

50376
1990
140

70241

50376
1990
140

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES-ARTOIS
U.F.R. DE BIOLOGIE

Année : 1990

Numéro d'ordre : 581

THESE

présentée à l'université de Lille I
pour l'obtention du grade de
docteur en Biologie.

par

Stéphane FLAMENT

**MISE EN EVIDENCE DE PROTEINES TAU ANORMALES
AU COURS DE LA DEGENERESCENCE NEUROFIBRILLAIRE
DE TYPE ALZHEIMER.**



présentée le 23 octobre 1990 devant le jury composé de :

Président :	Professeur H. PETIT
Rapporteurs :	Professeur B. LASSALLE Docteur P.-M. SINET
Examineurs :	Docteur F. JAVOY-AGID Docteur A. DELACOURTE.

A Laurence mon épouse,

à Thomas mon fils,

à mes parents,

à ma famille,

à mes amis,

à tous ceux qui m'ont aidé à la réalisation de cette thèse.

J'adresse mes remerciements au professeur Henri PETIT, qui m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse et sans qui ce travail n'aurait pu être effectué.

Qu'il me soit également permis d'exprimer toute ma gratitude aux docteurs France JAVOY-AGID et Pierre-Marie SINET qui ont contribué à la réalisation de ce travail et ont accepté de le juger.

Docteur André DELACOURTE.

Vous m'avez accordé votre confiance en m'accueillant dans votre laboratoire alors que ma première année de thèse avait débuté et avez toujours oeuvré dans ce sens par la suite..

Au cours de ces deux années, j'ai découvert que consacrer sa vie à la recherche n'était pas chose aisée. Votre combativité, votre dynamisme et votre optimisme resteront toujours pour moi un exemple.

Je suis très fier d'avoir pu travailler dans un laboratoire dont la renommée internationale reflète le niveau scientifique.

Je n'oublierai jamais que je vous dois beaucoup.

Professeur Bernard LASSALLE.

Lorsque vous étiez mon tuteur de D.E.A., j'ai constaté que les qualités pédagogiques dont vous aviez fait preuve à l'occasion des enseignements que vous dispensiez en licence et en maîtrise, étaient doublées de qualités scientifiques indéniables.

De plus, votre disponibilité et votre gentillesse ont créé une ambiance idéale que tout jeune étudiant aimerait rencontrer lors de son intégration au monde de la recherche.

Depuis que j'ai quitté le laboratoire, vous avez continué à me soutenir et à montrer un grand intérêt à mon égard. Le fait que vous ayez accepté de juger ce travail en témoigne. Je vous en remercie infiniment.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance au Professeur Pierre DEGAND pour m'avoir accueilli à l'unité INSERM n°16 et m'avoir permis de réaliser ce travail.

Docteur André DEFOSSEZ.

Une partie de ce travail a pu être menée à bien grâce à votre collaboration et à votre compétence. Je vous remercie pour votre disponibilité et le bon accueil que vous m'avez toujours réservé. Nos discussions ont toujours été enrichissantes.

Brigitte HEMON.

J'ai beaucoup apprécié ces deux années pendant lesquelles j'ai travaillé à tes côtés. Tu as toujours fait preuve de compétence et de disponibilité. Ta gentillesse et ta bonne humeur ont rendu mon séjour au laboratoire plus agréable encore.

Je remercie également :

- Bernard SABLONNIERE qui m'a apporté son aide et ses compétences dans le domaine de la synthèse peptidique,

- Pirouz SHIRALI qui a toujours porté un grand intérêt à mon travail et qui a participé aux études de microscopie électronique,

- Luc BUEE pour l'amitié qu'il m'a toujours témoignée et les discussions que nous avons eues.

J'adresse également mes remerciements à Valérie, Pierre-Eric, Dibe, Laurent, Bertrand, Marie-Claire, Rose-Marie, Myriam, Claude, Françoise, Anne-Sophie.

Une partie du travail présenté ici a été récompensée en 1989, par le prix de l'association "France Alzheimer", dont le comité scientifique est composé de : Y. Agid, J-L Albarède, H. Allain, N. Baumann, J-P Changeux, F. Forette, J-J Hauw, R. Hugonot, Y. Lamour, M. Le Moal, J. Mallet, J. Mikol, M. Poncet, J-L. Signoret, E. Zarifian.

Ce travail a donné lieu aux publications suivantes :

(1) - Direct biochemical evidence for an abnormal phosphorylation of Tau proteins during Alzheimer's disease. C. R. Acad. Sci. Paris, t. 308, Série III, p. 77-82, 1989.

S. Flament, A. Delacourte, B. Hémon, A. Défossez.

(2) - Abnormal Tau species are produced during Alzheimer's disease neurodegenerating process. FEBS Letters. 247 : 213-216, 1989.

S. Flament, A. Delacourte.

(3) - Characterization of two pathological Tau protein variants in Alzheimer brain cortices. J. Neurol. Sci. 92 : 133-141, 1989.

S. Flament, A. Delacourte, B. Hémon, A. Défossez.

(4) - Phosphorylation of Tau proteins : a major event during the process of neurofibrillary degeneration. (A comparative study between Alzheimer's disease and Down's syndrome.) Brain Res. 516 : 15-19, 1990.

S. Flament, A. Delacourte, D.M.A. Mann.

(5) - Correlation between microscopical changes and Tau 64,69 biochemical detection in senile dementia of the alzheimer type. Tau 64 and 69 are reliable markers of the neurofibrillary degeneration. Acta Neuropathologica 80 : 212-215, 1990.

S. Flament, A. Delacourte, P. Delaère, C. Duyckaerts, J-J Hauw.

(6) - Tau marker? Nature 346 : 22, 1990.

S. Flament, A. Delacourte.

(7) - Pathological proteins Tau 64 and 69 are specifically expressed in the somatodendritic domain of the degenerating cortical neurons during Alzheimer's disease: demonstration with a panel of antibodies against Tau proteins. Acta neuropathol. 80 : 111-117, 1990.

A. Delacourte, S. Flament, EM. Dibe, P. Hublau, B. Sablonnière, B. Hémon, V. Sherrer, A. Défossez.

(8) - Vers la mise au point d'un modèle d'étude in vitro de la dégénérescence neurofibrillaire de type Alzheimer. Press. Med. 19 : 170-173, 1990.

A. Delacourte, S. Flament, A. Défossez.

(9) - Qualitative and quantitative comparison of brain proteins in Alzheimer's disease. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 370 : 1229-1234, 1989.

L. Buée, A. Laine, A. Delacourte, S. Flament, K-K. Han.

Généralités.

1. Aspects cliniques.....	2
1.1. Evolution des idées.....	2
1.2. La maladie d'Alzheimer.....	2
1.3. Intérêt porté à la maladie d'Alzheimer.....	3
1.4. Aspects cliniques de la maladie d'Alzheimer.....	5
1.4.1. Les fonctions mnésiques.....	5
1.4.2. Les fonctions organisatrices : raisonnement et jugement.....	5
1.4.3. Les fonctions verbales.....	6
1.4.4. Les fonctions perceptivo-motrices : gnosies et praxies.....	6
1.4.5. Autres troubles neurologiques.....	7
1.4.6. Diagnostic différentiel : les autres démences.....	8
1.4.6.1. Les pseudo-démences dépressives.....	8
1.4.6.2. Les démences organiques.....	8
1.4.6.2.1. Les démences organiques traitables et éventuellement curables.....	8
1.4.6.2.2. Les démences infectieuses.....	9
1.4.6.2.3. Les démences vasculaires.....	9
1.4.6.2.4. Les démences organiques dégénératives.....	10
1.5. Les tests utilisés en clinique.....	11
1.5.1. Leurs buts.....	11
1.5.2. Les types de tests.....	13
1.6. Arguments paracliniques.....	15
1.6.1. Electroencéphalogramme.....	15
1.6.2. L'imagerie médicale.....	15
1.6.2.1. Le scanner X.....	15
1.6.2.2. L'imagerie par résonance magnétique nucléaire.....	15
1.6.2.3. La tomographie d'émission monophotonique.....	16
1.6.2.4. La tomographie par émission de positons.....	16
1.6.3. Les examens du sang et du liquide céphalo-rachidien.....	17
1.7. Les critères du N.I.N.C.D.S.- A.D.R.D.A.....	17
1.8. Sous-groupes de maladie d'Alzheimer.....	17
2. Aspects neuropathologiques.....	19
2.1. L'atrophie cérébrale.....	19
2.1.1. Données macroscopiques.....	19

2.1.1.1. Au cours du vieillissement normal.....	19
2.1.1.2. Dans la maladie d'Alzheimer.	19
2.1.2. Les comptages cellulaires.....	20
2.1.2.1. Vieillissement normal.....	20
2.1.2.2. Maladie d'Alzheimer.....	21
2.2. Les dépôts de substance amyloïde.....	22
2.2.1. Définition, mise en évidence, ultrastructure.....	22
2.2.2. Nature biochimique.	23
2.2.3. Les composants mineurs de la substance amyloïde.	24
2.2.4. Les différents types de dépôts et leur distribution.	24
2.2.4.1. Apport de l'immunohistochimie.....	24
2.2.4.2. Apport des techniques d'amplification.	25
2.3. La dégénérescence granulo-vacuolaire.	28
2.4. La dégénérescence neurofibrillaire.....	28
2.4.1. Définition, mise en évidence et ultrastructure.	28
2.4.2. Nature biochimique.	29
2.4.3. Constituants mineurs.....	30
2.4.4. Distribution.....	31
2.4.5. Relation entre les différentes maladies neurodégénératives.	33
2.5. Corrélations entre démence et lésions histopathologiques.	33
2.6. Les différentes hypothèses étiopathogéniques.	34
2.6.1. Rôle des dépôts de substance amyloïde.....	34
2.6.2. Hypothèse neurochimique.....	35
2.6.3. Hypothèse génétique.....	37
2.6.4. Autres hypothèses.....	39

Etude des protéines tau cérébrales par immuno-transfert.

1. Les microtubules.....	41
1.1. Mise en évidence.....	41
1.2. Fonctions.....	41
1.3. Nature biochimique.....	42
1.4. Les protéines associées aux microtubules.	44
2. Les protéines tau.	45
2.1. Propriétés physico-chimiques.....	45
2.2. Origine de l'hétérogénéité des protéines tau.	45
2.2.1. Au niveau post-traductionnel : la phosphorylation.	46
2.2.2. Au niveau génomique.....	46
2.3. Rôle et mode d'action des protéines tau.....	47

2.3.1. Interaction avec les microtubules.....	47
2.3.2. Interaction avec les autres éléments du cytosquelette.....	48
2.4. Régulation de l'action des protéines tau.....	49
2.4.1. La calmoduline.....	49
2.4.2. La phosphorylation.....	49
2.5. Localisation tissulaire.....	49
2.6. Localisation cellulaire.....	50
3. Les protéines tau et la maladie d'Alzheimer.....	50
4. Résultats personnels.....	51
4.1. Méthodologie.....	51
4.2. Etude des protéines tau de différentes régions cérébrales provenant d'un malade et d'un témoin de même âge.....	53
4.3. Etude d'un plus grand nombre de cas.....	55
4.4. Comparaison substance grise substance blanche.....	57
4.5. Nature des protéines de 64 et 69 kDa.....	59
4.6. Les protéines tau 64 et 69 sont elles des marqueurs fiables de la DNF ?.....	62
4.7. Mise en évidence d'une troisième protéine tau pathologique.....	66
4.8. Application au diagnostic de maladie d'Alzheimer.....	68
4.8.1. Etude du liquide céphalorachidien.....	68
4.8.2. Etude de biopsies cérébrales.....	70
4.9. Caractérisation des protéines tau 55, 64 et 69.....	72
4.9.1. Purification.....	72
4.9.2. Effets des agents réducteurs.....	73
4.9.3. Traitement à la phosphatase alcaline.....	75
4.10. Le vieillissement sans démence.....	78
4.11. La trisomie 21.....	80
4.12. La maladie de Pick.....	86
4.13. La paralysie supranucléaire progressive.....	88
5. Conclusions et perspectives.....	93
Modèle in vitro.	
1. Choix des cellules.....	103
1.1. Méthodologie.....	103
1.2. Description de la culture.....	103
1.2.1. Les cellules en prolifération.....	103
1.2.2. Les cellules différenciées.....	104
1.3. Etude des protéines tau des cellules SK-N-SH.....	109
2. Addition d'extraits de cerveau.....	109

3. Les phosphorylations in vitro.	112
3.1. Activation de la protéine kinase C par addition d'esters de phorbol.	112
3.2. Activation de la protéine kinase A par addition de forskoline.	113
4. Hypothèse toxique : rôle de l'aluminium.....	115
4.1. Aluminium sous forme soluble.	115
4.2. Aluminium sous forme insoluble.....	116
5. Le modèle de la trisomie 21 : la superoxyde dismutase Cu/Zn dépendante (SOD 1).	122
5.1. La SOD 1 et les radicaux libres.	122
5.2. Implication de la SOD 1 dans la maladie d'Alzheimer.....	123
5.3. Obtention d'une lignée de souris transgéniques pour la SOD 1.....	124
5.4. Etude des protéines tau.....	125
6. Conclusions et perspectives.	127

Matériel et méthodes.

1. Solution réductrice de Laemmli (Laemmli 1970).....	131
2. Electrophorèse en présence de SDS.	131
3. Electrophorèse bidimensionnelle.....	133
4. Transfert des protéines sur feuille de nitrocellulose.....	134
5. Application des immunosérums sur les feuilles de nitrocellulose.....	135
6. Histologie.....	136
6.1. Fixation du tissu et réalisation des coupes.....	136
6.2. Immunohistochimie.	136
6.3. Coloration à la thioflavine S.....	137
7. Synthèse peptidique.	137
7.1. Greffe du premier acide aminé sur la résine.	137
7.1.1. Réalisation d'un sel de césium.....	137
7.1.2. Préparation de la résine.	139
7.1.3. Couplage de l'acide aminé à la résine.....	139
7.2. Autres étapes de la synthèse.....	140
7.2.1. Déprotection.....	140
7.2.2. Neutralisation.....	140
7.2.3. Activation et couplage.....	141
7.2.3.1. Méthode des anhydrides symétriques.	141
7.2.3.2. Méthode des esters activés.....	141
7.3. Coupure de la liaison peptide-résine.....	143
7.4. Purification.....	144
7.5. Couplage à l'ovalbumine.	144

7.5.1. Méthode au glutaraldéhyde.....	144
7.5.2. Méthode au SMCC.....	146
7.6. Contrôles.	146
7.7. Immunisation des lapins.....	148
8. Culture des cellules SK-N-SH.....	148
8.1. Détachement.....	148
8.2. Congélation.....	149
8.3. Repiquage.	149
8.3.1. Prolifération.....	149
8.3.2. Différenciation.....	150
8.3.3. Milieu défini.....	150
9. Coloration des cellules au violet cristallin.....	150
10. Ecrasements tissulaires ou " squashes ".....	151
11. Analyse d'images.....	151
12. Microscopie électronique à balayage.....	153
13. Microscopie électronique à transmission.....	154
Annexes.....	156
Bibliographie.....	162

RESUME

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative caractérisée par une démence liée à la dégénérescence d'un grand nombre de cellules pyramidales dans le néocortex associatif et l'hippocampe. Cette dégénérescence est dite neurofibrillaire (DNF), en raison de l'accumulation cytoplasmique de paquets de fibrilles qui, en microscopie électronique, se présentent sous la forme de paires hélicoïdales de filaments (PHF). Les protéines tau, facteurs de polymérisation des microtubules, sont les constituants antigéniques et structuraux majeurs de ces PHF, mais la raison de leur incorporation dans ces filaments reste inconnue. L'hypothèse d'une phosphorylation anormale de ces protéines a été émise mais reste controversée.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons comparé les protéines tau du cerveau de malades d'Alzheimer à celles de cerveaux témoins par la technique des immuno-transferts grâce à trois immunsérums : anti-tau, anti-PHF et anti-PHF épuisé.

Nous avons ainsi découvert dans la substance grise des régions affectées par la DNF, trois variants de protéines tau dont le poids moléculaire élevé (55, 64 et 69 kDa) résulte d'une phosphorylation anormale. Une étude en aveugle a confirmé qu'elles étaient des marqueurs fiables de la DNF. Les protéines tau 55, 64 et 69 n'ont pas été retrouvées dans le liquide céphalo-rachidien des patients atteints de maladie d'Alzheimer. Leur présence dans deux biopsies cérébrales réalisées chez des patients montrant les premiers signes d'une démence atypique suggère qu'elles sont des marqueurs précoces de la DNF.

Ces trois protéines ont également été détectées dans le cerveau des trisomiques 21 qui présentent une DNF semblable à celle de la maladie d'Alzheimer. L'étude de la trisomie 21 pourrait donc contribuer à la compréhension des mécanismes neurodégénératifs de la maladie d'Alzheimer. Par contre, dans les affections neurodégénératives comme la maladie de Pick ou la paralysie supranucléaire progressive, où les filaments anormaux qui s'accumulent dans les neurones en dégénérescence ne sont pas des PHF mais des filaments droits, des protéines tau anormales sont également produites, mais elles diffèrent des protéines tau 55, 64 et 69.

Nous avons tenté de mettre au point un modèle expérimental de la DNF basé sur l'induction d'une modification du profil électrophorétique des protéines tau de cellules de neuroblastomes humains en culture. Ni l'addition d'extraits de cerveaux malades, ni l'addition d'activateurs des protéines kinases A ou C, ni l'addition d'aluminium, n'ont permis d'induire un tel changement. Le profil électrophorétique des protéines tau cérébrales de souris transgéniques pour le gène de la SOD 1 (enzyme codée par un gène situé sur le chromosome 21 dans la zone obligatoire de la trisomie 21) est identique à celui de souris témoins de même âge.

Nos résultats confirment donc l'hypothèse d'une phosphorylation anormale des protéines tau au cours de la maladie d'Alzheimer. Les protéines tau 55, 64 et 69, caractéristiques de la DNF de type Alzheimer sont d'un grand intérêt car outre leur valeur diagnostique, elles permettent d'envisager l'élaboration d'un modèle expérimental d'étude de la DNF, préalable indispensable à la mise au point d'une thérapeutique efficace.

Généralités.

Comment parler de travaux de recherche fondamentale concernant la maladie d'Alzheimer sans aborder les aspects cliniques ?

Ne possédant malheureusement aucune expérience en la matière et n'ayant jamais rencontré de malades ou de personnes vivant dans leur entourage, nous nous sommes inspirés de plusieurs ouvrages dont la liste se trouve à la fin du manuscrit, et c'est volontairement que les références bibliographiques concernant la clinique ont été omises.

Au cours de la première partie de ce chapitre nous rapportons la présentation qu'Aloïs Alzheimer avait faite sur la maladie qui portera plus tard son nom, nous analysons ensuite la démence et les différentes affections où elle peut être rencontrée, et finalement nous décrivons les outils dont dispose le clinicien pour le diagnostic de l'affection qui ne peut à l'heure actuelle, être affirmé en l'absence des preuves anatomo-pathologiques fournies lors de l'autopsie.

Nous présentons ensuite les modifications anatomo-pathologiques caractéristiques de l'affection : atrophie cérébrale et perte neuronale, dépôts de substance amyloïde et dégénérescence neurofibrillaire.

Enfin, nous exposons les raisons qui nous ont amené à étudier les protéines tau, protéines constitutives des filaments anormaux qui s'accumulent dans les cellules nerveuses cérébrales en dégénérescence.

1. Aspects cliniques.

1.1. Evolution des idées.

Au siècle dernier, la démence observée chez les personnes âgées était considérée par les médecins et l'entourage du malade comme dans l'ordre normal des choses. Bien que non obligatoire, cette involution s'inscrivait dans le cadre d'une fatalité liée à la "condition humaine, à l'issue normale du temps, à la fameuse artériosclérose".

Par la suite, les concepts ont peu à peu changé.

La démence dégénérative primaire a été isolée de la démence vasculaire et l'on a considéré que les lésions des cellules nerveuses pouvaient ne pas être le résultat des lésions vasculaires.

Il a été également reconnu qu'à côté du vieillissement normal, sans altérations des fonctions intellectuelles et avec des cellules saines d'aspect tout à fait analogue à celui des cellules jeunes, existait un état pathologique démentiel caractérisé sur le plan anatomo-pathologique par la présence au sein du cortex cérébral :

- de nombreuses cellules nerveuses altérées, soit atrophiées, soit d'aspect extérieur normal mais contenant un réseau neurofibrillaire modifié,
- d'une "sclérose miliaire" représentée par des petits amas ronds à contours réguliers appelés plaques miliaires (futures plaques séniles).

1.2. La maladie d'Alzheimer.

Le 8 novembre 1906, alors qu'il travaille à Munich, Aloïs Alzheimer présente à Tubingen une conférence intitulée "sur une maladie particulière du cortex cérébral". Il y rapportait les résultats de l'étude anatomo-pathologique du cerveau d'une malade hospitalisée à Francfort.

Alzheimer en rapporte d'abord l'histoire : évolution en 4 à 5 ans, à partir de 51 ans, selon un tableau caractérisé par un trouble progressif de la mémoire, des troubles de l'orientation spatiale puis temporelle, des idées délirantes puis des hallucinations.

La malade présentait des troubles aphasiques tels que manque du mot, paraphasies (substitution de mots les uns aux autres), des difficultés pour lire et surtout pour écrire, ainsi que des troubles apraxiques (elle ne savait plus utiliser certains objets).

A l'autopsie, le cerveau était atrophique. Sur les coupes histologiques traitées selon la méthode de Bielschowsky (imprégnation argentique) étaient observées des modifications particulières des neurones : accumulation de neurofibrilles d'épaisseur inhabituelle et regroupées en paquets. Le cortex cérébral présentait également de nombreuses plaques miliaries, constituées d'une substance homogène non argentophile. Devant cette observation, Alzheimer conclura en faveur d'un processus pathologique spécifique et proposera pour expliquer l'aspect fibrillaire de la dégénérescence neuronale, l'effet d'une transformation chimique des neurofibrilles.

Kraepelin, quelques années plus tard, donnera à cette maladie le nom de celui qui l'avait décrite pour la première fois : maladie d'Alzheimer.

Le terme de maladie d'Alzheimer a longtemps été réservé aux formes pathologiques affectant les personnes jeunes (forme présénile de l'affection) par opposition aux démences séniles de type Alzheimer qui présentaient les mêmes caractéristiques mais étaient observées chez les personnes âgées. Il est vraisemblable que cette affection ait d'abord été considérée comme rare par la communauté médicale parce que réduite aux formes survenant chez des sujets adultes relativement jeunes.

Actuellement, l'appellation "maladie d'Alzheimer" regroupe à la fois les formes préséniles et séniles.

1.3. Intérêt porté à la maladie d'Alzheimer.

L'amélioration des soins et la réduction de l'incidence des maladies infectieuses puis des affections cardio-vasculaires ont entraîné une augmentation de l'espérance de vie : en un peu plus d'un siècle, elle est passée de 40 à 75 ans.

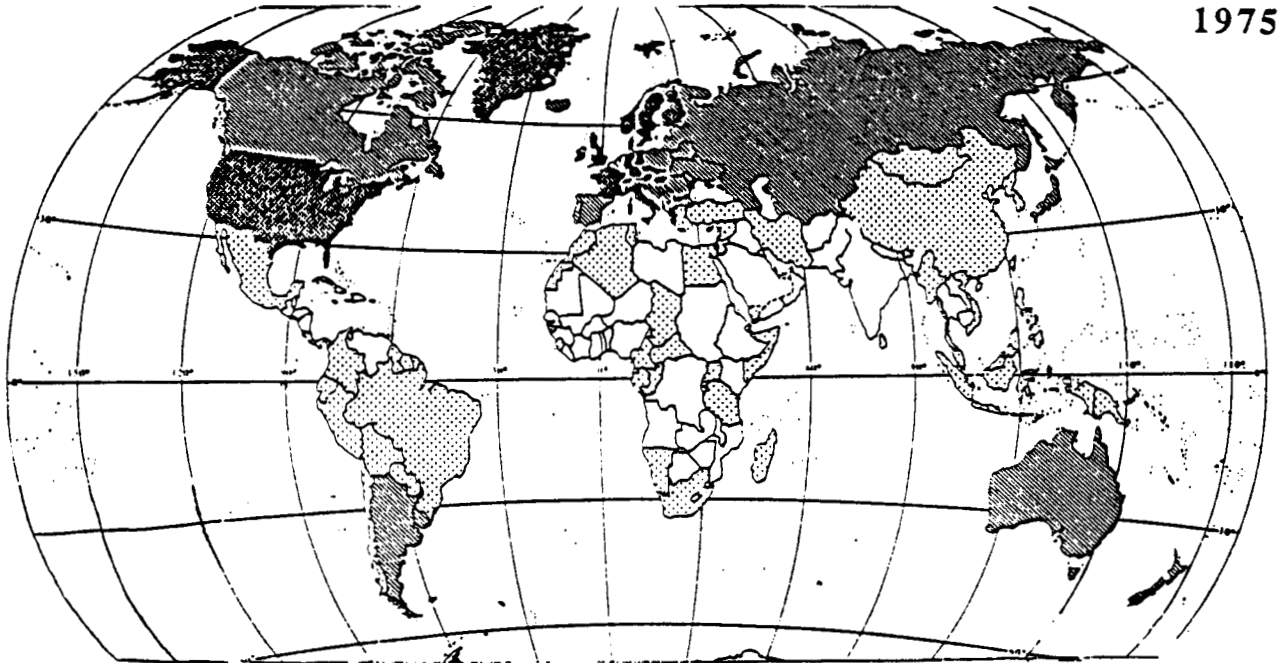
Ce vieillissement de la population donne à la maladie d'Alzheimer un avenir redoutable : on a pu l'appeler "l'épidémie silencieuse" ou encore "la peste noire du 20^{ème} siècle". En effet, elle affecte 5 % des sujets âgés de plus de 60 ans et 20 % des octagénaires. A côté des grands ténors tels que cancers, maladies cardio-vasculaires et accidents de la route, la maladie d'Alzheimer est l'outsider. Elle est en passe de devenir la plus grande cause d'invalidité et de morbidité. Ceci explique l'intérêt considérable qui est porté aujourd'hui à la maladie d'Alzheimer.

En raison des efforts et des moyens déployés au cours de la dernière décennie, un grand nombre de découvertes fondamentales ont été réalisées, surtout dans le domaine de la biochimie des lésions caractéristiques de l'affection. Cependant, cette meilleure connaissance de la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer n'a pas encore permis de mettre au point un test biologique fiable permettant de conforter le

Figure 1 : pourcentage de la population mondiale âgée de plus de 60 ans.

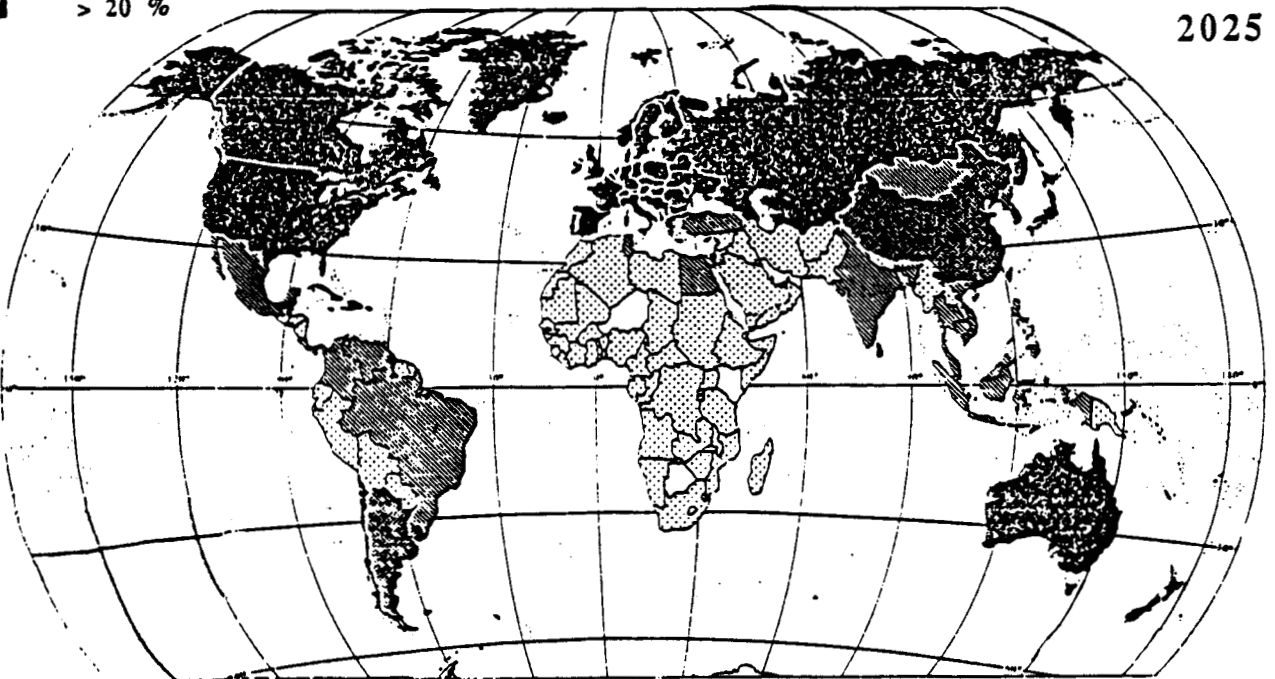
Le vieillissement de la population donne à la maladie d'Alzheimer un avenir redoutable.

1975



< 5 %
5 - 9 %
10 - 14 %
15 - 19 %
> 20 %

2025



(d'après la revue " Maladie d'Alzheimer " - 4^{ème} édition, de la fondation IPSEN).

diagnostic clinique et n'a toujours pas abouti à la conception d'une thérapeutique adaptée laquelle fait actuellement cruellement défaut.

1.4. Aspects cliniques de la maladie d'Alzheimer.

Comme nous venons de le voir dans la description faite par Aloïs Alzheimer, l'expression clinique de cette maladie est caractérisée par des troubles mentaux affectant les fonctions intellectuelles : troubles mnésiques, gnosiques, praxiques et phasiques.

1.4.1. Les fonctions mnésiques.

Elles consistent à apprendre, conserver et utiliser des informations.

Les troubles de la mémoire sont constants et sont en général la première manifestation clinique de la maladie d'Alzheimer. Les patients ou le plus souvent leur entourage, se plaignent d'oublis concernant des faits de la vie quotidienne (noms propres, consignes, rendez-vous, place d'objets usuels). Ces troubles mnésiques peuvent rester longtemps isolés (sans atteinte des autres fonctions cognitives) et sont difficilement différenciés de l'oubli bénin lié à l'âge, où le terme oublié est retrouvé dans les minutes qui suivent. Dans la maladie d'Alzheimer, la première manifestation de ces troubles de mémoire est la répétition de questions.

La mémoire biographique, représentée par la capacité à reconstituer une partie de notre vie, semble longtemps préservée au cours de la maladie d'Alzheimer, mais cela n'est qu'une apparence car de nombreux détails manquent.

La mémoire culturelle ou sémantique est plus tardivement touchée.

1.4.2. Les fonctions organisatrices : raisonnement et jugement.

Un sujet normal, lorsqu'il est soumis à une épreuve mettant en jeu l'intelligence, organise les différentes données selon un plan et un ordre logique (raisonnement) afin de trouver la solution du problème et ensuite la critiquer (jugement). Le patient atteint de maladie d'Alzheimer, soumis à une telle épreuve, réagit lentement, avec perplexité, distractibilité et manque d'initiative.

1.4.3. Les fonctions verbales.

Elles consistent à acquérir, produire et comprendre les signes d'un langage.

Il est fréquent d'observer des troubles du langage chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer : manque du mot, troubles de la compréhension verbale, troubles de l'expression avec réduction du discours et paraphasies.

1.4.4. Les fonctions perceptivo-motrices : gnosies et praxies.

Elles consistent en la reconnaissance et l'identification de formes et d'objets, et en la constitution d'un répertoire de gestes pour utiliser ces objets et communiquer.

On distingue différents types de troubles apraxiques.

L'apraxie constructive est la première à apparaître au cours de la maladie d'Alzheimer. Elle correspond à la perte progressive de la perspective du cube lors de la copie ; le patient dessine 2 carrés puis un seul.

L'apraxie réflexive correspond à la difficulté de reproduire des postures ou des mouvements des mains.

Lors d'une apraxie idéatoire ou idéo-motrice, le patient ne peut mimer l'utilisation d'un objet et ne peut ultérieurement utiliser cet objet avec ou sans démonstration préalable.

Lors d'une apraxie de l'habillement, il existe une altération de l'ordre dans lequel les habits sont mis.

Les troubles agnosiques correspondent à une impossibilité de reconnaître un objet par l'intermédiaire de l'un des sens.

L'agnosie visuelle est le trouble le plus souvent identifié mais il faut signaler qu'il existe aussi des troubles de la reconnaissance tactile.

Les activités mnésiques et organisatrices sont en relation avec le monde extérieur de l'individu et ont besoin des activités perceptivo-motrices et verbales pour s'exprimer au monde extérieur. Les activités verbales, organisatrices et perceptivo-motrices peuvent agir sur les activités mnésiques. Par exemple, trouver des rapports entre plusieurs objets (activité organisatrice) peut aider au souvenir de ces objets (activité mnésique). L'interdépendance entre activités mnésiques et autres activités cognitives existe aussi dans l'autre sens. Par exemple, le fait d'apprendre des mots nouveaux (mnésie) pourra influencer les activités verbales.

Lorsqu'une fonction cognitive est affectée, il peut s'agir d'un trouble isolé ou alors d'un trouble associé à d'autres désordres affectant le fonctionnement intellectuel. C'est cette association entre un trouble de mémoire et un autre désordre cognitif qui définit un état démentiel.

La variété des troubles de mémoire est liée au fait que la mémoire repose sur plusieurs autres activités cognitives.

1.4.5. Autres troubles neurologiques.

A côté des troubles qui affectent les fonctions cognitives et qui de ce fait, définissent la maladie d'Alzheimer, il peut exister d'autres signes neurologiques non spécifiques mais qui sont fréquemment rencontrés dans la maladie d'Alzheimer. Classiquement, ces signes étaient considérés comme absents dans la maladie d'Alzheimer. En fait, des études systématiques, comparant des malades à des sujets normaux appariés par l'âge, ont montré leur plus grande fréquence dans la maladie d'Alzheimer que dans la population générale. Les réflexes archaïques sont parfois observés chez les patients (réflexe de la moue, de préhension, d'agrippement, de succion). Des déficits olfactifs ont également été décrits ainsi que des troubles de la marche.

Ces signes ne constituent jamais un mode de révélation.

Il faut aussi signaler l'existence de troubles psychiatriques tels que :

- des troubles de l'humeur (un syndrome dépressif peut en effet survenir au début de la maladie),
- des troubles du comportement (des modifications du caractère peuvent apparaître avec de l'irritabilité ou de l'agressivité),
- à des stades plus évolués on peut rencontrer un délire qui le plus souvent a pour thème la persécution.

Certains patients sont agités, surtout la nuit pendant laquelle ils déambulent. D'autres sont apathiques, le comportement alimentaire étant d'une manière générale perturbé dans le sens d'une anorexie et rarement d'une boulimie.

L'importance des troubles psychiatriques est souvent minimisée dans la maladie d'Alzheimer. Cependant, c'est leur manifestation qui rend la vie impossible à la famille et à l'entourage des patients.

1.4.6. Diagnostic différentiel : les autres démences.

Une démence est un affaiblissement acquis et global des fonctions intellectuelles. Cependant, une démence peut être observée dans des conditions autres que la maladie d'Alzheimer.

1.4.6.1. Les pseudo-démences dépressives.

Sont regroupées ici différentes situations comme tristesse de l'humeur, tendance à l'auto-dépréciation, anxiété... Les changements sont plus subjectifs qu'objectifs, les patients faisant eux-mêmes volontiers état des signes somatiques de leur dépression. Elles sont curables sans traitement spécifique.

1.4.6.2. Les démences organiques.

1.4.6.2.1. Les démences organiques traitables et éventuellement curables.

Les causes peuvent être mécaniques.

C'est le cas lors de contusions, de traumatismes. La démence pugilistique ou démence des boxeurs en est un exemple. Chez ces personnes, on observe une atteinte intellectuelle progressive plusieurs années après l'arrêt des combats, atteinte qui fait suite à des troubles du caractère et du comportement.

C'est aussi le cas lors d'un hématome sous-dural. Celui-ci peut se manifester plusieurs semaines ou mois après un traumatisme minime et entraîner une démence progressive.

C'est également le cas lors de tumeurs. Celles-ci sont parfois révélées par un syndrome démentiel, surtout les tumeurs prérolandiques responsables d'un syndrome frontal.

Les causes peuvent être toxiques.

Par exemple, les complications neurologiques centrales de l'alcoolisme sont bien connues.

Les causes peuvent être carencielles.

Les carences vitaminiques entraînent exceptionnellement un véritable état démentiel qu'il s'agisse de la carence en folates ou en vitamine PP.

Les troubles intellectuels rencontrés en cas de carence en vitamine B12 ne signifient pas une véritable démence : il n'existe que des troubles de la mémoire et de l'attention.

Les causes peuvent être métaboliques endocriniennes.

La découverte d'une hypothyroïdie est fréquente chez les femmes de 50-60 ans, la symptomatologie en étant un ralentissement psychomoteur, des troubles de la concentration intellectuelle mais les capacités mnésiques sont longtemps préservées de même que les fonctions intellectuelles.

1.4.6.2.2. Les démences infectieuses.

Nous ne développerons ici que la maladie de Creutzfeldt-Jacob en sachant qu'il existe d'autres pathologies infectieuses (syphilis, Kuru, SIDA...) où l'on peut rencontrer une démence.

La maladie de Creutzfeldt-Jacob est une affection rare (1 cas sur 1000000 par an) qui a des similitudes d'âge d'installation avec la maladie d'Alzheimer et provoque une démence évoluant rapidement vers la mort (1 an). Elle peut être familiale, avec transmission autosomique dominante. Mais surtout, et ce contrairement à la maladie d'Alzheimer, elle est transmissible aux primates par injection intra-cérébrale d'extraits purifiés de tissus cérébraux infectés. Par des centrifugations différentielles, on a pu obtenir des fractions au pouvoir infectieux augmenté, dont on a isolé l'agent infectieux appelé prion : celui-ci résiste aux processus inactivant les acides nucléiques mais il est détruit par la protéinase K. Une protéine de 27 à 30000 Da a été isolée à partir des prions, le gène codant pour cette protéine étant situé sur le chromosome 20 et les ARN messagers étant exprimés au plus fort taux dans les neurones. Les prions peuvent s'agréger sous forme de bâtonnets biréfringents possédant tous les caractères physico-chimiques de la substance amyloïde. On n'a jamais pu mettre en évidence d'acide nucléique au sein des prions ; ceci implique qu'ils se multiplient selon un mécanisme original qui demeure hypothétique.

1.4.6.2.3. Les démences vasculaires.

La principale cause de démence vasculaire est celle liée à des hémorragies ou à des infarctus cérébraux multiples quelle qu'en soit l'origine. Ils peuvent se produire sans traduction clinique majeure avant l'apparition de l'atteinte intellectuelle.

1.4.6.2.4. Les démences organiques dégénératives.

Elles peuvent être à prédominance corticale.

Lorsque l'âge d'installation est supérieur à 65 ans, on parle de démence sénile de type Alzheimer.

Lorsque l'âge d'installation est inférieur à 65 ans, cela peut être outre la maladie d'Alzheimer :

- la trisomie 21 ; les mongoliens, nous y reviendrons ultérieurement, lorsqu'ils vivent au-delà de 35-40 ans, développent des lésions cérébrales identiques à celles de la maladie d'Alzheimer et une détérioration intellectuelle est observée chez ces patients.

- la maladie de Pick caractérisée par une atteinte frontale se traduisant sur le plan clinique par une diminution de l'activité et des comportements stéréotypés, les fonctions intellectuelles et la mémoire étant relativement épargnées. Des troubles de la marche et de la posture sont observés.

Elles peuvent être à prédominance sous-corticale.

Ce peut être la Paralyse supranucléaire progressive ou maladie de Steele Richardson Olzewski qui associe un syndrome Parkinsonien à prédominance axiale, une paralysie de la verticalité vers le bas dans les mouvements oculaires volontaires et une démence légère. On observe chez les patients une lenteur du fonctionnement intellectuel. Les lésions (dégénérescence neurofibrillaire, perte neuronale et gliose) sont localisées surtout au niveau du tronc cérébral et des noyaux de la base du cerveau.

Ce peut être la Chorée de Huntington où la démence a toujours été considérée comme un élément important du tableau clinique avec les mouvements choréiques (involontaires). En raison du caractère très progressif de l'atteinte mnésique sans troubles aphasiques, il est rare que se pose la question de diagnostic différentiel avec la maladie d'Alzheimer.

Ce peut être la maladie de Parkinson. Elle est assez proche de la maladie d'Alzheimer car d'une part, 20% des maladies de Parkinson peuvent avoir une évolution démentielle et d'autre part, dans 33% des maladies d'Alzheimer, en fin d'évolution, une akinésie et une hypertonie de type Parkinsonien peuvent être observées. Sur le plan neurobiologique, les deux affections ont en commun une atteinte du noyau basal de Meynert avec perte neuronale et diminution de l'acétylcholine transférase. De plus des corps de Lewy (inclusions neuronales caractéristiques de la maladie de Parkinson) sont décrits dans les noyaux du tronc cérébral chez 10% des malades d'Alzheimer tandis que des neurones en dégénérescence neurofibrillaire

sont observés dans l'hippocampe de 60% des patients atteints de maladie de Parkinson. Cependant, dans une population témoin de plus de 65 ans, on retrouve ces pourcentages de corps de Lewy et de neurones en dégénérescence neurofibrillaire. Les deux affections peuvent être observées chez un même patient mais leur développement simultané est peu fréquent.

1.5. Les tests utilisés en clinique.

Face à une détérioration intellectuelle, le praticien dispose d'outils de mesure. Ils sont très nombreux et il en existe deux grands types : les tests psychométriques et les échelles d'évaluation psychocomportementales.

1.5.1. Leurs buts.

Chaque test a des caractéristiques propres et des objectifs particuliers.

Affirmer la démence.

Il faut différencier les sujets sains des sujets déments et chez ces derniers éliminer les pseudo-déments d'origine dépressive.

Affirmer la maladie d'Alzheimer.

Un certain nombre de déments sur lesquels sont effectuées les études n'ont pas une maladie d'Alzheimer mais une démence d'une autre origine. Cette source d'erreur est souvent le fait des démences par infarctus multiples.

Quantifier les résultats.

Les échelles d'évaluation permettent de quantifier l'intensité des troubles. Il leur faut une bonne fidélité "inter-juges" (le même résultat doit être obtenu par deux évaluateurs différents) et "intra-juge" (le même résultat doit être obtenu par un même évaluateur à deux moments différents). Leur sensibilité doit être suffisante pour dépister des petites variations, mais pas trop grande pour limiter les artéfacts de mesure.

Cette quantification permet d'abord de constituer des groupes homogènes quant à la gravité. La maladie d'Alzheimer est d'évolution lente et progressive et des stades de sévérité croissante, qui ne font pas pour l'instant l'objet d'un consensus, se succèdent. C'est grâce à la quantification des troubles cognitifs que l'on a, par exemple, pu mettre en évidence une corrélation entre la sévérité de la maladie d'Alzheimer et l'atrophie cérébrale décelée par le scanner X.

CLASSIFICATION DES DÉMENCES

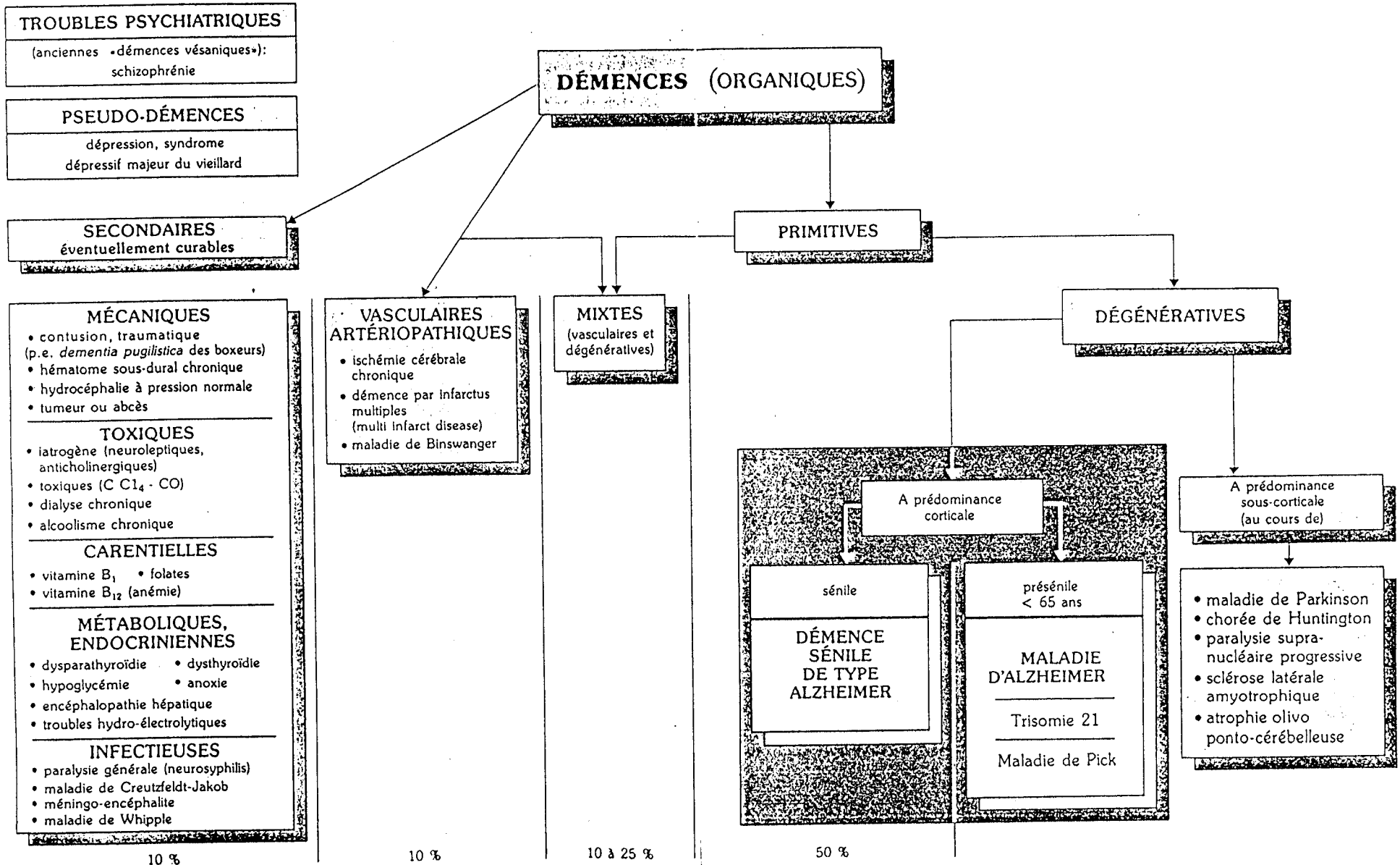


Figure 2 : classification des démences.

Un état démentiel peut être rencontré dans des affections autres que la maladie d'Alzheimer et le diagnostic clinique doit être posé avec précautions.

(d'après " Maladie d'Alzheimer " - 4^{ème} édition, de la fondation IPSEN).

Elle permet aussi d'apprécier des modifications au cours des essais thérapeutiques où il faut comparer non plus des sujets entre eux, mais un même sujet à différentes périodes. Cependant, il existe de multiples raisons pour lesquelles il est difficile de mesurer l'effet d'un traitement :

- on ne sait pas sur quelles manifestations agiront les médicaments et de ce fait il faut au départ des tests permettant de quantifier une multitude de variables, afin de ne pas négliger une amélioration qui ne concernerait qu'une partie des troubles ; il faut donc des tests de réalisation rapide variés et nombreux ;

- on ne connaît pas non plus l'évolution naturelle des tests psychométriques dans la maladie d'Alzheimer car à notre connaissance, aucune étude longitudinale n'a encore été réalisée à l'heure actuelle.

1.5.2. Les types de tests.

Deux tests sont principalement utilisés en clinique.

Le Mini Mental State.

Il analyse un éventail important de fonctions telles que orientation, apprentissage, calcul ou langage. Il a l'avantage de durer une dizaine de minutes et de ce fait, il peut être utilisé au cours d'une consultation.

Le score varie de 0 à 30. Une démence est dite légère lorsque le score est compris entre 15 et 25, modérée lorsqu'il est compris entre 5 et 15 et sévère quand il ne dépasse pas 5.

L'échelle de Blessed (Blessed et coll. en 1968).

Elle a été validée par la mise en évidence d'une corrélation entre les résultats qu'elle donne et la quantification des lésions neuropathologiques. Elle se divise en 2 sous-échelles :

- la sous-échelle B repose sur l'interrogation du malade et teste l'orientation (14 items), la mémoire (16 items) et l'attention (3 items) ;

- la sous-échelle A repose sur l'interrogation de l'entourage du malade et teste les modifications de la vie quotidienne (8 items), des habitudes (3 items), de la personnalité et du comportement du malade (11 items) ; ces 2 sous-échelles sont cotées en sens inverse : plus la démence est évoluée, plus le score est élevé à l'échelle A et bas à l'échelle B.

échelle de Blessed A (score de 0 à 28) :

NB : Entourer le chiffre correspondant à la réponse obtenue

A. INTERROGATOIRE DE L'ENTOURAGE

I. Modifications dans la réalisation des activités quotidiennes

	OUI - INCAPACITÉ COMPLÈTE	± INCAPACITÉ PARTIELLE VARIABLE DU INTERMÉDIAIRE	NON - CAPACITÉ ENTIÈREMENT PRÉSERVÉE
1. Incapable d'accomplir les tâches quotidiennes	1	0.5	0
2. Incapable de manipuler de petites sommes d'argent	1	0.5	0
3. Incapable de se rappeler une petite liste de mots, par exemple en faisant les courses	1	0.5	0
4. Incapable de se repérer dans son appartement	1	0.5	0
5. Incapable de trouver son chemin dans des rues familières	1	0.5	0
6. Incapable d'identifier l'environnement (comme par exemple savoir s'il est à l'hôpital ou à la maison)	1	0.5	0
7. Incapable de se rappeler les faits récents (par exemple les sorties récentes, les visites de parents ou d'amis, le menu de la veille)	1	0.5	0
8. Tendance à vivre dans le passé	1	0.5	0
TOTAL I			

II. Modifications des habitudes

9. <u>Alimentation</u> :			
Mange proprement avec les couverts appropriés		0	
Mange seulement en n'utilisant que sa cuillère		1	
Mange avec ses mains		2	
Doit être nourri		3	
10. <u>Habillage</u> :			
S'habille sans aide		0	
Parfois mal ajusté, mal boutonné		1	
Erreurs et oublis fréquents dans la séquence d'habillage		2	
Incapable de s'habiller seul		3	
11. <u>Contrôle sphinctérien</u> :			
Normal		0	
Urine parfois au lit		1	
Urine fréquemment au lit		2	
Double incontinence		3	
TOTAL II			

III. Modifications de la personnalité et du comportement

	OUI	NON
12. Augmentation de la rigidité mentale	1	0
13. Augmentation de l'égoïsme	1	0
14. Perte d'intérêt pour les sentiments d'autrui	1	0
15. Baisse de l'affectivité	1	0
16. Perte du contrôle émotionnel, comme par exemple susceptibilité et irritabilité excessives	1	0
17. Hilarité déplacée	1	0
18. Réponse émotionnelle diminuée	1	0
19. Inconduite sexuelle d'apparition récente	1	0
20. Abandon des distractions favorites	1	0
21. Perte des initiatives ou apathie croissante	1	0
22. Hyperactivité non justifiée	1	0
TOTAL III		
TOTAL I + II + III		

Plus le score est élevé, plus le déficit est prononcé.

échelle de Blessed B (score de 37 à 0) :

NB : Entourer le chiffre correspondant à la réponse obtenue

B. INTERROGATOIRE DU MALADE

I. Orientation

	FAUX	VRAI
Nom	0	1
Âge	0	1
Temps (heure)	0	1
Moment de la journée	0	1
Jour de la semaine	0	1
Date	0	1
Mois	0	1
Saison	0	1
Année	0	1
Adresse personnelle : rue	0	1
ville	0	1
code postal	0	1
Identification du lieu (« Où est-on ici ? »...)	0	1
Identification des personnes (femme de ménage, médecin, infirmière, patient, parent ; identification de 2 d'entre eux)	0	1
TOTAL I		

II. Mémoire

	FAUX	±	VRAI
1. <u>Mémoire des faits personnels</u> :			
Date de naissance	0		1
Lieu de naissance	0		1
École fréquentée	0		1
Profession (à défaut celle du conjoint)	0		1
Nom des parents ou du conjoint	0		1
Nom d'une ville où le patient a travaillé ou vécu	0		1
Nom des employeurs (à défaut celui du conjoint)	0		1
2. <u>Mémoire des faits non personnels</u> :			
Date de début de la Première Guerre mondiale } 1/2 point si la date	0	0.5	1
Date de début de la Deuxième Guerre mondiale } est exacte à 3 ans près	0	0.5	1
Nom du Président de la République	0		1
Nom du Premier ministre	0		1
3. <u>Épreuve de mémoire à court terme</u> : Monsieur Jean	0		1
Restituer après 5 mn, c'est-à-dire : BRUN	0		1
période d'apprentissage de 2 minutes 42	0		1
puis 2 essais de répétition. Passer rue de l'Ouest	0		1
au Ch. III ↓ pour procéder après à VÉSOU	0		1
la restitution du texte mémorisé.			
TOTAL II			

III. Attention, concentration

	FAUX	±	VRAI
Compter de 1 à 20	0	1	2
Compter de 20 à 1	0	1	2
Mois de l'année à l'envers	0	1	2
TOTAL III			

TOTAL I + II + III

Plus le score est bas, plus le déficit est prononcé.

* G. Blessed, B.E. Tomlinson, M. Roth.
The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects.
Brit. J. Psychiat., 1968, vol. 114, 797-811.

Figure 3 : l'échelle de Blessed.

Ce test est fréquemment utilisé par le clinicien afin d'évaluer l'état intellectuel du patient.

(d'après " Maladie d'Alzheimer " - 4^{ème} édition, de la fondation IPSEN).

1.6. Arguments paracliniques.

Comme nous venons de le voir, la reconstitution des antécédents et de l'histoire de la maladie, l'examen clinique et les tests neuropsychologiques permettent d'évoquer le diagnostic de maladie d'Alzheimer. Néanmoins, certains examens, bien que non spécifiques de l'affection, confortent ce diagnostic en permettant l'exclusion d'autres causes de démence.

1.6.1. Electroencéphalogramme.

L'électroencéphalogramme peut montrer une augmentation des ondes lentes qui s'accroît au cours de l'évolution de la maladie. Les potentiels évoqués corticaux dont la latence est augmentée au cours de nombreuses démences dont celle de la maladie d'Alzheimer, peuvent néanmoins servir à exclure les syndromes dépressifs où ils sont normaux.

1.6.2. L'imagerie médicale.

1.6.2.1. Le scanner X.

Le scanner cérébral est devenu un outil indispensable pour l'exploration d'un état démentiel. Il permet d'abord d'exclure d'autres causes de démences dans la mesure où il permet de révéler hématome sous-dural, tumeur, hydrocéphalie et pathologie vasculaire. Son autre intérêt est de mettre en évidence l'atrophie cérébrale qui est caractérisée par une augmentation des espaces liquidiens situés autour du cerveau faisant apparaître les sillons plus profonds et par une dilatation des ventricules cérébraux, en comparaison avec les images obtenues chez des sujets sains de même âge.

1.6.2.2. L'imagerie par résonance magnétique nucléaire.

Les résultats apportés par cette technique sont les mêmes que ceux issus de l'examen au scanner X, mais la définition des images est meilleure ce qui rend les mesures plus précises dans l'appréciation de l'atrophie par exemple. Les techniques actuelles sont basées sur la résonance magnétique du proton.

1.6.2.3. La tomographie d'émission monophotonique.

Le développement de l'imagerie médicale a eu pour conséquence la mise au point de machines capables non seulement de voir la structure interne du cerveau, mais aussi d'étudier ses fonctions et son métabolisme.

La technique la plus courante est basée sur l'injection intraveineuse de HMPAO^{99mTc} (hexa méthyle propylène amine oxine marquée au technétium 99 m). Elle permet la mesure des débits sanguins cérébraux. Dans la maladie d'Alzheimer, on constate fréquemment une hypo-fixation dans les régions temporo-pariétales.

1.6.2.4. La tomographie par émission de positons.

Le positon est un "électron positif" émis lors de la désintégration nucléaire d'une certaine classe de radio-éléments (ce sont des isotopes à durée de vie brève (¹⁵O, ¹¹C, ¹⁸F) ce qui implique la proximité immédiate d'un outil de production qui est le cyclotron médical). Après un bref trajet dans la matière biologique, il rencontre un "électron négatif" naturel ce qui donne lieu à une annihilation de la masse des deux particules et à l'émission de deux photons de très haute énergie et ayant des parcours diamétralement opposés. Le principe de la technique est de déceler exclusivement les deux photons d'annihilation, d'identifier leur parcours et de reconstituer sous forme d'image la distribution de la radioactivité. La molécule marquée administrée au patient est ainsi localisée avec précision et sa concentration tissulaire peut être appréciée. La caméra à émission de positons reçoit donc des données brutes qui sont transmises à un ordinateur assurant la reconstitution des images.

Dans la maladie d'Alzheimer, on observe une diminution de 11 à 30 % du débit sanguin cérébral par rapport à une population de témoins de même âge.

La caméra à émission de positons permet également de suivre la consommation cérébrale d'une substance analogue au glucose mais qui n'est pas métabolisée et reste piégée dans les cellules nerveuses. Plusieurs équipes ont montré que la consommation de glucose était réduite au niveau du cortex cérébral des patients atteints de maladie d'Alzheimer. De plus, une asymétrie droite / gauche (sans latéralité préférentielle) de la consommation en glucose, semble être caractéristique de la maladie d'Alzheimer.

1.6.3. Les examens du sang et du liquide céphalo-rachidien.

Ils sont utiles pour exclure les infections telles que méningites, syphilis ...

L'étude du liquide céphalo-rachidien a en outre permis de montrer que chez certains patients atteints de maladie d'Alzheimer existaient des auto-anticorps dirigés contre des cellules nerveuses. Cependant, on ne sait pas encore si ils sont une cause ou une conséquence de l'affection et cela ne permet en aucun cas d'affirmer le diagnostic.

1.7. Les critères du N.I.N.C.D.S.- A.D.R.D.A..

Devant l'hétérogénéité des signes cliniques de la maladie d'Alzheimer, il a été nécessaire d'uniformiser les critères de diagnostic de l'affection. Un groupe de travail, réuni par le "National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke" (N.I.N.C.D.S.) et par le "Alzheimer's Disease and Related Disorders Association" (A.D.R.D.A.), a tenté d'établir ces critères de diagnostic (McKhann et coll. en 1984).

Sur la base de ces critères, les diagnostics suivants peuvent être posés :

- maladie d'Alzheimer possible,
- maladie d'Alzheimer probable,
- maladie d'Alzheimer certaine qui nécessite une confirmation anatomo-pathologique par biopsie ou par autopsie.

Ces critères servent de référence pour l'instant et sont susceptibles d'être modifiés dans l'avenir.

1.8. Sous-groupes de maladie d'Alzheimer.

Forme familiale / Forme sporadique.

Quelques familles dans lesquelles la maladie se transmet de façon héréditaire sur un mode autosomique dominant ont été décrites (Foncin et coll. en 1985 ; St George-Hyslop et coll. en 1987a,b). Cependant, l'origine génétique de la maladie n'est pas seule en cause comme le montre l'étude de vrais jumeaux : parfois l'un est touché par l'affection et l'autre pas et, lorsque les deux jumeaux sont touchés, l'un peut parfois être atteint 10 ans avant l'autre (Nee et coll. en 1987). Ceci laisse supposer que des facteurs épigénétiques puissent intervenir. Les mêmes modifications sont pourtant observées dans les formes sporadiques et dans les formes familiales. A

l'heure actuelle, on pense que les cas sporadiques pourraient être génétiquement déterminés, l'absence d'agrégation familiale pouvant être due :

- au décès précoce des membres de la famille porteurs du gène avant la période d'apparition de la maladie,
- à la présence simultanée de gènes facilitateurs situés sur d'autres chromosomes,
- à l'intervention de facteurs exogènes facilitant l'expression du gène.

Forme présénile (débutant avant 65 ans) / Forme sénile (débutant après 65 ans).

Association à une autre affection neurologique, en particulier une maladie de Parkinson.

Pour poser le diagnostic de maladie d'Alzheimer, les cliniciens utilisent les critères du N.I.N.C.D.S.-A.D.R.D.A. work group.

Malgré cela, on constate une double tendance :

- dans la pratique clinique, ce diagnostic est actuellement porté avec excès si on méconnaît les nombreuses affections qui peuvent être abusivement considérées comme une maladie d'Alzheimer ; en effet, dans les études épidémiologiques, les essais thérapeutiques et les tentatives de mise au point de tests de laboratoire, les patients sont sélectionnés sur l'association d'arguments cliniques, neurophysiologiques, radiologiques et biologiques et pourtant, 20% d'entre eux n'ont pas une maladie d'Alzheimer comme le montrent à posteriori les études anatomiques ;
- une sous-évaluation du diagnostic après les études longitudinales lorsqu'on établit des corrélations avec l'examen anatomique.

Le diagnostic de maladie d'Alzheimer ne peut être affirmé qu'en présence des preuves anatomo-pathologiques fournies lors de l'autopsie ou d'une biopsie cérébrale. S'il est souhaitable de poser le diagnostic du vivant du patient, le recours à la biopsie cérébrale ne peut cependant pas être la règle.

2. Aspects neuropathologiques.

2.1. L'atrophie cérébrale.

2.1.1. Données macroscopiques.

2.1.1.1. Au cours du vieillissement normal.

Une atrophie est parfois visible lors de l'examen macroscopique du cerveau. Celle-ci touche surtout le cortex (néocortex et paléocortex ou hippocampe) au niveau duquel les sillons sont plus profonds et plus élargis.

De nombreux auteurs ont tenté de la quantifier par pesée et par exemple, Dekaban et coll. en 1978, rapportent une perte de poids d'environ 11% entre 20 et 70 ans.

D'autres auteurs ont apprécié l'atrophie cérébrale en comparant le volume du cerveau à celui de la boîte crânienne. Par cette méthode, Davis et coll. en 1977, montrent que le cerveau occupe 92% de la boîte crânienne à 60 ans et seulement 83% à 80 ans.

2.1.1.2. Dans la maladie d'Alzheimer.

L'atrophie cérébrale est plus importante chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer que chez les témoins d'âge comparable.

La perte de poids est plus marquée (Jellinger et coll. 1983). Selon, Terry et coll. en 1981, une diminution de poids de 8% serait observée entre le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer et les témoins de même âge.

Hubbard et coll. en 1981, ont mesuré la surface du cortex et ont montré que l'atrophie touche l'ensemble du cortex dans les cas pré-séniles (moins de 65 ans) alors que le lobe temporal est plus particulièrement touché dans les cas séniles (plus de 65 ans).

L'utilisation de la technique d'analyse d'images a permis de montrer que cette atrophie ne correspondait pas à une diminution de l'épaisseur du cortex (Terry et coll. 1981) mais à une diminution de sa longueur (Duyckaerts et coll. 1985). C'est pour cette raison que Duyckaerts et coll. pensent que les éléments affectés sont situés selon des colonnes plutôt que selon des couches.

Cette atrophie touche non seulement la substance grise mais aussi la substance blanche (Hubbard et coll. 1981).

Il faut signaler que des régions autres que le cortex peuvent être touchées, telles que le noyau basal de Meynert ou l'amygdale.

2.1.2. Les comptages cellulaires.

Quelle pouvait être la signification au niveau cellulaire de cette atrophie? La perte d'un certain nombre de cellules étant une explication plausible, de nombreux travaux basés sur des comptages cellulaires furent réalisés.

2.1.2.1. Vieillesse normale.

Les travaux préliminaires, issus de comptages "manuels", rapportaient une perte neuronale importante au fil des années, en effet, elle serait de l'ordre de 1% par an et affecterait surtout les petits neurones des couches corticales II et IV (Brody en 1955 ; Colon en 1972). Cependant ces travaux furent critiqués par la suite en raison du faible nombre de cas étudiés.

L'utilisation de l'analyseur d'images a par la suite facilité ces comptages. L'utilisation de cette technique a permis de confirmer l'existence d'une perte neuronale mais contrairement à ce qui était décrit dans les études antérieures, elle concernerait plutôt les grands neurones pyramidaux (Henderson et coll. en 1980 ; Terry et coll. en 1981 ; Anderson et coll. 1983).

Par la suite, la théorie d'une perte neuronale importante au cours du vieillissement a été fortement contestée.

En effet, la répartition des neurones en différentes classes selon leur taille, a permis de montrer que le nombre de grands neurones diminue avec l'âge mais que parallèlement, le nombre de petits neurones augmente (Terry et coll. en 1987 ; Hansen et coll. en 1988). La perte neuronale ne serait donc qu'apparente, un rétrécissement ou "shrinkage" des neurones étant plus vraisemblable. Toutefois, comme la densité neuronale ne change pas mais que la surface du cortex diminue, il semble bien qu'il existe une perte neuronale, laquelle n'atteint cependant pas les proportions décrites antérieurement (Terry et coll. en 1987).

Terry et coll. en 1987, lors de leur étude par analyse d'images montrent une augmentation de la glie avec l'âge, ce qui est corroboré par l'étude immunohistochimique de Hansen et coll. en 1987.

2.1.2.2. Maladie d'Alzheimer.

Dans le cortex, une diminution du nombre de neurones pyramidaux d'environ 40% a été rapportée (Terry en 1985). Les grands neurones sont particulièrement touchés mais, à l'inverse du vieillissement physiologique, leur disparition n'est pas simplement due à une réduction de taille car le nombre de petits neurones diminue aussi. Le cortex temporal serait le plus atteint (Terry et coll. en 1981 ; Neary et coll. en 1986 ; Mann en 1988). Selon Neary et coll. en 1986, cette perte neuronale est fortement corrélée avec la détérioration intellectuelle. L'hippocampe est également touché, surtout le champ CA1 de la corne d'Ammon.

Mehraein et coll. en 1975 rapportent une diminution du nombre d'épines dendritiques par unité de surface. Scheibel en 1978 décrit une perte significative des dendrites horizontaux. Des imprégnations de golgi sur des coupes de cortex et d'hippocampe permettent d'observer une réduction de l'arbre dendritique (Buell et coll. en 1979). Une diminution du nombre de synapses a été rapportée par Davies et coll. en 1987.

Une réduction de la capacité des neurones corticaux à synthétiser les protéines serait également observée dans le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer, le volume nucléolaire serait en effet plus petit (Neary et coll. en 1986).

Mann rapporte en 1988 les comptages de neurones, de plaques séniles et de neurones en dégénérescence réalisés chez 5 patients atteints de maladie d'alzheimer. Ces comptages ont été effectués d'abord sur des biopsies cérébrales puis à l'autopsie. La modification la plus marquante durant cette période est la diminution de la densité neuronale.

Une autre étude intéressante est celle de Hansen et coll. en 1988. Ces auteurs ont étudié 120 cerveaux de témoins et de malades d'Alzheimer et ont constaté que la densité neuronale variait peu entre jeunes malades d'Alzheimer et vieux malades, de même qu'entre vieux malades et vieux témoins, alors que les différences sont beaucoup plus marquées entre jeunes malades et jeunes témoins. Ainsi les cas préséniles seraient plus affectés que les cas séniles. Néanmoins, les cas séniles sont significativement différents des vieux témoins et il est conclu que la maladie d'Alzheimer est bien une pathologie plutôt qu'un vieillissement accéléré.

Concernant les cellules gliales, Schechter et coll. en 1981 signalent une augmentation du nombre d'astrocytes fibreux dans les couches II à VI du cortex. Delacourte en 1990 rapporte une réaction gliale dans toutes les régions du cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer.

Finalement, les avis sont encore partagés quant à la perte neuronale : les uns pensent que celle-ci est réelle alors que d'autres pensent que les neurones ne font que s'atrophier. La mise au point de nouvelles techniques permettant de réaliser des comptages neuronaux par unité de volume plutôt que par unité de surface, éclairciront peut-être les choses (Duyckaerts et coll. en 1989). En effet, selon Duyckaerts, lors de la réalisation des coupes histologiques, les grands neurones ont plus de chances que les petits d'être coupés et donc observés par la suite et de ce fait, l'atrophie des grands neurones est faussement interprétée comme une diminution de la densité neuronale.

2.2. Les dépôts de substance amyloïde.

2.2.1. Définition, mise en évidence, ultrastructure.

Sous le terme "amyloïdoses" sont rassemblées plusieurs pathologies caractérisées par un dépôt extra- ou intra-cellulaire de protéines fibrillaires anormales. L'accumulation de ces fibrilles entraîne la mort des cellules dans les organes affectés qui peuvent être foie, rein ou encore cerveau, selon les pathologies (Castano et coll. en 1988). En dépit des différences qui existent entre leur composition biochimique, les différents types de fibrilles amyloïdes ont en commun un certain nombre de propriétés qui sont :

- une structure secondaire à feuillettes β plissés,
- la diffraction bêta des rayons X,
- la biréfringence lors d'une observation en lumière polarisée après coloration par le rouge congo,
- une structure quaternaire fibrillaire,
- la coloration élective par la thioflavine S,
- l'insolubilité dans les tampons dénaturants et la résistance à la protéolyse.

Dans le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer on observe de tels dépôts de substance amyloïde. La coloration de coupes de cerveau de malades d'Alzheimer par la thioflavine S ou le rouge congo les met en évidence : au niveau des plaques séniles et dans la paroi des vaisseaux sanguins corticaux (angiopathie amyloïde). Les études en microscopie électronique ont révélé l'ultrastructure de la substance amyloïde, qui est constituée par des filaments droits de 6 à 9 nm de diamètre (Merz et coll. en 1983).

2.2.2. Nature biochimique.

Glenner et coll. en 1984 à partir des vaisseaux méningés, de même que Masters et coll. en 1985 à partir des plaques séniles, ont pu isoler et séquencer un polypeptide d'environ 4000 Da comprenant 42 acides aminés et appelé bêta protéine A4.

Ce peptide est un fragment d'une protéine beaucoup plus grosse (70 kDa) qui est un récepteur transmembranaire (Kang et coll. en 1987). La bêta protéine A4 correspond aux 28 résidus d'acides aminés situés dans le domaine extra-cellulaire près de la membrane et aux 14 résidus de la portion intramembranaire. Ce récepteur est ubiquiste chez l'homme et le gène correspondant existe chez des espèces comme la souris, le hamster, le xénope ou encore la drosophile (Tanzi et coll. en 1987). Chez l'homme, le gène est situé sur le chromosome 21 (Goldgaber et coll. en 1987 ; Kang et coll. en 1987 ; Robakis et coll. en 1987 ; Tanzi et coll. en 1987).

Ce gène est traduit sous plusieurs formes par épissage alternatif :

- une forme constituée de 695 acides aminés
- des formes plus longues, 751 (Kitaguchi et coll. en 1988) ou 770 acides aminés (Ponte et coll. en 1988 ; Tanzi et coll. en 1988), qui contiennent un fragment de 56 résidus, ayant 50% d'homologie avec la séquence du site actif des inhibiteurs de protéases de type Kunitz.

Les formes de 751 et 770 acides aminés seraient identiques à la nexine II, un inhibiteur de protéases sécrété par les cellules (Oltersdorf et coll. en 1989 ; Van Nostrand et coll. en 1989).

Selon Selkoe en 1989, la forme la plus courte serait exprimée préférentiellement par les cellules nerveuses alors que les plus longues seraient ubiquistes.

Des formes sécrétées des précurseurs de la β protéine A4 ont été décrites : elles correspondent aux précurseurs dépourvus de leur partie C-terminale (parties cytoplasmique et intra-membranaire). Ces formes sécrétées peuvent être issues soit du clivage des précurseurs à proximité de la membrane plasmique (Weideman et coll. en 1989), soit de la traduction d'un type particulier d'ARN messager (De Sauvage et coll. en 1989).

Les précurseurs contenant le fragment analogue à la séquence des inhibiteurs de protéases de type Kunitz interviennent vraisemblablement dans l'inhibition de protéases dans le domaine extracellulaire. Le clivage des précurseurs à un "mauvais" endroit pourrait être responsable d'une dégradation anormale de la partie C-terminale restante et au dépôt de la β protéine A4 dans le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer.

Cependant l'inhibition des protéases n'est pas la seule fonction des précurseurs de la β protéine A4 en effet, Saitoh et coll. en 1989 ont montré qu'ils pouvaient jouer le rôle de facteur de croissance.

2.2.3. Les composants mineurs de la substance amyloïde.

Des études immunohistochimiques ont suggéré l'existence de composants mineurs de la substance amyloïde tels que des immunoglobulines G et des protéines du complément (Eikelenboom et coll. en 1982 ; Ishii et coll. en 1984), des héparanes sulfates protéoglycannes (Snow et coll. en 1988). Le marquage des plaques séniles, dans le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer, par des anticorps dirigés contre l'alpha-1-antichymotrypsine (un autre inhibiteur de protéases) décrit comme constant par Abraham et coll. en 1988, ne semble être en fait que rarement observé (Buée et coll. en 1989).

Des lectines permettent aussi de mettre en évidence les dépôts de substance amyloïde suggérant que des sucres pourraient intervenir dans la pathogenèse des dépôts de substance amyloïde (Szumanska et coll. en 1987). Cette relation entre sucres et dépôts de substance amyloïde semble être particulière au cerveau car elle n'a pas été retrouvée dans les autres organes chez des patients présentant une amyloïdose générale (Szumanska et coll. en 1987).

Des alumino-silicates ont également été décrits au niveau des plaques séniles (Candy et coll. en 1986).

2.2.4. Les différents types de dépôts et leur distribution.

2.2.4.1. Apport de l'immunohistochimie.

Une fois la séquence de la bêta protéine A4 connue, il a été possible d'obtenir différents outils immunologiques. Ceux-ci ont permis de confirmer avec plus de sensibilité les résultats préalablement obtenus par exemple avec le rouge congo ou la thioflavine S.

Ainsi, la classification des plaques séniles établie par Wisniewski et coll. en 1973a restait valable. On distinguait alors :

- les plaques séniles primitives, caractérisées par la présence de quelques neurites en dégénérescence avec peu ou pas de dépôt de substance amyloïde ;

- les plaques séniles matures où existe un noyau amyloïde central dense, entouré par de nombreux neurites en dégénérescence, des prolongements astrocytaires et occasionnellement des cellules microgliales ;

- les plaques "burned-out" où seul le noyau dense de substance amyloïde est visible.

L'immunohistochimie a également confirmé la localisation de ces lésions : néocortex, amygdale et hippocampe sont les régions de prédilection chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer. Des plaques séniles sont parfois visibles dans l'hippocampe des personnes âgées non démentes.

De même, le dépôt de substance amyloïde dans la paroi des vaisseaux sanguins corticaux fut confirmé par les techniques immunohistochimiques. Cette angiopathie est appelée congophile lorsque le dépôt amyloïde est strictement limité à la paroi vasculaire et dyshorique lorsqu'il déborde dans le neuropile environnant. Le dépôt de substance amyloïde dans la paroi des vaisseaux peut provoquer leur rupture et ainsi les hémorragies sont fréquentes. Certains vaisseaux présentant une angiopathie amyloïde sont entourés par des neurites en dégénérescence similaires à ceux qui sont présents à la périphérie des plaques séniles (Delacourte et coll. en 1987).

Au cours du vieillissement normal, la fréquence de l'angiopathie augmente (Mountjoy et coll. en 1983) mais elle n'est pas constante : dans leur étude de 12 centenaires, Hauw et coll. en 1986 rapportent trois cas sans angiopathie. Elle est également fréquente dans la maladie d'Alzheimer mais n'est pas constante (60 à 90% des cas selon les auteurs). Elle est plus souvent observée dans les territoires occipitaux que dans les autres régions corticales (Bergeron et coll. en 1987). L'angiopathie amyloïde est aussi observée dans le cerveau des vertébrés supérieurs âgés (Selkoe en 1987).

Joachim et coll. en 1989 ont retrouvé des dépôts de substance amyloïde dans la peau des patients atteints de maladie d'Alzheimer. Ceci suggère que l'affection pourrait ne pas être exclusivement cérébrale. De plus cette découverte ouvre de nouvelles perspectives de diagnostic de la maladie par la réalisation de biopsies cutanées.

2.2.4.2. Apport des techniques d'amplification.

Récemment, la mise au point de techniques permettant d'améliorer considérablement la sensibilité du marquage des dépôts de substance amyloïde par les anticorps a révolutionné ces conceptions.

Ces techniques, basées sur un traitement des coupes de tissu préalable à l'application des anticorps, sont au nombre de deux :

- un traitement à l'acide périodique dans le cas d'une fixation au Carnoy (Behrouz et coll. en 1989a) ; la plus grande accessibilité des sites antigéniques résulterait donc d'une déglycosylation ;

- un traitement à l'acide formique dans le cas d'une fixation au formol (Kitamoto et coll. en 1987).

Suite à ces traitements, il est apparu que d'autres types de plaques séniles existaient et que les dépôts de substance amyloïde étaient beaucoup plus étendus.

En effet, des plaques séniles où le dépôt de substance amyloïde amorphe a un aspect granulaire plutôt que fibrillaire apparaissent alors (Ikeda et coll. en 1989 ; Ogomori et coll. en 1989 ; Wisniewski et coll. en 1989).

De plus, dans le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer, les plaques séniles se trouvent non seulement dans le néocortex, l'amygdale et l'hippocampe mais il est aussi fréquent de les trouver dans des régions sous-corticales comme le noyau caudé, le thalamus, le putamen, le pont cérébral voire même dans le cervelet ; leur présence dans des régions telle la moelle épinière et le globus pallidus est moins fréquente (Ikeda et coll. en 1989 ; Ogomori et coll. en 1989 ; Wisniewski et coll. en 1989). Des plaques ont également été décrites dans la substance blanche corticale (Behrouz et coll. en 1990).

Chez les témoins, il est apparu que des plaques séniles pouvaient aussi être trouvées dans le néo-cortex, l'amygdale et l'hippocampe mais en moins grand nombre que dans le cerveau des personnes atteintes par la maladie d'Alzheimer.

La figure 4 illustre les dépôts de substance amyloïde.

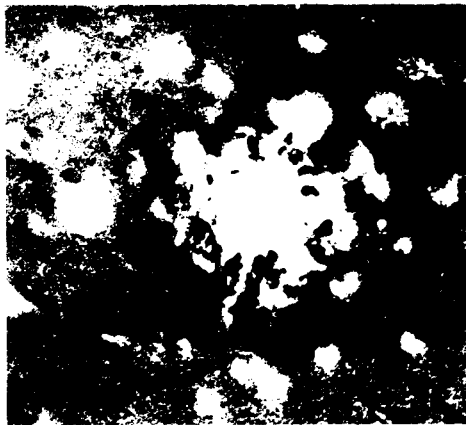


Figure 4 : les dépôts de substance amyloïde dans le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer (ici le patient A11).

a - coupe histologique de cortex temporal (x 300) colorée par la thioflavine S - observation en lumière ultraviolette. La substance amyloïde des plaques séniles matures (flèches) et de la paroi des vaisseaux pathologiques (pointes de flèches) est fluorescente.

b - coupe histologique de cortex temporal (x 250) - réaction immunohistochemique avec un anticorps polyclonal anti- β protéine A4. La substance amyloïde des plaques séniles (flèches) et des vaisseaux pathologiques (pointes de flèches) est immunoréactive.

c et d - coupe histologique de cortex occipital (x 600) - coloration par la thioflavine S et réaction immunohistochemique avec un anticorps anti-tau (observation à la fois en lumière ultraviolette et en lumière blanche).

La substance amyloïde de la plaque sénile (c) et de la paroi d'un vaisseau angiopathique v (d) colorée par la thioflavine S est entourée de neurites immunoréactifs avec l'anti-tau. Cette substance amyloïde n'est pas marquée par l'anti-tau.

e et f - coupes histologiques adjacentes de cortex pariétal (x 400). La substance amyloïde occupant la paroi d'un vaisseau pathologique est colorée par la thioflavine (fluorescence en lumière U.V - e) et marquée par l'immunsérum anti- β protéine A4 (f).

Il n'y a pas de réaction croisée entre les anticorps anti-tau et les anticorps anti- β protéine A4.

Ces photos nous ont été prêtées par le docteur André Défossez.

2.3. La dégénérescence granulo-vacuolaire.

Dans le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer, les cellules pyramidales de l'hippocampe, présentent de façon quasi-constante dans leur cytoplasme des vacuoles claires de 4 à 5 μm de diamètre contenant un granule dense s'imprégnant fortement des colorations argyrophiles. Ces vacuoles dont le nombre peut aller jusqu'à 15 par cellule, seraient de nature autophagique (Wisniewski et coll. en 1973b) et contiendraient des protéines du cytosquelette phosphorylées (Dickson et coll. en 1987). Ces vacuoles sont également observées dans l'hippocampe des personnes âgées non démentes ainsi que dans l'hippocampe de patients atteints d'autres pathologies neurodégénératives comme la maladie de Pick (Ball et coll. en 1983).

2.4. La dégénérescence neurofibrillaire.

2.4.1. Définition, mise en évidence et ultrastructure.

Il nous faut d'abord rappeler que le cytosquelette neuronal est constitué par plusieurs types de filaments :

- les microtubules qui sont des tubes creux de 25 nm de diamètre, dont le constituant majeur est la tubuline,
- les microfilaments qui sont constitués par de l'actine polymérisée et qui ont un diamètre de 7 nm,
- les filaments intermédiaires que l'on appelle ici neurofilaments ont un diamètre de 10 nm et sont constitués par trois sous-unités protéiques dénommées NF-H, NF-M et NF-L dont les poids moléculaires respectifs sont 200, 160 et 70 kDa.

La dégénérescence des neurones est qualifiée de neurofibrillaire (DNF) parce que dans le cytoplasme des cellules nerveuses en dégénérescence, tant au niveau du corps cellulaire que des dendrites, s'accumulent des paquets de fibrilles.

Ces fibrilles sont argentophiles et les neurones en dégénérescence peuvent être mis en évidence par les techniques d'imprégnations argentiques comme celle de Bodian ou de Bielschowski. Un certain nombre de ces neurones sont également mis en évidence par les colorants de la substance amyloïde comme le rouge congo ou la thioflavine S.

Kidd en 1963 a observé ces fibrilles en microscopie électronique et a montré qu'elles étaient constituées par des paires hélicoïdales de filaments ou PHF, ces

filaments ayant un diamètre de 10 nm et l'hélice un pas de 80 nm. Les PHF sont en fait constitués d'un axe central entouré par un manteau flou ; après traitement à la pronase, le manteau est éliminé alors que l'axe central reste intact (Wischik et coll. en 1988a).

2.4.2. Nature biochimique.

L'origine des PHF a été longtemps sujette à controverse. Ces fibrilles sont insolubles (elles résistent aux détergents comme le sodium dodécyl sulfate (Selkoe et coll. en 1982 ; Iqbal et coll. en 1984)) et cela a freiné considérablement l'analyse biochimique de leurs constituants.

Certains auteurs y voyaient le résultat de la production d'une protéine purement pathologique (Foncin et coll. en 1986).

Masters et coll. en 1985 ont rapporté que des anticorps dirigés contre la β protéine A4 marquaient non seulement les dépôts extracellulaires de substance amyloïde, mais aussi les neurones en dégénérescence ; de ce fait ils émirent l'hypothèse que la β protéine A4 était le constituant des PHF.

D'autres encore incriminaient les protéines du cytosquelette normal et, par exemple, Nukina et coll. en 1983 avaient montré que des anticorps dirigés contre MAP 2 marquaient les neurones en dégénérescence sur coupes histologiques.

Cependant, les données issues des travaux de Kidd en 1963 avaient orienté la majorité des recherches vers les neurofilaments dont le diamètre est aussi de 10 nm. Le fait que des anticorps dirigés contre les protéines constitutives des neurofilaments reconnaissent les neurones en DNF sur coupes histologiques de cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer renforça l'idée de l'implication des neurofilaments dans la pathogenèse des PHF (Anderton et coll. en 1982).

Ceci fut remis en question lorsque Brion et coll. en 1985 montrèrent lors d'une étude par immuno-transfert (technique qui consiste à séparer les protéines d'un mélange complexe en fonction de leur poids moléculaire par une électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS et à les transférer sur un support (le plus souvent une feuille de nitrocellulose) permettant l'incubation avec un anticorps spécifique d'une protéine), que des anticorps reconnaissant spécifiquement les neurones en DNF ne marquaient aucun des constituants des neurofilaments. En revanche, ces anticorps reconnaissaient une famille de protéines appelées protéines tau qui, dans les neurones normaux, interviennent dans la polymérisation de la tubuline et dans la stabilisation des microtubules. Des anticorps dirigés contre les protéines tau marquaient les neurones en dégénérescence ce qui confirma les résultats de Brion et

coll. (Delacourte et coll. en 1986 ; Grundke-Iqbal et coll. en 1986 ; Kosik et coll. en 1986 ; Wood et coll. en 1986 ; Nukina et coll. en 1986).

Défosses et coll. en 1988 ont obtenu le double marquage immunocytochimique des PHF (méthode à l'or colloïdal) en utilisant des anticorps dirigés contre les protéines tau et des anticorps dirigés contre les PHF.

La biologie moléculaire a permis d'obtenir des preuves directes de l'incorporation des protéines tau dans les PHF. Goedert et coll. en 1988 ont cloné et séquencé le gène codant pour un peptide issu des PHF et l'ont identifié comme étant celui des protéines tau. Kondo et coll. en 1988 ont montré que des peptides, issus de la digestion enzymatique partielle de PHF purifiées, avaient une séquence similaire à celle d'une séquence répétitive de la partie C-terminale des protéines tau humaines. Wischik et coll. en 1988b ont montré que cette séquence répétitive était intimement liée à l'axe des PHF résistant à la pronase.

Les protéines tau contenant 3 séquences répétitives sont exprimées à la fois à l'état foetal et adulte, alors que les protéines tau contenant quatre fois cette séquence sont présentes uniquement à l'état adulte. Selon Mori et coll. en 1989, les PHF ne renfermeraient que des formes foetales. En fait, les derniers travaux de Goedert et coll. en 1989 qui montrent l'existence de nouvelles isoformes de protéines tau, indiquent que les PHF contiennent les deux types de variants (avec 3 ou 4 séquences répétitives).

2.4.3. Constituants mineurs.

Des constituants non spécifiques viennent se fixer sur les PHF. Il a été montré que des anticorps dirigés contre l'ubiquitine marquent les neurones en dégénérescence dans le cerveau des personnes atteintes de maladie d'Alzheimer (Mori et coll. en 1987 ; Perry et coll. en 1987). Cette protéine est présente dans toutes les cellules eucaryotes où elle intervient dans la dégradation des protéines anormales, en activant les systèmes protéolytiques ATP-dépendants non lysosomiaux, après s'être fixée sur la protéine à dégrader. La fixation de l'ubiquitine sur les PHF serait donc une tentative d'élimination de ces structures insolubles. Manetto et coll. en 1988 ont montré que l'ubiquitine était associée, d'une manière générale, aux filaments anormaux caractéristiques de différentes pathologies neurodégénératives (Paralysie supranucléaire progressive, maladie de Pick et maladie de Parkinson).

Des glucides se fixent également sur les PHF. Des lectines marquent en effet des neurones en dégénérescence dans le cerveau des personnes atteintes de maladie d'Alzheimer (Szumanska et coll. en 1987 ; Mann et coll. en 1987a). Cependant, la présence de ces sucres n'est pas expliquée.

Perl et coll. en 1980 ont mis en évidence de l'aluminium dans les corps cellulaires des neurones en dégénérescence neurofibrillaire.

2.4.4. Distribution.

L'utilisation d'anticorps dirigés contre les protéines tau en immunohistochimie a l'avantage de ne mettre en évidence que les neurones en dégénérescence alors que les imprégnations argentiques colorent aussi les neurones normaux. Ces anticorps marquent le corps cellulaire des neurones en DNF (Brion et coll. en 1985), les neurites en dégénérescence dispersés dans le parenchyme nerveux (Braak et coll. en 1986) ou rassemblés à la périphérie des plaques séniles et enfin, les neurites en dégénérescence à proximité des vaisseaux angiopathiques (Delacourte et coll. en 1987).

Les régions cérébrales les plus affectées sont l'hippocampe et plus particulièrement le subiculum et le champ CA1, les couches II et IV du cortex entorhinal (Hyman et coll. en 1984), les couches III et V du néo-cortex (Pearson et coll. en 1985), le cortex temporal et le cortex pariétal semblant être touchés avant le cortex frontal et le cortex occipital.

Des noyaux sous corticaux comme le noyau basal de Meynert (Arendt et coll. en 1984), le locus coeruleus (Tomlinson et coll. en 1981) ou le noyau raphé dorsal (Yamamoto et coll. en 1985), peuvent aussi être touchés par la dégénérescence neurofibrillaire.

La figure 5 illustre la dégénérescence neurofibrillaire.

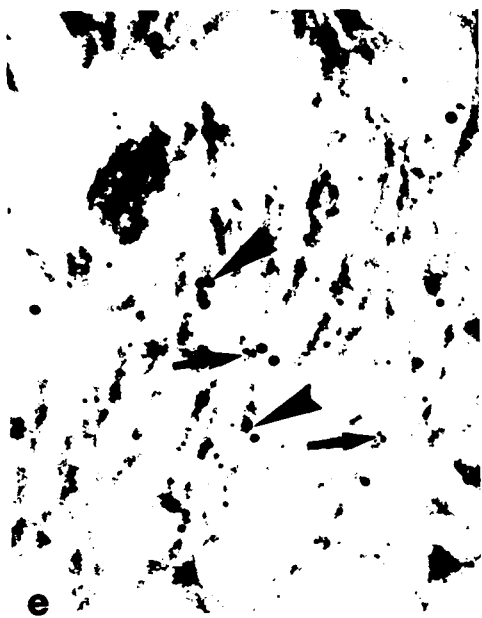
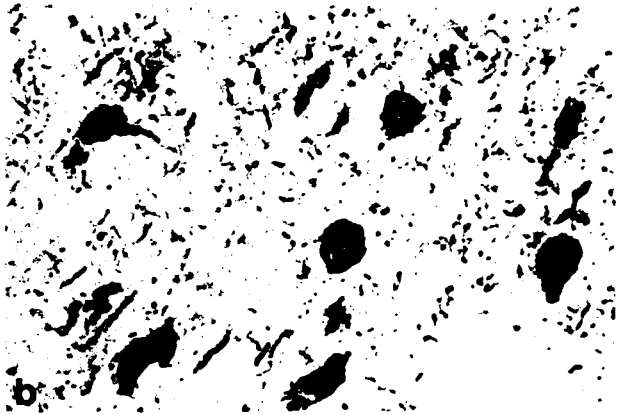


Figure 5 : la dégénérescence neurofibrillaire dans le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer (ici le patient A12).

a - coupe histologique de cortex temporal (x 250). Imprégnation argentique par la méthode de Bielschowsky. Les plaques séniles (pointes de flèches) et les neurones en dégénérescence neurofibrillaire (flèches) sont colorés.

b - coupe histologique de cortex temporal (x 600). Réaction immunohistochimique avec l'anticorps anti-tau (l'anticorps anti-PHF donne le même résultat). Marquage des corps cellulaires neuronaux et de nombreux neurites disséminés dans le neuropile.

c - coupe semi-fine de cortex temporal (x 1200). Réaction immunohistochimique avec l'anticorps anti-tau. Marquage du corps cellulaire d'un neurone en dégénérescence (le noyau n'est pas immunoréactif).

d - coupe ultrafine de cortex frontal (x 80000). Un paquet de paires hélicoïdales de filaments (PHF) est observé. Les flèches montrent une PHF particulièrement mieux visible.

e - coupe ultrafine de cortex temporal (x 200000). Réaction immunohistochimique révélée par la méthode à l'or colloïdal avec l'anticorps anti-tau (grains d'or de 20 nm) et l'anticorps anti-PHF (grains d'or de 5 nm).

Ces photos nous ont été prêtées par le docteur André Défossez.

2.4.5. Relation entre les différentes maladies neurodégénératives.

Les PHF ne sont observées que dans l'espèce humaine (Foncin en 1980). On les trouve également dans les neurones en dégénérescence dans l'hippocampe de certaines personnes âgées non démentes (Kemper en 1984) et dans le cerveau des trisomiques 21 (Wisniewski et coll. en 1979). Dans les pathologies neurodégénératives telles que la paralysie supranucléaire progressive (Tellez-Nagel et coll. en 1973) ou la maladie de Pick (Rewcastle et coll. en 1968), le cytoplasme des neurones en dégénérescence est essentiellement occupé par des filaments droits.

Les neurones en dégénérescence observés dans toutes les affections précédemment citées, bien que caractérisés par des filaments dont l'ultrastructure diffère, sont détectés par des anticorps dirigés contre les protéines tau (Brion et coll. en 1985 ; Delacourte et coll. en 1986 ; Pollock et coll. en 1986 ; Joachim et coll. en 1987).

2.5. Corrélations entre démence et lésions histopathologiques.

Depuis la mise au point de tests psychométriques permettant de quantifier la démence, un certain nombre d'études ont été réalisées afin de déterminer si des corrélations existaient entre les lésions histopathologiques et la démence.

Blessed et coll. en 1968 furent les pionniers en ce domaine. Dans leur étude, ils montrent que le nombre de plaques séniles est corrélé positivement avec la sévérité de la démence de patients atteints de maladie d'Alzheimer appréciée à l'aide du test de Blessed. D'autres études de ce type montrant une corrélation entre la densité des neurones en dégénérescence neurofibrillaire et le nombre des plaques séniles ont été réalisées par la suite (Wilcock et coll. en 1982 ; Pearson et coll. en 1985 ; Mann et coll. en 1985).

Neary et coll. en 1986 rapportent que la détérioration mentale est mieux corrélée avec l'atteinte des grands neurones pyramidaux (perte, diminution du volume nucléaire et nucléolaire ainsi que la diminution des taux d'ARN messagers), qu'avec le nombre des plaques séniles ou celui des neurones en dégénérescence neurofibrillaire.

Cela pourrait être expliqué grâce au travail de Mann en 1988, qui avait rapporté qu'entre la biopsie et l'autopsie, le nombre de neurones pyramidaux et le volume nucléaire et nucléolaire diminuaient alors que le nombre des plaques séniles et celui des neurones en dégénérescence ne changeaient pas. Comme ces lésions ne sont pas des structures figées et qu'elles finissent par être dégradées, cet auteur proposait qu'il pourrait exister un équilibre entre la formation de nouvelles lésions et la disparition de

lésions préexistantes. Une fois cet équilibre atteint, les densités de plaques séniles et de neurones en dégénérescence restent constantes mais la perte cellulaire est de plus en plus importante. Si cette théorie est vérifiée, les études corrélatives entre histopathologie et état intellectuel ne seraient valables que durant la période qui précède l'atteinte de cet équilibre.

Comme nous l'avons vu précédemment, il existe aujourd'hui différentes méthodes permettant de mettre en évidence, avec des résultats variés, les neurones en dégénérescence neurofibrillaire et les plaques séniles : imprégnations argentiques, thioflavine S, rouge congo ou encore des techniques immunohistochimiques. Duyckaerts et coll. en 1987 ont étudié l'influence de la technique utilisée pour compter les lésions (technique à l'argent par rapport à un immunosérum anti-PHF) sur la corrélation avec le test de Blessed. Ils concluent que les résultats des comptages sont différents selon que l'une ou l'autre des techniques a été employée, mais que les coefficients de corrélations entre la densité des lésions et le test de Blessed varient peu.

2.6. Les différentes hypothèses étiopathogéniques.

2.6.1. Rôle des dépôts de substance amyloïde.

Comme nous l'avons signalé précédemment, certains neurones en dégénérescence sont marqués par la thioflavine S ou le rouge congo. De plus certains auteurs ont rapporté le marquage des neurones en dégénérescence par des anticorps anti β protéine A4 (Masters et coll. en 1985).

Bien que cela fut à l'origine d'une théorie selon laquelle la β protéine A4 serait à la fois le constituant des dépôts de substance amyloïde et des PHF, il est maintenant établi que les constituants de ces deux types de lésions sont différents.

Tout d'abord, la coloration thioflavine positive des neurones en dégénérescence va de paire avec la diminution de l'immunoréactivité de ces mêmes neurones vis à vis d'anticorps anti-protéines tau (Défossez et coll. en 1987). Ainsi, les neurones en dégénérescence n'acquièrent les propriétés de la substance amyloïde (conformation en feuillets bêta plissés) que dans les stades terminaux de leur évolution. Les neurones en dégénérescence ne sont donc pas des structures figées.

De plus, les résultats de plusieurs équipes (Wong et coll. en 1985 ; Défossez et coll. en 1987 ; Behrouz et coll. en 1989a) montrent que les neurones en dégénérescence neurofibrillaire colorés par la thioflavine S ne sont jamais marqués par des anticorps dirigés contre la β protéine A4, contrairement à ce qu'avaient rapporté Masters et coll. en 1985.

Les neurones en dégénérescence finissent par perdre leur membrane plasmique et deviennent des fantômes de neurones en dégénérescence ("ghost-tangles"). Ils sont alors envahis par des prolongements astrocytaires et les débris sont éliminés progressivement, peut-être par les cellules microgliales (Mann en 1988).

Bien que les deux types de lésions soient constitués par des protéines différentes, il semble encore exister un lien entre elles. En effet, des neurites en dégénérescence sont présents à la périphérie des dépôts de substance amyloïde, au niveau des plaques séniles, de même qu'au niveau de certains vaisseaux angiopathiques (Delacourte et coll. en 1987).

Cependant, les avis sont à ce propos une fois de plus divergents : certains pensent que les neurones produisent la substance amyloïde alors que d'autres pensent que la substance amyloïde est d'origine vasculaire et qu'elle pourrait être, directement ou indirectement, à l'origine de la dégénérescence neuronale et par conséquent responsable de la maladie d'Alzheimer.

Duyckaerts et coll. en 1988 ont montré qu'au niveau des plaques séniles, la substance amyloïde apparaît avant les neurites en dégénérescence neurofibrillaire.

Des résultats allant dans le même sens, ont été obtenus à partir de l'étude neuropathologique des trisomiques 21. Les trisomiques qui vivent au delà de 35-40 ans développent des lésions cérébrales identiques à celles des patients atteints de maladie d'Alzheimer : plaques séniles et neurones en dégénérescence neurofibrillaire. Néanmoins, l'apparition des lésions est beaucoup plus lente que dans la maladie d'Alzheimer. L'étude de patients dont l'âge se situe dans la période d'apparition de ces lésions, a permis de montrer que les dépôts de substance amyloïde apparaissent avant la dégénérescence neurofibrillaire (Mann et coll. en 1989).

La localisation de la substance amyloïde dans la paroi des vaisseaux sanguins corticaux suggère donc qu'elle ait une origine vasculaire. De plus, par la microscopie électronique, Miyakawa et coll. en 1982 ont montré qu'au centre des plaques séniles on trouvait systématiquement un capillaire.

2.6.2. Hypothèse neurochimique.

Les cellules cérébrales affectées appartiennent-elles à la même famille ?

Pour répondre à cette question, de nombreuses équipes se sont intéressées aux neurotransmetteurs en étudiant plus précisément les enzymes impliquées dans leur métabolisme.

C'est ainsi que Bowen et coll. en 1976 de même que Perry et coll. en 1977, ont démontré une diminution de l'activité de l'acetyl-choline transférase (enzyme impliquée dans la synthèse de ce neurotransmetteur) de 40 à 70% dans le néo-cortex et l'hippocampe des patients atteints de maladie d'Alzheimer par rapport à des témoins de même âge. Davies et coll. en 1976 rapportent en plus de cela, une diminution de l'activité de l'acétylcholine-estérase (enzyme impliquée dans la dégradation). Cependant, la quantité des récepteurs de l'acétylcholine (récepteurs muscariniques) n'est pas modifiée (Davies en 1979).

Il a été montré que l'activité cholinergique corticale se manifestait essentiellement au niveau des projections cholinergiques issues du noyau basal de Meynert. De ce fait, l'hypothèse d'une atteinte du noyau basal de Meynert dans la maladie d'Alzheimer a été émise (Johnston et coll. en 1979). Ceci a été confirmé par l'existence d'une perte neuronale dans celui-ci (Whitehouse et coll. en 1981 ; Tagliavini et coll. en 1983 ; Brion et coll. 1986). Néanmoins, cette atteinte des neurones du noyau basal de Meynert semble être postérieure aux altérations touchant leurs extrémités corticales. En effet, une diminution de l'activité de la choline-acetyl transférase corticale a été rapportée sans qu'une perte cellulaire puisse être décelée dans le noyau basal de Meynert (Pearson et coll. en 1983).

Des neurites cholinergiques ont été mis en évidence au niveau des plaques séniles corticales (Kitt et coll. en 1984 ; Geddes et coll. en 1986). De plus, la perte neuronale au niveau du noyau basal de Meynert est corrélée avec le nombre de plaques séniles corticales (Arendt et coll. en 1984). C'est donc au niveau des plaques séniles que pourraient se produire les altérations des extrémités neuronales.

A la suite de cette découverte de l'atteinte du système cholinergique dans la maladie d'Alzheimer, un espoir thérapeutique est né : on a pensé pouvoir traiter la maladie d'Alzheimer à l'aide d'un produit augmentant la concentration en acétylcholine, comme la L-dopa permet d'augmenter le taux de dopamine dans la maladie de Parkinson. L'administration de précurseurs de l'acétylcholine n'a pas donné de résultats positifs. Deux médicaments, la physostigmine et la tétrahydro-9-aminoacridine (THA), qui possèdent des propriétés anticholinestérasiques, font actuellement l'objet de nombreux essais cliniques mais les résultats sont décevants. Une légère amélioration est observée dans certains cas, mais elle n'est que transitoire et les effets disparaissent au cours des traitements chroniques.

Les autres systèmes monoaminergiques sont touchés mais à un degré moindre :

- le système noradrénergique, avec une perte neuronale au niveau du locus coeruleus dans les cas très affectés (Bondareff en 1982), celle-ci étant corrélée avec le nombre de plaques séniles corticales (Marcyniuk et coll. en 1986) ;
- le système dopaminergique avec une perte neuronale au niveau de l'aire tegmentée ventrale (Mann et coll. en 1987b).

Les systèmes neuropeptidergiques sont également impliqués dans la maladie : des neurites renfermant des neuropeptides divers sont présents au niveau des plaques séniles (Struble et coll. en 1987). Lenders et coll. en 1988 ont montré que le marquage des neurites des plaques séniles par des anticorps dirigés contre certains neuropeptides (NPY, somatostatine) précédait le marquage par des anti-tau ou des anti-PHF.

2.6.3. Hypothèse génétique.

Celle-ci résulte d'une part de l'existence d'une forme familiale de maladie d'Alzheimer et d'autre part de la similitude existant entre trisomie 21 et maladie d'Alzheimer.

Plusieurs équipes étudient des familles où la maladie semble se transmettre selon un mode autosomique dominant et tentent de localiser avec précision le gène de la maladie d'Alzheimer ou gène FAD pour "familial Alzheimer's disease".

Leur approche est basée sur le polymorphisme de longueur de fragments de restriction. Les endonucléases de restriction sont des enzymes qui reconnaissent des séquences d'ADN spécifiques qu'elles coupent en des points précis. L'utilisation de sondes radioactives permet de détecter parmi tous les fragments issus de la coupure, ceux qui ont une séquence d'ADN complémentaire. Si l'ADN a subi des mutations, les points de clivage sont modifiés et l'on obtient des fragments de restriction de longueur inhabituelle correspondant à autant d'allèles et conférant le polymorphisme. Il est ensuite possible de déterminer si un allèle est transmis avec la maladie.

En utilisant différentes sondes dont la position sur le chromosome 21 est connue, celles-ci étant choisies de façon à couvrir une partie du chromosome, différentes équipes ont montré que le gène lié aux formes familiales était localisé sur la partie proximale du bras long du chromosome 21 (St George-Hyslop et coll. en 1987a). Néanmoins, les sondes les plus proches (D21S16 et D21S1/D21S11 localisées en 21q21) sont situées à environ 15 centimorgans du gène FAD et son clonage n'a pas encore pu être réalisé. Il faut toutefois signaler que Schellenberg et coll. en 1988 ont obtenu des résultats opposés à ceux de St George-Hyslop et coll. en

ne trouvant pas de liaison entre les sondes situées en 21q21 et le gène FAD. Le fait que l'âge d'installation de la maladie était plus élevé pour les familles étudiées par ces auteurs que pour celles étudiées par St George-Hyslop, pourrait expliquer les résultats divergents et la forme familiale de la maladie pourrait donc être hétérogène.

De plus par cette méthode, plusieurs équipes ont montré que le gène du précurseur de la β protéine A4, lui aussi situé sur le bras long du chromosome 21, n'était pas lié au gène FAD (Van Broeckhoven et coll. en 1987 ; Tanzi et coll. en 1987c).

Le phénotype mongolien est la plupart du temps lié à la présence de trois chromosomes 21 au lieu de deux. Certains mongoliens (5%) ont cependant un caryotype normal c'est à dire sans trisomie 21 apparente. Dans ce cas, il a été montré par dosage génique, c'est à dire par mesure de l'activité d'enzymes codées par des gènes se situant sur le chromosome 21, qu'une partie du chromosome 21 était présente en trois exemplaires à la suite d'une translocation ou d'une microduplication d'un petit fragment du chromosome 21. Ainsi, les gènes responsables du syndrome de la trisomie 21 ne sont pas répartis au hasard sur le chromosome, mais ils sont situés sur ou à proximité de la bande 21q22. En effet, la trisomie pour cette seule bande suffit à provoquer la maladie ; elle contient les gènes de la superoxyde dismutase cuivre / zinc dépendante, de la cystationine β -synthétase et du protooncogène ETS 2 (Delabar et coll. en 1987a). Tous ces patients développent les lésions cérébrales caractéristiques de la maladie d'Alzheimer.

Parmi les enzymes précédemment citées, il en est une qui a fait et fait encore l'objet de très nombreuses études : la super oxyde dismutase cuivre/ zinc dépendante (SOD Cu/Zn) ou SOD 1. En effet, Sinet en 1982, a proposé qu'en raison de ses propriétés catalytiques et de son rôle dans le métabolisme des produits de réduction de l'oxygène, la SOD 1 pourrait être responsable du vieillissement accéléré observé dans la trisomie 21 et qu'elle pourrait également être impliquée dans la maladie d'Alzheimer. Nous aurons l'occasion d'y revenir au cours de la troisième partie de ce mémoire.

Plusieurs équipes ont tenté de déterminer si une microduplication du chromosome 21 ne pouvait pas être à l'origine de la maladie d'Alzheimer. Alors que certains auteurs ont montré que des séquences portées par le chromosome 21 étaient dupliquées dans la maladie d'Alzheimer (Delabar et coll. en 1987b), d'autres ont obtenu des résultats opposés (St George-Hyslop et coll. en 1987b ; Tanzi et coll. en 1987a). Le gène du précurseur de la β protéine A4 ne serait donc pas dupliqué dans la maladie d'Alzheimer.

2.6.4. Autres hypothèses.

L'hypothèse virale, émise il y a quelques années à la suite de la découverte des prions responsables notamment de la maladie de Creutzfeldt-Jacob, tend actuellement à être abandonnée. En effet, la maladie d'Alzheimer ne semble pas être transmissible.

Certains auteurs ont émis l'hypothèse d'un déficit en facteur de croissance pour expliquer la perte sélective des neurones cholinergiques (Hefti et coll. en 1986). Le premier facteur trophique isolé, le nerve growth factor (NGF), est non seulement actif sur les neurones du système nerveux périphérique comme cela avait été décrit initialement, mais aussi sur les neurones cholinergiques centraux. En effet, il a été montré récemment que les cellules cibles de ces neurones possèdent des ARN messagers qui codent pour le NGF et les neurones cholinergiques eux-mêmes possèdent des récepteurs membranaires au NGF (Hefti et coll. en 1987). Une utilisation locale du NGF pourrait donc prévenir ou limiter l'atteinte cholinergique. Une autre thérapeutique pourrait consister en des greffes neuronales.

D'autres pensent qu'une substance toxique pourrait être à l'origine de la maladie d'Alzheimer. Le glutamate pour certains, à cause de ses propriétés cytotoxiques, l'aluminium pour d'autres, en raison de sa localisation dans les lésions cérébrales, seraient de bons candidats sur lesquels nous reviendrons au cours de la troisième partie de ce mémoire.

Nous pouvons retenir de ce chapitre que :

- le diagnostic ne peut être affirmé du vivant des malades en raison de l'absence de marqueur biologique ;
- il n'existe aucun modèle expérimental de l'affection : la plupart des travaux s'effectuent sur des cerveaux prélevés *post-mortem* ne révélant que les stades terminaux des processus pathologiques ;
- il n'existe pas de traitement efficace.

Nos efforts se portent sur l'étude des constituants biochimiques des lésions cérébrales. En effet, comme bon nombre d'auteurs, nous pensons :

- que la meilleure connaissance des constituants lésionnels permettra de comprendre les mécanismes pathologiques à l'origine de la formation de ces lésions,
- que différentes hypothèses étiopathogéniques pourront être posées et que des modèles expérimentaux permettant de les vérifier pourront être mis au point,
- que pourront ensuite être instaurées des thérapeutiques visant à enrayer ces processus pathologiques.

C'est sur les dépôts de substance amyloïde que se sont tournés la plupart des chercheurs, car il est vraisemblable que cet évènement soit assez proche du *primum movens* de l'affection.

Néanmoins, la démence est due à la mort neuronale et il est très probable que celle-ci soit entraînée par l'accumulation des fibrilles insolubles, constituées d'agrégats de protéines tau, dans le cytoplasme des neurones. Or, les protéines tau sont rencontrées de façon normale dans les cellules nerveuses saines. De ce fait, nous pensons que leur incorporation dans les paires de filaments en hélice est consécutive à leur modification biochimique.

Notre but était au départ, de découvrir cette modification.

Nous verrons, au cours de la deuxième partie de ce mémoire, comment l'étude comparative des protéines tau issues de cerveaux témoins et de cerveaux de patients atteints de maladie d'Alzheimer nous a permis de découvrir des formes anormalement phosphorylées de ces protéines, qui sont spécifiquement exprimées dans le tissu nerveux atteint par la dégénérescence neurofibrillaire.

La troisième partie, exposera comment, grâce à cette découverte, nous avons tenté de mettre au point un modèle *in vitro* de la dégénérescence neurofibrillaire.

**Etude des protéines tau
cérébrales
par immuno-transfert.**

Comme nous venons de le voir, les protéines tau sont non seulement présentes dans les neurones en dégénérescence où elles constituent les PHF, mais elles sont aussi présentes dans les cellules nerveuses saines. Nous avons d'abord tenu à aborder le rôle physiologique de ces protéines avant d'envisager leur implication physiopathologique dans la maladie d'Alzheimer.

1. Les microtubules.

1.1. Mise en évidence.

La mise au point de techniques douces de fixation des cellules a rendu possible l'observation des microtubules en microscopie électronique (Slautterback en 1963 ; Ledbetter et coll. en 1963). Aujourd'hui, nous savons que les microtubules sont présents dans toutes les cellules eucaryotes à l'exception des hématies des mammifères.

Ils se présentent sous la forme de tubes creux de 25 nm de diamètre et de longueur variable (plusieurs microns). Ces tubes sont constitués par l'assemblage de 13 protofilaments de 5 nm de diamètre qui s'associent selon une hélice gauche.

Peu après ont été mis en évidence deux autres classes de filaments qui interviennent dans le cytosquelette. Ce furent d'abord les microfilaments qui sont constitués par de l'actine polymérisée et qui ont un diamètre de 7 nm. Ils forment un réseau à proximité de la membrane plasmique. L'autre classe est celle des filaments intermédiaires. Ceux-ci sont spécifiques d'un type cellulaire et c'est ainsi que l'on trouve des neurofilaments dans les cellules nerveuses, des filaments gliaux dans les cellules gliales, des filaments de desmine dans les cellules musculaires... Les neurofilaments sont des filaments de 10 nm de diamètre qui sont constitués par trois sous-unités protéiques dénommées NF-H, NF-M et NF-L de poids moléculaire respectif 200, 160 et 70 kDa.

Avant la mise en évidence de ces filaments, on pensait que le fluide intracellulaire n'était pas du tout organisé mais l'existence d'une architecture intra-cellulaire est maintenant clairement établie : les différents organites sont en contact avec les différents types de filaments parmi lesquels les microtubules jouent un rôle clé.

1.2. Fonctions.

Les microtubules et les filaments du cytosquelette en général sont impliqués dans le maintien de la forme des cellules. Par exemple, lors de la différenciation des

cellules musculaires striées, la mise en place des myofibrilles est guidée par des microtubules qui donnent une forme allongée aux myocytes plurinucléés. Si les cellules sont traitées par la colchicine, elles ne s'allongent pas et prennent une forme sphérique, les myofibrilles étant dans ces conditions orientées dans toutes les directions.

Les microtubules sont aussi impliqués dans la motilité cellulaire. Cette deuxième fonction est évidente lorsque les structures étudiées sont les cils ou les flagelles, mais c'est aussi la motilité intra-cellulaire qui est concernée. Cela est flagrant lorsque la cellule étudiée est un neurone. En effet, la machinerie servant à la synthèse des protéines (récepteurs membranaires, neurotransmetteurs...) ou des lipides (nécessaires au renouvellement des membranes), se situe dans le corps cellulaire alors que la destination la plus éloignée de ces molécules, c'est à dire la terminaison synaptique, se trouve parfois à plusieurs décimètres du lieu de synthèse. Cet acheminement vers les terminaisons nerveuses est appelé transport antérograde. De plus, il existe un transport rétrograde car des molécules sont captées par endocytose au niveau des terminaisons nerveuses et gagnent ensuite le corps cellulaire.

Cet acheminement des molécules depuis le corps cellulaire jusqu'aux terminaisons nerveuses, et vice versa, se fait par l'intermédiaire des microtubules sur lesquels s'accrochent mitochondries, vésicules contenant des neurotransmetteurs, vésicules contenant des fragments de membrane. Ce transport axonal demande de l'énergie qui est fournie par l'hydrolyse de l'ATP et fait intervenir des protéines ATPasiques comme la kinésine.

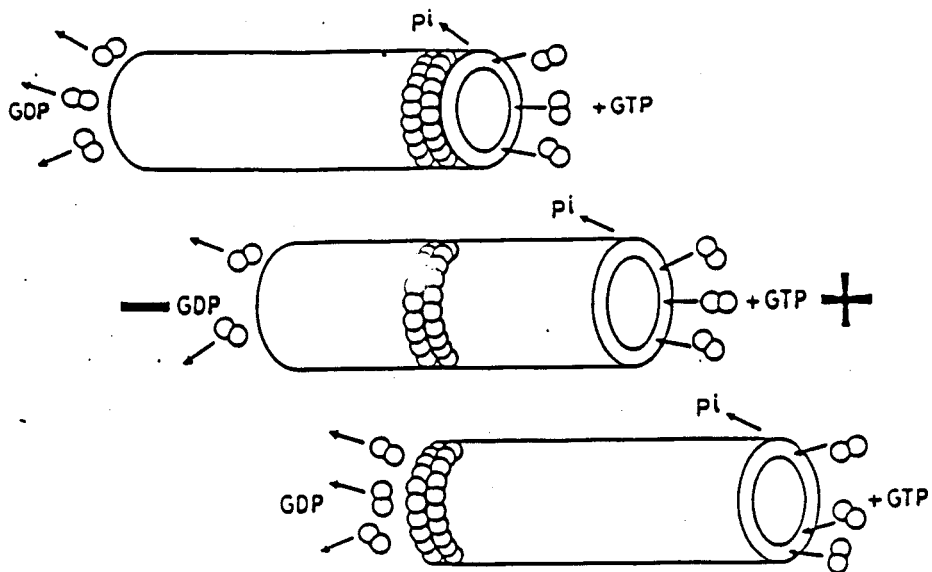
Un transport axonal lent a également été décrit. Celui-ci, antérograde, correspond à un déplacement en masse de l'axoplasme.

1.3. Nature biochimique.

Le constituant majeur des microtubules est une protéine appelée tubuline qui a un poids moléculaire de 120 kDa et un coefficient de sédimentation de 6 S (Weisenberg et coll. en 1972). Cette protéine a été très bien conservée au cours de l'évolution. Chaque molécule de tubuline est en fait un dimère de deux sous unités : la tubuline α et la tubuline β , chacune ayant un poids moléculaire d'environ 55 kDa (Bryan et coll. en 1971). Ce sont ces dimères qui constituent l'unité de base des microtubules, ceux-ci étant construits de telle sorte qu'une molécule de tubuline α soit toujours entourée par de la tubuline β et réciproquement. Il en résulte une polarité des microtubules, une extrémité ne présentant que des sous-unités α , l'autre que des sous-unités β .

Figure 6 : schéma illustrant la polymérisation des microtubules (d'après Dustin en 1984).

La polymérisation a lieu à l'extrémité + tandis que la dépolymérisation se poursuit à l'extrémité -.



De la tubuline préparée à partir d'extraits de cerveau est capable de polymériser *in vitro*, les microtubules obtenus étant tout à fait semblables à ceux observés *in vivo*. Les critères nécessaires à la polymérisation sont la présence d'une certaine concentration en tubuline appelée concentration critique, de guanosine triphosphate (GTP) et de Mg^{++} à faible concentration, la polymérisation optimale se faisant à 37°C. Les facteurs favorisant la dépolymérisation sont la présence de calcium, les pressions élevées, une température inférieure à 4°C, certains alcaloïdes qui se fixent sur les dimères de tubuline et empêchent ainsi leur polymérisation (colchicine, vinblastine, podophylline). Margolis et coll. en 1978 ont montré que les dimères de tubuline ayant fixés du GTP sont ajoutés à une extrémité (notée +) tandis que des dimères associés à du GDP sont continuellement perdus à l'autre (notée -). La tubuline se déplace donc de l'extrémité + vers l'extrémité -.

1.4. Les protéines associées aux microtubules.

Avec la tubuline, on trouve des protéines mineures appelées MAP (microtubule associated protein) pouvant être réparties en deux groupes :

- l'un, de haut poids moléculaire, comprend MAP 1 (345 kDa) et MAP 2 (un doublet à 271 et 286 kDa) ;
- l'autre, de faible poids moléculaire (50 à 70 kDa) est constitué par les protéines tau.

On s'est aperçu lors d'études *in vitro* que les microtubules dépolymérisés contenaient en plus de la tubuline 6 S (dimères de tubuline α et β), de la tubuline 36 S constituée de 23 sous-unités 6 S disposées en anneau (Borisi et coll. en 1972 ; Kirschner et coll. en 1974). En fait, seule la fraction 36 S est capable de polymériser (Weingarten et coll. en 1974).

Ceci est dû à la présence d'un facteur protéique. Certains auteurs ont montré que ce facteur correspondait aux protéines tau (Weingarten et coll. en 1975 ; Fellous et coll. en 1977) alors que d'autres montraient qu'il s'agissait de MAP 2 (Murphy et coll. en 1975 ; Keates et coll. en 1975 ; Sloboda et coll. en 1976). Il apparaît aujourd'hui que les deux molécules sont capables d'induire la polymérisation de la tubuline, les protéines tau étant toutefois plus performantes que MAP2.

2. Les protéines tau.

2.1. Propriétés physico-chimiques.

Ces protéines ont été très étudiées depuis leur découverte. Les résultats connus à ce jour proviennent de l'étude de différentes espèces : souris, rat, porc, boeuf et homme. Chez toutes ces espèces, la structure et les fonctions des protéines tau sont très similaires.

Chez l'homme, elles sont en fait une famille de 5 à 6 polypeptides dont le poids moléculaire, déterminé après électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de sodium-dodécyl-sulfate (SDS), se situe dans une zone allant de 45 à 62 kDa. Le nombre et le poids moléculaire de ces isoformes varient d'une espèce à l'autre. Les protéines tau sont donc hétérogènes mais les cartes peptidiques (obtenues par protéolyse limitée) des différents variants ainsi que leur composition en acides aminés suggèrent une parenté très proche (Cleveland et coll. en 1977).

L'analyse bidimensionnelle de ces protéines révèle une hétérogénéité encore plus grande. En effet, si 5 à 6 bandes sont visibles après une séparation monodimensionnelle, ce sont une vingtaine de taches que l'on peut observer après une séparation bidimensionnelle. Leur point isoélectrique déterminé par cette méthode, est compris entre 6,5 et 8,5, les variants les plus petits étant les plus basiques (Cleveland et coll. en 1977 ; Ksiezak-Reding et coll. en 1988a,b).

Les protéines tau sont très dissymétriques avec un rapport axial de 20 / 1 (Cleveland et coll. en 1977). Le fait d'être des molécules allongées pourrait leur permettre d'interagir avec plusieurs molécules.

2.2. Origine de l'hétérogénéité des protéines tau.

Il faut tout d'abord signaler que cette hétérogénéité n'est pas innée. En effet, dans le cerveau de rat foetal, des anticorps anti-tau marquent une seule bande à 48 kDa alors que plusieurs bandes sont détectées après la naissance (J 20 à J 25 post natal) (Mareck et coll. en 1980 ; Francon et coll. en 1982). La forme foetale diffère des formes adultes de par sa structure : leur protéolyse limitée donne des cartes peptidiques différentes (Francon et coll. en 1982). De plus, la forme foetale est moins performante dans la polymérisation de la tubuline que les protéines tau adultes. Les différentes formes de protéines tau adultes, bien qu'elles soient hétérogènes, sont très proches les unes des autres comme le montre la similitude de leurs cartes peptidiques (Cleveland et coll. en 1977).

2.2.1. Au niveau post-traductionnel : la phosphorylation.

On sait depuis longtemps que ce sont des phosphoprotéines (Cleveland et coll. en 1977).

Elles peuvent servir de substrat :

- à la protéine kinase C (Calcium / phospholipides dépendante) qui intervient surtout au niveau des résidus " sérine " et peu au niveau des résidus " thréonine " (Hoshi et coll. en 1987).

- à la protéine kinase A (AMPc dépendante) qui peut également phosphoryler les protéines tau (Pierre et coll. en 1983). Cette phosphorylation se fait aussi sur les résidus " sérine ", mais en des sites différents de ceux de la protéine kinase C.

- à la protéine kinase II calcium / calmoduline dépendante (Yamamoto et coll. en 1983).

Par des expériences de phosphorylation *in vitro*, Baudier et coll. en 1987 ont montré qu'il existait 2 modes de phosphorylation :

- le mode I qui entraîne une diminution de la mobilité électrophorétique due à un changement de la conformation et qui se fait par l'intermédiaire de la protéine kinase II calcium / calmoduline dépendante ;

- le mode II qui fait intervenir la protéine kinase C et qui ne modifie pas la mobilité électrophorétique.

Même si certains types de phosphorylation n'entraînent pas un ralentissement de la mobilité électrophorétique, ils peuvent néanmoins engendrer une hétérogénéité. En effet, l'addition de groupements phosphates apporte des charges négatives aux protéines et de ce fait modifie leur point isoélectrique. Or nous avons vu précédemment que si 5 bandes sont détectées après séparation monodimensionnelle, ce sont 20 taches qui sont observées après une séparation bidimensionnelle.

La phosphorylation des protéines tau est donc une des causes de leur hétérogénéité.

2.2.2. Au niveau génomique.

Les protéines tau ne sont codées que par un seul gène (Drubin et coll. en 1984 ; Neve et coll. en 1986) qui est localisé chez l'homme sur le chromosome 17 (Neve et coll. en 1986). C'est par épissage alternatif des ARN messagers que l'hétérogénéité est obtenue (Himmler et coll. en 1989b). L'ADN est d'abord transcrit en un ARN immature appelé transcrit primaire qui est composé de séquences codantes appelées

exons et de séquences non codantes appelées introns. Ce transcrit primaire peut donner naissance à plusieurs ARN messagers matures qui ont des longueurs différentes parce qu'ils ne comportent pas tous les mêmes exons. Ces ARN messagers seront ensuite traduits en autant de protéines différentes.

Quelle que soit l'espèce considérée, les différents variants des protéines tau ont une partie C terminale constante qui contient des domaines répétitifs renfermant un motif caractéristique Proline-Glycine-Glycine-Glycine et une partie N terminale variable. Chez l'homme, les domaines répétitifs sont composés de 31 à 32 résidus d'acides aminés et peuvent être présents en 3 (Goedert et coll. en 1988) ou 4 exemplaires (Goedert et coll. en 1989a). Ces domaines répétitifs sont codés par des exons différents (Goedert et coll. en 1989a ; Himmler et coll. en 1989a). A l'état foetal, on ne rencontre que des protéines tau contenant trois domaines répétitifs alors qu'à l'état adulte, les formes contenant 3 ou 4 domaines répétitifs coexistent (Goedert et coll. en 1989a). Dans l'hippocampe, les cellules granulaires du gyrus denté ne renferment que les formes avec 3 domaines répétitifs alors que les cellules pyramidales de la corne d'Ammon et du subiculum renferment les deux types de protéines tau (Goedert et coll. en 1989a). Il existe donc une spécificité vis à vis du stade de développement et une spécificité vis à vis du type cellulaire. La découverte de deux nouvelles parties de séquence des protéines tau fait que, en combinaison avec la présence de 3 ou 4 domaines répétitifs, on dénombre à l'heure actuelle chez l'homme 6 variants de protéines tau (Goedert et coll. en 1989b) (figure 6 bis).

Les protéines MAP 2 et tau ont une partie de séquence commune : leur partie C terminale qui contient les domaines répétitifs (Lewis et coll. en 1988). Ceci explique l'existence de réactions croisées entre tau et MAP 2 (Yen et coll. en 1987) ainsi qu'entre tau et les neurofilaments (Nukina et coll. en 1987 ; Ksiezak-Reding et coll. en 1987).

2.3. Rôle et mode d'action des protéines tau.

2.3.1. Interaction avec les microtubules.

L'action polymérisante des protéines tau sur les microtubules, nous venons de le voir, est à l'origine de la découverte de ces protéines. Des expériences de polymérisation *in vitro* ont permis de montrer qu'elles agissent de manière stoechiométrique plutôt que catalytique.

Figure 6 bis : séquence des protéines tau humaines (d'après Goedert et coll. en 1989).
La combinaison des séquences soulignées donnerait naissance à 6 variants des protéines tau.

1 MAEPRQEFVMEHDAGTVGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTD
41 AGLKESPLOTPTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLV
81 DEGAPGKOOAAOPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAG
121 HVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPP
161 GQKKQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGTSSP
201 GSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAK
241 SRLQTAPVPMPLKKNVKSIGSTENLKHQPGGGKVQIINK
281 KLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVVKPVDLSKVTS
321 KCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNI
361 THVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVVKSPVVS
401 GDTSPRHLSNVSSSTGSIDMVDSPLATLADEVSAASLAKQG
441 L

La microinjection de protéines tau dans des cellules contenant naturellement peu de ces protéines (fibroblastes) entraîne la polymérisation des microtubules ; de plus, les microtubules des cellules ainsi traitées sont plus résistants à l'action du nocodazol (une drogue anti-microtubulaire dépolymérisante) que les cellules non traitées (Drubin et coll. en 1986). Outre leur rôle polymérisateur, les protéines tau ont donc un rôle stabilisateur. Des fibroblastes transfectés avec une partie du gène codant pour les protéines tau, voient leurs microtubules s'agencer en paquets (Kanai et coll. en 1989).

L'observation en microscopie électronique de microtubules polymérisés *in vitro* en présence ou en l'absence de protéines tau a permis de montrer que celles-ci forment des bras sur les microtubules (< 20 nm) ; elles pourraient donc servir de ponts entre les microtubules et les autres filaments ou même des organites (Murphy et coll. en 1975 ; Hirokawa et coll. en 1988).

Les protéines tau les plus lourdes sont les plus affines pour la tubuline (Sandoval et coll. en 1981 ; Carlier et coll. en 1984 ; Kim et coll. en 1986). Littauer et coll. en 1986 ont montré que les protéines tau interagissent avec 2 peptides dérivés de la partie C terminale de la β tubuline (les acides aminés 434-440 de la tubuline seraient les plus importants). Les séquences répétitives des protéines tau constituent le domaine de liaison à la tubuline (Lewis et coll. en 1988 ; Himmler et coll. en 1989a ; Ennulat et coll. en 1989). La liaison entre protéines tau et tubuline pourrait être de type électrostatique en raison de la nature basique des domaines répétitifs des protéines tau et de la nature acide de la partie C terminale de la tubuline (Himmler et coll. en 1989a).

Lewis et coll. ont montré en 1989 que l'extrémité C terminale des protéines tau avait une structure en hélice α . Les protéines tau situées sur deux microtubules adjacents pourraient interagir par l'intermédiaire de ces structures particulières et ainsi former des ponts entre deux microtubules voisins.

La présence de groupements sulfhydryls dans la molécule a été suggérée par Baudier et coll. en 1987b, permettant peut-être la réalisation d'autres pontages entre les molécules.

2.3.2. Interaction avec les autres éléments du cytosquelette.

Les protéines tau se lient aux neurofilaments (Letierrier et coll. en 1982 ; Bloom et coll. en 1983 ; Heimann et coll. en 1985 ; Miyata et coll. en 1986).

La fixation des microtubules à l'actine se fait par les MAPs (Nishida et coll. en 1981 ; Griffith et coll. en 1982).

2.4. Régulation de l'action des protéines tau.

2.4.1. La calmoduline.

Les protéines tau peuvent se lier à la calmoduline par l'intermédiaire du calcium, cette liaison empêchant leur fixation sur les microtubules (Sobue et coll. en 1981 ; Kakiuchi et coll. en 1981 ; Lee et coll. en 1982 ; Erneux et coll. en 1984). La liaison des protéines tau à l'actine est inhibée de la même façon par la calmoduline (Kotani et coll. en 1985). Il en est de même pour la liaison avec les neurofilaments (Miyata et coll. en 1986).

Baudier et coll. en 1987b ont montré que la polymérisation des microtubules pouvait également être inhibée par la protéine S100 qui interagit en fait avec les protéines tau de la même façon que la calmoduline par l'intermédiaire du calcium.

2.4.2. La phosphorylation.

Les protéines tau, lorsqu'elles sont dans un état phosphorylé, ont une activité polymérisante diminuée (Lindwall et coll. en 1984). Yamamoto et coll. en 1983 ont montré que cette diminution de l'activité polymérisante était proportionnelle au degré de phosphorylation. Selon Baudier et coll. en 1987, la phosphorylation de mode I serait celle qui empêche la polymérisation des microtubules.

La liaison avec l'actine est inhibée par la phosphorylation (Nishida et coll. en 1981 ; Selden et coll. en 1983).

2.5. Localisation tissulaire.

Différentes techniques ont été utilisées pour déterminer si les protéines tau étaient spécifiques d'un type cellulaire mais elles ont donné des résultats contradictoires : les techniques immunohistochimiques suggèrent leur présence dans des cellules gliales ou des fibroblastes (Conolly et coll. en 1980) alors que les techniques de biologie moléculaire (hybridation in situ ou northern blot) suggèrent une spécificité vis à vis des cellules nerveuses (Goedert et coll. en 1988).

2.6. Localisation cellulaire.

Cette fois encore, des résultats divergents ont été obtenus. Des cultures d'explants de ganglion cervical supérieur (Peng et coll. en 1986), ainsi que des cultures de neurones hippocampiques (Kosik et coll. en 1987) suggèrent que les protéines tau sont présentes dans l'axone. Papasozomenos et coll. en 1987, ont montré que des protéines tau étaient présentes également dans le corps cellulaire mais qu'elles différaient des protéines tau axonales par leur état de phosphorylation. En effet, un anticorps monoclonal appelé tau-1 ne met en évidence que l'axone mais, si les coupes de tissu sont déphosphorylées avant la réaction immunohistochimique, l'anticorps reconnaît aussi les corps cellulaires. Brion et coll. en 1988 ont montré que dans le cervelet, les protéines tau étaient localisées dans l'axone. Parent et coll. en 1988 ont montré par immuno-transfert que les protéines tau étaient présentes aussi bien dans l'axone que le corps cellulaire et qu'elles étaient plus abondantes dans ce dernier compartiment.

3. Les protéines tau et la maladie d'Alzheimer.

Comme nous l'avons vu au cours de la première partie de ce manuscrit, les protéines tau sont les constituants antigéniques et ultrastructuraux majeurs des PHF qui s'accumulent dans les neurones en dégénérescence, dans le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer. L'agrégation de ces protéines sous la forme de PHF insolubles doit être consécutive à une modification biochimique.

En 1988, à notre arrivée au laboratoire, cette modification n'était pas connue. Une hypothèse avait néanmoins été avancée : celle d'une phosphorylation anormale. Elle était basée sur le fait que la détection des neurones en dégénérescence sur coupes de tissu par l'anticorps monoclonal tau-1 était augmentée après un traitement préalable par une enzyme déphosphorylante, la phosphatase alcaline (Grundke-Iqbal et coll. en 1986b ; Wood et coll. en 1986).

Des résultats convergents avaient été obtenus par Ihara et coll. en 1986b. Ces auteurs montraient qu'un immunosérum dirigé contre les PHF contenait une forte proportion d'anticorps dirigés contre des épitopes phosphorylés des protéines tau et une faible proportion d'anticorps dirigés contre des épitopes non phosphorylés. La détection des neurones en dégénérescence sur coupes de tissu par les seuls anticorps dirigés contre des épitopes phosphorylés des protéines tau était tout à fait similaire à celle de l'immunosérum anti-PHF initial. Par contre, les anticorps dirigés contre les épitopes non phosphorylés les détectaient très faiblement.

Parmi ces trois équipes, seule celle de Grundke-Iqbal et coll. avait réalisé une étude par immuno-transfert : les polypeptides issus de préparations de PHF ainsi que les protéines tau issues de préparations de microtubules de cerveaux malades étaient mieux détectées par tau-1 après déphosphorylation mais le profil électrophorétique était tout à fait similaire à celui de protéines tau issues de préparations de microtubules de cerveaux témoins.

En d'autres termes, l'existence de variants de protéines tau caractéristiques du cerveau malade n'avait pas été démontrée.

En 1988b, Ksiezak-Reding et coll., en utilisant l'anticorps monoclonal tau-1 n'ont pas observé une augmentation de l'immunoréactivité des protéines tau issues du cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer après déphosphorylation ; l'analyse bidimensionnelle des protéines tau ne leur a pas permis de mettre en évidence des variants caractéristiques de la maladie d'Alzheimer et les auteurs ont conclu que les protéines tau du cerveau témoin et celles du cerveau malade avaient les mêmes propriétés biochimiques.

Ce travail remettait donc en question la théorie d'une phosphorylation anormale des protéines tau dans la maladie d'Alzheimer.

4. Résultats personnels.

4.1. Méthodologie.

Nous avons entrepris l'étude des protéines tau par immuno-transferts afin d'affirmer ou d'infirmer l'hypothèse d'une phosphorylation anormale. Nous nous sommes intéressés dans un premier temps aux protéines tau au sein d'homogénats cérébraux totaux plutôt qu'aux protéines tau purifiées, afin d'éviter une perte de matériel ou une dégradation. De plus, nous avons essayé dans la mesure du possible de réaliser une étude immunohistochimique, afin de relier les résultats de notre analyse biochimique à la présence ou à l'absence de neurones en dégénérescence neurofibrillaire (DNF) et de plaques séniles (PS).

Nous disposions d'une banque de cerveaux provenant de 15 patients atteints de maladie d'Alzheimer et de 15 témoins (tableau 1). Le diagnostic clinique de maladie d'Alzheimer a été posé en accord avec les critères du N.I.N.C.D.S - A.D.R.D.A. et a été confirmé par la présence de neurones en DNF et de PS à l'issue d'un examen neuropathologique. Les cerveaux témoins provenaient de personnes qui n'étaient atteintes d'aucune maladie neurologique et qui ne présentaient pas à l'autopsie les lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer.

Tableau 1 : âge, sexe et délai *post-mortem* des malades et témoins étudiés.

L'âge est exprimé en années et le délai *post-mortem* en heures. Les critères qui ont servi à l'élaboration du diagnostic de maladie d'Alzheimer sont ceux de McKhann et coll. en 1984. Les témoins ne souffraient d'aucune maladie neurologique au moment du décès.

TEMOINS			
CAS	SEXE	AGE	P - M
T1	F	38	8
T2	H	45	5
T3	H	53	7
T4	H	55	15
T5	H	59	8
T6	F	62	7
T7	H	68	3
T8	H	72	5
T9	F	74	6
T10	F	78	14
T11	F	79	6
T12	F	79	14
T13	F	80	5
T14	H	81	7
T15	F	98	3

MALADES			
CAS	SEXE	AGE	P - M
A1	F	37	5
A2	F	55	4
A3	F	60	3
A4	F	62	3
A5	H	64	15
A6	H	66	6
A7	H	68	6
A8	H	69	12
A9	H	70	5
A10	F	73	4
A11	F	75	5
A12	F	77	11
A13	F	77	5
A14	F	78	30
A15	F	85	7

Aussitôt les cerveaux prélevés nous avons procédé de la façon suivante :

- un hémisphère est fixé dans le carnoy et, après inclusion dans la paraffine, des coupes sont réalisées pour les études immunohistochimiques (collaboration avec l'équipe du docteur André Défossez du laboratoire d'histologie de la faculté de médecine de Lille) ;

- sur l'autre hémisphère, différentes régions cérébrales sont disséquées puis congelées en vue d'analyses biochimiques ultérieures ou homogénéisées immédiatement à l'aide d'un broyeur de Potter (téflon / verre ou verre / verre) dans la solution réductrice de Laemmli (Laemmli et coll. en 1970) dans les proportions 1 : 10 (poids : volume) ; l'homogénat est ensuite chauffé à 100°C pendant 10 mn afin d'améliorer la solubilisation des protéines (par la fixation du SDS) et leur réduction pour la séparation électrophorétique.

Les outils immunologiques dont nous disposions pour réaliser cette étude étaient deux anticorps polyclonaux : un anti-protéines tau humaines et un anti-PHF.

L'immunsérum anti-tau avait été obtenu en injectant à un lapin des protéines tau humaines extraites du cerveau du patient T7 selon un protocole basé sur leur thermostabilité et purifiées par électrophorèse préparative.

L'immunsérum anti-PHF avait été obtenu grâce à des PHF extraites du cerveau du patient A1 par la technique de Selkoe et coll. en 1982.

Les propriétés immunologiques de ces deux anticorps sont semblables. En effet, sur coupes de cerveaux de patients atteints de maladie d'Alzheimer, ils marquent tous deux les neurones en dégénérescence à l'échelle de la microscopie optique (Persuy et coll. en 1985 ; Delacourte et coll. en 1986) et marquent tous deux les PHF à l'échelle de la microscopie électronique (Défossez et coll. en 1988). De plus, sur immuno-transferts, ils marquent les protéines tau (Delacourte et coll. en 1986 ; Parent et coll. en 1988).

4.2. Etude des protéines tau de différentes régions cérébrales provenant d'un malade et d'un témoin de même âge.

Avant d'étudier un grand nombre de cas, nous avons d'abord voulu comparer le cerveau d'un malade à celui d'un témoin. Le patient A11 a été choisi car il avait été bien étudié sur le plan histologique et le témoin T9 parce que son âge et le délai *post-mortem* étaient proches de ceux du patient A11 (tableau 1).

Dans le cerveau du témoin T9 (figure 7A), l'anti-tau détecte les protéines tau dans une zone de poids moléculaires allant de 45 à 62 kDa quelles que soient les régions cérébrales étudiées.

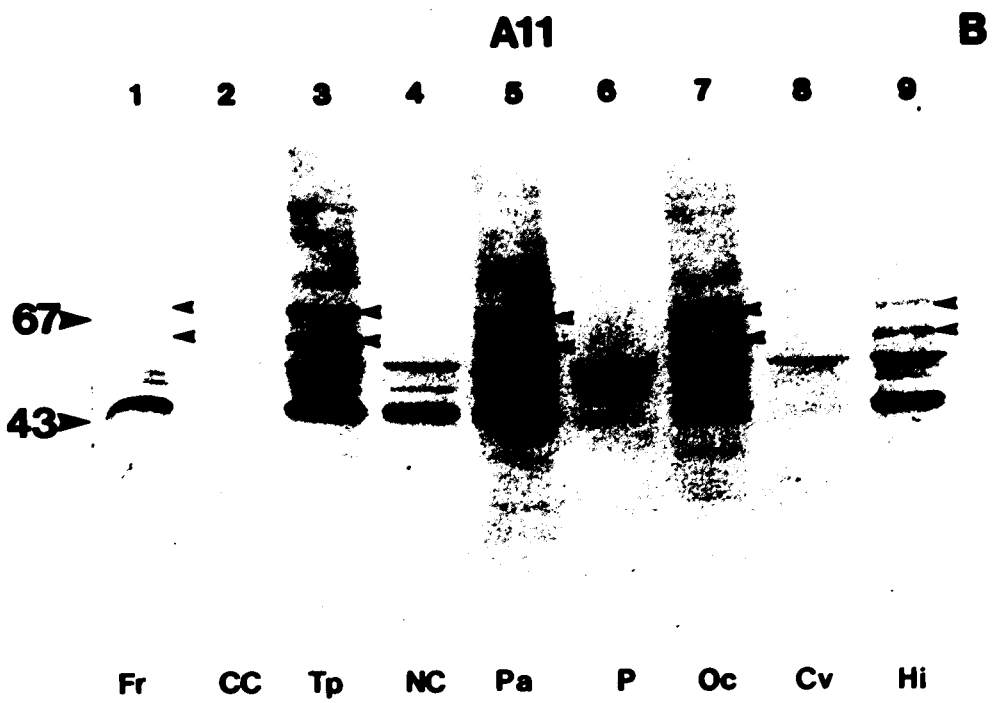
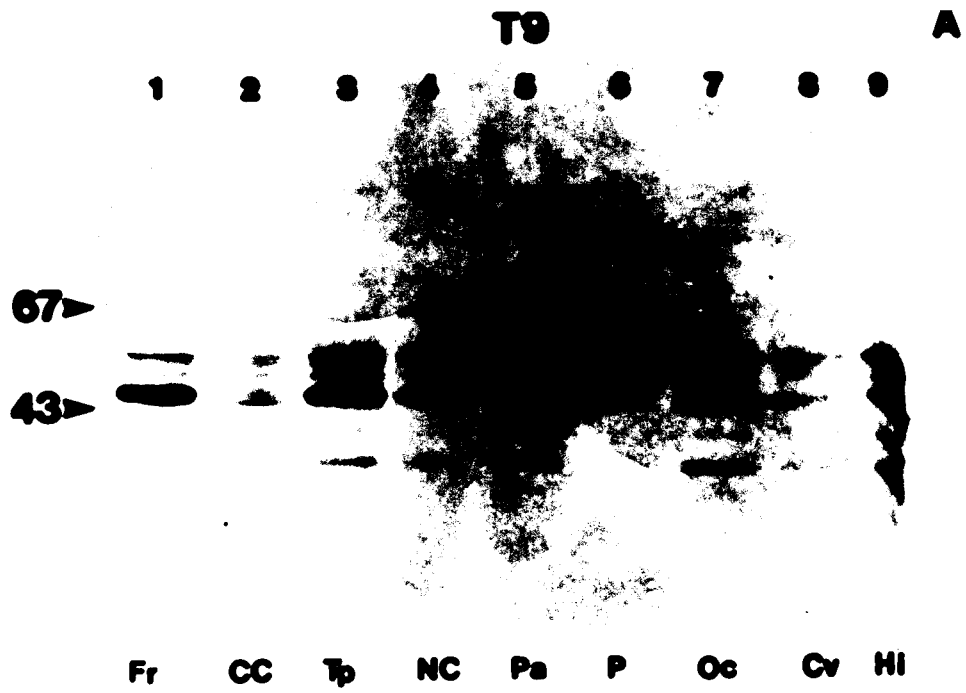


Figure 7 : étude par immuno-transfert avec l'immunsérum anti-tau, d'homogénats totaux de différentes régions cérébrales provenant du témoin T9 (A) et du malade A11 (B).

Des couloirs 1 à 9 ont été déposés respectivement 25 µl des homogénats suivants : cortex frontal (Fr), corps calleux (CC), cortex temporal (Tp), noyau caudé (NC), cortex pariétal (Pa), pont cérébral (P), cortex occipital (Oc), cervelet (Cv) et hippocampe (Hi).

La détection des protéines tau varie quantitativement d'une région cérébrale à une autre tant chez le témoin que chez le patient atteint de maladie d'Alzheimer. Elle varie également qualitativement mais uniquement chez le malade où deux protéines dont le poids moléculaire est situé aux alentours de 64 et 69 kDa (petites pointes de flèches) sont présentes dans les régions qui renferment les lésions caractéristiques de l'affection.

L'anti-tau a été utilisé dilué au 1/10000. Les témoins de masse moléculaire (grandes pointes de flèches) sont la sérum albumine bovine (67 kDa) et l'ovalbumine (43 kDa).

Des différences d'ordre quantitatif existent entre ces régions : par exemple, le corps calleux (figure 7A couloir 2), le noyau caudé (figure 7A couloir 4), le pont cérébral (figure 7A couloir 6) ou le cervelet (figure 7A couloir 8), contiennent moins de protéines tau que les différentes régions corticales (figure 7A couloirs 1, 3, 5 et 7) ou l'hippocampe (figure 7A couloir 9). Aux environs de 45 kDa, une bande diffuse est fortement détectée dans les régions contenant beaucoup de substance grise (couloirs 2, 6 et 8). Le fait que cette bande soit diffuse est vraisemblablement dû à l'existence de deux protéines tau de poids moléculaire très voisin. En effet, deux bandes sont visibles aux environs de 45 kDa lorsque l'immunoréactivité est faible (couloirs 2, 6 et 8). Ainsi, nos immunsérums détectent 6 bandes dans certains cas et 5 dans d'autres, mais ces 6 variants de protéines tau sont toujours localisés dans une zone de poids moléculaire allant de 45 à 62 kDa.

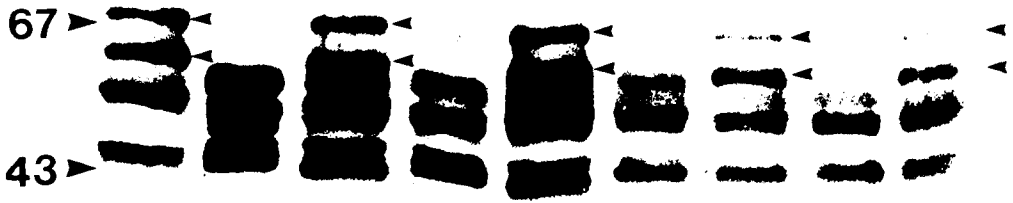
Dans le cerveau du patient A11 (figure 7B), un profil similaire est observé dans les régions telles que le corps calleux (figure 7B couloir 2), le noyau caudé (figure 7B couloir 4), le pont cérébral (figure 7B couloir 6) ou le cervelet (figure 7B couloir 8) mais un profil différent, marqué par la présence de deux bandes supplémentaires situées aux environs de 64 et 69 kDa, est observé dans la plupart des régions corticales comme le cortex frontal (figure 7B couloir 1), le cortex temporal (figure 7B couloir 3), le cortex pariétal (figure 7B couloir 5), le cortex occipital (figure 7B couloir 7) ou l'hippocampe (figure 7B couloir 9). Les régions où ce profil particulier est observé contiennent toutes des neurones en DNF et des PS.

4.3. Etude d'un plus grand nombre de cas.

Il nous fallait déterminer si ces deux bandes étaient présentes dans les homogénats de cerveaux de tous les malades d'Alzheimer ou si elles étaient simplement le fait du patient A11. La figure 8 représente un immuno-transfert sur lequel des homogénats de cortex temporal de malades d'Alzheimer et de témoins alternent. Cette région cérébrale a été choisie parce qu'elle est affectée de façon constante par la dégénérescence neurofibrillaire au cours de la maladie d'Alzheimer. Nos immunsérums détectent les deux bandes à 64 et 69 kDa dans tous les homogénats de cerveaux malades mais dans aucun des homogénats témoins.

Ces résultats sont valables pour les cerveaux des 15 témoins et des 15 malades appartenant à notre banque : les deux bandes détectées à 64 et 69 kDa ne sont rencontrées que dans les cerveaux malades, uniquement dans les régions où les lésions caractéristiques de l'affection sont présentes.

1 2 3 4 5 6 7 8 9



A2 T3 A3 T6 A4 T10 A13 T15 A15
Tp

Figure 8 : étude par immuno-transfert avec l'immunsérum anti-tau, d'homogénats totaux de cortex temporal provenant de plusieurs malades et plusieurs témoins.

25 µl d'homogénat ont été déposés dans chaque puits. L'anti-tau a été utilisé dilué au 1/10000. Les témoins de masse moléculaire (grandes pointes de flèches) sont les mêmes que ceux de la figure 7.

Les deux bandes aux alentours de 64 et 69 kDa (petites pointes de flèches) sont toujours détectées dans les homogénats cérébraux des patients atteints de maladie d'Alzheimer mais jamais dans les homogénats témoins. Nous remarquons que l'intensité de la détection de ces deux protéines est proportionnelle aux traînées qui correspondent vraisemblablement à du matériel issu de la solubilisation partielle des PHF. La détection de ces deux protéines est plus forte dans les homogénats provenant des patients jeunes.

Elles sont plus fortement détectées dans les homogénats provenant des patients jeunes (comparer les couloirs 1, 3 et 5 avec les couloirs 7 et 9 de la figure 8).

Ces deux bandes ne sont pas détectées dans toutes les aires corticales : les aires motrices (gyrus precentralis par exemple) en sont dépourvues. Par ailleurs, leur détection n'est pas limitée au cortex car dans le cas de patients très affectés, nous avons pu les trouver dans les noyaux comme le putamen ou le noyau caudé.

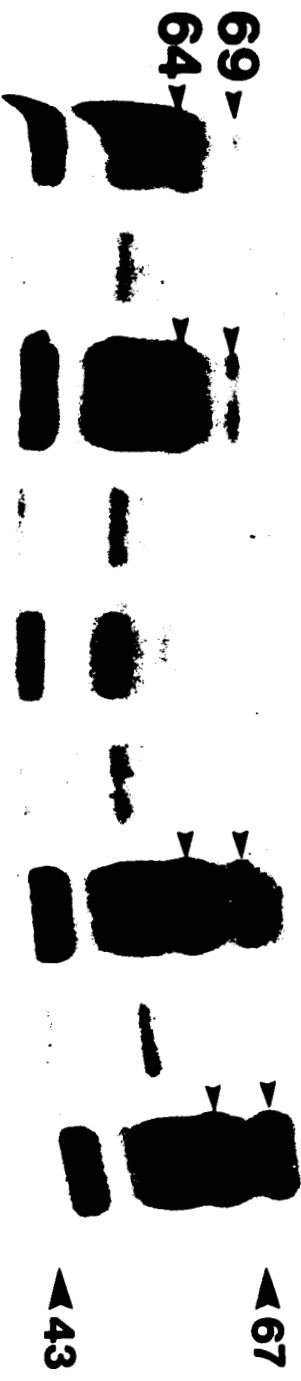
4.4. Comparaison substance grise substance blanche.

Les régions corticales de malades et de témoins ont été disséquées de manière à étudier séparément la substance grise et la substance blanche par immuno-transfert.

Chez les témoins, les protéines tau sont présentes à la fois dans la substance grise et la substance blanche mais elles sont plus abondantes dans la substance grise. Ces résultats confirment les résultats de Papasozomenos et coll. en 1987 et de Parent et coll. en 1988 mais ils infirment ceux de Binder et coll. en 1985 ; Peng et coll. en 1986 et Kosik et coll. en 1987.

Chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer, la situation est identique à celle des témoins et de plus, les protéines de 64 et 69 kDa sont uniquement détectées dans la substance grise corticale (comparer les couloirs 1, 3, 5, 7 et 9 avec les couloirs 2, 4, 6, 8 et 10 de la figure 9).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Oc Pa Prec Tp Fr
g b g b g b g b g b

A7

Figure 9 : comparaison par immuno-transfert du contenu en protéines tau de la substance grise et de la substance blanche corticales.

L'anti-tau a été utilisé dilué au 1/10000. Les témoins de masse moléculaire (grandes pointes de flèches) sont les mêmes que ceux de la figure 7.

La substance grise (g) et la substance blanche (b) des cortex occipital (Oc), pariétal (Pa), temporal (Tp), frontal (Fr) ainsi que celles du gyrus precentralis (PreC) proviennent du cerveau du patient A7. Elles ont été disséquées séparément et homogénéisées dans la solution réductrice de Laemmli. 25 µl d'homogénat ont été déposés par puits.

Dans tous les cas, l'intensité de la détection des protéines tau est plus forte dans la substance grise que dans la substance blanche. Les deux protéines de 64 et 69 kDa (petites pointes de flèches) ne sont détectées que dans la substance grise corticale. Elles ne sont pas détectées dans le gyrus precentralis qui ne contient pas de neurones en dégénérescence neurofibrillaire ni de plaques séniles.

4.5. Nature des protéines de 64 et 69 kDa.

Le fait que nos immunosérums anti-tau et anti-PHF détectent ces deux protéines suggère qu'elles sont des formes modifiées des protéines tau.

Afin de le confirmer, nous avons utilisé d'autres immunosérums anti-tau (figure 10). Ceux-ci étaient dirigés contre les protéines tau de différents vertébrés : rat, porc, boeuf. Comme le montre la figure 10, tous ces anticorps détectent les protéines de 64 et 69 kDa dans les homogénats de cerveaux malades (couloirs 2, 3 et 4).

Ces deux protéines ne sont pas reconnues par des immunosérums dirigés contre les neurofilaments.

De plus, nous avons entrepris la synthèse de peptides correspondant à des parties de séquence des protéines tau humaines qui ont été injectés à des lapins afin d'obtenir des anticorps polyclonaux. Ces peptides ont été choisis à partir de la séquence des protéines tau humaines (Goedert et coll. en 1989) dont une prédiction de structure secondaire (régions qui sont sous la forme de feuillets β , d'hélices α ...) et la détermination de l'antigénicité (hydrophilie, hydrophobie) ont été réalisées à l'aide d'un logiciel informatique. Les séquences des différents peptides que nous avons synthétisés sont répertoriées dans le tableau 2.

Pour notre part, nous avons réalisé la synthèse du peptide n°2, le peptide n°1 ayant été synthétisé par le docteur Hublau et les peptides n°3 et 4 ont été synthétisés par les laboratoires Neosystem.

A ce jour, un seul immunosérum a été obtenu : celui dirigé contre le peptide n°1 qui correspond à la séquence répétitive de la partie C terminale des protéines tau. Cet immunosérum détecte non seulement les protéines tau humaines normales mais aussi les deux protéines de 64 et 69 kDa (figure 10 couloir 5 A1).

Ces résultats indiquent que ces deux protéines sont bien des protéines tau modifiées que nous appellerons désormais tau 64 et tau 69.

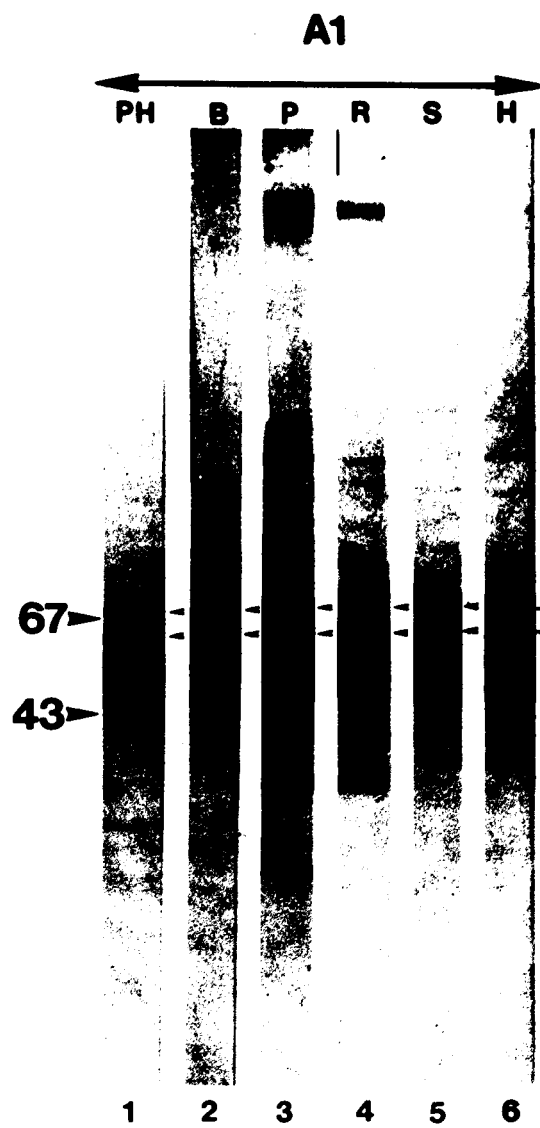
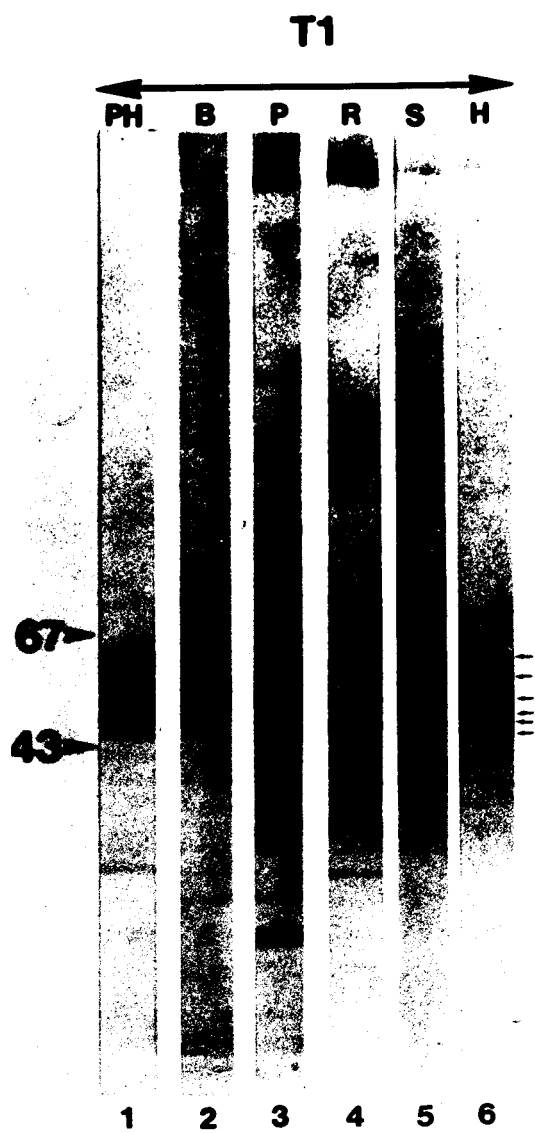


Figure 10 : étude des protéines tau par immuno-transfert à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines tau de différents vertébrés.

Nous avons utilisé ici le cortex pariétal du malade A1 et du témoin T1. Les homogénats (250 µl) n'ont pas été déposés dans des puits mais directement à la surface des gels de concentration. Après l'électrophorèse, les protéines ont été transférées sur une feuille de nitrocellulose qui a été découpée en fines bandelettes après coloration par le Ponceau S.

Ces bandelettes ont ensuite été incubées avec les anticorps suivants :

- un immunosérum anti-protéines tau de boeuf dilué au 1/500 (B - couloir 2),
- un immunosérum anti-protéines tau de porc dilué au 1/200 (P - couloir 3),
- un immunosérum anti-protéines tau de rat dilué au 1/500 (R - couloir 4),
- un immunosérum dirigé contre le peptide synthétique n°1 dilué au 1/200 (S - couloir 5).

Les trois premiers anticorps nous ont été prêtés respectivement par les docteurs Jacques Baudier, Arlette Fellous et Jean-Pierre Brion.

Dans l'homogénat de cerveau témoin, ces quatre immunosérums détectent les protéines tau normales (flèches) comme notre immunosérum anti-protéines tau humaines dilué au 1/10000 (H - couloir 6) et notre anti-PHF dilué au 1/200 (PH - couloir 1).

Dans l'homogénat de cerveau malade, les protéines de 64 et 69 kDa (pointes de flèches) qui sont détectées par l'anti-tau et l'anti-PHF, sont également reconnues, mais plus faiblement, par ces quatre immunosérums.

Ces deux protéines sont donc des protéines tau anormales.

Tableau 2 : séquences des peptides tau qui ont été synthétisés.

Peptides	Séquences	Position
n°1	V-Q-S-K-I-G-S-L-D-N-I-T-H-V-P-G-G-G	350-367
n°2	S-K-D-G-T-G-S-D-D-K-K-A-K-G-A-D-G	131-147
n°3	E-D-G-S-E-E-P-G-S-E-T-S-D-A-K	53-67
n°4	T-A-P-L-V-D-E-G-A-P-G-K-Q-A-A	76-90

Les positions sont données à partir de la séquence des protéines tau humaines publiée par Goedert et coll. en 1989.

4.6. Les protéines tau 64 et 69 sont-elles des marqueurs fiables de la DNF ?

Comme nous l'avons énoncé aux paragraphes 4.2. et 4.3., les protéines tau 64 et 69 ont toujours été détectées dans les régions touchées par la DNF. Cependant, afin de déterminer si ces deux protéines étaient des marqueurs fiables de la DNF et de mieux analyser la relation existant entre l'intensité de leur détection sur immunotransfert et la densité des lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer sur coupes de tissu, nous avons réalisé une étude en aveugle en collaboration avec l'équipe du professeur Jean-Jacques Hauw de l'hôpital de La Salpêtrière à Paris.

Cette étude s'est déroulée de la façon suivante : nous avons reçu de l'équipe de La Salpêtrière des échantillons codés de gyrus supramarginalis, provenant de 17 patientes dont nous ne connaissons ni le dossier clinique, ni la neuropathologie, pour lesquels nous avons recherché la présence des protéines tau 64 et 69 par immunotransfert à l'aide de l'immunsérum anti-PHF. Cet immunsérum a été préféré à l'anti-tau car nous avons constaté que lorsqu'elles étaient présentes en faible quantité, les protéines tau 64 et 69 étaient mieux détectées par l'anti-PHF.

Lorsque ces deux protéines étaient détectées par l'anti-PHF dans un homogénat, nous avons réalisé une évaluation semi-quantitative de leur immunodétection par passage des feuilles de nitrocellulose au densitomètre (celui-ci étant utilisé en mode réflectance). L'électrophorégramme obtenu a ensuite été décalqué sur du papier Wathman n°3 et les pics correspondants aux protéines Tau 64 et 69 découpés et pesés. Une valeur de 0 fut attribuée aux échantillons ne contenant que des protéines tau normales, une valeur de 100 fut attribuée à l'échantillon où les protéines tau 64 et 69 sont détectées le plus fortement, les autres échantillons étant notés proportionnellement à ce dernier (poids des pics pour l'échantillon considéré x 100 / poids des pics pour l'échantillon où la détection est la plus forte). Afin de limiter les erreurs dues à une qualité de transfert inégale entre les différentes parties du gel, trois immuno-transferts ont été réalisés avec des échantillons disposés de façon aléatoire sur les gels de polyacrylamide et les moyennes de la quantification des protéines tau 64 et 69 furent calculées.

Ces résultats furent ensuite confrontés avec les éléments dont disposait l'équipe du professeur Hauw :

- âge, délai *post-mortem*, intensité de la démence évaluée par le score obtenu par les patients au test de Blessed ;

- densités de neurones en DNF et de PS évaluées lors des examens de coupes de gyrus supramarginalis, prélevé sur l'hémisphère controlatéral, après coloration par la méthode de Bodian (imprégnation argentique).

Les résultats regroupés dans le tableau 3 montrent que les protéines tau 64 et 69 furent détectées dans 7 des 17 homogénats de gyrus supramarginalis analysés et qu'à chaque fois, leur détection était associée à la présence de neurones en DNF et de PS sur les coupes histologiques correspondantes. De plus, une forte immunodétection des protéines tau 64 et 69 était toujours liée à une forte densité de lésions, à l'exception de l'échantillon n°2677. Le fait que ces protéines ne furent pas détectées dans l'échantillon n°2825 où la densité de lésions était importante s'explique par une protéolyse (l'autopsie fut réalisée 56 heures après le décès). Les protéines tau 64 et 69 étaient absentes des échantillons ne contenant pas de lésions (échantillons n° 2813, 2896, 2857, 2634).

Elles n'ont pas été trouvées dans les échantillons contenant peu de neurones en DNF (échantillon n° 2916), peu de PS (échantillons n° 2944 et 2809) ou à la fois peu de neurones en DNF et de PS (échantillons n° 2722 et 2739). Ceci peut s'expliquer par une différence de sensibilité entre l'histologie et la technique des immuno-transferts. En effet, si l'échantillon contient seulement quelques lésions, celles-ci seront recensées lors de l'examen des coupes histologiques alors que la faible quantité de protéines tau 64 et 69 sera diluée lors de l'homogénéisation dans la solution réductrice de Laemmli et ces protéines ne seront pas détectées sur immuno-transfert. Cela pourrait aussi être lié à une asymétrie de la répartition des lésions : en effet, l'analyse biochimique a été réalisée sur des échantillons issus d'un hémisphère alors que les comptages de lésions ont été réalisés sur l'hémisphère controlatéral.

Afin de déterminer si la quantité de protéines tau 64 et 69 était corrélée statistiquement à la densité de lésions, nous avons calculé le coefficient de corrélation des rangs de Spearman (ρ) qui est un test non paramétrique. Ce type de test est requis lorsque le nombre d'échantillons est petit. Les résultats de ce test ont montré qu'il n'existait pas de corrélation entre la quantité de protéines tau 64 et 69 et l'âge des patients ou le délai *post-mortem*. Par contre la quantité de ces protéines est fortement corrélée avec la densité de lésions, la corrélation étant plus forte avec la densité de neurones en DNF qu'avec la densité de PS (tableau 4). De plus il existe aussi une corrélation, certes plus faible mais significative à 5 % avec la démence évaluée par le test de Blessed (tableau 4).

Cette étude en aveugle démontre donc que les protéines tau 64 et 69 sont des marqueurs fiables de la DNF de type Alzheimer.

Tableau 3 : données cliniques, neuropathologiques et biochimiques se rapportant aux 17 patientes impliquées dans l'étude en aveugle.

L'âge est exprimé en années et le délai *post-mortem* (P-M) en heures.

Les densités de plaques séniles (PS) et de neurones en dégénérescence neurofibrillaire (DNF) sont exprimées en $(\text{cm}^2)^{-1}$.

Le score au test de Blessed (BTS) et la quantité de protéines tau 64 et 69 (Tau 64,69) sont exprimés en unités arbitraires.

Cas	Age	P-M	BTS	PS	DNF	Tau 64,69
2812	82	7	4	12.9	49.9	97
2971	75	8	0	8	51.7	94
2704	89	5	2	9.4	27.1	90
2942	89	34	6	7.7	6.5	75
2677	90	35	-	.7	.46	44
2943	97	24	13	4.7	3.2	38
2782	75	2	2	5.8	3.6	25
2825	88	56	8	11.8	7.7	0
2813	86	44	10	0	0	0
2896	79	16	10	0	0	0
2857	89	14	19	0	0	0
2634	87	8	28	0	0	0
2916	97	22	16	0	.4	0
2944	88	5	27	.3	0	0
2809	94	19	26	1.4	0	0
2722	93	12	6	5.1	.3	0
2739	86	22	26	2.8	1.2	0

Tableau 4 : coefficient de corrélation des rangs de Spearman pour la quantité de protéines tau anormales et différents paramètres.

n est le nombre de valeurs sur lequel le test a pu être effectué ; rho est le coefficient de corrélation des rangs de Spearman ; p est la significativité de la corrélation.

Il existe une très forte corrélation avec la densité de neurones en dégénérescence, une corrélation un peu plus faible avec la densité de plaques séniles et une corrélation plus faible encore mais significative à 5 % avec la démence.

Les protéines tau 64 et 69 sont donc des marqueurs fiables de la dégénérescence neurofibrillaire.

	n	rho	p
Tau 64,69: BTS	16	- 0.51	< 0.05
Tau 64,69: PS	17	+ 0.71	< 0.01
Tau 64,69: DNF	17	+ 0.82	< 0.001

4.7. Mise en évidence d'une troisième protéine tau pathologique.

Comme cela a été signalé ci-dessus, l'anti-PHF détecte mieux les protéines tau 64 et 69 que l'anti-tau lorsque celles-ci sont présentes en faible quantité dans un homogénat de cerveau. Il aurait été intéressant de disposer d'un outil immunologique permettant de ne détecter que les protéines tau des homogénats de cerveaux malades.

Nous avons émis l'hypothèse que l'immunsérum anti-PHF contenait à la fois des anticorps dirigés contre des épitopes normaux des protéines tau et des anticorps dirigés contre des épitopes modifiés des protéines tau. Si cette hypothèse était exacte, il devait être possible d'épuiser l'immunsérum en anticorps du premier type par une incubation avec des protéines tau de cerveau témoin et d'obtenir un immunsérum ne contenant que les anticorps du second type et ne détectant plus que les homogénats de cerveaux malades.

Nous avons homogénéisé du tissu cérébral témoin dans le tampon qui est habituellement utilisé pour la réaction immunologique (Tris NaCl Tween), après que l'anti-PHF y ait été ajouté de façon à obtenir sa dilution optimale. Différents homogénats, correspondant à des valeurs croissantes du rapport poids / volume, ont été réalisés et testés sur des feuilles de nitrocellulose où avaient été transférés des homogénats de cerveaux témoins afin de déterminer le rapport minimal permettant d'épuiser l'immunsérum. Lorsqu'au moins 0,5 g de tissus est homogénéisé dans 8 ml d'immunsérum dilué au 1/200, les protéines tau des homogénats de cerveaux témoins ne sont plus détectées par cet anti-PHF épuisé. Par contre, au sein des homogénats de cerveaux malades, cet anti-PHF épuisé détecte encore les protéines tau 64 et 69 ainsi qu'une protéine de 55 kDa que nous avons appelée tau 55. La figure 11 montre les profils d'immunodétection obtenus par les immunsérums anti-tau, anti-PHF et anti-PHF épuisé sur des homogénats de cerveaux témoins et des homogénats de cerveaux malades.

Nous avons donc " élaboré " un outil immunologique permettant de détecter spécifiquement les protéines tau des patients atteints de maladie d'Alzheimer.

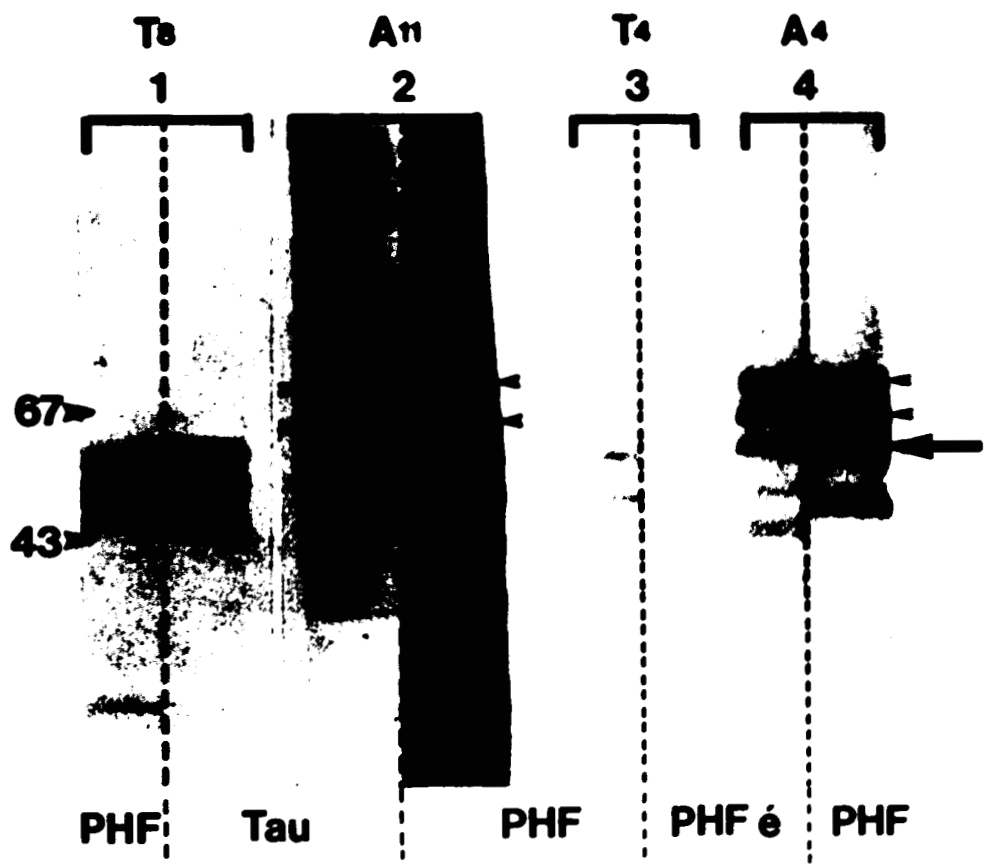


Figure 11 : comparaison du marquage obtenu avec l'anti-tau, l'anti-PHF et l'anti-PHF épuisé sur des homogénats cérébraux provenant de témoins et de patients atteints de maladie d'Alzheimer.

Le cortex temporal des témoins T4 et T8 et des malades d'Alzheimer A4 et A11 ont été choisis pour illustrer cette comparaison.

L'anti-tau a été utilisé dilué au 1/10000, l'anti-PHF et l'anti-PHF épuisé ont été dilués au 1/200.

L'anti-tau (Tau) détecte les protéines tau normales (dont le poids moléculaire est compris entre 45 et 62 kDa) dans les homogénats de cerveaux témoins (couloir 1) et il détecte en outre les protéines tau 64 et 69 (petites pointes de flèches) dans les homogénats de cerveaux malades (couloir 2).

Le marquage obtenu avec l'anti-PHF (PHF) est similaire (couloirs 1 et 2 pour les témoins ; couloirs 3 et 4 pour les malades).

L'anti-PHF épuisé (PHF é) ne détecte plus aucune protéine dans les homogénats cérébraux témoins (couloir 3) alors qu'il détecte encore les protéines tau 64 et 69 (petites pointes de flèches) ainsi qu'une protéine tau de 55 kDa (flèche) dans les homogénats de cerveaux malades (couloir 4). Les traînées sont encore détectées mais un peu plus faiblement que par l'anti-PHF.

Il existe donc trois protéines tau anormales dans les homogénats cérébraux de patients atteints de maladie d'Alzheimer : tau 55, 64 et 69. L'anti-PHF épuisé permet de les détecter spécifiquement.

4.8. Application au diagnostic de maladie d'Alzheimer.

Comme les protéines tau pathologiques sont des marqueurs fiables de la DNF de type Alzheimer qui peuvent être détectés spécifiquement par l'anti-PHF épuisé, nous avons tenté de les utiliser pour mettre au point un test permettant de poser le diagnostic de l'affection, du vivant des malades.

4.8.1. Etude du liquide céphalorachidien.

Nous avons d'abord étudié le liquide céphalorachidien (LCR) car nous pensions que les protéines tau 55, 64 et 69 pourraient y être détectées. En effet, au chapitre précédent, nous avons rapporté que les neurones en DNF n'étaient pas des structures figées mais qu'ils étaient dégradés vraisemblablement par l'intermédiaire des cellules microgliales. De ce fait, le passage des protéines tau pathologiques dans le LCR pouvait très bien être envisagé. De plus, Metha et coll. en 1985 avaient montré par la technique ELISA et des anticorps anti-PHF, que des antigènes issus des PHF étaient présents dans le LCR de malades d'Alzheimer.

Notre étude a porté sur 12 patients atteints de maladie d'Alzheimer probable (selon les critères du N.I.N.C.D.S.-A.D.R.D.A.) âgés de 38 à 88 ans (moyenne 66,7 +/- 15,1 ans) ainsi que sur 12 témoins de même âge (54-81 ans, moyenne 67 +/- 7,5 ans). Ces témoins souffraient d'hernie discale lombaire mais d'aucune maladie neurologique (ils avaient réalisé un score supérieur à 28 au mini mental state de Folstein et coll. en 1975). Les échantillons de LCR furent congelés aussitôt après la ponction. Après avoir été dilués au demi dans la solution réductrice de Laemmli, ils furent chauffés à 100°C pendant 10 mn et analysés par la technique des immuno-transferts.

Le profil qui est habituellement observé dans les homogénats de cerveaux malades (les protéines tau 55, 64 et 69 essentiellement) n'a été retrouvé dans aucun des échantillons de LCR (figure 12 A). Nos anticorps ne détectent qu'une bande très diffuse située aux alentours de 55 kDa, celle-ci étant détectée tant chez les témoins que chez les malades mais dont l'intensité varie selon les individus. Cependant il n'existe aucune corrélation entre l'intensité de la détection de cette bande et la pathologie.

L'anti-PHF épuisé détecte faiblement cette bande non seulement chez les malades mais aussi chez les témoins ; ceci est vraisemblablement dû à un épuisement insuffisant de l'immunsérum par rapport à la quantité de matériel immunoréactif, car la détection faible par l'anti-PHF épuisé n'est observée que lorsque l'anti-tau ou l'anti-PHF détectent cette bande de façon très importante.

A

67 ▶

43 ▶

A T A T A T A T A T A T A

B

67 ▶

43 ▶

T A T A T A T

Figure 12 : étude par immunotransfert avec l'immunsérum anti-tau du liquide céphalorachidien de patients atteints de maladie d'Alzheimer probable et de témoins.

L'anti-tau a été utilisé dilué au 1/10000.

Le LCR a été étudié soit après avoir été traité par un volume de solution de Laemmli (A), soit après avoir été concentré environ 5 fois (B).

En A, un homogénat de cortex temporal provenant du patient A10 a été déposé comme référence à l'extrême droite.

Les protéines tau 55, 64 ou 69 n'ont jamais été détectées même après concentration.

Seule une bande diffuse aux environs de 55 kDa fut mise en évidence par nos immunsérums. Sa présence n'est pas liée à la pathologie car on la trouve tantôt chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer (A), tantôt chez les témoins (T).

L'utilisation de l'anti-PHF épuisé ne nous a pas permis de distinguer entre malades et témoins.

Ce matériel immunoréactif est thermostable.

Le fait de concentrer le LCR des patients sur une membrane diaflo qui ne laisse passer que les protéines inférieures à 10 kDa n'a pas modifié les résultats : le même profil est observé lorsque le LCR est concentré 5 fois (figure 12 B).

4.8.2. Etude de biopsies cérébrales.

Comme cela a été signalé au chapitre précédent, les biopsies cérébrales, même si elles sont utiles pour confirmer le diagnostic clinique, ne sont indiquées que lorsque la démence est atypique.

La première biopsie que nous avons analysée a été réalisée au niveau du cortex frontal d'un homme âgé de 58 ans qui présentait un syndrome frontal. Le tissu cérébral fut divisé en 2 parties l'une destinée à l'examen biochimique, l'autre à un examen neuropathologique. Après avoir été traité par 10 volumes de solution réductrice de Laemmli, l'échantillon fut analysé par la technique des immuno-transferts à l'aide de nos trois antisérums (anti-tau, anti-PHF et anti-PHF épuisé). Les résultats de cette analyse montrent que les protéines tau 55, 64 et 69 sont présentes dans la biopsie (couloirs 1 et 4 de la figure 13a). De plus, leur immunodétection est plus forte que dans tous les échantillons *post-mortem* que nous avons analysés jusqu'ici (comparer les couloirs 1 et 3 de la figure 13A). Nous avons alors posé le diagnostic de DNF au sein du tissu cérébral, ce qui fut confirmé ultérieurement par l'histologiste. En effet, des neurones en DNF et des PS étaient présents (figure 13b).

La seconde biopsie que nous avons étudiée avait été réalisée chez une femme de 68 ans qui présentait également un syndrome frontal. Lorsque nous avons analysé cet échantillon, l'immunsérum anti-tau révéla la présence d'une protéine tau anormale de 65 kDa (couloirs 2 et 5 de la figure 13c). Le profil obtenu avec l'anti-PHF épuisé révéla l'existence de deux autres protéines tau anormales à 50 et 60 kDa (couloirs 2 et 5 de la figure 13e). L'examen neuropathologique révéla la présence de nombreux neurites en dégénérescence mais d'aucun neurone en DNF (figure 13d). Une coloration par la thioflavine S mettait en évidence quelques dépôts de substance amyloïde (figure 13f).

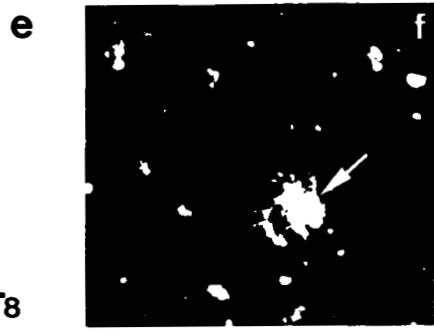
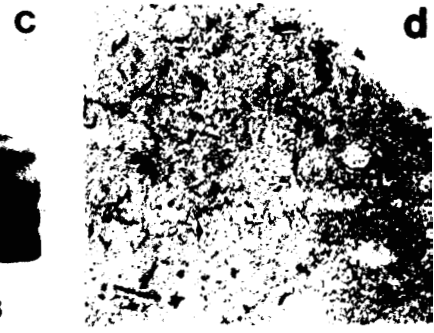
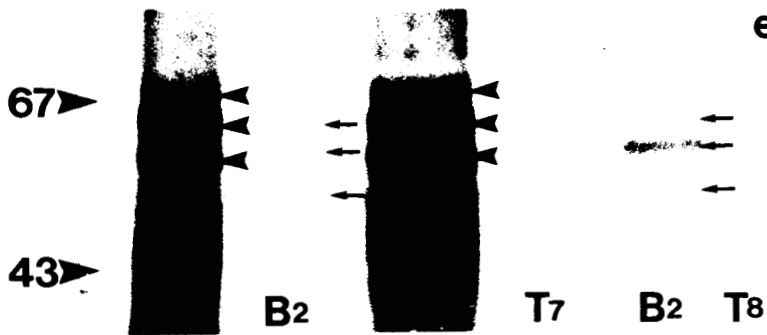
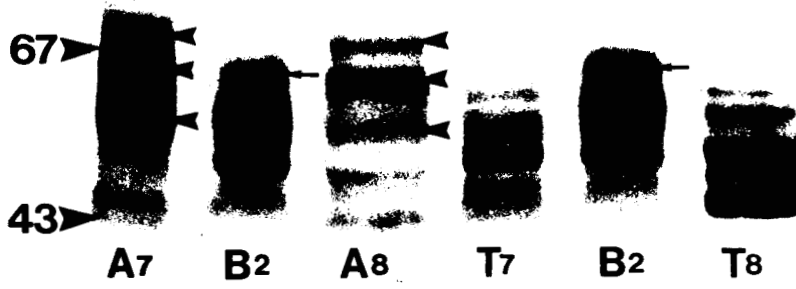
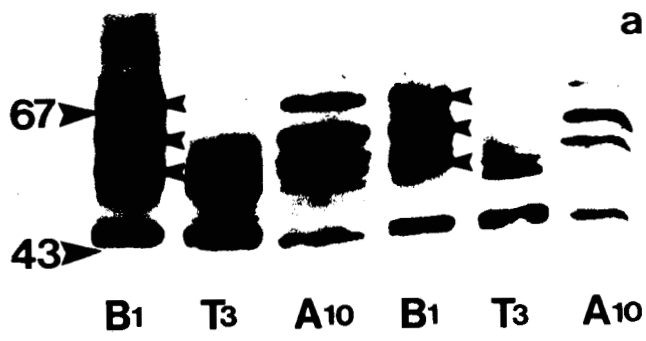


Figure 13 : étude histologique et par immuno-transfert de deux biopsies cérébrales.

La biopsie n°1 fut réalisée chez un patient âgé de 58 ans et la biopsie n°2 chez une patiente âgée de 68 ans tous deux présentant des signes atypiques de démence débutante.

En (a), la biopsie frontale n°1 (B1) est comparée à des homogénats de cortex frontal provenant du témoin T3 et du malade A10. Les protéines tau 55, 64 et 69 (pointes de flèches) sont détectées par l'anti-tau (ainsi que par l'anti-PHF et l'anti-PHF épuisé) dans cette biopsie, plus fortement que dans tous les échantillons autopsiques analysés précédemment. Dans les trois couloirs de droite, les échantillons ont été dilués au demi afin de vérifier que la plus forte immunodétection des protéines tau anormales dans la biopsie n'était pas un artéfact dû au transfert.

De nombreux neurones en DNF sont marqués par l'immunsérum anti-tau sur les coupes histologiques de cette biopsie (b).

En (c et e), la biopsie n°2 (B2) est comparée à des homogénats de cortex frontal provenant des témoins T7 et T8 et des malades A7 et A8. Le profil obtenu avec l'anti-tau (c) n'est caractéristique ni d'un malade d'alzheimer, ni d'un témoin : il comporte une seule bande anormale de poids moléculaire situé aux environs de 65 kDa (flèche). L'anti-PHF épuisé (e) révèle l'existence de deux autres bandes anormales à 50 et 60 kDa (flèches).

Sur les coupes histologiques, l'anti-tau (d) marque des neurites en dégénérescence dispersés dans le tissu cérébral mais jamais concentrés à la périphérie d'un dépôt amyloïde ; il ne marque pas de corps cellulaires de neurones en dégénérescence. La thioflavine S (f) met en évidence quelques dépôts amyloïdes sous formes de plaques séniles.

S'il est vrai que les dépôts de substance amyloïde apparaissent avant la DNF (Delacourte et coll. en 1987 ; Duyckaerts et coll. en 1988 ; Mann et coll. en 1989), cet échantillon pourrait renfermer les premiers signes de DNF. Comme nous y avons trouvé des protéines tau anormales de 50, 60 et 65 kDa, peut-être ces trois variants des protéines tau sont-ils des précurseurs des protéines tau 55, 64 et 69. L'étude d'autres biopsies cérébrales réalisées à des stades précoces de la maladie d'Alzheimer, est nécessaire pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Comme elles sont observées dans le cortex de patients présentant les premiers symptômes de maladie d'Alzheimer, les protéines tau 55, 64 et 69 sont des marqueurs précoces de la DNF de type Alzheimer.

4.9. Caractérisation des protéines tau 55, 64 et 69.

4.9.1. Purification.

Afin de pouvoir caractériser ces protéines, nous avons tenté de les purifier.

Le protocole que nous avons initialement choisi était basé sur la thermostabilité des protéines tau, propriété qui avait en outre permis l'obtention de l'immunsérum anti-tau humaines.

Cela consiste à homogénéiser le tissu cérébral dans un tampon Mes (acide 2-(N-morpholino)-éthane sulfonique) à pH 6,4 à raison de 1g / ml et à centrifuger cet homogénat à faible vitesse (13000 g) de façon à éliminer le matériel insoluble. Le surnageant auquel a été ajouté du NaCl (0,75 M) est ensuite chauffé à 100°C pendant 5 mn. Dans ces conditions, les protéines thermolabiles précipitent alors que les protéines thermostables (les protéines MAP 2 et tau) restent solubles. Une nouvelle centrifugation permet de récolter les protéines thermostables qui sont finalement concentrées par précipitation au sulfate d'ammonium.

Ce type de purification n'a pas pu être réalisé car les protéines tau 64 et 69 sont insolubles. En effet, lorsque l'homogénéisation est réalisée dans du tampon Mes et qu'une centrifugation à faible vitesse a lieu, l'analyse par immuno-transfert des différentes fractions montre que les protéines tau 55, 64 et 69 se trouvent dans le culot (figure 14 couloir 2).

Nous avons ensuite modifié notre protocole en ajoutant au tampon Mes une faible quantité de détergent, en espérant ainsi solubiliser les protéines tau pathologiques. Plusieurs détergents ont été utilisés (triton X100 ; triton X114 ; tween ; chaps ; N-lauryl sarcosine ; thesit ; N-dodécyl glucoside), mais aucun d'eux n'a permis de solubiliser ces protéines à l'exception du SDS. Ces protéines ne sont pas solubilisées même si 10% de triton X100 sont ajoutés.

Ainsi, l'étude des protéines tau 55, 64 et 69 nécessite la présence de SDS mais ceci empêche toute tentative de purification par les techniques chromatographiques classiques telles que la chromatographie d'échange d'ions ou la chromatographie d'affinité à l'aide d'anticorps immobilisés. Seule la chromatographie de tamisage moléculaire est permise avec certains gels très résistants tels que le sépharose CL 6B pour lesquels des tampons contenant 1% de SDS peuvent être employés. Les essais que nous avons réalisés en utilisant ce type de chromatographie n'ont pas été couronnés de succès car le tamisage moléculaire lorsqu'il est utilisé seul, n'est pas assez résolutif pour permettre la purification de ces protéines.

Nos investigations concernant l'origine des protéines tau 55, 64 et 69 ont donc été poursuivies sur des homogénats totaux.

4.9.2. Effets des agents réducteurs.

Nous avons d'abord pensé que ces trois protéines et en particulier les protéines tau 64 et 69 en raison de leur poids moléculaire élevé, pouvaient être issues de l'association entre certaines protéines tau et des petites protéines. La présence de groupements sulfhydryl au sein des protéines tau ayant été mise en évidence (Baudier et coll. en 1988), cette association pouvait donc éventuellement résulter d'une liaison de type pont disulfure. Pour vérifier cela, nous avons étudié le comportement électrophorétique de ces protéines dans différentes conditions de réduction. Les effets de deux agents réducteurs ont été testés : le β -mercapto éthanol (de 0 à 5%) et le dithiotreitol (de 0 à 1%). Aucune modification du poids moléculaire des protéines tau 55, 64 et 69 n'a été observée même lorsque une forte proportion de réducteur était présente dans la solution de Laemmli (comparer les couloirs 5, 6 et 7 de la figure 14).

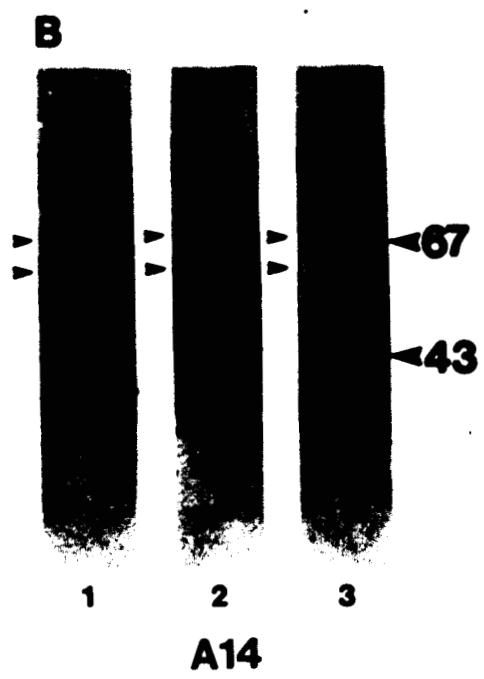
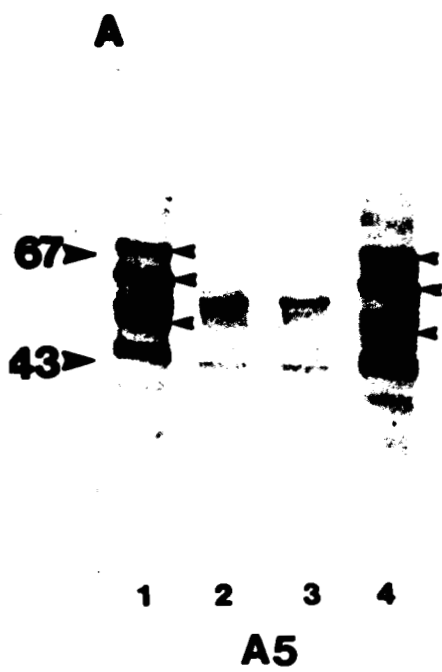


Figure 14 : A - analyse par immuno-transfert de la solubilité des protéines tau d'un homogénat de cerveau malade.

Le cortex temporal du patient A5 a été homogénéisé dans le tampon Mes à raison de 1 g par ml (couloir 1), puis l'homogénat a été centrifugé à 13000 g pendant 20 mn et un échantillon de surnageant a été prélevé (couloir 2) enfin, une centrifugation à 100000 g pendant une heure a été réalisée et surnageant (couloir 3) et culot (couloir 4) ont été analysés après addition d'un volume de solution réductrice de Laemmli et chauffage à 100°C pendant 10mn. 5 µl d'homogénat ont été déposés par puits.

Les protéines tau anormales (pointes de flèches) ne sont détectées que dans le culot 100000 g et ne sont donc pas solubles dans le tampon Mes.

B - étude par immuno-transfert des protéines tau d'un homogénat de cerveau malade placé dans différentes conditions de réduction.

Le cortex temporal du malade A14 a été homogénéisé à raison de 1 g pour 10 ml soit dans la solution réductrice de Laemmli dépourvue d'agents réducteurs (couloir 1), soit dans la solution réductrice de Laemmli contenant 1 % de dithiothreitol (couloir 2), soit dans la solution réductrice de Laemmli contenant 5 % de β-mercapto éthanol (couloir 3).

Les agents réducteurs n'ont pas d'effet sur le poids moléculaire des protéines tau 64 et 69 (pointes de flèches).

Leur poids moléculaire élevé ne résulte donc pas d'une liaison de type pont disulfure avec une petite protéine.

4.9.3. Traitement à la phosphatase alcaline.

Une phosphorylation anormale pouvait elle être à l'origine de l'existence des protéines tau 55, 64 et 69 ?

Nous avons deux raisons d'émettre cette hypothèse :

- comme nous l'avons vu précédemment, une théorie selon laquelle les protéines tau seraient phosphorylées dans la maladie d'Alzheimer existait même si elle était sujette à controverse (Grundke-Iqbal et coll. en 1986b ; Wood et coll. en 1986 ; Ihara et coll. en 1986 ; Ksiezak-Reding et coll. en 1988b) ;

- mais surtout, la phosphorylation *in vitro* de protéines tau de boeuf entraîne un ralentissement de leur mobilité électrophorétique (Baudier et coll. en 1987) ; ceci pourrait donc expliquer le poids moléculaire élevé des protéines tau 64 et 69.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé un traitement à la phosphatase alcaline en espérant induire une déphosphorylation se traduisant par une modification de la mobilité électrophorétique des protéines tau 64 et 69.

Dans un premier temps, les homogénats cérébraux ont été dialysés pendant 24 heures contre un tampon tris afin d'éliminer la plus grande partie du SDS sans faire précipiter les protéines tau anormales. Cette première dialyse réalisée à température ambiante (car le SDS précipite à 4°C) fut suivie d'une dialyse de 24 heures à 4°C contre le tampon utilisé par Baudier et coll. en 1987, qui permet une action optimale de l'enzyme (Tris ; NaCl ; MgCl₂ ; DTT ; pH 8,3). Des inhibiteurs de protéases (phénylméthyl-sulfonil-fluoride 0,2 µM et leupeptine 10 µM) sont ensuite ajoutés au dialysat avant l'incubation avec la phosphatase alcaline qui se déroule à 37°C.

Deux enzymes ont été employées :

- la phosphatase alcaline d'*Escherichia coli* de type III S qui fut utilisée à 10 U / ml ;

- la phosphatase alcaline d'intestin de veau utilisée à 100 U / ml.

Des tubes témoins ont été réalisés en incubant les extraits cérébraux avec une forme inactivée de l'enzyme qui est obtenue soit par chauffage (100°C pendant 5 mn), soit par addition de pyrophosphate de sodium (100 mg / ml) qui est un des substrats de la phosphatase alcaline. Ce deuxième type de témoin est le plus fiable car si l'enzyme est contaminée par des protéases (ce qui est souvent le cas), celles-ci seront également inactivées lors du chauffage alors que l'addition de pyrophosphate n'inhibe que la phosphatase.

Le temps d'incubation le plus long est de 20 heures et des échantillons sont prélevés à différents temps d'incubation afin de réaliser une cinétique. L'enzyme est inactivée par chauffage à 100°C pendant 10 mn après qu'un volume de solution réductrice de Laemmli ait été ajouté à chaque échantillon.

L'analyse de ces différents échantillons par la technique des immuno-transferts (figure 15) montre qu'après deux heures d'incubation avec l'enzyme (selon les homogénats), qu'il s'agisse de l'une ou l'autre des phosphatases employées, les protéines tau pathologiques ne sont plus détectées aux mêmes poids moléculaires : nos anticorps détectent fortement deux bandes à 50 et 60 kDa qui correspondent aux formes déphosphorylées des protéines tau 55, 64 et 69. Dans certains cas, nous avons remarqué la présence d'une fine bande faiblement détectée par nos anticorps aux environs de 67 kDa, qui pourrait être un produit intermédiaire de la déphosphorylation de la protéine tau 69. Ce profil (avec deux bandes majeures à 50 et 60 kDa) reste le même lorsque l'incubation est prolongée jusqu'à 20 heures. Dans les deux tubes témoins, le profil électrophorétique ne change pas quel que soit le temps d'incubation ce qui démontre que la diminution de poids moléculaire est bien due à l'action de la phosphatase alcaline.

Nous en avons conclu qu'une phosphorylation des protéines tau a bien lieu au cours de la maladie d'Alzheimer et que celle-ci entraîne l'apparition des variants pathologiques tau 55, 64 et 69. Cette phosphorylation est vraisemblablement responsable d'un changement de la conformation des protéines tau qui se traduit par une augmentation de leur poids moléculaire apparent.

Jusqu'ici, nous avons envisagé le cas de patients atteints de maladie d'Alzheimer par rapport à des témoins de même âge. Or, comme nous l'avons signalé au cours du premier chapitre, il existe d'autres affections où des filaments s'accumulent dans les cellules nerveuses en dégénérescence.

Ainsi, des neurones en dégénérescence contenant des paquets de PHF sont aussi présents dans l'hippocampe de certaines personnes âgées non démentes (Kemper en 1984) et dans de nombreuses régions cérébrales chez les mongoliens lorsqu'ils vivent au-delà de 35-40 ans (Wisniewski et coll. en 1979).

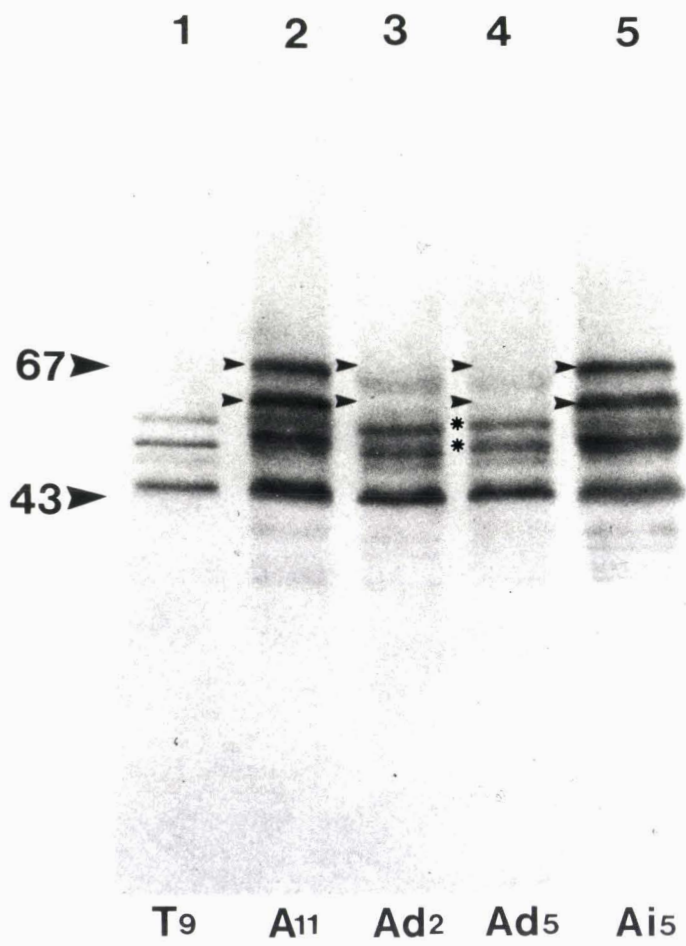


Figure 15 : étude par immuno-transfert des protéines tau d'un homogénat de cerveau malade après un traitement à la phosphatase alcaline d'intestin de veau.

L'enzyme a été utilisée à 100U/ml. La réaction a lieu à 37°C.

1 ml d'homogénat de cortex temporal provenant du patient A11 a été dialysé contre un tampon Tris/méthanol puis contre un tampon Tris-Mg⁺⁺ pH 8,3. Après dialyse, le volume est de 4 ml. Comme un volume de la solution réductrice de Laemmli est ajouté aux échantillons prélevés au cours de la déphosphorylation, nous avons déposé 160 µl pour obtenir une détection suffisante.

Couloir 1 : homogénat de cortex temporal du témoin T9 (20 µl).

Couloir 2 : homogénat de cortex temporal du patient A11 après dialyse.

Couloir 3 : échantillon prélevé après 2 heures d'incubation avec l'enzyme.

Couloir 4 : échantillon prélevé après 5 heures d'incubation avec l'enzyme.

Couloir 5 : tube témoin où avait été additionné du pyrophosphate de sodium à 100 mg/ml avant le début de la réaction enzymatique ; échantillon prélevé après 5 heures d'incubation avec l'enzyme.

Au cours du traitement à la phosphatase alcaline, le profil classique des homogénats de cerveaux malades comprenant les protéines tau 55, 64 et 69 (petites pointes de flèches) est modifié en un profil contenant deux bandes majeures à 50 et 60 kDa (astérisques), proche du profil électrophorétique des homogénats cérébraux témoins. Nous remarquons cependant parfois la persistance d'une fine bande aux environs de 67 kDa.

Les protéines tau 55, 64 et 69 sont issues d'une phosphorylation anormale.

D'autre part, des neurones contenant des filaments droits sont présents dans le cortex frontal et l'hippocampe des patients atteints de maladie de Pick (Rewcastle et coll. en 1968) ainsi que dans les noyaux du tronc cérébral et de la base du cerveau (putamen, pallidum) des patients atteints de paralysie supranucléaire progressive (PSP) (Tellez-Nagel et coll. en 1973).

Les protéines tau semblent intervenir dans la constitution de ces différents types de filaments car les cellules en DNF de toutes ces affections peuvent être mises en évidence par des immunsérums anti-tau (Brion et coll. en 1985 ; Delacourte et coll. en 1986 ; Pollock et coll. en 1986 ; Joachim et coll. en 1987).

Il nous fallait donc déterminer si la présence de protéines tau modifiées était caractéristique de la maladie d'Alzheimer ou au contraire, si c'était une constante au cours de tout processus neurodégénératif. De plus, si tel était le cas, il fallait préciser si les modifications étaient les mêmes pour toutes ces affections ou si chacune avait ses particularités. Pour cela, nous avons réalisé un traitement à la phosphatase alcaline et une analyse bidimensionnelle lorsque cela était possible.

4.10. Le vieillissement sans démence.

Comme nous venons de le préciser, l'hippocampe des personnes âgées non démentes est parfois affecté par la dégénérescence neurofibrillaire.

En analysant par la technique des immuno-transferts les homogénats d'hippocampe provenant de tous les cerveaux témoins de notre banque, nous avons trouvé les protéines tau 55, 64 et 69 dans un seul cas, celui du témoin T13 (figure 16).

Comme le montraient les résultats de l'analyse immunohistochimique, cette région contenait effectivement des neurones en DNF (figure 16).

Cet échantillon était en quantité insuffisante pour que nous puissions réaliser un traitement à la phosphatase alcaline ou une analyse bidimensionnelle.

Une fois de plus, la détection des protéines tau 55, 64 et 69 était associée à la DNF mais cette fois, elle ne concernait plus un patient atteint de maladie d'Alzheimer, mais une personne âgée de 80 ans qui n'était pas démente.

T13



T3



A10



Figure 16 : étude par immuno-transfert des protéines tau de l'hippocampe d'un témoin âgé non dément.

L'immunsérum anti-tau a été utilisé dilué au 1/10000 pour les immuno-transferts et au 1/200 pour l'immunohistochimie.

Dans l'homogénat d'hippocampe du témoin T13, l'immunsérum anti-tau détecte les protéines tau 55, 64 et 69 (pointes de flèches) sur immuno-transfert et il marque quelques neurones en dégénérescence sur les coupes histologiques (x 400).

Cette situation est différente de celle qui est habituellement observée chez les témoins où seules les protéines tau normales sont détectées sur immuno-transferts et aucun signe de dégénérescence n'est visible sur les coupes de tissu (par exemple cortex temporal du témoin T3). Par contre elle se rapproche de celle qui est classiquement observée chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer dans les régions affectées par la dégénérescence neurofibrillaire (par exemple cortex frontal du patient A10).

4.11. La trisomie 21.

En collaboration avec le docteur Mann de l'université de Manchester, nous avons étudié le cerveau de 6 patients présentant une trisomie 21 (syndrome de Down).

Ces patients étaient âgés de 37 à 65 ans (moyenne de 54,7 +/- 9,7 ans). Au moment du décès, ces patients résidaient dans un hôpital pour handicapés mentaux et de ce fait, les autopsies ont été réalisées tardivement : entre 42 et 93 heures après la mort (moyenne 54,8 +/- 18,9).

Un hémisphère avait été fixé pour les études histologiques qui étaient basées sur une coloration de Palmgren (imprégnation argentique ; Cross en 1982).

L'autre hémisphère avait été congelé pour les études biochimiques. Le tissu cérébral fut traité en vue de son analyse par immuno-transfert. L'intensité de l'immunodétection des protéines tau pathologiques fut évaluée semi-quantitativement par passage des feuilles de nitrocellulose au densitomètre comme décrit au paragraphe 4.6..

Nous avons étudié le cortex frontal, le cortex temporal, l'hippocampe, le noyau caudé, le thalamus et le cervelet.

Dans les régions comme le cervelet (figure 17 couloir 5) ou le noyau caudé (figure 17 couloir 7), l'anti-tau et l'anti-PHF détectent les protéines tau normales (poids moléculaire compris entre 45 et 62 kDa) alors qu'aucun marquage n'est observé en utilisant l'anti-PHF épuisé.

Dans le cortex frontal (figure 17 couloir 6), le cortex temporal (figure 17 couloirs 2, 3 et 10) ou l'hippocampe (figure 17 couloirs 4 et 8) les protéines tau 55, 64 et 69 ont été détectées à l'exception du cortex frontal du patient âgé de 37 ans.

Dans le thalamus, deux cas de figure se sont présentés : chez les 2 patients les plus jeunes les protéines tau pathologiques étaient absentes (par exemple figure 17 couloir 1) alors que chez les 4 autres patients, elles étaient faiblement détectées (figure 17 couloir 9).

Afin de déterminer si les protéines tau 55, 64 et 69 résultent d'une phosphorylation pathologique dans la trisomie 21 comme tel est le cas dans la maladie d'Alzheimer, certains homogénats de cerveaux contenant ces protéines tau pathologiques ont été incubés avec la phosphatase alcaline d'intestin de veau selon le protocole décrit au paragraphe 4.10..

SD
37 | 50 | 57 | 58 | 65

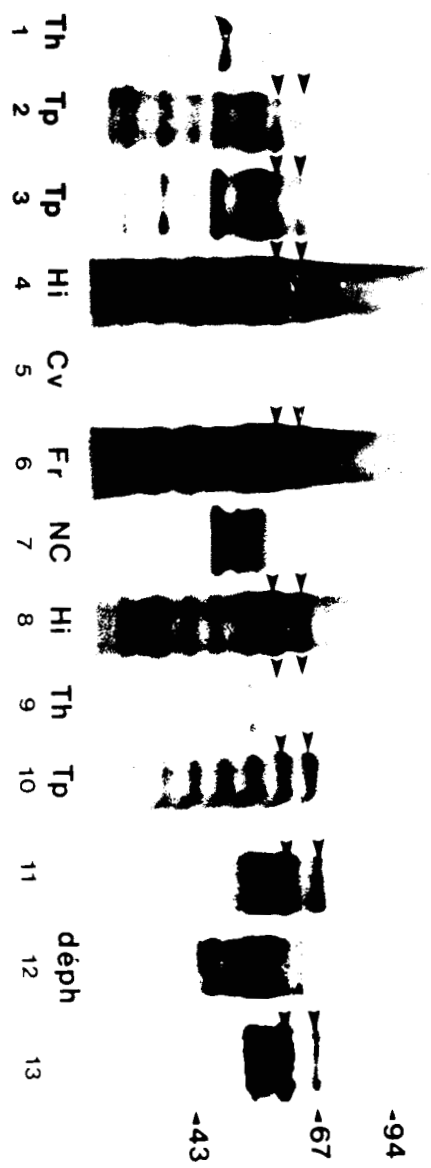


Figure 17 : étude par immuno-transfert avec l'immunosérum anti-tau, d'homogénats cérébraux issus de patients présentant une trisomie 21 (syndrome de Down).

De la gauche vers la droite ont été déposés 25 µl des homogénats suivants :

- thalamus (Th - couloir 1) et cortex temporal (Tp - couloir 2) du patient âgé de 37 ans,
- cortex temporal (Tp - couloir 3) et hippocampe (Hi - couloir 4) du patient âgé de 50 ans,
- cervelet (Cv - couloir 5) et cortex frontal (Fr - couloir 6) du patient âgé de 57 ans,
- noyau caudé (NC - couloir 7) et hippocampe (Hi - couloir 8) du patient âgé de 58 ans,
- thalamus (Th - couloir 9) et cortex temporal (Tp - couloir 10) du patient âgé de 65 ans.

Nous avons ensuite illustré la déphosphorylation (déph) en déposant 160 µl des échantillons suivants : homogénat de cortex temporal provenant du patient âgé de 65 ans après dialyse contre le tampon Tris-Mg⁺⁺ (couloir 11), un échantillon prélevé après 4 heures d'incubation avec la phosphatase alcaline d'intestin de veau à 100 U/ml (couloir 12) et enfin, l'échantillon témoin (prélevé après 4 heures) auquel nous avons ajouté 100 mg/ml de pyrophosphate de sodium avant le début de la réaction enzymatique (couloir 13).

Les protéines tau 55, 64 et 69 sont également présentes dans le cerveau des mongoliens. De plus elles résultent aussi d'une phosphorylation anormale

Comme le montre la figure 17, après deux heures de traitement, le profil change : les protéines tau 64 et 69 ne sont plus détectées alors que deux bandes sont plus fortement marquées à 50 et 60 kDa (comparer les couloirs 11 et 12 de la figure 17). Aucun changement de profil électrophorétique n'est observé lorsque du pyrophosphate de sodium est ajouté au préalable (figure 17 couloir 13). Donc, dans la trisomie 21 comme dans la maladie d'Alzheimer, les protéines tau 55, 64 et 69 sont des variants anormalement phosphorylés des protéines tau.

Cette fois encore, la détection des protéines tau 55, 64 et 69 sur immunotransferts était associée à la présence de neurones en DNF et de PS au sein des coupes de tissu. La détection des protéines tau 55, 64 et 69 était non seulement plus forte chez les patients les plus âgés mais elle était aussi plus étendue (thalamus). Pour illustrer ceci plus clairement, nous n'avons présenté dans le tableau 5 que les données concernant le patient le plus jeune (37 ans) et un patient âgé de 58 ans.

Certains homogénats de cerveaux ont également été analysés après que les protéines aient été séparées par électrophorèse bidimensionnelle. Dans un premier temps, les protéines sont séparées en fonction de leur point isoélectrique par un gradient de pH qui est obtenu à l'aide d'ampholines (isoélectrofocalisation). Puis les protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire par une électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS avant d'être transférées sur feuille de nitrocellulose et incubées avec les anticorps.

En utilisant des ampholines permettant d'établir des gradients assez étendus (3-10), nous avons constaté que les protéines tau pathologiques avaient des points isoélectriques plus acides que les protéines tau normales. Ceci nous a amené à utiliser pour la comparaison entre les différentes maladies neurodégénératives des gradients de pH mieux adaptés, c'est à dire plus acides, et nous avons finalement opté pour un gradient 2-5,5.

Les protéines tau normales lorsqu'elles sont soumises à ce type de gradient ne migrent pas car elles ont un pHi compris entre 6,5 et 8,5, tandis que les protéines tau pathologiques dont le pHi est plus acide migrent et sont mieux séparées.

Tableau 5 : intensité de l'immunodétection des protéines tau pathologiques sur immuno-transferts et densités de lésions sur coupes histologiques de tissu cérébral provenant de deux patients présentant une trisomie 21.

Pour quantifier l'immunodétection des protéines tau 64 et 69, les feuilles de nitrocellulose ont été analysées au densitomètre, les chromatogrammes ont été décalqués sur du papier Whatman n°3 et les pics découpés et pesés.

(-) signifie que seules les protéines tau normales étaient présentes, (+) signifie que les protéines tau 64 et 69 étaient faiblement détectées, (++) moyennement et (+++) fortement.

Les plaques séniles (PS) et les neurones en dégénérescence neurofibrillaire (DNF) ont été mis en évidence par une coloration selon la technique de Palmgren. Un système de comptage semi-quantitatif fut employé pour les neurones en DNF et les PS (pris séparément) : - = absence de lésions ; 0/+ = lésions rencontrées après une recherche intensive ; + = au plus une lésion par champ d'observation (objectif x10) ; ++ = entre 1 et 5 lésions par champ ; +++ = plus de 5 lésions par champ.

Dans le cerveau des trisomiques 21, l'intensité de la détection des protéines tau pathologiques est liée à la densité de plaques séniles et de neurones en DNF.

Cas	Région	DNF	PS	Tau 64/69
SD 37 ans	Cortex Temporal	+	+	+
	Cortex Frontal	-	+	-
	Hippocampe	+	++	+
	Thalamus	-	-	-
	Noyau Caudé	-	-	-
	Cervelet	-	-	-
SD 58 ans	Cortex Temporal	+++	+++	+++
	Cortex Frontal	+++	+++	+++
	Hippocampe	+++	+++	+++
	Thalamus	+	+	+
	Noyau Caudé	+	-	-
	Cervelet	-	-	-

Pour ces électrophorèses bidimensionnelles, il est nécessaire de déposer une plus grande quantité d'homogénat car l'intensité apparente de la réaction immunologique est diminuée du fait de l'existence de plusieurs isoformes pour une même protéine, celles-ci étant représentées par des taches étalées plutôt que par des points concentrés. De plus, une concentration en SDS de l'ordre de 1% est permise pour la solubilisation des protéines sans que cela modifie leur charge (les protéines sont progressivement débarrassées du SDS au fur et à mesure de leur entrée dans le gel).

Lorsque nous avons ainsi comparé des homogénats cérébraux de patients atteints de maladie d'Alzheimer et de mongoliens, nous n'avons remarqué aucune différence dans le profil d'immunodétection. Les protéines tau 55, 64 et 69 ont dans les 2 cas des pHi identiques compris entre 3 et 4, la protéine tau 64 étant la plus acide (figure 18). Nous en avons conclu que les modifications biochimiques qui entraînent l'apparition de protéines tau pathologiques au cours de ces deux processus neurodégénératifs sont les mêmes.

Ces résultats montrant de nouvelles similitudes entre trisomie 21 et maladie d'Alzheimer confortent l'hypothèse selon laquelle la trisomie 21 pourrait servir de modèle à l'étude de la maladie d'Alzheimer (Mann en 1988). La biologie moléculaire pourrait permettre de découvrir le gène impliqué dans la forme familiale de la maladie d'Alzheimer et la protéine (codée par ce même gène) qui est impliquée dans la forme sporadique de l'affection. En outre, comme l'installation de la DNF est beaucoup plus lente chez les mongoliens que chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer, l'étude de la trisomie 21 pourrait permettre d'appréhender la chronologie des événements pathologiques dans la maladie d'Alzheimer.

Ainsi, les protéines tau 55, 64 et 69 ne sont pas comme nous le pensions auparavant des marqueurs spécifiques de la maladie d'Alzheimer, mais elles apparaissent en fait comme des marqueurs de la DNF de type Alzheimer (maladie d'Alzheimer, trisomie 21 et vieillissement sans démence).

Ceci est néanmoins logique car si à partir des mêmes constituants (les protéines tau), le même type de structure pathologique (les PHF) se forme dans les neurones en DNF de la maladie d'Alzheimer, du vieillissement sans démence ou de la trisomie 21, c'est parce que ces constituants subissent la même modification biochimique, en l'occurrence une phosphorylation qui se traduit par l'apparition des protéines tau 55, 64 et 69.

↙ ↘ ↗ ief
sds

| | | | | | |
5 4,5 4 rm 3,5 3 2,5
| | | | | | |

A6

<67

<43

SD58

<67

<43

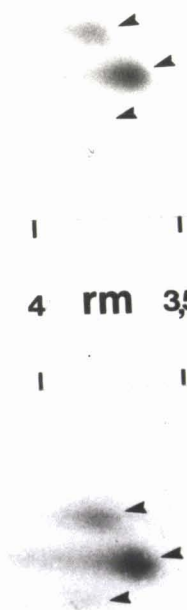


Figure 18 : étude par immuno-transfert des protéines tau issues du cerveau d'un patient atteint de trisomie 21 et d'un malade d'Alzheimer après électrophorèse bidimensionnelle.

Le patient atteint de trisomie 21 est âgé de 58 ans et le patient atteint de maladie d'Alzheimer est le patient A6.

Le tissu cérébral est homogénéisé à raison de 1 g/ml dans une solution contenant 1g d'urée, 10 mg de SDS et 50 µl de BME pour 1 ml d'H₂O. Le rouge de méthyle dont le pHi est 3,75 sert de témoin interne.

La première dimension ou isoélectrofocalisation est réalisée avec un gradient de pH allant de 2 à 5,5 ; 50 µl d'homogénats ont été déposés.

La deuxième dimension est une électrophorèse classique en présence de SDS (gradient 10-20 %).

L'immunsérum anti-PHF (dilué au 1/200) détecte trois taches correspondant aux protéines tau 55, 64 et 69 (pointes de flèches) situées dans une zone de pHi proche de celle où migre le rouge de méthyle, c'est à dire entre 3 et 4. La protéine tau 64 est la plus acide.

Des protéines tau pathologiques identiques sont donc produites au cours de la maladie d'Alzheimer et de la trisomie 21.

Qu'en est-il des pathologies comme la maladie de Pick ou la PSP qui diffèrent de la DNF de type Alzheimer par l'ultrastructure de leurs filaments ?

4.12. La maladie de Pick.

Nous avons pu en collaboration avec le docteur Jacqueline Mikol de l'hôpital Lariboisière (Paris) et le docteur France Javoy-Agid de l'unité INSERM 289 (Paris), étudier quelques échantillons cérébraux provenant de patients atteints de cette affection rare qu'est la maladie de Pick. Ces échantillons étaient deux biopsies frontales, la première réalisée chez une patiente âgée de 49 ans et la seconde chez un homme âgé de 76 ans ; nous avons également étudié un fragment d'hippocampe prélevé lors de l'autopsie d'un patient âgé de 58 ans. Pour ces trois patients, le diagnostic clinique de maladie de Pick avait été confirmé par un examen neuropathologique qui avait révélé des neurones ballonnés ainsi que la présence de corps de Pick dans les cellules pyramidales et l'absence totale de DNF de type Alzheimer.

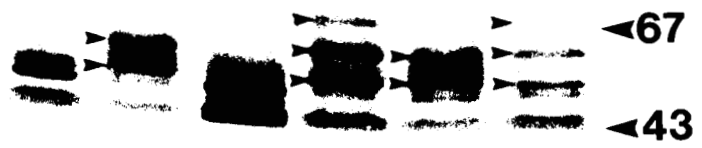
Dans tous ces échantillons, les immunsérums anti-tau et anti-PHF semblaient détecter la protéine tau 64, la protéine tau 69 semblait absente et la présence de la protéine tau 55 ne pouvait être affirmée (par exemple couloirs 2 et 5 de la figure 19A). Le profil obtenu avec l'anti-PHF épuisé était beaucoup plus net : les protéines tau 55 et 64 étaient présentes mais la protéine tau 69 était absente (par exemple couloirs 2 et 5 de la figure 19B). En raison de la faible quantité d'homogénat à notre disposition, nous n'avons pu réaliser le traitement à la phosphatase alcaline ni l'analyse bidimensionnelle.

Ainsi, des formes pathologiques de protéines tau sont également produites au cours du processus neurodégénératif de la maladie de Pick : les protéines tau 55 et 64. Au cours de la DNF de type Alzheimer, ces deux protéines sont accompagnées par une troisième protéine appelée tau 69.

Comme nous l'avons suggéré au cours du paragraphe 4.10. en raison des variations de poids moléculaire observées sous l'effet d'un traitement à la phosphatase alcaline, la phosphorylation anormale des protéines tau doit être responsable de changements conformationnels entraînant l'apparition de protéines tau de poids moléculaire plus élevé. Bien sûr, au cours de cette étude sur la maladie de Pick, nous n'avons pas réalisé de déphosphorylation. Néanmoins, comme le poids moléculaire de ces 2 variants pathologiques est identique à celui des protéines tau qui sont produites au cours de la DNF de type Alzheimer (55 et 64 kDa), il est permis de penser que les protéines tau 55 et 64 sont aussi anormalement phosphorylées dans la maladie de Pick.

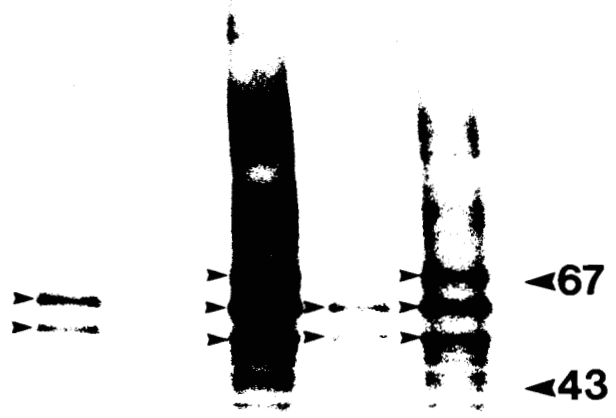
A

PHF



1	2	3	4	5	6
T3	P	T4	A4	P	A5
1	2	3	4	5	6

B



PHFé

Figure 19 : étude par immuno-transfert à l'aide des immunsérums anti-PHF (A) et anti-PHF épuisé (B) de l'homogénat d'une biopsie frontale réalisée chez une patiente atteinte de maladie de Pick.

Nous avons déposé 25 µl des homogénats suivants :

- couloir 1 : cortex frontal du témoin T3,
- couloir 2 : biopsie frontale de la patiente atteinte de maladie de Pick âgée de 49 ans,
- couloir 3 : cortex frontal du témoin T4,
- couloir 4 : cortex frontal du malade d'Alzheimer A4,
- couloir 5 : biopsie frontale de la patiente atteinte de maladie de Pick âgée de 49 ans,
- couloir 6 : cortex frontal du malade d'Alzheimer A5.

Nous avons réalisé deux électrophorèses identiques mais après le transfert, une feuille de nitrocellulose a été incubée avec l'anti-PHF (PHF) et l'autre avec l'anti-PHF épuisé (PHF é), tous deux dilués au 1/200.

Dans l'homogénat cérébral provenant de la patiente atteinte de maladie de Pick, l'anti-PHF ne détecte pas la protéine tau 69 mais les protéines tau 55 et 64 semblent être présentes.

Ceci apparaît beaucoup plus nettement lorsque nous utilisons l'anti-PHF épuisé.

Dans la maladie de Pick, les protéines tau pathologiques sont donc différentes de celles qui sont présentes dans le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer.

De ce fait, nous proposons que dans la maladie de Pick, la phosphorylation des protéines tau n'est pas apte à induire un changement de conformation entraînant l'apparition de la protéine tau 69, soit parce que l'intensité de cette phosphorylation est insuffisante soit parce que l'enzyme impliquée n'est pas la même.

Ces modifications différentes des protéines tau sont observées bien que des cellules pyramidales dégèrent dans les deux cas, suggérant que ces deux affections sont dues à des agents différents. Les choses sont sans doute beaucoup plus complexes car bien que le même type cellulaire soit affecté par la DNF dans les deux cas, dans la maladie de Pick, les régions touchées sont limitées au cortex frontal et à l'hippocampe.

4.13. La paralysie supranucléaire progressive.

Nous avons étudié différents échantillons cérébraux provenant de patients atteints de PSP grâce à la collaboration du docteur France Javoy-Agid.

Cette étude a porté sur les cerveaux de 8 patients (4 hommes et 4 femmes) (cas n° 182 à 441) âgés de 57 à 76 ans (moyenne 68,5 +/- 7,5 ans). Le diagnostic clinique fut confirmé par l'examen microscopique de coupes de cerveaux après coloration selon la méthode de Bodian (imprégnation argentique). La distribution des neurones en DNF était en accord avec les données présentées par Steele et coll. en 1964. Les délais entre la mort et l'autopsie variaient de 2 à 24 heures (moyenne 10,8 +/- 7,4). Les cortex frontal, temporal et occipital ainsi que le noyau lenticulaire (putamen et pallidum) furent étudiés par la technique des immuno-transferts.

La protéine tau 55 n'a été détectée dans aucun des homogénats de cerveau de patients atteints de PSP. En effet, l'anti-PHF épuisé ne détecte que les protéines tau 64 et 69 (figure 20A). Celles-ci ont été plus fortement détectées par nos 3 immunosérums (anti-tau, anti-PHF et anti-PHF épuisé) dans le noyau lenticulaire que dans le cortex temporal et le cortex frontal (par exemple comparer les couloirs 1 et 2 avec les couloirs 3 à 6 de la figure 20B). Les protéines tau 64 et 69 n'ont jamais été détectées dans le cortex occipital (par exemple couloir 7 de la figure 20B).

Les résultats de l'évaluation semi-quantitative des protéines tau 64 et 69 furent comparés avec la densité de neurones en DNF pour chaque région (tableau 6). Cette comparaison montra que l'immunodétection des protéines tau 64 et 69 était toujours associée à la présence de neurones en DNF dans le tissu cérébral. De plus, l'immunodétection de ces 2 protéines était proportionnelle à la densité de lésions (tableau 6).

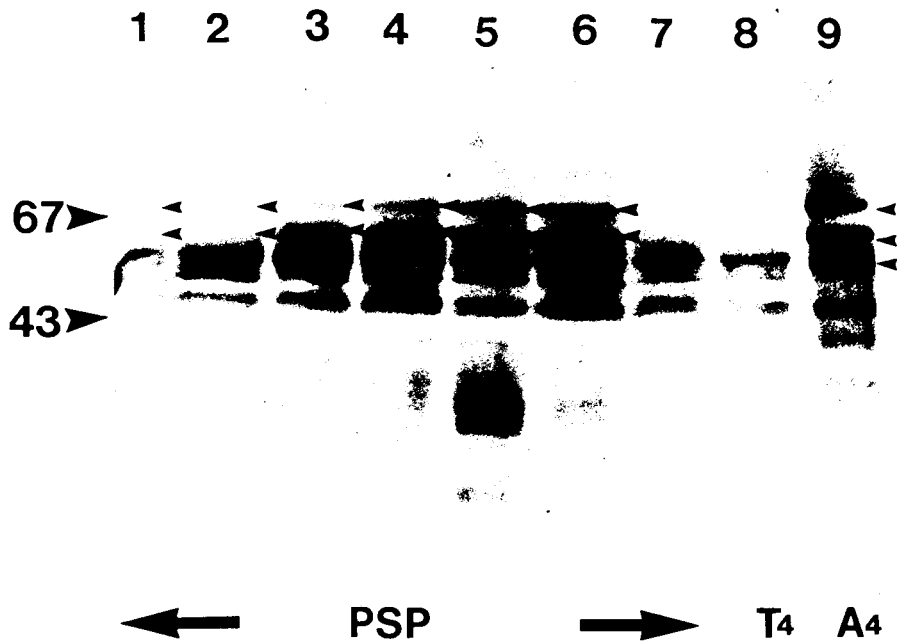
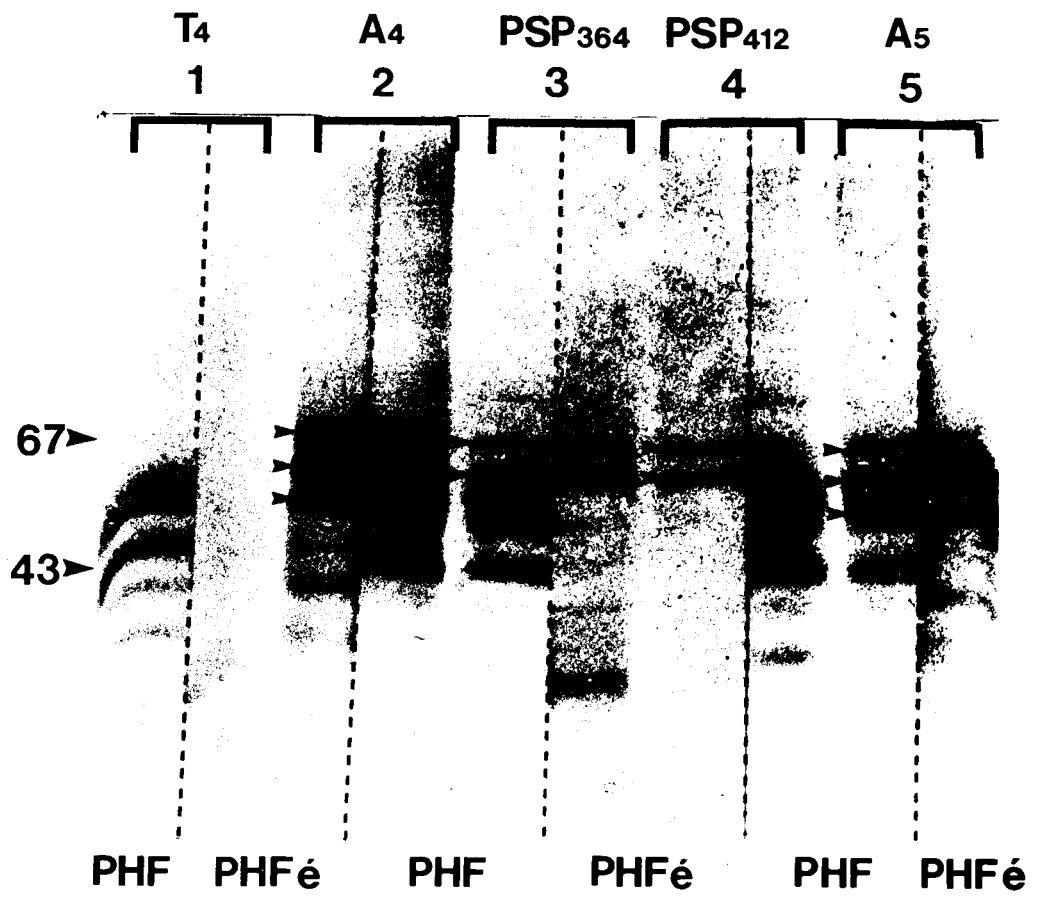


Figure 20 : A - étude par immuno-transfert avec les immunosérums anti-PHF et anti-PHF épuisé, d'homogénats de cerveaux provenant de patients atteints de PSP.

Nous avons déposé dans des puits larges les homogénats suivants :

- couloir 1 : cortex temporal du témoin T4 (30 µl),
- couloir 2 : cortex temporal du malade d'Alzheimer A4 (30 µl),
- couloir 3 : noyau lenticulaire du patient atteint de PSP n° 364 (90 µl),
- couloir 4 : noyau lenticulaire du patient atteint de PSP n° 412 (90 µl),
- couloir 5 : cortex temporal du malade d'Alzheimer A5 (30 µl).

Après le transfert, les couloirs de migration révélés par la coloration réversible au Ponceau S ont été divisés en 2 parties : la première fut incubée avec l'anti-PHF (PHF) et la seconde avec l'anti-PHF épuisé (PHF é). Les deux immunosérums ont été utilisés dilués au 1/200.

L'anti-PHF épuisé ne détecte que deux protéines tau pathologiques (tau 64 et 69) dans les homogénats de cerveau provenant de patients atteints de PSP alors qu'il en détecte trois dans les homogénats de cerveau provenant de patients atteints de maladie d'Alzheimer et aucune dans les homogénats de cerveaux témoins.

B - étude par immuno-transfert avec l'immunosérum anti-tau, d'homogénats de cerveaux provenant de patients atteints de PSP.

Nous avons déposé les homogénats suivants : cortex temporal du patient n°182 (couloir 1), cortex frontal du patient n° 261(couloir 2), noyau lenticulaire des patients n° 218 (couloir 3), n° 339 (couloir 4), n° 182 (couloir 5), n° 422 (couloir 6), cortex occipital du patient n° 364 (couloir 7), cortex temporal du témoin T4 (couloir 8), cortex temporal du malade d'Alzheimer A4 (couloir 9). (45 µl ont été déposés pour les homogénats issus de patients atteints de PSP et 15 µl pour le témoin et le malade d'Alzheimer). L'anti-tau a été utilisé dilué au 1/10000.

Dans le cerveau des patients atteints de PSP, les protéines tau 64 et 69 sont présentes en faible quantité dans les régions corticales et en quantité plus importante dans le noyau lenticulaire. Néanmoins, leur détection est toujours environ 3 fois plus faible que dans les homogénats de cerveaux issus de patients atteints de maladie d'Alzheimer.

	182	218	261	339	364	412	422
	DNF 64,69	DNF 64,69	DNF 64,69	DNF 64,69	DNF 64,69	DNF 64,69	DNF 64,69
Frontal	++	++	+	+	+++	+++	+++
Temporal	+	+	0	+	++	+	+
Occipital	0	0	0	0	0	0	0
Noyau lenticulaire	++	+	++	+	++	++	++

Tableau 6 : intensité de l'immunodétection des protéines tau pathologiques sur immuno-transferts et densités de neurones en DNF sur coupes histologiques de tissu cérébral provenant de patients atteints de PSP.

Pour quantifier l'immunodétection des protéines tau 64 et 69, les feuilles de nitrocellulose ont été analysées au densitomètre, les chromatogrammes ont été décalqués sur du papier Whatman n°3 et les pics découpés et pesés.

(-) signifie que la région n'a pas été étudiée, (0) indique que seules les protéines tau normales étaient présentes, (+) signifie que les protéines tau 64 et 69 étaient faiblement détectées, (++) moyennement et (+++) fortement.

Les neurones en dégénérescence neurofibrillaire (DNF) ont été mis en évidence par une coloration selon la technique de Bodian. L'état général des coupes (neurones en dégénérescence, fibres anormales, gliose) a été évalué et noté de la façon suivante : (-) signifie que la région n'a pas été étudiée, (0) indique une absence de lésions ; (+) signifie que les changements étaient faibles ; (++) indique que les changements étaient modérés ; (+++) indique que les changements étaient sévères.

Dans le cerveau des patients atteints de PSP, l'intensité de la détection des protéines tau 64 et 69 est liée à la densité de neurones en DNF.

Les régions les plus affectées au cours de la PSP (noyau lenticulaire) et de la maladie d'Alzheimer (aires corticales) furent comparées en fonction de leur quantité de protéines tau 64 et 69. Nous avons ainsi pu constater que dans la PSP, les protéines tau 64 et 69 étaient présentes en plus petite quantité que dans la maladie d'Alzheimer : approximativement trois fois moins (comparer les couloirs 3 et 4 (90 µl) avec les couloirs 2 et 5 (30 µl) de la figure 20A de même que les couloirs 3 à 6 (45 µl) avec le couloir 9 (15 µl) de la figure 20B).

Nous avons réalisé un traitement à la phosphatase alcaline afin de déterminer si dans cette affection, les protéines tau pathologiques résultaient aussi d'une phosphorylation anormale. Après trois heures d'incubation avec l'enzyme, une diminution du poids moléculaire des protéines tau 64,69 fut observée. Une telle modification du profil électrophorétique était inhibée par addition préalable de pyrophosphate de sodium.

L'analyse bidimensionnelle révéla des différences entre les protéines tau 64 et 69 des cerveaux de PSP et les " mêmes protéines " des cerveaux de malades d'Alzheimer. En effet, ces deux protéines étaient légèrement plus basiques ($pH_i > 4$) que dans la DNF de type Alzheimer, la protéine tau 69 étant cette fois plus acide que la protéine tau 64 (figure 21). De plus, aux environs de 55 kDa, deux taches étaient détectées par l'anti-tau et l'anti-PHF (figure 21) mais pas par l'anti-PHF épuisé.

Des formes modifiées de protéines tau sont donc également produites au cours du processus neurodégénératif de la PSP mais elles diffèrent de celles qui sont produites au cours de la DNF de type Alzheimer. En effet, l'anti-PHF épuisé détecte les protéines tau 64 et 69 mais il ne détecte pas la protéine tau 55. Après une séparation électrophorétique bidimensionnelle, l'immunsérum anti-tau détecte deux taches aux environs de 55 kDa qui ne sont pas reconnues par l'anti-PHF épuisé. Puisque les protéines tau normales ne migrent pas dans un gradient 2-5,5, ces deux taches doivent correspondre à des protéines tau modifiées. Cependant, comme elles ne sont pas détectées par l'anti-PHF épuisé, soit les modifications subies par ces protéines n'ont pas entraîné l'apparition d'épitopes anormaux qui pourraient être reconnus par les anticorps présents dans l'immunsérum anti-PHF épuisé, soit ces modifications sont particulières à la PSP et les épitopes anormaux que renferment ces protéines ne peuvent pas être reconnus par l'anti-PHF épuisé.

Les protéines tau 64 et 69 semblaient être communes aux deux types d'affections en effet, leurs poids moléculaires étaient identiques mais en fait, elles diffèrent par leurs propriétés isoélectriques.

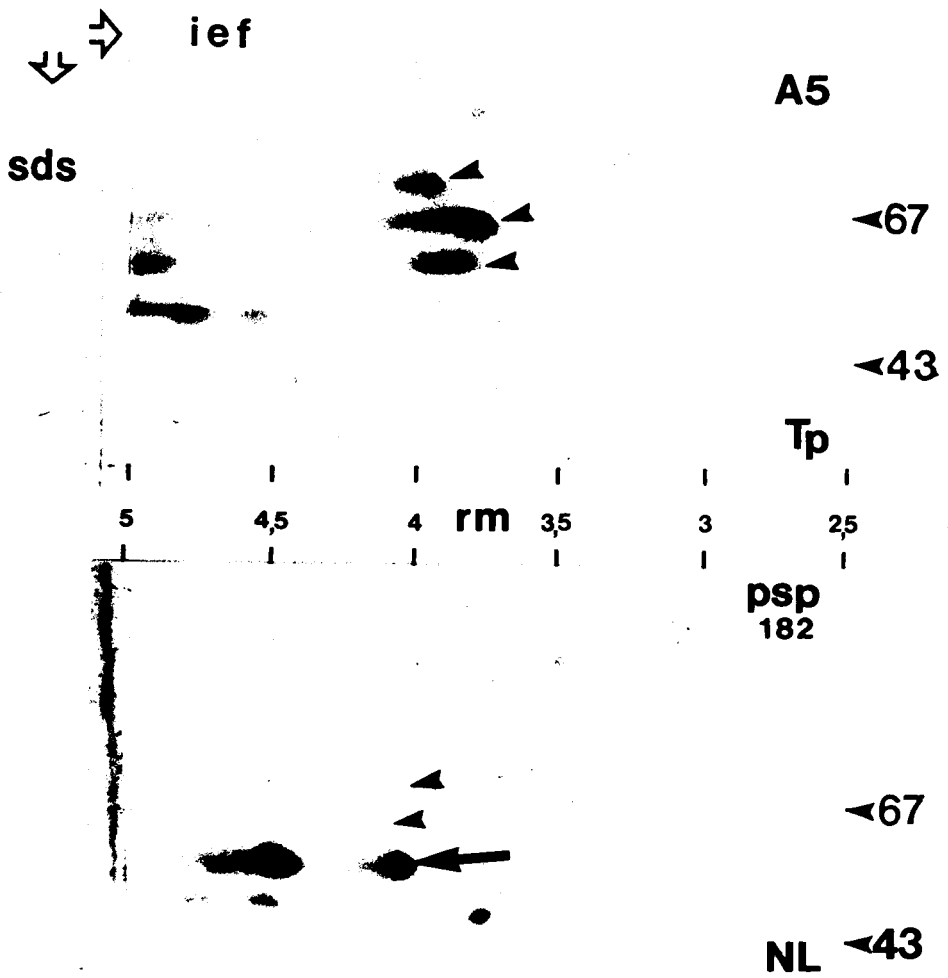


Figure 21 : étude par immuno-transfert avec l'anti-tau, d'homogénats de cerveau provenant d'un patient atteint de PSP et d'un malade d'Alzheimer, après électrophorèse bidimensionnelle.

Le patient atteint de PSP est le cas n° 182 ; le patient atteint de maladie d'Alzheimer est le patient A5.

Le tissu cérébral est homogénéisé à raison de 1 g/ml dans une solution contenant 1g d'urée, 10 mg de SDS et 50 µl de BME pour 1 ml d'H₂O. Nous avons déposé 50 µl d'homogénat pour le patient atteint de maladie d'Alzheimer et 100 µl pour le patient atteint de PSP.

La première dimension ou isoélectrofocalisation est réalisée avec un gradient de pH allant de 2 à 5,5. Le rouge de méthyle (rm) dont le pHi est 3,75 sert de témoin interne. La deuxième dimension est une électrophorèse classique en présence de SDS (gradient 10-20 %).

Dans l'homogénat de cortex temporal (Tp) provenant du patient atteint de maladie d'Alzheimer, le profil obtenu avec l'immunsérum anti-tau (dilué au 1/10000) est celui qui est observé habituellement : trois taches correspondant aux protéines tau 55, 64 et 69 (pointes de flèches) situées dans une zone de pHi comprise entre 3,5 et 4.

Dans l'homogénat de noyau lenticulaire (NL) provenant du patient atteint de PSP, le profil obtenu est différent : les protéines tau 64 et 69 sont légèrement plus basiques (pHi > 4), la protéine tau 69 étant plus acide que la protéine tau 64 ; de plus, aux environs de 55 kDa, deux taches (flèche) sont détectées par l'anti-tau.

Les protéines tau pathologiques qui sont produites au cours de la maladie d'Alzheimer et de la PSP sont donc différentes.

La détection de ces deux protéines est une fois de plus liée à la présence de neurones en DNF au sein du tissu cérébral. Le fait que les protéines tau 64 et 69 sont produites en moins grande quantité dans la PSP que dans la DNF de type Alzheimer est vraisemblablement dû à la présence d'un nombre moins important de neurones en DNF dans le tissu cérébral des patients atteints de PSP.

Dans la PSP, les cellules qui dégèrent sont les neurones du tronc cérébral et du striatum et, à un moindre degré, les neurones pyramidaux corticaux. Nous n'avons pas observé de différences qualitatives entre les protéines tau modifiées qui sont produites dans ces différentes régions. Ceci suggère que différents types cellulaires peuvent répondre de la même manière à une même "agression".

Comme l'ultrastructure des filaments pathologiques est commune à la maladie de Pick et à la PSP (filaments droits), on pouvait s'attendre à ce que les protéines tau modifiées soient les mêmes dans ces deux affections. Or, il en est autrement. Ceci pourrait être dû au fait que dans la PSP, les filaments droits sont simplement agencés en paquets alors que dans la maladie de Pick, ils s'organisent en une structure particulière qui est le corps de Pick.

5. Conclusions et perspectives.

Cette étude des protéines tau par immuno-transfert nous a permis de découvrir que des variants pathologiques sont produits au cours de la maladie d'Alzheimer.

De tels variants n'avaient jamais été mis en évidence auparavant. Nous avons plusieurs explications à cela. D'abord, la plupart des équipes qui ont étudié les protéines tau ont travaillé sur des protéines tau purifiées. Or, nous avons montré que les protéines tau pathologiques sont insolubles et de ce fait elles devaient être perdues au cours des étapes de purification. De plus, les outils immunologiques les plus fréquemment utilisés étaient des anticorps monoclonaux (Grundke-Iqbal et coll. en 1986 ; Wood et coll. en 1986 ; Ksiezak-Reding et coll. en 1988a,b) qui sont moins fiables que les anticorps polyclonaux. En effet, l'épitope qui est reconnu par l'anticorps monoclonal peut devenir inaccessible soit parce que les protéines tau sont modifiées en ce site particulier (Papasozomenos et coll. en 1987), soit parce qu'elles sont modifiées en un autre site et que cela entraîne un changement conformationnel.

Depuis leur publication, ces résultats n'ont été confirmés ou infirmés directement par aucune équipe. Seuls les résultats obtenus par Ksiezak-Reding et coll. en 1990a,b, avec un anticorps monoclonal appelé Alz 50, les confirment indirectement. Cet anticorps a été obtenu en immunisant des souris avec un broyat de

noyau basal de Meynert (noyau gris central impliqué dans l'innervation cholinergique du cortex associatif), région qui est affectée par la DNF au cours de la maladie d'Alzheimer. Suite à l'immunisation, les auteurs ont isolé un clone qui produisait un anticorps reconnaissant un antigène spécifique de l'affection. En effet, Alz 50 marque les neurones en dégénérescence sur coupes de cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer et reconnaît sur immuno-transferts une protéine dont le poids moléculaire est situé aux environs de 68 kDa, celle-ci étant présente dans les homogénats de cerveaux malades mais pas dans les homogénats de cerveaux témoins (Wolozin et coll. en 1986). Cependant, la nature de l'antigène reconnu par Alz 50 n'était toujours pas connue.

Plusieurs équipes ont ensuite montré que Alz 50 reconnaît les protéines tau du cerveau de boeuf et du cerveau humain (Nukina et coll. en 1988 ; Ksiezak-Reding et coll. en 1988a). Dès lors, il est apparu que la protéine de 68 kDa pouvait être une protéine tau modifiée. Pour notre part, nous pensons que l'antigène de 68 kDa et la protéine tau 69 étaient la même protéine.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous nous sommes procuré l'anticorps Alz 50 (laboratoires Abbott) et l'avons comparé avec nos immunsérums anti-tau, anti-PHF et anti-PHF épuisé, par la technique des immuno-transferts. Notre étude montre que Alz 50 détecte les protéines tau normales (45 à 62 kDa) (figure 22 couloir 1) et les protéines tau 55, 64 et 69 (figure 22 couloir 2). Que l'étude soit réalisée avant ou après déphosphorylation (comparer les couloirs 2 et 3 de la figure 22), après une séparation monodimensionnelle (figure 22) ou bidimensionnelle (figure 23) des protéines, Alz 50 et nos anticorps ont toujours donné des profils d'immunodétection identiques et Alz 50 n'a jamais détecté une protéine de 68 kDa autre que la protéine tau 69. De plus, sur coupes adjacentes d'hippocampe de patients atteints de maladie d'Alzheimer, Alz 50 marque moins de neurones en DNF que nos anticorps polyclonaux mais les cellules qui sont marquées par Alz 50 sont également marquées par nos immunsérums (figure 24).

Nous en avons conclu que Alz 50 était dirigé contre un épitope des protéines tau. La protéine de 68kDa reconnue par Alz 50 était donc bien la protéine tau 69.

Les derniers articles parus concernant la caractérisation de ce monoclonal démontrent qu'il détecte en fait 3 protéines dont les poids moléculaires correspondent à ceux des protéines tau 55, 64 et 69 (Ksiezak-Reding et coll. en 1990a,b).

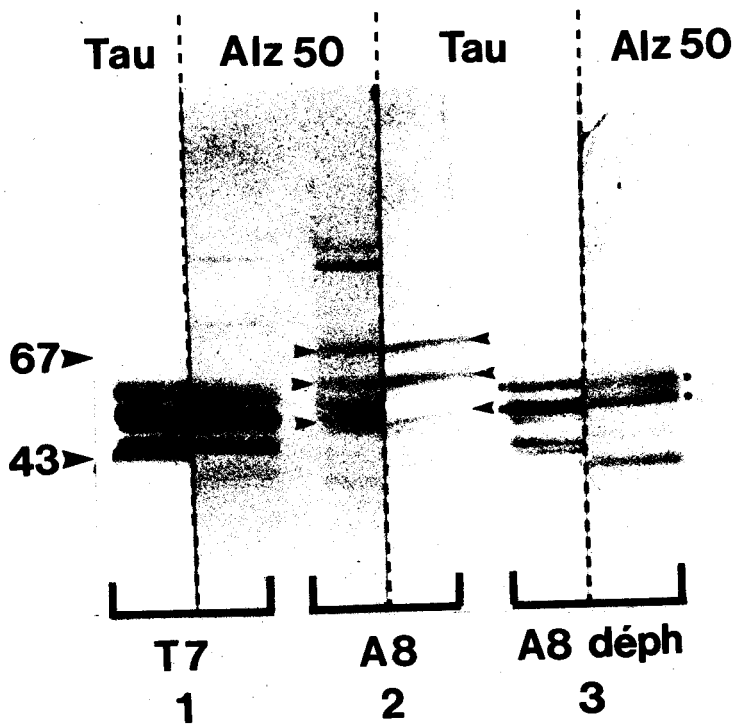


Figure 22 : comparaison du marquage obtenu avec Alz 50 et l'immunsérum anti-tau sur des homogénats cérébraux provenant d'un témoin et d'un patient atteint de maladie d'Alzheimer.

Nous avons déposé dans des puits larges 50 µl d'homogénats de cortex frontal provenant des patients suivants :

- couloir 1 : témoin T7,
- couloir 2 : patient A8,
- couloir 3 : patient A8 après traitement à la phosphatase alcaline d'intestin de veau (100 U/ml).

Après le transfert, les couloirs de migration révélés par la coloration réversible au Ponceau S ont été divisés en 2 parties : la première fut incubée avec l'anti-tau (Tau) dilué au 1/10000, et la seconde avec Alz 50 dilué au 1/10.

L'anticorps Alz 50 reconnaît les protéines tau normales. Il reconnaît également les protéines tau pathologiques (pointes de flèches) et leurs formes déphosphorylées (astérisques).

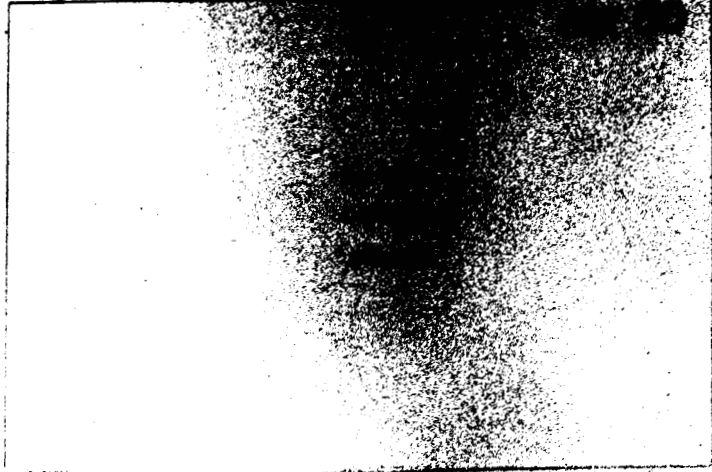
Aucune protéine autre que la protéine tau 69 n'est détectée par Alz 50 aux alentours de 68 kDa.

scs



67

43



67

43

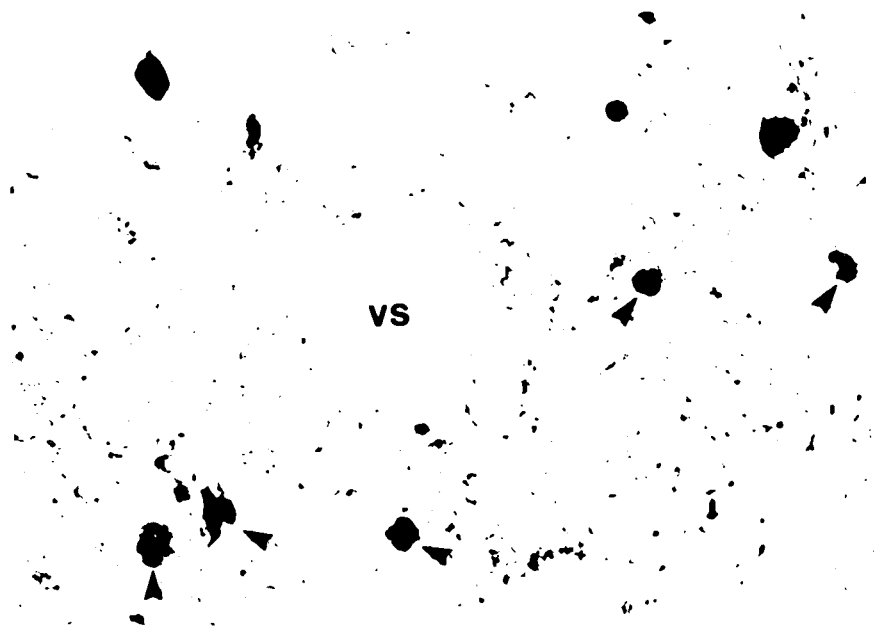
Figure 23 : comparaison du marquage obtenu avec Alz 50 et l'immunsérum anti-tau sur des homogénats cérébraux provenant d'un témoin et d'un patient atteint de maladie d'Alzheimer, après séparation bidimensionnelle des protéines.

Le malade d'Alzheimer est le patient A8. L'électrophorèse bidimensionnelle a été réalisée selon le protocole décrit antérieurement en utilisant le rouge de méthyle (rm) comme témoin interne de pHi. L'anti-tau a été utilisé dilué au 1/10000 ; Alz 50 a été utilisé dilué au 1/10.

Comme l'immunsérum anti-tau, Alz 50 détecte les trois protéines tau pathologiques tau 55, 64 et 69 (pointes de flèches). Alz 50 ne détecte aucune protéine de poids moléculaire situé aux environs de 68 kDa à l'exception de la protéine tau 69.

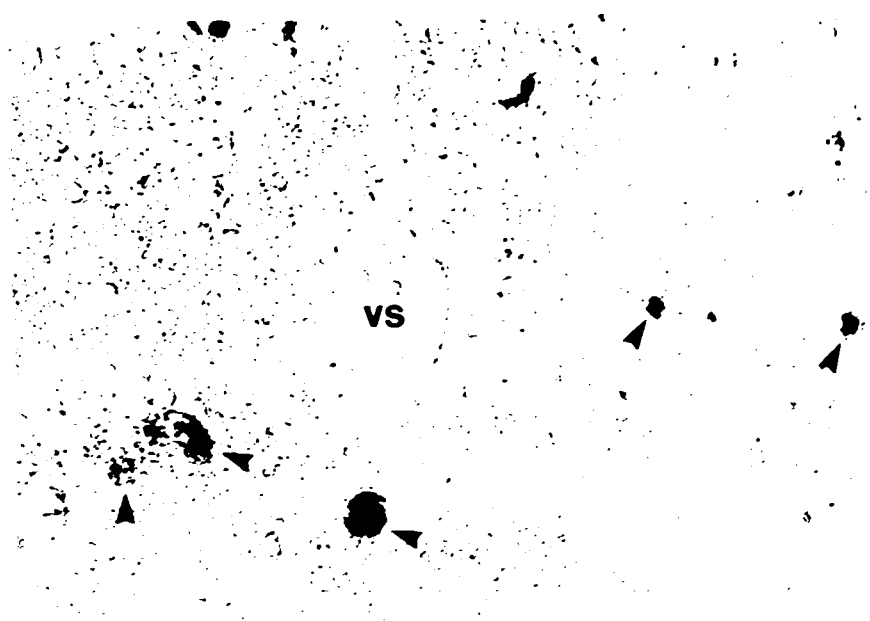
L'antigène A68 et la protéine tau 69 sont donc la même protéine.

Tau



VS

A11



VS

A1z 50

Figure 24 : comparaison du marquage obtenu avec Alz 50 et l'immunsérum anti-tau sur des coupes adjacentes d'hippocampe de patient atteint de maladie d'Alzheimer.

L'hippocampe provient du patient A11. L'anti-tau a été utilisé dilué au 1/400 ; Alz 50 a été utilisé pur. Les structures sont grossies environ 500 fois.

La présence du même vaisseau sanguin (vs) sur les deux coupes montre qu'elles sont adjacentes.

L'immunsérum anti-tau marque plus de neurones en dégénérescence neurofibrillaire que Alz 50, mais les cellules qui sont marquées par Alz 50 le sont également par l'anti-tau (pointes de flèches).

Néanmoins quelques points restent à éclaircir concernant l'homologie entre Alz 50 et nos immunsérums polyclonaux. Il a été rapporté que la protéine de 68 kDa pouvait être détectée par Alz 50 dans le LCR des patients atteints de maladie d'Alzheimer après une précipitation des protéines du LCR au sulfate d'ammonium (Wolozin et coll. en 1987). Ainsi, cet anticorps pourrait permettre de poser le diagnostic de maladie d'Alzheimer du vivant des patients. Comme nous l'avons décrit au paragraphe 4.8.1., nous n'avons pas retrouvé les protéines tau 55, 64 et 69 dans le LCR d'aucun des patients atteints de maladie d'Alzheimer probable que nous avons étudiés à l'aide de nos immunsérums. La même étude a été réalisée avec Alz 50 mais nous n'avons pas obtenu de meilleurs résultats. Dans notre étude, la concentration du LCR avait été réalisée par passage sur une membrane et non par précipitation ; une concentration 5 fois supérieure à la normale n'était peut-être pas suffisante pour détecter les protéines tau pathologiques. Il nous faudra donc poursuivre cette étude du LCR en utilisant un protocole basé sur une précipitation au sulfate d'ammonium.

D'autre part, Alz 50 marque les neurones de l'épithélium olfactif de patients atteints de maladie d'Alzheimer, ouvrant de nouvelles perspectives pour le diagnostic *in vivo*, cette région se prêtant aisément à la biopsie (Talamo et coll. en 1989). Nous n'avons pas encore pu vérifier ce résultat.

Nous avons montré que dans la maladie d'Alzheimer, la modification qui est responsable de l'apparition de ces protéines tau modifiées était une phosphorylation qui entraîne vraisemblablement un changement de la conformation des protéines tau entraînant un ralentissement de leur mobilité électrophorétique se traduisant par un poids moléculaire apparent plus élevé (Baudier et coll. en 1987). Ainsi, nous confirmons l'hypothèse de la phosphorylation anormale des protéines tau émise par Grundke-Iqbal et coll., Wood et coll. et Nukina et coll. en 1986, hypothèse qui avait été remise en question par Ksiezak-Reding et coll. en 1988b.

Les résultats obtenus par Baudier et coll. en 1987 sur les protéines tau de boeuf nous amènent à penser que la protéine kinase II (Calcium / calmoduline dépendante) pourrait être impliquée dans la maladie d'Alzheimer car elle entraîne un ralentissement de la mobilité électrophorétique des protéines tau. Cette enzyme existe sous deux formes, l'une est liée à la membrane (Schulman en 1978) et l'autre est cytosolique (Fukunaga et coll. en 1982). Elle est présente dans tout le cerveau mais elle est localisée uniquement dans les neurones (Ouimet et coll. en 1984). Nous avons obtenu du docteur Baudier un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine kinase II extraite du cerveau de rat. Cet anticorps ne nous a pas permis de mettre en évidence une surexpression de l'enzyme chez les malades d'Alzheimer sur immunotransfert. De

plus, en immunohistochimie, l'immunodétection des neurones pyramidaux dans l'hippocampe de malades d'Alzheimer n'est pas augmentée par rapport à celle observée dans les cerveaux témoins, contrairement à ce qu'ont publié Mc Kee et coll. en 1990. De ce fait, nous ne possédons pas encore d'indications sur l'enzyme qui est impliquée dans la maladie d'Alzheimer. Nous réaliserons des études immunohistochimiques et par immuno-transferts à l'aide d'anticorps dirigés contre d'autres types de kinases, en espérant identifier cette enzyme.

Nous avons également montré que les mêmes protéines tau modifiées (tau 55, 64 et 69) sont produites au cours de la DNF qui survient dans le cas du vieillissement sans démence et de la trisomie 21. Nous avons aussi montré que des formes modifiées de protéines tau étaient présentes dans le cerveau des patients atteints de PSP ou de maladie de Pick. Cependant, les variants pathologiques des protéines tau diffèrent de ceux que nous avons trouvé dans le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer par l'absence de la protéine tau 55 dans la PSP et l'absence de la protéine tau 69 dans la maladie de Pick. De plus, dans la PSP, bien que les variants aient un poids moléculaire identique, ils ont des points isoélectriques différents.

Une phosphorylation anormale est à l'origine des protéines tau pathologiques observées dans toutes ces affections (en extrapolant pour le vieillissement sans démence et la maladie de Pick pour lesquels nous n'avons pas réalisé de traitement à la phosphatase alcaline). Nous confirmons donc l'hypothèse qu'avaient avancée Pollock et coll. en 1986 en constatant que les neurones en DNF de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Pick et de la PSP n'étaient marqués par l'anticorps monoclonal Tau-1 qu'après un traitement des coupes de tissu par la phosphatase alcaline. Cette phosphorylation pourrait être l'élément clef qui est à l'origine de l'agrégation de ces protéines sous forme de filaments insolubles. Des phosphorylations différentes pourraient expliquer que les variants pathologiques ne sont pas les mêmes dans la DNF de type Alzheimer et dans la maladie de Pick ou la PSP. Celles-ci pourraient être dues à l'action de kinases différentes soit parce que des types cellulaires différents sont affectés, soit parce que les agents étiopathogéniques sont différents.

A l'issue de la comparaison entre ces différentes affections, nous émettons l'hypothèse suivante : la façon dont les protéines tau sont modifiées influe, au moins partiellement, sur l'ultrastructure des filaments qui s'accumulent dans les neurones en dégénérescence. En effet, la présence des PHF et la production des protéines tau 55, 64 et 69 sont concomitantes. De même, la production des protéines tau 64 et 69 est liée à la présence de filaments droits agencés en paquets (PSP). Enfin, la production des protéines tau 55 et 64 est liée à la présence de filaments droits agencés en corps de Pick

(maladie de Pick). Nous avons volontairement employé le terme " partiellement " ci-dessus car, il n'a pas encore été démontré que les protéines tau étaient les seuls constituants de ces filaments ; d'autres constituants spécifiques de chaque affection pourraient aussi agir sur l'ultrastructure des filaments.

Comme nous l'avons décrit au début de ce deuxième chapitre, la phosphorylation des protéines tau intervient dans la régulation de leur interaction avec les microtubules. En effet, lorsqu'elles sont phosphorylées, les protéines tau ont une activité polymérisante diminuée (Lindwall et coll. en 1984), cette diminution étant proportionnelle au degré de phosphorylation (Yamamoto et coll. en 1983). La phosphorylation des protéines tau régule aussi leur interaction avec les autres éléments du cytosquelette en inhibant par exemple leur liaison à l'actine (Nishida et coll. en 1981 ; Selden et coll. en 1983). Un dérèglement de la phosphorylation doit donc avoir des répercussions dramatiques sur la physiologie des neurones car, les microtubules en particulier et le cytosquelette en général, jouent un rôle primordial dans le transport axonal qui permet au neurone, d'une part de recevoir les informations en provenance des cellules cibles et d'autre part, d'acheminer vers ces mêmes cellules cibles ses propres informations par l'intermédiaire des neurotransmetteurs. Il n'est donc pas impossible que la phosphorylation des protéines tau soit directement impliquée dans la DNF et la mort neuronale.

Quelle est la signification de cette phosphorylation ?

On peut tout d'abord envisager qu'une enzyme impliquée dans la régulation normale des protéines tau soit rendue " hyperactive " par une substance. Ceci pouvant être dû à une action sur l'enzyme elle-même ou à une action sur les phosphatases ou les kinases qui régulent cette enzyme. On sait par exemple que la forme phosphorylée de la protéine kinase II devient autonome et qu'une déphosphorylation par une phosphatase spécifique est nécessaire à l'inhibition de l'enzyme (Miller et coll. en 1986). Si cette phosphatase est modifiée ou inhibée, la protéine kinase II phosphorylée ne pourra plus être inactivée. En ce qui concerne la maladie d'Alzheimer, cet agent serait issu de l'environnement pour les formes sporadiques alors que pour les formes familiales cet agent ou l'enzyme modifiée elle-même auraient une origine génétique.

On peut aussi supposer que l'agent qui est à l'origine de la maladie d'Alzheimer n'agisse pas directement sur une kinase. Si celui-ci pénètre dans les cellules nerveuses au niveau de leurs extrémités axonales et est transmis au corps cellulaire, site de son action nocive, par le biais du transport rétrograde, la phosphorylation des protéines tau pourrait être une réponse " volontaire " des neurones agressés. Elle aurait pour but de protéger le neurone vis à vis de cet agent, par un arrêt de son transport rétrograde. Si les effets de cet agent sont trop nocifs, au lieu d'être normale, la phosphorylation des

protéines tau par les neurones pourrait devenir anormale, soit par son intensité soit par les types d'enzymes réquisitionnés, et ainsi entraîner l'apparition des protéines tau 55, 64 et 69 et la formation des filaments insolubles.

Dans l'avenir, il nous faudra purifier les protéines tau pathologiques afin de mieux les caractériser. Actuellement, nous vérifions le protocole utilisé par Ksiezak-Reding et coll. pour purifier les protéines reconnues par Alz 50 (c'est à dire tau 55, 64 et 69). Ce protocole est basé sur une centrifugation en gradient de sucrose. Les premiers résultats sont encourageants dans la mesure où ce protocole permet une purification partielle des protéines tau pathologiques mais cela est encore insuffisant.

Lorsque les protéines d'homogénats cérébraux totaux sont séparées par une électrophorèse bidimensionnelle, les protéines tau 55, 64 et 69, dont les points isoélectriques sont voisins, se retrouvent dans une zone de pHi acide où migrent très peu de protéines comme le révèle la coloration réversible au Ponceau S après le transfert sur feuille de nitrocellulose. Nous envisageons de faire subir ce type d'électrophorèse à la fraction partiellement purifiée par la centrifugation en gradient de sucrose. Cela devrait nous permettre de séparer les protéines tau 55, 64 et 69 de toutes les autres protéines et de les récolter par électroélution ; le SDS encore présent à ce stade, pourrait être éliminé par dialyse contre un tampon physiologique.

Même si les protéines tau pathologiques précipitent à la suite de cette dialyse, ce type de préparation pourra être utilisé pour immuniser des souris dans le but d'obtenir des anticorps monoclonaux. Bien qu'il n'ait pas encore été possible d'obtenir des anticorps monoclonaux qui soient spécifiques de chacun des variants de protéines tau normales, nous pensons qu'il est possible d'obtenir des anticorps monoclonaux qui reconnaissent les protéines tau 55, 64 et 69 mais pas les protéines tau normales et peut-être même des anticorps monoclonaux spécifiques de chacune des protéines tau 55, 64 et 69. En effet, le fait que l'anti-PHF épuisé reconnaisse les protéines tau 55, 64 et 69 mais pas les protéines tau normales nous amène à penser que des épitopes caractéristiques de ces protéines doivent exister. Ces épitopes sont probablement des épitopes conformationnels et, de ce fait, ils pourraient ne pas être communs aux trois protéines.

De tels outils immunologiques permettraient de mieux étudier la relation existant entre protéines tau anormales et filaments insolubles tant au niveau de la DNF de type Alzheimer que de la dégénérescence de la maladie de Pick ou de la PSP. Cette étude pourrait être réalisée par immunohistochimie soit en microscopie optique soit en microscopie électronique. De plus, à l'aide de ces anticorps monoclonaux, l'étude du LCR pourrait être reprise car si ces anticorps sont plus sensibles que nos anti-tau, anti-

PHF ou anti-PHF épuisé, peut-être permettront ils d'y détecter des traces de protéines tau pathologiques et d'élaborer le test diagnostique tant espéré.

Tant que les protéines tau 55, 64 et 69 ne pourront pas être solubilisées par un autre moyen que le SDS, les techniques classiques de purification des protéines ne pourront être appliquées.

L'élaboration d'anticorps polyclonaux dirigés contre les peptides synthétiques correspondant à des parties de séquence des protéines tau humaines est en cours (paragraphe 4.5.). Chacun de ces anticorps ne devrait reconnaître que certains variants des protéines tau normales. Ils devraient donc nous permettre de déterminer si les protéines tau 55, 64 et 69 sont issues de toutes les protéines tau normales ou si elles ne sont issues que d'un seul variant normal. Nous pourrions transfecter des fibroblastes ou des cellules de neuroblastomes avec l'ADN complémentaire codant pour ce variant normal. Les cellules ainsi transfectées constitueraient un modèle de choix pour tenter l'induction des protéines tau 55, 64 ou 69 kDa sous l'effet de divers agents.

Jusqu'à présent, différentes équipes ont tenté d'induire des PHF *in vitro*. Or, le temps nécessaire à la formation de ces structures est sûrement très long, trop long peut-être pour qu'elles puissent être détectées dans les systèmes à durée de vie limitée que sont les cultures de neurones.

Les protéines tau 55, 64 et 69 sont des marqueurs précoces de la DNF car elles sont détectées dans les biopsies qui sont réalisées à des stades peu avancés de la maladie. De plus, comme elles sont solubles dans des conditions où les PHF restent insolubles, la phosphorylation doit avoir lieu bien avant la formation des PHF. Ainsi, nous pensons que l'induction d'une phosphorylation expérimentale des protéines tau entraînant un ralentissement de leur mobilité électrophorétique doit être plus aisée que l'induction de la formation de PHF.

Au cours du dernier chapitre de ce manuscrit, nous traiterons des expériences que nous avons réalisées afin de découvrir l'agent causal de la DNF de type Alzheimer et d'élaborer un modèle expérimental de cette dégénérescence.

Modèle *in vitro*.

1. Choix des cellules.

Le modèle le mieux adapté à nos expériences aurait consisté à cultiver des neurones humains sinon hippocampiques, du moins corticaux. Néanmoins, outre un problème éthique, se posait un problème matériel : ce type de cellules ne peut être obtenu que lorsque des biopsies cérébrales sont pratiquées, ce qui est peu fréquent.

Nous avons écarté les neurones de rat car les PHF n'ont été observées que dans l'espèce humaine (Foncin et coll. en 1980).

Finalement, nous avons opté pour une lignée de neuroblastomes humains : les cellules SK-N-SH (Biedler et coll. en 1973).

1.1. Méthodologie.

Ces cellules sont néoplasiques. Ceci est gênant car elles peuvent ne pas exprimer les mêmes protéines que les neurones différenciés. De plus, leur prolifération peut poser des problèmes si les expériences doivent être menées pendant plusieurs jours.

Pour pallier ces inconvénients, nous avons décidé de réaliser toutes nos expériences sur des cellules différenciées, afin de nous placer dans une situation la plus proche possible de celle qui existe dans le cerveau humain adulte.

1.2. Description de la culture.

1.2.1. Les cellules en prolifération.

Les cellules baignant dans un milieu contenant 90 % de sérum de veau foetal (SVF) et 10 % de diméthylsulfoxyde (DMSO) sont conservées dans l'azote liquide.

Une fois décongelées par un passage rapide à 37 °C, les cellules sontensemencées dans le milieu minimum essentiel de Earle supplémenté en L-glutamine et contenant 5 % de SVF. Six à huit heures après l'ensemencement, les cellules s'attachent sur le fond du flacon de culture.

Deux types de cellules sont observés :

- des petites cellules denses possédant de courts prolongements qui sont des neuroblastes (figure 25A) (environ 95 %);

- de grandes cellules aplaties au cytoplasme clair qui sont les précurseurs de cellules gliales (figure 25B) (environ 5 %).

Le temps de doublement, calculé par des comptages de cellules effectués à l'aide d'une cellule de Malassez à des intervalles réguliers, est d'environ 2 jours (figure 26). Lorsque la confluence est atteinte, les cellules sont décollées à l'aide d'une solution saline sans calcium ni magnésium, dissociées à la pipette Pasteur puis réensemencées.

1.2.2. Les cellules différenciées.

Les neuroblastomes ont été très étudiés en raison de leur aptitude à la différenciation sous l'effet de différents agents : NGF, DMSO, AMPc, Acide rétinoïque ... (Abemayor et coll. en 1989).

Le NGF (NGF 7s à 10 $\mu\text{g/ml}$) n'a pas d'effet différenciateur sur les cellules SK-N-SH. Ceci est en accord avec les données de la littérature car seule une sous lignée de SK-N-SH appelée SY5Y se différencie dans ces conditions (Perez-Polo et coll. en 1982).

Par contre les cellules SK-N-SH se différencient sous l'effet de l'acide rétinoïque (10^{-5} M). En effet, une journée après l'addition d'acide rétinoïque, les prolongements des petites cellules s'agrandissent ; au bout de 2 jours, les axones se distinguent nettement et les neurones voisins établissent des contacts pouvant correspondre à des synapses (figure 25B) ; la complexité du réseau neuritique continue à s'accroître jusqu'à 3 jours. La différenciation des grandes cellules est plus difficile à observer car elle ne se traduit pas par l'émission de prolongements ; seul un aplatissement plus marqué et une augmentation de la surface des cellules sont observables. Le milieu est remplacé tous les deux jours.



Figure 25 : A - cellules SK-N-SH en prolifération - Coloration au violet cristallin.

Dans les cultures de cellules SK-N-SH on distingue :

- de nombreuses petites cellules denses possédant de courts prolongements appelées neuroblastes (n),
- quelques grandes cellules très étalées, au cytoplasme clair qui sont des précurseurs des cellules gliales (g).

Lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu contenant 5 % de SVF, elles prolifèrent activement ; la pointe de flèche indique une cellule en fin de télophase.

B - cellules SK-N-SH différenciées (2 jours après addition d'acide rétinoïque) - Coloration au violet cristallin.

Lorsque les cellules SK-N-SH sont cultivées dans un milieu contenant de l'acide rétinoïque (10^{-5} M), les neuroblastes se différencient en neurones (N). Après 2 jours, cette différenciation est nettement appréciable d'un point de vue morphologique en raison de la poussée des neurites, de la formation de l'axone (a) et de l'apparition de contacts entre neurones voisins suggérant la réalisation de synapses (s).

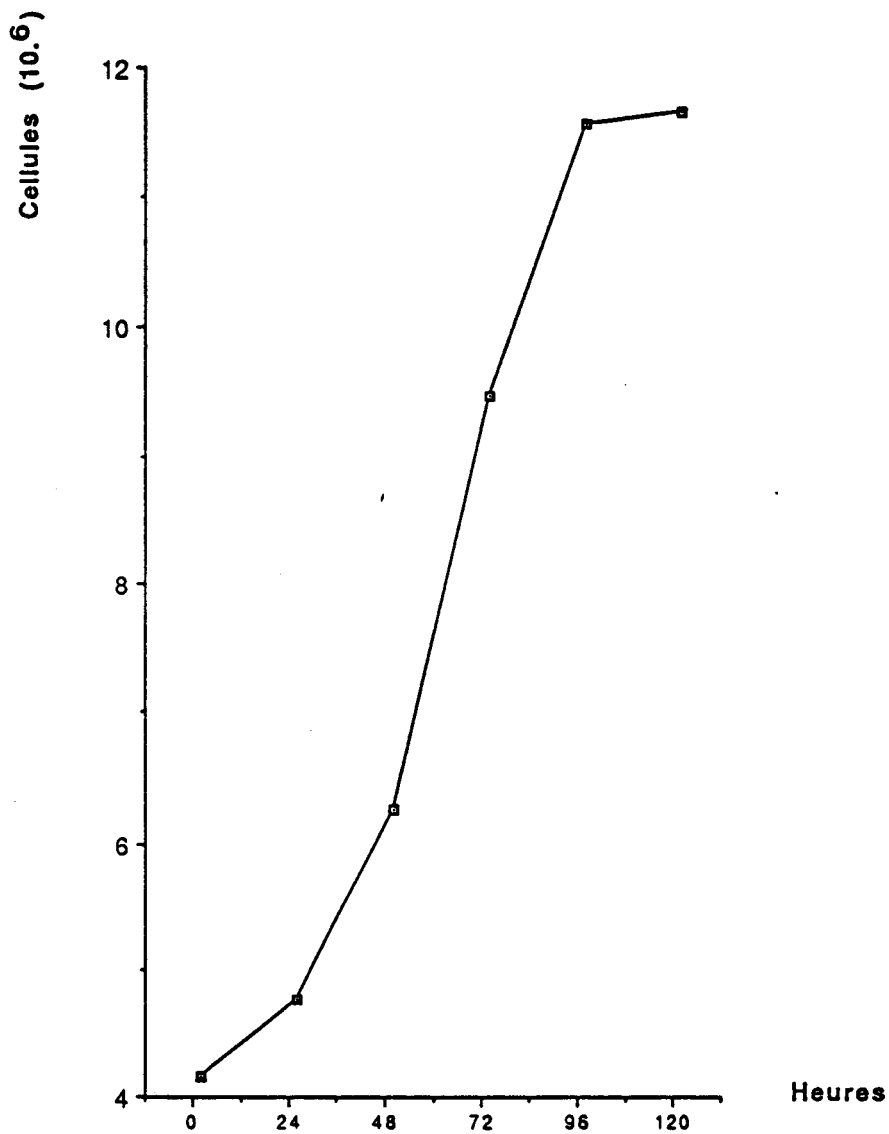


Figure 26 : courbe de croissance des cellules SK-N-SH.

Les cellules sont comptées à l'aide d'une cellule de Malassez toutes les 24 heures. Les valeurs qui nous ont permis d'établir cette courbe de croissance correspondent à la moyenne de trois comptages ; les écarts types n'ont pas été figurés, ils sont de l'ordre de 5 %.

Le temps de doublement, évalué d'après la partie de la courbe correspondant à la phase de croissance exponentielle de la culture, est d'environ 48 heures.

Bien que cette différenciation puisse être affirmée sur la base de critères morphologiques, nous avons réalisé son étude par analyse d'images en collaboration avec le docteur Bernard Lassalle du laboratoire de Biologie du Développement de l'université de Lille I. Les culots cellulaires sont fixés avant d'être écrasés entre 2 lames de verre afin de séparer les cellules les unes des autres. Les mesures ont été réalisées à l'aide de l'analyseur d'images SAMBA 200, sur les noyaux des cellules ainsi préparées, noyaux dont le contenu en ADN a préalablement été visualisé par la coloration stoechiométrique de Feulgen (Feulgen en 1924).

La quantité d'ADN présente dans les noyaux variant en fonction de la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouvent les cellules, nous avons apprécié l'activité prolifératrice de la culture en représentant sous forme d'histogramme, le paramètre exprimant la quantité d'ADN nucléaire, à savoir la densité optique intégrée, et ce pour chaque stade étudié au cours de l'évolution de la culture (figure 27).

Au jour 0 (avant l'addition d'acide rétinoïque), les cellules sont réparties selon une courbe bimodale, le second pic ayant (en unités arbitraires) une valeur double du premier. Le premier pic correspond aux cellules ayant une quantité d'ADN égale à $2c$ caractéristique des phases G0 et G1 du cycle cellulaire. Le second pic correspond aux cellules ayant une quantité double d'ADN ($4c$), cellules en phase G2 du cycle cellulaire, phase précédant la mitose. Toutes les cellules possédant une quantité d'ADN comprise entre $2c$ et $4c$ sont en cours de synthèse d'ADN (phase S). Par rapport à la population totale, le nombre de cellules ayant une quantité d'ADN supérieure à $2c$ est de 27 %. Ce nombre chute à 14 %, une journée après l'addition d'acide rétinoïque et il ne reste plus que 6 % de cellules en prolifération après 3 jours.

La différenciation que nous avons observée précédemment est donc confirmée par cette étude en analyse d'images. Néanmoins, le pourcentage de cellules en prolifération ne devient pas nul. Cela n'est pas dû au fait que certaines cellules ne se différencient pas, mais à la présence de cellules gliales qui, contrairement aux neurones, prolifèrent encore lorsqu'elles sont différenciées.

Nous avons donc décidé de débiter nos tentatives d'induction des protéines tau 55, 64 et 69, 3 jours après l'addition d'acide rétinoïque, stade auquel la différenciation est acquise.

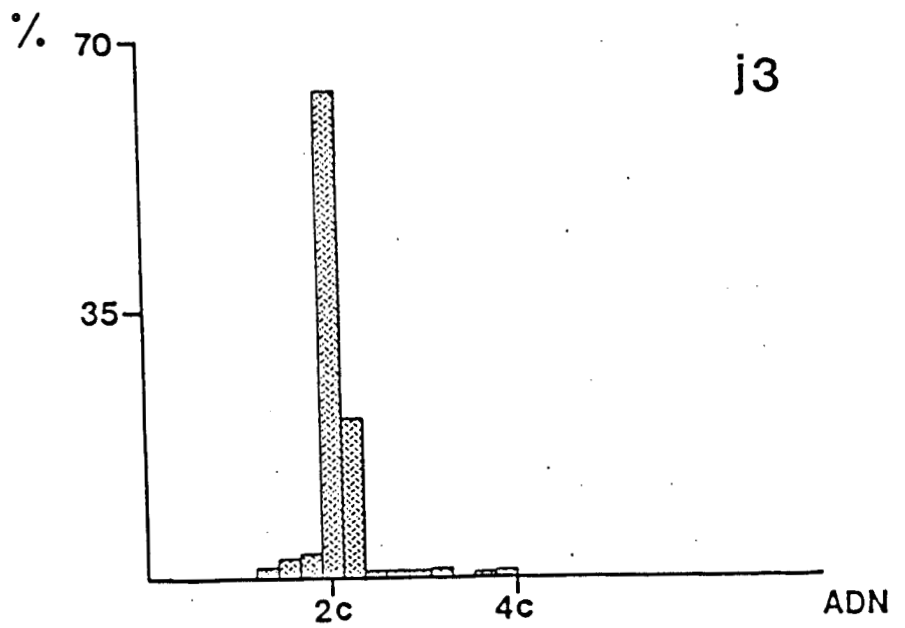
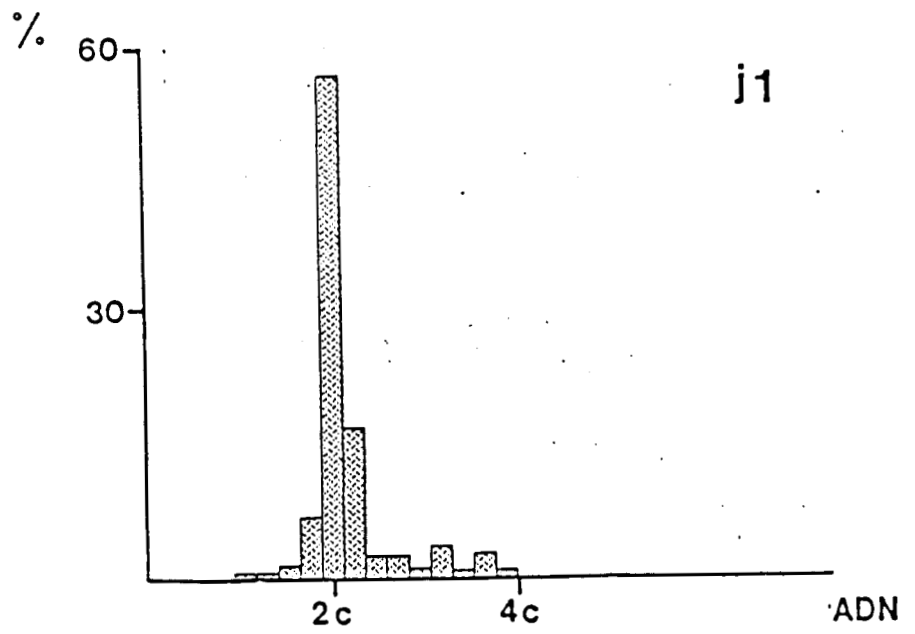
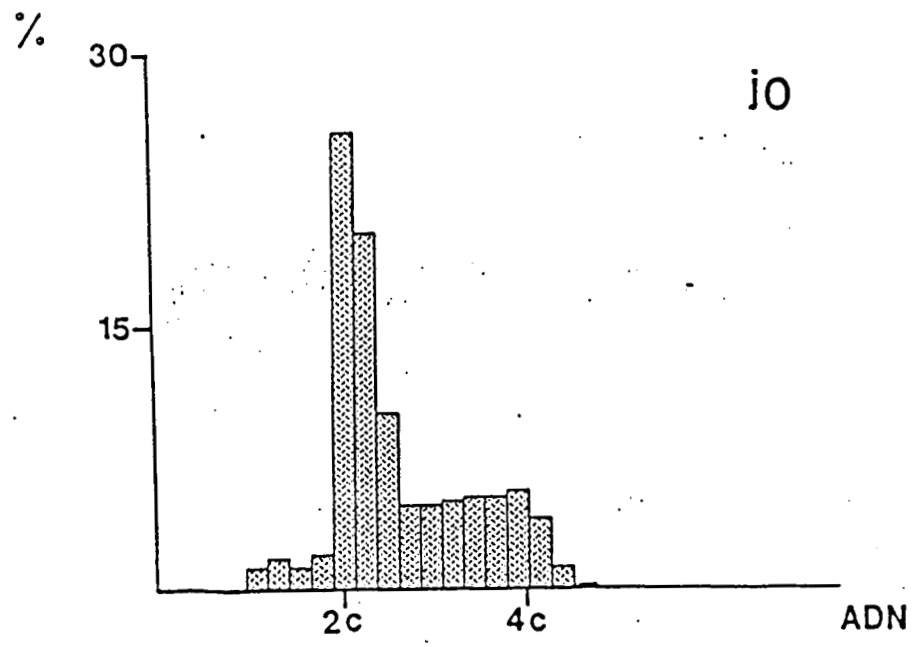


Figure 27 : histogrammes de la densité optique intégrée (DOI) exprimant en unités arbitraires la quantité d'ADN nucléaire des cellules SK-N-SH à 0, 1 et 3 jours après addition d'acide rétinoïque.

Les cellules possédant une quantité d'ADN comprise entre $2c$ et $4c$ sont en cours de synthèse d'ADN (phase S). La valeur $4c$ correspond à des cellules ayant répliqué leur ADN. En ordonnée, le pourcentage de cellules dans chaque classe.

Au jour 0, le nombre de cellules ayant une quantité d'ADN supérieure à $2c$ est de 27 %. Ce nombre chute à 14 %, une journée après l'addition d'acide rétinoïque et il ne reste plus que 6 % de cellules en prolifération (cellules gliales) après 3 jours.

Trois jours après addition d'acide rétinoïque, la différenciation est acquise et c'est à ce stade que seront réalisées nos expériences ultérieures.

1.3. Etude des protéines tau des cellules SK-N-SH.

Lorsque nous avons analysé les homogénats de culots de cellules SK-N-SH par la technique des immuno-transferts, nos anticorps anti-tau et anti-PHF ne détectèrent qu'une seule bande située aux environs de 60 kDa. Ce profil ne change pas au cours de la différenciation du point de vue qualitatif mais, cette bande est beaucoup plus fortement détectée par nos anticorps dans les homogénats de cellules différenciées depuis 3 jours.

Le fait que ces cellules ne contiennent qu'une seule protéine tau nous semblait un avantage dans la mesure où cela nous aurait permis de déceler facilement une modification du profil électrophorétique aussi petite soit-elle.

2. Addition d'extraits de cerveau.

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer si le facteur responsable de l'apparition des protéines tau pathologiques était encore présent dans le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer. Pour cela, nous avons ajouté des extraits de cerveaux malades à des cellules nerveuses en culture et nous avons analysé les protéines tau de ces cellules par la technique des immuno-transferts.

Les extraits de cerveau provenant de 2 patients atteints de maladie d'Alzheimer et de 2 témoins furent testés. Ces couples (malade ; témoin) ont été choisis afin que les âges et les délais *post-mortem* soient identiques. Nous avons comparé le malade A10 au témoin T8 ainsi que le malade A13 au témoin T10.

Une même région du cortex temporal a été disséquée chez ces 4 patients et homogénéisée à raison de 1g pour 10 volumes de milieu de culture (sans sérum de veau foetal) où avaient été ajoutés préalablement des inhibiteurs de protéases (PMSF 2 μ M et leupeptine 10 μ M). Les homogénats furent ensuite centrifugés à 15000 g. Ces opérations ont été réalisées à 4°C.

Après centrifugation, les surnageants ont été collectés et congelés. Des échantillons de surnageant et de culot ont été prélevés et analysés par la technique des immuno-transferts afin de vérifier que les homogénats de cerveaux malades contenaient des protéines tau anormales et que les homogénats de cerveaux témoins n'en contenaient pas.

Après 3 jours de différenciation, le milieu fut remplacé par un milieu défini (dont la composition est parfaitement connue, c'est à dire exempt de SVF) contenant insuline, transferrine et sélénium, substances essentielles à la survie des cellules nerveuses en culture. Ce milieu qui contient aussi 5 % d'extraits de cerveau (volume/volume), est renouvelé tous les jours. Les cellules sont collectées au bout de 3 jours car leur survie dans le milieu défini diminue fortement au-delà de ce stade. Les cellules sont ensuite décollées, centrifugées et les culots sont homogénéisés dans la solution réductrice de Laemmli en vue de leur analyse par la technique des immunotransferts. La figure 28 montre qu'aucune modification du profil électrophorétique n'est entraînée par addition des extraits de cerveaux, qu'ils soient issus de témoins ou de patients atteints de maladie d'Alzheimer.

S'il existe dans les homogénats de cerveaux malades, un facteur responsable de l'apparition des protéines tau 55, 64 et 69 dans la DNF de type Alzheimer, celui-ci semble être inactif sur les cellules de neuroblastomes. Ce résultat pourrait s'expliquer par une dégradation de ce facteur due à la congélation et décongélation ou par le fait qu'il est inactif sur les SK-N-SH.

La seule différence que nous ayons observé entre extraits de cerveaux malades et extraits témoins était la suivante : un nombre plus important de neurones survivaient dans les flacons où avaient été ajoutés des extraits de cerveaux malades. Ceci était surprenant car dans le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer une perte neuronale est observée. Néanmoins, ce résultat a été rapporté par d'autres auteurs qui avaient utilisé des cellules corticales de rat nouveau-né (Uchida et coll. en 1988). Ces mêmes auteurs ont montré par la suite que cela était dû au fait que les extraits de cerveaux témoins étaient dépourvus de facteurs inhibiteurs (Uchida et coll. en 1989). Ces résultats sont en contradiction avec l'hypothèse selon laquelle la perte neuronale serait due à un déficit en facteur neurotrophique dans la maladie d'Alzheimer (Hefti et coll. en 1986).

SK-N-SH +

T9 A11 T11 A13

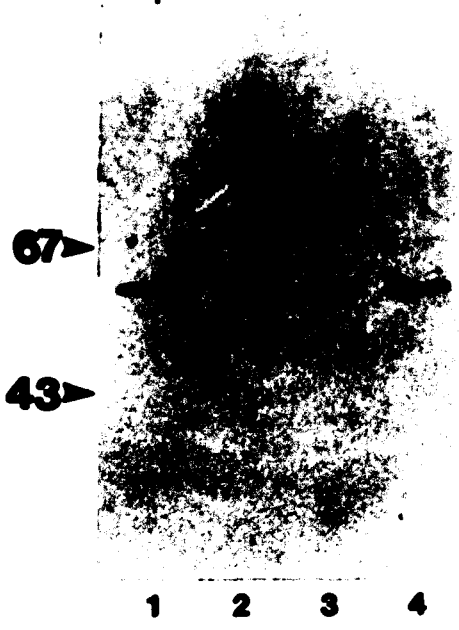


Figure 28 : étude par immuno-transfert des protéines tau de cellules SK-N-SH cultivées en présence d'extraits de cerveau provenant de malades d'Alzheimer et de témoins.

Après leur différenciation par l'acide rétinoïque, les cellules ont été cultivées pendant 3 jours en présence de 5 % d'extraits de cerveau provenant des patients suivants :

- couloir 1 : témoin T9,
- couloir 2 : malade A11,
- couloir 3 : témoin T11,
- couloir 4 : malade A13.

L'anti-tau a été utilisé dilué au 1/10000 ; 25 µl d'homogénat ont été déposés par puits.

Le poids moléculaire de la protéine tau des cellules SK-N-SH (environ 60 kDa) n'est pas modifié par l'addition d'extraits de cerveau qu'ils proviennent de témoins ou de patients atteints de maladie d'Alzheimer.

3. Les phosphorylations *in vitro*.

La phosphorylation de préparations de protéines tau issues de cerveaux témoins pourrait être tentée expérimentalement en utilisant plusieurs types de kinases, comme l'ont fait Baudier et coll. en 1987 sur des protéines tau de boeuf. Ceci nous renseignerait sur la nature de l'enzyme qui est impliquée dans le processus neurodégénératif et l'activation spécifique de cette kinase au sein de cultures de cellules nerveuses pourrait alors être envisagée.

Nous n'avons pas réalisé cette étude car nous n'avons pas encore pu nous procurer les différents types de kinases nécessaires.

Malgré cela, nous avons tenté d'activer spécifiquement certaines kinases.

3.1. Activation de la protéine kinase C par addition d'esters de phorbol.

La PKC (Ca²⁺/phospholipide dépendante) joue un rôle important dans la prolifération. Elle est normalement activée par le diacylglycérol (DAG) qui, avec l'inositol triphosphate, est issu du phosphatidyl inositol diphosphate (PIP₂) par action d'une phosphodiesterase. Cette cascade d'événements est entraînée par la fixation d'un second messenger sur son récepteur membranaire (Bell en 1986).

Les esters de phorbol sont des substances qui entraînent la formation de tumeurs. Ils activent en fait la protéine kinase C à la manière du DAG, en augmentant son affinité pour le calcium et les phospholipides (Castagna et coll. en 1982).

Les différents types d'esters de phorbol agissent sur la PKC mais certains, comme le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) ou le 12-O-tétra-décanoylphorbol-13-acétate (TPA), sont plus actifs que d'autres. Ces substances sont généralement utilisées à des concentrations variant de 0,001 à 0,2 µM et les réponses cellulaires sont alors observées dans des délais assez brefs (quelques minutes).

Nous avons tenté d'activer la protéine kinase C des cellules SK-N-SH différenciées par l'addition de ces deux esters de phorbols, en espérant induire la phosphorylation de la protéine tau et l'apparition d'une forme de plus haut poids moléculaire.

Trois jours après la différenciation, le milieu est remplacé par un milieu contenant 0,2 µM de PMA ou 0,2 µM de TPA. Comme ces deux esters de phorbol sont repris par du DMSO, une quantité équivalente de DMSO (0,1 %) est ajoutée au milieu défini dans un flacon qui servira de témoin. Le milieu est renouvelé quotidiennement et l'expérience se déroule pendant 3 jours.

Que du PMA, du TPA ou du DMSO aient été ajoutés, la mobilité électrophorétique de la protéine tau des cellules SK-N-SH reste la même (figure 29).

3.2. Activation de la protéine kinase A par addition de forskoline.

Comme la PKC peut être activée par les esters de phorbol, la PKA (AMPC dépendante) peut être activée par la forskoline. En effet, ce diterpène active l'adénylate cyclase et entraîne une augmentation de la concentration en AMPC intra-cellulaire et par conséquent une activation de la PKA (Seamon et coll. en 1981).

Le fait de cultiver les cellules SK-N-SH pendant 3 jours dans un milieu contenant 10 μ M de forskoline n'entraîne pas de modification au niveau de la protéine tau (figure 29).

Nous pourrions en conclure que ni la PKC, ni la PKA, ne sont capables d'induire une phosphorylation des protéines tau qui ralentisse leur mobilité électrophorétique. Ce résultat concorde avec celui de Baudier et coll. en 1987 qui avaient montré que seule la protéine kinase II induisait un tel ralentissement sur les protéines tau de boeuf. L'activation de cette enzyme n'a pas été tentée car il n'existe pas, à notre connaissance, de substances activatrices de la PKII qui soient semblables aux esters de phorbol pour la PKC ou à la forskoline pour la PKA.

Néanmoins, cette conclusion doit être nuancée pour plusieurs raisons :

- nous n'avons pas étudié la relation dose/effet pour notre modèle expérimental et nous ne savons donc pas si les concentrations en esters de phorbol ou en forskoline utilisées ont réellement ou suffisamment activé les kinases ;

- nous n'avons pas déterminé si la protéine tau des SK-N-SH avait été phosphorylée par la PKC ou la PKA ; le fait que les protéines tau soient phosphorylées par ces enzymes *in vitro* comme l'ont montré Baudier et coll. en 1987, n'implique pas qu'elles le soient également *in vivo*.

Ce deuxième point n'a pas été vérifié parce que l'expérience durait 3 jours et, si nous avions additionné du 32 P et réalisé une autoradiographie afin de déterminer les protéines qui avaient été phosphorylées, le précurseur radioactif aurait été incorporé dans un trop grand nombre de protéines.

SK-N-SH

t tpa | t pma | t frk

67 ▶



43 ▶

1 2 3 4 5 6

Figure 29 : étude par immuno-transfert des protéines tau de cellules SK-N-SH cultivées en présence d'activateurs des protéines kinases A et C.

Les cellules ont été cultivées pendant trois jours dans un milieu contenant :

- couloir 1 : 0,1 % de DMSO,
- couloir 2 : 0,2 μ M de 12-O-tétra-décanoylphorbol-13-acétate (tpa),
- couloir 3 : 0,1 % de DMSO,
- couloir 4 : 0,2 μ M de phorbol 12-myristate 13-acétate (pma),
- couloir 5 : 0,1 % de DMSO,
- couloir 6 : 10 μ M de forskoline (frk).

Les cellules témoins (t) ont été cultivées dans un milieu contenant 0,1 % de DMSO car c'est dans le DMSO que sont dissous les esters de phorbols et la forskoline.

L'immunsérum anti-tau a été utilisé dilué au 1/10000 ; 25 μ l d'homogénat ont été déposés par puits.

Ni l'addition d'activateurs de la protéine kinase C, ni l'addition d'activateurs de la protéine kinase A n'entraînent un ralentissement de la mobilité électrophorétique de la protéine tau des cellules SK-N-SH.

4. Hypothèse toxique : rôle de l'aluminium.

4.1. Aluminium sous forme soluble.

Crapper et coll. en 1973 ont rapporté que le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer contient une plus grande quantité d'aluminium (7 à 9 μg / g de poids sec) que celui de témoins de même âge (2 μg / g de poids sec), la répartition de cet aluminium étant liée à celle des lésions cérébrales caractéristiques de l'affection. Perl et coll. en 1980 ont obtenu plus de précisions et ont montré que l'aluminium est contenu dans les neurones en DNF.

De plus, l'aluminium est présent au centre des plaques séniles où il est sous forme d'alumino-silicates (Candy et coll. en 1986).

Cette co-localisation avec les lésions de la maladie d'Alzheimer a donné naissance à une hypothèse selon laquelle l'aluminium pourrait être impliqué dans la pathogenèse de l'affection.

Les propriétés neurotoxiques de l'aluminium sont connues depuis longtemps et plusieurs équipes ont réalisé des injections d'aluminium sous forme soluble à des animaux par voie sous-cutanée, orale ou intra-cérébrale. Cependant, la dégénérescence neurofibrillaire induite par l'aluminium diffère de celle qui est observée dans la maladie d'Alzheimer par l'ultrastructure des filaments et leurs composition biochimique : il s'agit de filaments simples de 10 nm de diamètre (Terry et coll. en 1965), qui apparaissent constitués par des neurofilaments et non des protéines tau (Troncoso et coll. en 1985).

Ces différences peuvent être liées au fait que la dégénérescence est celle de neurones animaux et non humains, les PHF, nous l'avons déjà signalé, n'ont été observées que dans l'espèce humaine (Foncin et coll. en 1980). Par des techniques immunohistochimiques, des plaques séniles (essentiellement de type immature) ont été mises en évidence dans le cerveau de patients insuffisants rénaux et bénéficiant d'une dialyse rénale chronique (Edwardson et coll. en 1989). Si ces personnes avaient vécu plus longtemps, peut-être aurait-on aussi trouvé dans leur cortex cérébral des neurones en DNF.

Afin de vérifier si des sels d'aluminium pouvaient entraîner une phosphorylation des protéines tau identique à celle qui est observée dans la maladie d'Alzheimer, nous avons cultivé les cellules SK-N-SH pendant 3 jours dans un milieu contenant du chlorure d'aluminium, en renouvelant le milieu tous les jours. La concentration en chlorure d'aluminium que nous avons choisie était la concentration la plus forte (1mM) qu'ont utilisé Shea et coll. en 1989, pour réaliser le même traitement sur des cellules de neuroblastomes murins. Ces auteurs ont réalisé une étude immunohistochimique à l'aide d'anticorps anti-neurofilaments et ont montré que le chlorure d'aluminium induit après 3 jours une accumulation de neurofilaments.

Ce traitement n'a pas eu d'effet sur la protéine tau des neuroblastomes SK-N-SH, protéine qui est toujours détectée à 60 kDa (figure 30). Nous n'avons pas réalisé d'étude immunohistochimique pour déterminer si les cellules cultivées en présence de sels d'aluminium accumulent des neurofilaments. Nos résultats suggèrent donc que les sels d'aluminium n'agissent pas sur les protéines tau et que la dégénérescence neurofibrillaire dont ils sont responsables, diffère de celle de la maladie d'Alzheimer.

4.2. Aluminium sous forme insoluble.

Nous avons déjà signalé que l'aluminium est présent au niveau des plaques séniles sous la forme d'alumino-silicates (Candy et coll. en 1986). Peut-être l'association aluminium-silice confère-t-elle à l'aluminium des propriétés particulières. Nous avons alors utilisé le même protocole que celui décrit précédemment, mais en remplaçant le chlorure d'aluminium par du kaolin qui est un alumino-silicate insoluble.

Nous avons d'abord ajouté 50 µg de kaolin par ml mais cette dose s'est avérée trop toxique et nous n'en avons finalement ajouté que 25 µg par ml. Les cellules SK-N-SH sont restées dans ce milieu pendant 3 jours, le milieu n'étant pas renouvelé car, le kaolin étant insoluble et ayant sédimenté, il n'aurait pu être ôté complètement et l'addition de milieu neuf aurait augmenté sa concentration.

L'observation des cellules au microscope électronique à balayage montre qu'après une journée, le kaolin n'est plus aléatoirement réparti dans les flacons de culture : il se trouve sur les corps cellulaires et le long des prolongements nerveux (figure 31A). Après 2 jours, il semble que le kaolin pénètre dans les cellules. En effet, les particules de kaolin semblent s'intégrer à la membrane (figure 31B). Au bout de 3 jours, des perforations cellulaires sont visibles suggérant le passage du kaolin à l'intérieur des cellules.

SK-N-SH

^{j1} t al | ^{j3} t al

67▶



43▶

1 2 3 4

Figure 30 : étude des protéines tau de cellules SK-N-SH cultivées en présence d'aluminium soluble : $AlCl_3$.

L'anti-tau a été dilué au 1/10000 ; 25 μ l d'homogénat ont été déposés par puits.

Les cellules ont été cultivées dans un milieu contenant 1mM de chlorure d'aluminium (al) et analysées après un jour (couloir 2) et 3 jours (couloir 4). Les couloirs 1 et 3 correspondent aux homogénats de cellules témoins.

L'addition de chlorure d'aluminium n'a pas d'effet sur la mobilité électrophorétique de la protéine tau des cellules SK-N-SH.

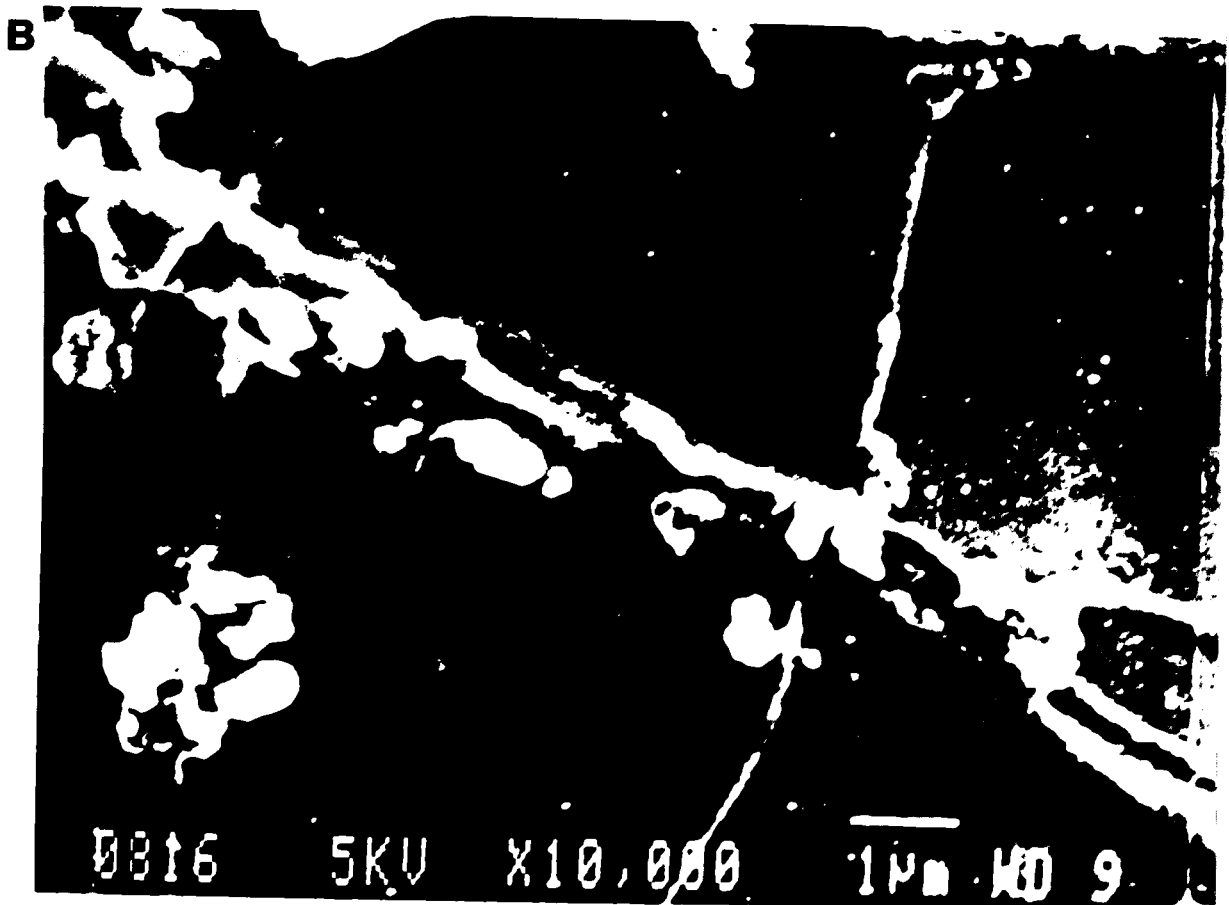
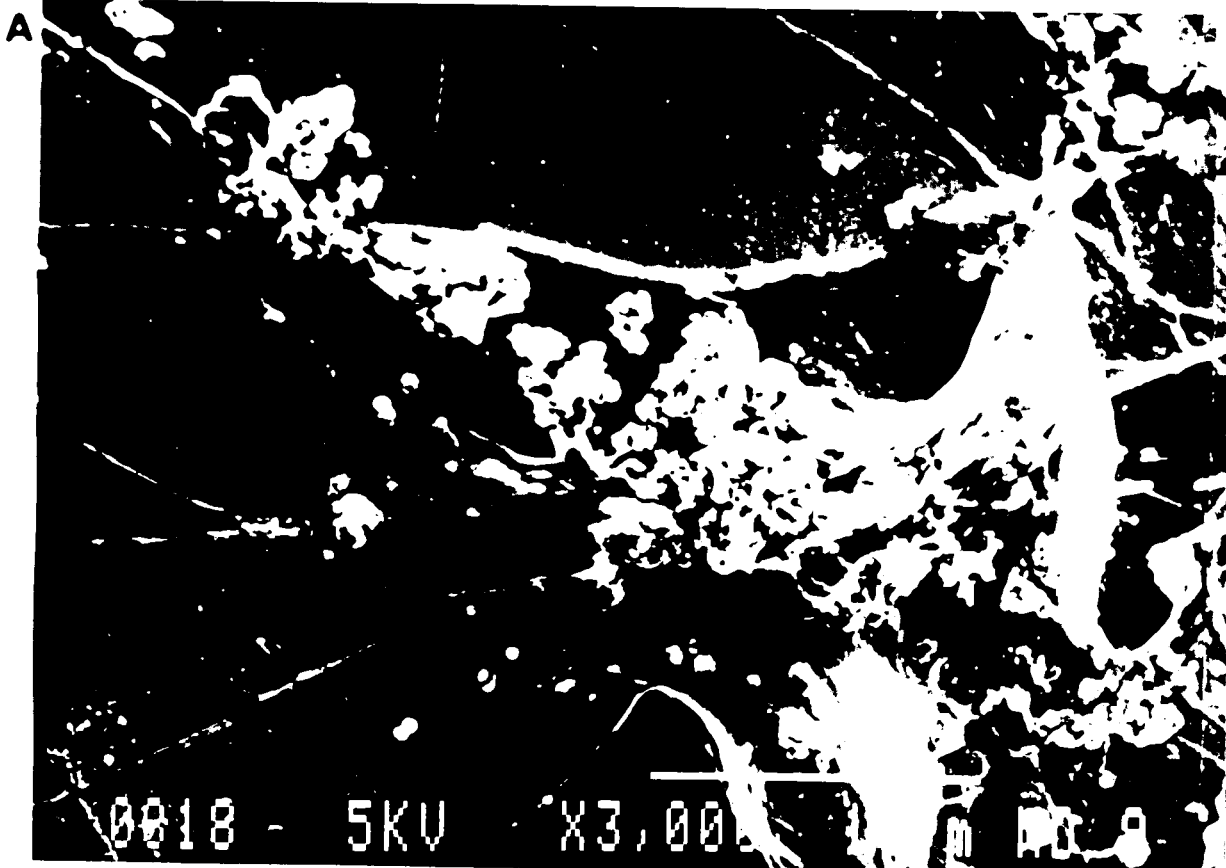


Figure 31 : cellules SK-N-SH cultivées en présence de kaolin observées au microscope électronique à balayage.

A - après une journée, le kaolin n'est plus aléatoirement réparti : il se trouve sur les corps cellulaires et le long des prolongements cellulaires (x 3000).

B - après 2 jours, les particules de kaolin semblent s'intégrer à la membrane (x 10000).

Le kaolin possède une forte affinité pour les cellules nerveuses.

L'étude des cellules au microscope électronique à transmission confirme cette internalisation du kaolin. De plus, nous remarquons à proximité immédiate des particules de kaolin, la présence de structures filamenteuses concentriques (figure 32). Peu nombreuses et de petite taille après 2 jours, ces structures concentriques sont nombreuses et de taille plus importante après 3 jours. Cette augmentation de nombre et de taille va de paire avec la dégénérescence des cellules (organites moins nombreux, membranes plasmiques rompues).

L'étude par immuno-transfert de ces cellules ne montre aucun changement du profil électrophorétique de la protéine tau. Nous remarquons uniquement l'apparition d'une fine bande de poids moléculaire plus faible (figure 33 couloirs 3 à 6) après 2 jours tant dans les homogénats de cellules traitées par le kaolin que dans les homogénats de cellules témoins. Nous interprétons cela comme une dégradation de la protéine tau de 60 kDa. En effet, lorsque les cellules SK-N-SH sont maintenues dans le milieu défini pendant 3 jours sans qu'il soit renouvelé, une partie des cellules meurent, les membranes se rompent et des protéases sont libérées.

Ainsi, ni l'aluminium ni les silicates d'aluminium n'induisent une phosphorylation des protéines tau semblable à celle qui est observée au cours de la DNF de type Alzheimer. Néanmoins, cette étude confirme les effets néfastes de l'aluminium sur les cellules nerveuses et, même si celui-ci n'est pas à l'origine de la maladie d'Alzheimer, sa présence au niveau des lésions suggère qu'il participe partiellement à la mort neuronale.

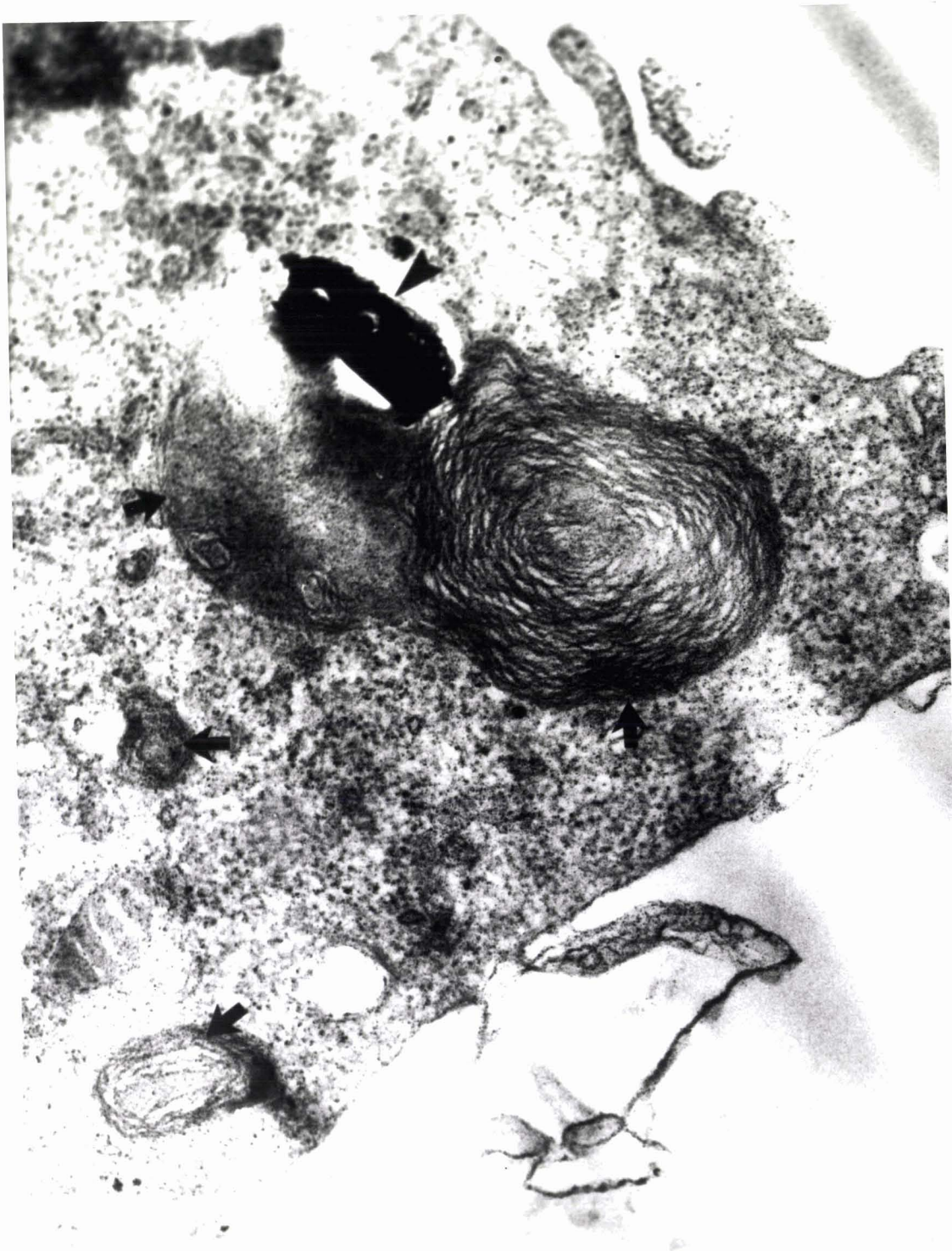


Figure 32 : cellules SK-N-SH cultivées pendant 3 jours en présence de kaolin, observées au microscope électronique à transmission.

La présence de kaolin (pointe de flèche) à l'intérieur des cellules SK-N-SH est toujours accompagnée par la formation de structures filamenteuses concentriques (flèches), dont le nombre et la taille augmentent avec le prolongement de la culture en présence de kaolin.

SK-N-SH

t^{j₁} k | t^{j₂} k | t^{j₃} k

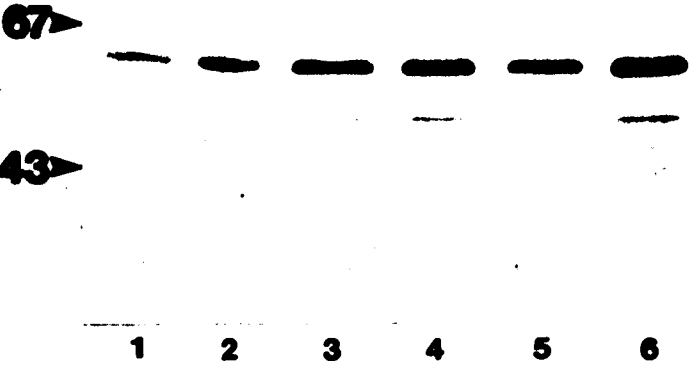


Figure 33 : étude par immuno-transfert des protéines tau de cellules SK-N-SH cultivées en présence d'aluminium insoluble : le kaolin.

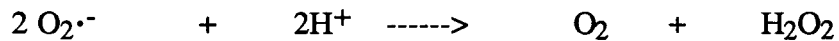
L'anti-tau a été utilisé dilué au 1/10000 ; 25 µl d'homogénat ont été déposés par puits. Les cellules ont été cultivées dans un milieu défini contenant 25 µg/ml de kaolin (k) et analysées par immuno-transfert après une journée (couloir 2), 2 jours (couloir 4) et 3 jours (couloir 6). Dans les couloirs 1, 3 et 5 ont été déposés les homogénats de cellules témoins (t), c'est à dire cultivées pendant une durée équivalente mais dans un milieu dépourvu de kaolin.

La seule modification du profil électrophorétique consiste en l'apparition d'une bande située aux environs de 50 kDa tant dans les homogénats de cellules traitées que dans les homogénats de cellules témoins.

5. Le modèle de la trisomie 21 : la superoxyde dismutase Cu/Zn dépendante (SOD 1).

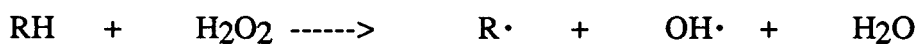
5.1. La SOD 1 et les radicaux libres.

Au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, la réduction complète de l'oxygène requiert 4 électrons et se fait via la cytochrome c oxydase mais, il existe une voie mineure, procédant par étapes monoélectroniques et donnant naissance au radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). La SOD 1 catalyse la dismutation de ces radicaux superoxydes en oxygène et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) selon la réaction :



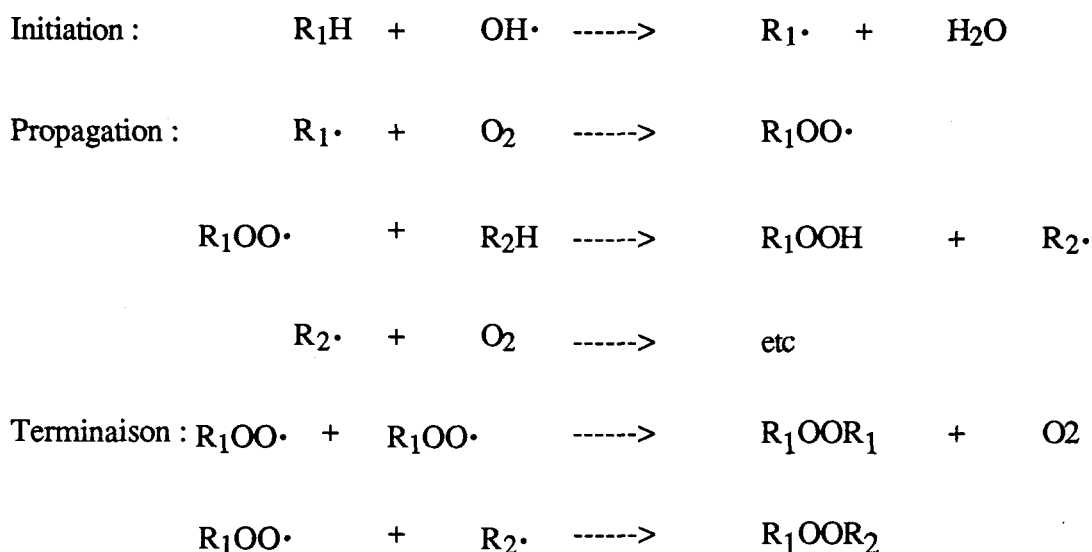
La SOD est donc considérée comme une enzyme de protection contre les effets délétères de $O_2^{\cdot-}$.

Cependant, on ne peut exclure la possibilité qu'un excès de cette enzyme puisse être toxique. En effet, $O_2^{\cdot-}$, bien qu'espèce radicalaire, n'est pas très actif et peut être selon les cas oxydant ou réducteur. Par contre, H_2O_2 issu de la dismutation est un oxydant puissant et de plus, sa réduction catalysée par les métaux de transition tels le fer, donne naissance à l'espèce radicalaire la plus oxydante en milieu aqueux : le radical hydroxyle OH^{\cdot} .



Le peroxyde d'hydrogène est normalement détruit par les catalases cellulaires en donnant de l'oxygène et de l'eau ; une autre famille d'enzymes peut également détruire H_2O_2 : les peroxydases parmi lesquelles la glutathion peroxydase sélénium dépendante joue un rôle important.

Le radical hydroxyle, en oxydant la première molécule organique rencontrée, initie des réactions de peroxydation en chaîne, aboutissant à des altérations des composants cellulaires : membrane (rupture des doubles liaisons des acides gras insaturés), protéines (oxydation permettant la protéolyse à la suite d'un changement conformationnel), ADN (cassure, délétions, mutations) ...



5.2. Implication de la SOD 1 dans la maladie d'Alzheimer.

Dans le cerveau des trisomiques 21, l'apparition de lésions identiques à celles observées chez les malades d'Alzheimer pourrait être due à des protéines ou à des enzymes, codées par des gènes situés sur le chromosome 21. Le gène de la Cu/Zn superoxyde dismutase est situé sur le chromosome 21, dans une région qui est dupliquée dans la trisomie 21. L'accroissement des réactions oxydatives catalysées par cette enzyme pourrait donc causer des dommages aux neurones (Sinet en 1982 ; Sinet et coll. en 1987).

En 1983, Thompson et coll. ont émis l'hypothèse suivante : dans les PHF, les pontages entre les fibrilles pourraient être dus à l'action du radical hydroxyle.

Cette hypothèse est étayée aujourd'hui par la détermination de la composition en acides aminés des PHF qui révèle la présence de 6% d'hydroxyproline (Vogelsang et coll. en 1990). Cet acide aminé est absent du cerveau humain témoin ; habituellement, il est associé à des protéines extracellulaires secrétées et résulte d'une hydroxylation enzymatique des protéines au niveau du réticulum endoplasmique. La présence d'hydroxyproline dans les PHF pourrait résulter d'une hydroxylation non enzymatique probablement liée au radical hydroxyle.

De plus, des expériences destinées à étudier le mode de formation de PHF dans des fibroblastes en culture montrent que lorsque ces cellules sont traitées avec un découplant de la chaîne respiratoire mitochondriale (conduisant à la formation de radicaux libres), elles sont marquées par des anticorps anti-PHF, de façon comparable aux fibroblastes de patients atteints de maladie d'Alzheimer (Blass et coll. en 1989).

Enfin, l'activité de la SOD 1 est augmentée dans les fibroblastes de patients atteints de forme familiale de maladie d'Alzheimer (Zemlan et coll. en 1989).

Grâce à la collaboration des docteurs Pierre-Marie Sinet et Irène Cébaillos, nous avons eu la possibilité d'analyser par la technique des immuno-transferts, les protéines tau cérébrales de souris transgéniques pour le gène de la SOD 1 par rapport à celles de souris témoins de même âge. L'étude de ces souris transgéniques pouvait peut-être nous aider à déterminer si la SOD 1 était responsable de la phosphorylation des protéines tau dans la maladie d'Alzheimer (par exemple, par inactivation d'une kinase à la suite de son oxydation par les radicaux libres).

5.3. Obtention d'une lignée de souris transgéniques pour la SOD 1.

Les souris transgéniques ont été obtenues selon la méthode de Gordon et coll. en 1983. Douze heures après la fécondation, les oeufs sont prélevés et mis en culture jusqu'à l'apparition des 2 pronuclei. On injecte alors l'ADN ou transgène (qui doit être inférieur à 20 kb) dans l'un des pronuclei. La séquence d'ADN à injecter comprenant le gène de la SOD 1 humaine et son promoteur est séparée de l'ADN plasmidique où elle avait été stockée par électrophorèse, après digestion par l'enzyme de restriction Eco RI. L'ADN intéressant (16 kb) est ensuite récupéré et dilué dans un tampon tris (pH 7,5) ; environ 500 copies sont microinjectées par oeuf. Les oeufs injectés sont ensuite réimplantés dans le ventre d'une souris en pseudo-gestation et menés à terme.

Sur 244 oeufs microinjectés, 17 souriceaux sont nés.

Il a ensuite fallu vérifier quels étaient ceux qui avaient intégré le transgène car la fréquence d'animaux transgéniques varie entre 10 et 40 %. Pour cela, de l'ADN isolé à partir de la queue des souriceaux est séparé par électrophorèse après coupure par l'enzyme de restriction Eco RI puis, une sonde radioactive (^{32}P) correspondant à l'ADN complémentaire permet de faire la sélection. Parmi les 17 souriceaux, 2 seulement avaient intégrés le transgène : TG1 et TG2.

Ces souriceaux transmettaient le transgène de façon stable aux descendants.

L'étude des ARN messagers totaux par Northern blot montra que seul l'individu TG2 exprimait la SOD 1 humaine. Le dosage de l'activité de la SOD 1 réalisé à l'aide du nitro-bleu tetrazolium comme substrat révèle une augmentation maximale au niveau cérébral (x 1,93).

Une étude immunohistochimique ainsi qu'une étude par hybridation in situ ont permis de montrer que dans le cerveau des souris transgéniques, la SOD 1 humaine était exprimée de manière ubiquiste mais qu'elle était présente exclusivement dans les neurones. L'hippocampe est la région où son expression est la plus forte bien que limitée aux cellules granulaires du gyrus denté et aux neurones pyramidaux de la corne d'Ammon.

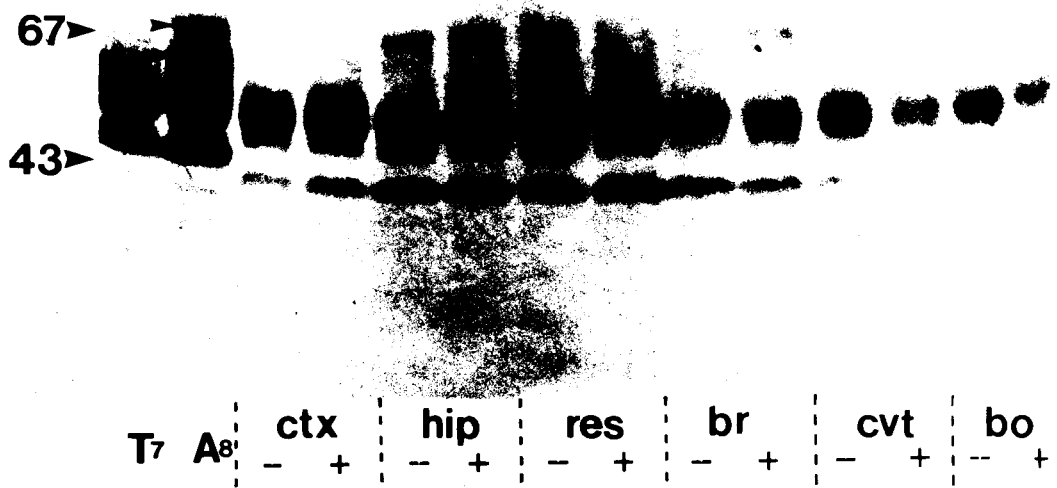
5.4. Etude des protéines tau.

Cette étude a porté sur 3 souris transgéniques (descendants de TG2) âgées de 1, 7 et 10 mois et sur 3 souris témoins d'âges apparentés.

Que la comparaison ait été réalisée entre souris de 1, 7 ou 10 mois, nous n'avons jamais pu mettre en évidence une modification du profil électrophorétique des protéines tau, ni avec nos immunsérums anti-tau ou anti-PHF (figure 34A), ni avec l'anti-PHF épuisé (figure 34B). Bien que ces résultats soient issus de l'étude d'animaux chez lesquels des PHF n'ont jamais été observées, ils ne sont pas en faveur d'une relation entre la SOD 1 et la phosphorylation des protéines tau. Une étude complémentaire portant sur des cellules de neuroblastomes humains transfectés avec le gène de la SOD 1 pourrait être envisagée.

Lorsque nous avons utilisé l'anti-PHF épuisé, nous avons constaté qu'un marquage persistait pour les homogénats de cerveau de souris, qu'ils soient ou non issus de souris transgéniques alors que les protéines tau des homogénats de cerveau humain témoin n'étaient plus détectées (figure 34B). Ceci nous laisse supposer que les protéines tau de souris pourraient renfermer des épitopes qui sont également présents dans les PHF.

PHF



PHF é

Figure 34 : comparaison par immuno-transfert avec les immunosérums anti-PHF (A) et anti-PHF épuisé (B) des protéines tau au sein d'homogénats de différentes régions cérébrales provenant d'une souris transgénique pour la SOD 1 âgée de 10 mois et d'une souris témoin de même âge.

Les régions issues de la souris transgénique sont notées + ; celles de la souris témoin sont notées -. Nous avons déposé 25 µl d'homogénat des régions cérébrales suivantes : le cortex (ctx), l'hippocampe (hip), le bulbe rachidien (br), le bulbe olfactif (bo), le cervelet (cvt) et le reste du cerveau (res). Nous avons également déposé 25 µl d'homogénat de cortex temporal provenant du témoin T7 et du malade d'Alzheimer A8.

L'anti-PHF (PHF) et l'anti-PHF épuisé (PHFé) ont été dilués au 1/200.

Dans les homogénats de cerveau provenant de la souris transgénique ou de la souris témoin, l'anti-PHF détecte :

- une bande aux environs de 43 kDa;
- une bande diffuse correspondant vraisemblablement à la superposition de plusieurs bandes de poids moléculaires voisins compris entre 50 et 55 kDa ; ces bandes sont plus discernables dans les homogénats de bulbe rachidien, de bulbe olfactif ou de cervelet où l'immunodétection est plus faible que dans le cortex, l'hippocampe ou le reste du cerveau;
- une fine bande aux environs de 69 kDa.

L'anti-PHF épuisé, alors qu'il ne détecte plus les protéines tau du cerveau humain témoin, détecte encore certaines protéines tau des cerveaux murins, surtout les bandes de 50 et 69 kDa.

Ni l'anti-PHF, ni l'anti-PHF épuisé ne détectent de différences entre les protéines tau cérébrales de la souris transgénique et celles de la souris témoin.

6. Conclusions et perspectives.

Les expériences que nous avons décrites dans ce chapitre ne nous ont pas permis d'induire un ralentissement de la mobilité électrophorétique des protéines tau sous l'effet d'une phosphorylation.

Cela signifie t-il que les agents que nous avons étudiés ne sont pas impliqués dans la maladie d'Alzheimer ou dans la dégénérescence neurofibrillaire ?

Nous ne sommes pas en mesure de l'affirmer.

D'abord, le modèle que nous avons choisi ne permet peut-être pas d'observer l'apparition de protéines tau modifiées. En effet, les cellules SK-N-SH ne contiennent qu'une protéine tau, qui reste unique après différenciation. Or, nous n'avons pas encore déterminé si les protéines tau 55, 64 et 69 étaient issues de l'ensemble ou d'une partie seulement des variants normaux des protéines tau. Si les protéines tau pathologiques sont issues de variants autres que celui qui est contenu dans les SK-N-SH, nous n'observerons jamais un quelconque changement du profil électrophorétique, même sous l'effet du facteur responsable de la maladie d'Alzheimer. Nous devons étudier d'autres lignées cellulaires où existent plusieurs protéines tau. Par exemple, les cellules de phéochromocytome de rat (PC12) différenciées par le NGF contiennent plusieurs protéines tau. Il nous faudra donc rechercher des lignées cellulaires semblables, mais d'origine humaine.

De plus, au cours de ces expériences, nous n'avons étudié qu'un seul facteur à la fois. Il n'est pas exclu que la maladie d'Alzheimer et la dégénérescence neurofibrillaire résultent d'un processus multifactoriel. Ainsi, d'autres expériences faisant intervenir simultanément plusieurs facteurs pourront être réalisées.

Même si les situations que nous avons envisagées au cours de ces différentes expériences ne sont pas celles de la maladie d'Alzheimer, cela ne signifie pas pour autant que l'induction de protéines tau anormales *in vitro* n'est pas réalisable. En effet, d'autres facteurs peuvent et doivent encore être testés.

Par exemple, nous avons activé la PKC et la PKA mais l'activation de la protéine kinase II n'a pas été réalisée. Nous pourrions également nous intéresser à d'autres kinases comme la caséine kinase II dont la concentration est diminuée dans le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer et dont la présence dans les corps cellulaires des neurones en dégénérescence a été démontrée (Iimoto et coll. en 1989).

D'autre part, nous avons la possibilité d'agir sur les phosphatases, par exemple en les inhibant, ce qui rendrait impossible l'inactivation de certaines kinases dont la régulation est basée sur un système " phosphorylation-déphosphorylation ". Ce deuxième type d'expérience pourra être réalisé grâce à l'acide okadaïque, un promoteur de tumeurs qui inhibe de nombreux types de phosphatases (Cohen et coll. en 1990).

Nous n'avons pas non plus testé le rôle du glutamate. Celui-ci est un agent pathogène possible en raison de sa toxicité et un certain nombre d'expériences visant à induire une dégénérescence neurofibrillaire *in vitro* par exposition au glutamate ont déjà été réalisées.

Ainsi, De Boni et coll. en 1985 ont rapporté l'induction de PHF par le glutamate, dans des neurones de moelle épinière de fœtus humain en culture organotypique. Malheureusement, ce travail n'a pas été reproduit depuis.

Par ailleurs, à partir de cultures de neurones d'hippocampe de rat embryonnaire ou nouveau-né, Mattson et coll. en 1989 ont montré que les cellules pyramidales étaient sensibles au glutamate alors que les cellules étoilées et les cellules bipolaires y étaient insensibles. Lorsque les cellules pyramidales sont exposées à une concentration de 1mM en glutamate, on observe une fragmentation et une régression de leurs prolongements dendritiques, les corps cellulaires augmentent de taille et s'arrondissent et les cellules finissent par se détacher du substrat. Une hiérarchie semble exister entre les différentes régions de l'hippocampe : les cellules pyramidales du gyrus denté sont moins sensibles que celles du champ CA2 elles-mêmes moins sensibles que celles du champ CA3, les cellules du champ CA1 étant les plus sensibles (Mattson et coll. en 1989).

Au cours d'une étude plus récente, ces mêmes auteurs ont montré que la toxicité du glutamate se faisait par l'intermédiaire d'un influx calcique, les effets du glutamate pouvant être inhibés par addition de chélateurs du calcium ou mimés, par utilisation d'un ionophore calcique (Mattson en 1990). De plus, alors qu'elle est faible dans les cultures témoins, l'immunoréactivité des terminaisons axonales et des corps cellulaires des cellules pyramidales, vis à vis d'anticorps anti-tau, devient forte au cours de la dégénérescence induite par le glutamate ou le calcium (Mattson en 1990).

Nous pourrions donc vérifier si un changement du profil électrophorétique des protéines tau accompagne ce changement d'immunoréactivité et/ou adapter le même protocole à des lignées cellulaires humaines.

Enfin, nous n'avons pas étudié le rôle de la substance amyloïde.

Whitson et coll. ont rapporté que la survie des neurones d'hippocampe de rat en culture était augmentée lorsqu'un peptide synthétique correspondant aux acides aminés 1-28 de la séquence de la β protéine A4 (1989) ou à la β protéine A4 entière (1990), étaient ajoutés au milieu de culture (100 μ g / ml). A la vue de ces résultats, ces auteurs ont proposé que la présence de neurites à la périphérie des plaques séniles soit due à l'activité trophique de la β protéine A4. Ceci est en accord avec certains travaux décrivant la croissance anormale de neurites dans le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer (Ihara et coll. en 1988).

Un autre travail est à signaler : celui de Yankner et coll. en 1989. Ces auteurs ont transfecté des cellules PC12 avec les ADN complémentaires codant pour différentes parties du précurseur de la β protéine A4 (nucléotides -95 à 2953, 1769 à 2373 et 1769 à 1959) et ont observé si l'expression de ces séquences, sous l'effet d'une différenciation par le NGF, entraînait ou non une dégénérescence des cellules. Ils ont constaté que seul le peptide correspondant aux 105 acides aminés de la partie C-terminale du précurseur (nucléotides 1769-2373) était neurotoxique (les cellules transfectées avec l'ADN complémentaire codant pour la totalité du précurseur ainsi que celles transfectées avec la portion de gène codant uniquement pour la β protéine A4 ne dégénérent pas). Ainsi, la toxicité ne serait pas due à la β protéine A4 mais à certains produits intermédiaires apparaissant au cours de la dégradation de son précurseur.

Afin de déterminer si des protéines tau anormales sont produites au cours de cette dégénérescence, nous pourrions utiliser les cellules PC12 ou des lignées cellulaires humaines, transfectées avec la séquence correspondant aux nucléotides 1769-2373.

A ce jour, de nombreuses hypothèses pourraient expliquer la dégénérescence neurofibrillaire qui apparaît au cours de la maladie d'Alzheimer. Les études biochimiques réalisées *post-mortem* dans le but de déterminer la nature des éléments qui composent les lésions caractéristiques de l'affection permettent de faire un tri parmi toutes ces hypothèses.

Par exemple, les résultats présentés au cours du deuxième chapitre de ce manuscrit nous ont permis de confirmer la théorie d'une phosphorylation anormale des protéines tau en mettant en évidence les protéines tau 55, 64 et 69 qui sont des marqueurs fiables de la dégénérescence neurofibrillaire. La phosphorylation des protéines tau doit donc être la modification biochimique qui est à l'origine de leur agrégation sous forme de PHF insolubles.

Ainsi, nous nous rapprochons peu à peu de la cause de l'affection. Néanmoins, ces études *post-mortem* ne révèlent que les stades terminaux des processus pathologiques. C'est pourquoi la mise au point d'un modèle expérimental de la dégénérescence neurofibrillaire, qui est désormais permise par la découverte des protéines tau 55, 64 et 69 comme nous venons de l'illustrer au cours de ce dernier chapitre, est primordiale. En effet, ce modèle devrait permettre, dans un avenir assez proche, d'identifier l'agent causal de l'affection. Le diagnostic *in vivo* de la maladie d'Alzheimer ainsi qu'une thérapeutique efficace pourront alors voir le jour.

Matériel et méthodes.

1. Solution réductrice de Laemmli (Laemmli 1970).

SDS	50 g
Tris	7,57 g
EDTA	1,12 g
EGTA	1,14 g
DTT	2,5 g
Glycérol	100 ml
Bleu de bromophénol	
H ₂ O	qsp 1000 ml

Le pH de la solution est amené à 6,8 par addition d'HCl.

2. Electrophorèse en présence de SDS.

Le plus souvent nous utilisons des gradients d'acrylamide de 10 à 20 %.

Solution à pH 8,8 contenant 10 % d'acrylamide :

Acrylamide	100 g
Bis acrylamide	2,66 g
Tris	45,3 g
SDS	1 g
Temed	300 µl
H ₂ O	qsp 1000 ml.

Solution à pH 8,8 contenant 20 % d'acrylamide :

Acrylamide	200 g
Bis acrylamide	5,32 g
Tris	45,3 g
SDS	1 g
Temed	300 µl
Glycérol	200 ml
H ₂ O	qsp 1000 ml.

Le pH de ces solutions est amené à 8,8 avec de l'HCl.

Le persulfate d'ammonium qui sert de catalyseur lors de la polymérisation de l'acrylamide est ajouté au moment de couler les gels et ce, à raison de 50 µl d'une solution contenant 100 mg / ml pour 27 ml de solution d'acrylamide.

Les gels d'acrylamide sont coulés entre deux plaques de verre espacées de 1,5 mm dont une est échancrée afin de permettre le contact avec le tampon lors de l'électrophorèse qui est réalisée en système vertical descendant.

Les dimensions du gel inférieur ou gel de séparation sont : 14 x 14 cm. Le gradient est réalisé à l'aide d'un appareil à deux compartiments et d'une pompe péristaltique. Le compartiment le plus éloigné de la pompe contient la solution d'acrylamide à 10 % de pH 8,3 et est dénommé réservoir ; le plus proche contient initialement la solution d'acrylamide à 20 % de pH 8,3 plus du glycérol et est dénommé mélangeur. Dès la mise en marche de la pompe, la solution à 20 % est aspirée et est remplacée au fur et à mesure par la solution à 10 % non glycérolée. Ainsi, apparaît dans le mélangeur une solution de moins en moins concentrée en acrylamide et par la même occasion de moins en moins glycérolée et donc moins dense. Ceci aboutit à la formation d'un gradient d'acrylamide vertical entre les plaques de verre (20 % en bas et 10 % en haut). Avant de laisser polymériser le gel, de l'eau déminéralisée est ajoutée afin d'obtenir une surface bien plane.

Le gel supérieur ou gel de concentration est ensuite coulé. Il est constitué par une solution à pH 6,8 contenant 5% d'acrylamide:

Acrylamide	50 g
Bis acrylamide	0,8 g
Tris	15,1 g
SDS	1 g
Temed	500 µl
H ₂ O	qsp 1000 ml.

Du persulfate d'ammonium est ajouté et, une fois coulée, des puits de dépôts sont aménagés dans cette solution à l'aide d'un peigne qui est ôté lorsque le gel est polymérisé. Nous utilisons tantôt des peignes permettant d'obtenir 5, 10 ou 15 puits. Ce gel de concentration a une hauteur de 2 cm.

La composition du tampon d'électrophorèse est la suivante :

Tris	3 g
Glycine	14,4 g
SDS	1 g
H ₂ O	qsp 1000 ml.

Le pH est amené à 8,3 avec de l'HCl.

L'électrophorèse est effectuée à l'aide d'un redresseur de courant qui permet de maintenir un ampérage constant (20 mA durant une nuit). Le bleu de bromophénol qui est contenu dans la solution de Laemmli permet de suivre la migration qui est arrêtée lorsque le bleu sort du gel d'acrylamide.

3. Electrophorèse bidimensionnelle.

La première dimension est une isoélectrofocalisation.

Les gels sont réalisés à l'aide de la solution suivante :

Acrylamide	10 g
Bisacrylamide	0,26 g
Urée	48 g
Ampholines	5 ml
Temed	30 μ l
H ₂ O	qsp 100 ml.

Le persulfate d'ammonium est ajouté au dernier moment et dans des proportions identiques à celles décrites au paragraphe précédent.

Deux types de gel ont été réalisés : le premier à l'aide d'ampholines permettant d'obtenir un gradient de pH 3-10 et le second, à l'aide d'ampholines permettant de réaliser un gradient de pH 2-5,5.

Les gels sont coulés entre deux plaques de verre comme nous l'avons décrit au paragraphe précédent pour les gels contenant du SDS. Ces plaques ne sont espacées que de 0,75 mm afin de pouvoir déposer les bandes de gel entre les plaques de verre espacées de 1,5 mm lors de la deuxième dimension. Il n'est pas nécessaire de couler de gel de concentration, les peignes à 10 dents sont disposés directement dans la solution d'acrylamide contenant les ampholines.

Deux tampons sont utilisés.

- à l'anode : de l'acide orthophosphorique 10 mM,
- à la cathode : de la soude 40 mM.

L'électrophorèse est effectuée à l'aide d'un redresseur de courant qui permet de maintenir un voltage constant. Une prémigration est d'abord réalisée : 200 V pendant 15 mn, 300 V pendant 30 mn, 400 V pendant 30 mn. Au cours de celle-ci, les ampholines contenues dans le gel se placent les unes à côté des autres établissant ainsi le gradient de pH.

Le tissu cérébral est homogénéisé à raison de 1 g / ml dans une solution contenant 1g d'urée, 10 mg de SDS et 50 μ l de BME pour 1 ml d'H₂O. Du rouge de méthyle est ajouté à l'homogénat avant la mise en route de l'électrophorèse. Celui-ci ayant un pHi de 3,75 et étant repérable par sa coloration rouge permet de suivre le bon déroulement de l'isoélectrofocalisation.

Pour la migration des protéines cérébrales, le voltage est fixé à 400 V pendant une nuit puis à 800 V pendant une heure afin de resserrer le gradient de pH. Les protéines étant déposées dans un tampon dont le pH est supérieur à leur pHi (soude), elles sont ionisées négativement (seul le groupement acide carboxylique est ionisé) et elles migrent vers l'anode. Leur ionisation varie au fur et à mesure qu'elles entrent dans le gel car elles traversent des zones dont le pH est de plus en plus acide : elles perdent des charges négatives (COO⁻) et acquièrent des charges positives (NH₃⁺). Lorsqu'elles parviennent dans la zone de pH qui correspond à leur pHi, elles possèdent alors autant de charges positives que négatives et leur migration s'arrête.

Une fois l'isoélectrofocalisation terminée, les bandes où ont migré les protéines cérébrales sont découpées et la linéarité du gradient de pH est vérifiée. Pour cela, une bande est découpée en petits morceaux de 0,5 cm depuis l'anode jusqu'à la cathode, ces morceaux sont placés dans des tubes contenant 2 ml d'H₂O et après une agitation d'une heure, le pH est mesuré et la courbe du gradient de pH est vérifiée. De plus, le rouge de méthyle sert de témoin interne. Dans la réalité, le gradient de pH est toujours légèrement tronqué par rapport à ce qui est attendu avec les ampholines. Avec les ampholines 3-10, le gradient de pH obtenu est 4-9 ; avec les ampholines 2-5,5, le gradient obtenu est 2,5-5.

Certaines bandes sont congelées, d'autres sont soumises à la deuxième dimension qui consiste en une séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire par migration dans un gel contenant du SDS. Cette deuxième dimension est réalisée d'une manière identique à celle que nous avons décrite au paragraphe précédent. La seule modification est liée au fait que les bandes de gel, après l'isoélectrofocalisation, doivent être incubées pendant deux heures dans la solution de Laemmli. Cette opération est réalisée afin que le SDS se fixe sur les protéines et permette ainsi la séparation en fonction de leur poids moléculaire.

4. Transfert des protéines sur feuille de nitrocellulose.

Les transferts sont réalisés horizontalement à l'aide d'un appareil LKB 2117-250 novablot. Le mode de transfert est qualifié de semi-liquide car au lieu de baigner dans le tampon, gel d'acrylamide et feuille de nitrocellulose sont simplement entourés de feuilles de papier Wathman n°1 imbibées de tampon. On dépose successivement de l'anode vers la cathode: 6 feuilles de papier Wathman n°1 imbibées de tampon anode (Tris 36,3 g ; méthanol 200 ml ; H₂O qsp 1000 ml ; pH 10,4), la feuille de nitrocellulose imbibée de tampon anode, le gel d'acrylamide imbibé de tampon cathode (Acide 6-amino-n-hexanoic 5,2 g ; méthanol 200 ml ; pH 7,6) et enfin 6 feuilles de

papier Wathman n°1 imbibées de tampon cathode. La durée du transfert est de une heure et l'ampérage est de l'ordre de 0,8 mA par cm² d'unité de transfert.

La qualité du transfert (séparation satisfaisante des protéines, absence de bulles d'air entre les feuilles de papier Whatman - les bulles d'air empêchent le passage du courant) est vérifiée par une coloration réversible des protéines adsorbées sur la feuille de nitrocellulose au Ponceau S. Les bandes correspondant aux protéines apparaissent rouges. Les témoins de masse moléculaire sont également mis en évidence par cette coloration et ils sont alors repérés au moyen d'un trait de crayon.

Solution de Ponceau S :

Acide trichloracétique	30 g
Ponceau S	2 g
H ₂ O	qsp 1000 ml.

5. Application des immunosérums sur les feuilles de nitrocellulose.

La solution que nous utilisons pour diluer les anticorps est le tampon TNT :

Tris	1,8 g
NaCl	8 g
Tween	0,5 g
H ₂ O	qsp 1000 ml.

Le pH est amené à 8 avec HCl.

Avant d'appliquer les immunosérums, il est nécessaire de saturer la feuille de nitrocellulose avec un tampon TNT contenant 5 % de lait. Cette saturation a pour but de combler les espaces de la feuille de nitrocellulose qui sont encore vierges de protéines et ce, par des protéines avec lesquelles les immunosérums utilisés ultérieurement ne risquent pas de réagir. L'omission de cette étape entraîne une adsorption non spécifique des anticorps sur ces espaces vierges.

Les immunosérums dilués au demi dans le glycérol sont stockés à -20°C. Au moment de l'emploi, ils sont dilués dans le tampon TNT :

- l'anti-tau au 1/10000,
- l'anti-PHF et l'anti-PHF épuisé au 1/200.

Les étapes suivantes sont :

- rinçage au TNT 3 fois 5 mn ;
- incubation avec l'antisérum spécifique pendant une nuit à 4°C ou 2 heures à température ambiante ;
- rinçage au TNT 3 fois 5 mn ;
- incubation avec le second anticorps (dirigé contre les immunoglobulines de l'espèce qui a élaboré l'immunsérum précédent) marqué à la peroxydase ; celui-ci est dilué au 1 / 200 dans le TNT ;
- rinçage avec le TNT 2 fois 5 mn ;
- rinçage avec le TBS (Tris 1,21 g ; NaCl 9 g ; pH 7,5) 5 mn ;
- révélation de l'activité peroxydasique par une solution de TBS contenant 0,5 mg / ml de 4-chloro-1-naphtol et 0,06 % d'H₂O₂.

6. Histologie.

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire d'histologie du professeur Mazzuca.

6.1. Fixation du tissu et réalisation des coupes.

Le tissu cérébral est fixé pendant 24 heures dans la solution de Carnoy (éthanol, chloroforme, acide acétique dans les proportions 6/3/1) ou pendant au moins 72 heures dans le formol tamponné.

Après inclusion dans la paraffine, des coupes de 5 µm d'épaisseur sont réalisées.

6.2. Immunohistochimie.

Après une incubation d'une nuit à l'étuve à 50 °C, déparaffinage et hydratation, les coupes sont traitées à l'eau oxygénée à 4 % pendant 10 minutes. Après rinçage, les réactions immunoperoxydasiques sont réalisées selon la méthode indirecte qui consiste à appliquer pendant 12 heures l'immunsérum spécifique dilué dans un tampon phosphate ou PBS (anti-PHF dilué au 1/100 ; anti-tau dilué au 1/1000) puis, après rinçage dans le PBS, l'immunsérum de chèvre anti-IgG de lapin, conjugué à la peroxydase, dilué au 1/100 dans le PBS pendant une heure. La révélation est effectuée en utilisant comme chromogène le 4-chloro-1-naphtol en présence d'H₂O₂ (20 mg de 4-chloro-1-naphtol, 0,25 ml de diméthyl formamide, 50 ml de Tris et 2 gouttes d'H₂O₂).

Les lames sont ensuite montées dans l'eau glycinée.

6.3. Coloration à la thioflavine S.

Elle peut être réalisée seule ou en parallèle avec la réaction immunohistochimique. Après une nuit dans l'eau glycinée, les coupes sont rincées dans le PBS et colorées par la thioflavine S à 1 % pendant 15 minutes, puis rincées dans une solution alcoolique à 80 %. Les préparations sont observées en lumière ultraviolette.

7. Synthèse peptidique.

La méthode utilisée est celle décrite par Merrifield en 1963. Elle est dite synthèse en phase solide car le peptide est fixé sur une résine. Les acides aminés que l'on ajoute au fur et à mesure sont eux dans une phase liquide qui doit être non aqueuse ; le dichlorométhane (DCM) ou le diméthylformamide (DMF) sont des solvants de choix, mais ils doivent avoir un bon degré de pureté. Tous les acides aminés employés pour cette synthèse ont leur fonction NH₂ protégée à l'aide d'un groupement butyloxycarbonyle (Boc). De ce fait, la synthèse commence par l'acide aminé qui est situé à l'extrémité C-terminale du peptide. Les groupements fonctionnels des chaînes latérales des acides aminés sont également protégés à l'aide de groupements résistants au TFA (dérivés benzylés).

Les différentes étapes de cette synthèse sont résumées dans la figure 35.

7.1. Greffe du premier acide aminé sur la résine.

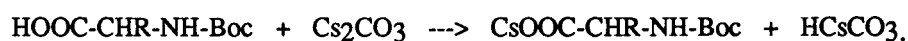
Celle-ci est réalisée par une réaction d'estérification entre le sel de césium du premier acide aminé et les groupements chlorométhyles du support.

7.1.1. Réalisation d'un sel de césium.

Celui-ci est obtenu entre le premier Boc-acide aminé et du carbonate de césium.

Pour cela, 3 mmoles de Boc-acide aminé sont dissoutes dans 10 ml d'éthanol et 3 ml d'eau, puis le pH est amené à 7 par addition, goutte à goutte, de carbonate de césium 2M.

La réaction suivante a alors lieu :



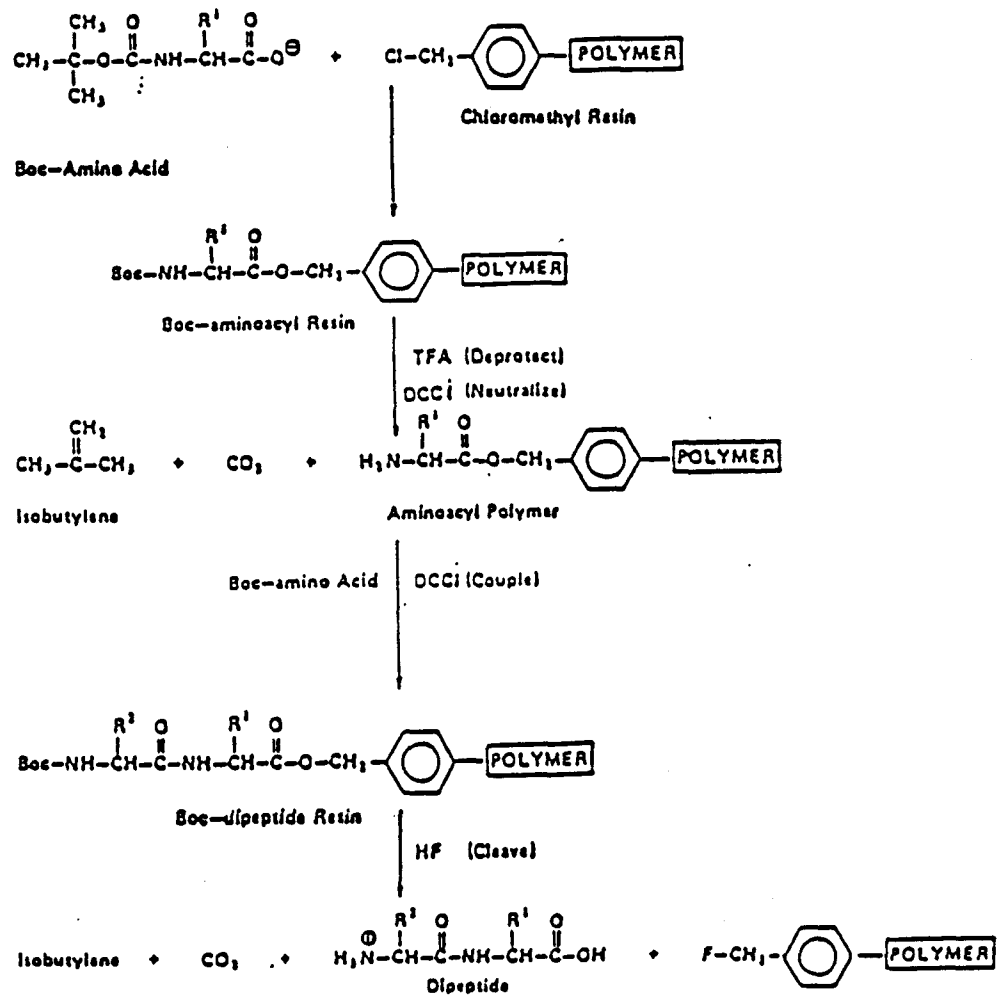


Figure 35 : résumé des différentes étapes de la synthèse peptidique en phase solide d'après Merrifield en 1963.

TFA = acide trifluoroacétique ; DCCl = dicyclohexyle carbodiimide ; HF = acide fluorhydrique.

Le liquide est ensuite évaporé (rotavapeur à 50°C). La poudre est reprise par du benzène fraîchement distillé (80°C) puis elle est évaporée à nouveau et cette opération est répétée deux fois.

Le ballon contenant le sel de césium est placé pendant 24 heures dans un dessiccateur dans le fond duquel une coupelle contenant de l'anhydride phosphorique (P₂O₅) a été préalablement déposée.

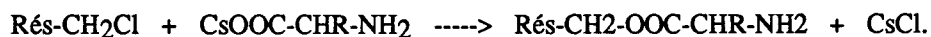
7.1.2. Préparation de la résine.

Nous utilisons la résine de Merrifield (Fluka) qui est un copolymère styrène-divinylbenzène chlorométhylé.

Nous plaçons un gramme de résine dans un fritté afin de la laver avec 100 ml de DMF, 100 ml de DMF / eau (V / V), 100 ml DMF, 100 ml de méthanol. Le fritté est ensuite placé dans un dessiccateur pendant 24 heures en même temps que le Cs-Boc-acide aminé.

7.1.3. Couplage de l'acide aminé à la résine.

Le Cs-Boc-acide aminé est repris par 20 ml de DMF et cette solution est additionnée à la résine. Le tout est laissé 60 heures à 50°C sous agitation. C'est pendant ce temps que le couplage a lieu selon la réaction :



La peptidyl-résine est ensuite lavée avec 100 ml de DMF, 50 ml de DMF / eau (V / V), 50 ml de DMF / éthanol et 50 ml de méthanol, avant d'être placée dans un dessiccateur pendant une nuit.

7.2. Autres étapes de la synthèse.

Elles se déroulent dans un réacteur qui possède :

- une ouverture apicale fermée par un bouchon au niveau de laquelle sont ajoutés TFA, DIEA, Boc-acide aminés ; c'est également par cette ouverture que les échantillons de résine nécessaires à la réalisation des tests colorimétriques sont prélevés;

- deux ouvertures basales commandées par un robinet deux voies ; l'une est reliée à une ampoule à décanter contenant du DCM, l'autre à un ballon servant de poubelle, derrière lequel est placée une trompe à eau permettant de faire le vide dans le réacteur et, par conséquent, tantôt d'y faire pénétrer du DCM, tantôt d'en évacuer la phase liquide qu'il contient (la résine étant retenue par le fond du réacteur qui est en verre fritté).

Ce réacteur est animé d'une rotation alternative par un moteur à couple faible.

7.2.1. Déprotection.

Le groupe Boc est complètement ôté par addition de :

- acide trifluoroacétique (TFA) 24 ml
- DCM qsp 60 ml.

Nous réalisons d'abord une incubation de 2 mn afin d'éviter une dilution éventuelle due au solvant utilisé précédemment et qui rendrait la déprotection moins efficace, puis une incubation de 30 mn. Nous effectuons ensuite 5 rinçages de 2 mn avec 25 ml de DCM.

7.2.2. Neutralisation.

Le sel α -aminé résultant est neutralisé à l'aide d'une amine tertiaire comme la diisopropyl éthyl amine (DIEA) :

- DIEA 2,5 ml
- DCM qsp 50 ml.

Nous réalisons une incubation de 2 mn qui est suivie d'une incubation de 10 mn. Nous effectuons ensuite 3 rinçages de 2 mn avec 25 ml de DCM.

7.2.3. Activation et couplage.

Le premier Boc-acide aminé est alors prêt à réagir avec le deuxième Boc-acide aminé lequel doit être activé pour que la liaison peptidique se réalise.

7.2.3.1. Méthode des anhydrides symétriques.

Le principe de cette activation qui est effectuée par addition de dicyclohexyle carbodiimide (DCCI) est décrit dans la figure 36-1. Le couplage s'effectue à l'aide de 2 charges successives en Boc-acide aminé.

D'abord, nous dissolvons 3 mmoles de Boc- acide aminé dans 15 ml de DCM et d'autre part, 1,5 mmoles de DCCI dans 5 ml de DCM et ces deux solutions sont placées à 4°C. Après 10 mn, nous les mélangeons et plaçons le mélange 30 mn à 4°C. Celui-ci est ensuite filtré sur de la laine de verre afin d'éliminer le précipité de dicyclohexylurée (DCU) et le filtrat est incubé avec la résine dans le réacteur pendant 30 mn. Quinze minutes après le début de cette incubation, nous ajoutons 150 µl de DIEA.

Lorsque cette première charge est terminée, la résine est rincée trois fois 2 mn avec 25 ml de DCM puis on la neutralise avec 25 ml de DIEA à 5 % dans le DCM pendant 10 mn. Puis une deuxième charge ne contenant qu'une millimole de Boc-acide aminé est réalisée. La résine est de nouveau rincée 5 fois avec du DCM.

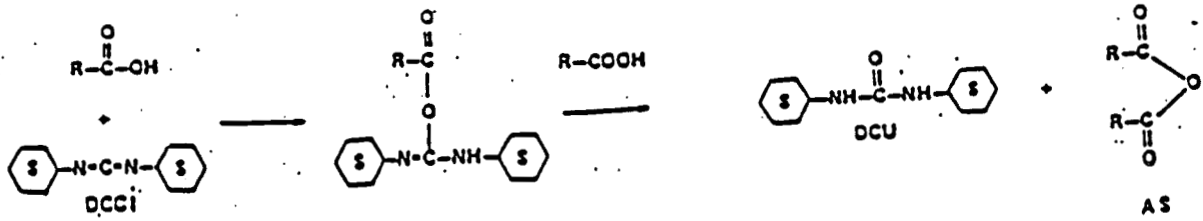
7.2.3.2. Méthode des esters activés.

Elle n'est utilisée que pour l'asparagine, la glutamine et l'arginine. Le DCCI entraîne l'apparition d'une fonction nitrile au sein de ces acides aminés à la suite de la déshydratation de leur fonction amide. L'addition préalable d'hydroxybenzotriazole (HOBt) empêche cette modification de la fonction amide (figure 36-2).

Dans ce cas, les deux charges sont réalisées pendant des temps plus longs (2 heures et 1 heure).

Les étapes de déprotection, neutralisation, activation et couplage sont réalisées successivement pour chacun des acides aminés qui composent le peptide, depuis l'extrémité C-terminale jusqu'à l'acide aminé situé à l'extrémité N-terminale. Lorsque le dernier acide aminé vient d'être couplé, seules les étape de déprotection et de neutralisation sont réalisées.

A



B

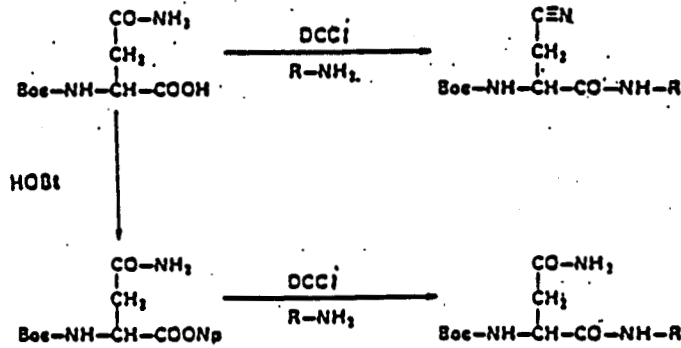


Figure 36 : activation des acides aminés selon la méthode des anhydrides symétriques (A) et des esters activés (B) d'après Merrifield en 1963.

DCCI = dicyclohexyle carbodiimide ; DCU = dicyclohexylurée ; AS = anhydride symétrique ; HOBt = hydroxybenzotriazole.

Un test colorimétrique (test de Christensen) permettant de vérifier l'accessibilité des fonctions NH₂ est réalisé après chaque déprotection et chaque couplage. Il consiste à ajouter à quelques grains de résine :

- 2 gouttes d'une solution contenant 500 mg de parachloranil pour 20 ml de toluène,

- 6 gouttes d'acétaldéhyde.

Après 5 mn à température ambiante, les grains de résine deviennent verts lorsque des fonctions NH₂ libres sont présentes (après déprotection) tandis qu'ils restent blancs si les fonctions NH₂ sont protégées par les groupements Boc (après couplage d'un nouvel acide aminé). Si le test n'est pas franchement négatif, un couplage supplémentaire avec le même acide aminé est de nouveau effectué ; si il n'est pas franchement positif, une nouvelle déprotection par le TFA est réalisée.

7.3. Coupure de la liaison peptide-résine.

Cette coupure se fait par l'acide fluorhydrique (HF). C'est une opération très délicate car cet acide doit être manipulé avec beaucoup de précautions. L'opération a lieu sous une hotte, l'acide est stocké dans une bouteille sous pression et il est manipulé grâce à une trompe à vide et par une alternance de réchauffement (son évaporation a lieu à 19°C) et refroidissement (par de l'azote liquide qui entraîne sa liquéfaction).

L'HF attaque non seulement la liaison peptide-résine, mais aussi les groupements protecteurs des chaînes latérales. L'attaque de ces derniers entraîne l'apparition d'ions (carbonium ...) qui vont pouvoir attaquer les résidus alkylables du peptide. Ces alkylations sont empêchées par l'addition préalable de " scavengers " qui sont du paracrésol et du thiocrésol.

Une fois le peptide synthétisé, la peptidyl-résine est placée dans un dessiccateur pendant 24 heures. Elle est ensuite pesée afin de déterminer proportionnellement les quantités de réactifs à utiliser.

La réaction a lieu pendant une heure à 0°C.

Une fois la coupure réalisée, la résine est lavée par de l'éther qui élimine les " scavengers ", elle est déposée sur un fritté pour y être rincée par de l'acide acétique à 5 % puis par de l'acide acétique à 50 %. Les fractions issues de ces 2 lavages sont récoltées séparément et lyophilisées. L'éluion par l'acide acétique 5 % entraîne la plus grande partie du peptide.

7.4. Purification.

Une fois séparé de la résine et lyophilisé, le peptide doit encore être purifié avant d'être injecté aux lapins. Pour le purifier, nous avons réalisé une chromatographie d'adsorption. Nous avons utilisé une colonne semi-préparative où la phase stationnaire est du nucléosyl C8 et où la phase mobile est constituée par un mélange de TFA (1 / 1000) et d'acétonitrile. Les proportions de ce mélange sont obtenues grâce à l'utilisation des deux pompes d'un appareil HPLC et peuvent être modifiées au cours du temps permettant ainsi la réalisation de gradients. La colonne est reliée à un détecteur (la liaison peptidique absorbe à 220 nm) et à un enregistreur. Plus le peptide est hydrophobe, plus il s'adsorbe sur la phase stationnaire et il doit être désorbé par un fort pourcentage d'acétonitrile. Ne connaissant pas les propriétés de notre peptide, nous avons d'abord utilisé un gradient 10-60% en acétonitrile et ce pendant 20 mn. A l'issue de la première injection (0,5 mg de peptide), nous constatons que le peptide est assez peu hydrophobe. Nous avons finalement utilisé un gradient 8-20 % en acétonitrile pendant 20mn avec lequel le temps de rétention du peptide est de 8,7 mn (figure 37). Une fois ces conditions optimales établies, nous injectons de plus grandes quantités de peptide (8 mg).

7.5. Couplage à l'ovalbumine.

Afin d'augmenter son antigénicité, le peptide est finalement couplé à une protéine porteuse (encore appelée " carrier "), en l'occurrence l'ovalbumine, avant d'être injecté au lapin.

7.5.1. Méthode au glutaraldéhyde.

Ce type de couplage intéresse les fonctions NH₂ et donc plus particulièrement les lysines. Il a été employé pour les peptides n° 1 et 3. Pour le réaliser, 0,3 µmoles d'ovalbumine et 12 µmoles de peptide (excès de 40 fois par rapport au carrier) sont reprises par 3 ml de tampon phosphate (PBS) à pH 7,4. Nous ajoutons ensuite, goutte à goutte, 1 ml de la glutaraldéhyde à 6 %. Le couplage a lieu à 4°C sous agitation pendant une heure. La réaction est stoppée par addition de borohydrure de sodium (5 mg dans 200 µl d'eau). Afin d'être concentrée, cette solution est ensuite filtrée sur une membrane " diaflo YM10" dont la taille des pores autorise le passage de protéines de poids moléculaire inférieur à 10 kDa. La solution concentrée (0,5 ml) est récoltée en vue d'un dosage d'albumine.

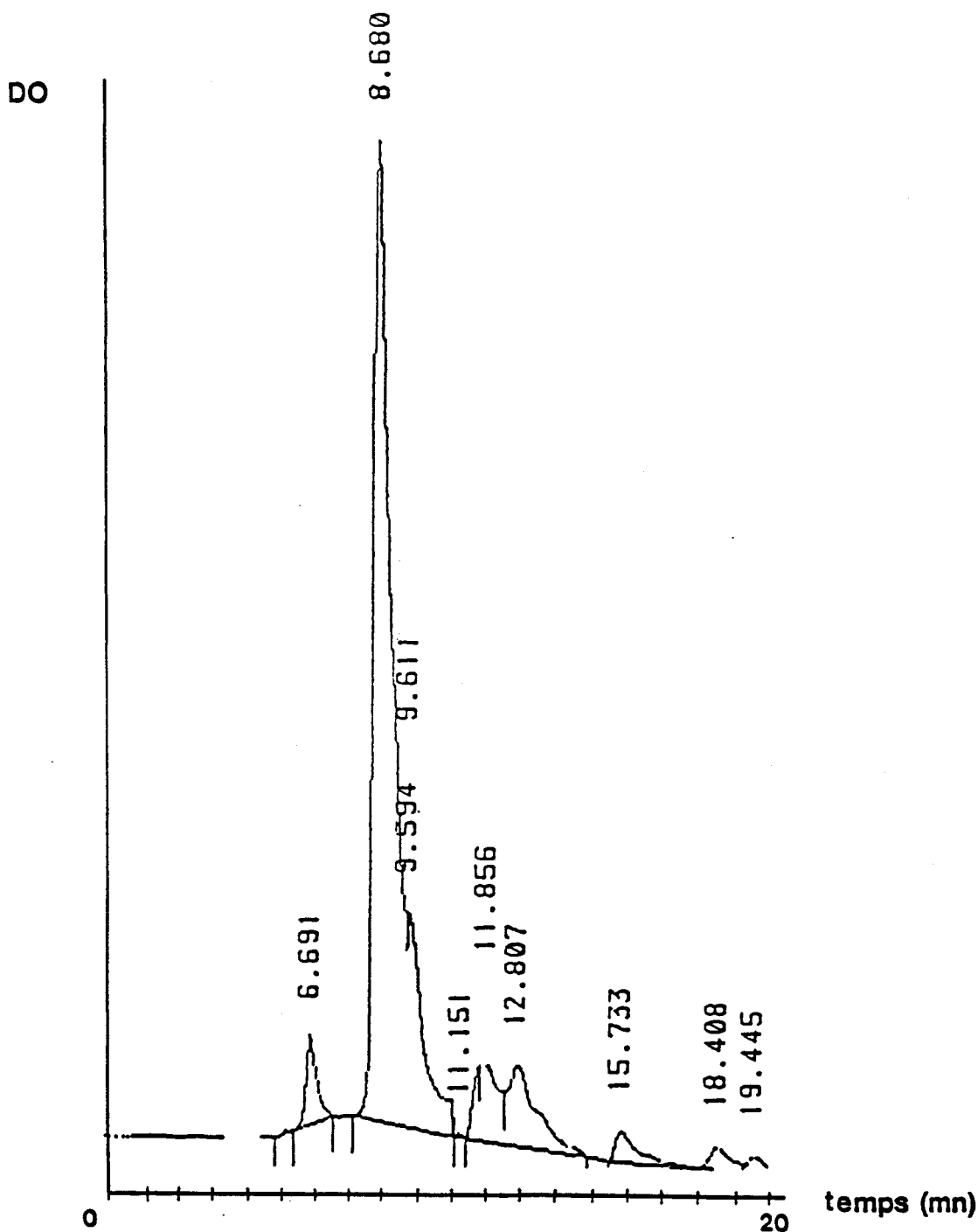


Figure 37 : chromatogramme illustrant le comportement du peptide n°2 après coupure HF lors d'une chromatographie sur colonne de nucléosyl C8 semi-préparative en utilisant un gradient 8-20% d'acétonitrile dans du TFA à 1/000 pendant 20mn.

Le temps de rétention du peptide est de 8,7 mn (pic majeur). L'éluat est collecté entre 7,8 et 9,2 mn.

La solution concentrée est ensuite dessalée sur une colonne de gel filtration ACA 202. Celle-ci est équilibrée avec du PBS à pH 7,4 et après dépôt de la solution, des fractions sont récoltées toutes les 2 mn (0,6 ml) pendant 40 mn. Puis le dosage d'albumine au vert de bromocrésol (VBC) est effectué sur ces fractions (25 µl d'échantillon + 700 µl de VBC 5 mn à l'obscurité et lecture à 600 nm). L'albumine se trouve principalement dans les tubes n° 7 à 13 que l'on rassemble et que l'on répartit en 6 doses qui serviront à 6 injections aux lapins.

7.5.2. Méthode au SMCC.

Le couplage des peptides au succinimidyl-4-(N-maleimido-méthyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) intéresse les groupements thiols des cystéines. Cette méthode a été employée pour les peptides n° 2 et 4.

La première étape est une réduction des groupements thiols des cystéines du peptide et s'effectue par le DTT (20 mM). Cette étape est suivie d'un dessalage sur GF 05.

Le SMCC est ensuite couplé à l'ovalbumine pendant 3 heures à 40°C (5 mg de SMCC pour 0,2 µmoles d'ovalbumine). Cette deuxième étape est suivie d'un dessalage sur ACA 202.

Le peptide est additionné à l'ovalbumine-SMCC et le mélange est placé à 0°C pendant 60 heures sous agitation.

7.6. Contrôles.

La conformité de la séquence ainsi que l'efficacité du couplage sont contrôlées par la détermination de la composition en acides aminés après hydrolyse acide totale (HCl 5,6 N pendant 72 heures à 110°C).

La figure 38 montre la composition en acides aminés issue de l'hydrolyse acide totale de la peptidyl-résine.

ACIDES AMINES	QUANTITE	% CALCULE	% THEORIQUE
Ac. Aspartique	537	21,7	22,2
OH proline			
Thréonine	133	5,4	5,6
Sérine	241	9,8	11,1
Asparagine			
Ac. Glutamique			
Glutamine			
Proline			
Glycine	687	27,8	27,8
Alanine	357	14,4	11,1
Valine			
Cystine	19		1
Méthionine			
Isoleucine			
Leucine			
Tyrosine			
Phénylalanine			
Lysine	517	20,9	22,2
Histidine			
Tryptophane			
Arginine			

Figure 38 : composition en acides aminés après hydrolyse acide totale du peptide n°2 avant coupure par l'acide fluorhydrique.

La détermination de la composition en acides aminés est basée sur une chromatographie d'échange d'ions. Les colonnes sont étalonnées avec des quantités données d'acides aminés connus. Chaque acide aminé a un temps de rétention propre et lorsque le mélange complexe issu de l'hydrolyse est analysé, la nature et la quantité des acides aminés qu'il renferme sont déterminées par rapport au chromatogramme étalon.

Les quantités sont ici exprimées en nanomoles par mg de peptidyl-résine ; le pourcentage de chaque acide aminé est ensuite calculé en ne tenant pas compte des acides aminés dégradés et il est comparé au pourcentage théorique qui découle de la séquence du peptide synthétisé.

7.7. Immunisation des lapins.

Les fractions contenant 2 mg de matériel antigénique sont émulsionnées dans une solution contenant 500 µl d'adjuvant complet de Freund et 500 µl de sérum physiologique. Trente à quarante injections intradermiques sont réalisées avec, lors de la première injection, des injections complémentaires d'une dose de vaccin contre le BCG et d'une dose de vaccin antitétanique, afin de stimuler les réactions immunologiques. Deux semaines plus tard, puis chaque mois, l'animal reçoit des injections de rappel avec de l'adjuvant incomplet de Freund. La première saignée est réalisée deux mois après la première injection et les autres saignées, 6 jours après chaque rappel.

8. Culture des cellules SK-N-SH.

8.1. Détachement.

Dans un flacon de culture Corning de 25 cm², lorsque les cellules arrivent à confluence, le milieu est ôté et 0,5 ml d'une solution sans calcium ni magnésium sont ajoutés, afin de les détacher de leur substrat.

Solution sans calcium ni magnésium (pH 7,5):

EDTA	1,5 g
NaCl	8 g
KCl	0,4 g
NaHPO ₄	0,1 g
Tris	3 g
H ₂ O	qsp 1000 ml.

Après avoir fait circuler cette solution sur toute la surface du fond du flacon pendant une à deux minutes, nous détachons les cellules en donnant des coups secs avec la paume de la main sur les côtés du flacon ; les cellules se détachent alors par grappes qui apparaissent blanches à l'oeil nu et le bon déroulement de cette opération peut être suivi par une observation du flacon au microscope inversé. Nous ajoutons ensuite 4,5 ml de milieu de culture contenant 10 % de sérum de veau foetal (SVF) et les cellules sont homogénéisées à l'aide d'une pipette Pasteur (50 aspirations environ). La dissociation des cellules est elle aussi suivie au microscope inversé.

Les cellules ainsi détachées et dissociées, peuvent être congelées en vue d'une utilisation ultérieure, ou réensemencées soit afin de poursuivre leur prolifération soit afin de subir une différenciation.

8.2. Congélation.

Les cellules détachées et dissociées sont centrifugées à faible vitesse (1500 trs.mn-1) pendant 5 mn. Le surnageant est ôté et le culot est remis en suspension à l'aide d'une pipette dans 1 ml d'une solution contenant 90 % de SVF et 10 % de DMSO et cette suspension cellulaire est placée dans un tube à congélation. Ce tube est laissé 24 heures à -70°C puis il est placé dans un conteneur à azote liquide.

8.3. Repiquage.

8.3.1. Prolifération.

Les cellules détachées et dissociées sont repiquées dans d'autres flacons de culture. Les cellules issues d'un flacon de 25 cm² confluent sont repiquées dans 3 nouveaux flacons de 25 cm². Les comptages à la cellule de Malassez donnent les résultats suivants:

- un flacon confluent contient environ $12 \cdot 10^6$ cellules,
- $4 \cdot 10^6$ cellules environ sontensemencées lors des repiquages.

Une cellule de Malassez est une lame de verre sur le fond de laquelle apparaissent des quadrillages correspondant à $10^{-2} \mu\text{l}$. Il suffit d'y déposer une lamelle de verre, d'insérer entre la lame et la lamelle la suspension cellulaire à analyser, et de compter les cellules en observant la préparation au microscope inversé. Les comptages sont réalisés sur dix quadrillages et la moyenne est calculée. Celle-ci correspond donc au nombre de cellules contenues dans le volume défini par le quadrillage et il suffit de multiplier ce chiffre par 10^5 pour obtenir le nombre de cellules par ml de milieu.

Avant d'effectuer ce comptage, 10 % de bleu trypan est ajouté à l'échantillon de suspension à analyser. Celui-ci pénètre dans les cellules mortes qu'il colore en bleu et permet donc de ne prendre en compte que les cellules vivantes.

Le milieu de prolifération est le suivant :

SVF décomplémenté	10 ml
L-glutamine (200 mM)	1 ml
AA-non essentiels	1 ml
Fungizone (5 mg/ml)	50 μl
MEM avec sels de Earle (x1 et contenant 2,2 g/l de NaHCO ₃)	qsp 100 ml.

La décomplémentation du SVF est obtenue par chauffage à 56 °C pendant 1/2 heure.

Les cellules sont cultivées dans un incubateur à 37°C en atmosphère humide contenant 5 % de CO₂.

8.3.2. Différenciation.

Les cellules qui ont proliféré jusqu'à confluence sont détachées et dissociées comme précédemment décrit. Les cellules issues d'un flacon de 25 cm² confluent sont repiquées dans 6 nouveaux flacons de 25 cm² (2 . 10⁶ cellules par flacon).

La constitution du milieu de différenciation est la suivante :

SVF décomplémenté	2 ml
L-glutamine (200 mM)	1 ml
AA-non essentiels	1 ml
Fungizone (5 mg/ml)	50 µl
Acide rétinoïque (1,65 . 10 ⁻² M).	60 µl
MEM avec sels de Earle (x1 et contenant 2,2 g/l de NaHCO ₃)	qsp 100 ml.

Pour la solution d'acide rétinoïque, 100 mg de " all trans retinoic acid de type XX " (Sigma) sont repris dans 20 ml d'éthanol. En ajoutant 60 µl de cette solution à 100 ml de milieu, la proportion d'éthanol est de 0,06 % et n'est pas toxique.

8.3.3. Milieu défini.

Lorsque nous voulons tester certains produits sur les cellules SK-N-SH, nous passons à un milieu défini où le SVF est remplacé par 1 ml d'une solution contenant insuline (0,5 mg / ml), transferrine (0,5 mg / ml) et sélénium (0,5 µg / ml) (Sigma).

9. Coloration des cellules au violet cristallin.

La solution de violet cristallin est constituée par :

Violet cristallin	2 g
Formol à 30 %	100 ml
Méthanol	720 ml
H ₂ O	qsp 1000 ml.

Quelques gouttes de cette solution sont déposées sur les cellules pendant 30 s puis les boîtes sont rincées abondamment à l'eau distillée avant d'être observées au microscope.

10. Ecrasements tissulaires ou "squashes".

Après qu'elles aient été détachées et dissociées, les cellules sont centrifugées à faible vitesse (voir les paragraphes 7.1. et 7.2.). Les surnageants sont éliminés et les culots sont fixés pendant 5 mn dans une solution contenant 5 ml d'acide acétique à 30 %, 10 ml de formol et 85 ml d'alcool 95. Les culots sont ensuite détachés et découpés en petits morceaux que l'on écrase dans une goutte d'acide acétique à 45 %, entre deux lames de verre légèrement chauffées. L'ensemble des deux lames est refroidi pendant un temps minimum de 15 mn à -70°C, puis les lames sont séparées, lavées à l'éthanol 100° et séchées. Après collodionnage, les squashes sont hydrolysés pendant 1h30 dans HCl 5N puis colorés par la méthode de Feulgen (réactif de Schiff 30 mn à l'obscurité, eau courante 5 mn, eau distillée 5 mn, métabisulfite de sodium 3 fois 2 mn, eau distillée 1 mn). Les préparations sont ensuite déshydratées (éthanol 50° - 5 mn, éthanol 70° - 5 mn, éthanol 95° - 5 mn, éthanol 100° - 2 fois 5 mn, Toluène - 3 fois 5 mn) et montées.

11. Analyse d'images.

L'analyseur d'images que nous avons utilisé, le SAMBA 200 (TITN-Thomson) est un Système d'Analyse Microscopique à Balayage Automatique. Il est composé de :

- un capteur électro-optique, intégrant un microscope qui assure l'exploration des préparations à l'aide d'une platine motorisée en X, Y et Z, ainsi que l'acquisition des images ;

- un processeur de traitement et d'analyse comportant le module de commande et de contrôle des capteurs, ainsi que le module de traitement et d'analyse des images ;

- un processeur d'applications analyse les données et gère les applications ; il constitue l'interface entre l'utilisateur et le système (figure 39).

L'exploration des préparations et l'acquisition des images s'effectuent en deux temps.

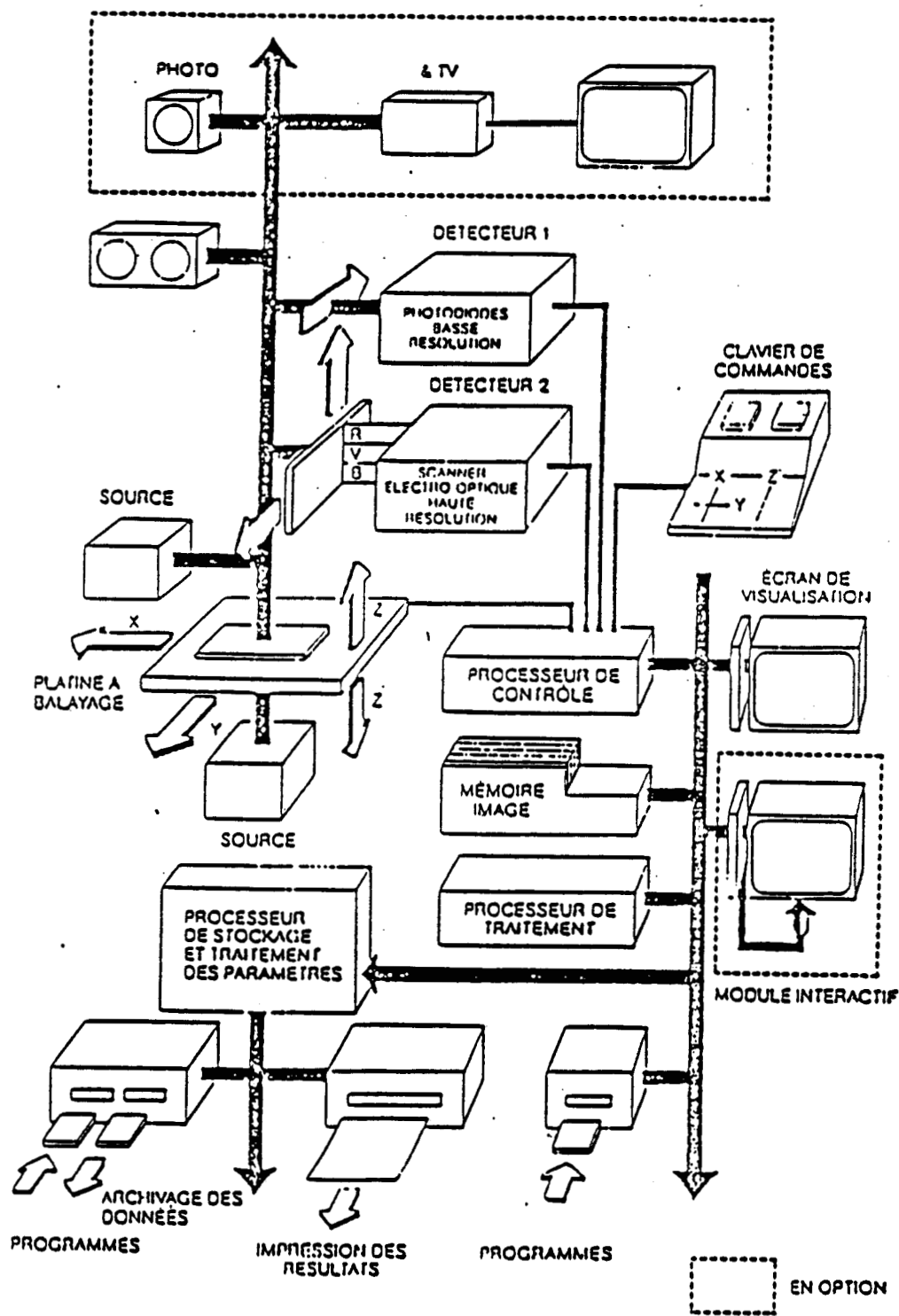


Figure 39 : schéma fonctionnel du SAMBA 200 d'après Brugal et coll. en 1985.

Tout d'abord, une exploration à basse résolution d'une portion de la préparation est réalisée par l'analyse de champs élémentaires disposés en lacets. Les objets se trouvant dans ces champs élémentaires sont détectés par segmentation de l'image à l'aide d'un seuil bas et d'un seuil haut de densité optique (niveaux de gris des points d'images).

Les objets dont la surface et la forme correspondent aux critères fixés par l'opérateur sont sélectionnés et leurs coordonnées X, Y et Z sont mémorisées en vue de leur analyse à haute résolution.

Dans un deuxième temps, une fenêtre dans laquelle sont centrés successivement les objets sélectionnés au cours de la phase précédente, subit une exploration à haute résolution. Elle est à la fois spatiale et photométrique ; elle s'effectue à travers un filtre vert à bande large. Au terme de celle-ci, 18 paramètres sont calculés.

Ces caractères peuvent être :

- morphométriques (surface, périmètre ...),
- texturaux (ces paramètres mesurent la distribution des niveaux de gris dans le noyau par référence au degré d'hétérogénéité et au caractère de la répartition de la chromatine),
- densitométriques.

Ces derniers sont ceux qui ont retenu notre attention car c'est la densité optique intégrée qui mesure la quantité d'ADN nucléaire (exprimée en unités arbitraires).

L'analyse de données peut-être appliquée aux paramètres recueillis sur chaque noyau repéré grâce aux programmes implantés dans le processeur d'applications.

12. Microscopie électronique à balayage.

Les cellules sont cultivées à faible densité ($12 \cdot 10^4$ cellules par boîte) sur des lamelles de verre qui sont déposées sur le fond de boîtes de culture rondes de $9,6 \text{ cm}^2$ de surface.

Les cellules sont fixées pendant 35 mn à 4°C dans du MEM contenant 2,5 % de glutaraldéhyde. Puis elles sont lavées pendant une heure avec du tampon Millonig 0,1 M à pH 7,2. Nous réalisons ensuite une post-fixation pendant 30 mn dans du tampon Millonig contenant 1 % de tétroxyde d'osmium (le tampon Millonig est obtenu en mélangeant une solution contenant 71,6 g/l de $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$ et une solution de 31,2 g/l de $\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ dans les proportions 3/1 afin d'obtenir un pH égal à 7).

Les préparations sont ensuite déshydratées par passages successifs dans des bains d'éthanol de degrés croissants (voir paragraphe 9.).

Pour l'observation en microscopie électronique à balayage, la lamelle doit être conductrice. Pour cela, elle est métallisée par pulvérisation d'une fine couche d'or à sa surface. Cette opération est réalisée à l'aide d'un métallisateur POLARON - série II ("cool" sputtering system type E5100). Le principe est le suivant : la décharge d'un gaz inerte tel que l'argon sous pression réduite (< 1 mbar) et sous haute tension donne naissance à un faisceau d'ions qui bombardent la cathode en or. Ceci a pour effet d'arracher des atomes de la cathode puis, par chocs répétés, ces atomes sont fortement déviés et il se crée un nuage d'atomes qui se déposent sur les parois et sur la lamelle qui est placée à proximité de l'anode (figure 40). Pour que le dépôt soit de bonne qualité, il est nécessaire que l'atmosphère soit dépourvue d'eau, de CO₂ et d'O₂.

Les lamelles sont ensuite observées à l'aide d'un microscope à balayage JEOL JSM-840.

13. Microscopie électronique à transmission.

Des culots de cellules SK-N-SH constituent ici le point de départ (voir les paragraphes 7.1. et 7.2.). Ils sont fixés et déshydratés d'une manière tout à fait identique à celle qui est décrite ci-dessus pour les cellules poussant sur lamelles. Après deux bains de 10 mn dans l'oxyde de propylène, les culots sont fragmentés et placés dans une solution contenant 40 % d'oxyde de propylène et 60 % d'épon (2 fois 30 mn) et enfin dans l'épon pur (12 heures). Les fragments sont ensuite répartis dans des gélules qui sont placées à 60°C pendant au moins une nuit. Une fois solidifiées, les gélules peuvent être conservées jusqu'à la réalisation des coupes.

Les coupes sont effectuées à l'aide de l'ultra-microtome LKB III. Elles sont recueillies sur des grilles en cuivre recouvertes d'une membrane Pioloform F et examinées à l'aide du microscope électronique ZEISS EM 10 CR.

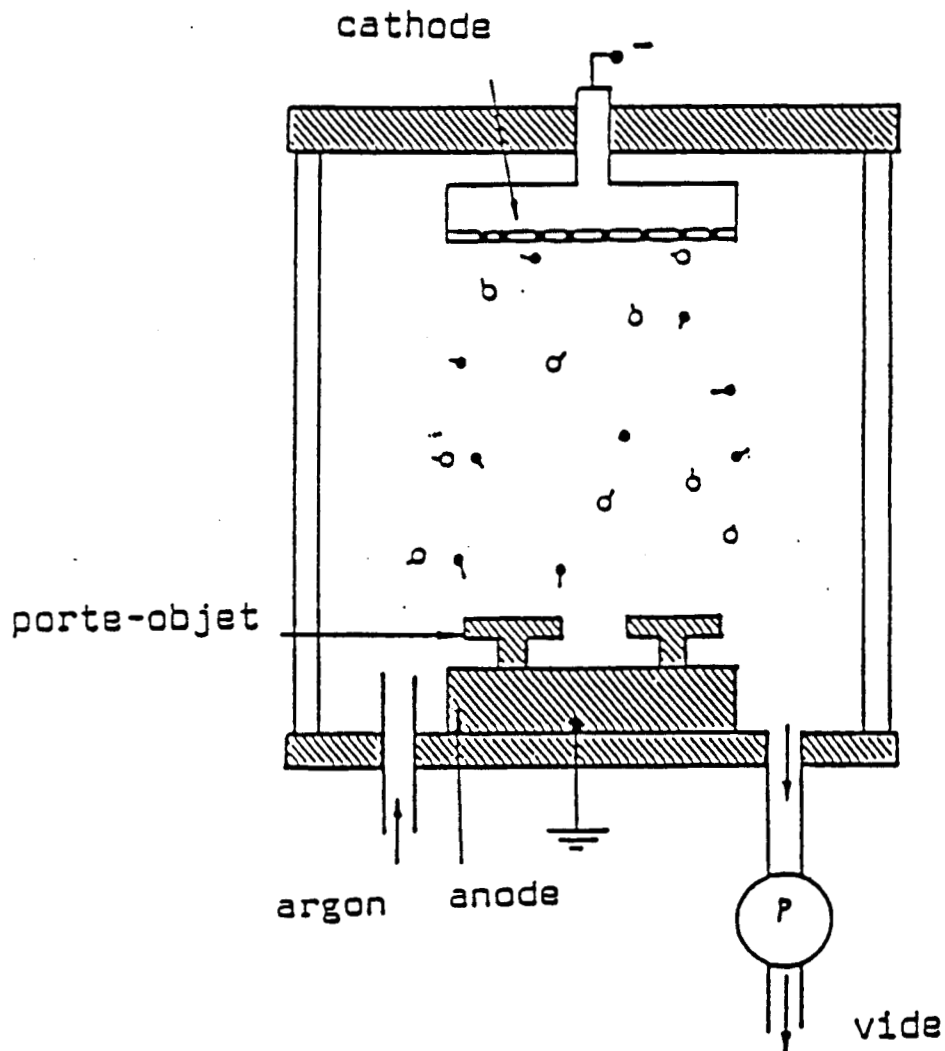
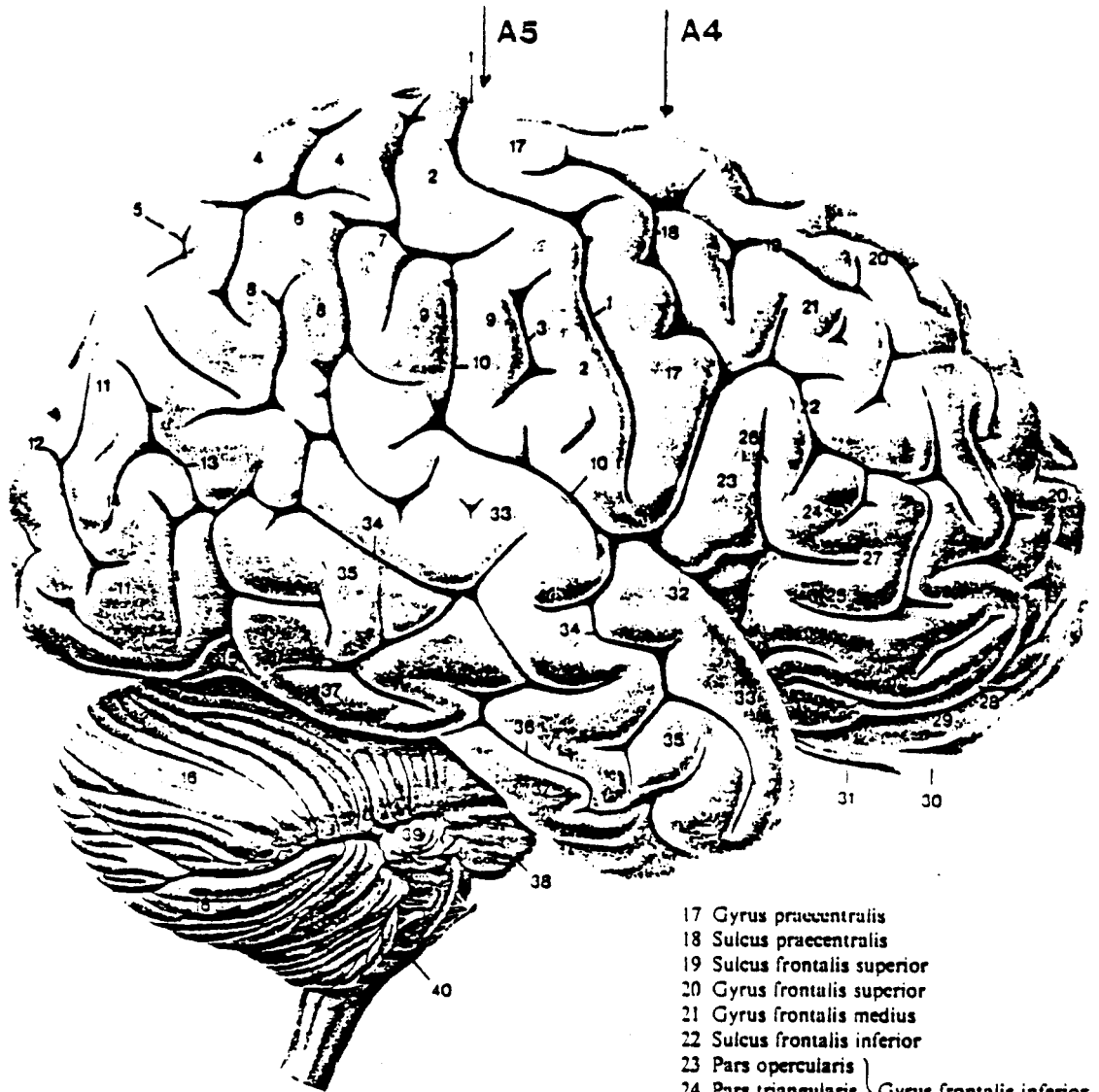


Figure 40 : schéma de la métallisation des lames en vue de l'observation en microscopie électronique à balayage.

- σ atome de métal arraché à la cathode ;
- ρ particules ionisées.

Annexes.

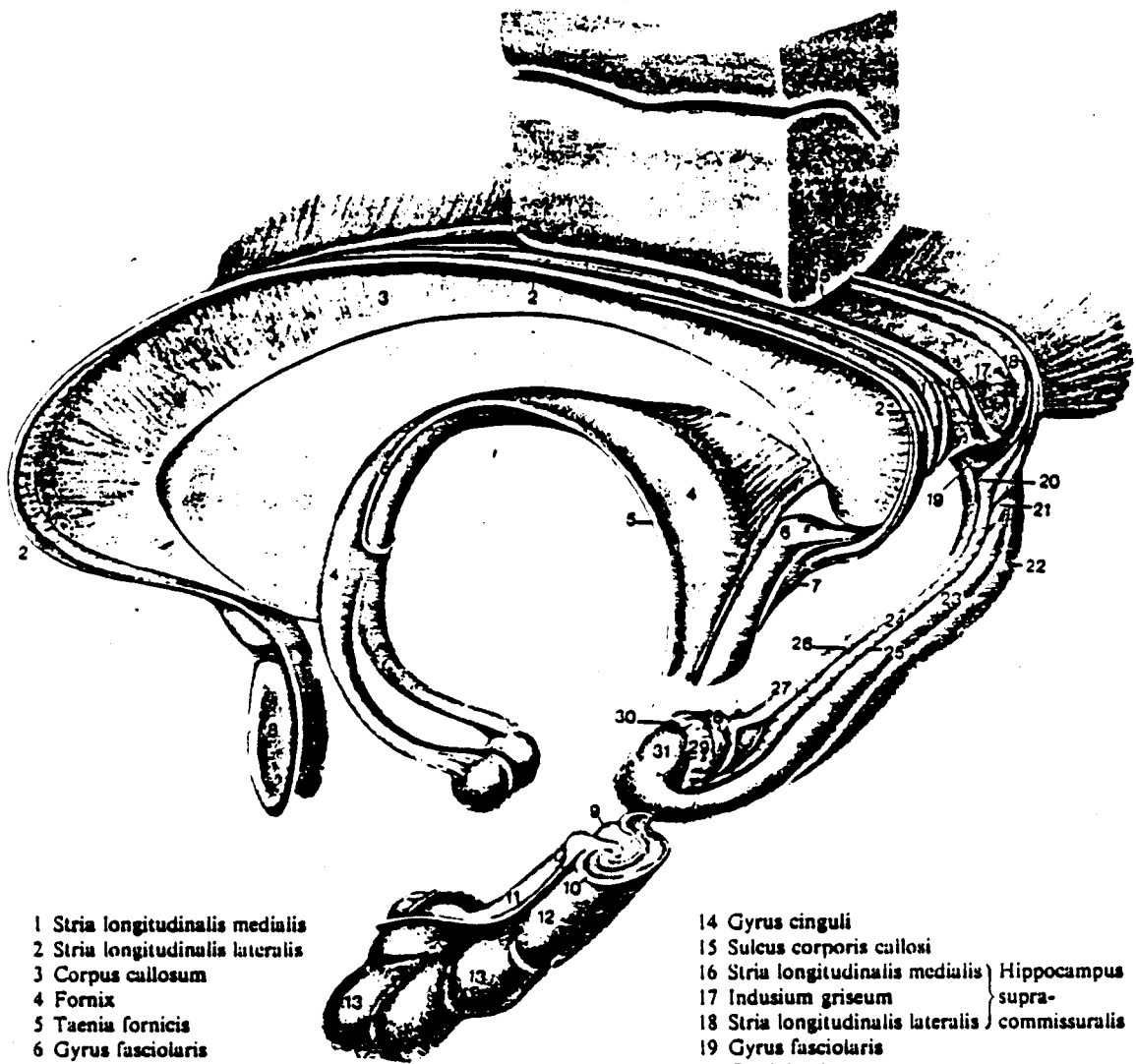


- 1 Sulcus centralis
- 2 Gyrus postcentralis
- 3 Sulcus postcentralis
- 4 Lobulus parietalis superior
- 5 Sulcus parieto-occipitalis
- 6 Lobulus parietalis inferior
- 7 Sulcus intraparietalis
- 8 Gyrus angularis
- 9 Gyrus supramarginalis
- 10 Sulcus lateralis, ramus posterior
- 11 Gyri occipitales
- 12 Sulcus lunatus
- 13 Sulcus occipitalis anterior
- 14 Sulci occipitales
- 15 Incisura praecoccipitalis
- 16 Hemisphaerium cerebelli

- 17 Gyrus praecentralis
- 18 Sulcus praecentralis
- 19 Sulcus frontalis superior
- 20 Gyrus frontalis superior
- 21 Gyrus frontalis medius
- 22 Sulcus frontalis inferior
- 23 Pars opercularis
- 24 Pars triangularis
- 25 Pars orbitalis
- 26 Sulcus lateralis, ramus ascendens
- 27 Sulcus lateralis, ramus anterior
- 28 Sulci orbitales
- 29 Gyri orbitales
- 30 Bulbus olfactorius
- 31 Tractus olfactorius
- 32 Sulcus lateralis
- 33 Gyrus temporalis superior
- 34 Sulcus temporalis superior
- 35 Gyrus temporalis medius
- 36 Sulcus temporalis inferior
- 37 Gyrus temporalis inferior
- 38 Pons
- 39 Flocculus
- 40 Medulla oblongata

Annexe 1 : vue latérale du cerveau (x1).

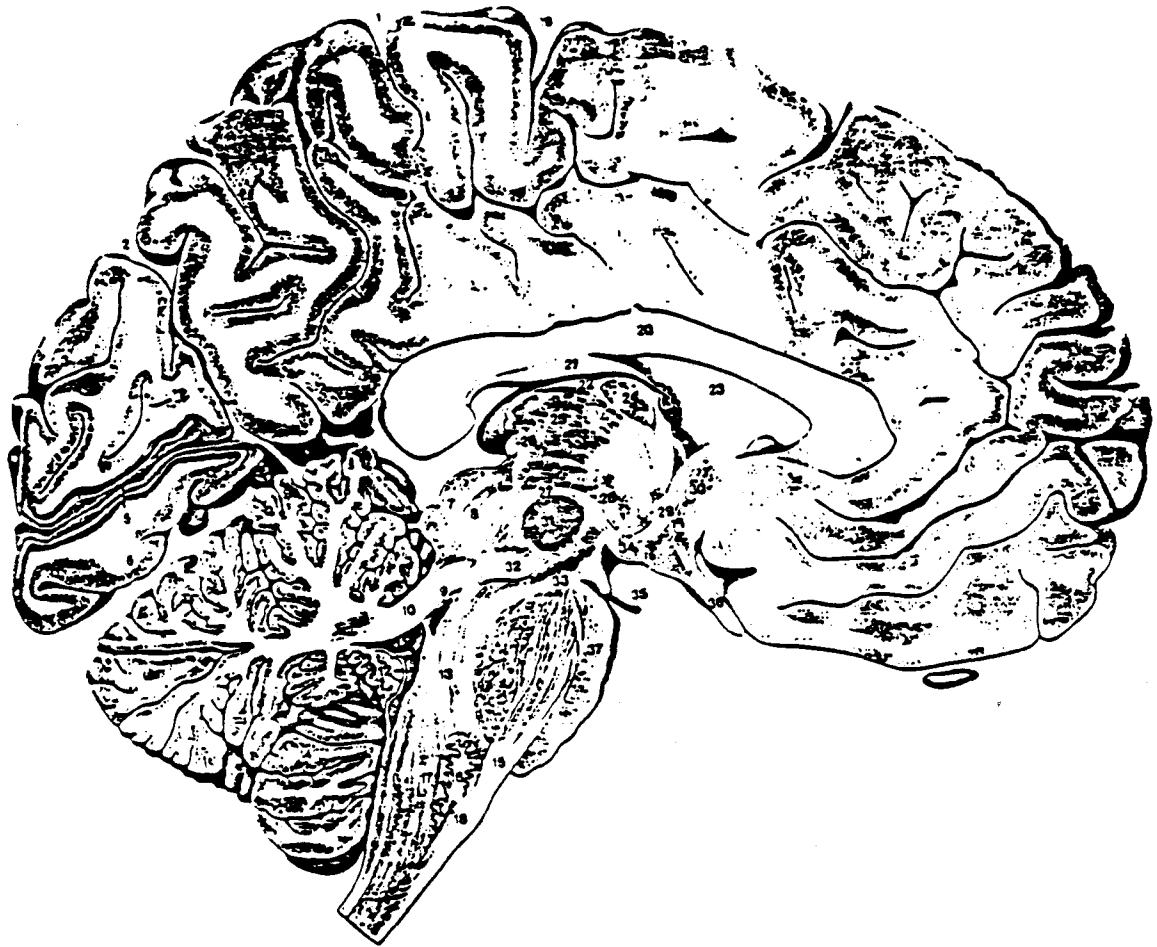
A4 et A5 indiquent les niveaux où ont été réalisées les coupes présentées en annexes 4 et 5 - (d'après " The human central nervous system ").



- 1 Stria longitudinalis medialis
- 2 Stria longitudinalis lateralis
- 3 Corpus callosum
- 4 Fornix
- 5 Taenia fornix
- 6 Gyrus fasciolaris
- 7 Gyri Andreae Retzii
- 8 Hippocampus praecommissuralis
- 9 Gyrus dentatus
- 10 Alveus hippocampi
- 11 Fimbria hippocampi
- 12 Cornu ammonis
- 13 Digitationes hippocampi

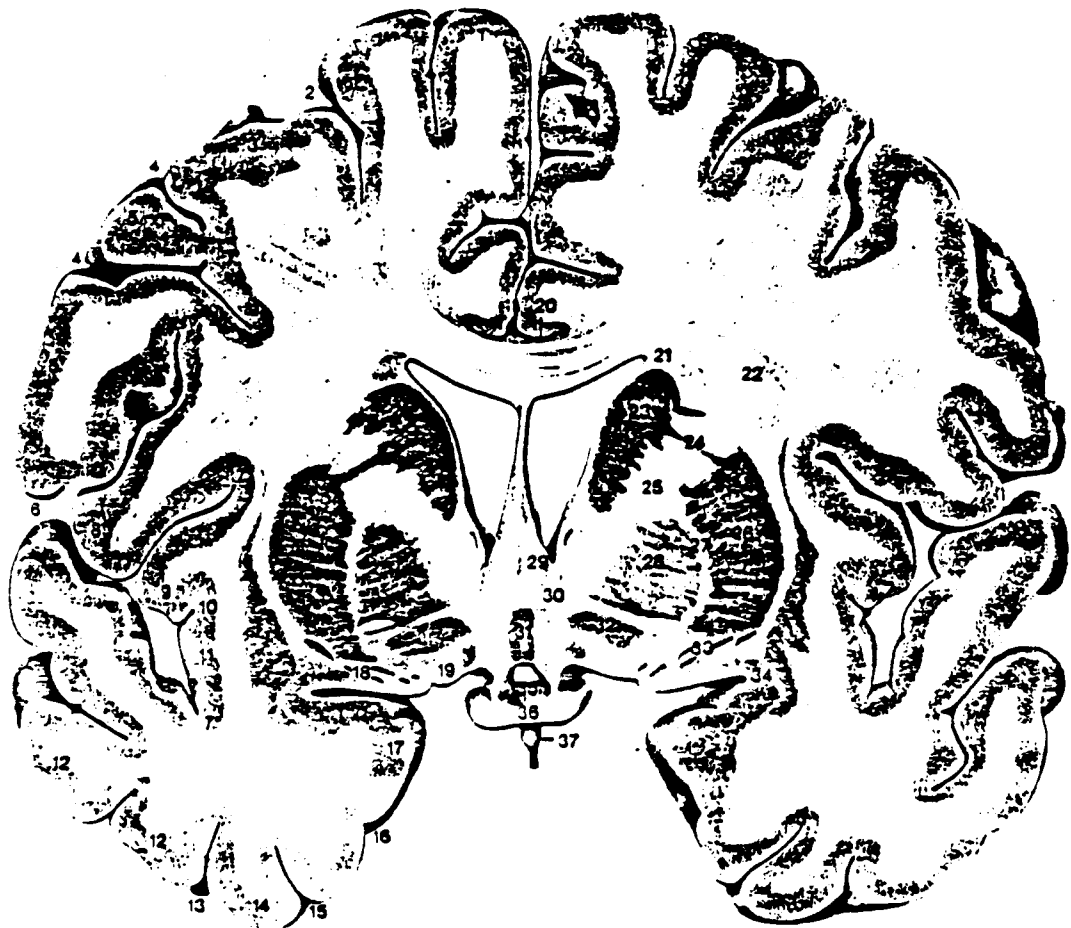
- 14 Gyrus cinguli
- 15 Sulcus corporis callosi
- 16 Stria longitudinalis medialis } Hippocampus supra-
- 17 Indusium griseum } commissuralis
- 18 Stria longitudinalis lateralis }
- 19 Gyrus fasciolaris }
- 20 Fasciola cinerea } Hippocampus retro-
- 21 Gyri Andreae Retzii } commissuralis
- 22 Cornu ammonis }
- 23 Subiculum } Hippocampus retro-
- 24 Gyrus dentatus } commissuralis
- 25 Sulcus hippocampi
- 26 Sulcus fimbriodentatus
- 27 Fimbria hippocampi
- 28 Gyrus intralimbicus
- 29 Limbus Giacomini
- 30 Sulcus hippocampi
- 31 Gyrus uncinatus

Annexe 2 : dissection montrant l'hippocampe et ses relations avec quelques autres structures. Vue oblique (x 2) - (d'après " The human central nervous system ").



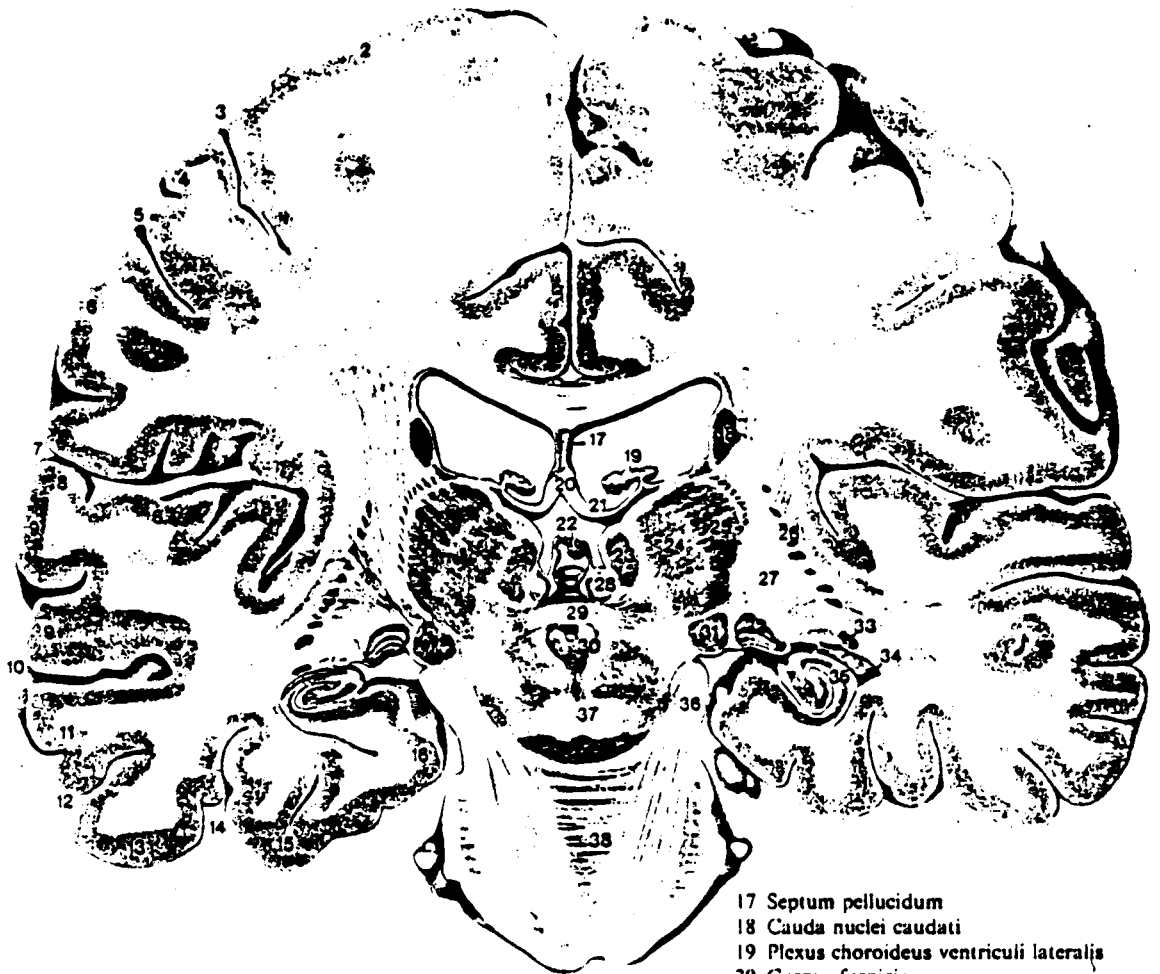
- | | |
|--|---|
| 1 Sulcus postcentralis | 19 Sulcus paracentralis |
| 2 Sulcus parieto-occipitalis | 20 Corpus callosum |
| 3 Cuneus | 21 Corpus fornicis |
| 4 Area striata | 22 Stria medullaris thalami |
| 5 Sulcus calcarinus | 23 Ventriculus lateralis |
| 6 Gyrus occipitotemporalis medialis | 24 Nucleus anterior thalami |
| 7 Lamina quadrigemina | 25 Nucleus medialis thalami |
| 8 Tegmentum mesencephali | 26 Nuclei habenulae |
| 9 Locus coeruleus | 27 Tractus mamillo-tegmentalis |
| 10 Pedunculus cerebellaris superior | 28 Tractus mamillo-thalamicus |
| 11 Ventriculus quartus | 29 Columna fornicis |
| 12 Tela choroidea ventriculi quarti | 30 Commissura anterior |
| 13 Tractus tegmentalis centralis | 31 Nucleus ruber |
| 14 Tonsilla cerebelli | 32 Decussatio pedunculorum cerebellarium superiorum |
| 15 Pyramis | 33 Substantia nigra |
| 16 Nucleus olivaris inferior | 34 Corpus mamillare |
| 17 Nucleus olivaris accessorius dorsalis | 35 Nucleus oculomotorius |
| 18 Nucleus olivaris accessorius medialis | 36 Chiasma opticum |
| | 37 Pons |

Annexe 3 : coupe parasagittale passant par le corps mamillaire, le noyau rouge et le fornix (x 6/5) - (d'après " The human central nervous system ").



- | | |
|--|--|
| 1 Gyrus frontalis superior | 20 Indusium griseum |
| 2 Sulcus frontalis superior | 21 Stratum subependymale |
| 3 Gyrus frontalis medius | 22 Corona radiata |
| 4 Sulcus praecentralis | 23 Caput nuclei caudati |
| 5 Gyrus praecentralis | 24 Pontes grisei caudatolenticulares |
| 6 Sulcus lateralis, ramus posterior | 25 Capsula interna, crus anterior |
| 7 Sulcus circularis insulae | 26 Putamen |
| 8 Gyrus frontalis inferior, pars opercularis | 27 Lamina medullaris lateralis |
| 9 Gyri breves insulae | 28 Globus pallidus |
| 10 Sulcus centralis insulae | 29 Columna fornicis |
| 11 Gyrus longus insulae | 30 Commissura anterior |
| 12 Gyrus temporalis medius | 31 Lamina terminalis |
| 13 Sulcus temporalis inferior | 32 Substantia innominata |
| 14 Gyrus occipitotemporalis lateralis | 33 Arteria cerebri media, rami striati |
| 15 Sulcus collateralis | 34 Stria olfactoria lateralis |
| 16 Sulcus rhinalis | 35 Recessus opticus |
| 17 Gyrus parahippocampalis | 36 Chiasma opticum |
| 18 Substantia perforata anterior | 37 Infundibulum |
| 19 Gyrus diagonalis | |

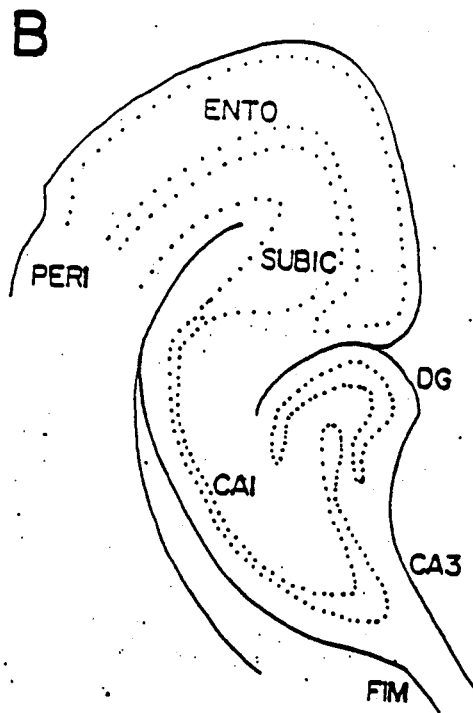
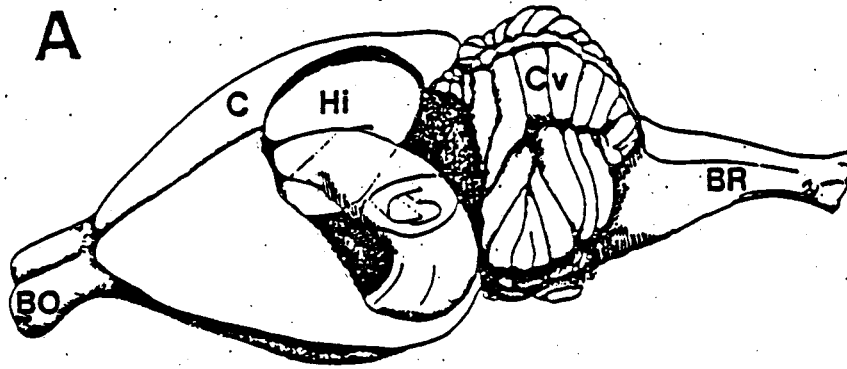
Annexe 4 : coupe frontale passant par la commissure antérieure et le chiasma optique (x 6/5) - (d'après " The human central nervous system ").



- 1 Lobulus paracentralis
- 2 Gyrus praecentralis
- 3 Sulcus centralis
- 4 Gyrus postcentralis
- 5 Sulcus postcentralis
- 6 Lobulus parietalis inferior
- 7 Sulcus lateralis, ramus posterior
- 8 Gyri temporales transversari (Heschl)
- 9 Gyrus temporalis superior
- 10 Sulcus temporalis superior
- 11 Gyrus temporalis medius
- 12 Sulcus temporalis inferior
- 13 Gyrus temporalis inferior
- 14 Sulcus occipitotemporalis
- 15 Gyrus occipitotemporalis lateralis
- 16 Gyrus parahippocampalis

- 17 Septum pellucidum
- 18 Cauda nuclei caudati
- 19 Plexus choroideus ventriculi lateralis
- 20 Corpus fornix
- 21 Crus fornix
- 22 Plexus choroideus ventriculi tertii
- 23 Nucleus medialis thalami
- 24 Nuclei pulvinares
- 25 Nucleus lateralis posterior
- 26 Pontes grisei caudatolenticulares
- 27 Capsula interna, pars retrolenticularis
- 28 Nuclei habenulae
- 29 Commissura posterior
- 30 Aqueductus cerebri
- 31 Corpus geniculatum mediale
- 32 Corpus geniculatum laterale
- 33 Cauda nuclei caudati
- 34 Ventriculus lateralis, cornu inferius
- 35 Hippocampus
- 36 Pedunculus cerebri
- 37 Decussatio pedunculorum cerebellarium superiorum
- 38 Pons

Annexe 5 : coupe frontale passant par la partie postérieure du thalamus (x 6/5) -
(d'après " The human central nervous system ").



Annexe 6 : A - schéma de l'hippocampe de rat exposé *in situ*.

BO = bulbe olfactif ; C = cortex ; Hi = hippocampe ; Cv = cervelet ; BR = bulbe rachidien.

B - relations entre l'hippocampe proprement dit (CA1-CA4), gyrus denté (DG), subiculum (SUBIC), Fimbria (FIM) et les aires entorhinales (ENTO) et périhinales (PERI) chez le rat.

Bibliographie.

" Maladie d'Alzheimer ". Fondation Ipsen 1989. Préface de Jean-Louis Signoret.
4ème édition. Editions Générale Graphique.

" La maladie d'Alzheimer et ses limites ". Rapport de neurologie présenté à Chambéry
les 13-17 juin 1988 par Didier Leys et Henri Petit avec la collaboration d'André
Delacourte, lors du congrès de psychiatrie et de neurologie de langue française.
Editions Masson.

" La maladie d'Alzheimer " par Olivier Guard et Bernard Michel. Editions
Medsa/McGraw-Hill 1989.

" The human central nervous system ". A synopsis and Atlas. R. Nieuwenhuys, J.
voogd, Ch. Van Huijzen. Editions Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New-York
1981.

Abemayor E., Sidell N. (1989) Human neuroblastoma cell lines as models for the in vitro study of neoplastic and neuronal cell differentiation. *Env. Health Persp.* 80 : 3-15.

Abraham C.R., Selkoe D.J., Potter H. (1988) Immunological identification of the serine protease inhibitor alpha-1-antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Cell* 52 : 487-501.

Anderson J.M., Hubbard G.R., Coghill G.R., Slidders W. (1983) The effect of advanced old age on the neuron content of the cerebral cortex : observations with an automatic image analyzer point counting method. *J. Neurol. Sci.* 58 : 235-246.

Anderton B.H., Breinburg D., Downes M.J., Green P.J., Tomlinson B.E., Ulrich J., Wood J.N., Kahn J. (1982) Monoclonal antibodies show that neurofibrillary tangles and neurofilaments share antigenic determinants. *Nature* 298 : 84-86.

Arendt T., Bigl V., Tennstedt A., Arendt A. (1984) Correlation between cortical plaque count and neuronal loss in the nucleus basalis in Alzheimer's disease. *Neurosci.Lett.* 48 : 81-85.

Ball M.J. (1983) Granulovacuolar degeneration. Dans "Alzheimer's disease : the standard reference." Reisberg B. éd. The Free Press. New-York. 62-68.

Baudier J., Cole R.D. (1987a) Phosphorylation of tau proteins to a state like that in Alzheimer's brain is catalyzed by a calcium/calmodulin-dependent kinase and modulated by phospholipids. *J. Biol. Chem.* 262 : 17577-17583.

Baudier J., Lee S-H., Cole R.D. (1987b) Separation of the different microtubule-associated tau protein species from bovine brain and their mode II phosphorylation by Ca^{2+} /phospholipid-dependent protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 262 : 17584-17590.

Baudier J., Mochly-Rosen D., Newton A., Lee S-H., Koshland D.E., Cole R.D. (1987c) Reinvestigation of the sulfhydryl reactivity in bovine brain S100b ($\beta\beta$) protein and the microtubule associated Tau Proteins. Ca^{2+} stimulates disulfide cross-linking between the S100b β -subunit and the microtubule associated Tau(2) protein. *Biochemistry* 27 : 2728-2736.

Bell R.M. (1986) Protein kinase C activation by diacylglycerol second messengers. *Cell*. 45 : 631-632.

Behrouz N., Défossez A., Delacourte A., Hublau P., Mazzuca M. (1989a) An antiserum to the N-terminal subsequence of the Alzheimer amyloid beta protein does not react with neurofibrillary tangles. *J. Gerontol.* 44 : 156-159.

Behrouz N., Défossez A., Delacourte A., Hublau P., Mazzuca M. (1989b) Alzheimer's disease : glycolytic pretreatment dramatically enhances immunolabelling of senile plaques and cerebrovascular amyloid substance. *Lab. Invest.* 61 : 576-583.

Bergeron C., Ranall P.J., Miceli P.N. (1987) Amyloid angiopathy in Alzheimer's disease. *Can. J. Neurol. Sci.* 14 : 564.

Biedler J.L., Helson L., Spengler B.A. (1973) Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.* 33 : 2643-2652.

Binder L.I., Frankfurter A., Rebhun L.I. (1985) The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J. Cell. Biol.* 101 : 1371-1378.

Blass J.P., Baker A.C., Sheu K.F.R., Ko L., Black R.S., Smith A. (1989) Use of cultured skin fibroblasts in studies of Alzheimer's disease. Dans " Biological markers of Alzheimer's disease. " Boller F., Katzman R., Rascol A., Christen Y. éd. 153-162.

Blessed G., Tomlinson B.E., Roth M. (1968) The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Br. J. Psychiatry* 114 : 797-811.

Bloom G.S., Vallee R.B. (1983) Association of microtubule-associated protein 2 with microtubules and intermediate filaments in cultured brain cells. *J. Cell. Biol.* 96 : 1523-1531.

Bodian D. (1936) A new method for staining nerve fibers and nerve endings in mounted paraffin sections. *Anat. Rec.* 65 : 89-97.

Bondareff (1982) Loss of neurons of origin of the adrenergic projection to cerebral cortex (nucleus locus coeruleus) in senile dementia. *Neurology* 32 : 164-168.

Borisy G.G., Olmsted J.B. (1972) Nucleated assembly of microtubules in porcine brain extracts. *Science* 177 : 1196-1197.

Bowen D.M., Smith C.B., White P., Davison A.N. (1976) Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain* 99 : 459-496.

Braak H., Braak E., Grundke-Iqbal et coll. (1986) Occurrence of neuropils trends in the senile human brain and in Alzheimer's disease. A 3rd location of paired helical filaments outside of neurofibrillary tangles and the neuritic plaques. *Neurosci. Lett.* 65 : 351-355.

Brion J.P., Passareiro H., Nunez J., Flament-Durand J. (1985) Immunological determinants of Tau proteins are present in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Arch. Biol.* 95 : 229-235.

Brion J-P., Cheetham M.E., Robinson P.A., Couck A-M., Anderton B.H. (1988) Isolation of cDNAs coding for epitopes shared by microtubule-associated proteins and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *F.E.B.S. Lett.* 226 : 28-32.

Brion S., Plas J., Massé G. (1986) *Maladie d'Alzheimer et noyau basal de Meynert.* *L'encéphale* XII : 111-114.

Brody H. (1955) Organization of the cerebral cortex (III). A study of aging in the human cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* 102 : 111-556.

Bryan J., Wilson L. (1971) Are cytoplasmic microtubules heteropolymers? *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 68 : 1762-1766.

Buée L., Laine A., Delacourte A., Flament S., Han K-K. (1989) Qualitative and quantitative comparison of brain proteins in Alzheimer's disease. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 370 : 1229-1234.

Buell S.J., Coleman P.D. (1979) Dendritic growth in the aged human brain and failure of growth in senile dementia. *Science* 206 : 854-856.

Candy J.M., Klinowski J., Perry R.H., Perry E.K., Fairbairn A., Oakley A.E., Carpenter T.A., Atack J.R., Blessed G., Edwardson J.A. (1986) Aluminosilicates and senile plaque formation in Alzheimer's disease. *The Lancet* 1 : 354-356.

Carlier M.F., Simon D., Pantaloni D. (1984) Polymorphism of tubulin oligomers in the presence of microtubule-associated proteins. Implications in microtubule assembly. *Biochemistry* 23 : 1582-1590.

Castano E.M., Frangione B. (1988) Human amyloidosis, Alzheimer disease and related disorders. *Lab. Invest.* 58 : 122-132.

Castagna M., Takai Y., Kaibuchi K., Sano K., Nishizuka Y. (1982) Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 257 : 7847-7851.

Ceballos I., Nicole A., Briand P., Grimber G., Blouin J.L., Delacourte A., Flament S., Thevenin M., Kamoun P., Sinet P.-M. (1990) Expression of human Cu/Zn superoxide dismutase gene in transgenic mice : model for gene dosage effect in Down's syndrome. *Free Rad. Res. Comm.* (sous presse).

Cleveland D.W., S-Y. Hwo, Kirschner M.W. (1977a) Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J. Mol. Biol.* 116 : 207-225.

Cleveland D.W., S-Y. Hwo, Kirschner M.W. (1977b) Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J. Mol. Biol.* 116 : 227-247.

Cohen P., Holmes C.F.B., Tsukitani Y. (1990) Okadaic acid : a new probe for the study of cellular regulation. *TIBS* 15 : 98-102.

Colon E.J. (1972) The elderly brain : a quantitative analysis of cerebral cortex in two cases. *Psychiatr. Neurol. Neurochir.* 75 : 261-270.

Conolly J.A., Kalnins V.I. (1980) Tau and HMW microtubule-associated proteins have different microtubule binding sites in vivo. *Eur. J. Cell Biol.* 21 : 296-300.

Cross R.B. (1982) Demonstration of neurofibrillary tangles in paraffin section - a quick and simple method using Palmgrens technique. *Med. Lab. Sci.* 39 : 67-69.

Davies C.A., Mann D.M.A., Sumter P.Q. (1987) A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* 78 : 151-164.

Davies P., Maloney A.F. (1976) Selective loss of cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* II : 1403.

Davies P. (1979) Neurotransmitter-related enzymes in senile dementia of the Alzheimer type. *Brain Res.* 171 : 319-327.

Davis P.J.M., Wright E.A. (1977) A new method for measuring cranial cavity and its application to the assessment of cerebral atrophy at autopsy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 3 : 341.

De Boni U., Crapper Mc Lachlan D.R. (1985) Controlled induction of paired helical filaments of the Alzheimer type in cultured human neurons by glutamate and aspartate. *J. Neurol. Sci.* 68 : 105-118.

Défossez A., Beauvillain J-C., Delacourte A., Mazzuca M. (1988) Alzheimer's disease : a new evidence for common epitopes between microtubule associated protein Tau and paired helical filaments (PHF) ; demonstration at the electron microscope by a double immunogold labelling. *Virchows Archiv.* 413 : 141-145.

Défossez A., Delacourte A. (1987) Transformation of degenerating neurofibrils into amyloid substance in Alzheimer's disease : histochemical and immunohistochemical studies. *J. Neurol. Sci.* 81 : 1-10.

Dekaban A.S., Sadowsky D. (1978) Changes in brain weights during the span of human life : relation of brain weights to body heights and body weights. *Ann. Neurol.* 4 : 345-356.

Delabar J.M., Sinet P.-M., Chadefaux B., Nicole A., Gegonne A., Stehelin D., Creau-Goldberg N., Turleau C., De Grouchy J. (1987a) Submicroscopic duplication of chromosome 21 and trisomy 21 phenotype (Down's syndrome). *Hum. Genet.* 76 : 225-229.

Delabar J.M., Goldgaber D., Lamour Y., Nicole A., Huret J.L., De Grouchy J., Brown P., Gajduzek D.C., Sinet P.-M. (1987b) Amyloid gene duplication in Alzheimer's disease and karyotypically normal Down's syndrome. *Science.* 235 : 1390-1392.

Delacourte A., Défossez A. (1986) Alzheimer's disease : Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly are major components of paired helical filaments. *J. Neurol. Sci.* 76 : 173-186.

Delacourte A., Défossez A., Persuy P., Peers M.-C. (1987) Observation of morphologic relationships between angiopathic blood vessels and degenerative neurites in Alzheimer's disease. *Virchows Arch.* 411 : 199-204.

Delacourte A. (1990) General and dramatic glial reaction in Alzheimer brains. *Neurology* 40 : 33-37.

De Sauvage F., Octave J.-N. (1989) A novel mRNA of the amyloid precursor gene coding for a possible secreted protein. *Science* 245 : 651-653.

Dickson D.W., Ksiezak-Reding H., Davies P., Yen S.-H. (1987) A monoclonal antibody that recognizes a phosphorylated epitope in Alzheimer neurofibrillary tangles, neurofilaments and tau proteins immunostains granulovacuolar degeneration. *Acta Neuropathol.* 73 : 254-258.

Drubin D.G., Caput D., Kirschner M.W. (1984) Studies on the expression of the microtubule-associated protein tau during mouse brain development, with newly isolated complementary DNA probes. *J. Biol. Chem.* 98 : 1090-1097.

Drubin D.G., Kirschner M.W. (1986) Tau protein function in living cells. *J. Cell. Biol.* 103 : 2739-2746.

Duyckaerts C., Brion J.-P., Hauw J.-J., Flament-Durand J. (1987) Quantitative assessment of the density of neurofibrillary tangles and senile plaques in senile dementia of the Alzheimer type. Comparison of immunocytochemistry with a specific antibody and Bodian's protargol method. *Acta Neuropathol.* 73 : 167-170.

Duyckaerts C., Delaère P., Poulain V., Brion J.-P., Hauw J.-J. (1988) Does amyloid precede paired helical filaments in the senile plaque? A study of 15 cases with graded intellectual status in aging and Alzheimer disease. *Neuroscience Lett.* 91 : 354-359.

Duyckaerts C., Hauw J.-J., Piette F., Rainsard V., Poulain C., Berthaux P., Escourolle R. (1985) Cortical atrophy in senile dementia of the Alzheimer type is mainly due to a decrease in cortical length. *Acta Neuropathol.* 66 : 72-74.

Duyckaerts C., Llamas E., Delaère P., Miele P., Hauw J.-J., (1989) Neuronal loss and neuronal atrophy. computer simulation in connection with Alzheimer's disease. *Brain Research* 504 : 94-100.

Edwardson J.A., Candy J.M. (1989) Aluminium and the pathogenesis of senile plaques in Alzheimer's disease, Down's syndrome and chronic renal dialysis. *Ann. Med.* 21 : 95-97.

Eikelenboom P., Stam F. C. (1982) Immunoglobulins and complement factors in senile plaques. *Acta Neuropathol.* 57 : 239-242.

Ennulat D.J., Liem R.K.H., Hashim G.A., Shelanski M.L. (1989) Two separate 18-amino acid domains of tau promote the polymerisation of tubulin. *J. Biol. Chem.* 264 : 5327-5330.

Erneux C., Passareiro H., Nunez J. (1984) Interaction between calmodulin and microtubule-associated proteins prepared at different stages of brain development. *F.E.B.S. Lett.* 172 : 315-320.

Fellous A., Francon J., Lennon A.-M., Nunez J. (1977) Microtubule assembly in vitro. Purification of assembly-promoting factors. *Eur. J. Biochem.* 78 : 167-174.

Feulgen R., Rossenbeck H. (1924) Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure von Typers der Thymonucleinsäure und die dachauf Beruhende elektive Färbung von Zellkernen in Mikroskopischem Praraten. Z. Physiol. Chem. 135 : 203-248.

Folstein M.F., Folstein S.E., Mc Hugh P.R. (1975) " Minimental state " . A practical method for grading the cognitive state for patients for the clinician. J. Psychiatr. Res. 12 : 189-198.

Foncin J.-F. (1980) Etude anatomo-pathologique et ultrastructurale de divers processus de vieillissement cérébral chez l'homme. Revue critique. Rev E.E.G.Neurophysiol. 10 (3) : 215-227.

Foncin J.-F., Salmon D., Supino-Viterbo V., Feldman R.G., Macchi G., Mariotti P., Scoppetta C., Caruso G., Bruni A.C. (1985) Démence présénile d'Alzheimer transmise dans une famille étendue. Rev. Neurol. 141 (3) : 194-202. •

Foncin J.-F., El Hachimi K.H. (1986) Neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease : a discussion to aluminium pathology in man. Dans "Senile dementias : early detection" A. Bés et al. éd. John Libbey Eurotext. 191-201.

Francon J., Lennon A-M., Fellous A., Mareck A., Pierre M, Nunez J. (1982) Heterogeneity of microtubule-associated proteins and brain development. Eur. J. Biochem. 129 : 465-471.

Fukunaga K. et coll. (1982) Purification and characterization of a Ca⁺⁺- and calmodulin-dependent protein kinase from rat brain. J. Neurochem. 39 : 1607-1617.

Geddes J.W., Anderson K.J., Cotman C.W. (1986) Senile plaques as aberrant sprout-stimulating structures. Exp. Neurol. 94 : 767-776.

Glenner G.G., Wong C.W. (1984) Alzheimer's disease : initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. Biochem. Biophys. Res. Comm. 120, 885-890.

Goedert M., Wischik C.M., Crowther R.A., Walker J.E., Klug A. (1988) Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filaments of Alzheimer disease : identification as the microtubule-associated protein Tau. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85 : 4051-4055.

Goedert M., Spillantini M.G., Potier M.C., Ulrich J., Crowther R.A. (1989a) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats : differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *E.M.B.O. J.* 8 : 393-399.

Goedert M., Spillantini M.G., Jakes R., Rutherford D., Crowther R.A. (1989b) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein Tau : sequence and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3 : 519-526.

Goldgaber D., Lerman M.I., Westley Mc Bride O., Saffioti U., Gajduzek D.C. (1987) Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* 235 : 877-880.

Gordon J.W., Ruddle F.H. (1983) Gene transfer into mouse embryos : production of transgenic mice by pronuclear microinjection. *Methods Enzymol.* 101 : 411-433.

Griffith L.M., Pollard T.D. (1982) The interaction of actin filaments with microtubules and microtubule-associated proteins. *J. Biol. Chem.* 257 : 9143-9151.

Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Quinlan M., Tung Y-C., Wang G., Wisniewski H.M. (1986a) Microtubule associated protein tau a component of Alzheimer paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* 261 : 6084-6089.

Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Tung Y-C., Quinlan M., Wisniewski H.M., Binder L.I. (1986b) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 83: 4913-4917.

Hansen L.A., Armstrong D.M., Terry R.D. (1987). An immunohistochemical quantification of fibrous astrocytes in the aging human cerebral cortex. *Neurobiology of Aging* 8 : 1-6.

Hansen L.A., DeTeresa R., Davies P., Terry R.D. (1988) Neocortical morphometry, lesion counts and choline acetyl transferase levels in the age spectrum of Alzheimer's disease. *Neurology* 38 : 48-54.

Hauw J.-J., Vignolo P., Duyckaerts C., Beck H., Forette F., Henry J.-F., Laurent M., Piette F., Sacht A., Berthaux P. (1986) Etude neuropathologique de 12 centenaires. *Rev. Neurol.* 142 (2) : 107-115.

Hefti F., Weiner W.J. (1986) Nerve growth factor and Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 20 : 275-281.

Hefti F., Will B. (1987) NGF is a neurotrophic factor for forebrain cholinergic neurons : implications for AD. *J. Neural. Transm. supp.* 24 : 309-315.

Heimann R., Shelanski M.L., Liem R.K.H. (1985) Microtubule associated proteins bind specifically to the 70-kDa neurofilament protein. *J. Biol. Chem.* 260 : 12160-12166.

Henderson G., Tomlinson B.E., Gibson P.H. (1980) Cell counts in human cerebral cortex in normal adults throughout life using an image analysing computer. *J. Neurol. Sci.* 46 : 113-136.

Himmler A., Drechsel D., Kirschner M.W., Martin D.W. (1989a) Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol. Cell. Biol.* 9 : 1381-1388.

Himmler A. (1989b) The structure of the bovine tau gene : alternatively spliced transcripts generate a protein family. *Mol. Cell. Biol.* 9 : 1389-1396.

Hirokawa N., Shiomura Y., Okabe S. (1988) Tau proteins : the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J. Cell. Biol.* 107 : 1449-1459.

Hoshi M., Nishida E., Miyata Y., Sakai H., Miyoshi T., Ogawara H., Akiyama T. (1987) Protein kinase C phosphorylates tau and induces its functional alterations. *F.E.B.S. Lett.* 217 : 237-241.

Hubbard B.M., Anderson J.M. (1981) A quantitative study of cerebral atrophy in old age and senile dementia. *J. Neurol. Sci.* 50 : 135-145.

Hyman B.T., Van Hoesen G.W., Damasio A.R., Barnes C.L. (1984) Alzheimer's disease : cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science* 225 : 1168-1170.

Ihara Y., Nukina N., Miura R., Ogawara M. (1986) Phosphorylated tau proteins is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J. Biochem.* 99: 1807-1810.

Iimoto D.S., Masliah E., DeTeresa R., Terry R.D., Saitoh T. (1989) Aberrant casein kinase II in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 507 : 273-280.

Ikeda S.-I., Allsop D., Glenner G.G. (1989) Morphology and distribution of plaque and related deposits in the brains of Alzheimer's disease and control cases. An immunohistological study using amyloid β -protein antibody. *Lab. Invest.* 60 : 113-122.

Iqbal K., Zaidi T., Thompson C.H., Merz P.A., Wisniewski H.M. (1984) Alzheimer paired helical filaments : bulk isolation, solubility, and protein composition. *Acta Neuropathol.* 62 : 167-177.

Ishii T., Haga S. (1984) Immuno-electron microscopic localization of complements in amyloid fibrils of senile plaques. *Acta Neuropathol.* 63 : 296-300.

Jellinger K., Riederer P. (1983) Dementia in Parkinson's disease and presenile dementia of Alzheimer type : morphological aspects and changes in the intra cerebral MAO activity. Dans " *Advances in Neurology.* " Hassler R.G., Christ J.F. éds. Raven Press New-York. 40 : 199-210.

Joachim C.L., Morris J.H., Kosik K.S., Selkoe D.J. (1987) Tau antisera recognize neurofibrillary tangles in a range of neurodegenerative disorders. *Ann. Neurol.* 22: 514-520.

Joachim C.L., Mori H., Selkoe D.J. (1989) Amyloid β -protein deposition in tissues other than brain in Alzheimer's disease. *Nature* 341 : 226-230.

Johnston M.V., McKinney M., Coyle J.T. (1979) Evidence for a cholinergic projection to neocortex from neurons in basal forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 76 : 5392-5396.

Kakiuchi S., Sobue K. (1981) Ca^{2+} and calmodulin dependent flip-flop mechanism in microtubule assembly-disassembly. *F.E.B.S. Lett.* 132 : 141-143.

Kanai Y., Takemura R., Oshima T., Mori H., Ihara Y., Yanagisawa M., Masaki T., Hirokawa N. (1989) Expression of multiple tau isoforms and microtubule bundle formation in fibroblasts transfected with a single tau cDNA. *J. Cell. Biol.* 109 : 1173-1184.

Kang J., Lemaire H.G., Unterbeck A., Salbaum J.M., Masters C.L., Grzeschik K.H., Multhaup G., Beyreuther K., Muller-Hill B. (1987) The precursor of the amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325 : 733-736.

Keates R.A.B., Hall R.H. (1975) tubulin requires an accessory protein for self-assembly into microtubules. *Nature* 257 : 418-421.

Kemper Y. (1984) Neuroanatomical and neuropathological changes in normal aging and dementia. Dans " *Clinical neurology of aging.* " M.L. Albert éd. Oxford University Press, New-York. 9-52.

Kidd M. (1963) Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 197 : 192-193.

Kim H., Jensen C.G., Rebhun L.I. (1986) The binding of MAP2 and tau on brain microtubules in vitro : implications for microtubule structure. *Dynamic aspects of microtubule biology.* Ann. NY Acad. Sci. 466 : 218-239.

Kirschner M.C., Williams R.C., Weingarten M., Gerhart J.C. (1974) Microtubules from mammalian brain : some properties of their depolymerization products and a proposed mechanism of assembly and disassembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 71 : 1159-1163.

Kitaguchi N., Takahashi Y., Tokushima Y., Shiojiri S., Ito H. (1988) Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature* 331 : 530-532.

Kitamoto T., Ogomori K., Tateishi J., Prusiner S.B. (1987) Methods in laboratory investigations : Formic acid pretreatment enhances immunostaining of cerebral and systemic amyloids. *Lab. Invest.* 57 : 230-236.

Kitt C.A., Price D.L., Struble R.G., Cork L.C., Wainer B.H., Becher M.W., Mobley W.C. (1984) Evidence for cholinergic neurites in the senile plaques. *Science* 226 : 1443-1445.

Kondo J., Honda T., Mori H., Hamada Y., Miura R., Ogawara M., Ihara Y. (1988) The carboxyl third of Tau is tightly bound to paired helical filaments. *Neuron* 1 : 827-834.

Kosik K.S., Joachim C.L., Selkoe D.J. (1986) Microtubule-associated protein tau is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83 : 4044-4048.

Kosik K.S., Finch E.A. (1987) MAP2 and tau segregate into dendritic and axonal domains after the elaboration of morphologically distinct neurites : an immunocytochemical study of cultured rat cerebrum. *J. Neurosci.* 7 : 3142-3153.

Kotani S., Nishida E., Kumagai H., Sakai H. (1985) Calmodulin inhibits interaction of actin with MAP2 and tau, two major microtubule-associated proteins. *J. Biol. Chem.* 260 : 10779-10783.

Ksiezak-Reding H., Dickson D.W., Davies P., Yen S.H. (1987) Recognition of tau epitopes by anti-neurofilament antibodies that bind to Alzheimer neurofibrillary tangles. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 84 : 3410-3414.

Ksiezak-Reding H., Binder L.I., Yen S-H. (1988a) Immunochemical and biochemical characterization of tau proteins in normal and Alzheimer's disease brains with Alz 50 and tau-1. *J. Biol. Chem.* 263 : 7947-7953.

Ksiezak-Reding H., Davies P., Yen S-H. (1988b) Alz 50, a monoclonal antibody to Alzheimer's disease antigen cross-reacts with tau proteins from bovine and normal human brain. *J. Biol. Chem.* 263 : 7943-7947.

Ksiezak-Reding H., Chien C-H., Lee M-Y., Yen S-H. (1990a) Mapping of the Alz 50 epitope in microtubule-associated proteins tau. *J. Neurosci. Res.* 25 : 412-419.

Ksiezak-Reding H., Binder L.I., Yen S-H. (1990b) Alzheimer disease proteins (A68) share epitopes with tau but show distinct biochemical properties. *J. Neurosci. Res.* 25 : 420-430.

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

Ledbetter M.C., Porter K.R. (1963) A " microtubule " in plant fine structure. *J. Cell. Biol.* 19 : 239-250.

Lee Y.C., Wolff J. (1982) Calmodulin binds to both microtubule-associated protein 2 and tau proteins. *J. Biol. Chem.* 257 : 6306-6310.

Lenders M.B., Peers M.C., Tramu G., Delacourte A., Défossez A., Petit H., Mazuca M. (1988) Dystrophic peptidergic neurites in senile plaques of Alzheimer's disease hippocampus precede formation of paired helical filaments. *Brain Res.* 481 : 344-349.

Leterrier J-F., Liem R.K., Shelanski M.L. (1982) Interactions between neurofilament and microtubule-associated proteins : a possible mechanism for intraorganellar bridging. *J. Cell. Biol.* 95 : 982-986.

Lewis S.A., Wang D., Cowan N.J. (1988) Microtubule-associated protein MAP2 shares a microtubule binding domain with tau protein. *Science* 242 : 936-939.

Lewis S.A., Ivanov I.E., Lee G-H., Cowan N.J. (1989) Organization of microtubules in dendrites and axons is determined by a short hydrophobic zipper in microtubule-associated proteins MAP2 and tau. *Nature* 342 : 498-505.

Lindwall G., Cole R.D. (1984) The purification of tau protein and the occurrence of two phosphorylation states of tau in brain. *J. Biol. Chem.* 259 : 12241-12245.

Littauer U.Z., Givon D., Thierauf M., Ginzburg I., Ponstingl H. (1986) Common and distinct tubulin binding sites for microtubule-associated proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 83 : 7162-7166.

McKhann G., Drachman D., Folstein M., Katzman R., Price D., Stadlan E.M. (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease : report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of department of health and human services task force on Alzheimer's disease. *Neurology* 34 : 939-944.

Manetto V., Perry G., Tabaton M., Mulvihill P., Fried V.A., Smith H.T., Gambetti P., Autillio-Gambetti L. (1988) Ubiquitin is associated with abnormal cytoplasmic filaments characteristic of neurodegenerative diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85 : 4501-4505.

Mann D.M.A. (1988) The progression of the pathological changes of Alzheimer's disease in frontal and temporal neocortex examined both at biopsy and at autopsy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 14 : 177-195.

Mann D.M.A., Bonshek R.E., Marcyniuk B., Stoddart R.W., Torgerson E. (1987a) Saccharides of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 85 : 277-282.

Mann D.M.A., Esiri M.M. (1989) The pattern of acquisition of plaques and tangles in the brains of patients under 50 years of age with Down's syndrome. *J. Neurol. Sci.* 89 : 169-179.

Mann D.M.A., Yates P.O., Marcyniuk B. (1985) Correlation between senile plaque and neurofibrillary counts in cerebral cortex and neuronal counts in cortex and subcortical structures in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 56 : 51-55.

Mann D.M.A., Yates P.O., Marcyniuk B. (1987b) Dopaminergic neurotransmitter systems in Alzheimer's disease and in Down's syndrome at middle age. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 50 : 341-344.

Marcyniuk B., Mann D.M.A., Yates P.O. (1986) Loss of nerve cells from locus coeruleus in Alzheimer's disease is topographically arranged. *Neurosci. Lett.* 64 : 247-252.

Mareck A., Fellous A., Francon J., Nunez J. (1980) Changes in composition and activity of microtubule-associated proteins during brain development. *Nature* 284 : 353-355.

Masters C.L., Multhaup G., Simms G., Pottgiesser J., Martins R.N., Beyreuther K. (1985) Neuronal origin of a cerebral amyloid : neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *E.M.B.O. J.* 4 : 2757-2763.

Mattson M.P., Kater S.B. (1989) Development and selective neurodegeneration in cell cultures from different hippocampal regions. *Brain Res.* 490 : 110-125.

Mattson M.P. (1990) Antigenic changes similar to those seen in neurofibrillary tangles are elicited by glutamate and Ca^{2+} influx in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 4 : 105-117.

McKee A.C., Kosik K.S., Kennedy M.B., Kowall N.W. (1990) Hippocampal neurons predisposed to neurofibrillary tangle formation are enriched in type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 49 : 49-63.

Mehraein P. et coll. (1975) Quantitative study on dendrites and dendritic spines in Alzheimer's disease and senile dementia. Dans "Physiology and pathology of dendrites. *Advances in neurobiology.*" G.W. Kreutzberg éd. Raven press New-York. 12.

Merz P.A., Wisniewski H.M., Somerville R.A., Bobin S.A., Masters C.L., Iqbal K. (1983) Ultrastructural morphology of amyloid fibrils from neuritic and amyloid plaques. *Acta Neuropathol.* 60 : 113-119.

Metha P.D., Thal L., Wisniewski H.M., Grundke-Iqbal I, Iqbal K. (1985) Paired helical filament antigen in CSF. *Lancet* I: 35.

Miller S.G., Kennedy M.B. (1986) Regulation of brain type II Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation : ATP modulates production of an autonomous enzyme. *Cell* 44 : 861-870.

Miyakawa T., Shimoji A., Kuramoto R., Higuchi Y. (1982) The relationship between senile plaques and cerebral blood vessels in Alzheimer's disease and senile dementia. *Virchows Arch.* 40 : 121-129.

Miyata Y., Hoshi M., Nishida E., Minami Y., Sakai H. (1986) Binding of microtubule-associated protein 2 and tau to the intermediate filament reassembled from neurofilament 70-kDa subunit protein. *J. Biol. Chem.* 261 : 13026-13030.

Mori H., Hamada Y., Kawaguchi M., Honda T., Kondo J., Ihara Y. (1989) A distinct form of tau is selectively incorporated into Alzheimer's paired helical filaments. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 159 : 1221-1226.

Mori H., Kondo J., Ihara Y. (1987) Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science* 235 : 1641-1644.

Mountjoy C.Q., Roth M., Evans N.J.R., Evans H.M. (1983) Cortical neuronal counts in normal elderly controls and demented patients. *Neurobiol. Aging* 4 : 1-11.

Murphy D.B., Borisy G.G. (1975) Association of high-molecular-weight proteins with microtubules and their role in microtubule assembly in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 72 : 2696-2700.

Neary D., Snowden J.S., Mann D.M.A., Bowen D.M., Sims N.R., Northen B., Yates P.O., Davison A.N. (1986) Alzheimer's disease : a correlative study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr* 49 : 229-237.

Nee L.E., Eldridge R., Sunderland T., Thomas C.B., Katz D., Thompson K.E., Weingartner H., Weiss H., Julian C., Cohen R. (1987) Dementia of the Alzheimer type : clinical and family study of 22 twin pairs. *Neurology* 37 : 359-363.

Neve R.L., Harris P., Kosik K.S., Kurnit D.M., Donlon T.A. (1986) Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Mol. Brain Res.* 1 : 271-280.

Nishida E., Kuwaki T., Sakai H. (1981) Phosphorylation of microtubule-associated proteins (MAPs) and pH of the medium control interaction between MAPs and actin filaments. *J. Biochem.* 90 : 575-578.

Nukina N., Ihara Y. (1983) Immunocytochemical study on senile plaques in Alzheimer's disease (Part II). *Proc. Japan. Acad.* 59 : 284-292.

Nukina N., Ihara Y. (1986) One of the antigenic determinants of Paired Helical Filaments is related to Tau proteins. *J. Biochem.* 99 :1541-1544.

Nukina N., Kosik K.S., Selkoe D.J. (1987) Recognition of Alzheimer paired helical filaments by monoclonal neurofilament antibodies is due to cross-reaction with tau protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 84 : 3415-3419.

Nukina N., Kosik K.S., Selkoe D.J. (1988) The monoclonal antibody, Alz 50, recognizes tau proteins in Alzheimer's disease brain. *Neurosci. Lett.* 87 : 240-246.

O'Farrell P.H. (1975) High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250 : 4007-4021.

Ogomori K., Kitamoto T., Tateishi J., Sato Y., Suetsugu M., Abe M. (1989) β -protein amyloid is widely distributed in the central nervous system of patients with Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 134 : 243-251.

Oltersdorf T., Fritz L.C., Schenk D.B., Lieberburg I., Johnson-Wood K.L., Beattie E.C., Ward P.J., Blacher R.W., Dovey H.F., Sinha S. (1989) The secreted form of the Alzheimer's amyloid precursor with the Kunitz domain is protease nexin-II. *Nature* 341 : 144-147.

Ouimet C.C., McGuinness T.L., Greengard P. (1984) Immunocytochemical localization of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 81 : 5604-5608.

Papasozomenos S.C., Binder L.I. (1987) Phosphorylation determines two distinct species of tau in the central nervous system. *Cell motility and the cytoskeleton* 8 : 210-226.

Parent M., Delacourte A., Défossez A., Hemon B., Han K-K., Petit H. (1988) Alzheimer's disease: study of the distribution of paired helical filaments tau proteins in the human central nervous system. *C. R. Acad. Sci.* 306 : 391-397.

Pearson R.C.A., Esiri M.M., Wilcock G.K., Powell T.P.S. (1985) Anatomical correlates of the distribution of the pathological changes in the neocortex in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 4531-4534.

Pearson R.C.A., Sofroniew M.V., Cuello A.C., (1983) Persistence of cholinergic neurons in nucleus basalis of a brain with S.D.A.T. demonstrated by immunohistochemical staining for choline acetyl transferase. *Brain Res.* 289: 375-379.

Peng I., Binder L.I., Black M.M. (1986) Biochemical and immunological analysis of cytoskeletal domains of neurons. *J. Cell. Biol.* 102 : 252-256.

Perez-Polo J.R., Tiffany-Castiglioni E., Werrbach-Perez K. (1982) Effect of nerve growth factor on catecholamine metabolism in a human neuroblastoma clone (SY5Y). *Dev. Neurosci.* 5 : 418-423.

Perl D.P. (1980) Alzheimer's disease : X-Ray spectrometric evidence of aluminium accumulation in neurofibrillary tangle-bearing neurons. *Science* 208 : 297-299.

Perry E.K., Perry R.H., Blessed G., Tomlinson B.E. (1977) Necropsy evidence of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* i : 189.

Perry G., Friedman R., Shaw G., Chan V. (1987) Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84 : 3033-3036.

Persuy P., Défossez A., Delacourte A., Tramu G., Bouchez B., Arnott G. (1985) Anti-PHF antibodies : an immunohistochemical marker of the lesions of the Alzheimer's disease. *Virchows Archiv.* 407 : 13-23.

Pierre M., Nunez J. (1983) Multisite phosphorylation of Tau proteins from rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115 : 212-219.

Pollock N.J., Mirra S.S., Binder L.I., Hansen L.A., Wood J.G. (1986) Filamentous aggregates in Pick's disease, progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease share antigenic determinant with microtubule-associated protein Tau. *The Lancet* 2: 1211.

Ponte P., Gonzalez-DeWhitt P., Schilling J., Miller J., Hsu D., Greenberg B., Davis K., Wallace W., Liebenburg I., Fuller F., Cordell B. (1988) A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors. *Nature* 331 : 525-527.

Rewcastle N.B., Ball M.J. (1968) Electron microscopic structure of the "inclusion bodies" in Pick's disease. *Neurology* 18: 1205-1213.

Robakis N.K., Ramakrishna N., Wolfe G., Wisniewski H. M. (1987) Molecular cloning and sequencing of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84 : 4190-4194.

Saitoh T., Sundsmo M., Roch J.M., Kimura N., Cole G., Schubert D., Oltersdorf T., Schenk D.B. (1989) Secreted form of amyloid β protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. *Cell* 58 : 615-622.

Sandoval I.V., Vandekerkhove J.S. (1981) A comparative study of the in vitro polymerization of tubulin in the presence of the microtubule-associated proteins MAP2 and Tau. *J. Biol. Chem.* 256 : 8795-8800.

Schechter R. et coll. (1981) Fibrous astrocytes in senile dementia of the Alzheimer type. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 40 : 95.

Scheibel A.B. (1978) Structural aspect of the aging brain : spine system and the dendritic arbor. Dans " Aging." Raven Press, New-York. 7 : 353-373.

Schellenberg G.D., Bird T.D., Wijsman E.M., Moore D.K., Boehnke M., Bryant E.M., Lampe T.H., Nochlin D., Sumi S.M., Deeb S.S., Beyreuther K., Martin G.M. (1988) Absence of linkage of chromosome 21q21 markers to familial Alzheimer's disease. *Science* 241 : 1507-1510.

Schulman H., Greengard P. (1978) Stimulation of brain membrane protein phosphorylation by calcium and an endogenous heat-stable protein. *Nature* 271 : 478-479.

Seamon K.B., Padgett W., Daly J.W. (1981) Forskolin : unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78 : 3363-3367.

Selden S.C., Pollard T.D. (1983) Phosphorylation of microtubule-associated proteins regulate their interaction with actin filaments. *J. Biol. Chem.* 258 : 7064-7071.

Selkoe D.J., Ihara Y., Salazar F.J. (1982) Alzheimer's disease : insolubility of partially purified paired helical filaments in sodium dodecyl sulfate and urea. *Science* 215 : 1243-1245.

Selkoe D.J. (1987) Deciphering Alzheimer's disease : the pace quickens. *T.I.N.S.* 10 : 181-184.

Selkoe D.J. (1989) Amyloid β -protein precursor and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Cell* 58 : 611-612.

Shea T.B., Clarke J.F., Wheelock T.R., Paskevich P.A., Nixon R.A. (1989) Aluminum salts induce the accumulation of neurofilaments in perikarya of NB2a/dl neuroblastoma. *Brain res.* 492 : 53-64.

Sinet P.-M. (1982) Metabolism of oxygen derivatives in down's syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 396 : 83-94.

Sinet P.-M., Nicole A., Ceballos I., Delabar J.-M. (1987) Trisomie 21 et maladie d'Alzheimer. *Médecines-Sciences* 3 : 256-262.

Slautterback D.B. (1963) Cytoplasmic microtubules. I. Hydra. *J. Cell. Biol.* 18 : 367-388.

Sloboda R.D., Dentler W.L., Rosenbaum J.L. (1976) Microtubule-associated proteins and the stimulation of tubulin assembly in vitro. *Biochemistry* 15 : 4497-4505.

Snow A. D., Mar H., Nochlin D., Kimata K., Kato M., Suzuki S., Hassell J., Wight T. N. (1988) The presence of heparan sulfate proteoglycans in the neuritic plaques and congophilic angiopathy in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 133 : 456-463.

Sobue K., Fujita M., Muramoto Y., Kakiuchi S. (1981) The calmodulin binding protein in microtubules is tau factor. *F.E.B.S. Lett.* 132 : 137-140.

St George-Hyslop P.H., Tanzi R.E., Polinsky R.J., Haines J.L., Nee L., Watkins P.C., Myers R.H., Feldman R.G., Pollen D., Drachman D., Growdon J., Bruni A., Foncin J-F., Salmon D., Frommelt P., Amaducci L., Sorbi S., Piacentini S., Stewart G.D., Hobbs W.J., Conneally P.M., Gusella J.F. (1987a) The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science* 235 : 885-890.

St George-Hyslop P.H., Tanzi R.E., Polinsky R.J., R.L. Neve, Pollen D., Drachman D., Growdon J., Cupples L.A., Nee L., Myers R.H., O'Sullivan D., Watkins P.C., Amos J.A., Deutsch C.K., Bodfish J.W., Kinsbourne M., Feldman R.G., Bruni A., Amaducci L., Foncin J-F., Gusella J.F. (1987b) Absence of duplication of chromosome 21 genes in familial and sporadic Alzheimer's disease. *Science* 238 : 664-666.

Steele J.C., Richardson J.C., Olszewski J. (1964) Progressive supranuclear palsy. *Arch. Neurol.* 10: 333-359.

Struble R.G., Powers R.E., Casanova M.F., Kitt C.A., Brown E.C., Price D.L. (1987) Neuropeptidergic systems in plaques of Alzheimer's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 46 : 567-584.

Szumanska G., Vorbrod A.W., Mandybur T.I., Wisniewski H.M. (1987) Lectin histochemistry of plaques and tangles in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 73 : 1-11.

Tagliavini F., Pilleri G. (1983) Basal nucleus of Meynert. *J. Neurol. Sci.* 62 : 243-260.

Talamo B.R., Rudel R.A., Kosik K.S., Lee V.M-Y., Neff S., Adelman L., Kauer J.S. Pathological changes in the olfactory neurons in patients with Alzheimer's disease. *Nature* 337: 736-739 (1989).

Tanzi R.E., Bird E.D., Latt S.A., Neve R.L. (1987a) The amyloid β protein gene is not duplicated in brains from patients with Alzheimer's disease. *Science* 238 : 666-669.

Tanzi R.E., Gusella J.F., Watkins P.C., Bruns G.A.P., St George-Hyslop P., Van Keuren M.L., Patterson D., Pagan S., Kurnitt D.M., Neve R.L. (1987b) Amyloid beta protein gene : cDNA, mRNA distribution and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* 235 : 880-884.

Tanzi R.E., St George-Hyslop P., Haines J.L., Polinsky R.J., Nee L., Foncin J.-F., Neve R.L., McClatchey A.I., Conneally P.M., Gusella J.F. (1987c) The genetic defect in familial Alzheimer's disease is not tightly linked to the amyloid β -protein gene. *Nature* 329 : 156-157.

Tanzi R.E., McClatchey A.I., Lamperti E.D., Gusella J.F., Neve R.L. (1988) Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature* 331 : 528-530.

Tellez-Nagel I., Wizniewski H.M. (1973) Ultrastructure of neurofibrillary tangles in Steel-Ridchardson-Olszewski syndrome. *Arch. Neurol.* 29: 324-327.

Terry R.D., Pena C. (1965) Experimental production of neurofibrillary degeneration (2) Electronmicroscopy, phosphatase histochemistry and electron probe analysis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 24 : 200-210.

Terry R.D., Peck A., DeTeresa R., Schechter R., D.S. Horoupian (1981) Some morphometric aspects of the brain in senile dementia of Alzheimer type. *Ann. Neurol.* 10 : 184-192.

Terry R.D. (1985) Alzheimer's disease : clinical aspects, function and frequency. Dans " Textbook of neuropathology." R.L. Davies, D.M. Robertson éds. 824-840.

Terry R.D., DeTeresa R., Hansen L.A. (1987) Neocortical cell counts in normal adult aging. *Ann. Neurol.* 21 : 530.

Thompson R.J. (1983) Dementia and the cytoskeleton. *Trends Biochem. Sci.* 8 : 389-390.

Tomlinson, B.E., Irving D., Blessed G. (1981) Cell loss in the locus coeruleus in senile dementia of Alzheimer type. *J. Neurol. Sci.* 49 : 419-428.

Troncoso J., Sternberger L., Sternberger N., Hoffman P., Price D. (1985) Immunocytochemical studies of neurofilament antigens in the neurofibrillary pathology induced by aluminium. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 44 : 332.

Uchida Y., Ihara Y., Tomonaga M. (1988) Alzheimer's disease brain extract stimulate the survival of cerebral cortical neurons from neonatal rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150 : 1263-1267.

Uchida Y., Tomonaga M. (1989) Neurotrophic action of Alzheimer's disease brain extract is due to the loss of inhibitory factors for survival and neurite formation of cerebral cortical neurons. *Brain Res.* 481 : 190-193.

Van Broeckhoven C., Genthe A.M., Vandenberghe A., Horsthemke B., Backhovens H., Raeymaekers P., Van Hul W., Wehnert A., Gheuens J., Cras P., Bruyland M., Martin J.J., Salbaum M., Multhaup G., Masters C.L., Beyreuther K., Gurling H.M.D., Mullan M.J., Holland A., Barton A., Irving N., Williamson R., Richards S.J., Hardy J.A. (1987) Failure of familial Alzheimer's disease to segregate with the A4-amyloid gene in several European families. *Nature* 329 : 153-155.

Van Nostrand W.E., Wagner S.L., Suzuki M., Choi B.H., Farrow J.S., Geddes J.W., Cotman C.W., Cunningham D.D. (1989) Protease nexin II, a potent anti-chymotrypsin, shows identity to amyloid- β protein precursor. *Nature* 341 : 546-549.

Vogelsang G.D., Zemlan F.P., Dean G.E. (1990) Purification and solubilization of paired helical filaments from Alzheimer's brains. *J. Neurochem.* 54 : 148-155.

Weidemann A., König G., Bunke D., Fischer P., Salbaum J.M., Masters C.L., Beyreuther K. (1989) Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 57 : 115-126.

Weingarten M.D., Lockwood A.H., Hwo S.Y., Kirschner M.W. (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 1858-1862.

Weingarten M.D., Suter M.M., Littman D.R., Kirschner M.W. (1974) Properties of the depolymerization products of microtubules from mammalian brain. *Biochemistry* 13 : 5529-5537.

Weisenberg R.C. (1972) Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations. *Science* 177 : 1104-1105.

Whitehouse P.J., Price D.L., Clark A.W., Coyle J.T., DeLong M.R. (1981) Alzheimer disease : evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann. Neurol.* 10 : 122-126.

Whitson J.S., Selkoe D.J., Cotman C.W. (1989) Amyloid β protein enhances the survival of hippocampal neurons in vitro. *Science* 243 : 1488-1490.

Whitson J.S., Glabe C.G., Shintani E., Abcar A., Cotman C.W. (1990) β -amyloid protein promotes neuritic branching in hippocampal cultures. *Neurosci. Lett.* 110 : 319-324.

Wilcock G.K., Esiri M.M. (1982) Plaques, tangles and dementia. A quantitative study. *J. Neurol. Sci.* 56 : 343-356.

Wischik C.M., Novak M., Edwards P.C., Tichelaar W., Crowther R.A. (1988a) Structural characterization of the core of the paired helical filaments of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85 : 4884-4888.

Wischik C.M., Novak M., Thogersen H.C., Edwards P.C., Runswick M.J., Jakes R., Walker J.E., Milstein C., Roth M., Klug A. (1988b) Isolation of a fragment of Tau derived from the core of the paired helical filaments of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85 : 4506-4510.

Wisniewski H.M., Terry R.D. (1973a) Reexamination of the pathogenesis of the senile plaque. dans " Progress in Neuropathology." H.M. Zimmerman éd. Grune and Straton, New-York. 2 : 1-26.

Wisniewski H.M., Terry R.D. (1973b) Morphology of the aging brain, human and animal. Prog. Brain Res. 40 : 167-186.

Wisniewski K., Jervis G.A., Moretz R.C., Wisniewski H.M. (1979) Alzheimer neurofibrillary tangles in diseases other than senile and presenile dementia. Ann. Neurol. 5: 288-294.

Wisniewski H.-M., Bancher C., Barcikowska M., Wen G.Y., Currie J. (1989) Spectrum of morphological appearance of amyloid deposits in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol. 78 : 337-347.

Wolozin B., Pruchniki A., Dickson D.W., Davies P. (1986) A neuronal antigen in the brain of Alzheimer patients. Ann. Neurol. 22 : 521-526.

Wolozin B., Davies P. (1987) Alzheimer related neuronal protein A68 : specificity and distribution. Ann. Neurol. 22 : 521-526.

Wong C.W., Quaranta V., Glenner G.G. (1985) Neuritic plaques and cerebrovascular amyloid in Alzheimer's disease are antigenically related. Proc. Natl. Acad. Sci. 82 : 8729-8732.

Wood J.G., Mirra S.S., Pollock N.J., Binder L.I. (1986) Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau. Proc. Natl. Acad. Sci. 83 : 4040-4043.

Yamaguchi H., Hirai S., Morimatsu M., Shoji M., Ihara Y. (1988) A variety of cerebral amyloid deposits in the brains of the Alzheimer type dementia demonstrated by β protein immunostaining. Acta Neuropathol. 76 : 541-549.

Yamamoto H., Fukunaga K., Tanaka E., Miyamoto E. (1983) Ca^{++} - and calmodulin-dependent phosphorylation of microtubule-associated protein 2 and Tau factor, and inhibition of microtubule assembly. J. Neurochem. 41 : 1119-1125.

Yamamoto T., Hirano A. (1985) Nucleus raphe dorsalis in Alzheimer's disease : neurofibrillary tangles and loss of large neurons. *Ann. Neurol.* 17 : 573-577.

Yankner B.A., Dawes L.R., Fisher S., Villa-Komaroff L., Oster-Granite M.L., R.L. Neve (1989) Neurotoxicity of a fragment of the Amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science* 245 : 417-420.

Yen S.H., Dickson D.W., Crowe A., Butler M., Shelanski M.L. (1987) Alzheimer's neurofibrillary tangles contain unique epitopes and epitopes in common with the heat-stable microtubule-associated proteins tau and MAP2. *Am. J. Pathol.* 126 : 81-91.

Zemlan F.P., Thienhaus O.J., Bosmann H.B. (1989) Superoxide dismutase activity in Alzheimer's disease : possible mechanism for paired helical filaments formation. *Brain Res.* 476 : 160-162.

