

50376
1992
236

63147

50376
1992
236

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

UFR DE BIOLOGIE

N° d'ordre 965

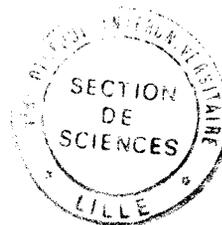
ANNÉE UNIVERSITAIRE: 1991-1992

Thèse (Nouveau Régime)
de Sciences de la Vie et de la Santé
Option Neurosciences

PRÉSENTÉE À L'UNIVERSITÉ DE LILLE I
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR EN BIOCHIMIE

par

Luc BUÉE



MALADIE D'ALZHEIMER:
LE RÔLE DES PROTÉOGLYCANNES
DANS L'AMYLOÏDOSE
ASPECTS NEUROPATHOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES
DES INTERACTIONS PROTÉOGLYCANNES-PROTÉINE AMYLOÏDE

Présentée le 2 octobre 1992 devant le Jury composé de:

Président: Monsieur le Professeur André VERBERT
Rapporteurs: Monsieur le Professeur Howard M. FILLIT
Monsieur le Professeur Patrick R. HOF
Examineurs: Monsieur le Professeur Bernard LASSALLE
Monsieur le Professeur Marc MAZZUCA
Directeur de thèse: Monsieur le Docteur André DELACOURTE

A Valérie

A mes parents

A Marc

A ma famille

A mes amis

Ce travail a été réalisé dans l'unité 156 INSERM (Directeur: Monsieur le Pr. Marc Mazzuca), au sein du groupe "Vieillesse et Dégénérescence du Neurone" sous la direction de Monsieur le Dr. André Delacourte et à The Mount Sinai Hospital, dans le Department of Geriatrics (Chairman: Pr. Robert N. Butler) et le Fishberg Center for Neurobiology (Co-Director: Pr. John H. Morrison) sous la direction de Monsieur le Pr. Howard M. Filiat.

J'exprime tous mes remerciements à

Monsieur le Professeur André Verbert. Après avoir bénéficié de votre enseignement, de votre soutien et de vos encouragements, je suis particulièrement honoré par la bienveillante attention que vous me témoignez en présidant ce jury.

Monsieur le Professeur Marc Mazzuca. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude pour m'avoir accueilli dans votre unité et m'avoir permis de travailler dans les meilleures conditions en autorisant la collaboration internationale qui a favorisé ce travail.

Monsieur le Docteur André Delacourte. Vous avez su me faire partager votre dynamisme scientifique par vos conseils et vos encouragements. Vous m'avez accordé votre confiance en m'autorisant à effectuer un stage aux Etats-Unis pour mener à bien ce travail et établir une collaboration internationale avec le laboratoire. Veuillez trouver ici l'expression de ma vive gratitude et ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Docteur Patrick R. Hof, Assistant Professor. Vous m'avez apporté vos connaissances et votre aide au cours de mon séjour à New York. J'ai pu apprécier vos qualités de chercheur et d'enseignant. Le fait que vous ayez accepté d'être rapporteur de cette thèse m'honore au plus haut point.

Monsieur le Docteur Howard M. Fillit, Associate Professor. Vous m'avez donné accès à toutes les facilités de votre laboratoire. Vous m'avez initié à la biochimie des protéoglycannes. La confiance que vous m'avez accordée pendant mon séjour et votre venue en tant que rapporteur pour la présentation de ce travail est pour moi un grand honneur.

Je tiens encore à remercier tout particulièrement Messieurs les Professeurs Fillit et Hof qui me font l'honneur de se déplacer spécialement de New York pour juger ce travail.

A mes maîtres Messieurs le Pr. Pierre Degand, le Pr. Didier Leys, le Pr. Jean Montreuil, et le Pr. Henri Petit, sans qui ce travail n'aurait pu être réalisé.

A tous mes amis qui m'ont toujours soutenu pendant mes années universitaires:

Claude, Pierre-Eric, Odile, Jean-René, Stéphane...

Mes remerciements s'adressent tout spécialement à

Monsieur le Docteur André Défossez, pour sa disponibilité, sa gentillesse et ses précieux conseils.

Monsieur le Docteur Patrick Vermersch, pour son amitié et son aide dans les aspects cliniques de la maladie d'Alzheimer.

Monsieur le Docteur Constantin Bouras, pour l'amitié qu'il me témoigne et ses discussions toujours enrichissantes.

I would also like to thank

Pr. John H. Morrison. It was a great honor to be a student in your laboratory. Your disponibility and scientific dynamism will always be for me a reference.

Pr. Robert Kisilevsky. Your advices and helps were priceless. It is a great honor to have your friendship.

I also thank investigators who have collaborated on aspects on this research including: Pr. Robert N Butler, Pr. Myron Miller, and Pr. Daniel P Perl (New York, NY), Pr. John C Steele (Agana, Guam), Drs. John P Anderson and Nikolaos K Robakis (New York, NY), Dr. David D Roberts (Bethesda, MD), and Dr. Joe Rogers (SunCity, AZ).

I would also thank for their outstanding technical assistance Mrs. Wanhong Ding, Mr. Noel J Boyle, Mr. William Janssen, Ms. Nancy Archin, Mr. Libang Zhang, Mr. Robert Woolley and Mrs. Weiming Gai. Thanks also to The Mount Sinai Staff: Mrs. Linda Weiss, Judith Howe, Sally Hernandez.

Mes remerciements s'adressent également à tous ceux avec qui je partage quotidiennement "la vie de labo" et en particulier Jesse, Esther, "The Boys", Annick, Marie-Laure, Marie-Christine, Bernard, Philippe, Didier, Laetitia,

Une partie de ce travail a été récompensée par une des Bourses 1992 de l'Association FRANCE ALZHEIMER ET TROUBLES APPARENTÉS dont le comité scientifique comprend: Yves Agid, Annick Alperovitch, Nicole Baumann, François Boller, Jean-Pierre Changeux, Jacques Epelbaum, Françoise Forette, Jean-Jacques Hauw, Yvon Lamour, Michel Le Moal, Jacques Mallet, Jacqueline Mikol, Jean-Marc Orgogozo, Henri Petit, Michel Poncet et Edouard Zarifian.

Ce travail de thèse et ceux effectués en parallèle ont donné lieu aux publications et communications suivantes:

LISTE DE PUBLICATIONS SOU MIS

Buée L, Hof PR, Bouras C, Delacourte A, Perl DP, Morrison JH, Fillit HM. Microvascular Pathology and the Deposition of Vascular Heparan Sulfate Proteoglycan in Senile Plaques: A Comparative Study in Alzheimer's Disease and Other Dementing Disorders. *Neurobiol Aging*, (soumis).

1992

- 1) Buée L, Hof PR, Roberts DD, Delacourte A, Morrison JH, Fillit HM. Immunohistochemical identification of Thrombospondin in normal human brain and Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 141: (sous presse).
- 2) Buée L, Ding W, Delacourte A, Fillit H. Binding of secreted human neuroblastoma proteoglycans to the Alzheimer amyloid A4 peptide. *Brain Research* (sous presse).
- 3) Hof PR, Bouras C, Buée L, Delacourte A, Perl DP, Morrison JH. Differential distribution of neurofibrillary tangles in the cerebral cortex of dementia pugilistica and Alzheimer's disease cases. *Acta Neuropathologica*. (sous presse).
- 4) Hof PR, Charpiot A, Delacourte A, Buée L, Purohit D, Perl DP and Bouras C. Distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques in the cerebral cortex in postencephalitic parkinsonism. *Neurosci Lett* 139: 10-14.
- 5) Hof PR, Bierer LM, Perl DP, Delacourte A, Buée L, Bouras C, Morrison JH. Evidence for early vulnerability of the medial and inferior aspects of the temporal lobe in a 82-year-old patient with preclinical signs of dementia: regional and laminar distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques. *Arch Neurol*, 49: 946-953.

1991

- 1) Buée L, Boyle N, Zhang L, Delacourte A, Fillit H (1991) Optimization of an Alcian blue dot-blot assay for the detection of glycosaminoglycans and proteoglycans. *Anal Biochem* 195: 238-242.
- 2) Fillit H, Ding W, Buée L, Kalman J, Altstiel L, Lawlor B, Wolf-Klein G (1991) Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 129: 318-320.
- 3) Furby A, Leys D, Delacourte A, Buée L, Soetart G, Petit H (1991) Are alpha-1-antichymotrypsin and inter-alpha-trypsin inhibitor peripheral markers of Alzheimer's disease? *J Neurol Neurosurg Psych* 54: 469.

1989

- 1) Buée L, Laine A, Delacourte A, Flament S and Han KK (1989) Qualitative and quantitative comparison of brain proteins in Alzheimer's disease. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 370: 1229-1234.
- 2) Delacourte A and Buée L (1989) Widespread and severe glial reaction in all areas of Alzheimer brains. *CR Acad Sci Paris (Série III)* 308: 359-365.

LISTE DE COMMUNICATIONS

1992

- 1) Buée L, Hof PR, Delacourte A, Perl DP, Morrison JH and Fillit H. Vascularisation corticale et démences: une étude immuno-histochimique. Société française des neurosciences, 4-7 mai 1992 (Strasbourg, France).
- 2) Buée L, Hof PR, Anderson J, Robakis N, Morrison JH, Fillit H and Delacourte A. Amyloid and Proteoglycans in Alzheimer's disease. First Lille Neurological Workshop, 25 mai 1992 (Lille, France).
- 3) Buée L, Hof PR, Nimchinsky E, Nasrallah J, Steele JC, Delacourte A, Perl DP, Morrison JH and Fillit H. Microvasculature in Guam ALS/PD cases. Sixty seventh Annual Meeting, American Association of Neuropathologists, 16-21 juin 1992 (St Louis, USA). *J Neuropath Exp Neurol*, 51: 323.
- 4) Buée L, Hof PR, Delacourte A, Morrison JH and Fillit H. Characterization of vascular and neuronal heparan sulfate proteoglycan that bind to the amyloid β protein. Third International Conference on Alzheimer's disease and related disorders. 12-17 juillet 1992 (Abano Terme Italie). *Neurobiol Aging*, 13: S82.

- 5) Buée L, Hof PR, Bouras C, Perl DP, Morrison JH, Fillit HM, Delacourte A. Analyse immunohistochimique des anomalies vasculaires dans les maladies neurodégénératives. IV^{ème} Congrès Interrégional de gérontologie clinique. 11-12 septembre 1992 (Lille, France).
- 6) Buée L, Hof PR, Delacourte A, Surini M, Bouras C. Laminar and regional distribution of neurofibrillary tangles and Pick's bodies in Pick's disease: comparison with Alzheimer's disease. Society for Neuroscience, 25-30 octobre 1992 (Anaheim, U.S.A.). Soc. Neurosci. Abstr., Vol. 18.
- 7) Buée L, Hof PR, Bouras C, Perl DP, Morrison JH, Fillit HM, and Delacourte A. Laminar and regional microvascular pathology: an immunohistochemical study in Alzheimer's disease and other dementing disorders. Sixth International Psychogeriatric Association Workshop. 30-31 octobre 1992 (Lille, France).
- 8) Fillit H, Buée L, Ding W, Delacourte A. Binding of secreted human neuroblastoma proteoglycans to the Alzheimer's amyloid A4 peptide. Society for Neuroscience, 25-30 octobre 1992 (Anaheim, U.S.A.). Soc. Neurosci. Abstr., Vol. 18.
- 9) Eisler J, Buée L, Ding W, Kisilevsky R, Narindrasorasak S, Fillit H. Three different heparan sulfate proteoglycan protein cores are present in the amyloid plaques of Alzheimer's disease. Society for Neuroscience, 25-30 octobre 1992 (Anaheim, U.S.A.). Soc. Neurosci. Abstr., Vol. 18.

1991

- 1) Buée L, Anderson J, Robakis NK, Delacourte A and Fillit HM. Binding of the secreted form of Alzheimer beta amyloid precursor to heparan sulfate. Society for Neuroscience, 10-15 novembre 1991 (New Orleans, U.S.A.). Soc. Neurosci. Abstr., Vol. 17, Part I, p. 693.
- 2) Buée L, Hof PR, Delacourte A, Perl DP, Morrison JH and Fillit H. Immunohistochemical analysis of vascular heparan sulfate proteoglycan protein core distribution in aging and dementia. Third IBRO World Congress of Neuroscience, 4-9 août 1991 (Montreal, Canada).
- 3) Fillit HM, Buée L, Hof PR, Delacourte A and Morrison JH. Cortical distribution of abnormal microvasculature and vascular heparan sulfate proteoglycan positive plaques in Alzheimer's disease. Society for Neuroscience, 10-15 novembre 1991 (New Orleans, U.S.A.). Soc. Neurosci. Abstr., Vol. 17, Part I, p. 692.
- 4) Fillit H, Ding W, Buée L, Altstiel L, Lawlor B and Forette F. Complement dependent cytotoxicity of human neuroblastoma cells by Alzheimer's disease sera. Third IBRO World Congress of Neuroscience, 4-9 août 1991 (Montreal, Canada).

- 5) Fillit H, Kalman J, Ding W, Buée L and Wolf-Klein G. Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. American Geriatrics Society, 9-12 mai 1991 (Chicago, U.S.A.).

1990

- 1) Buée L, Zhang L, Delacourte A and Fillit H. A highly sensitive semi-quantitative dot-blot assay for glycosaminoglycans and proteoglycans. Society for Complex Carbohydrates 19th annual meeting. 10-13 octobre 1990 (San Diego, U.S.A.). Glyconj. J., 7: 513.
- 2) Flament S, Buée L and Delacourte A. The neuronal antigen A68 recognized by Alz 50 in Alzheimer brains is an abnormally phosphorylated tau protein. Second International Conference on Alzheimer's disease and related disorders. 15-21 juillet 1990 (Toronto, Canada) Neurobiol. Aging, 11: 284-285.
- 3) Furby A, Leys D, Delacourte A, Buée L, Soetart G and Petit H. Are alpha-1-antichymotrypsin and Inter-alpha-trypsin inhibitor peripheral markers of Alzheimer's disease? Second International Conference on Alzheimer's disease and related disorders. 15-21 juillet 1990 (Toronto, Canada) Neurobiol. Aging, 11: 338-339.

INTRODUCTION

GÉNÉRALITÉS

La maladie d'Alzheimer est la cause de démence la plus courante chez les personnes âgées. Elle représente un problème socio-économique majeur dans les pays industrialisés où l'espérance de vie est croissante. A l'inverse d'autres maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson, aucun traitement symptomatique n'existe. Néanmoins, au cours de ces dix dernières années, la compréhension des phénomènes étiopathogéniques a progressé de façon fulgurante. L'accumulation anormale extracellulaire d'un peptide, sous forme de dépôts amyloïdes et la perte neuronale, liée à l'agrégation intracellulaire de protéines modifiées du cytosquelette sous la forme de paires de filaments en hélice, sont les deux événements majeurs responsables de la démence chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Toutefois si la cause de la maladie d'Alzheimer est encore méconnue, un certain nombre de facteurs favorisants ont été identifiés. La présence de formes familiales et l'identification de mutations situées sur le gène du précurseur du peptide amyloïde font soupçonner une prédisposition génétique. De nombreux facteurs exogènes ont également été proposés tels l'aluminium, des agents infectieux (de type prions ou virus lents), ou encore les traumatismes cérébraux. Plus récemment, d'autres hypothèses ont aussi été envisagées: réponse immunologique liée à la présence d'auto-anticorps, ou encore des processus oxydatifs avec la formation de radicaux libres.

Il est probable que la maladie d'Alzheimer ne soit pas le résultat d'un seul agent causal mais apparaisse plutôt comme l'aboutissement d'une combinaison de facteurs génétiques, environnementaux, entre autres. L'hétérogénéité de cette maladie appuie cette hypothèse. Pourtant du point

de vue neuropathologique, la maladie d'Alzheimer est considérée comme une entité unique malgré cette hétérogénéité.

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à un aspect de la maladie d'Alzheimer: l'amyloïdose et plus particulièrement les relations protéine amyloïde et glycosaminoglycannes/protéoglycannes. En effet, les amyloïdoses systémiques et cérébrales ont la particularité d'avoir en commun ces mêmes constituants: les glycosaminoglycannes. Ce sont des polysaccharides sulfatés liés de façon covalente à un axe protéique. La glycoprotéine résultante est dénommée protéoglycane. Dans la maladie d'Alzheimer, ils s'accumulent dans les dépôts amyloïdes et les neurones en dégénérescence.

Dans un premier temps, nous décrirons brièvement la maladie d'Alzheimer sous ces aspects cliniques, neuropathologiques, génétiques, biologiques et biochimiques. Puis, la structure et le rôle des glycosaminoglycannes dans l'amyloïdose seront définis.

1 Aspects cliniques:

La démence résulte d'une affection cérébrale qui détériore progressivement la fonction intellectuelle provoquant des troubles majeurs de la personnalité et de l'adaptation sociale.

La définition de la maladie d'Alzheimer est anatomo-clinique. Son diagnostic reste difficile malgré la somme considérable de travaux qui lui ont été consacrée dans les deux dernières décennies. Sa prévalence semble de toute façon avoir été sous-estimée. L'étude des maladies neurodégénératives a montré que la maladie d'Alzheimer est la forme la plus commune de démence sénile (Evans et al., 1989) et qu'environ 11 % de la population âgée de plus de 65 ans et jusqu'à 50 % des individus âgés de plus de 85 ans répondent aux critères diagnostiques validant une "maladie d'Alzheimer probable" (McKhann et al., 1984) en fonction d'échelles d'évaluation neuropsychologique (Evans et al., 1989).

1.1 la démence de la maladie d'Alzheimer

1.1.1 Les signes cliniques

La sémiologie de la maladie d'Alzheimer comporte des troubles cognitifs, des troubles du comportement et des signes neurologiques.

A) Les troubles cognitifs

La mémoire

Les troubles de la mémoire sont quasi toujours les premiers en date: leur apparition est insidieuse et volontiers mise sur le compte de l'âge.

Primaire ou mémoire à court terme

Elle est caractérisée par une faible capacité à restituer une grande quantité d'information (de l'ordre de 7 ± 2 items) dans un temps court (de quelques secondes à quelques minutes). Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, elle est principalement évaluée en clinique par une variante

du paradigme de Brown-Peterson (restitution d'une liste de trois mots après une brève activité interférente). Cette mémoire à court terme est très précocement altérée dans la maladie d'Alzheimer. Elle semble due à une diminution globale des capacités de traitement de l'information (Morris, 1986).

Secondaire ou mémoire à long terme

Elle est caractérisée par une capacité illimitée dans la durée et la quantité d'informations stockées. Ce système distingue une mémoire automatique (ou implicite) et une mémoire explicite (épisode et sémantique). Dans la maladie d'Alzheimer, l'ensemble est compromis. Néanmoins, il faut distinguer ce qui est caractéristique de la démence de type Alzheimer. Les atteintes de la mémoire automatique et épisodique sont analogues à ce qui est rencontré dans les syndromes amnésiques; cela reflète une altération des systèmes hippocampiques et septaux. Au contraire, comme la mémoire primaire, l'atteinte de la mémoire sémantique est propre à la maladie d'Alzheimer. Ceci est lié à une atteinte globale du cortex cérébral et à l'étendue des lésions cérébrales (Derouesné, 1991).

Le noyau aphaso-apraxy-agnosique

Aphasie

Les troubles du langage sont considérés avec les troubles mnésiques comme les troubles cognitifs les plus fréquents. Ils sont retrouvés dans 40 à 100 p. cent des cas. Le langage écrit est souvent plus rapidement altéré que le langage oral. Le manque du mot est précoce ainsi qu'une réduction dans les épreuves de fluence verbale.

Apraxie

Les perturbations des réalisations gestuelles sont très fréquentes dans la maladie d'Alzheimer. Elles provoquent une difficulté à se servir des objets usuels comme les objets ménagers, les outils de bricolage, les couverts, ce qui réduit de façon importante l'autonomie du patient. L'apraxie réflexive et l'apraxie constructive sont les plus précoces.

Agnosie

Elle est essentiellement visuelle et est beaucoup moins étudiée. Au cours de l'évolution, une difficulté à reconnaître les visages peut apparaître (prosopagnosie).

B) Les signes neurologiques

Extrapyramidaux

Une augmentation du tonus musculaire est fréquemment rencontrée au cours de la maladie d'Alzheimer. Cette rigidité extrapyramidale, pouvant être associée à une akinésie, est parfois difficile à différencier d'une rigidité d'opposition. L'intensité de l'hypertonie est corrélée avec la sévérité de la démence. Une dyskinésie buccofaciale a également été décrite.

Myoclonies

Elles ont été rapportées dans 10 p. cent des cas et principalement dans des démences sévères.

C) Les troubles comportementaux

Dépression

Elle a d'abord été considérée comme une réaction psychologique du malade à la diminution de ses capacités intellectuelles, mais elle pourrait être une complication spécifique en rapport direct avec

les lésions de la maladie d'Alzheimer (Derouesné, 1991). Étant donné la présence d'une démence, cette dépression est difficilement mesurable par les critères de diagnostic généralement utilisés pour les démences "primaires". Les fréquences varient selon les études de 15 à 57 p. cent (Lazarus et al., 1987).

Comportements psychopathologiques

La réduction des activités

Dans la vie quotidienne, le patient réduit son activité pour éviter de se trouver dans des situations qui lui seront difficiles à résoudre. Ainsi, de façon très précoce, il est courant d'observer chez le malade des comportements passifs tels qu'une perte de l'initiative, un émoussement affectif, ou une anxiété. Plus tardivement, la réduction des activités témoigne de l'incapacité à les réaliser du fait des troubles mnésiques et praxiques.

Les comportements d'agitation

Certains malades ont des conduites stéréotypées, ils réalisent des tâches sans raison. Les fugues sont également courantes, et des comportements agressifs sont parfois observés, plus volontiers chez des patients méconnaissant leurs troubles (anosognosiques).

Les manifestations psychotiques

Des hallucinations sont décrites dans 5 à 20 p. cent des cas. Les malades ont parfois des idées délirantes: idées de vol et d'abandon ou présentent des manifestations hypochondriaques.

Autres

Des perturbations du comportement alimentaire, et plus rarement du comportement sexuel ont été signalées. Une incontinence sphinctérienne est fréquemment rapportée lorsque la démence est évoluée.

1.1.2 L'hétérogénéité de la maladie d'Alzheimer

Si la maladie d'Alzheimer se définit selon les caractéristiques cliniques décrites ci-dessus, elle possède également une grande hétérogénéité dans sa présentation.

A) Selon l'âge de début

La maladie d'Alzheimer a été classiquement séparée en forme présénile, débutant avant 65 ans, et en forme sénile (Amaducci et al., 1986). Les études anatomo-cliniques actuelles ont mis en évidence que cette distinction n'est pas justifiée, et ces deux formes ont été regroupées sous la même appellation (McKhann et al., 1984).

Trois formes sont néanmoins différenciées: la première est la démence présénile "classique" avec une symptomatologie homogène incluant un noyau aphaso-apraxo-agnosique (Chui et al., 1985); elle peut également incorporer des formes séniles. La forme sénile est subdivisée en deux sous-groupes. La "démence sénile de type Alzheimer" est caractérisée par des symptômes pariétaux marqués alors que la "démence sénile simple" se manifeste par des troubles de la mémoire, une désorientation et une réduction du langage, sans prédominance de signes pariétaux (Constantinidis et Richard, 1985).

B) Selon les signes cliniques

Aphasie

Comme nous l'avons vu, elle représente un élément essentiel dans le diagnostic de la maladie d'Alzheimer. Néanmoins, elle n'est pas observée chez tous les patients: sa présence semble dépendre de la sévérité de la maladie et de sa durée au moment de l'examen (Selnes et al., 1988). Au contraire, elle pourrait être révélatrice chez les patients ayant une vulnérabilité particulière de l'hémisphère gauche (Jagust et al., 1987; Green et al., 1990).

Les manifestations focales

Un certain nombre de cas avec des déficits neurologiques focaux ont été rapportés à une maladie d'Alzheimer (confirmée par biopsie ou autopsie) tels que des cas avec un déficit moteur (Jagust et al., 1990; Golaz et al., 1992); avec syndrome pariétal droit (Crystal et al., 1982) et finalement d'autres avec des troubles visuo-spatiaux (Benson et al., 1988; Berthier et al., 1991; Hof et al., 1989; 1990).

Les signes extrapyramidaux

L'existence d'un sous-groupe de patients avec signes extrapyramidaux a été mise en évidence par de nombreux auteurs (Pearce, 1974; Mölsä et al., 1984; Stern et al., 1987).

C) Selon l'évolution

L'évolution peut être représentée par le modèle en trois étapes (Gustafson, 1985). La première étape insidieuse, est dominée par les troubles mnésiques quel que soit l'âge de début. La deuxième étape est dominée par les signes corticaux tels aphasie, apraxie et agnosie alors que les troubles mnésiques s'aggravent. Des troubles de la personnalité apparaissent et le contrôle émotionnel s'émousse. La dernière est caractérisée par une atteinte sévère et diffuse des fonctions intellectuelles, aboutissant à une démence évoluée et à la mort en quelques mois.

Il existe aussi à tout âge des formes où l'aggravation est lente (Mayeux et al., 1985). Certains travaux ont suggéré que signes extrapyramidaux, myoclonies, détérioration intellectuelle sévère, sexe masculin et altération importante des activités étaient des éléments prédictifs d'une évolution défavorable (Stern et al., 1987) et d'un décès plus précoce (Heyman et al., 1987). Il existe aussi une corrélation entre sévérité de l'aphasie et mortalité ou institutionnalisation précoce à degré égal de détérioration intellectuelle (Knesevich et al., 1985).

D) Selon les critères génétiques

La plupart des cas de maladie d'Alzheimer sont sporadiques mais une prédisposition génétique existe. Les études de cas familiaux ou de jumeaux suggèrent une transmission autosomique dominante. Un certain nombre de mutations dans les cas d'Alzheimer familiaux ont été très récemment mis en évidence (Goate et al., 1991; Chartier-Harlin et al., 1991; 1992) au niveau du gène du précurseur amyloïde (voir paragraphe 3.2.1).

E) Selon les critères d'imagerie

Le scanner-X et l'imagerie par résonance magnétique nucléaire mettent en évidence une atrophie cérébrale caractérisée par un élargissement des sillons corticaux et des ventricules. L'atrophie dépend du stade évolutif de la maladie et de la sévérité de la démence avec toutefois un chevauchement important des résultats entre patients et témoins (Leys et al., 1989a). L'évaluation de l'atrophie temporale et hippocampique permet mieux de différencier les patients des témoins (Scheltens et al., 1992a). Ces outils radiologiques ont également permis d'individualiser un sous-groupe de patients avec des anomalies de la substance blanche (Scheltens et al., 1992b).

Même si un hypométabolisme temporo-pariétal bilatéral est caractéristique, les techniques d'imagerie métabolique, tomographie d'émission de positon (PET-scan) ou monophotonique (SPECT) ont identifié des sous-types métaboliques et leur correspondance avec des sous-types cliniques distincts (Leys et al., 1989b; Weinstein et al., 1992).

1.2 Le diagnostic clinique

Le diagnostic de démence est étayé par une évaluation neuropsychologique. La précocité et la validité de ce diagnostic dépendent de la qualité des méthodes utilisées, ce qui explique le rôle des épreuves psychométriques dans la mise en évidence de la détérioration des activités cognitives.

1.2.1 Les échelles d'évaluation

Il existe un certain nombre de tests psychométriques. Les plus utilisés sont l'échelle de Blessed (Blessed et al., 1968 - annexe III), le *mini mental test* (Folstein et al., 1975 - annexe IV), l'échelle de Reisberg (Reisberg et al., 1982) et l'échelle d'intelligence de Wechsler pour adultes (WAIS-R) (Wechsler, 1989). Il existe également des échelles d'évaluation psychocomportementales telle l'échelle de Hamilton (Hamilton, 1967) qui donne des informations sur l'état thymique du patient.

1.2.2 Les critères diagnostiques

A) DSM III R (*Diagnostic and statistical manual of mental disorders*)

Les critères de démences dégénératives primaires du DSM III de l'association américaine de psychiatrie (American Psychiatric Association, 1980, révisé en 1987) ont permis un pas important vers un choix judicieux des critères diagnostiques de démence. Néanmoins, la plupart des équipes spécialisées préfère utiliser des critères plus spécifiques de la maladie d'Alzheimer, en particulier ceux du NINCDS-ADRDA.

B) NINCDS-ADRDA

Les critères du *National Institute of Neurological Disorders and Stroke* (NINCDS) et de l'*Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (ADRDA) (McKhann et al., 1984) apparaissent être les plus

fiables. Ils définissent trois stades de diagnostic: probable, possible et certain (annexe V).

C) Le diagnostic différentiel

L'élimination d'autres causes de démence notamment curables, nécessite la réalisation d'un certain nombre d'exams complémentaires comme une tomodensitométrie cérébrale, un bilan thyroïdien et sanguin. Un score élevé à l'échelle de Hachinski et coll. (1975) donne des arguments en faveur du diagnostic de démence par infarctus multiples.

1.3 Les traitements

Si la recherche d'une thérapie tentant de corriger les troubles mnésiques a montré la multiplicité des anomalies de neurotransmission, le traitement, à proprement parler, de la maladie d'Alzheimer n'existe pas. Des essais ont été réalisés ou sont en cours de réalisation pour l'activation des systèmes de neurotransmission cholinergique, aminergique, et neuropeptidergiques (ACTH, Arg vasopressine) et l'inhibition des systèmes GABAergique et opiacés. L'approche glutamatergique est plus délicate de part le caractère excitotoxique de ce neurotransmetteur. Il a été aussi envisagé d'agir sur les phénomènes biologiques qui conduisent à l'accumulation des constituants des lésions neuropathologiques tels que la protéolyse ou la phosphorylation. De même, l'utilisation de facteurs trophiques et de greffes cellulaires a été proposée (pour revue, Pomponi et al., 1990). Néanmoins, ces essais thérapeutiques sont rendus difficiles du fait de l'hétérogénéité de la maladie.

2 Aspects neuropathologiques

2.1 L'atrophie cérébrale

2.1.1 Les données macroscopiques

Le poids des cerveaux de patients atteints de maladie d'Alzheimer est en dessous de la normale par rapport aux cerveaux contrôles. Néanmoins, ces résultats, valables pour une population donnée, ne le sont pas pour un individu particulier, et ne peuvent donc pas être considérés comme critère diagnostique. En effet, ils ne tiennent pas compte de l'effet de cohorte: le poids moyen du cerveau s'est en effet accru au cours du siècle. Il n'est donc pas possible de comparer sans biais le poids du cerveau de personnes nées à quelques décennies d'intervalle (Miller et Corsellis, 1977).

A) Atrophie corticale

Elle est diffuse et n'est significative que pour les lobes temporal et frontal chez les patients âgés de plus de 75 ans. Le lobe occipital est le plus souvent épargné. L'atrophie corticale se traduit par un rétrécissement des circonvolutions et un élargissement des sillons.

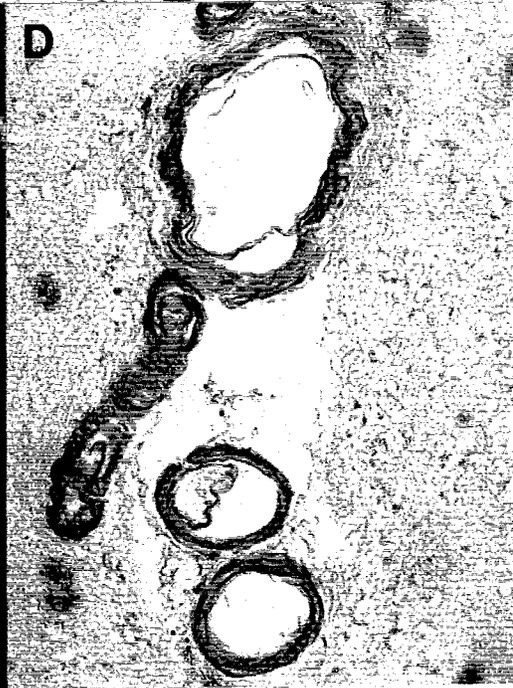
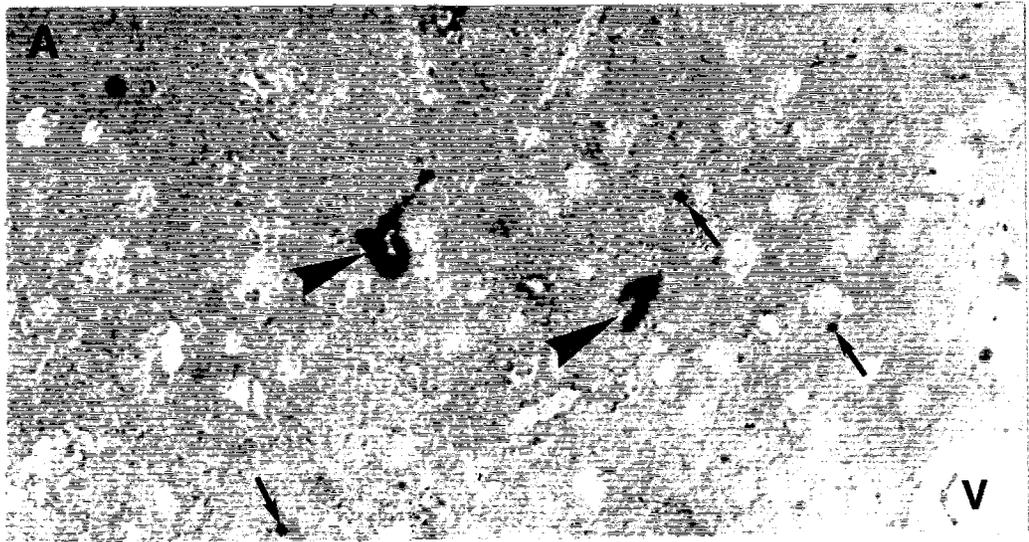
B) Dilatation ventriculaire

Dans les cas sévères, une dilatation des ventricules latéraux et du III^{ème} ventricule peut être observée. Elle est sans doute liée à une réduction de volume de la substance blanche.

2.1.2 Les données microscopiques

A) La perte neuronale

Contrairement au vieillissement cérébral normal où s'observe une diminution de volume des grands neurones, il existe une véritable perte neuronale dans la maladie d'Alzheimer de l'ordre de 22 à 26 p. cent (Terry et al., 1981; Mountjoy et al., 1983).



B) La réponse gliale

Elle est caractérisée par une gliose astrocytaire (Mandybur et Chuirazzi, 1990) et une présence de microglie à la périphérie des lésions (Perlmutter et al., 1990b). Les cellules microgliales contiguës aux dépôts amyloïdes sont considérées par certains comme une réponse à une agression (Ohgami et al., 1991) et par d'autres comme un élément fondamental dans l'amyloïdose (Perlmutter et al., 1990b; Wisniewski et al., 1991).

C) Les lésions

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par deux grands types de lésions neuropathologiques: les neurones en dégénérescence neurofibrillaire et les dépôts amyloïdes (Figure I). La nature de ces lésions sera exposée dans les prochains paragraphes. Il faut noter que ces lésions sont trouvées également chez les trisomiques 21 (Syndrome de Down). Chez ces sujets, les dépôts amyloïdes sont détectés vers 20 ans et la dégénérescence neurofibrillaire vers 35 ans (Mann et al., 1989a, b, c).

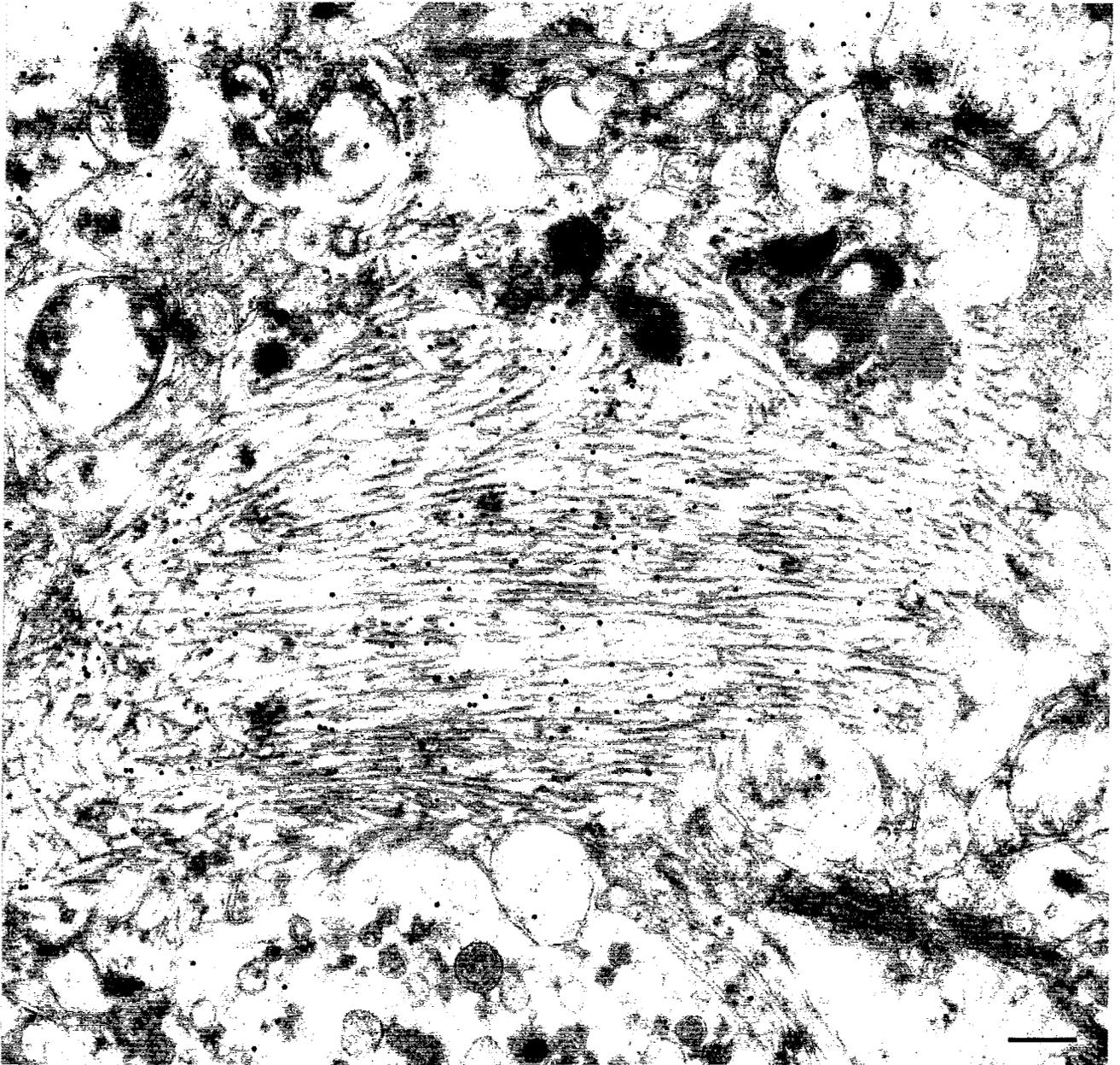
2.2 La dégénérescence neurofibrillaire

2.2.1 La description des lésions

A) Microscopie électronique

La dégénérescence neurofibrillaire est caractérisée par l'accumulation intraneuronale de paires hélicoïdales de filaments (PHF) (Figure II). Ces PHF ont été décrites pour la première fois en 1963 par Kidd. Les filaments ont un diamètre de 10 à 12 nm et forment une hélice d'un pas de 80 nm.

Figure II



Réaction immunocytochimique réalisée avec un anticorps anti-tau révélé par un anticorps secondaire couplé à l'or colloïdal (20 nm de diamètre). Noter l'amas de filaments en hélice. Les particules d'or sont trouvées principalement sur les PHF. Echelle = 300 nm.

Ces clichés nous ont été gracieusement fournis par le Dr. André Défossez, INSERM U156, Lille.

B) Microscopie optique

Techniques histochimiques

Propriétés argyrophiles

Les PHF possèdent des propriétés argyrophiles et peuvent être mises en évidence par de nombreuses imprégnations argentiques (Gallyas, 1971; Campbell et al., 1987). Par ces colorations, il est possible de visualiser le périkaryon des neurones en dégénérescence, mais aussi des neurites en dégénérescence. Ces derniers se présentent sous la forme de "virgules" dispersées dans le neuropile. Ils sont parfois regroupés sous la forme d'amas sphériques ou trouvés à la périphérie des dépôts amyloïdes (plaques séniles et angiopathie dyshorique) (Delacourte et al., 1987; Lenders et al., 1989).

Structure en feuillets β plissés

Certains neurones et neurites en dégénérescence neurofibrillaire peuvent être visualisés par des colorants de la substance amyloïde tels que le rouge Congo et la thioflavine S. Par conséquent, les constituants des PHF ont probablement une structure en feuillets β plissés.

Techniques immunohistochimiques

Les PHF sont des structures très insolubles et aucune séquence n'a pu être déterminée chimiquement. Néanmoins, elles ont pu être purifiées grâce à ce caractère insoluble. Ces PHF isolées ont été injectées à des lapins pour produire des immunosera dirigés contre les PHF. Un certain nombre de constituants ont été ainsi décrits tels que les protéines tau, l'ubiquitine, les protéoglycannes et le peptide A4.

Les anti-protéines tau

De nombreuses équipes ont démontré que les protéines tau sont les constituants majeurs des PHF (Brion et al., 1985; Delacourte et Défossez, 1986; Grundke-Iqbal et al., 1986; Kosik et al., 1986; Nukina et al.,

1986; Wood et al., 1986) (Figure II). Ces anticorps permettent la visualisation des neurones et neurites en dégénérescence mais également des neurones au début de la dégénérescence (Figure Ia). L'immunoréactivité observée est alors confinée à une partie du domaine somatique dans un neurone encore bien individualisé.

Les anti-neurofilaments

Les résultats obtenus avec les anti-neurofilaments sont très différents d'un laboratoire à l'autre (Anderton et al., 1982; Lee et al., 1988; Mulvihill et Perry, 1989). Ils semblent que les neurofilaments partagent des épitopes communs avec les protéines tau pathologiques (Nukina et al., 1987; Lee et al., 1988). Cette hypothèse a été récemment confirmée par les études biochimiques (voir Généralités paragraphe 3.1.3).

Les anti-MAP2 (*microtubule-associated-protein 2*)

Là aussi, les résultats sont très différents d'un laboratoire à l'autre (Kosik et al., 1984; Dammerman et al., 1989; Mulvihill et Perry, 1989; Roseblatt et al., 1989; Hasegawa et al., 1990). MAP2 possède des séquences communes avec les protéines tau (les domaines d'affinité aux microtubules). Il est donc possible d'observer des réactions croisées.

L'anti-ubiquitine

Ces anticorps marquent des neurones en dégénérescence à un stade avancé (Bancher et al., 1991). Il est probable que la présence d'ubiquitine soit une réponse de la cellule à l'accumulation anormale des protéines tau.

L'anti-A4

Un marquage de neurones en dégénérescence par des anticorps dirigés contre le peptide amyloïde est également observé (Masters et al., 1985; Perry et al., 1991). Néanmoins, ces résultats ne font pas l'unanimité (Behrouz et al., 1990).

2.2.2 Distribution régionale

Dans la maladie d'Alzheimer, les régions les plus touchées par la dégénérescence neurofibrillaire sont d'abord les régions hippocampiques et parahippocampiques, en particulier, le cortex entorhinal (aire 28), le subiculum et le CA1. Il faut noter que le gyrus dentatus et les régions CA2, CA3 et CA4 sont relativement épargnées. Les régions de l'amygdale et en particulier, le noyau basal accessoire de l'amygdale présentent également une importante dégénérescence neurofibrillaire (Arnold et al., 1991). Elle s'étend ensuite aux régions voisines du cortex entorhinal, de l'hippocampe, et de l'amygdale et touche aussi le pôle temporal (aire 38), le cortex périrhinal (aire 35), la région parahippocampique postérieure, et à un degré moindre les régions néocorticales du lobe temporal. Les régions néocorticales temporales et frontales, et le noyau basal de Meynert montrent une forte variabilité dans leur nombre de neurones en dégénérescence contrairement aux régions limbiques et paralimbiques (Arnold et al., 1991).

2.2.3 Distribution laminaire

Les couches II, III, V et VI du néocortex sont les plus atteintes. Elles correspondent aux couches des neurones pyramidaux. Le subiculum et les couches II et V du cortex entorhinal sont toujours fortement affectés par la dégénérescence neurofibrillaire, ainsi que la couche pyramidale du CA1. Le CA4 est légèrement touché. Finalement, les régions CA2 et CA3 sont très légèrement atteintes (Rogers and Morrison, 1985; Pearson et al., 1985; Hyman et al., 1986; Lewis et al., 1987; Hof et al., 1990; Hof and Morrison, 1990; Morrison et al., 1990; Arnold et al., 1991; Braak et Braak, 1991; Price et al., 1991; Terry et al., 1991).

2.2.4 Cinétique d'apparition

La cinétique d'apparition de la dégénérescence neurofibrillaire a été déterminée chez des patients non déments et déments (Braak et Braak, 1991) ou atteints du syndrome de Down (Mann et al., 1989b).

La dégénérescence neurofibrillaire apparaît tout d'abord au niveau de la couche II de la région entorhinale/trans-entorhinale. Elle s'étend ensuite à la couche V du cortex entorhinal et la couche pyramidale du CA1. Puis, les couches III et V du néocortex sont affectées. Finalement, la dégénérescence atteint le CA4 et parfois même des régions sous-corticales tels que le striatum et le thalamus (Braak et Braak, 1990, 1991)

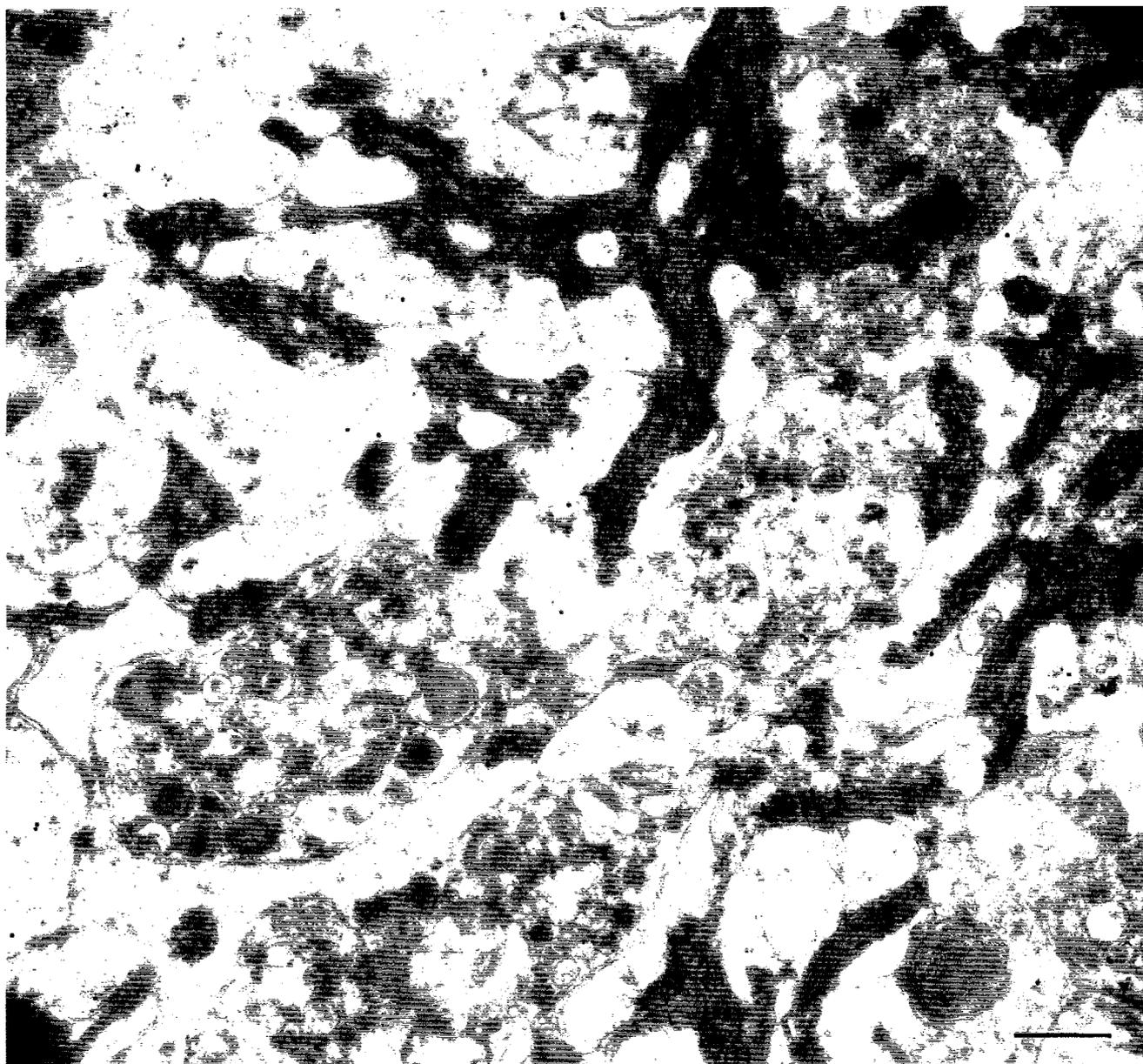
2.3 La substance amyloïde

2.3.1 La description des lésions

A) à l'échelle de la microscopie électronique

La substance amyloïde est constituée de filaments droits de 6 à 9 nm de diamètre (Merz et al., 1983) (Figure III). Lorsque ces filaments s'accumulent dans le domaine extracellulaire sous la forme de dépôts sphériques, ils prennent la dénomination de plaques séniles. Une autre forme d'accumulation de filaments amyloïdes dans la paroi des vaisseaux est fréquemment observée au cours de la maladie d'Alzheimer. Il s'agit de l'angiopathie. Elle est dite congophile quand elle se limite à la paroi des gros vaisseaux perforants. Elle est appelée dyshorique quand l'amyloïde s'étend au parenchyme cérébral au voisinage du vaisseau congophile. Dans ce dernier cas, elle affecte peu les gros vaisseaux perforants mais plus particulièrement les artérioles et les capillaires de la couche IV du cortex visuel primaire, mais elle peut être également rencontrée dans d'autres régions du cortex cérébral (Morel, 1943).

III



Réaction immunocytochimique réalisée avec l'anticorps anti-peptide A4 (1-28) révélé par un anticorps secondaire couplé à l'or colloïdal (20 nm de diamètre). Noter la présence de filaments droits marqués. Echelle = 600 nm.

Ces clichés nous ont été gracieusement fournis par le Dr. André Défossez, INSERM U156, Lille.

B) à l'échelle de la microscopie optique

Techniques histochimiques

Propriétés argyrophiles

La structure quaternaire filamenteuse des dépôts amyloïdes leur confère également une affinité pour les sels d'argent. De nombreuses méthodes de coloration sont utilisées telles que les techniques de Gallyas (1971), Bodian, Campbell-Switzer (Campbell et al., 1987)...

Structure en feuillets β plissés

Les dépôts amyloïdes ont une structure secondaire en feuillets β plissés qui leur confère un certain nombre de caractéristiques telles que la diffraction des rayons X et leur mise en évidence par un certain nombre de colorants électifs comme le rouge Congo et la thioflavine S. Les dépôts amyloïdes apparaissent biréfringents en lumière polarisée après utilisation du rouge Congo. En fluorescence en lumière ultra-violette, les dépôts amyloïdes dans le milieu extracellulaire ou dans la paroi des vaisseaux (Figure Ic) peuvent être visualisés après coloration à la thioflavine.

Techniques immunohistochimiques

L'analyse des constituants des dépôts amyloïdes s'est faite grâce à des techniques immunohistochimiques. Seule la protéine principale de ces dépôts a pu être isolée biochimiquement, il s'agit d'un peptide de 42-43 acides aminés, appelé β protéine ou peptide A4 (Glennner et Wong, 1984).

Anti-A4

En utilisant un immunsérum dirigé contre le peptide A4, il est possible de mettre en évidence les deux types de dépôts amyloïdes: les plaques séniles (Figure Ib, III) et l'angiopathie amyloïde (Figure Id). De plus, une nouvelle structure a été découverte: elle a été définie comme des dépôts pré-amyloïdes qui infiltrent le tissu nerveux (Figure Ib). Ceux-ci n'ont pas toujours les caractéristiques biophysiques des plaques séniles. En

particulier, ils ne sont pas ou peu colorés par la thioflavine S et le rouge Congo (Vallet et al., 1992). Récemment, des classifications des différents types de dépôts amyloïdes ont été proposées par de nombreux auteurs. Nous avons retenu celle de Ikeda et coll. (1989). Elle est divisée en quatre types: 1) dépôts amyloïdes avec core; 2) dépôts amyloïdes sans core détectable (non détectable au rouge Congo); 3) dépôts amyloïdes granulaires et 4) agrégats de granules immunoréactives (non détectable au rouge Congo et à une coloration à l'argent).

Autres constituants

D'autres constituants ont été détectés dans les plaques séniles. Il en existe à l'heure actuelle une trentaine: α_1 -antichymotrypsine, apolipoprotéine B, apolipoprotéine E, collagène IV, protéines du complément, composé P amyloïde, *fibroblast growth factor* (FGF) basique, fibronectine, glycosaminoglycannes, immunoglobulines, *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1), laminine, protéase nexine I, protéoglycannes...

2.3.2 Distribution régionale

Les régions néocorticales sont particulièrement affectées dans la maladie d'Alzheimer. Les lobes temporaux et occipitaux sont les plus riches en plaques séniles, suivis du lobe pariétal, et du lobe frontal. La région limbique contient en général peu de dépôts amyloïdes (Arnold et al., 1991 ; Price et al., 1991). L'angiopathie congophile touche principalement les artères perforantes du néocortex. L'angiopathie dyshorique est le plus souvent rencontrée dans le cortex visuel primaire (aire 17) (Morel, 1943).

2.3.3 Distribution laminaire

Selon les premières études utilisant des colorations à l'argent ou à la thioflavine, les plaques séniles sont trouvées principalement au niveau des

couches III puis V du néocortex (Rogers and Morrison, 1985; Lewis et al., 1987).

L'utilisation d'anticorps spécifiques du peptide A4 a permis de montrer que les dépôts amyloïdes ont en fait une distribution laminaire moins restreinte. Ils sont retrouvés dans toutes les couches du cortex (Braak et Braak, 1991; Delaère et al., 1991) et même à la limite substance blanche-substance grise (Braak et Braak, 1991) ou au niveau de certains microvaisseaux (Behrouz, 1990) dans la substance blanche.

2.3.4 Cinétique d'apparition

Il est très difficile d'établir une cinétique d'apparition des dépôts amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer. Leurs distribution et quantification sont réalisées pour des patients diagnostiqués avec une maladie d'Alzheimer mais avec un dossier clinique pauvre (peu ou pas de critères psychométriques, peu ou pas d'imagerie). Les études réalisées ont donc été établies de façon rétrospective sur des populations de déments et non-déments (Braak et Braak, 1991), mais également sur des patients de différents âges atteints du syndrome de Down (Mann et al., 1989; Mann et Esiri, 1989).

Selon Braak et Braak, trois stades (A, B, et C) sont à distinguer selon la gravité de l'amyloïdose. Au stade A, les premiers dépôts amyloïdes sont trouvés en faible quantité dans les régions basales du cortex frontal, temporal et occipital. L'hippocampe est épargné, la couche parvocellulaire du présubiculum et la couche II du cortex entorhinal montrent de rares dépôts. Au stade B, les aires associatives de presque l'ensemble de l'isocortex contiennent des densités moyennes de dépôts amyloïdes. Les couches pyramidales du CA1 et du subiculum et la couche moléculaire du gyrus dentatus sont également légèrement touchées. La couche parvocellulaire du présubiculum est remplie de dépôts amyloïdes et des

"bandes" amyloïdes sont observées au niveau du subiculum. Au stade C, l'ensemble de l'isocortex, y compris les aires isocorticales primaires, est touché. La formation hippocampique montre le même profil qu'au stade B.

Les résultats obtenus chez les patients avec syndrome de Down donnent globalement les mêmes résultats, avec l'exception de l'hippocampe qui serait touché plus tôt et serait beaucoup plus affecté (Mann et al., 1989; Mann et Esiri, 1989).

2.4 Les relations dépôts amyloïdes et dégénérescence neurofibrillaire

L'origine de la substance amyloïde reste inconnue. Toutes les cellules sont candidates: neurones (Masters et al., 1985; Perry et al., 1992a, 1992b), cellules gliales (Wisniewski et al., 1991; Perlmutter et al., 1990b) et cellules endothéliales (Selkoe, 1990). Deux types de situation sont généralement envisagés: la première est l'apparition de la substance amyloïde suivie de la dégénérescence neurofibrillaire (Hardy et Higgins, 1992) et la seconde est la pathologie neuronale précédant les dépôts amyloïdes (Masliah et al., 1990; Terry et al., 1991; Perry et al., 1992b). En addition à ces deux hypothèses, il est possible qu'il y ait une cellule productrice de la protéine amyloïde et une cellule effectrice pour la transformation en amyloïde (Wisniewski et al., 1991). Il n'est donc pas possible à partir des données immunohisto- et immunocytochimiques de déterminer les éléments impliqués dans le processus pathologique de la maladie d'Alzheimer.

3 Aspects biochimiques et génétiques

3.1 La dégénérescence neurofibrillaire

3.1.1 Les protéines tau

A) Rôle

Les protéines tau sont des protéines associées aux microtubules (Cleveland et al., 1977a). Elles sont des facteurs de polymérisation des microtubules (Cleveland et al., 1977b) qui sont modulés par leur état de phosphorylation. Les protéines tau déphosphorylées favorisent la polymérisation des microtubules (Lindwall et Cole, 1984; Drubin et Kirschner, 1986). La liaison des protéines tau aux microtubules est également régulée par la calmoduline (Erneux et al., 1984).

D'autres fonctions des protéines tau ont été proposées suite à leurs interactions non seulement avec les microtubules mais aussi avec les neurofilaments (Leterrier et al., 1982; Miyata et al., 1986). Ainsi, les protéines tau joueraient un rôle dans la différenciation d'un neurite vers une identité axonale (Ferreira et Caceres, 1989; Ferreira et al., 1989) et favoriseraient la croissance axonique (Kanai et al., 1989).

B) Localisation

Les protéines tau sont d'abord des protéines neuronales mais elles sont rencontrées dans d'autres types cellulaires, en particulier les fibroblastes (Kanai et al., 1989). Au niveau cellulaire, elles se trouvent tout d'abord dans l'axone (Weingarten et al., 1975; Binder et al., 1985), mais aussi dans les dendrites et le soma. Leur trafic intracellulaire serait lié à leur état de phosphorylation.

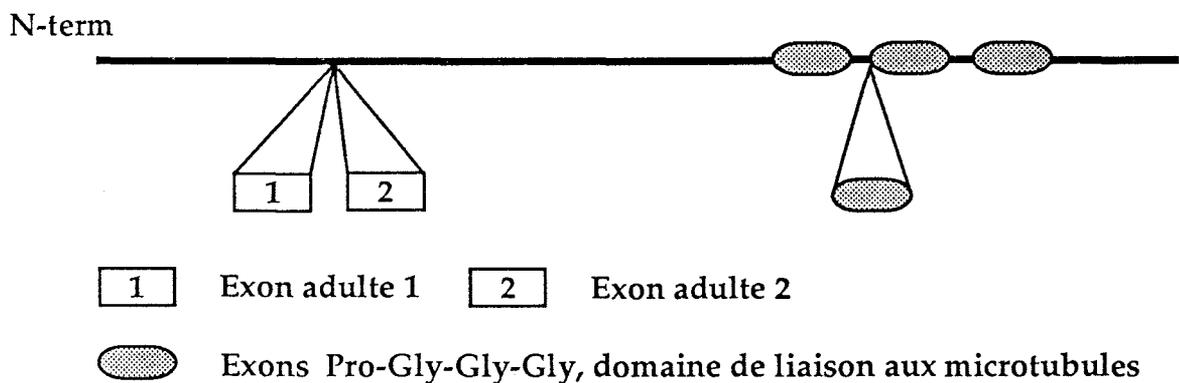
C) Structure

Les protéines tau forment une famille hétérogène de protéines de 55 à 62 kDa. Cette importante hétérogénéité est due à la fois à un épissage alternatif et à une phosphorylation différentielle.

Les protéines tau proviennent d'un gène unique, situé sur le chromosome 17 (Schmidt et Cooper, 1988), dont la structure a été récemment déterminée (Goedert et al., 1989). Elles possèdent un domaine d'affinité pour les microtubules dans leur partie C-terminale, contenant une séquence répétitive Pro-Gly-Gly-Gly, qui se répète trois ou quatre fois. De plus, il y a l'ajout d'une ou deux insertions de 29 ou 58 acides aminés dans leur partie N-terminale (Figure IV). Ces modifications s'expliquent par un épissage alternatif. Jusqu'à présent, seulement six variants de protéines tau ont été identifiés (Goedert et Jakes, 1990). Les deux insertions de 29 ou 58 acides aminés, spécifiques à l'adulte correspondent respectivement à l'exon adulte 1 et aux exons adultes 1 et 2. Au contraire, la présence des trois et quatre domaines répétitifs Pro-Gly-Gly-Gly peut coexister chez l'adulte et le fœtus.

Figure IV

Structure des six variants de protéines tau



Les protéines tau sont phosphorylables par un ensemble de protéines kinases (protéine kinase C, protéine kinase A, protéine kinase II Ca²⁺/calmoduline dépendante, sérine/thréonine-proline kinases). Certaines kinases telle que la Ca²⁺/calmoduline dépendante modifie leur

migration électrophorétique non seulement en isoélectrofocalisation mais aussi en SDS-PAGE (Baudier et Cole, 1987).

Les protéines tau peuvent former des paracristaux (Lichtenberg et al., 1988) dont l'élasticité est liée à leur état de phosphorylation. Les protéines tau phosphorylées sont longues et rigides contrairement aux non-phosphorylées qui sont courtes (Hagestedt et al., 1989).

D) Régulation

Les protéines associées aux microtubules telles que MAP2 et les protéines tau sont trouvées dans l'ensemble des neurites non différenciés. Au cours de la différenciation en axone et dendrites, une ségrégation est observée. MAP2 se retrouve dans les dendrites et les protéines tau principalement dans l'axone. Ces résultats suggèrent que les interactions du neurone avec d'autres cellules ou d'autres types cellulaires peuvent modifier l'expression des protéines tau et des MAP (Cambray-Deakin, 1991).

3.1.2 Les protéines tau, constituants antigéniques majeurs des PHF

La présence des protéines tau dans les PHF a été démontrée simultanément dans de nombreux laboratoires (Brion et al., 1985; Delacourte et Défossez, 1986; Grundke-Iqbal et al., 1986; Kosik et al, 1986; Nukina et al., 1986; Wood et al, 1986).

3.1.3 Les protéines tau dans les PHF sont anormalement phosphorylées

En 1986, une phosphorylation des protéines tau dans la maladie d'Alzheimer est suggérée (Grundke-Iqbal et al., 1986; Ihara et al, 1986; Wood et al, 1986). En 1989, Flament et al. ont mis en évidence deux variants anormaux des protéines tau de masse moléculaire plus élevée, appelées tau

64, tau 69. Ces deux variants ont une mobilité électrophorétique différente résultant d'une phosphorylation anormale (Delacourte et al., 1989; Flament et al., 1989a; 1989b; 1989c).

A) Identification d'un triplet de protéines tau pathologiques

L'analyse immunochimique des protéines tau a permis de mettre en évidence non pas deux mais trois protéines, dénommées tau 55, 64 et 69, anormalement phosphorylées (Delacourte et al., 1990) (Figure V). Ceci a été ensuite confirmé par d'autres équipes avec des approches différentes telles que la purification des PHF ou des protéines tau insolubles en milieu SDS (Ksiezak-Reding et al, 1990; Greenberg et Davies, 1990; Hanger et al, 1991). Les PHF isolées sont constituées du triplet de protéines tau anormalement phosphorylées (Greenberg et Davies, 1990).

B) Le triplet résulte de la phosphorylation des six variants de protéines tau

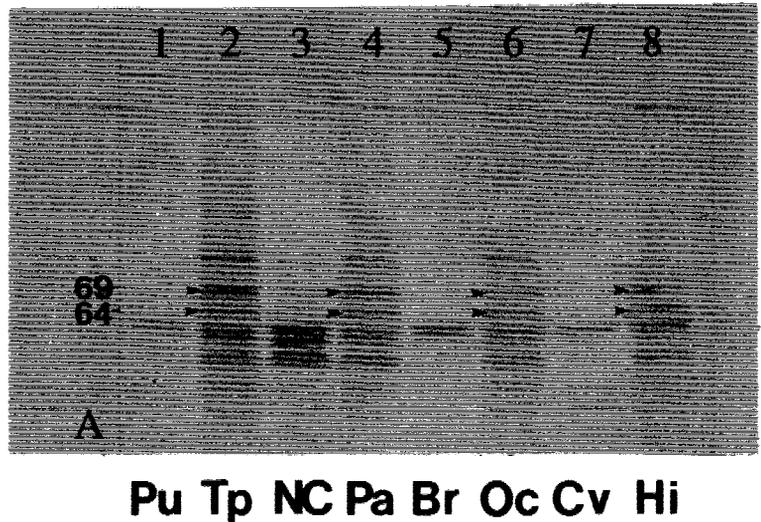
L'origine du triplet a été récemment démontrée. Il résulte de la phosphorylation des six variants de protéines tau (Brion et al., 1991; Goedert et al., 1992). La protéine tau 69 provient de la fusion des deux isoformes avec deux insertions adultes contenant trois ou quatre domaines répétitifs de liaison aux microtubules; la protéine tau 64 de deux isoformes avec une insertion adulte contenant trois ou quatre domaines répétitifs de liaison aux microtubules, et la protéine tau 55 de deux isoformes sans aucune insertion mais avec soit les trois, soit les quatre domaines répétitifs de liaison aux microtubules (Goedert et al., 1992).

C) Mise en évidence des sites de phosphorylation anormale

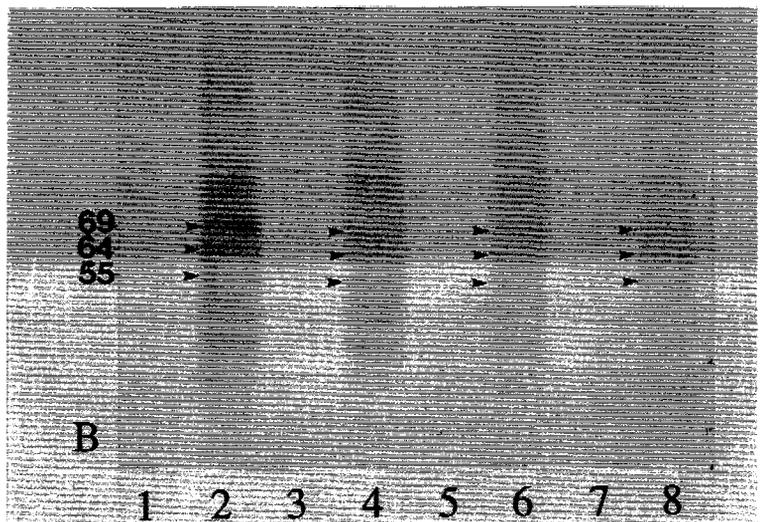
Des sites de phosphorylation anormale ont été suggérés par différentes équipes (Steiner et al., 1990; Brion et al., 1991). La première séquence anormalement phosphorylée a été le site KSPV, avec la Ser³⁹⁶ comme site de phosphorylation. Ce motif est répété de nombreuses fois

Figure V

A) Anti-tau



B) Anti-PHF



Immuno-empreintes d'homogénats totaux de cerveaux où les protéines tau normales et pathologiques sont détectées par un anti-tau (A) et un anti-PHF spécifique des sites de phosphorylation anormale (B) dans différentes régions du cerveau d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer.

1: putamen, 2: cortex temporal, 3: noyau caudé, 4: cortex pariétal, 5: bulbe rachidien, 6: cortex occipital, 7: cervelet, 8: hippocampe.

A. L'anti-tau détecte les protéines tau comprises entre 45 et 62 kDa et deux protéines tau de masse moléculaire plus élevée (64 et 69 kDa) (têtes de flèche). La présence de ces deux protéines est limitée aux régions riches en lésions neurofibrillaires (cortex temporal (2), pariétal (4), occipital (6) et hippocampe (8)). Elles ne sont pas trouvées dans les autres régions.

B. L'anti-PHF spécifique de la phosphorylation anormale reconnaît uniquement les protéines tau pathologiques. Un triplet de protéines tau est détecté avec des masses moléculaires de 55, 64 et 69 kDa.

Cette planche nous a été gracieusement fournie par le Dr. André Delacourte.

dans les neurofilaments (Lee et al., 1991). Un site similaire avait été préalablement trouvé phosphorylé chez le bœuf, la séquence KESP (Iqbal et al., 1989). Plus récemment, deux autres sites de phosphorylation anormale ont pu être identifiés, aux sérines 199 et 202 (Biernat et al., 1992).

D) Mise en évidence des kinases

Connaissant les sites de phosphorylation anormale, les kinases impliquées ont pu être identifiées. Les kinases dirigées vers des sites Ser-Pro/Thr-Pro ont été rapidement soupçonnées de jouer un rôle fondamental dans le processus pathologique (Ishiguro et al., 1991; Lee et al., 1991; Biernat et al., 1992). Récemment, la kinase responsable de la phosphorylation des protéines tau dans la maladie d'Alzheimer semble avoir été identifiée. Il s'agit de la *Mitogen activated protein kinase* (MAP kinase) (Drewes et al., 1992). Les six isoformes des protéines tau sont phosphorylables par cette kinase et acquièrent la même migration électrophorétique que les tau-PHF dans la maladie d'Alzheimer (Drewes et al., 1992). Tous les sites de phosphorylation sont des Ser-Pro ou Thr-Pro. Le premier site phosphorylé serait situé à la Ser⁴⁰⁴ (Drewes et al., 1992). La raison pour laquelle cette kinase est activée au cours de la dégénérescence de type Alzheimer reste inconnue.

3.2 Les dépôts amyloïdes

3.2.1 La protéine amyloïde ou peptide A4

Le peptide A4 est le constituant principal des dépôts amyloïdes, il est insoluble et contient 42-43 acides aminés:

ASP-ALA-GLU-PHE-ARG-HIS-ASP-SER-GLY-TYR-GLU-VAL-HIS-HIS-GLN-LYS-LEU-
VAL-PHE-PHE-ALA-GLU-ASP-VAL-GLY-SER-ASN-LYS-GLY-ALA-ILE-ILE-GLY-LEU-
MET-VAL-GLY-GLY-VAL-VAL-ILE-ALA-THR.

Il dérive d'un précurseur beaucoup plus grand dénommé précurseur de la protéine amyloïde (APP) (Kang et al., 1987; Robakis et al., 1987a).

A) Aspect génétique

Les précurseurs

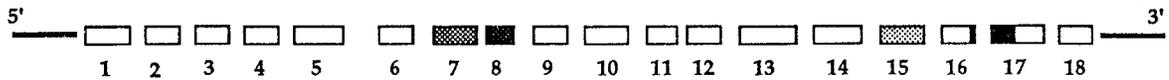
Un grand nombre de formes du précurseur de la protéine amyloïde existe (Figure VI). Au moment de l'écriture de ce manuscrit, neuf isoformes ont été identifiées grâce à leurs ARN messagers. En plus des APP₃₆₅, 563, 695, 714, 751 et 770, un nouveau mode d'épissage a été très récemment identifié dans les leucocytes. Il donne naissance aux L-APP qui correspondent à une délétion de l'exon 15 (c'est-à-dire précédent les deux exons codant pour le peptide A4) des APP₆₉₅, APP₇₅₁ et APP₇₇₀ (Figure VI). Cet épissage particulier a été également observé dans les cellules microgliales.

APP695

Il a été le premier identifié (Kang et al., 1987). Il a la structure d'un récepteur membranaire, possédant une région riche en Cys, une région riche en acides aminés acides (Glu et Asp) et deux sites de N-glycosylation (Kang et al., 1987) (Figure VI). L'ARN messager est formé de 16 exons. Le peptide amyloïde est codé en partie par les exons 14 et 15 suggérant qu'il ne résulte pas d'un épissage aberrant (Lemaire et al., 1989).

Figure VI: les isoformes de l'APP

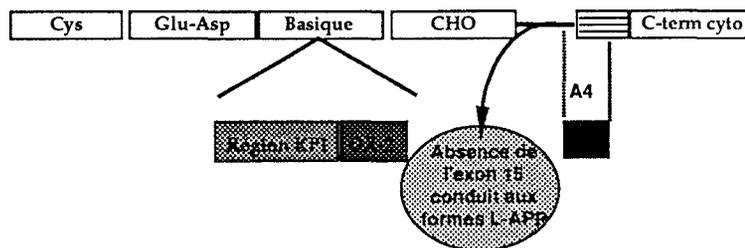
Les exons du gène du précurseur de la protéine β amyloïde: APP₇₇₀



Un épissage alternatif donne naissance aux ARNm suivants:

	Séquences particulières présentes:	
(APP ₃₆₅)	_____	KPI+OX-2
(APP ₅₆₃)	_____	KPI
(APP ₆₉₅)	_____	A4
(APP ₇₁₄)	_____	OX-2+A4
(APP ₇₅₁)	_____	KPI+A4
(APP ₇₇₀)	_____	KPI+OX-2+A4

La structure des isoformes de l'APP:



- Cys Région riche en Cys: zone de fixation du Zn²⁺
- Glu-Asp Région riche en acides aminés carboxyliques (Glu et Asp)
- Basique Région riche en acides aminés basiques (B)
- CHO Région contenant les deux sites de N-glycosylation
- KPI Région homologue aux inhibiteurs de protéases de type Kunitz
- Région partagée avec la glycoprotéine des thymocytes
- Exon 15
- Peptide A4 ou peptide amyloïde
- Région insérée dans la membrane plasmique
- C-term cyto Région C-terminale cytoplasmique

APP714, APP751, APP770

Ces isoformes ont la même structure que l'APP₆₉₅ mais contiennent des exons supplémentaires codant pour des régions particulières. Cet épissage alternatif permet l'insertion de un ou deux exons codant pour l'antigène OX-2 (APP714, APP770) (Kitaguchi et al., 1988; Golde et al., 1990) et une région homologue aux inhibiteurs de protéases de type Kunitz (APP751, APP770) (Kitaguchi et al., 1988; Ponte et al., 1988; Tanzi et al., 1988) (Figure VI). OX-2 est une séquence partagée avec une glycoprotéine de surface trouvée dans de nombreux thymocytes, lymphocytes, cellules endothéliales et neurones. Pour l'instant, aucun rôle biologique n'a pu être défini pour cette région. La région *Kunitz protease inhibitor* (KPI) est une insertion de 56 acides aminés homologue aux inhibiteurs de protéases de type Kunitz (ITI, UTI). Cette région KPI est biologiquement active; elle est capable d'inhiber des sérine-protéases.

APP secrétés 365, 563

Ces isoformes ne contiennent pas de région C-terminale d'ancrage à la membrane comprenant le peptide A4. Elles ne sont donc pas amyloïdogéniques (Figure VI).

L'APP₃₆₅ est la forme sécrétée homologue à l'APP₇₇₀ avec une délétion de douze nucléotides en dehors du cadre de lecture au niveau de l'exon 6 (selon la numérotation de Kang et al., 1987). Cela a pour conséquence une délétion de trois acides aminés T²⁷⁰-S²⁷¹-I²⁷² et la formation d'un nouveau nucléotide, à partir des nucléotides restant de la Thr²⁶⁹ et l'Ala²⁷³, codant pour la thréonine. De plus, les 400 acides aminés de la région C terminale sont remplacés par un insert de 6 acides aminés (Jacobsen et al., 1991). Aucun rôle biologique n'a été directement démontré puisque seule la transcription et non la traduction de ce variant a été démontrée. Néanmoins, il a été suggéré qu'il pourrait jouer un rôle dans la

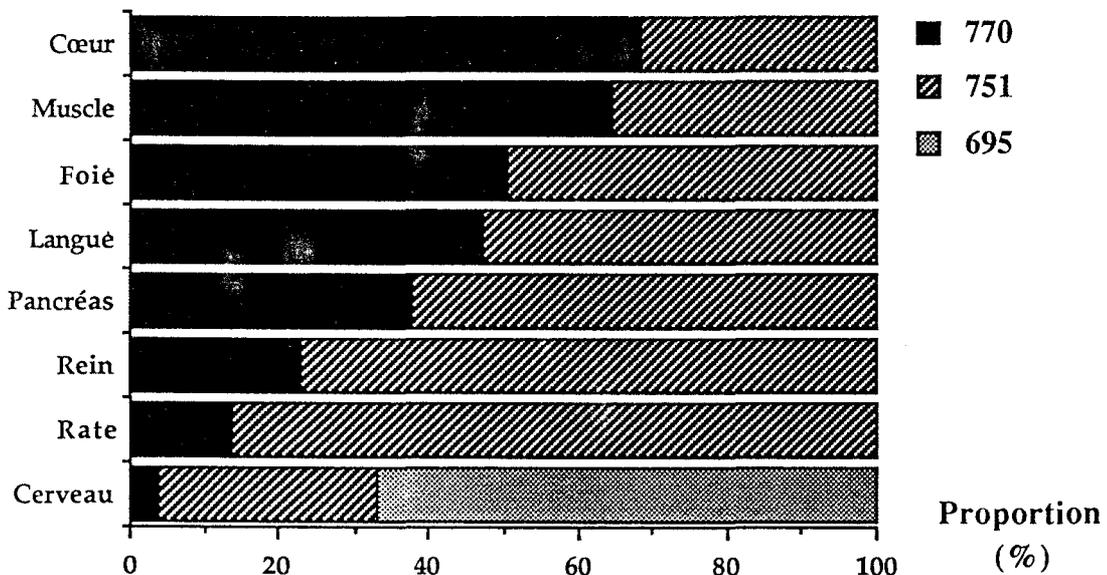
régulation de la sécrétion de l'APP membranaire grâce à son insertion KPI. Il pourrait également avoir un effet de croissance neuritique (Jacobsen et al., 1991).

Quant à l'APP₅₆₃, elle est la forme sécrétée homologue à l'APP₇₅₁ mais sans la partie C terminale. Les 208 derniers acides aminés sont remplacés par une insertion de 20 nouveaux acides aminés homologues à la famille Alu repeat (DeSavauge et Octave, 1989).

Distribution tissulaire

Elle a été déterminée pour les trois principales isoformes: APP₆₉₅, APP₇₅₁ et APP₇₇₀. L'APP₆₉₅ est la forme prépondérante du cerveau. Elle représente environ 67% des ARN messagers trouvés dans le cerveau (Tanaka et al., 1991). Elle n'existe qu'en très faible proportion dans les tissus non-neuronaux. L'APP₇₇₀ est la forme prépondérante du cœur (68,4%) et l'APP₇₅₁ celle de la rate (86,2%).

Analyse de l'expression des ARN messagers de l'APP dans différents tissus (selon Tanaka et al., 1991)



Localisation chromosomique

Chromosome 21

Le gène de l'APP a été localisé sur la chromosome 21 à l'interface des bandes q21-q22.1 (Goldgaber et al., 1987; Robakis et al., 1987b).

Implications pour les formes familiales de maladie d'Alzheimer

Gène FAD

St George-Hyslop et al ont démontré en 1987 la présence d'un locus chromosomique (FAD) pathogénique chez quatre familles différentes, situé sur le bras long du chromosome 21 à proximité du centromère.

Mutations

Hémorragies cérébrales avec angiopathie (Dutch type)

La présence d'une mutation au niveau de l'exon 17 (selon la numérotation de l'APP770), c'est-à-dire codant pour le peptide A4 a été démontrée chez les patients souffrant d'hémorragies cérébrales avec angiopathie de type hollandais (HCHWA-D). La Glu⁶⁹³, acide aminé 22 du peptide A4, est remplacée par de la Gln. Cette mutation serait responsable de l'accumulation du peptide amyloïde dans les parois des vaisseaux qui provoque à long terme des hémorragies et finalement la mort du patient vers 40-50 ans (Levy et al., 1990; Van Broeckhoven et al., 1990).

Codon 717

L'hétérogénéité génétique de la maladie d'Alzheimer a poussé l'équipe de J. Hardy à étudier les formes familiales à début précoce. Les chercheurs de cette équipe ont trouvé une liaison génétique (linkage) pour une famille à début précoce située sur une partie du bras long du chromosome 21 comprenant le gène de l'APP. Suite à la mutation trouvée

dans les HCHWA-D, ils ont commencé par séquencer l'exon 17 (APP770). Une mutation G -> A (bp 2149 de l'APP770) qui provoque la substitution d'une Val en Ile au codon 717 a été découverte (Goate et al., 1991). Cette mutation a été retrouvée dans cinq autres familles présentant une maladie d'Alzheimer familiale à début précoce mais d'origine ethnique différente. D'autres mutations ont ensuite été trouvées au codon 717; la première change la Val en une Phe (Murrell et al., 1991) et la deuxième la Val en Gly (Chartier-Harlin et al., 1991). Ces mutations ne sont pas retrouvées dans la population normale (Chartier-Harlin et al., 1991; Goate et al., 1991; VanDuijn et al., 1991). Ces mutations du codon 717 provoqueraient un dérèglement du métabolisme de l'APP qui conduit à la maladie d'Alzheimer (Hardy et Allsop, 1991).

Autres mutations

De nombreuses mutations sont actuellement décrites dans la littérature pour des patients atteints de maladie d'Alzheimer, de HCHWA-D et de schizophrénie chronique familiale et concernant les codons 670, 671, 674 692, 693, 711 et 713 (sous presse et communication personnelles). Ceci laisse penser que la relation entre le génotype et le phénotype des mutations de l'APP est probablement complexe.

Implications pour le syndrome de Down

La présence du locus FAD et du gène de l'APP sur le chromosome 21 a permis de mieux comprendre pourquoi potentiellement 100 p. cent des trisomiques présentent des lésions neuropathologiques identiques à celles rencontrées dans la maladie d'Alzheimer (Mann et al., 1989abc). Le syndrome de Down est également utilisé pour mieux comprendre les processus étiopathogéniques de la maladie d'Alzheimer (Farrar et al., 1990; Flament et al., 1990c; Hanger et al., 1991).

B) Aspects biologique et biochimique

L'ensemble des données biologiques de l'APP a été obtenu à partir d'études faites sur des cellules en culture tels que des fibroblastes, des cellules d'astrocytome, glioblastome, neuroblastome ou de cultures primaires (Autilio-Gambetti et al., 1988; Selkoe et al., 1988; Berkenbosch et al., 1990).

Structure de l'APP

Séquence et caractéristiques de la protéine

Selon la séquence déterminée par Kang et coll, (1987), l'APP₆₉₅ a la structure d'un récepteur membranaire. Il comprend tout d'abord dans sa partie N-terminale, une région riche en cystéine, qui vient d'être identifiée comme étant capable de fixer le Zn²⁺, en particulier la séquence Cys¹⁸⁶-Cys¹⁸⁷: FRGVEFVCCPLAEESDN (Bush et al., 1992) (Figure VI). A la limite de ce domaine, il existe ensuite une région riche en acides aminés carboxyliques (Glu et Asp). Puis succède une partie riche en acides aminés basiques où viendront s'insérer, entre la Val²⁸⁷ et l'Arg²⁸⁸, les séquences homologues aux inhibiteurs de type Kunitz de l'APP₇₅₁ et à l'antigène membranaire OX-2 de l'APP₇₇₀. Dans cette région, une séquence de liaison à l'héparine (Phe³¹⁶ à Ala³²⁵): FQKAKERLEA a été également récemment déterminée (Masters et Beyreuther, 1992). Deux sites de glycosylation existent également aux positions 467 (YERMNQSL) et 496 (QKEQNYSD). Le peptide A4 est situé à la fois dans le domaine extracellulaire (d'Asp⁵⁹⁷ à Lys⁶²⁴) et dans la membrane (de Gly⁶²⁵ à Ala⁶³⁸ ou Thr⁶³⁹) (Kang et al., 1987). Il existe un signal pour l'internalisation via le processus puits de clathrine (NPXY) dans la partie C-terminale (Haass et al., 1992; Kosik, 1992) de la molécule (QNGYENPTIYKFFEQM) qui est également un site de phosphorylation possible de la protéine kinase C (sur la Thr⁶⁸⁶). L'APP est en effet phosphorylé (Buxbaum et al., 1990; Caparaso et al., 1992).

Récemment, un site de phosphorylation de la protéine kinase C a été récemment mis en évidence sur la Ser⁶⁵⁵ (Gandy et al., 1992).

Il est à noter que l'APP est également Tyr-sulfaté (Schubert et al., 1989a) et N- et O-glycosylé (Dyrks et al., 1988; Weidemann et al., 1989). L'APP pourrait être un protéoglycane, de type héparane sulfate (Schubert et al., 1988) ou chondroïtine sulfate (Shioi et al., 1992).

Métabolisme de l'APP

Voie majeure

L'APP suit le chemin classique de la synthèse protéique jusqu'aux vésicules du Golgi. Il est ensuite dirigé vers la membrane plasmique où il est clivé à l'intérieur du peptide A4 (Sisodia et al., 1990; Anderson et al., 1991). La partie N-terminale est alors sécrétée dans le milieu extracellulaire. L'APP sécrété contenant la séquence homologue des inhibiteurs de protéases a été identifié comme la Protéase Nexine II (Oltersdorf et al., 1989; Van Nostrand et al., 1989). La partie C-terminale est réinternalisée et dégradée dans les lysosomes. Le clivage de l'APP pourrait également se faire avant que la protéine n'atteigne la membrane au niveau des vésicules de Golgi (Sambamurti et al., 1992).

Voie mineure

Il existe une voie métabolique mineure où l'APP n'est pas clivé à l'intérieur du peptide A4 mais en amont de celui-ci. Il existe donc des fragments C-terminaux amyloïdogéniques qui empruntent la voie endosome-lysosome (Golde et al., 1992; Estus et al., 1992). De plus, il semble que l'APP complet puisse être sécrété, puis recapté par la cellule via une internalisation par des récepteurs de type puits de clathrine grâce à son signal peptidique (Asn⁷⁵⁹-Pro-Thr-Tyr⁷⁶²) situé à l'extrémité C-terminale de l'APP (Haass et al., 1992). Finalement, la présence de fragments amyloïdogéniques C terminaux ainsi que le peptide A4 entier a été

récemment mise en évidence dans le milieu extracellulaire de cellules endothéliales (Selkoe, 1992). Ces aspects particuliers du métabolisme de l'APP ouvrent de nouvelles voies de recherche dans la compréhension du phénomène d'amyloïdose (Kosik, 1992). Il est d'autant plus intéressant qu'une pathologie des lysosomes a également été décrite dans la maladie d'Alzheimer (Cataldo et al., 1991; Bernstein et al., 1992).

Régulation

L'APP est régulée par les cytokines, en particulier l'interleukine-1 augmente son expression (Blume et Vitek, 1989; Goldgaber et al., 1989). Les facteurs de croissance (NGF, EGF) semblent jouer un rôle dans les modifications post-traductionnelles, en particulier le glycosylation mais ne modifient pas les taux d'expression des différents APP dans des cultures de PC12 (Refolo et al., 1989). De même dans des cultures de neuroblastomes SKN SH-SY5Y, le NGF ne modifie pas les taux d'expression des différents APP contrairement à l'acide rétinoïque, un agent de différenciation classiquement utilisé pour les neuroblastomes (Perez-Polo et al., 1979), qui augmente le taux d'expression de l'APP₆₉₅ par rapport aux APP₇₅₁ et APP₇₇₀ (König et al., 1990).

Ces facteurs agissent probablement en activant des cascades de phosphorylation dépendantes de la protéine kinase C. En effet, la sécrétion de l'APP est également régulée par son état de phosphorylation (Buxbaum et al., 1990; Caparaso et al., 1992; Gandy et al., 1992).

L'expression de l'APP augmente après un stress et il a été montré qu'il possède un promoteur similaire à ceux sensibles aux protéines de choc thermique (Salbaum et al., 1989).

Rôles de l'APP

De nombreux rôles ont été attribués à l'APP. Certains sont décrits ci-dessous:

L'APP semble avoir un effet trophique. Il joue un rôle dans la régulation de la croissance cellulaire par un effet mitotique (Schubert et al., 1989b). Il est également impliqué dans l'activité physiologique des synapses (Schubert et al., 1991). Des expériences de transfection ont démontré son effet sur la croissance neuritique (LeBlanc et al., 1992).

L'APP interagit fortement avec les constituants de la matrice extracellulaire: protéoglycannes, fibronectine, laminine, etc... (Klier et al., 1990; Narindrasorasak et al., 1991; Kisilevsky et al., 1992; Small et al., 1992) suggérant un rôle dans l'adhésion cellulaire (Schubert et al., 1989c).

La forme sécrétée a été identifiée comme l'inhibiteur de protéases: protéase nexine II (PNII), elle possède les mêmes caractéristiques: cicatrisation et coagulation des plaquettes, activation des lymphocytes, induction de la réponse immunitaire (Oltersdorf et al., 1989; Van Nostrand et al., 1989; Godfroid et Octave, 1990; Sinha et al., 1991).

C) Le peptide A4 ou la protéine amyloïde

Propriétés physico-chimiques

Le peptide est insoluble mais sa partielle solubilisation peut être obtenue dans de l'acide formique à 70% (Glennner et Wong, 1984; Masters et al., 1985; Orlando et al., 1992). Par dichroïsme circulaire à un pH physiologique, il présente une structure en β -turn pour deux tiers du peptide et absolument aucune structure en hélice α . Il s'agrège rapidement pour former des oligomères pouvant atteindre 4.10^6 daltons après 13 jours (Tomski et Murphy, 1992). A des pH acides (<4) ou basiques (>7), il adopte une structure en hélice α à l'exception de la région 29-42 qui a toujours une

structure β plissée quelles que soient les conditions de température, pH ou solvants (Barrow et Zagorski, 1991).

Propriétés biologiques

Glycosylation

Il a été très récemment suggéré que le peptide A4 est O-glycosylé sur la Ser⁶⁶⁰ dans les cellules de glioblastome C6 (Shioi et al., 1992). Cette O-glycosylation de type chondroïtine sulfate régulerait la sécrétion de l'APP (Figure VII).

Liaison à l' α_1 -antichymotrypsine (ACT)

L'ACT est capable de former in vitro un complexe stable avec le peptide A4. En effet, ce dernier possède une séquence homologue à celle des sérine-protéases (trypsine, chymotrypsine) de type Serpines: Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr (Potter et al., 1991) (Figure VII).

Réaction de type cascade complément

Le peptide A4 possède une forte affinité pour la protéine C1q. Il semblerait que le peptide A4 seul ne pourrait pas entraîner la cascade inflammatoire du complément alors que sous la forme de dépôts amyloïdes, il le pourrait (Rogers et al., 1991). Cette hypothèse explique la présence de protéines du complément et d'immunoglobulines dans les dépôts amyloïdes (Eikelenboom et Stam, 1984; Ishii et Haga, 1984).

Site de liaison à l'héparine (Heparin-binding-site) et site d'adhésion cellulaire

Un rôle du peptide A4 dans l'adhésion cellulaire a été proposé par plusieurs équipes (Chen and Yankner, 1991; Ghiso et al., 1991). La présence du térapeptide RHDS, homologue au RGDS des protéines d'adhésion cellulaire, pourrait expliquer ce rôle biologique par interaction avec un récepteur de type intégrine β_1 (Ghiso et al., 1991). De plus, le peptide A4 possède une séquence possible d'affinité à l'héparine [VHHQKL] (Cardin

et Weintraub, 1989) qui aurait un rôle dans les phénomènes d'adhésion cellulaire (Chen et Yankner, 1991). Enfin, l'affinité entre le peptide A4 et l'héparine pourrait expliquer leur co-déposition dans les dépôts amyloïdes (Kisilevsky, 1990) (Figure VII).

Région neurotoxique-neurotrophique

Des résultats très différents ont été obtenus sur les effets neurotrophiques et neurotoxiques du peptide A4 (Whitson et al., 1989; Yankner et al., 1989; 1990a; 1990b; 1992; Koh et al., 1990; Frautschy et al., 1991; Kowall et al., 1991; Araujo et Cotman, 1992; Mattson et al., 1992).

En 1989, Yankner et al. ont montré la neurotoxicité d'un fragment du précurseur amyloïde. Par la suite, la région 25-35 du peptide A4 (Figure VII) s'est avérée neurotoxique (10-100 nM) mais également neurotrophique (10-100 pM) (Yankner et al., 1990). La neurotoxicité est potentialisée par la présence de NGF (Yankner et al., 1990) et pourrait être inversée par des analogues de la Substance P (Yankner et al., 1990; Kowall et al., 1991). La neurotoxicité du peptide A4 serait liée à sa conformation; les peptides A4 synthétiques possèdent soit une structure en pelote statistique, soit en hélice α dans la partie N-terminale. Seuls ceux possédant une hélice α seraient neurotoxiques (Yankner et Busciglio, 1992). Néanmoins, d'autres auteurs ont montré que la neurotoxicité du peptide A4 est médiée par l'ion Ca^{2+} . Le peptide A4 augmenterait en particulier la vulnérabilité des neurones à l'excitotoxicité (Koh et al., 1990; Mattson et al., 1992).

L'effet neurotrophique du peptide A4 pourrait s'expliquer par une action stimulatrice de la synthèse de facteurs de croissance sur les cellules gliales (Araujo et Cotman, 1992).

3.2.2 Les autres constituants des dépôts amyloïdes

A) α_1 -antichymotrypsine, protéase nexine I

Des inhibiteurs de protéases sont trouvés dans les dépôts amyloïdes (Abraham et al., 1988; Rosenblatt et al., 1989). Potter et coll (1991) ont démontré, comme nous l'avons dit précédemment, que la protéine amyloïde se lie à l'ACT. A la suite de ces résultats, un modèle de polymérisation entre l'ACT et le peptide A4 a été proposé. D'autres considèrent les inhibiteurs de protéases comme une réponse cellulaire à l'augmentation du taux de protéases trouvée à la périphérie des lésions. Finalement, certains auteurs expliquent la présence de ces constituants par le fait qu'ils possèdent une forte affinité pour les GAG/PG trouvés dans les dépôts amyloïdes.

B) apolipoprotéine B, apolipoprotéine E, composé P amyloïde

Ce sont des protéines traditionnellement retrouvées dans les amyloïdoses (Kalaria et al., 1991; Namba et al., 1991, 1992; Wisniewski et Frangione, 1992). Elles sont considérées comme des protéines sériques.

Le composé P amyloïde est retrouvée normalement dans le cerveau mais son ARN messenger n'y est pas exprimé. Il passe donc la barrière hémato-encéphalique de manière inconnue (Kalaria et al., 1991). Au contraire, les apolipoprotéines sont trouvées dans le cerveau et y sont synthétisées (Elshourbagy et al., 1985).

C) protéines du complément, immunoglobulines

Ces protéines sont retrouvées dans les dépôts amyloïdes (Eikelenboom et Stam, 1984; Ishii et Haga, 1984). Les uns expliquent leur présence par une hypothèse autoimmunitaire dans la maladie d'Alzheimer (Fillit et al., 1987, 1988, 1990), les autres par le rôle possible du peptide A4 dans la cascade du complément (Rogers et al., 1991). Néanmoins, leur spécificité ne fait pas l'unanimité.

D) Constituants de la matrice extracellulaire

Les constituants de la matrice extracellulaire, tels que la laminine, la fibronectine et le collagène, sont retrouvés dans les dépôts amyloïdes. Ces molécules jouent un rôle dans l'interface cellule-cellule, cellule-MEC et cellule-membrane basale vasculaire. Elles possèdent toutes une forte affinité pour les protéoglycannes et l'APP (Kisilevsky et al., 1992a; 1992b; Small et al., 1992). Elles pourraient favoriser la formation des filaments amyloïdes.

E) Protéoglycannes

Ce sont aussi en partie des constituants de la matrice extracellulaire, mais aussi des membranes basales. Ils ont une forte affinité pour l'APP (Narindrasorasak et al., 1991). Ils sont retrouvés dans toutes les amyloïdoses et pourraient être directement impliqués dans l'amyloïdose (Kisilevsky et al., 1992b).

3.3 Les relations dépôts amyloïdes et dégénérescence neurofibrillaire

Les relations amyloïde et dégénérescence neurofibrillaire restent encore très obscures d'un point de vue biologique. Il est clair que la neurotoxicité du peptide amyloïde, si elle se confirme, apporte un argument de poids au rôle du peptide amyloïde dans la pathogénie de la maladie d'Alzheimer (Yankner et al., 1990b). Les protéoglycannes sont des éléments communs aux deux lésions et sont également impliqués dans le processus pathologique (Snow et Wight, 1989; Perry et al., 1991). Ils se lieraient en particulier aux protéines tau (Perry et al., 1992b).

Enfin, 50 à 90% de l'APP (intracellulaire et membranaire) sont associés au cytosquelette (aux neurofilaments dans les PC12, à la GFAP dans les cellules de glioblastome C6, mais également aux microtubules dans toutes les lignées neuronales ou le cerveau entier). L'APP lié au cytosquelette augmente avec la densité cellulaire et l'augmentation de l'activité kinasique (Refolo et al., 1991). Il est probable que l'APP soit également lié aux protéines tau. Récemment, la région C-terminale de l'APP a été retrouvée dans les PHF (Caputo et al., 1992). Pourtant, les interactions biologiques entre les protéines tau et l'APP restent inconnues. Nous pensons que l'APP pourrait jouer un rôle similaire aux intégrines (Albelda et Buck, 1990) ou aux moésines (Lankes et Furthmayr, 1991) en permettant l'échange d'informations entre la matrice extracellulaire et les protéines intracellulaires, en particulier celles du cytosquelette.

4 L'importance de la présence de PG dans les amyloïdoses.

4.1 Définition et structure des protéoglycannes

4.1.1 Définition

Les protéoglycannes sont des macromolécules ubiquitaires constituées de chaînes glycaniques liées de façon covalente à un axe protéique. Cette liaison se fait pratiquement dans tous les cas sur une liaison O-Ser/Thr selon le modèle suivant $\text{Glc UA } \beta (1 - 3) \text{ Gal } \beta (1 - 3) \text{ Gal } \beta (1 - 4) \text{ Xyl } \beta \text{ Ser}$. La partie glycanique est O- ou N-sulfatée, ce qui confère à la molécule un caractère anionique. Leur masse moléculaire s'échelonne de 25 à 2000 kDa.

Leur motif structural glycanique de base est un moyen simple de les classer. Ainsi, trois types peuvent être distingués selon leur unité disaccharidique: 1) $[\text{HexUA-GalN}]_n$, 2) $[\text{HexUA-GlcN}]_n$, et 3) $[\text{Gal-GlcN}]_n$. Alors que le type 3 ne regroupe uniquement que le kératane sulfate, le type 1 se subdivise en chondroïtine sulfate et dermatane sulfate et le type 2 en héparane sulfate et héparine. Néanmoins, cette classification ne tient pas compte de la microhétérogénéité des chaînes de glycosaminoglycannes. De plus, un autre problème se pose avec l'existence de protéoglycannes hybrides formés de deux types de chaînes glycaniques. Finalement en plus de la diversité glycanique, il existe une hétérogénéité des axes protéiques (Kjellen et Lindahl, 1991).

4.1.2 La partie glycanique

A) Acide hyaluronique

Il existe outre les structures glycaniques décrites précédemment, un type particulier de glycosaminoglycane qui n'est pas lié à un axe protéique: l'acide hyaluronique dont l'unité disaccharidique de base est $[\beta (1 - 3) \text{GlcUA} \beta (1 - 4) \text{GlcNAc}]_n$ (Figure VIIIA). Sa masse moléculaire s'échelonne de 50 à 8000 kDa (Snow et Wight, 1989).

B) Héparane sulfate/Héparine

La biosynthèse des chaînes héparane sulfate/héparine commence par la formation de la chaîne glycanique $[\alpha (1 - 4) \text{GlcUA} \beta (1 - 4) \text{GlcNAc}]_n$. Ce polymère est ensuite N-désacétylé/N-sulfaté, puis subit une épimérisation en C5: l'acide glucuronique devient de l'acide iduronique avec 2-O-sulfatation de l'acide iduronique et 6-O-sulfatation des unités de GlcN. Plus rarement, des substituants O-sulfate sont observés en C3 des unités GlcN et en C2 (ou C3) des unités d'acide glucuronique. L'ensemble de ces différentes combinaisons peut ainsi donner de 17 (voire 18) différents disaccharides [HexUA - GlcN] et 10 (voire 12) disaccharides [GlcN - HexUA] (Kjellen et Lindahl, 1991) (Figure VIIIF).

C) Chondroïtine sulfate A, C, Dermatane sulfate

Ces glycosaminoglycannes sont formés de façon similaire que précédemment par des modifications sur le polymère $[\beta (1 - 4) \text{GlcUA} \beta (1 - 3) \text{GalNAC}]_n$. Etant donné que les résidus GalNAC restent acétylés, la diversité structurale est moins importante. Néanmoins, compte tenu de la présence de résidus d'acide glucuronique et d'acide iduronique, et de la position variable de groupements O-sulfatés, neuf types de disaccharide [HexUA-GalNAC] ont été identifiés (Seldin et al., 1984) (Figure VIIIB,C,D).

D) Kéراتane sulfate

Le kéراتane sulfate dérive de la structure classique des polylectosamines [β (1 - 3) Gal β (1 - 4) GlcNAc] substitués par des groupements O-sulfate. Les groupements sulfate sont situés en C6 du Gal, du GlcNAc ou des deux. Récemment, des résidus fucose ont été trouvés liés en β (1 - 3) au GlcNAc, ainsi que la présence en fin de chaîne glycanique de résidus d'acide sialique (Kjellen et Lindahl, 1991) (Figure VIII E).

4.1.3 L'axe protéique

Les applications récentes de la biologie moléculaire à l'analyse de l'axe protéique des protéoglycannes n'a pas permis, contrairement aux collagènes, de les classer selon des homologies de séquence. Cinq grandes familles de protéoglycannes sont néanmoins établies (Tableau I).

1) Celle des larges CSPG possédant une affinité pour l'acide hyaluronique tels que l'aggrecan et le versican qui regroupe de nombreux protéoglycannes des tissus conjonctifs.

2) Les protéoglycannes avec de courts axes protéiques possédant des domaines homologues et une ou deux chaînes de glycosaminoglycannes tels que la décorine, le biglycane et la fibromoduline sont aussi souvent trouvés dans le tissu conjonctif.

3) Les HSPG de la matrice extracellulaire et des membranes basales tel que le perlecan (Noonan et al., 1991) ont des réactions croisées avec des anticorps dirigés contre leur partie protéique. Ils sont donc regroupés dans une même famille, sans savoir s'ils sont codés par un ou plusieurs gènes.

4) Les protéoglycannes trans-membranaires sont une large famille avec des chaînes glycaniques principalement CS/HS. Le protéoglycane hybride trans-membranaire syndecan et un second protéoglycane avec un axe protéique de 48 kDa, isolé récemment de fibroblaste, ont été incorporés dans cette famille.

5) La famille des Serglycines qui regroupe des protéoglycannes intracellulaires, avec des séquences répétitives Ser-Gly et de nombreuses chaînes de glycosaminoglycannes (CS et/ou héparine) (Hassell et al., 1986; Kjellen et Lindahl, 1991).

4.2 Rôles des protéoglycannes

4.2.1 Général

Les rôles des glycosaminoglycannes/protéoglycannes sont aussi diversifiés que leur structure. Cela va du soutien structural (dispersion des chocs ou contraintes pour éviter des déformations au niveau des cartilages ou des joints) à l'activité anticoagulante (rôle de l'héparine), en passant par la filtration de macromolécules, la régulation de l'adhésion cellulaire (interactions avec la matrice extracellulaire), le réservoir de facteurs de croissance (protège de la protéolyse le *Fibroblast Growth Factor* (FGF) basique) ou encore l'inhibiteur de protéases (inhibiteur tryptique urinaire) (Tableau I) (voir revues Roden, 1980; Hassell et al., 1986; Cardin et Weintraub, 1989; Jackson et al., 1991; Kjellen et Lindahl, 1991; Ruoslahti et Yamaguchi, 1991).

4.2.2 Dans le système nerveux central

Dans le système nerveux central, les différentes formes de PG existent, mais les deux grandes classes rencontrées sont les héparane sulfate PG et les chondroïtine/dermatane sulfate PG (Culp et al., 1989). La présence de PG a été démontrée au niveau des neurones (Matthew et al., 1985; Dow et al., 1988; Gowda et al., 1989) et des cellules gliales (Ard et Bunge, 1988; Gallo et Bertolotto, 1990). L'analyse des protéoglycannes neuronaux a été principalement faite dans les phéochromocytomes de rat PC12 (Damon et al., 1988; Gowda et al., 1989) et les neuroblastomes (Maresh et al., 1984; Watanabe et al., 1989).

Les protéoglycannes sont impliqués dans un ensemble de processus physiologiques fondamentaux du système nerveux central. Ils jouent un rôle dans le développement de celui-ci (Burg et Cole, 1990; Herndon et Lander, 1990), dans la croissance neuritique (Dow et al., 1991) et dans l'adhésion cellulaire, par exemple avec N-CAM (Cole et Akeson, 1989). Ils peuvent également servir de réservoir à facteurs de croissance et moduler l'activité de ces derniers, ainsi que celle des inhibiteurs de protéases (Ruoslahti et Yamaguchi, 1991). A la fois les GAG (Jackson et al., 1991) et l'axe protéique (Kjellen et Lindahl, 1991) semblent impliqués dans ces phénomènes.

Finalement, les protéoglycannes sont des constituants de la membrane basale des vaisseaux. Ils jouent un rôle fondamental dans la fonction de filtration de la barrière hémato-encéphalique (Simionescu et al., 1981, 1982; Fillit, 1990).

4.3 Amyloïde et protéoglycannes dans les amyloïdoses systémiques et cérébrales

4.3.1 Généralités: Historique, Classification et Co-facteurs

L'amyloïde est en fait un terme générique qui a d'abord été expliqué comme une accumulation de polysaccharides, d'où le terme amyloïde (Virchow, 1854). Il a ensuite été démontré que les constituants principaux sont protéiques (Friedrich et Kekule, 1859). Ces protéines amyloïdes sont tout à fait normales mais, pour des raisons encore inconnues (avec l'exception de certaines protéines avec une mutation ponctuelle telles que le peptide A4 ou la transthyréine), elles forment des dépôts qui possèdent une structure en feuillets β -plissés avec des propriétés physico-chimiques particulières (diffraction aux rayons X, coloration sélective à la thioflavine et le rouge Congo). L'implication de co-facteurs (AEF: amyloid enhancing

factor; composé P amyloïde; constituants de la membrane basale; glycosaminoglycannes/protéoglycannes) favorisant l'accumulation de constituants sous la forme de dépôts amyloïdes a été suggérée (Kisilevsky et al., 1992).

Historiquement, le même processus pathogénique avait été attribué aux amyloïdoses. Il aurait été lié à une dérégulation du système immunitaire. Ceci n'est pas surprenant puisque les amyloïdoses ont longtemps été associées à des troubles inflammatoires de longue durée tels que la présence d'abcès pulmonaires, la tuberculose ou l'ostéomyélite. Ensuite, dans les années 1930, avec l'arrivée des antibiotiques et l'amélioration de la santé publique, ces troubles devinrent moins fréquents. Les amyloïdoses furent alors retrouvées associées à des maladies dites auto-immunes telles que l'arthrite rhumatoïde et la spondylarthrite ankylosante. Un rôle immunologique apparaissait donc évident. Pourtant, dans les années 1970, les progrès biochimiques concernant l'isolation et la caractérisation des protéines ont permis la mise en évidence d'un grand nombre de constituants protéiques dans les amyloïdoses. Cette diversité a montré la faiblesse de l'hypothèse immunologique à expliquer l'ensemble des processus amyloïdogéniques. Il a également conduit à repenser le système de classification des amyloïdoses. Une classification en fonction du type de protéines impliquées a remplacé celle basée sur des critères cliniques (Tableau II).

Les constituants communs à ces amyloïdoses sont le constituant P amyloïde et les glycosaminoglycannes/protéoglycannes (Kisilevsky, 1987). Les glycosaminoglycannes ont été retrouvés dans toutes ces amyloïdoses (Snow et al., 1987a, 1987b, 1987c, 1988a, 1989a; Young et al., 1989; Kisilevsky, 1990).

4.3.2 Amyloïde du système nerveux central

Il nous a paru intéressant de séparer les amyloïdoses systémiques décrites dans le tableau II des amyloïdoses cérébrales qui concerneront les prochains paragraphes.

A) Creutzfeldt-Jakob, Kuru et Syndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker

Ce sont des maladies neurodégénératives transmissibles par le biais d'un agent pathogène appelé prion. Le terme prion a été introduit pour éviter toute confusion avec les virus. Les prions sont des particules infectieuses protéiques, contenant peu ou pas d'acides nucléiques, et pour lesquelles une forme aberrante d'une protéine hôte (PrP: prior protein) représente un constituant majeur et nécessaire de l'infection. Le Kuru est une maladie infectieuse trouvée dans une population isolée de Nouvelle Guinée et caractérisée par une ataxie cérébelleuse et la présence de nombreux dépôts amyloïdes. La maladie de Creutzfeldt-Jakob est rencontrée mondialement, elle se manifeste par une démence. Une occurrence familiale est observée dans 5 à 10% des cas. Le syndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker est très rare, ce n'est pas seulement une maladie infectieuse, mais aussi une maladie génétique autosomale dominante (Prusiner, 1990; Gadjusek et al., 1991). Là aussi, les glycosaminoglycannes sont retrouvés associés aux dépôts amyloïdes quand ils sont présents (Snow et al., 1989b, 1990; Guiroy et al., 1991). En effet, si tous les patients avec un syndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker ont des dépôts amyloïdes dans leur cerveau, ce n'est pas le cas de tous les patients avec Kuru ou maladie de Creutzfeldt-Jakob.

B) Hémorragies cérébrales héréditaires avec angiopathie

Les hémorragies cérébrales héréditaires avec angiopathie (HCHWA) ont été décrites en Islande et aux Pays-Bas. Les protéines amyloïdes dans les deux types sont différentes.

HCHWA de type islandais (HCHWA-I)

La protéine amyloïde trouvée chez ces patients est similaire à la cystatine C, un inhibiteur de cystéine protéases. Une mutation au niveau du deuxième exon du gène de la cystatine C, qui comprend trois exons, serait responsable de l'accumulation de cette protéine dans la paroi des vaisseaux cérébraux. Cela se traduit par la substitution de la Gln 68 en Leu (Levy et al., 1989).

HCHWA de type hollandais (HCHWA-D)

La protéine amyloïde rencontrée ici est la même que dans la maladie d'Alzheimer, il s'agit de la β protéine (voir paragraphe 3.2.1; Levy et al., 1990). Là aussi, une mutation (Glu en Gln) serait responsable de son accumulation dans la paroi des vaisseaux du cerveau.

Les glycosaminoglycannes sont également associés à ces deux types d'amyloïdose (Snow et Wight, 1989)

C) Maladie d'Alzheimer et Syndrome de Down

Il est difficile de considérer la maladie d'Alzheimer et le syndrome de Down comme des amyloïdoses cérébrales parce que les dépôts amyloïdes ne sont pas les seules lésions neuropathologiques. Néanmoins, ces deux pathologies présentent une amyloïdose. La présence de glycosaminoglycannes a été également rapportée dans ces dépôts amyloïdes (Snow et al., 1987a,b,c,d; 1988b; Snow et Wight, 1989; Snow et al., 1989a; Young et al., 1989; Kisilevsky, 1990; Perlmutter et al., 1990; Snow et al., 1990; Narindrasorasak et al., 1991). L'héparane sulfate est soupçonné être le

glycosaminoglycane impliqué; il serait sous la forme d'un protéoglycane. Il n'est pas clair si un ou plusieurs protéoglycannes sont présents dans les dépôts amyloïdes (Snow et Wight, 1989).

Quel est le rôle des glycosaminoglycannes/protéoglycannes dans le phénomène d'amyloïdose? Pour tenter de répondre à cette question, nous avons étudié par immunohistochimie la nature et la distribution des éléments reconnus par un anticorps monoclonal dirigé contre un héparane sulfate protéoglycane. L'analyse a été également réalisée chez des témoins âgés dans la maladie d'Alzheimer et d'autres maladies neurodégénératives. Les dépôts amyloïdes sont marqués par l'anticorps laissant suggérer une interaction entre l'héparane sulfate protéoglycane et le peptide. Nous avons donc analysé l'affinité des protéoglycannes d'origine vasculaire ou neuronale, pour la protéine amyloïde. De plus, une protéine possédant une affinité pour l'héparine, la thrombospondine a été étudiée.

RÉSULTATS PERSONNELS

RÉSULTATS PERSONNELS: AMYLOÏDE ET PROTÉOGLYCANNES DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER

L'étiologie de la maladie d'Alzheimer reste inconnue. Pourtant, les récentes données de la littérature ont mis en évidence le rôle fondamental de l'amyloïde dans cette pathologie (Hardy et Allsop, 1991; Selkoe, 1991; Hardy et Higgins, 1992; Kosik, 1992). L'existence de co-facteurs comme les glycosaminoglycannes/protéoglycannes est également considérée comme indispensable au processus d'amyloïdogénèse (Snow et Wight, 1989; Kisilevsky et al., 1992; Masters et Beyreuther, 1992). Par conséquent, l'étude des interactions du peptide A4 avec les autres constituants des dépôts amyloïdes devrait permettre une meilleure compréhension de la séquence d'événements qui conduit à la maladie d'Alzheimer. Finalement, la caractérisation des protéoglycannes présents dans les dépôts amyloïdes pourrait nous renseigner sur l'origine des cellules impliquées dans l'amyloïdose (Snow et Wight, 1989).

Les premiers travaux qui ont identifié les glycosaminoglycannes/protéoglycannes dans les dépôts amyloïdes ont été réalisés par Alan Snow dans le laboratoire du Pr. Robert Kisilevsky au Canada (Snow et al., 1987d, 1988b). Les résultats obtenus avec un anticorps (Kato et al., 1988) dirigé contre un héparane sulfate protéoglycanne de membrane basale (perlecan) (Noonan et al., 1991) ont laissé supposer une origine endothéliale pour ces protéoglycannes. De plus, une altération de la barrière hémato-encéphalique a été suggérée comme étant à la base des modifications neuropathologiques observées au cours de la maladie d'Alzheimer (Hassler, 1965; Ravens, 1978; Miyakawa et al., 1982; Hardy et al., 1986; Scheibel et al., 1986). En partant de l'hypothèse que les protéoglycannes ont

une spécificité cellulaire, il nous a semblé intéressant de poursuivre les travaux de Snow et al., 1988b, en utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre un autre héparane sulfate protéoglycane vasculaire isolé des glomérules de rein de bœuf afin de tester l'origine vasculaire des dépôts amyloïdes.

1 Caractérisation de l'anticorps monoclonal 7E12 dirigé contre l'héparane sulfate protéoglycane vasculaire.

Nous avons eu l'opportunité de travailler avec un anticorps monoclonal caractérisé en 1988 par Kemeny et coll.

1.1 Caractéristiques et spécificité

L'anticorps 7E12 a été obtenu à partir d'une préparation de protéoglycannes de glomérules de rein de bœuf (Fillit et al., 1985). Il reconnaît spécifiquement un héparane sulfate protéoglycane et ne montre aucune réaction croisée avec le chondroïtine sulfate protéoglycane du cartilage nasal de bœuf, la laminine, le collagène IV ou encore la fibronectine (Kemeny et al., 1988). En immunohistochimie, il reconnaît la membrane basale de glomérule de rein de bœuf (Kemeny et al., 1988).

1.2 Profil biochimique

Par la technique des immuno-empreintes après électrophorèse en gel de polyacrylamide 10%, l'anticorps marque une bande très large qui correspond à un protéoglycane d'environ 210 kDa.

1.3 Profil immunohistochimique dans le cerveau

1.3.1 dans les conditions normales

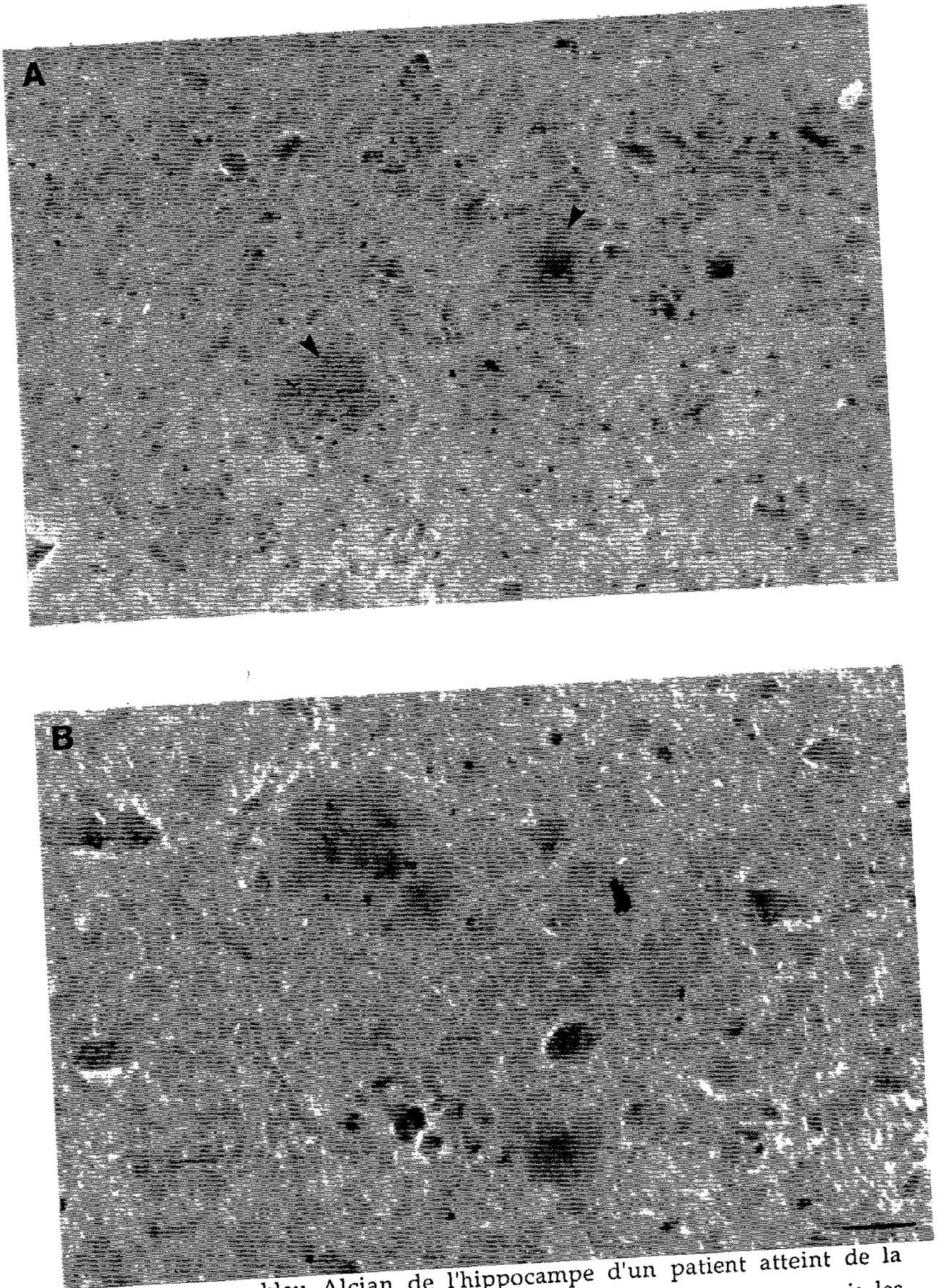
Cet anticorps avait déjà été utilisé en immunohistochimie sur des préparations de rein de bœuf mais aucune étude n'avait été réalisée sur le cerveau. Nous avons donc recherché les meilleures conditions de fixation pour le tissu cérébral. Elles ont été obtenues avec du tissu fixé dans un tampon phosphate pH 7,4 contenant 4% (P/V) paraformaldéhyde. Lorsque le tissu avait été fixé par des solutions de type formol, Carnoy ou autres, les résultats obtenus avec l'anticorps étaient de qualité moindre.

Avec les conditions optimales de fixation, l'anticorps s'est montré performant pour le tissu nerveux de primates mais totalement inopérants pour celui de rongeurs. Le profil immunohistochimique chez l'homme est caractérisé par la reconnaissance spécifique des capillaires et des artérioles. La microvascularisation est mise en évidence dans toutes les régions du cerveau.

1.3.2 dans la maladie d'Alzheimer

Avec l'anticorps 7E12, le même marquage de la microvascularisation a été obtenu chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Perlmutter et al., 1991) et les dépôts amyloïdes colorés par la thioflavine S ont été également détectés (Figure IX). La partie glycosaminoglycannique est également présente dans ces dépôts amyloïdes et peut être mise en évidence par une coloration au bleu Alcian (Figure X). Finalement, seuls quelques neurones normaux ou en dégénérescence sont marqués par l'anticorps monoclonal 7E12.

Figure X



Coloration au bleu Alcian de l'hippocampe d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer. De nombreuses structures sont marquées mais les dépôts amyloïdes sont parfaitement visibles (pointes de flèche) (A). A un grossissement plus important, un marquage diffus des dépôts est observé (B). A) Echelle = 50 µm. B) Echelle = 25 µm.

2 Hypothèse de formation des dépôts amyloïdes d'origine vasculaire

L'origine vasculaire des dépôts amyloïdes est une des premières hypothèses qui aient été proposées. Cette hypothèse repose sur un certain nombre d'observations faites en microscopie optique et électronique (Hassler, 1965; Ravens, 1978; Miyakawa et al., 1982; Hardy et al., 1986; Scheibel et al., 1986). Pour tester cette hypothèse, nous avons analysé la microvascularisation détectée par l'anticorps monoclonal 7E12. Ce dernier semble marquer l'ensemble du système vasculaire à l'exception des veines. Nous pouvons ainsi visualiser les larges vaisseaux perforants, les artérioles et les capillaires dans les six couches du néocortex, mais également les très fines anastomoses qui permettent la connexion des plus petits capillaires.

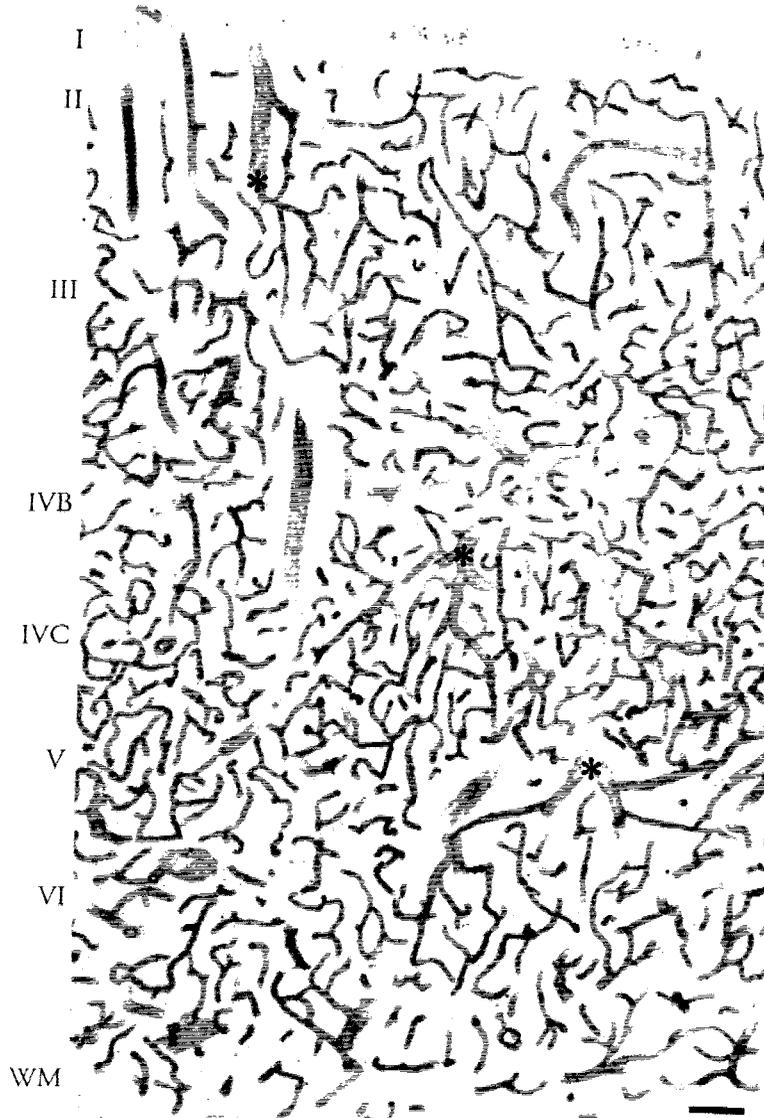
Nous avons d'abord étudié la microvascularisation d'un cas témoin jeune de 49 ans. Un rapport détaillé des caractéristiques morphologiques des microvaisseaux et de leur distribution laminaire et régionale a été établi. Tous les cas de témoins âgés (n=3, moyenne d'âge=79,0 ± 1,0 ans) ou patients atteints de la maladie d'Alzheimer (n=9, moyenne d'âge=80,8 ± 2,1 ans) décrits par la suite l'ont été par rapport à ce jeune témoin qui servait donc de référence. Référence présumée, puisque malheureusement, nous n'avons pu travailler que sur un seul cas jeune. Les autres cas de démences ont plutôt été comparés aux patients atteints de maladie d'Alzheimer.

2.1 Etude de la microvascularisation cérébrale

2.1.1 Dans la population jeune - angioarchitecture

Le marquage de la microvascularisation a été évalué en termes de caractéristiques morphologiques, de densité globale, et de densités régionale et laminaire des microvaisseaux. Chez le jeune témoin, les microvaisseaux étaient lisses et aucune irrégularité n'était visible (Figures XI, XII, XVIA). Chaque vaisseau pouvait être suivi sur de longues distances. Parfois, de très fins microvaisseaux étaient observés. Ils semblaient correspondre à des connections entre capillaires ou anastomoses (Figures XI, XVIB). La distribution laminaire et la densité des microvaisseaux permettaient une nette différence entre les régions corticales. Une corrélation entre l'angio- et la cytoarchitecture a pu être faite. Par exemple, dans l'hippocampe, l'alvéus contenait une faible densité de vaisseaux marqués en comparaison des autres régions de la corne d'Ammon. Une forte densité de microvaisseaux était observée dans la couche lacunoso-moléculaire de la corne d'Ammon et dans le gyrus dentatus. La couche pyramidale présentait plus de microvaisseaux marqués que la couche radiaire mais moins que la couche lacunoso-moléculaire. Dans le cortex entorhinal, la densité des microvaisseaux dans les couches II et III était la plus importante, pour décroître dans les couches V, VI et finalement IV. Dans le cortex temporal inférieur (aire 20), les couches III et V étaient les plus vascularisées (Figure XI). Une distribution similaire était observée pour le cortex frontal supérieur (aire 9) et le cortex visuel secondaire (aire 18). Dans ces régions, les anastomoses étaient principalement trouvées dans la couche III. Dans le cortex visuel primaire (aire 17), la couche IV β était la plus vascularisée, suivie de la couche IV α , IVA, IIIC et IVB, IIIB et V, et finalement des couches I, II, et VI (Figure XII).

Figure XII



Montage photographique du marquage immunohistochimique obtenu avec l'anticorps 7E12 dans le cortex visuel primaire chez le jeune témoin de 49 ans. Noter la présence d'artères perforantes qui se ramifient pour atteindre les couches pyramidales III et V et la couche IV granulaire fortement différenciée (astérisques). Remarquer la très dense vascularisation de la couche IVC. Echelle = 100 μ m.

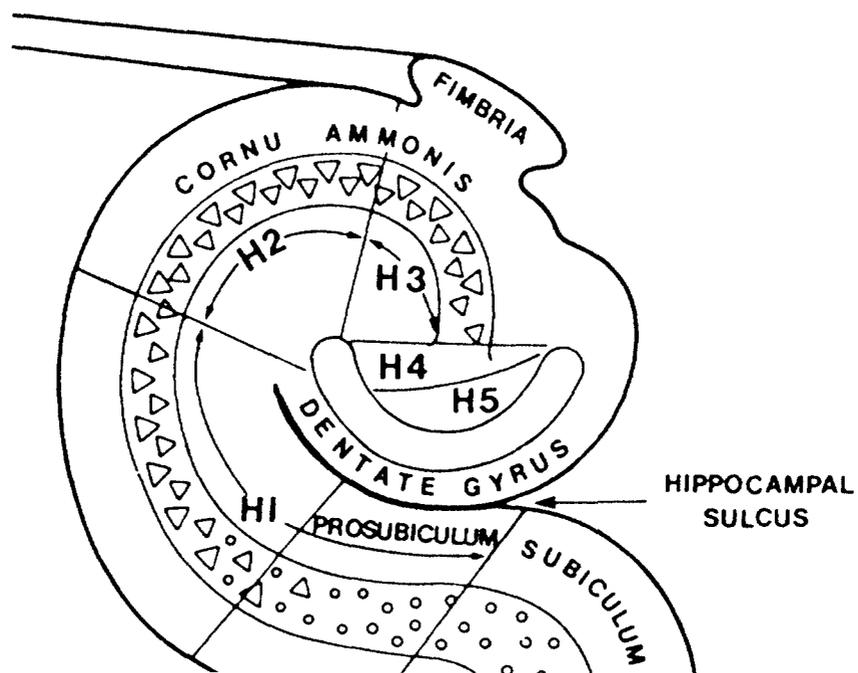
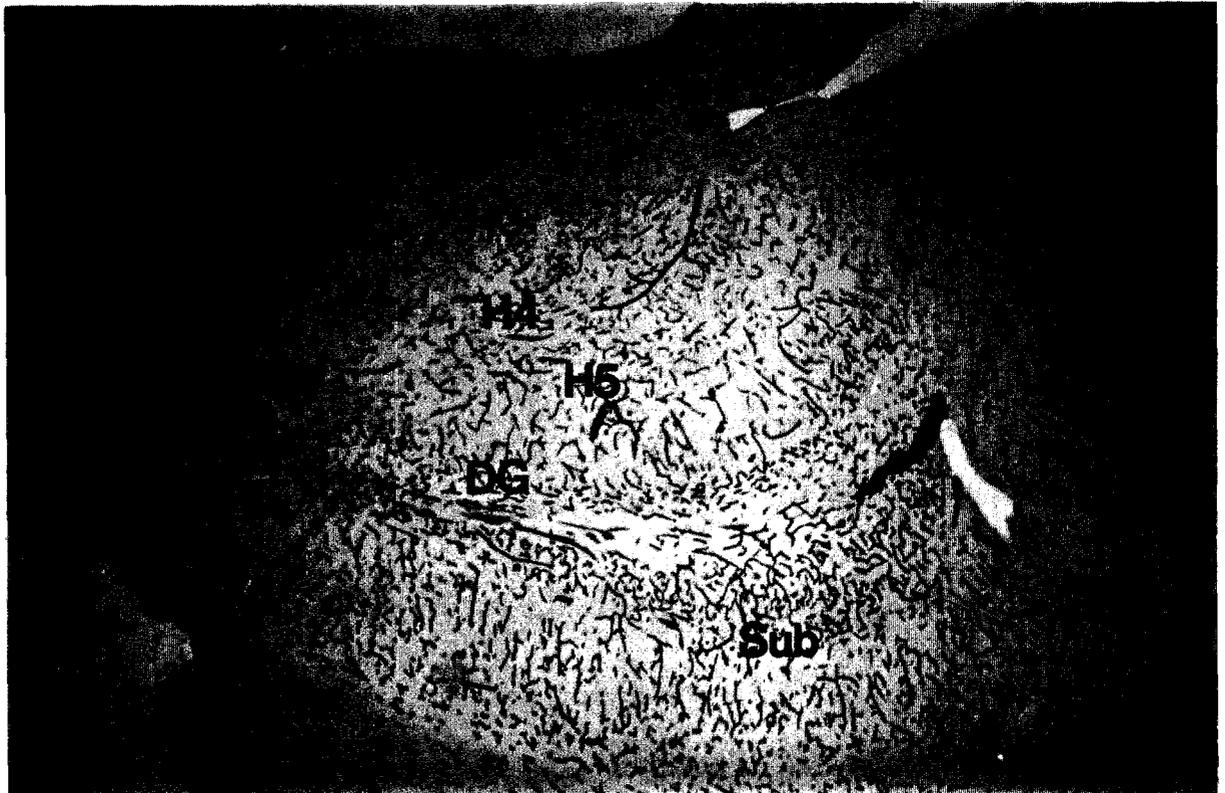


La vascularisation du cerveau peut donc être corrélée à la cytoarchitecture. Ainsi, la forte densité vasculaire des couches III et V dans les aires associatives ou dans la couche IV de l'aire visuelle primaire montre comment le cerveau répond aux besoins nutritifs des zones à forte activité métabolique. En effet, les neurones des couches III et V permettent les connections cortico-corticales (Barbas, 1986) et la couche IVC reçoit les afférences visuelles spécifiques du thalamus (corps géniculé latérale).

2.1.2 Dans la population âgée

Contrastant avec le marquage observé chez le cas jeune, la microvascularisation des témoins âgés présentait un profil différent: il était irrégulier et la densité vasculaire apparaissait plus faible (Figure XIII). Le nombre de branchements et la longueur des microvaisseaux étaient en particulier diminués chez ces patients âgés. De plus, les vaisseaux semblaient s'amincir et se fragmenter, leur ôtant l'aspect lisse de marquage observé chez le cas jeune (XVIA,B). Un petit nombre de vaisseaux de diamètre très faible a été trouvé: ceci suggère qu'il y a eu un rétrécissement vasculaire affectant à la fois anastomoses et capillaires. Lorsque ce rétrécissement touchait de longs microvaisseaux, nous les avons appelés vaisseaux atrophiés (Figure XVII, XIII). Malgré ces anomalies vasculaires, l'angioarchitecture était préservée et la pathologie vasculaire était faiblement présente dans les régions étudiées. Par exemple, dans l'hippocampe (Figure XIV), les vaisseaux atrophiés étaient trouvés dans le gyrus dentatus, et dans le hile/CA4. Ces altérations vasculaires avaient également une distribution laminaire particulière. Les couches pyramidale et lacunoso-moléculaire étaient les plus affectées dans l'hippocampe proprement dit (subiculum, CA1-CA4). L'aspect lisse du marquage des vaisseaux était généralement perdu dans les couches les plus vascularisées

Figure XIV



Immunohistochimie avec l'anticorps 7E12 dans l'hippocampe chez un sujet âgé. La structure laminaire est encore bien conservée malgré la présence de quelques vaisseaux atrophiés. H1: CA1; H2: CA2; H3: CA3; H4: CA4; H5: hile; DG: gyrus dentatus; Sub: subiculum; Al: alvéus; SP: couche pyramidale; SR: couche radiale; SLM: couche lacunoso-moléculaire. Echelle = 800 μ m.

(gyrus dentatus et couche lacunoso-moléculaire). Dans les cortex entorhinal et périrhinal, les vaisseaux atrophiés étaient trouvés dans les couches superficielles. Dans les cortex frontal supérieur (Figure XV) et temporal inférieur (Figure XIII), les vaisseaux atrophiés étaient retrouvés principalement dans les couches II et III et à un moindre degré, dans les couches V et VI. Dans le cortex visuel primaire, les vaisseaux atrophiés se situaient dans les couches III, IVA et V.

Au cours du vieillissement, une anomalie vasculaire est donc observée: il s'agit principalement d'une atrophie de certains microvaisseaux. Celle-ci a une distribution régionale et laminaire qui correspond aux zones hautement vascularisées à forte activité métabolique. Ces anomalies vasculaires pourraient donc être liées à la baisse de cette activité dans le vieillissement qui se traduirait par une rétraction de certains microvaisseaux devenus "inutiles". Cela expliquerait également le profil fragmenté des microvaisseaux. Il faut également noter que les zones présentant les vaisseaux atrophiés, sont identiques à celles où les lésions neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer sont retrouvées. Il se pourrait donc très bien que ce soit la formation de vaisseaux atrophiés qui conduit à la baisse d'activité métabolique par manque d'apport sanguin.

2.1.3 Dans la maladie d'Alzheimer et le syndrome de Down

Dans le cas de patients atteints de maladie d'Alzheimer, la densité de vaisseaux marqués était fortement diminuée par rapport aux cas témoins (Figure XVI B). Pourtant, suite à l'atrophie corticale, la baisse de densité vasculaire n'était pas toujours évidente à visualiser, les microvaisseaux apparaissaient plus fragmentés et présentaient moins de ramifications (Figure XVI b, XVII). De plus, le nombre de vaisseaux atrophiés (Figure XVII D) était nettement plus important et d'autres anomalies vasculaires

Témoin A



Malade C

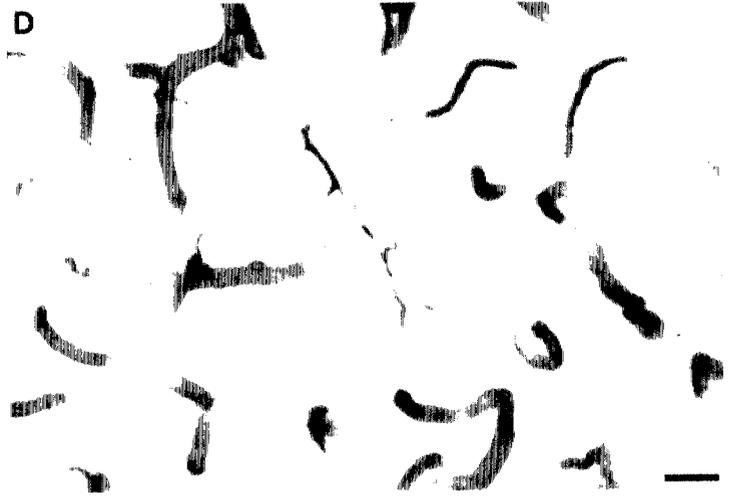
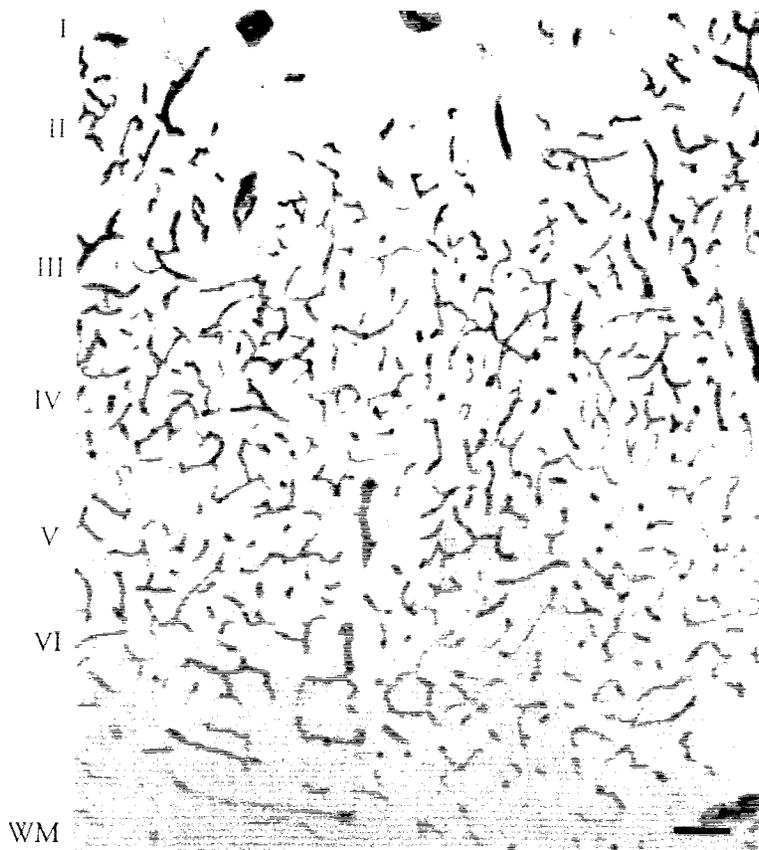


Figure XVI

Immunohistochimie avec l'anticorps 7E12: A) Couche III du cortex visuel primaire chez le jeune témoin de 49 ans. Les vaisseaux sont fortement ramifiés et la densité vasculaire est importante. B) Couche III du cortex temporal inférieur chez le jeune témoin de 49 ans. Noter l'anastomose entre deux microvaisseaux parallèles et l'aspect lisse du marquage des contours de vaisseaux. C) Couche III du cortex visuel primaire d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer. Noter l'irrégularité dans le contour des vaisseaux. Une baisse de la densité vasculaire est évidente avec amincissement et fragmentation des microvaisseaux. D) Couche III du cortex frontal supérieur chez un patient atteint de la maladie d'Alzheimer. Noter la présence du long vaisseau atrophié. D'autres plus courts sont également visibles. A) and C): Echelle = 100 µm. B) and D): Echelle = 25 µm.

Figure XVII



Montage photographique du marquage immunohistochimique obtenu avec l'anticorps 7E12 dans le cortex temporal inférieur chez un patient atteint de la maladie d'Alzheimer. Ce patient avait une forte atrophie cérébrale; cela se traduit par une compression laminaire. Les contours des vaisseaux apparaissent très altérés et les vaisseaux sont fortement fragmentés. De nombreux vaisseaux atrophiés sont également présents. Echelle = 100 μ m.

Figure XVIII

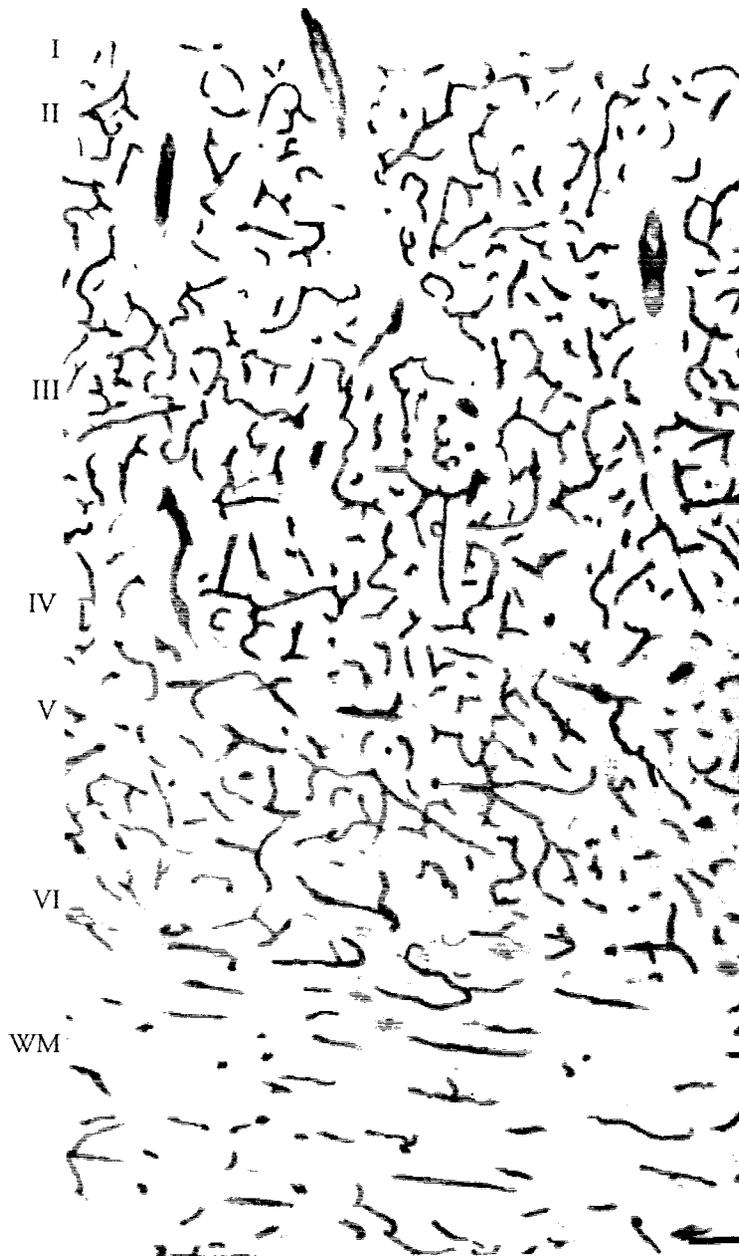


Détails d'anomalies vasculaires marqués par l'anticorps 7E12 chez différents patients atteints de la maladie d'Alzheimer: A) Formation d'une boucle sur une large artériole dans le subiculum (flèche incurvée). Noter également la compression laminaire qui conduit à une perte totale de l'angioarchitecture. B) Tortuosité d'un vaisseau de plus faible diamètre dans la couche III du cortex temporal inférieur (flèche). Ce type de structure était souvent retrouvé dans les régions à forte atrophie. C) Dans ce cas particulier, une lacune (microinfarctus) a été observée dans le CA1. Elle se caractérisait par l'accumulation extracellulaire de matériaux marqués par l'anticorps 7E12 et la présence de vaisseaux atrophiés et tortueux. Echelle = 100 μ m.

étaient observées, telles que la formation de boucles sur de larges artérioles (Figure XVIII A) et l'augmentation de la tortuosité des vaisseaux de plus petit diamètre (Figure XVIII B). Une lacune caractérisée par des débris de microvaisseaux était trouvée dans l'hippocampe d'un patient (région du CA1) (Figure XVIII C). Finalement, dans les cas présentant une atrophie sévère, la diminution de l'épaisseur du cortex conduisait à une forte perturbation de l'angioarchitecture, ne permettant plus de distinction entre les différentes couches du cortex (Figure XVII). Des anomalies vasculaires étaient retrouvées dans toutes les régions du néocortex, à l'exception du cortex visuel primaire où des différences étaient observées selon les patients. Ainsi, une multitude de vaisseaux atrophiés était visible dans toutes les régions du néocortex mais d'autres anomalies vasculaires restaient spécifiques à certaines régions. Par exemple, un écrasement des couches du néocortex était observé, pour certains cas présentant une sévère atrophie, dans la formation hippocampique et les cortex frontal supérieur et temporal inférieur, mais absolument pas dans l'aire visuelle primaire. Lorsque l'hippocampe n'était pas trop atrophié (Figure XIX), les autres changements vasculaires observés étaient identiques à ceux décrits pour les cas témoins âgés, mais ils s'étendaient beaucoup plus. Dans les cortex frontal supérieur, temporal inférieur et visuel secondaire, les anomalies vasculaires tels que les vaisseaux atrophiés ou fragmentés se situaient principalement dans les couches II et III, puis à plus faible densité dans les couches V, VI et finalement IV (Figures XVII, XX). La plupart des vaisseaux présentant des boucles était des artérioles et se situait principalement dans les couches V et VI et à un degré moindre dans les couches II et III. Les vaisseaux tortueux étaient observés majoritairement dans la substance blanche. Des enchevêtrements en spirale de vaisseaux étaient retrouvés dans les couches II et III (Figure XXXII). Dans le cortex visuel primaire, tous



Figure XX



Montage photographique du marquage immunohistochimique obtenu avec l'anticorps 7E12 dans le cortex frontal supérieur chez un patient atteint de la maladie d'Alzheimer. Dans ce cas, il y a une légère atrophie cérébrale et la perte de densité vasculaire est difficile à évaluer. Des vaisseaux atrophiés sont observés dans les couches II-III et V-VI. Des dépôts amyloïdes diffus sont visibles à la limite de la substance blanche (WM) et de la couche VI.

les patients présentaient des anomalies vasculaires mais à un degré moindre que dans les autres régions du néocortex. Elles se situaient également dans les couches III et V, mais dans certains cas avec angiopathie amyloïde, elles se retrouvaient tout d'abord dans la couche IVC, puis dans les couches III et V (Figure XXI).

Pour le syndrome de Down, deux cas âgés respectivement de 20 et 74 ans ont été étudiés: aucune lésion neuropathologique de type Alzheimer (dépôts amyloïdes ou lésions neurofibrillaires) n'a été détectée par une coloration à la thioflavine S chez le patient jeune. Par contre, chez le sujet âgé, une forte densité de plaques séniles et de lésions neurofibrillaires a pu être mise en évidence. Les deux cas présentaient des implications vasculaires tout à fait différentes. Chez le jeune trisomique, les anomalies vasculaires étaient similaires à celles décrites pour les témoins âgés: les vaisseaux atrophiés étaient principalement trouvés dans les couches III et V (Figure XXIIA). Le cas âgé possédait des microvaisseaux fins et fragmentés à un degré beaucoup plus important que les patients atteints de maladie d'Alzheimer et la faible densité de vaisseaux marqués par rapport au jeune sujet était également surprenante. Des vaisseaux atrophiés étaient retrouvés en grand nombre dans toutes les couches (Figure XXIIB).

Concernant les anomalies vasculaires, la différence avec le vieillissement est donc évidente. Outre les vaisseaux atrophiés décrits en grand nombre dans toutes les couches et régions, le profil angioarchitectural est différent: il y a une baisse de la densité vasculaire et une fragmentation des microvaisseaux. Ces deux phénomènes sont probablement liés; en effet, la diminution des ramifications vasculaires confère aux microvaisseaux cet aspect fragmentaire. Finalement, des structures anormales ont été identifiées tels que les vaisseaux tortueux, les vaisseaux en boucle et les enchevêtrements en spirale de microvaisseaux.

Figure XXI



Montage photographique du marquage immunohistochimique obtenu avec l'anticorps 7E12 dans le cortex visuel primaire chez un patient atteint de la maladie d'Alzheimer présentant une angiopathie amyloïde. Les microvaisseaux sont moins altérés que dans les autres régions du néocortex (cortex frontal supérieur et temporal inférieur). Les vaisseaux atrophiés étaient situés dans les couches II et III et V et VI, mais également dans la couche IVC. Les dépôts amyloïdes étaient localisés dans les couches II et III et V et VI (flèches). De plus, la couche IVC était riche en dépôts diffus à la périphérie des vaisseaux (têtes de flèches). Echelle = 100 μ m.

2.1.4 dans d'autres maladies neurodégénératives

Maladie de Pick

La maladie de Pick, démence dégénérative présénile, se caractérise par une atrophie lobaire circonscrite fronto-temporale, et l'absence de lésions de type sénile à l'examen histologique. Une lésion particulière est retrouvée dans environ 70 % des cas: les corps de Pick, ballonnements argyrophiles retrouvés dans les petits neurones pyramidaux (Brion et Plas, 1991).

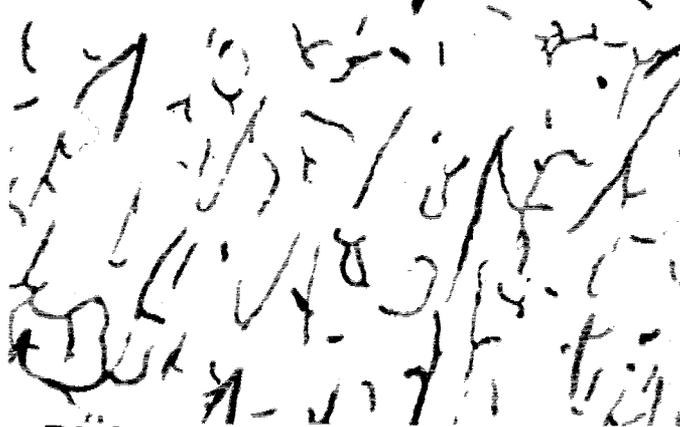
Dans la maladie de Pick (n = 6, moyenne d'âge = 71,8 ± 6,1 ans), la densité des vaisseaux était dramatiquement diminuée et l'aspect fragmenté était extrême. L'atrophie corticale était si importante qu'il était difficile ou parfois même impossible de distinguer clairement les profils angioarchitecturaux. Dans le plus âgé des cas, nous avons trouvé de nombreux vaisseaux tortueux. Dans tous les cas, le nombre de vaisseaux atrophiés était très important sans préférence laminaire évidente (Figure XXIIc).

Démence pugilistique

La démence pugilistique est un état démentiel consécutif à des traumatismes crâniens. Neuropathologiquement, elle se caractérise par la présence de lésions neurofibrillaires en amas dans le cortex frontal et temporal (médián, en particulier). Récemment, des dépôts amyloïdes détectés par un anticorps anti-protéine amyloïde ont été trouvés chez certains cas (Corsellis, 1978).

Dans les deux cas de démence pugilistique (63 et 69 ans), nous ne disposons que du cortex frontal et aucun dépôt amyloïde n'a pu être observé. La fragmentation des vaisseaux était comparable à celle observée dans la maladie d'Alzheimer. Aucun vaisseau tortueux ou en boucle n'a été observé. La perte en densité vasculaire était frappante, principalement

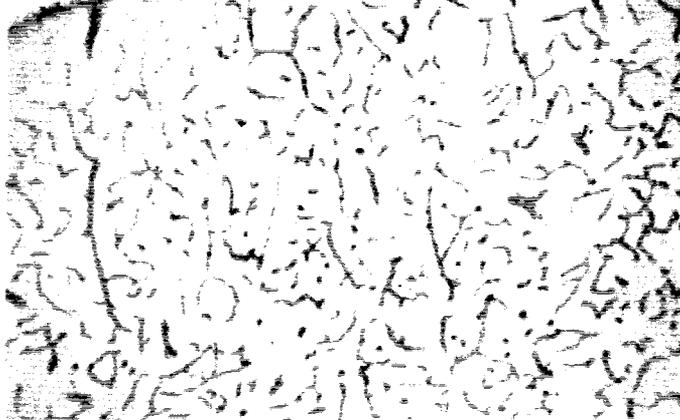
A: Jeune Down



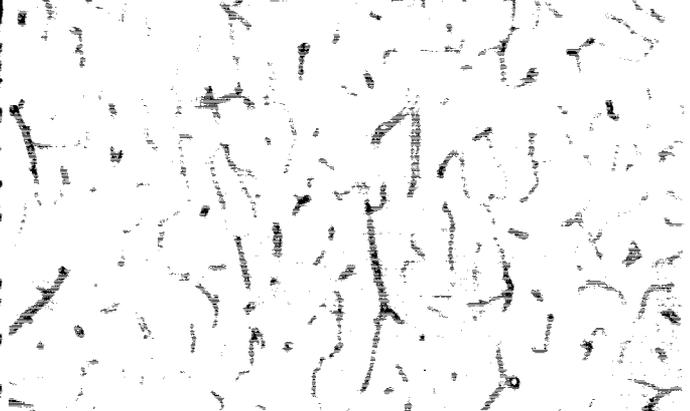
B: Down âgé



C: Pick



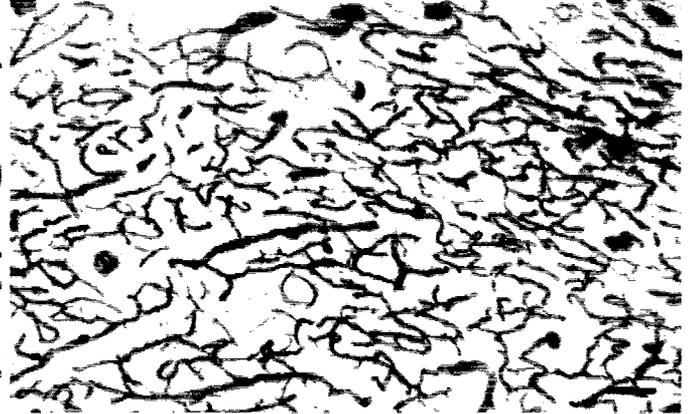
D: D. Pugl



E: Guam



F: Guam



dans les couches superficielles. La plupart des vaisseaux atrophiés ont été trouvés dans les couches III et V (Figure XXIID).

Syndrome de l'île de Guam

Ce syndrome associant maladie de Parkinson, sclérose latérale amyotrophique et démence, atteint la population Chamorro de l'île de Guam. L'examen histologique montre des lésions neurofibrillaires. Une origine environnementale est fortement soupçonnée (Garruto, 1991)

Dans tous les cas de Guam (n = 4 à syndrome parkinsonien, moyenne d'âge = $75,3 \pm 3,9$ ans et n = 1 présentant une sclérose latérale amyotrophique, 65 ans), une forte baisse de la densité vasculaire a été observée. Une compression laminaire des couches superficielles a été également observée chez certains patients avec syndrome parkinsonien (Figure XXIII) Des vaisseaux tortueux ont été trouvés chez tous les patients, dans toutes les régions étudiées et dans toutes les couches, y compris la substance blanche. Dans tous les cas, les vaisseaux atrophiés étaient principalement retrouvés dans les couches II et III (Figures XXII E,F) et V du cortex frontal supérieur et temporal inférieur. Dans les cas de Guam à syndrome parkinsonien, les enchevêtrements en spirale de vaisseaux étaient couramment rencontrés, principalement dans les couches superficielles. Dans un cas de Guam avec syndrome parkinsonien et manifestation d'atypies sémiologiques évoquant une paralysie supranucléaire progressive, la perte laminaire était évidente et de nombreux vaisseaux en boucle et tortueux étaient observés (Figure XXII F).

2.1.5 Anomalies vasculaires et démences: cause ou effet?

L'étude de la microvascularisation dans le cerveau normal jeune nous a permis de vérifier la corrélation entre cyto- et angioarchitecture (Duvernoy et al., 1981; Mann et al., 1986; Duvernoy, 1988). Dans le cerveau âgé, des anomalies vasculaires sont présentes tels que les vaisseaux atrophiés. Il est intéressant de noter qu'elles ont une distribution laminaire et régionale qui correspond aux zones où les lésions neuropathologiques de type Alzheimer sont retrouvées. Pourtant, il est probable que ces modifications vasculaires soient plutôt liées à d'autres complications tels que l'hypertension (Melamed et al., 1980), l'athérosclérose ou encore des problèmes respiratoires ou cardiaques (Funkenstein, 1988) qui conduiraient à des effets identiques à ceux rencontrés dans les maladies vasculaires (souffrance de la cellule endothéliale) (Vinters and Mah, 1991). Ces altérations expliqueraient aussi pourquoi les microvaisseaux perdent cet aspect lisse rencontré chez le jeune cas témoin.

L'étude de la microvascularisation dans la maladie d'Alzheimer et le syndrome de Down laisse ouverte une hypothèse étiopathogénique vasculaire, en particulier due au fait qu'un jeune trisomique sans lésion neuropathologique de type Alzheimer présente déjà des anomalies vasculaires. Cela suggère que la pathologie vasculaire précède l'apparition des dépôts amyloïdes et des lésions neurofibrillaires. Néanmoins, il est difficile de tirer une conclusion à partir d'un cas. Pourtant, de nombreux auteurs ont déjà émis l'hypothèse d'un rôle causal d'une vascularisation déficiente dans la maladie d'Alzheimer telle que la rupture de la barrière hémato-encéphalique (Hassler, 1965; Ravens, 1978; Miyakawa et al., 1982; Hardy et al., 1986; Scheibel et al., 1986). Ainsi, dans le vieillissement et la maladie d'Alzheimer, une augmentation du diamètre des capillaires et une diminution de la densité vasculaire ont été décrites (Hassler, 1965; Ravens,

1978; Bell and Ball, 1981; Mann et al., 1986; Perlmutter et al., 1990). Pourtant, les résultats entre patients atteints de la maladie d'Alzheimer et témoins âgés sont différents selon les auteurs. Certains n'observent pas de différence significative entre les deux populations quant au diamètre des capillaires et la densité vasculaire, même au niveau des régions présentant un grand nombre de lésions neuropathologiques de type Alzheimer (Bell and Ball, 1981; Bell and Ball, 1990). D'autres auteurs voient non seulement une diminution de la densité vasculaire mais aussi la présence d'anomalies vasculaires particulières (vaisseaux en boucle et/ou tortueux) (Hassler, 1965; Scheibel et al., 1986). Certaines de ces anomalies pourraient être la réponse physiologique à une modification métabolique: les vaisseaux en boucle et les enchevêtrements en spirale pourraient ralentir le débit sanguin en cas d'hypertension locale et ainsi prévenir des accidents ischémiques. D'autres vaisseaux tels que les vaisseaux tortueux pourraient être une réponse mécanique à l'atrophie corticale.

Récemment, Fischer et coll (1990) ont montré que les anomalies vasculaires et la baisse de densité vasculaire avaient une distribution régionale spécifique. Nos résultats vont également dans ce sens: il y a une spécificité dans la distribution des anomalies vasculaires (en particulier les microvaisseaux atrophiés) non seulement régionale mais aussi laminaire. Il faut néanmoins noter l'hétérogénéité de nos résultats: tous les malades n'ont pas une densité vasculaire fortement diminuée; la présence d'angiopathie amyloïde modifie le profil laminaire des anomalies vasculaires en particulier dans le cortex visuel primaire, pour passer des couches III et V à la couche IVC. Il est à noter que cette hétérogénéité est à rapprocher de celle observée pour la dégénérescence neurofibrillaire qui affecte tout particulièrement le cortex occipital (Hof et Bouras, 1991; Hof et al., 1989, 1990) ou qui épargne plus ou moins l'aire visuelle primaire (aire

17) (Vermersch et al., 1992). Il serait intéressant d'analyser la microvascularisation dans ces cas particuliers.

Pour mieux comprendre si ces anomalies vasculaires jouent un rôle pathogénique ou sont une conséquence de la présence de lésions de type Alzheimer, nous avons analysé la microvascularisation dans d'autres cas de souffrance neuronale. Tout d'abord, la maladie de Pick dont l'étiologie reste inconnue et qui ne présente pas de lésions neurofibrillaires mais une autre altération neuronale (corps de Pick) et une forte atrophie corticale, ensuite la démence pugilistique d'origine traumatique et finalement le syndrome de l'île de Guam probablement d'origine environnementale. Toutes les anomalies vasculaires décrites dans la maladie d'Alzheimer ont été retrouvées en partie ou totalement dans ces démences.

Dans la maladie de Pick, l'atrophie cérébrale est particulièrement sévère. Les anomalies vasculaires observées chez ces patients étaient principalement la compression laminaire avec un écrasement des couches qui a entraîné une perte du profil angioarchitectural et la présence de vaisseaux tortueux. Il semble donc évident de penser que ce type de structures apparaît à la suite de l'atrophie: il y aurait eu un phénomène mécanique de compression.

Dans la démence pugilistique, les vaisseaux atrophiés sont retrouvés dans les couches III et V; il y a donc une corrélation entre cette anomalie vasculaire et la distribution des lésions neurofibrillaires (Hof et al., 1992). La baisse de la densité vasculaire et l'aspect fragmenté des microvaisseaux était particulièrement visible dans les couches superficielles. Les traumatismes crâniens ont été considérés comme facteurs responsables de l'apparition des lésions neurofibrillaires non seulement dans la démence pugilistique mais aussi dans d'autres cas tel que le comportement d'auto-mutilation, fréquent dans les complications de l'autisme (Hof et al., 1991a). Dans de tels cas, il est

possible que la répétition de ces chocs et la création de traumatismes crâniens aboutissent à des dommages vasculaires qui induiraient la formation de lésions neurofibrillaires. Par exemple, dans le cas d'autisme avec auto-mutilation décrit par Hof et coll. (1991a), des amas de lésions neurofibrillaires ont été décrits à la périphérie des vaisseaux.

Les résultats obtenus avec les cas de syndrome de Guam apportent d'autres arguments à un rôle éventuel des microvaisseaux dans l'apparition de lésions neurofibrillaires. Pour les cas de Guam à syndrome parkinsonien, il y a également une corrélation entre la distribution laminaire et régionale des vaisseaux atrophiés et celle des neurones en dégénérescence (Hof et al., 1991b). L'étiopathogénèse du syndrome de Guam reste inconnue mais un facteur environnemental est probablement impliqué (Garruto, 1991). En particulier, l'aluminium et une toxine de la plante *Cycas circinalis* pourraient être impliqués dans la formation des lésions neurofibrillaires (Perl et al., 1982; Spencer, 1987; Garruto, 1991). L'aluminium est d'un intérêt particulier puisqu'il peut bloquer les sites anioniques de la barrière hémato-encéphalique de la même manière que dans les encéphalopathies des dialysés (Bakir et al., 1986) et par conséquent favoriser l'entrée d'une toxine dans le système nerveux central.

Nous avons pu mettre en évidence de nombreuses anomalies cérébrovasculaires présentes à la fois dans le vieillissement et dans toutes les conditions démentielles. Néanmoins, il existe une diversité dans leur nature et leur localisation qui confère à la pathologie vasculaire de chaque démence un caractère propre. La compression laminaire et les vaisseaux tortueux sont secondaires à l'atrophie cérébrale: suite à la perte neuronale, il y a un affaissement du tissu cortical (écrasement des couches du cortex) qui donne cet aspect "en ressort" aux microvaisseaux des couches superficielles. Ces vaisseaux tortueux sont caractéristiques de la maladie de

Pick même s'ils sont retrouvés dans d'autres démences. Les vaisseaux en boucle et les enchevêtrements en spirale sont probablement le résultat d'une action physiologique; en effet, un phénomène mécanique ne peut pas seul expliquer la torsion ou la spiralisation de trois à quatre vaisseaux; il faut un processus dynamique. Il n'est pas certain que ces anomalies aient un rôle dans la formation des lésions neuropathologiques. Finalement, les vaisseaux atrophiés sont communs à toutes les démences et sont également retrouvés dans le vieillissement. Leur distribution régionale et laminaire est corrélée avec celle des lésions neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer et des autres démences. Si cette association peut suggérer un rôle causal de la vascularisation dans les démences pugilistiques et les cas de Guam à syndrome parkinsonien, cela n'est pas si évident pour la maladie d'Alzheimer. Cette dernière a une étiologie qui lui est propre et certainement différente des autres démences étudiées. La seule conclusion qui puisse donc être tirée de l'étude de la vascularisation est la présence d'altérations vasculaires souvent ignorée ou sous-estimée dans le vieillissement et toutes les démences étudiées. Ce terme d'altération vasculaire doit être néanmoins clarifié. En effet, il existe différentes anomalies vasculaires et il est possible que certaines d'entre-elles jouent un rôle dans la pathogénèse des lésions chez certains patients atteints de la maladie d'Alzheimer. L'hétérogénéité de la maladie rend cependant l'analyse de ces résultats difficile.

2.2 Les dépôts amyloïdes

Si la pathologie vasculaire est peut-être causale dans un sous-groupe de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Miyakawa et al., 1982; Selkoe, 1991), quelle est la relation entre dépôts amyloïdes et microvascularisation? Pour tenter de répondre à cette question, nous avons analysé la morphologie des dépôts amyloïdes marqués avec l'anticorps monoclonal 7E12 (dirigé contre un héparane sulfate protéoglycane vasculaire) et leur relation spatiale avec les microvaisseaux.

2.2.1 Morphologie des dépôts amyloïdes

Une origine vasculaire des dépôts amyloïdes est soupçonnée du fait de leur marquage par l'anticorps 7E12. La classification des dépôts amyloïdes (visualisés avec un anticorps anti-peptide A4) choisie pour analyser le marquage de l'anticorps 7E12 est celle de Ikeda et al., 1989. Tous les types de dépôts ont été retrouvés avec l'anticorps 7E12:

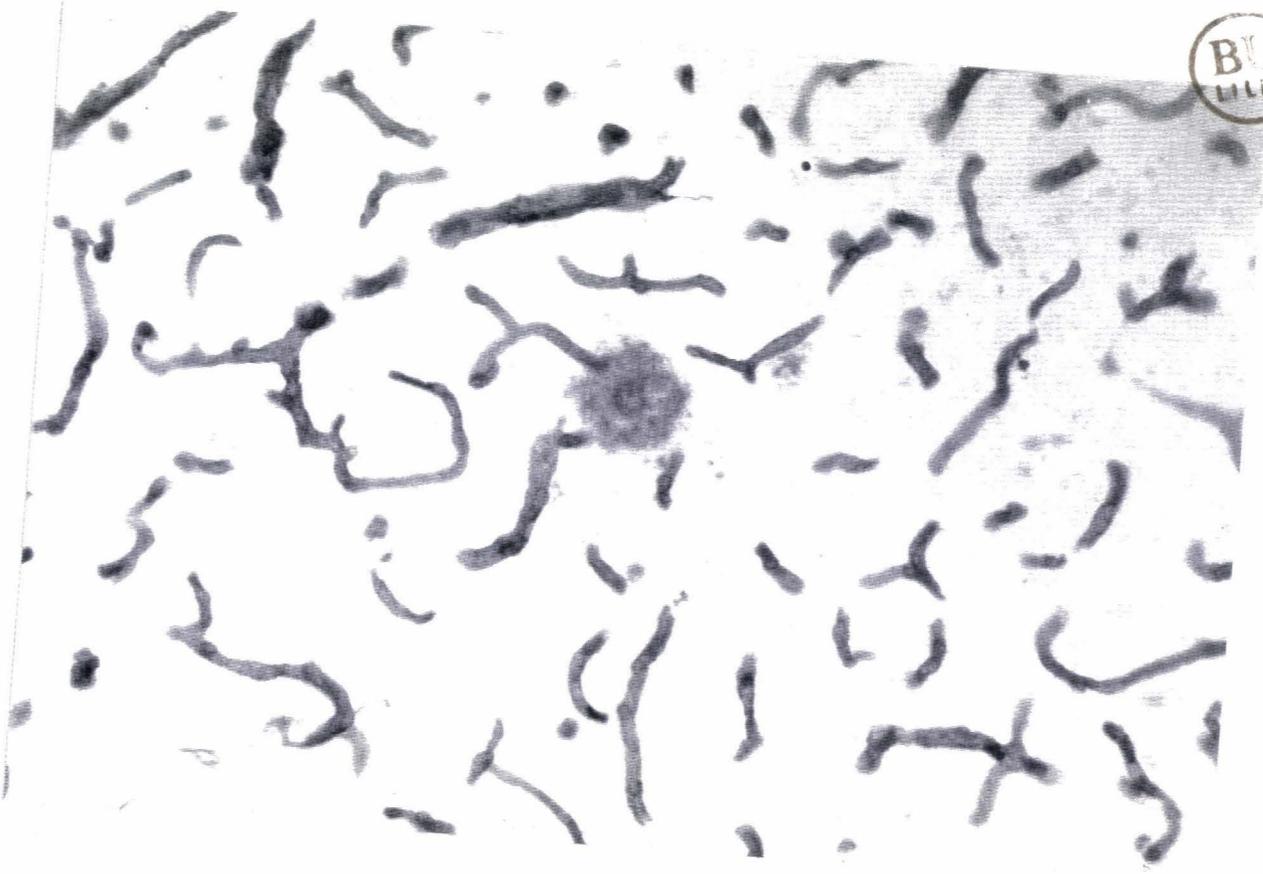
dépôts à core ou de type 1

Ce marquage était rare (Figure XXIV) et il était difficile de déterminer si le core n'était pas en fait un microvaisseau coupé transversalement. Ce type de dépôts était retrouvé plus volontiers dans les cas avec angiopathie amyloïde mais ne présentait pas de distribution régionale particulière.

dépôts sans core ou de type 2

Ce type de dépôts amyloïdes représentait la majorité du marquage obtenu avec l'anticorps 7E12 (Figures XXV,XXVI). Il a été trouvé chez tous les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, le sujet âgé trisomique et le cas présentant un syndrome de Guam parkinsonien avec dépôts amyloïdes.

BU
LLE

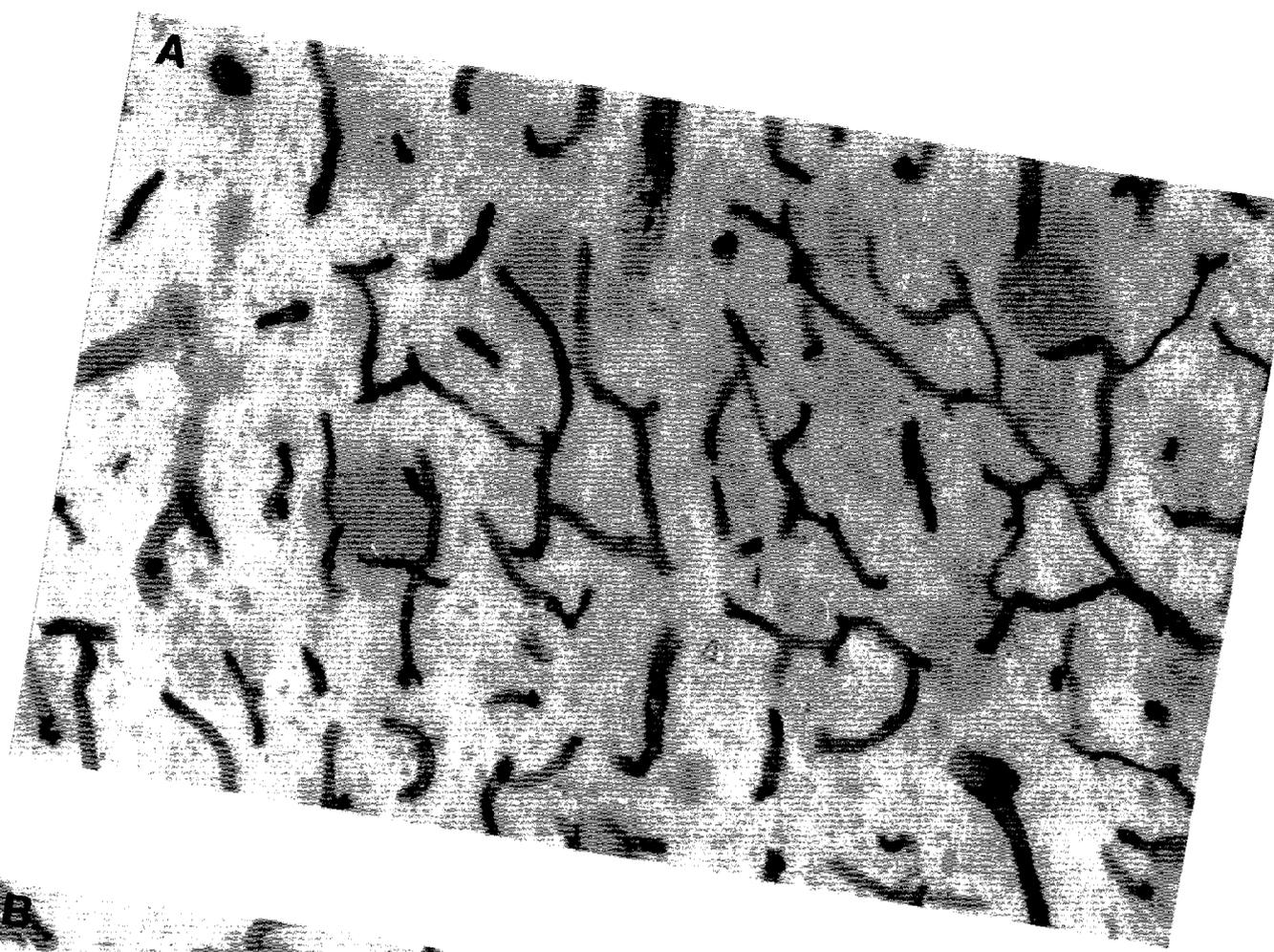


← Figure XXV

Immunohistochimie de dépôts amyloïdes de type 2 réalisée avec l'anticorps 7E12: A) dans le cortex frontal supérieur (couche III). Noter l'aspect granulaire du marquage. Le dépôt central ne présente aucune relation de contiguïté avec les microvaisseaux mais il est possible d'observer d'autres dépôts en relation avec les vaisseaux (en haut). B) dans le cortex temporal inférieur (couche V), les dépôts de type II ont un aspect plus compact et ils ne sont pas toujours en contact avec les microvaisseaux. A) Echelle = 25 μm . B) Echelle = 50 μm .

Figure XXVI →

Immunohistochimie de dépôts amyloïdes de type 2 réalisée avec l'anticorps 7E12: A) dans le cortex temporal inférieur (couche III), les dépôts ont un aspect limite entre le type 2 et le type 3, ils n'ont pas un aspect granulaire. Ils sont en contact avec les vaisseaux mais il est difficile d'établir leurs relations exactes avec la vascularisation. B) dans le cortex temporal inférieur (couche VI), les dépôts ont un aspect granulaire en contact ou non avec les vaisseaux. Echelle = 50 μm .



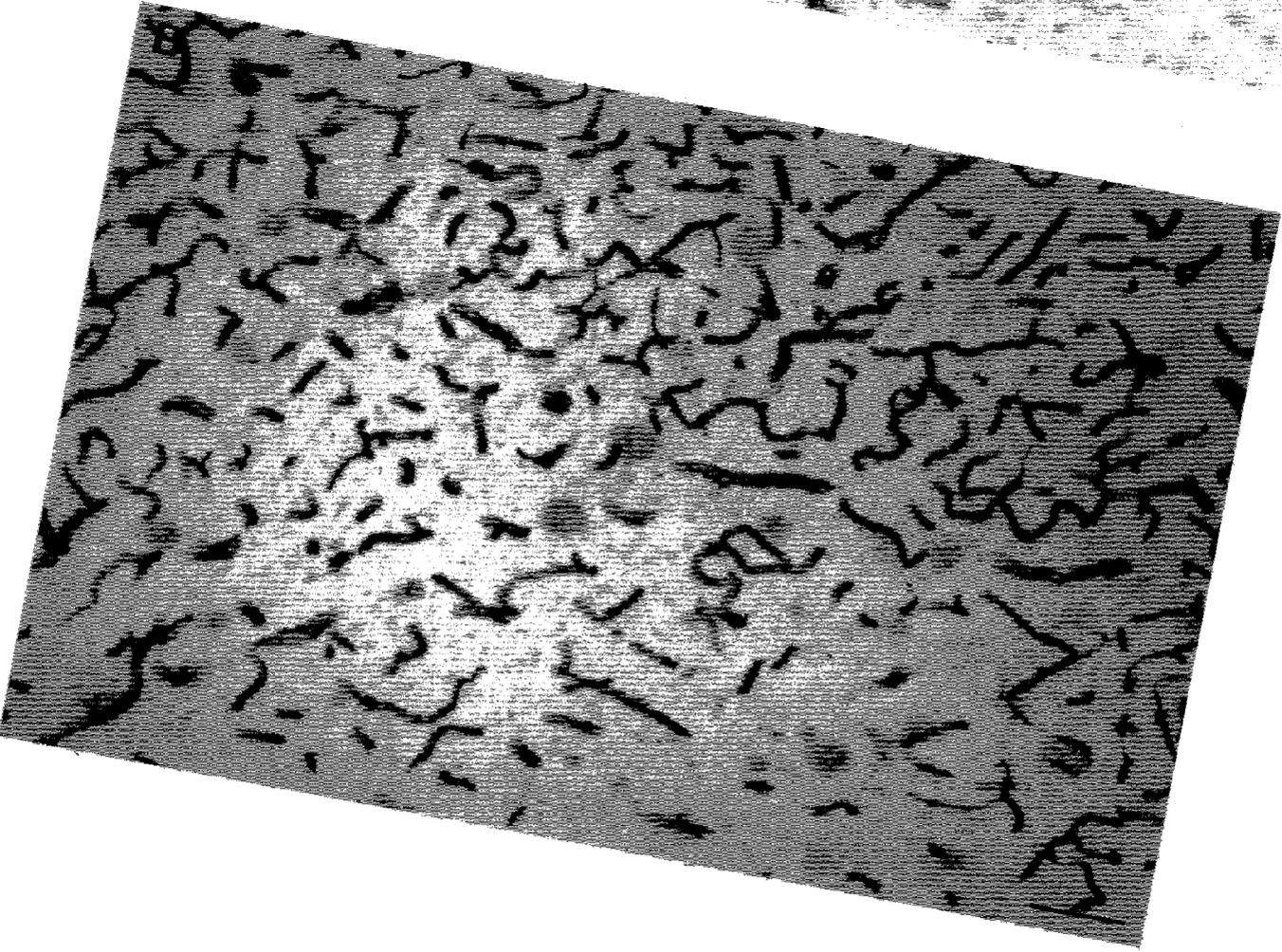
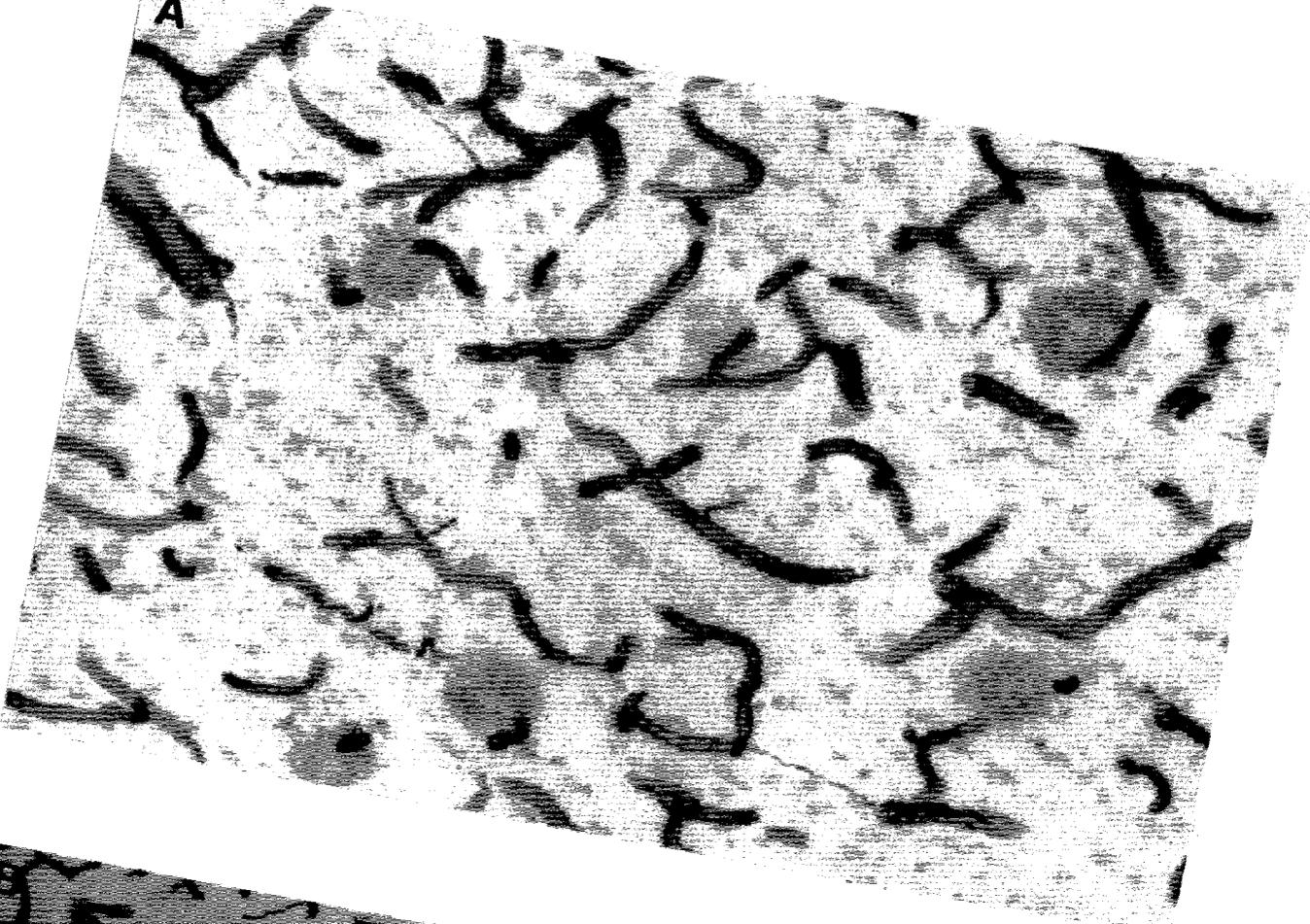
dépôts diffus et de type 3

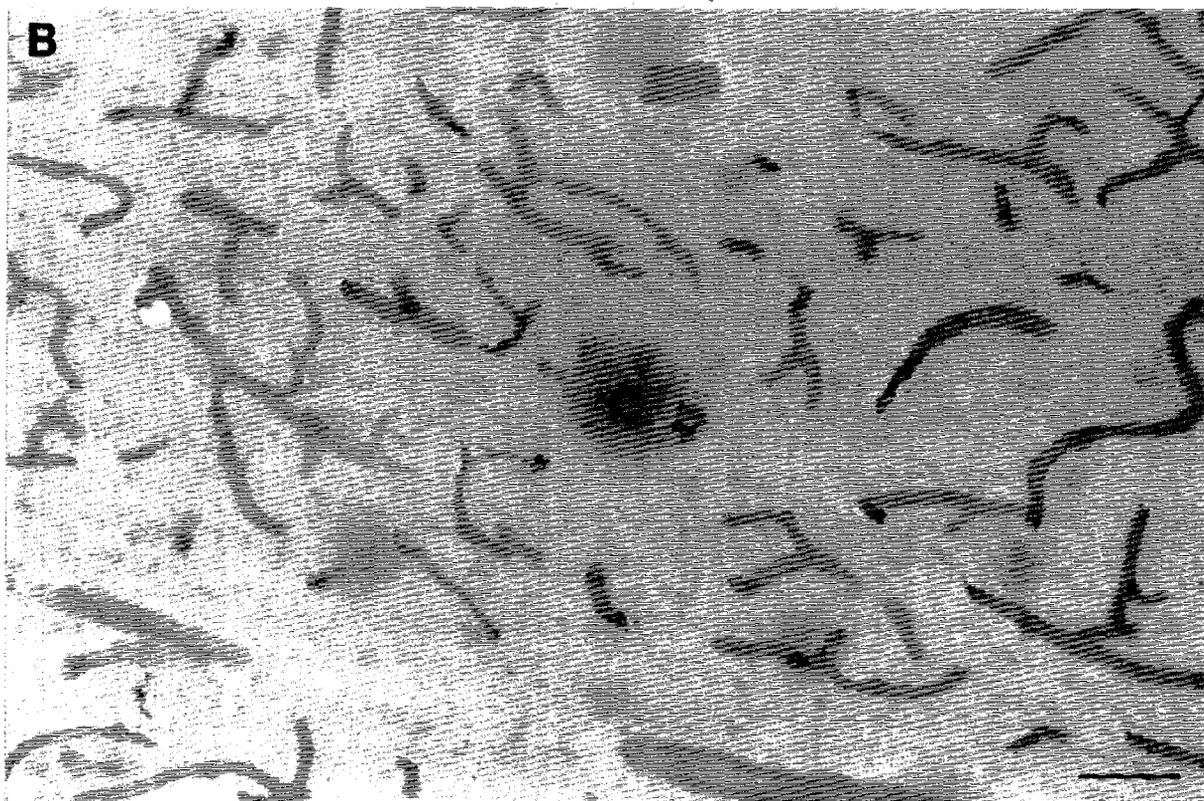
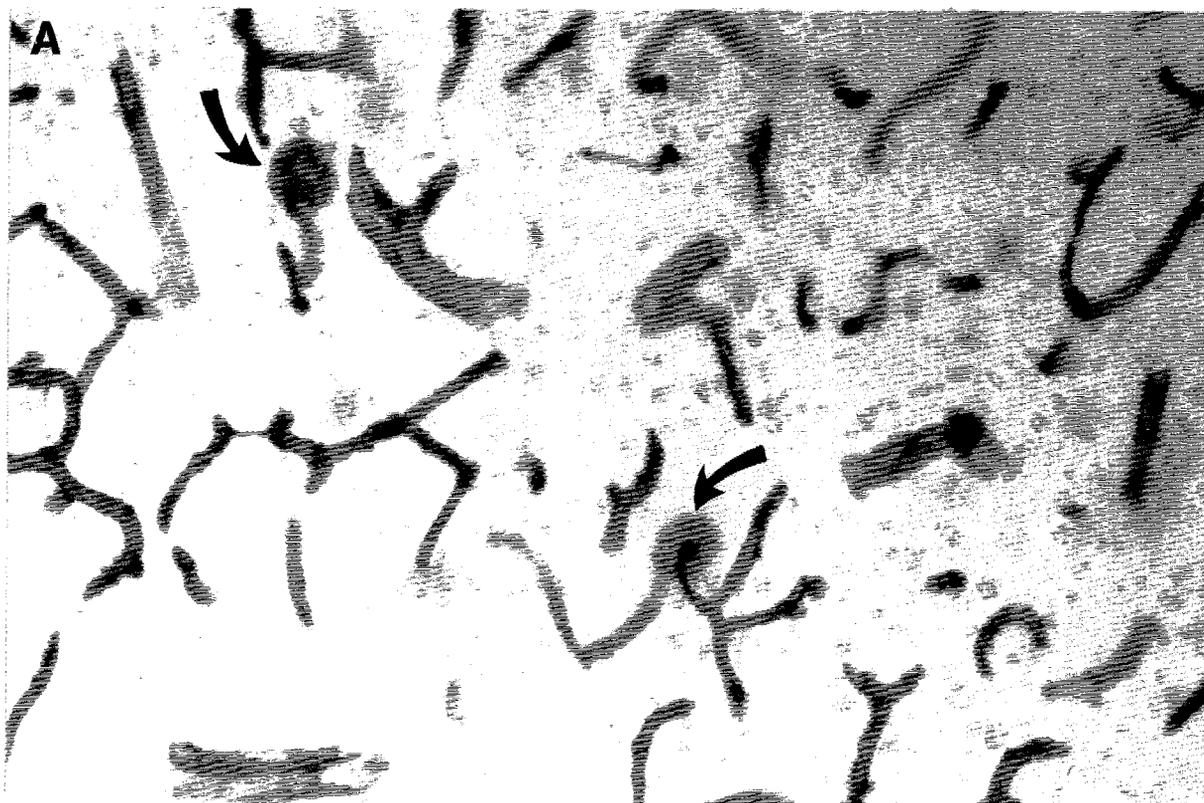
Il s'agissait d'un marquage caractéristique fréquemment rencontré à la limite entre la substance blanche et la couche VI (Figure XXVII): les dépôts diffus étaient fréquents mais à un moindre degré que ceux de type 2.

dépôts en contact ou non avec les vaisseaux

Etant donné la présence d'un HSPG vasculaire, constituant de la membrane basale des vaisseaux, dans les PS, nous avons analysé les rapports entre microvaisseaux et dépôts amyloïdes. Il ne semble pas y avoir une relation entre dépôts amyloïdes et microvaisseaux dans la plupart des cas (Figures XXV, XXVII, XXVIII). Les dépôts amyloïdes se trouvaient dispersés dans le domaine extracellulaire sans relation de contiguïté avec les microvaisseaux. Comme décrit précédemment pour les altérations vasculaires, dans le cas de patients avec angiopathie amyloïde, ce profil était quel que peu différent; un manchon amyloïde semblait être observé à la périphérie des vaisseaux (Figure XXIX). Cet aspect particulier d'amyloïdose a déjà été décrit, après une coloration à la thioflavine S, chez certains patients avec angiopathie amyloïde (Peers et al., 1988). Ce type d'amyloïde serait à l'origine des neurites dystrophiques trouvés en périphérie des vaisseaux (Delacourte et al., 1987). Il semble donc que dans ces cas, il y ait une relation de cause à effet entre les vaisseaux avec angiopathie amyloïde et les neurites en dégénérescence.

A





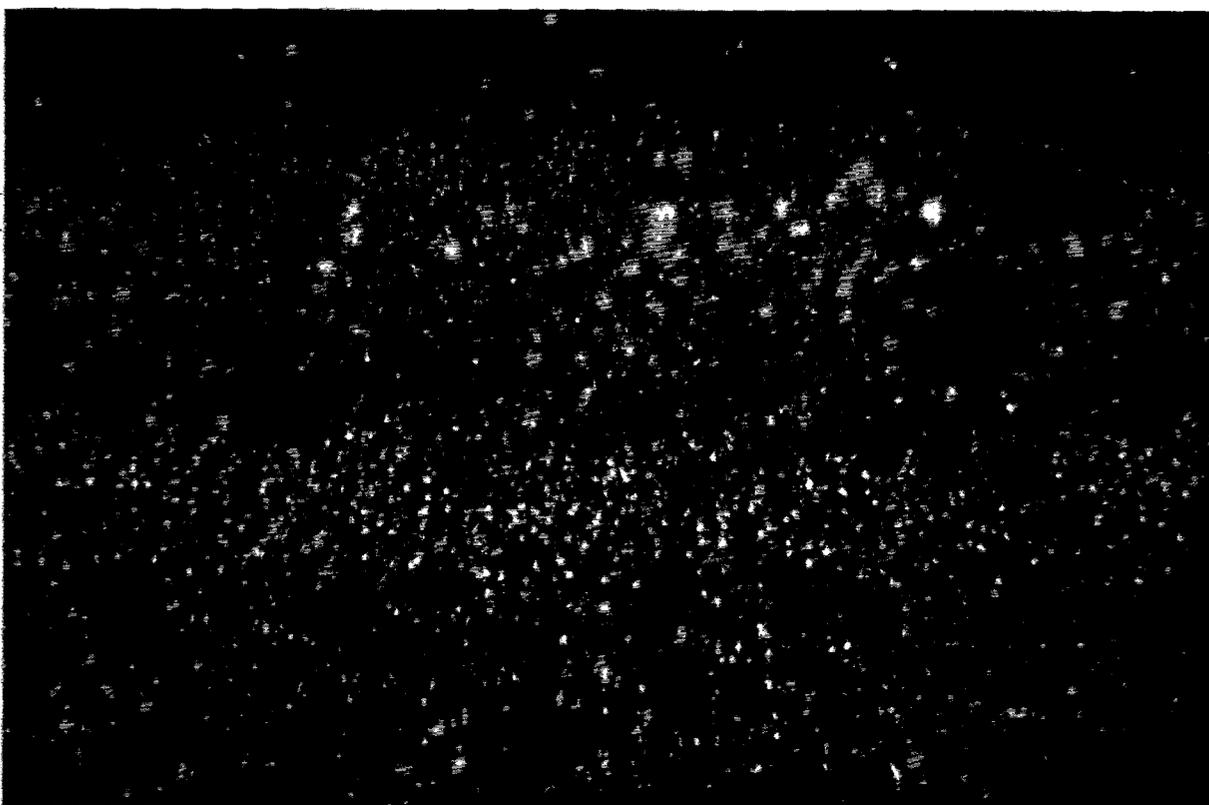
2.2.2 Distribution laminaire et régionale des dépôts amyloïdes marqués par l'anticorps 7E12

Chez un sujet âgé (78 ans), nous avons trouvé des dépôts amyloïdes de type 2 en l'absence de lésions neurofibrillaires (à l'exception du cortex entorhinal, où de rares lésions neurofibrillaires ont pu être observées). Ces dépôts étaient absents de l'hippocampe, rares dans le cortex périrhinal et très nombreux dans le cortex frontal et à un degré moindre dans le cortex temporal. Dans ce dernier, ils étaient localisés de façon prédominante dans la couche III, alors qu'ils se trouvaient plutôt dans les couches III et V du cortex frontal supérieur. Les anomalies vasculaires dans ce cas étaient moins sévères que dans d'autres cas témoins sans lésion neuropathologique. Si ce cas représente un cas pré-clinique de la maladie d'Alzheimer, ces résultats ne sont pas en faveur d'un rôle causal de la microvascularisation.

L'analyse régionale et laminaire des dépôts amyloïdes a également été réalisée dans la maladie d'Alzheimer (Figure XXX). Tous les types de dépôts amyloïdes sont marqués par l'anticorps 7E12, même les dépôts diffus, parfois peu colorés par la thioflavine S (Figure XXXI). La déposition d'héparane sulfate protéoglycane est donc un phénomène précoce dans l'amyloïdose puisque les dépôts diffus ou pré-amyloïdes, contenant non seulement le peptide A4 mais aussi l'APP complet, sont considérés comme les premiers à infiltrer le tissu nerveux. Dans l'hippocampe, les dépôts amyloïdes sont situés en nombre décroissant respectivement dans le gyrus dentatus, puis dans le hile/CA4 et finalement le CA1/subiculum (Figure XXI). Dans les cortex temporal et frontal, ils se trouvaient principalement dans les couches II et III, la couche V et à la limite de la couche VI et de la substance blanche (Figures XXII, XXXII). Dans le cortex visuel primaire, leur distribution laminaire était liée à la co-existence ou non d'angiopathie

A)

II



B)

III

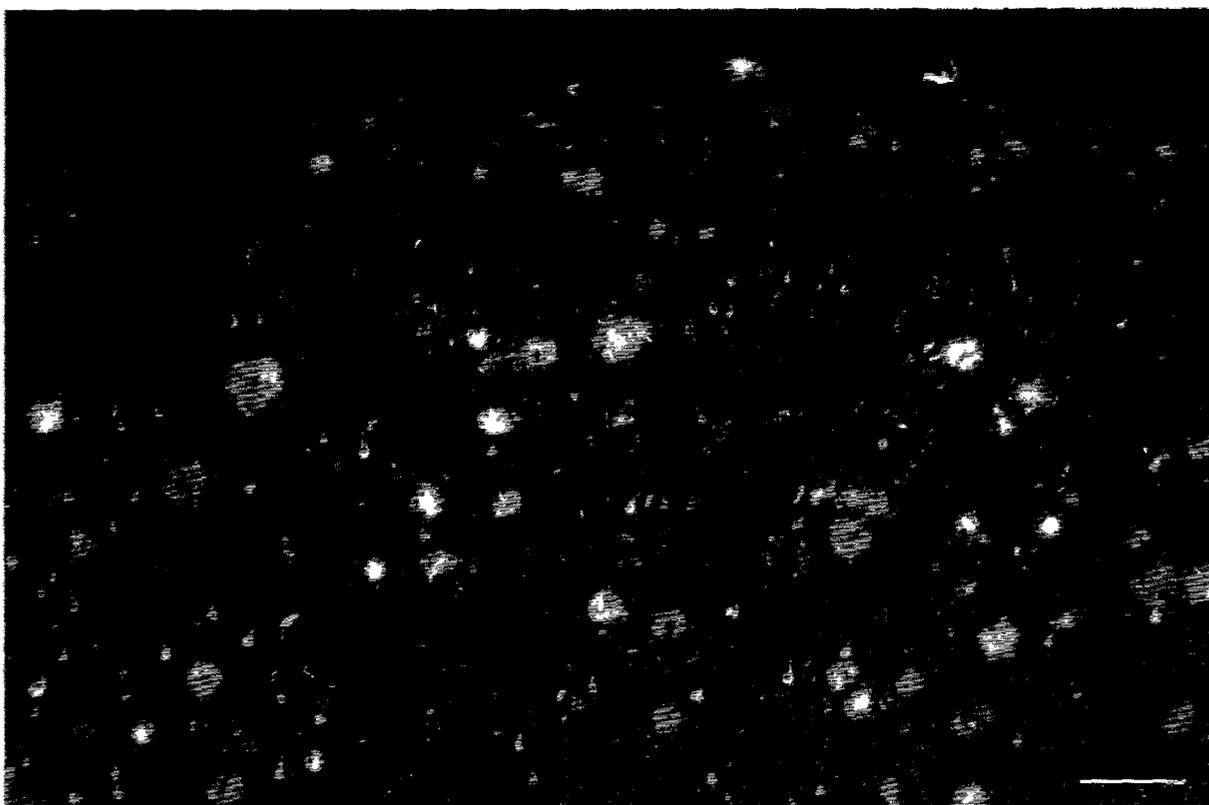
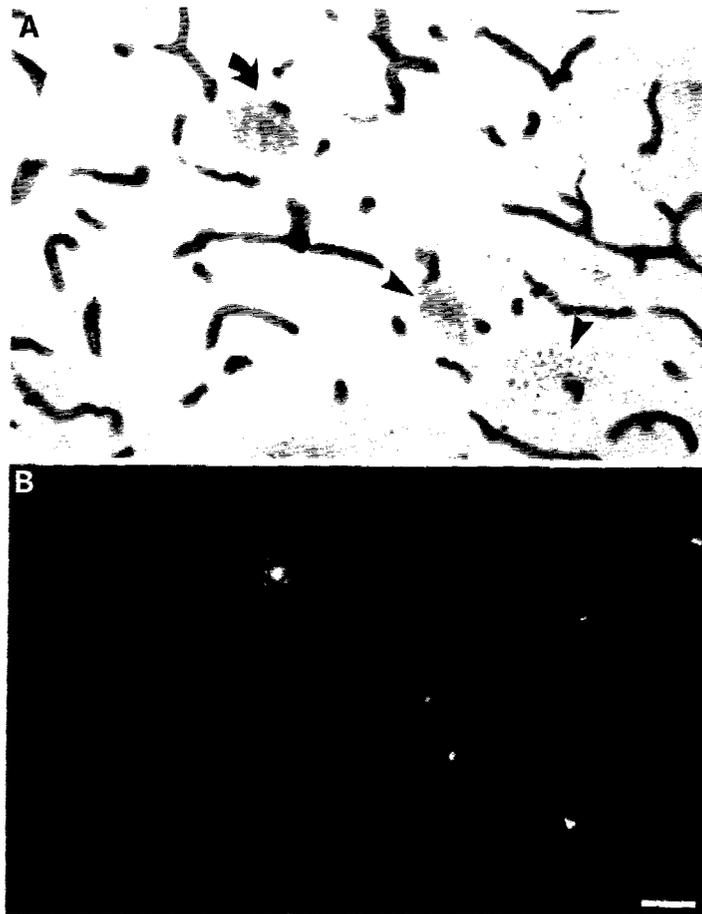
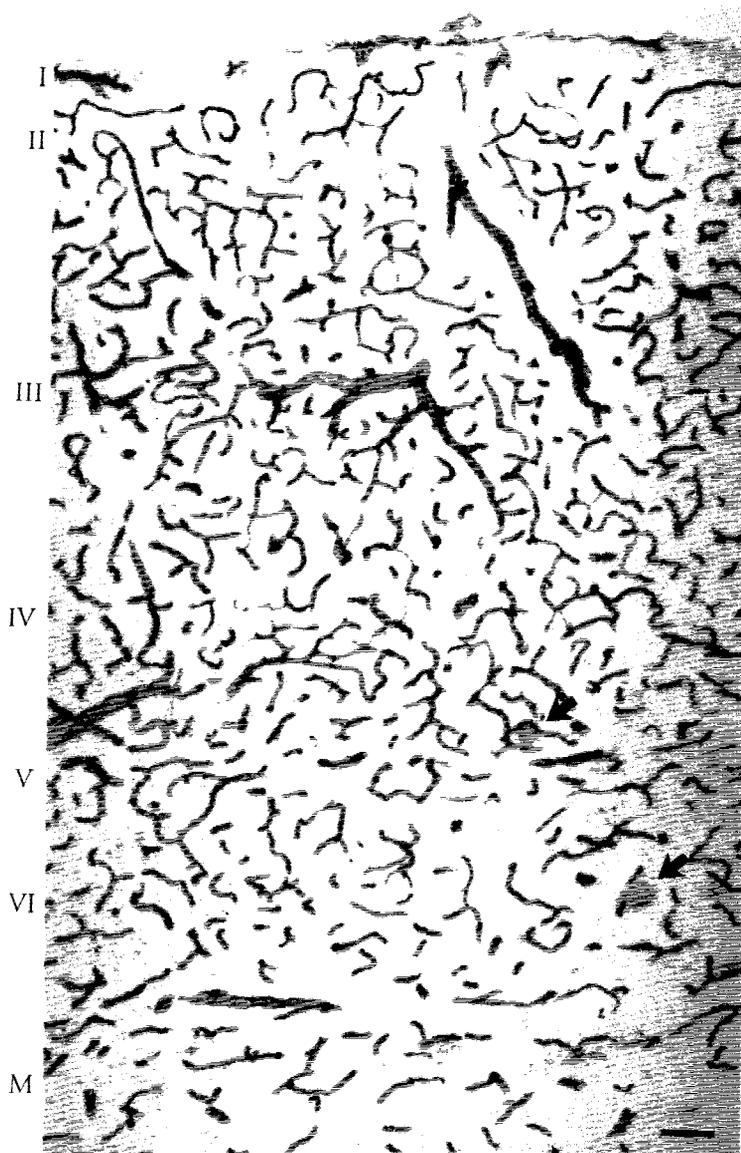


Figure XXXI



Couches profondes du cortex temporal d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer. Double marquage des dépôts amyloïdes par l'anticorps 7E12 (A) et par une coloration à la thioflavine S en fluorescence (B). Noter que les dépôts amyloïdes sont à la fois marqués par l'anticorps et le colorant (flèche). Les dépôts préamyloïdes ou diffus sont peu ou pas marqués par la thioflavine S (têtes de flèche). Ils n'ont pas encore acquis une structure en feuillets β -plissés mais ils sont bien marqués par l'anticorps. Echelle = 50 μ m.

Figure XXXII



Montage photographique du marquage immunohistochimique obtenu avec l'anticorps 7E12 dans le cortex frontal supérieur chez un patient atteint de la maladie d'Alzheimer. Noter l'atrophie corticale, le grand nombre de vaisseaux atrophiés et l'enchevêtrement de microvaisseaux (astérisque). Des dépôts amyloïdes diffus sont également détectés, en particulier dans les couches V et VI (flèches). Echelle = 100 μ m.

Figure XXXIII

Couche IVC du cortex visuel primaire d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer manifestant une angiopathie dyshorique. Double marquage des dépôts amyloïdes par une coloration à la thioflavine S en fluorescence (A) et par l'anticorps 7E12 (B). Noter le marquage diffus par l'anticorps 7E12 (B) à proximité des vaisseaux présentant une forte angiopathie (détectés par la coloration à la thioflavine S) (A). Les dépôts amyloïdes semblent sortir de la paroi des vaisseaux.

dyshorique (Figure XXXIII). En présence de cette dernière, une localisation préférentielle des dépôts amyloïdes dans la couche IVC était observée (Figures XXI, XXXIII). Ces distributions laminaire et régionale sont similaires à celles décrites dans la littérature (Rogers and Morrison, 1985; Lewis et al., 1987; Arnold et al., 1991; Braak et Braak, 1991; Delaère et al., 1991; Price et al., 1991). Il n'existe donc pas un sous-type de dépôts amyloïdes marqués par l'anticorps 7E12 mais il reste possible qu'un sous type de plaques, par exemple celles de la couche IVC du cortex visuel primaire dans le cas d'angiopathie amyloïde, ait pour origine les vaisseaux (Figures XXI, XXXIII) tel que cela vient d'être récemment suggéré (Yamaguchi et al., 1992).

2.3 Les thrombospondines: *heparin binding proteins*

2.3.1 Généralités

De nombreux constituants de la membrane basale des vaisseaux sont retrouvés dans les dépôts amyloïdes tels que l'héparane sulfate protéoglycane (perlecan) (Snow et al., 1988b), le collagène IV, et la laminine (Perlmutter et al., 1991), et la fibronectine (Howard et Pilkington, 1990). Ces observations et la détection d'anomalies vasculaires par l'anticorps 7E12 nous a amené à étudier la localisation immunohistochimique d'une famille de protéines particulières, les thrombospondines. Elles possèdent une affinité pour toutes les constituants décrits ci-dessus et agissent également comme un régulateur de l'angiogénèse (Frazier, 1991; Good et al., 1990; Taraboletti et al., 1990). Dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. D. Roberts (NIH, Bethesda, USA), nous disposons d'une batterie d'anticorps contre la thrombospondine. Nous avons donc analysé ces constituants particuliers qui sont par de nombreux aspects similaires aux protéoglycannes.

Les thrombospondines sont des glycoprotéines multifonctionnelles de la famille des protéines d'adhésion et produites à la suite d'un épissage alternatif d'un ou deux gènes (Laherty et al., 1992; Bornstein et al., 1991; Lawler et Hynes, 1986). Elles interagissent avec les constituants de la membrane plasmique et de la matrice extracellulaire tels que les glycolipides, les protéoglycannes, la fibronectine, le collagène et le plasminogène (Frazier, 1991; Mosher, 1990). Les thrombospondines favorisent aussi l'adhésion et la migration cellulaire et modulent les réponses de nombreux types cellulaires aux facteurs de croissance (Frazier, 1991; Mosher, 1990). Du fait de ces propriétés, ce sont des régulateurs de l'angiogénèse (Good et al., 1990; Taraboletti et al., 1990). Un de leurs ligands membranaires est l'héparane sulfate protéoglycannique qui pourrait moduler leur activité biologique (Roberts et al., 1987; Taraboletti et al., 1987; Roberts, 1988; Murphy-Ullrich et Höök, 1989). Dans le système nerveux central, les thrombospondines sont synthétisées par les cellules gliales (Asch et al., 1986). Elles jouent un rôle fondamental dans la migration neuritique au cours de l'embryogénèse: elles sont impliquées dans la migration des cellules granulaires cérébelleuses (O'Shea et al., 1990) et celles de la crête neurale au cours du développement (O'Shea et Dixit, 1988). Elles sont également impliquées dans la croissance neuritique des cellules PC12 (O'Shea et al., 1991) et de la rétine (Neugebauer et al., 1991). Elles possèdent au moins deux types de récepteurs neuronaux (Neugebauer et al., 1991).

Nous avons analysé la distribution des thrombospondines en utilisant deux anticorps (monoclonal A6.1 et polyclonal contre la thrombospondine humaine). Ces anticorps ont été développés contre la thrombospondine-1, produit du premier gène décrit (Lawler et Hynes, 1986). Nous n'avons aucune évidence qu'ils reconnaissent la thrombospondine-2, produit du second gène (Bornstein et al., 1991). Pourtant, les deux protéines

contiennent de nombreuses séquences identiques et il est probable que l'immunsérum reconnaisse des régions communes. Etant donné que l'anticorps monoclonal A6.1 reconnaît les mêmes éléments, nous pensons qu'il se fixe également sur les deux thrombospondines. La présence des deux protéines dans le cerveau de souris à l'état foetal et adulte (Laherty et al., 1992) laisse présager qu'elles sont également trouvées dans le cerveau humain: elles pourraient donc être reconnues par les deux anticorps. Pourtant, afin d'éviter toute confusion, la description de nos résultats se fera en utilisant le terme: la thrombospondine.

2.3.2 Localisation immunohistochimique

Dans le cortex des témoins âgés, les anticorps dirigés contre la thrombospondine marquaient une sous-population de neurones pyramidaux (Figure XXXIV). Ces derniers sont trouvés dans la couche pyramidale des régions CA1-CA4 de la corne d'Ammon (Figure XXXIVA), dans les larges neurones polymorphiques du gyrus dentatus, les couches II (Figure XXXIVB) et III du cortex entorhinal, les couches III et V de cortex temporal et frontal. Le marquage apparaissait finement granulaire (Figure XXXIVC). Les cellules gliales, en particulier ceux de la substance blanche étaient également marquées. Finalement, quelques microvaisseaux ont pu être détectés (Figure XXXIVA).

Dans le cortex des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, le marquage neuronal était fortement diminué, en particulier dans les régions affectées par la dégénérescence neurofibrillaire. Par exemple, dans les régions CA1 et CA3, les neurones étaient marqués chez les témoins (Figures XXXIVA, XXXVA,B). Dans la maladie d'Alzheimer, le marquage a presque disparu au niveau du CA1 (Figure XXXVC) et a légèrement diminué dans le CA3 (Figure XXXVD). Une baisse comparable a été observée dans le subiculum et les couches II et V des cortex temporal et frontal. Le marquage

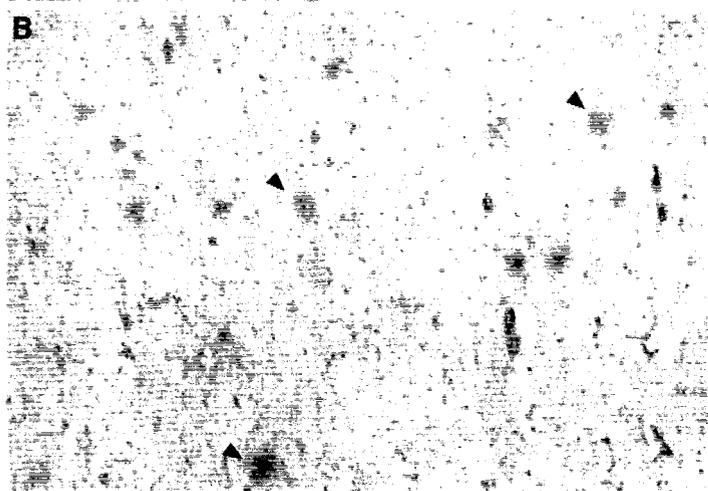
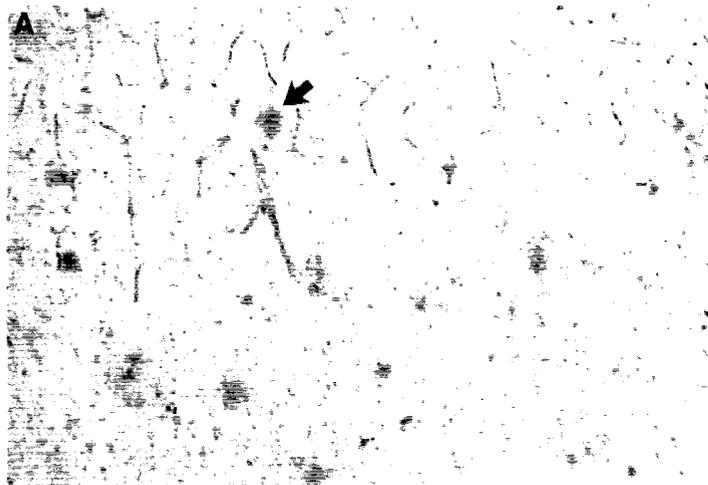


Figure XXXIV

A) Marquage de neurones pyramidaux et microvaisseaux par l'anticorps polyclonal dirigé contre la thrombospondine chez un sujet témoin âgé. B) Couche II du cortex entorhinal chez un sujet âgé marquée par l'anticorps monoclonal A6,1; noter le marquage neuronal. Echelle = 100 μm . C) Fort grossissement de neurones pyramidaux du CA3 mis en évidence par l'anticorps A6,1. Noter l'intensité du marquage granulaire. Echelle = 25 μm .

Figure XXXV

Immunohistochimie réalisée avec l'anticorps monoclonal A6,1: A) région CA1 chez un sujet âgé. B) région CA3 chez un sujet âgé. Noter l'intensité du marquage neuronal dans les cas pour les deux régions. Des microvaisseaux sont également détectés. C) région CA1 chez un patient atteint de la maladie d'Alzheimer; le marquage neuronal est fortement diminué où une détection des microvaisseaux est toujours possible. D) région CA3 chez un patient atteint de la maladie d'Alzheimer; le marquage neuronal est mieux préservé que dans la région CA1 et peu différent du sujet âgé. Té: sujet témoin âgé; MA: patient atteint de la maladie d'Alzheimer. Echelle = 100 μ m.



particulièrement intense chez les témoins des neurones de la couche II du cortex entorhinal avait complètement disparu chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Le marquage glial et vasculaire étaient identiques pour les deux populations. Les différents types de dépôts amyloïdes ont été également marqués par les anti-thrombospondine suggérant une localisation de la thrombospondine à la fois dans les neurites dystrophiques et les filaments amyloïdes (Figure XXXVI).

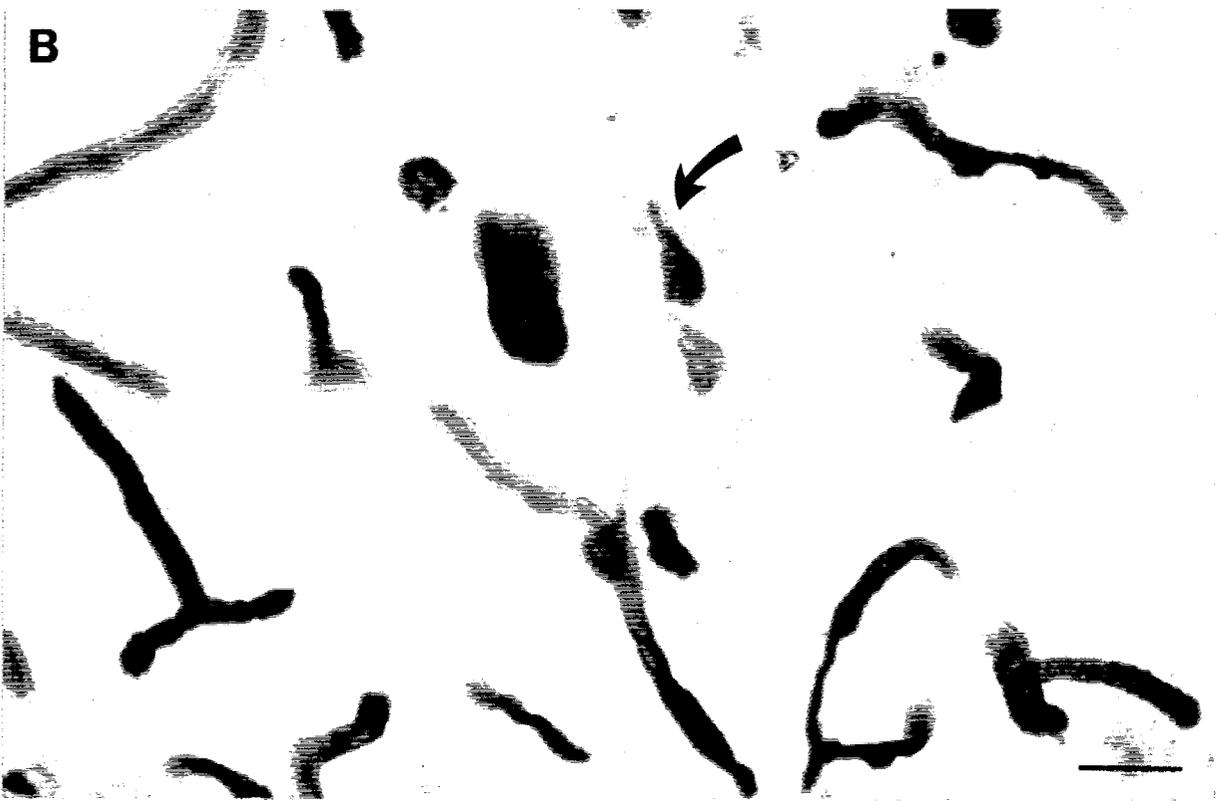
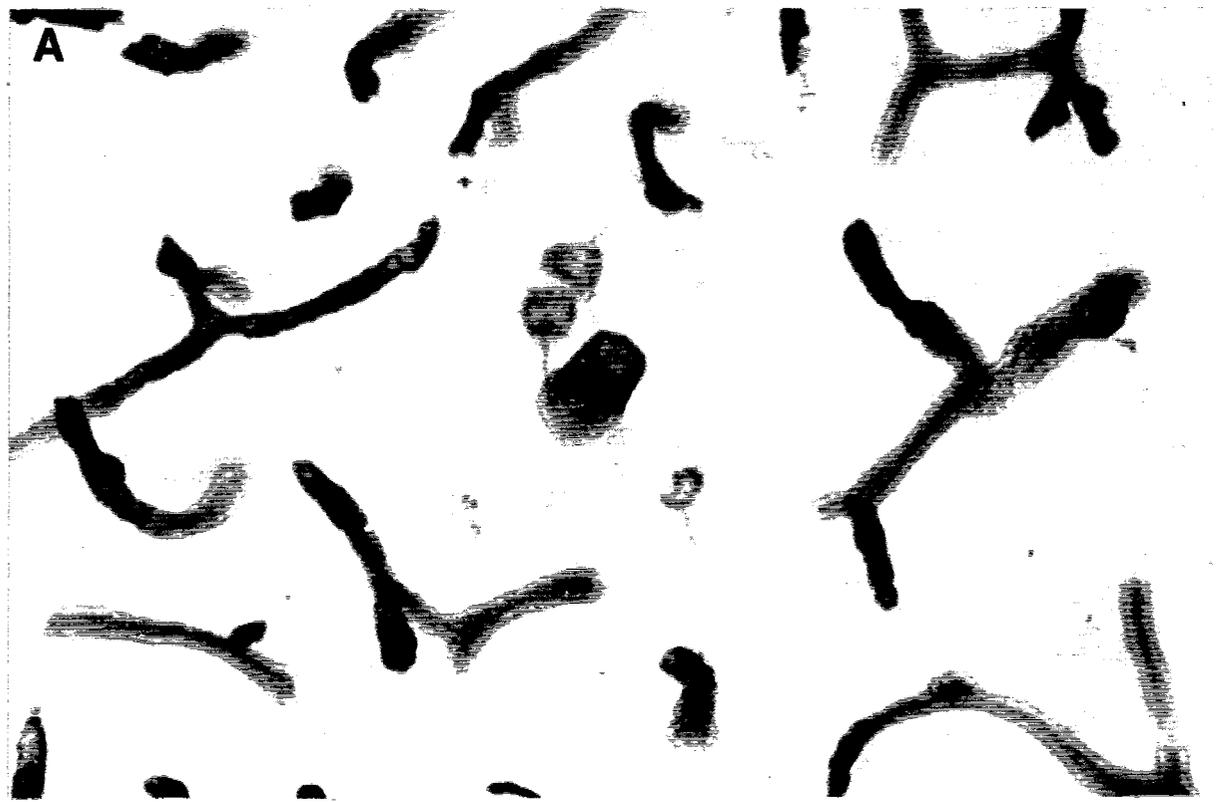
2.3.3 Conclusion

La vascularisation n'est pas fortement marquée avec les anti-thrombospondine dans la maladie d'Alzheimer. Il n'y a donc pas ou peu d'angiogénèse. Néanmoins, la présence de la thrombospondine dans les dépôts amyloïdes n'a jamais été rapportée. Elle montre que l'accumulation des constituants de la matrice extracellulaire dans les dépôts amyloïdes est certainement un phénomène important. Le marquage obtenu avec les anti-thrombospondine pose également le problème de la genèse des plaques. L'hypothèse vasculaire paraît s'affaiblir au profit d'une hypothèse neuronale.

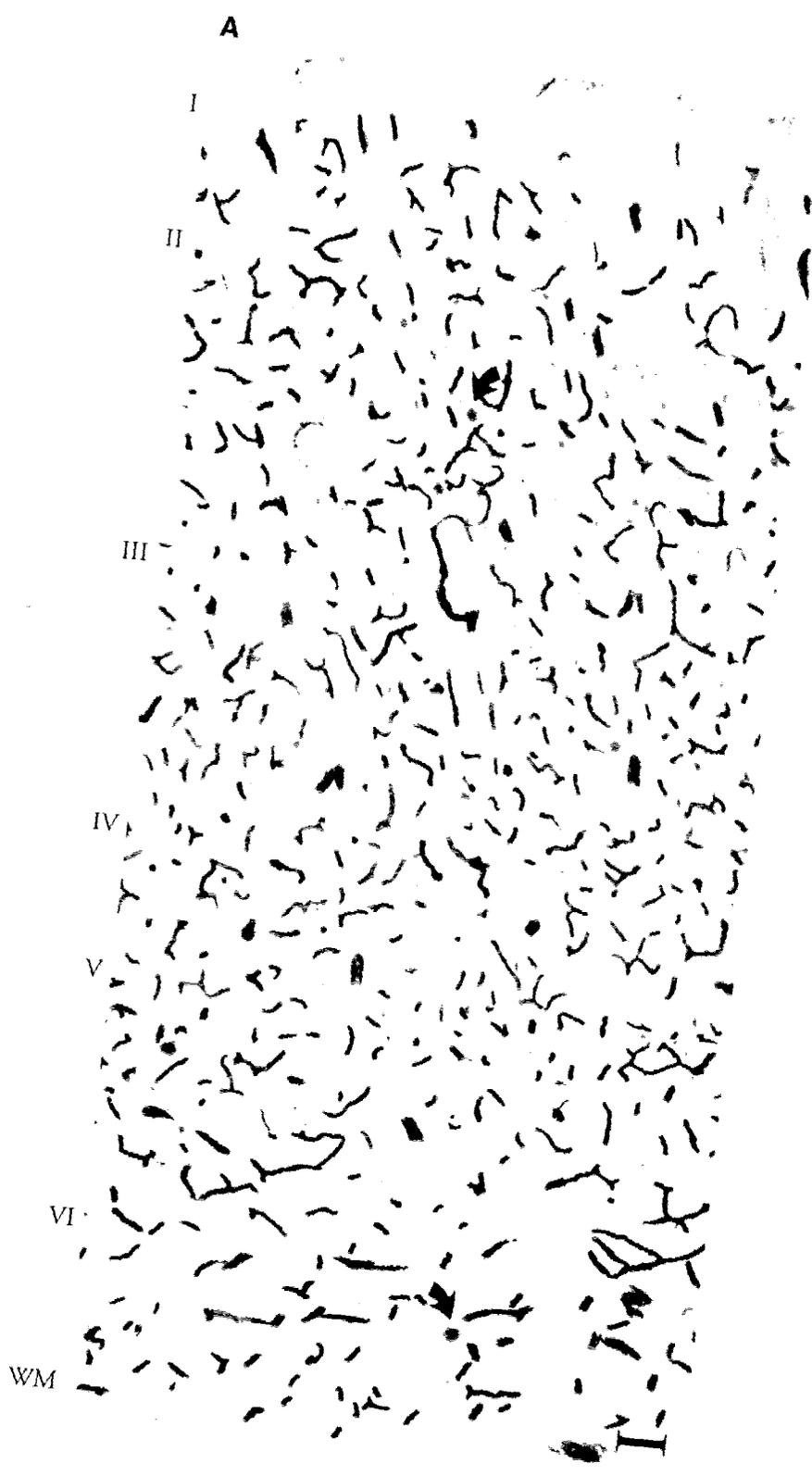
Le marquage d'une sous-population de neurones pyramidaux par les anticorps dirigés contre la thrombospondine pourrait être lié à la présence d'une protéine thrombospondine spécifique du neurone. Ceci indiquerait que les deux gènes de la thrombospondine sont exprimés différemment en fonction des types cellulaires. Une autre sous-population de neurones avait déjà été identifiée comme particulièrement vulnérable dans la maladie d'Alzheimer. Il s'agit de la population de neurones pyramidaux mise en évidence par l'anticorps monoclonal SMI-32 qui reconnaît un épitope non phosphorylé des sous-unités lourdes et moyennes des neurofilaments (Morrison et al., 1987; Hof et al., 1990; Hof et Morrison, 1990; Morrison et al., 1990). Pourtant, la phosphorylation anormale observée au cours de la

maladie d'Alzheimer est liée à une activation des kinases des neurofilaments (Lee et al., 1991; Biernat et al., 1992; Drewes et al., 1992). Il est donc possible que ces neurones n'ont pas disparu mais que l'épitope reconnu par l'anticorps SMI-32 est phosphorylé et qu'il n'est plus détecté par l'anticorps. La thrombospondine apparaît donc comme un meilleur marqueur pour une sous-population de neurones vulnérable dans la maladie d'Alzheimer.

Il faut noter que chez quelques patients (maladie d'Alzheimer, syndrome de Down et un cas de Guam avec syndrome parkinsonien), certains neurones ayant un aspect de lésion neurofibrillaire, ont été marqués par l'anticorps 7E12 (Figure XXXVII). Nous avons d'abord cru à une capture post-mortem par les neurones, décrite récemment par Mori et coll. (1991), de fragments protéolytiques de l'héparane sulfate protéoglycane vasculaire. Pourtant, cette conclusion se heurtait à un certain nombre de problèmes. Tout d'abord, les protéoglycannes sont résistants à la protéolyse. Puis, les neurones marqués par l'anticorps 7E12 ont dans le cerveau une distribution particulière qui est régionale et laminaire et identique à celle des lésions neurofibrillaires observées chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou du syndrome de Down (Braak et Braak, 1991). Dans le cas de Guam avec syndrome parkinsonien, les neurones reconnus par l'anticorps 7E12 avaient la même distribution régionale et laminaire (Figure XXXVIII) que celle des lésions neurofibrillaires décrite par Hof et coll. (1991). Il faut noter que ce cas de Guam était particulier puisqu'il était le seul à posséder des dépôts amyloïdes. Finalement, il est possible que ces neurones forment la sous-population de neurones qui perd son immunoréactivité pour la thrombospondine dans la maladie d'Alzheimer. Le marquage de la thrombospondine serait masqué par les protéoglycannes qui possèdent une







forte affinité pour cette glycoprotéine (Roberts et al., 1987; Taraboletti et al., 1987; Roberts, 1988; Murphy-Ullrich et Höök, 1989) ou bien encore une modification structurale des protéoglycannes ne leur permettrait plus d'agir comme un récepteur membranaire des protéoglycannes (Frazier, 1991). Ces résultats laissent suggérer un rôle des neurones dans la pathogénèse des dépôts amyloïdes.

2.4 Bilan des études immunohistochimiques

Nous avons donc observé un marquage des dépôts amyloïdes avec un anticorps monoclonal dirigé contre un héparane sulfate protéoglycanne vasculaire. Ces résultats suggèrent une origine vasculaire dans la formation des dépôts amyloïdes. Or, nos résultats concernant à la fois la vascularisation dans les démences et l'analyse morphologique et spatiale des dépôts amyloïdes ne sont pas en faveur d'un rôle causal direct d'une altération vasculaire. Nous n'avons réalisé aucune étude à l'échelle ultrastructurale en vue de localiser précisément cet héparane sulfate protéoglycanne. Récemment, Perlmutter et coll. (1991) ont observé le même type de marquage par l'anticorps 7E12 à l'échelle optique. De plus, ils ont réalisé une étude en microscopie électronique dans laquelle ils mettent en évidence, non seulement ce protéoglycanne mais aussi d'autres constituants de la membrane basale et la matrice extracellulaire tels que la fibronectine, le collagène IV et la laminine dans les dépôts amyloïdes. Ils proposent qu'un type cellulaire, associé à la vascularisation cérébrale (péricyte ou microglie), puisse intervenir dans l'amyloïdogénèse. Pourtant, il est alors difficile de comprendre un marquage des dépôts amyloïdes sans relation de contiguïté avec les microvaisseaux. Il est donc possible que ces protéoglycannes et autres constituants soient synthétisés non seulement par les péricytes ou les cellules endothéliales, mais également par d'autres types

cellulaires trouvés dans la matrice extracellulaire (glial ou neuronal). Si nous n'avons pas pu mettre en évidence un marquage d'astrocytes avec l'anticorps 7E12, les neurones étaient parfois marqués. Nous avons donc commencé à douter de la spécificité vasculaire de l'anticorps. Ce dernier pourrait reconnaître non seulement l'héparane sulfate protéoglycane vasculaire mais aussi un protéoglycane apparenté d'origine neuronale. Cette hypothèse est supportée par les résultats obtenus avec la thrombospondine. Ce constituant de la matrice extracellulaire permet l'identification d'un sous-groupe de neurones pyramidaux particulièrement sensibles dans la maladie d'Alzheimer. Etant donné la forte affinité entre les deux constituants, une modification dans le métabolisme des protéoglycannes dans la maladie d'Alzheimer pourrait expliquer les différences observées pour le marquage neuronal entre les populations témoin et malade. Néanmoins, avant de nous lancer dans la recherche de protéoglycannes neuronaux impliqués dans l'amyloïdose et qui montreraient une réaction croisée avec l'anticorps 7E12, nous avons terminé l'étude de l'interaction des protéoglycannes vasculaires avec les constituants des dépôts amyloïdes, en particulier l'APP. Les héparane sulfate protéoglycannes peuvent être sécrétés (Yanagishita et Hascall, 1992). Il est possible qu'ils interagissent avec un élément des dépôts amyloïdes, en particulier le peptide A4; en effet, une forte affinité a été démontrée entre un autre héparane sulfate protéoglycane (perlecan) et les trois principales isoformes de l'APP (Narindrasorasak et al., 1991). Nous avons voulu vérifier parallèlement à ce travail immunohistochimique, s'il existait une interaction entre l'héparane sulfate protéoglycane vasculaire et l'APP: les résultats obtenus lors de cette étude sont présentés dans les prochains paragraphes.

3 Etude de l'affinité de l'héparane sulfate protéoglycane vasculaire pour le précurseur de la protéine amyloïde

3.1 Choix de la méthode de mise en évidence de l'affinité.

Les travaux de Snow et Kisilevsky laissaient suggérer une forte affinité entre la partie glycanique des protéoglycannes et l'APP (Snow et Wight, 1989; Kisilevsky, 1990). Nous avons donc décidé d'étudier l'affinité des glycosaminoglycannes, en particulier l'héparane sulfate, pour les vingt huit premiers acides aminés du peptide A4 par la technique d'ELISA mais nous nous sommes heurtés à un certain nombre de difficultés. Tout d'abord, l'adsorption directe des glycosaminoglycannes aux plaques ELISA n'est pas réalisable. Nous avons donc utilisé une étape qui consiste à adsorber au préalable de la poly-L-lysine; les glycosaminoglycannes s'y lient parfaitement mais une saturation avec d'autres polyanions tels que l'ADN et le sulfate de dextran, n'a pas permis d'éliminer la liaison non spécifique du peptide A4 aux plaques ELISA. Nous avons donc recherché un autre moyen d'adsorber les glycosaminoglycannes aux plaques ELISA. Pour cela, nous avons biotinylé, selon un protocole modifié de Hofman et coll. (1977), de l'héparane sulfate traité préalablement par la benzoquinone (Brandt et al., 1975). Les plaques ELISA traitées par de l'avidine ont pu fixer l'héparane biotinylé. Néanmoins, de la même manière qu'avec la poly-lysine, le peptide A4 s'est lié de façon non spécifique. Nous avons finalement décidé d'utiliser la chromatographie d'affinité pour étudier l'affinité de l'APP à l'héparane sulfate.

3.2 Etude de l'affinité de l'APP sécrété pour l'héparane sulfate

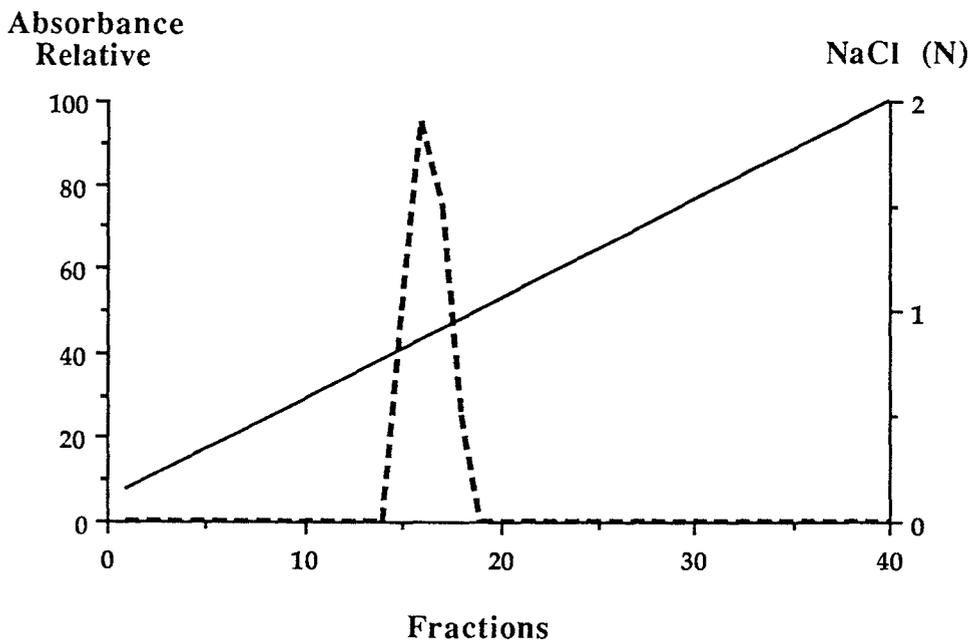
L'héparane sulfate a été couplé à un gel activé de Sépharose CL-4B, par la technique au carbodiimide (voir matériels et méthodes). La forme sécrétée de l'APP a été purifiée à partir de milieu de culture de cellules de

phéochromocytome de rat (PC12) différenciées au NGF (voir matériels et méthodes). L'APP ainsi purifié est composé majoritairement de formes présentant l'insertion KPI (Refolo et al., 1989).

3.2.1 Elution par le chlorure de sodium (NaCl)

Sept μg de la forme sécrétée de l'APP ont été déposés sur la colonne d'affinité à l'héparane sulfate. Après lavage par 10 volumes de colonne avec un tampon PBS, un gradient linéaire de NaCl (de 0,15 N à 2 N) a été réalisé. Des fractions de 200 μl ont été collectées et précipitées par 10% (w/w) d'acide trichloroacétique. Les fractions, après traitement par la solution de Laemmli (1970), sont analysées sur électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu SDS. Après transfert sur membrane d'Immobilon-P, un anticorps dirigé contre l'insertion supplémentaire des APP₇₅₁ et APP₇₇₀ est utilisé pour détecter l'APP sécrété. Ce dernier est élué de la colonne par du NaCl 0,75 N.

L'APP sécrété est élué par le NaCl de la colonne héparane sulfate



Il existe donc une affinité entre l'héparane sulfate et la partie sécrétée de l'APP.

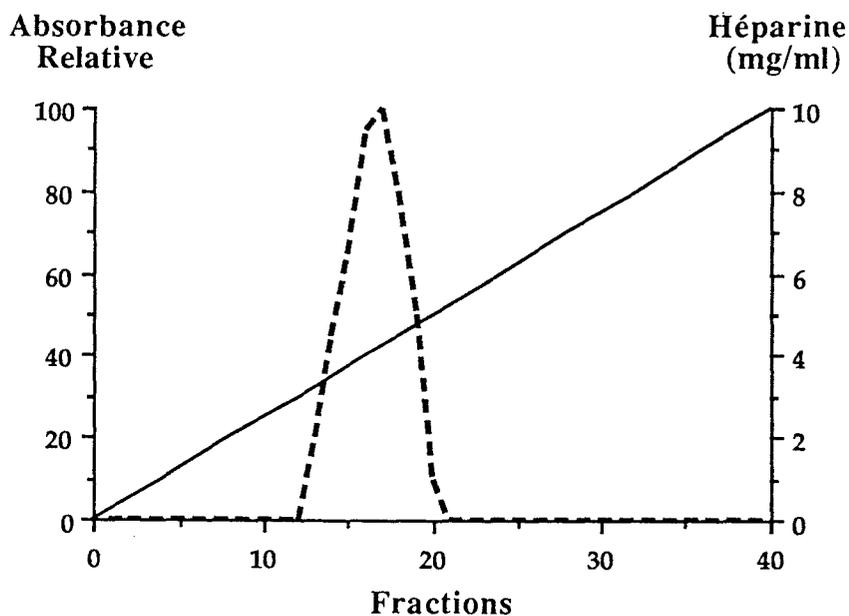
3.2.2 Elution par le sulfate de sodium

De la même manière, un gradient linéaire de 0 à 2 N de sulfate de sodium (Na_2SO_4) a été réalisé pour analyser le rôle de l'ion sulfate dans la liaison héparane sulfate-APP sécrété. Ce dernier était élué à la même normalité (0,75 N Na_2SO_4) que lors de l'éluion avec le chlorure de sodium. Par conséquent, il semble que la force ionique soit plutôt responsable de l'éluion et que le groupement sulfate ne soit pas le seul élément à intervenir dans cette liaison.

3.2.3 Elution par l'héparine

Afin d'établir si cette affinité était spécifique, nous avons alors réalisé une éluion par un gradient d'héparine (de 0 à 10 mg/ml): glycosaminoglycane le plus proche de l'héparane sulfate. L'APP sécrété était élué avec une concentration en héparine de 4,2 mg/ml. La liaison entre l'APP et l'héparane sulfate semble donc spécifique.

**L'APP sécrété est élué par l'héparine
de la colonne héparane sulfate**



3.2.4 Elution par le sulfate de dextran

Pour étudier de façon plus précise cette spécificité, nous avons utilisé un polysaccharide analogue à l'héparine: le sulfate de dextran dont la structure est la suivante: $(\alpha\text{-D-Glc}(1\text{-}\rightarrow 6))_n$ et qui peut contenir jusqu'à trois groupements sulfate par molécule de glucose. Cette molécule a donc une conformation très proche de celle de l'héparane sulfate. Un gradient linéaire de 0 à 10 mg/ml a été effectué et 7 mg/ml ont été nécessaires à l'élution de l'APP sécrété. Nous avons donc eu besoin d'un peu moins du double de la concentration en héparine pour éluer l'APP. Il existe donc une spécificité mais qui reste faible.

3.2.5 Elution par le chondroïtine sulfate

Finalement, nous avons utilisé un gradient de 0 à 10 mg/ml de chondroïtine sulfate (CS) pour éluer l'APP sécrété. L'élution a nécessité 5,2 mg/ml. La spécificité semble donc relativement faible, puisqu'il a seulement fallu 25% de plus pour éluer le matériel que dans le cas de l'héparine.

Solution d'élution	NaCl	Na ₂ SO ₄	Héparine	Sulfate de dextran	CS
Maximum d'élution	0,75 N	0,75 N	4,2 mg/ml	7 mg/ml	5,2 mg/ml

La spécificité de la liaison APP sécrété-héparane sulfate apparaît donc relativement faible. Il existe une liaison, mais elle peut être facilement rompue par des analogues de l'héparane sulfate. Il faut néanmoins considérer que la liaison de l'héparane sulfate au gel a pu modifier sa conformation. De plus, les glycosaminoglycannes libres sont rares; ils sont souvent sous la forme de protéoglycannes. Il nous a alors semblé que

l'étude de l'affinité de l'APP sécrété pour l'héparane sulfate protéoglycane complet serait plus judicieuse.

3.3 Etude de l'affinité de l'héparane sulfate protéoglycane vasculaire pour deux isoformes de l'APP

Nous avons eu l'opportunité de travailler en collaboration avec le Pr. Robert Kisilevsky (Kingston, ON, Canada). Cet auteur a testé avec son système ELISA (Narindrasorasak et al., 1991), l'affinité de l'APP pour l'héparane sulfate protéoglycane vasculaire purifié du rein de bœuf. Ce système consiste à analyser les résultats des expériences d'affinité, en supposant qu'il existe un équilibre thermodynamique entre la formation du complexe B "protéine en solution-protéine adsorbée" et les protéines non complexées en solution (S) ou adsorbées (R):

$$K_d = \frac{[R] \times [S]}{[B]} \quad (1)$$

La quantité mesurée expérimentalement B_{exp} a été analysée comme une fonction de la concentration [S] selon l'équation suivante:

$$B_{exp} = B_0 + s \times [S] + \frac{B_{max} \times [S]}{[S] + K_d} \quad (2)$$

où B_0 représente le faible bruit de fond en absence de protéine en solution, B_{max} le nombre maximum de complexes formés et s la constante de proportionnalité pour le bruit de fond. Ainsi, les résultats expérimentaux B_{exp} obtenus en faisant varier les concentrations [S] ont été analysés en utilisant un programme non linéaire des moindres carrés, afin de déterminer les meilleures valeurs pour les paramètres de l'équation (2) (Narindrasorasak et al., 1991).

L'APP sécrété est un mélange de différentes isoformes qui ont pu être séparées. La forme avec l'insertion KPI et OX-2 (APP₇₇₀) et la forme sans insertion (APP₆₉₅) ont été étudiées pour leur affinité à l'héparane sulfate protéoglycane vasculaire. Il existe une forte affinité: avec respectivement des constantes de dissociation de 1,6 et 0,2 nM quand le protéoglycane est immobilisé sur la plaque ELISA et de 1,0 et 1,3 nM quand les isoformes de l'APP sont adsorbés sur la plaque ELISA. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Narindrasorasak et coll. (1991) pour l'héparane sulfate protéoglycane de membrane basale (perlecan).

3.4 Etude de l'affinité de l'héparane sulfate protéoglycane vasculaire pour différentes séquences de l'APP riche en acides aminés basiques dont l'A4

L'héparane sulfate protéoglycane vasculaire possède une forte affinité pour au moins deux isoformes de l'APP. Quels peuvent être les sites de l'APP impliqués dans cette affinité? Quelle partie du protéoglycane se lie à l'APP? La présence de l'héparane sulfate protéoglycane vasculaire dans les dépôts amyloïdes laisse suggérer une affinité pour le peptide A4 (1-28). Nous avons donc testé le peptide A4 mais également deux autres régions de l'APP: l'une R4, (séquence 365-386 de l'APP₇₅₁), homologue du site d'affinité de la molécule N-CAM pour l'héparine (Cole et Akeson, 1989) et l'autre R5, (séquence 476-441 de l'APP₇₅₁), contenant une région riche en acides aminés basiques.

3.4.1 Affinité de l'HSPG vasculaire

pour les 28 premiers acides aminés du peptide A4

Cent µg d'héparane sulfate protéoglycane vasculaire ont été déposés sur un gel (1 ml) de chromatographie d'affinité Sépharose CL-4B couplé avec les 28 premiers acides aminés du peptide A4. Le gel équilibré dans un tampon PBS a été lavé par dix volumes de colonne. Ensuite, un gradient linéaire de chlorure de sodium de 0,15 à 2 N a été utilisé pour élué le matériel. Des fractions de 250 µl ont été collectées et 125 µl ont été déposés en dot-blot sur Immobilon-P. La membrane a ensuite été incubée avec l'anticorps monoclonal 7E12 (Kemeny et al., 1987). Le protéoglycane était élué à une concentration de NaCl comprise entre 0,75 et 1,55 N avec un maximum à 0,9 N. Il existe donc une affinité entre le peptide A4 et le protéoglycane vasculaire.

pour les séquences R4 et R5 de l'APP

L'affinité entre le peptide A4 et le protéoglycane vasculaire est-elle spécifique? Deux autres régions de l'APP ont été analysées pour tester leur affinité au protéoglycane vasculaire. Le protocole décrit précédemment a été utilisé. Le protéoglycane vasculaire ne s'est pas fixé sur la colonne de chromatographie d'affinité couplée à R5 et il a été élué pour une concentration de 0,3 N NaCl de la colonne de chromatographie d'affinité de R4. Le protéoglycane vasculaire ne présente donc pas ou peu d'affinité pour ces deux autres régions de l'APP. Il faut noter que la séquence R4 a été récemment identifié par Masters et Beyreuther (1992) comme le site d'affinité de l'héparine à l'APP. Nos résultats démontrent donc que l'affinité du protéoglycane vasculaire pour le peptide A4 est forte et spécifique.

3.4.2 Affinité de l'HS pour le peptide A4

Nous avons alors analysé la partie du protéoglycane impliquée dans la liaison au peptide A4. Etant donné nos résultats préliminaires avec la colonne de chromatographie d'affinité d'héparane sulfate et la présence d'un site putatif d'affinité à l'héparine selon Cardin et Weintraub (1989) au niveau du peptide A4 (YE[VHHQKL]VF), nous avons tout d'abord analysé l'affinité du glycosaminoglycane héparane sulfate pour le peptide A4. Deux cents µg d'héparane sulfate ont été déposés. Après rinçage de la colonne, un gradient linéaire de NaCl a été réalisé de 0,15 à 2 N. Des fractions de 250 µl ont été collectées et la moitié a été déposée en dot blot sur une membrane de Zetabind. Cette dernière a alors été colorée par une solution de bleu Alcian, spécifique des glycosaminoglycannes (voir section 5.1). L'héparane sulfate a été élué pour une concentration allant de 0,7 à 1,2 N NaCl, avec un maximum à 0,85 N NaCl. Il y a donc une forte affinité entre l'héparane sulfate et le peptide A4.

3.4.3 Affinité de l'HSPG vasculaire déglycosylé pour le peptide A4

Nous avons voulu vérifier que l'affinité du peptide A4 pour l'héparane sulfate protéoglycane se faisait uniquement par le biais de la partie glycosaminoglycannique. Nous avons donc déglycosylé chimiquement le protéoglycane par l'acide trifluorométhanesulfonique (Edge et al., 1981). En effet, l'utilisation d'enzymes de type héparitinase mène souvent à des réactions incomplètes.

Trois cents µg du matériel déglycosylé ont été déposés sur la colonne couplée au peptide A4. Après lavage, le même protocole que pour l'héparane sulfate a été appliqué. La totalité du volume des fractions collectées a été précipitée sur glace avec trois volumes du mélange éthanol 95%/acétate de potassium 1,3% (P/V). Le culot a été repris dans la solution

de Laemmli et déposé sur électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS. Après transfert sur Immobilon-P, l'axe protéique a été mis en évidence en utilisant l'anticorps monoclonal 7E12 (Figure XXXIX). Il était élué pour une concentration en chlorure de sodium allant de 0,8 N à 1,25 N avec un maximum à 1,1 N NaCl.

Figure XXXIX

Matériel élué	HSPG	HS	axe protéique
Concentration	0,9 N NaCl	0,85 N NaCl	1,1 N NaCl

3.5 Conclusion

Il existe donc une forte affinité, avec des constantes de dissociation de l'ordre du nanomolaire, entre l'héparane sulfate protéoglycane vasculaire et l'APP. Nous avons analysé trois régions de l'APP susceptibles de se lier à l'héparine: le peptide R4 (DENEHAH [FQKAKE] RLEAKHRER), le peptide R5 (KKYVRAEQK [DRQHTLKHf] EHVR) et finalement une partie du peptide A4 (région 1-28: DAEFRHDSGYE [VHHQKL] VFFAEDVGSNK) qui contiennent tous une séquence putative d'affinité à l'héparine (Cardin et Weintraub, 1989) (riche en acides aminés basiques: **B**) de type [XBBXBx] ou [XBBBXXBBX]. Seul le peptide A4 présentait une forte affinité pour le protéoglycane. Il faut noter qu'à la fois la partie glycosaminoglycannique et la partie protéique se fixent au peptide A4. Il est donc probable qu'il y ait un système coopératif de liaison au peptide A4. La séquence d'affinité à l'héparine [VHHQKL] pourrait être responsable de l'affinité de l'héparane sulfate pour le peptide A4 et l'affinité de l'axe protéique pourrait s'expliquer par une déglycosylation incomplète de l'héparane sulfate protéoglycane. Néanmoins, le profil chromatographique sans traîne laisse suggérer que le matériel élué est relativement homogène. Il semble donc tout à fait raisonnable de penser

qu'il existe une réelle affinité entre le peptide A4 et l'axe protéique du protéoglycane. La région impliquée dans le peptide A4 pourrait être une séquence homologue au térapeptide RGDS des protéines d'adhésion cellulaire, tel que le térapeptide RHDS. L'axe protéique du protéoglycane pourrait contenir une séquence ou un domaine homologue aux récepteurs de type intégrine, comme c'est le cas pour le protéoglycane syndecan (Reichardt et Tomaselli, 1991). Cette hypothèse pourrait expliquer l'affinité entre les deux molécules.

Quelle est la signification de l'affinité de l'héparane sulfate protéoglycane pour le peptide A4 dans la maladie d'Alzheimer?

Tout d'abord, de nombreux auteurs ont mis en évidence la présence de l'APP dans les dépôts amyloïdes et pré-amyloïdes (Cole et al., 1991; Joachim et al., 1991) et en particulier ceux liés à l'angiopathie amyloïde (Tagliavini et al., 1991). Si la liaison protéoglycane-APP s'effectue par le biais du peptide A4, cela pourrait expliquer pourquoi seul le peptide A4, et non pas une autre région de l'APP s'accumule dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Le peptide A4 serait protégé de la protéolyse comme cela existe pour les facteurs de croissance (Ruoslahti et Yamaguchi, 1991). Finalement, l'affinité de l'héparane sulfate protéoglycane pour le peptide A4 pourrait être fondamental dans les cas d'hémorragies cérébrales avec angiopathie. Par exemple, dans le type hollandais, la mutation observée au niveau du peptide A4 (Levy et al., 1990) pourrait augmenter l'interaction entre le protéoglycane vasculaire et le peptide A4 et conduire à l'accumulation du peptide à l'intérieur des parois des vaisseaux.

4 Analyse biochimique des protéoglycannes vasculaires

Si l'affinité des protéoglycannes pour le peptide A4 augmentait dans la maladie d'Alzheimer, cela pourrait expliquer la co-déposition de ces deux molécules. Nous avons alors recherché s'il existait une modification des protéoglycannes dans la maladie d'Alzheimer comme cela avait été déjà suggéré (Suzuki et al., 1965). Pour cela, nous avons purifié les protéoglycannes vasculaires à partir du cerveau.

Lors de la purification des protéoglycannes d'origine vasculaire, nous nous sommes heurtés au cours des différentes étapes techniques à des difficultés de détection et de quantification de ces molécules. En effet, les méthodes utilisées requièrent de l'urée et des sels à forte concentration et ces constituants interfèrent avec les dosages colorimétriques habituellement utilisés en biochimie. De plus, les protéoglycannes se retrouvent souvent au cours de l'extraction avec des protéines à caractère anionique et des acides nucléiques. Enfin, notre but est de travailler sur du tissu humain afin d'isoler les protéoglycannes des patients atteints de la maladie d'Alzheimer mais ce matériel n'est disponible qu'en faible quantité. Il nous fallait donc mettre au point une technique de détection et de dosage compatible avec l'ensemble de ces problèmes.

4.1 Mise au point d'une micro-méthode (Bleu Alcian par dot-blot)

La plupart des techniques de détection et de dosage des protéoglycannes utilise un caractère particulier des glycosaminoglycannes: la présence de sucres spécifiques et de groupements sulfates. Elles se basent donc sur la détection de l'acide uronique (Bitter et Muir, 1962), du galactosamine ou du glucosamine (Benson, 1975). L'autre moyen est d'exploiter le caractère anionique de ces molécules, lié à la présence des groupements sulfates et carboxyles. Les colorants cationiques tels que le bleu

de toluidine (Hsu et al., 1972), le bleu 1,9-diméthylméthylène (Farndale et al., 1986) et le bleu Alcian (Scott, 1985) ont été plus récemment employés dans la quantification des glycosaminoglycannes/protéoglycannes avec une sensibilité de l'ordre de 2 µg/ml (Curwen et Smith, 1977; Bartold et Page, 1985; Sabiston et al., 1985; Hronowski et Anastassiades, 1988).

Nous avons alors décidé de détecter les glycosaminoglycannes/protéoglycannes immobilisés par dot-blot (voir matériels et méthodes) sur des membranes de nylon chargées positivement, habituellement utilisées pour les acides nucléiques, (Heimer et Sampson, 1987) grâce à une solution optimisée de bleu Alcian.

Nos essais préliminaires nous ont fait choisir Zetabind (CUNO Division, Meriden, CT, USA) comme membrane, pour optimiser la solution de bleu Alcian. Les composés étudiés sont deux glycosaminoglycannes (le chondroïtine sulfate C (de cartilage de requin) et l'héparane sulfate du rein de bœuf, obtenus de chez Sigma, St Louis, MO, USA) qui ont été choisis du fait de leurs différences structurales. L'héparane sulfate contient des N- et O-sulfate (Kjellen et Lindahl, 1991) et est moins sulfaté que le chondroïtine sulfate C (Longas et Breitweiser, 1991) qui ne présente que des O-sulfate. La spécificité de la coloration a été vérifiée en étudiant d'autres molécules: la sérum albumine bovine, l'ADN et l'acide hyaluronique (du cordon ombilical humain) de chez Sigma.

4.1.1 Optimisation de la solution de coloration au bleu Alcian

Le premier facteur à déterminer était le pourcentage (P/V) de bleu Alcian à utiliser. Les solutions de base utilisées étaient la solution A: 50 mM acétate de sodium pH 5,7; 50 mM de chlorure de magnésium; 50 mM chlorure de sodium et la solution B: acide acétique pH 2,7; 50 mM de chlorure de magnésium; 50 mM chlorure de sodium.

Le pourcentage de bleu Alcian a été augmenté de 0,01% à 1% pour les deux solutions (pH 5,7 et pH 2,7). A pH 2,7, la coloration du chondroïtine sulfate C était maximale pour une concentration de bleu Alcian à 0,1%. L'héparane sulfate était beaucoup plus faiblement coloré. A des pourcentages plus élevés, le marquage diminuait dans les deux cas. Dans ces conditions et pour des dilutions comparables (entre 600 ng/ml et 1,6 µg/ml), les glycosaminoglycannes/protéoglycannes ne présentaient aucune interférence avec d'autres polyanions (ADN, sérum albumine bovine ou hyaluronique acide). A pH 5,7, la coloration pour les deux glycosaminoglycannes augmentait avec le pourcentage de bleu Alcian, bien que plus faible pour l'héparane sulfate. Pourtant, pour une concentration supérieure à 0,2% de bleu Alcian, des interférences étaient observées avec les autres molécules (ADN, sérum albumine bovine ou hyaluronique acide), ainsi qu'un important bruit de fond.

Par conséquent, nous avons choisi d'utiliser un pourcentage de bleu Alcian de 0,2% (P/V) qui s'est avéré être le meilleur compromis pour une bonne spécificité et sensibilité .

4.1.2 Effet de la concentration en chlorure de magnésium, du pH et de la force ionique

La liaison d'un polyanion de type glycosaminoglycane à un colorant cationique de type bleu Alcian dépend principalement du nombre de groupements anioniques (carboxyles, phosphates ou sulfates) du polyanion. Cette liaison est influencée par les cations présents dans la solution car ils entrent en compétition avec le colorant au niveau des sites négatifs. Le colorant et chaque cation de la solution possèdent une affinité différente pour chacun de ces sites; par exemple, en présence de chlorure de magnésium, le groupement O-sulfate est le dernier à abandonner le bleu Alcian. La concentration pour laquelle un cation donné est ainsi capable de

déplacer le colorant est appelée concentration critique en électrolyte (Scott, 1973). Par conséquent, il est possible de produire une solution de coloration spécifique des groupements sulfates, en choisissant de façon convenable une concentration en chlorure de magnésium. Cette affinité entre colorant et groupement anionique est également liée au pH de la solution. A un pH acide, le nombre de sites négatifs est en effet diminué.

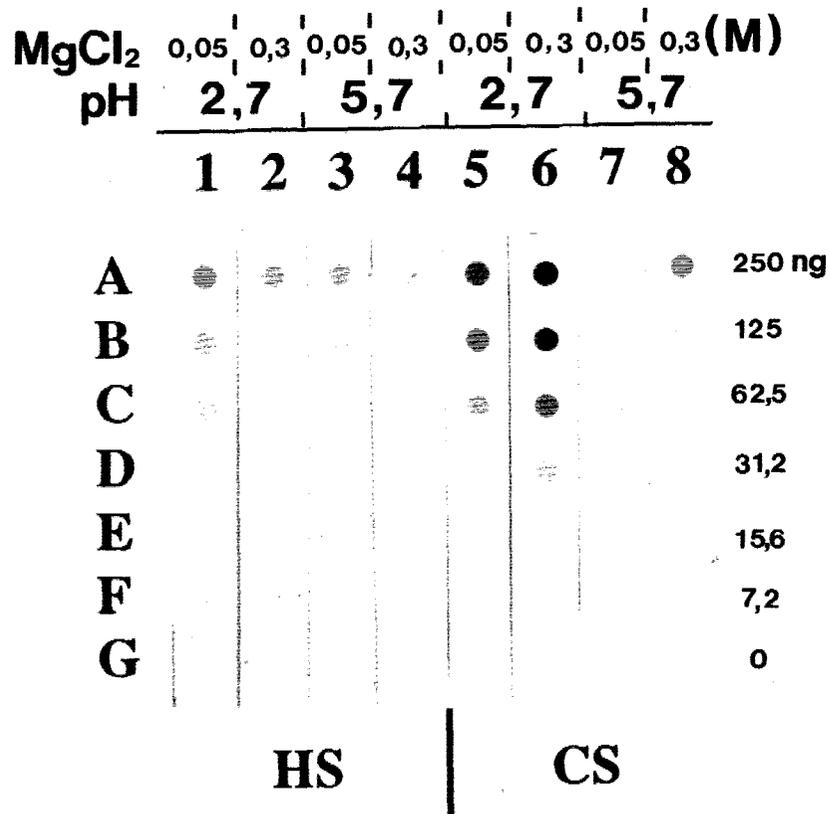
Nous avons donc étudié ces deux facteurs (pH et concentration critique en électrolyte) sur la coloration au bleu Alcian des glycosaminoglycannes/protéoglycannes. Le chondroïtine sulfate C et l'héparane sulfate ont été déposés à différentes concentrations sur dot-blot. Les membranes ont ensuite été placées dans les solutions de bleu Alcian, à des concentrations en $MgCl_2$ et des pH différents (Figure XL).

A pH 2,7, la plupart des groupes carboxyles, phosphates et sulfates perdent leur charge. En présence de 0,3 M $MgCl_2$, la coloration du chondroïtine sulfate C était augmentée alors que l'héparane sulfate n'était que faiblement coloré. A 0,6 M $MgCl_2$, seul le chondroïtine sulfate C restait observable. En utilisant une concentration en $MgCl_2$ plus faible (0,05 M), le marquage était encore amélioré mais il ne suffisait pas à colorer franchement l'héparane sulfate.

A pH 5,7, le marquage du chondroïtine sulfate C était plus faible mais de la même intensité que celui de l'héparane sulfate. Le meilleur marquage était obtenu pour 0,05 M $MgCl_2$. Un léger bruit de fond était néanmoins présent.

Afin d'améliorer la qualité de la coloration, nous avons augmenté la force ionique de la solution en élevant la concentration en chlorure de sodium. Le meilleur marquage a été obtenu avec 50 mM NaCl, cela a permis d'éliminer le léger bruit de fond observé avec la solution de bleu Alcian à 0,2%; 0,05 M $MgCl_2$; acétate de sodium pH 5,7.

Figure XL



Les échantillons d'héparane sulfate (HS) et le chondroïtine sulfate (CS) dilués dans un tampon PBS sont déposés en dot-blot de A vers G (respectivement 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6; 7,8 et 0 ng) sur membrane de Zetabind.

Quatre solutions de coloration sont étudiées; colonnes 1 et 5: 0,2% bleu Alcian, 0,05 M MgCl₂ dans l'acide acétique pH 2,7; colonnes 2 et 6: 0,2% bleu Alcian, 0,3 M MgCl₂ dans l'acide acétique pH 2,7; colonnes 3 et 7: 0,2% bleu Alcian, 0,05 M MgCl₂ dans l'acétate de sodium pH 5,7; colonnes 4 et 8: 0,2% bleu Alcian, 0,3 M MgCl₂ dans l'acétate de sodium pH 5,7. La coloration du CS est excellente à pH bas pour des concentrations en MgCl₂ élevées (0,3 M). La meilleure coloration pour l'ensemble des glycosaminoglycannes (ici CS et HS) est obtenue à pH 5,7 pour des concentrations en MgCl₂ faibles (0,05 M)

Nous avons donc obtenu une solution I de bleu Alcian (0,2% (P/V) bleu Alcian, acétate de sodium 50 mM pH 5,7, NaCl 50 mM et MgCl₂ 50 mM) qui colore spécifiquement la plupart des glycosaminoglycannes: chondroïtine sulfate A, chondroïtine sulfate C, dermatane sulfate, héparine et héparane sulfate, et l'héparane sulfate protéoglycane vasculaire purifié des glomérules du rein. A un pH plus acide (2,7) et une concentration en chlorure de magnésium plus élevée (>0,3 M), la solution II de bleu Alcian peut spécifiquement colorer les glycosaminoglycannes les plus O-sulfatés (chondroïtine sulfate C).

4.1.3 Affinité des GAG/PG pour différentes membranes

Les glycosaminoglycannes/protéoglycannes ne se fixent pas de la même manière sur toutes les membranes. Nous avons donc testé sept membranes qui présentent différentes propriétés: Immobilon-P et Immobilon-N (Millipore, Bedford, MA, USA), Nitrocellulose BA85 et Nytran 66 (Schleicher et Schuell, Keene, NH, USA), Zetabind (CUNO), Zeta-Probe et DEAE-cellulose (Bio-Rad, Richmond, CA, USA).

L'Immobilon-P et -N sont des membranes de difluorure de polyvinylidène ayant une porosité de 0,45 µm; elles sont respectivement utilisées pour le transfert des protéines et des acides nucléiques. Le Nytran 66 est une membrane de nylon 66 avec une porosité de 0,22 µm. Le Zetabind et le Zeta-Probe sont également des membranes de nylon 66 mais elles sont chargées positivement et possèdent une porosité de 0,45 µm.

Cinquante µl de six molécules à différentes dilutions (1,25 µg, 500 ng, 250 ng et 50 ng) ont été déposés en dot blot sur les sept membranes. Ces dernières ont ensuite été placées dans la solution I de bleu Alcian.

Seules les membranes Immobilon-N, Zetabind et Zeta-Probe fixèrent de manière efficace à la fois les glycosaminoglycannes et les protéoglycannes (Figure XLI). Immobilon-P et Nitrocellulose sont deux membranes qui ont été développées pour la fixation des protéines alors que les cinq autres permettent des interactions ioniques; elles sont plutôt utilisées en biologie moléculaire, pour la fixation des acides nucléiques. La coloration au bleu Alcian n'a pu être visualisée sur la membrane DEAE-cellulose. En effet, le colorant s'est fixé de façon irréversible sur la membrane et de plus, elle s'est très rapidement dégradée. Malgré une porosité de 0,22 μm , la feuille de Nytran 66 chargée positivement n'a permis que la détection de l'héparane sulfate protéoglycannique, mais de façon spécifique. Les glycosaminoglycannes se fixent peu ou pas sur ce type de membrane. Ceci avait déjà été constaté par Heimer et Sampson (1987) qui ne détectaient pas les glycosaminoglycannes immobilisés sur Nytran 66 à une concentration inférieure à 100 ng, par une technique de radio-détection (^{125}I -cytochrome C cationisé). Les trois dernières membranes donnèrent des résultats similaires avec une légère préférence pour Zetabind et Zeta-Probe par rapport à l'Immobilon-N. De plus, cette dernière est hydrophobe et demande un pré-traitement au méthanol. Nous avons donc choisi pour des raisons pratiques d'utiliser Zetabind.

4.1.4 Influence du tampon de l'échantillon

La purification et la caractérisation des protéoglycannes nécessitent l'utilisation de tampons d'extraction et de solubilisation particuliers. Des solutions de chlorhydrate de guanidine 4 M, d'urée 7 M, de chlorure de césium (1,2 g/g) ou de chlorure de sodium 1 M sont communes à ces procédures. Nous avons donc testé différents tampons d'échantillon pour analyser une éventuelle modification de l'affinité des molécules pour la membrane Zetabind.

Les glycosaminoglycannes et protéoglycannes en solution dans du chlorure de césium (1,2 g/g) n'ont pas été détectés par notre méthode. Dissout dans un tampon PBS ou un tampon acétate de sodium 50 mM pH 5,8; chlorhydrate de guanidine 4 M; 0,5% CHAPS, ils étaient colorés au bleu Alcian, même à faible dilution (50 ng). Mais, les meilleurs résultats furent obtenus avec un tampon acétate de sodium 50 mM; Bis-Tris 10 mM pH 5,8; 0,05% CHAPS; urée 7 M.

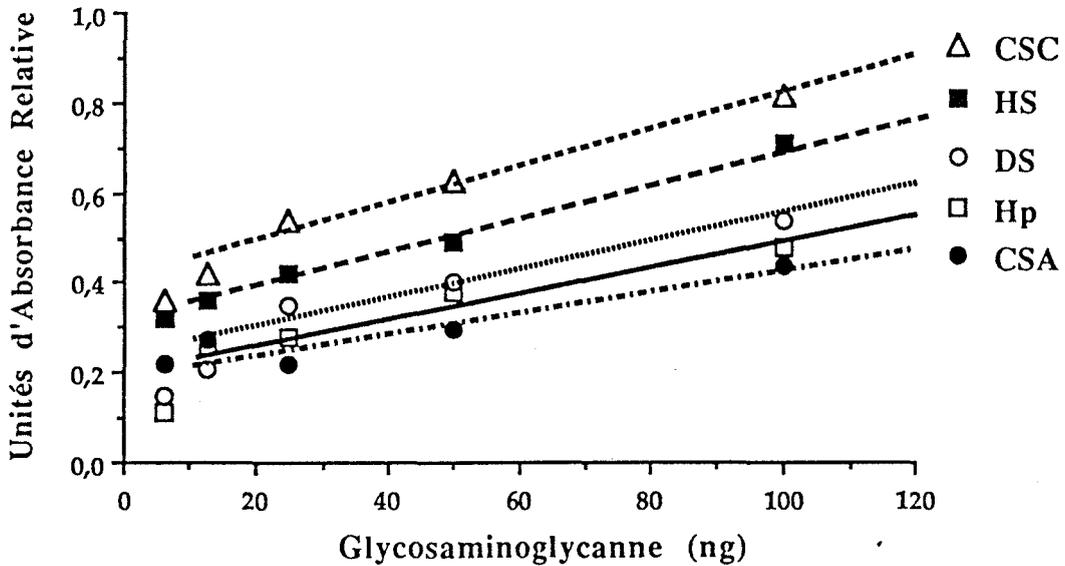
Il est possible que la force ionique, les détergents et les interactions chaotropiques des solutions de l'échantillon modifient l'affinité des glycosaminoglycannes/protéoglycannes pour la membrane. Le tampon urée a un faible pourcentage de détergent et une faible force ionique; il solubilise parfaitement les glycosaminoglycannes et protéoglycannes. Nous avons donc choisi d'utiliser ce tampon pour toutes les quantifications.

4.1.5 Quantification par densitométrie

La quantification des glycosaminoglycannes/protéoglycannes pose souvent de nombreux problèmes. En effet, les tampons d'extraction et de solubilisation interfèrent avec les dosages colorimétriques utilisés pour doser ces constituants. Nous avons donc analysé notre méthode sur le plan quantitatif.

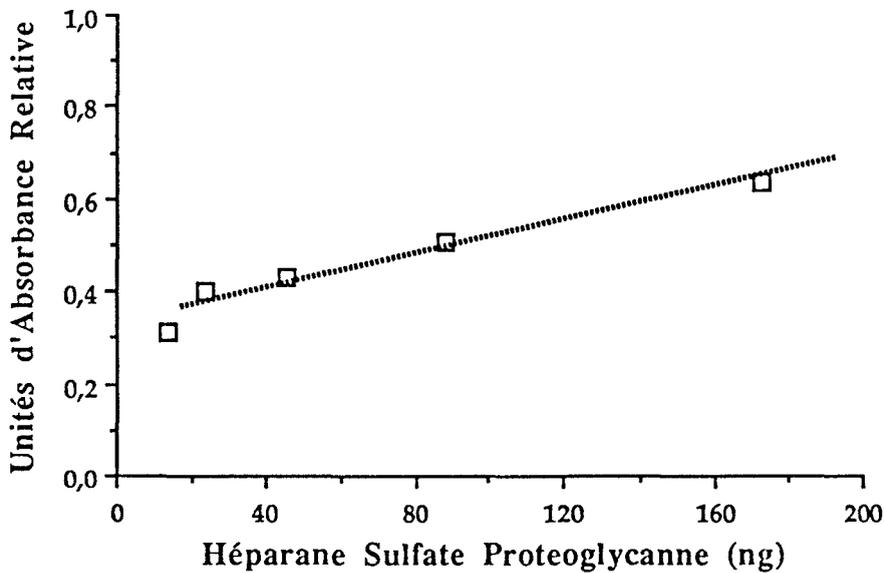
Des dilutions des glycosaminoglycannes suivants (chondroïtine sulfate A, chondroïtine sulfate C, dermatane sulfate, héparane sulfate, héparine, kératane sulfate, et l'héparane sulfate protéoglycanne vasculaire) ont été réalisées dans le tampon urée décrit ci-dessus. Les échantillons ont ensuite été déposés en dot-blot sur une membrane de Zetabind. Après coloration au bleu Alcian, les membranes séchées de Zetabind ont été digitalisées par un densitomètre laser Ultrascan XL (LKB Pharmacia).

Une échelle linéaire de 10 à 100 ng a été obtenue pour les glycosaminoglycannes déposés en dot-blot (à l'exception du kératane sulfate) en fonction de la réflectométrie de l'intensité de coloration.



Pour le kératane sulfate, cette portion linéaire s'établissait de 100 à 500 ng.

De même, pour l'héparane sulfate protéoglycane, une linéarité comprise entre 20 et 200 ng était retrouvée entre la quantité de protéoglycane déposée et la coloration mesurée par réflectométrie.



Notre méthode est donc quantitative pour des quantités très faibles en glycosaminoglycannes. Cependant, le kératane sulfate est le seul glycosaminoglycane qui ne montre pas la même sensibilité. Il est également le seul à ne pas contenir d'acide uronique (Kjellen et Lindahl, 1991) mais il a pourtant approximativement la même quantité de groupements sulfate (Longas et Breitweiser, 1991). Il est donc probable que l'interaction glycosaminoglycane-membrane se fasse à la fois par le biais des groupements sulfates et carboxyles des sucres. Finalement, il est intéressant de noter que les intervalles de linéarité pour l'héparane sulfate protéoglycane (purifié des glomérules de rein de bœuf) et le glycosaminoglycane héparane sulfate (purifié à partir du même matériel) sont différents. Cette apparente différence en sensibilité est sans doute liée à la quantité de glycosaminoglycane présente dans chaque préparation. En effet, l'héparane sulfate protéoglycane ne contient qu'environ 30% (w/w) de glycosaminoglycane héparane sulfate. De plus, la partie protéique de l'héparane sulfate protéoglycane peut affecter les propriétés de liaison à la membrane et modifier ainsi la quantité de matériel fixée à la feuille de Zetabind, ou encore la fixation du bleu Alcian aux chaînes de glycosaminoglycannes.

4.1.6 Suivie des techniques de purification

Etant donné la sensibilité de la technique, il doit être possible de suivre les étapes de purification des protéoglycannes (chromatographies d'échange d'anions et de gel filtration). Nous avons donc comparé la coloration par le bleu Alcian et le marquage de l'anticorps monoclonal 7E12, au cours d'une des étapes de purification de l'héparane sulfate protéoglycane vasculaire de rein de bœuf, à savoir la chromatographie de tamisage moléculaire (gel filtration) (Figure XLII).

Après gel filtration, trois pics sont obtenus (Fillit et al., 1985; Kemeny et al., 1988). Les fractions colorées au bleu Alcian sont celles des pics A et B. Par contre, l'anticorps monoclonal 7E12 ne marque que les fractions du pic B. Il faut noter que notre méthode détecte tous les protéoglycannes.

4.2 Recherche d'une modification des protéoglycannes vasculaires dans la maladie d'Alzheimer (au niveau des sulfates et de l'acide uronique)

Avant d'analyser les protéoglycannes vasculaires du cerveau humain, nous avons besoin de les purifier. Nous avons utilisé de très petites quantités (1 à 10 g) de cerveau de bœuf pour la mise au point de cette méthode, afin de pouvoir l'appliquer plus facilement aux échantillons de cerveau humain.

4.2.1 Mise au point d'une méthode de purification des protéoglycannes vasculaires de bœuf

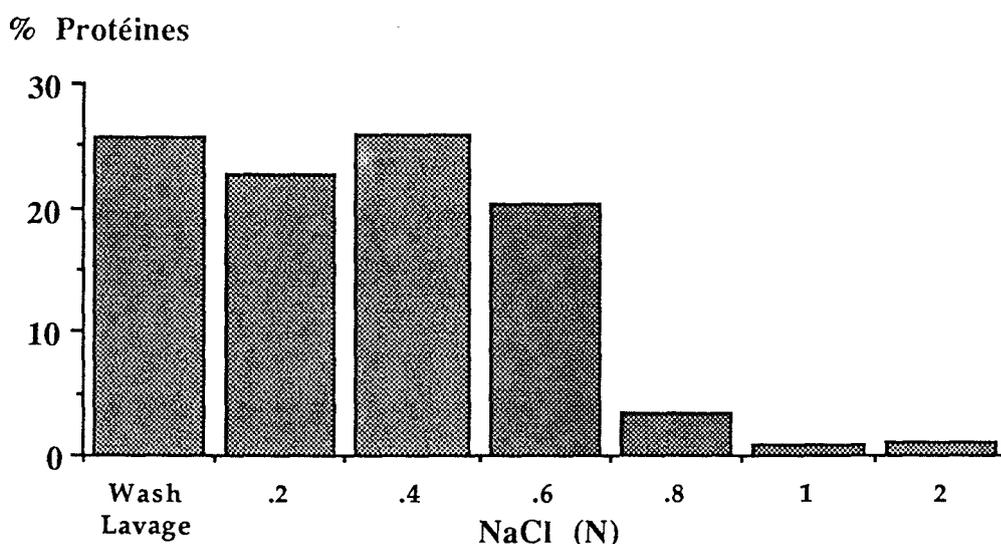
Nous avons utilisé une méthode de purification des protéoglycannes cérébrovasculaires qui dérive de celle de Fillit et al., 1985 pour l'héparane sulfate protéoglycannique de rein de bœuf. Une lyse du tissu (majoritairement la substance grise) a été réalisée en l'homogénéisant dans de l'eau distillée, en présence d'inhibiteurs de protéases. Après centrifugation, le matériel soluble a été éliminé et seul le culot qui contenait principalement des membranes basales vasculaires, des débris de membranes et des éléments du cytosquelette (Meezan et al., 1976) a été conservé. La préparation a été ensuite délipidée, car en absence de délipidation, la colonne de chromatographie d'échange d'anions s'obstruait. Il faut noter que la délipidation ne pouvait pas se faire en présence de détergents qui auraient favorisé l'extraction et la solubilisation des protéoglycannes.

Les protéoglycannes présents dans le matériel délipidé ont été extraits et solubilisés dans un tampon urée 7 M avec un détergent zwitterionique (0,5% CHAPS) et le matériel insoluble a été éliminé par centrifugation. Le surnageant a alors été déposé sur une colonne de chromatographie d'échange d'anions DEAE Sépharose CL-6B.

Un gradient linéaire de chlorure de sodium (de 0 à 2 N) a été réalisé et cinquante μ l de chaque fraction ont été déposés en dot-blot en vue d'une détection au bleu Alcian. Les fractions "bleu Alcian positives" ont été trouvées dans l'intervalle de 0,4 à 2 N NaCl. Après concentration par microfiltration, le matériel a été déposé en chromatographie de gel filtration Sépharose CL-4B. Deux pics ont été obtenus et ont été tous deux colorés au bleu Alcian mais seul le plus important des deux était immunoréactif avec l'anticorps monoclonal 7E12.

La quantité de matériel obtenue après gel filtration était insuffisante pour réaliser la moindre analyse biochimique (dosage de l'acide uronique et des protéines). Nous avons donc décidé de ne pas faire de gel filtration et de s'arrêter après la chromatographie d'échange d'anions. Mais, à la place d'un gradient linéaire de chlorure de sodium, nous avons réalisé un gradient d'élution en sept paliers (rinçage; 0,2 N; 0,4 N; 0,6 N; 0,8 N; 1 N et 2 N NaCl). Chaque fraction a ensuite été quantifiée pour son contenu en acide uronique et protéines. Aucun dosage colorimétrique de la quantité de sulfates des glycosaminoglycannes (Terho et Hartiala, 1971) n'a pu être réalisé du fait de la présence de nombreuses substances interférentes.

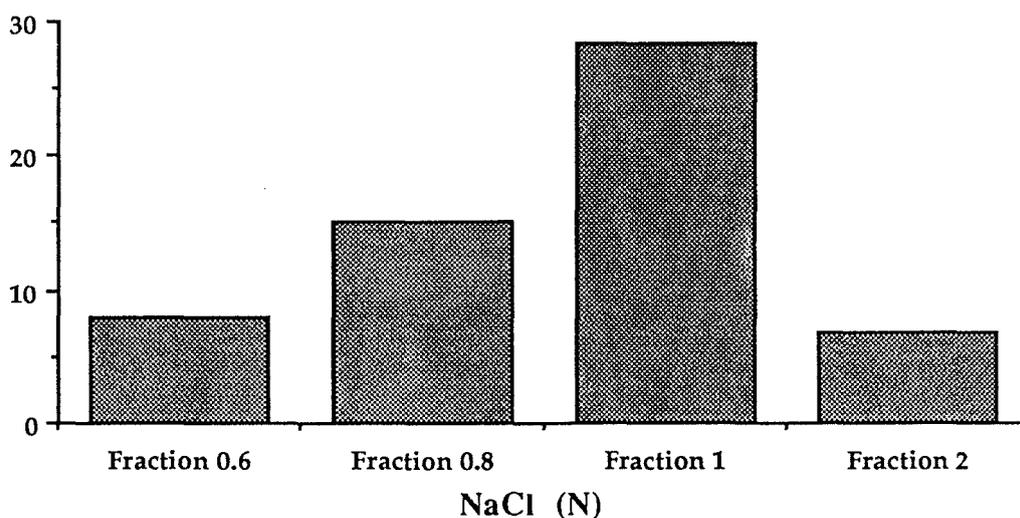
Les protéines de chaque fraction ont été quantifiées en pourcentage par rapport à l'ensemble des protéines contenues dans les sept fractions. Soixante quinze p. cent des protéines se trouvaient comprises dans les fractions de "rinçage" à 0,4 N NaCl. Dans les fractions anioniques, le palier 0,6 N était le plus riche avec 20% des protéines, puis 0,8 N et finalement 1 N et 2 N.



Pour la quantification de l'acide uronique, seules les fractions les plus anioniques (0,6 N; 0,8 N; 1 N et 2 N NaCl) ont pu être analysées. Les autres contenaient trop de substances interférentes (hexoses des glycoprotéines et glycosaminoglycannes neutres de type acide hyaluronique) et la couleur rose caractéristique du dosage de l'acide uronique n'a pu être obtenue. Cela n'a pas gêné notre analyse puisque les protéoglycannes détectés par la méthode au bleu Alcian se trouvaient dans les fractions post-0,4 N NaCl.

Les résultats ont été présentés comme un rapport acide uronique/protéines. Comme nous pouvions nous y attendre, ce rapport augmentait de la fraction 0,6 N à 1 N, avec des valeurs de 8%, 15% et 28% (w/w) respectivement pour les fractions 0,6 N; 0,8 N et 1 N NaCl. A 2 N NaCl, le rapport acide uronique/protéines était identique à celui de la fraction 0,6 N NaCl, avec une valeur de 7%.

Acide uronique/protéines



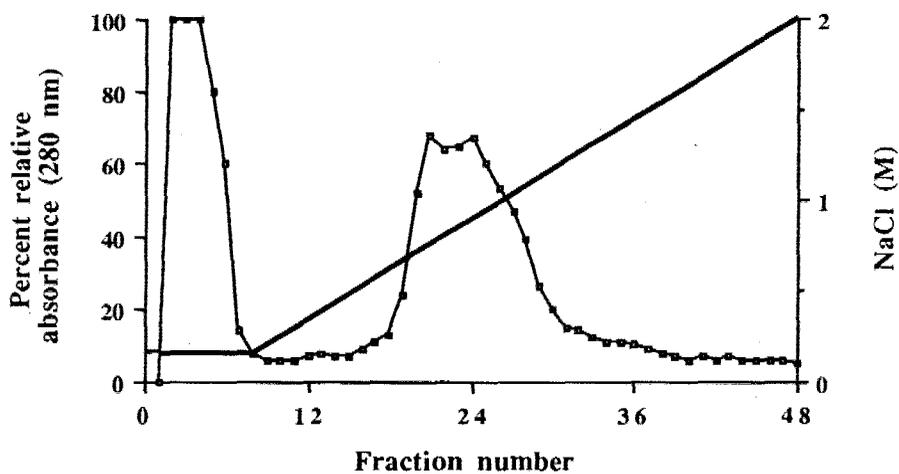
Les fractions enrichies en protéoglycannes s'échelonnaient donc de la fraction 0,4 N à 2 N NaCl. Leur analyse en hexosamine par analyseur d'acides aminés (Fauconnet et Rochemont, 1978) a révélé un mélange (1:1) de glucosamine et de galactosamine dans toutes les fractions à l'exception de la fraction 2 N NaCl qui contenait 100% de galactosamine. Etant donné que l'héparane sulfate est constitué de la répétition d'un disaccharide d'acide glucuronique et de N-acétyl-glucosamine et le chondroïtine sulfate d'acide glucuronique et de N-acétyl-galactosamine, il est probable que les fractions contenaient un mélange de protéoglycannes. L'exception était la fraction 2 N NaCl qui ne contenait pas d'héparane sulfate protéoglycanne mais uniquement un ou des chondroïtine sulfate protéoglycannes.

4.2.2 Application aux protéoglycannes du cerveau humain

Après avoir développé la technique de purification pour de petits échantillons de cerveau de bœuf, nous l'avons appliqué au cerveau humain de quatre témoins et quatre patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Les premières purifications, réalisées avec un gradient linéaire de NaCl en chromatographie d'échange d'anions (Figure XLIIIA), ont fourni des fractions positives au bleu Alcian de 0,4 N à 2 N NaCl (Figure XLIIIB). La coloration maximale obtenue autour de 0,6-1,2 N NaCl correspondait également aux fractions immunoréactives à l'anticorps monoclonal 7E12 (Figure XLIIIC). Pour quantifier protéines et acide uronique, des gradients par palier ont été réalisés: "lavage"; 0,15 N; 0,3 N; 0,6 N; 1 N et 2 N NaCl. Les six fractions ont été quantifiées pour leur contenu en protéines. Aucune différence significative n'a pu être observée entre patients atteints de la maladie d'Alzheimer et témoins. Quarante cinq pour cent du total des protéines ont été retrouvés dans l'intervalle "lavage"-0,3 M NaCl (Figure XLIVA). Comme nous l'avons décrit pour le cerveau de bœuf, les fractions anioniques ont été quantifiées pour leur acide uronique, et leur rapport acide uronique/protéines a été analysé. Dans la maladie d'Alzheimer, les fractions 0,6 N; 1 N et 2 N NaCl présentent un contenu en acide uronique plus faible que celles des témoins. Une différence significative a pu être observée pour le rapport acide uronique/protéines entre malades et témoins (test t de Student; DL = 6; $p < 0,05$) dans les deux fractions les plus anioniques (1 N et 2 N NaCl) (Figure XLIVB). Le taux d'acide uronique/protéines de la fraction 0,6 N NaCl était également plus faible pour les patients atteints de la maladie d'Alzheimer mais n'était cependant pas significatif.

A

Anion exchange profile



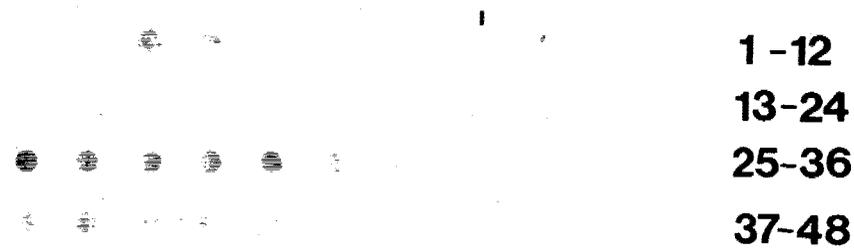
B

Alcian blue



C

Monoclonal antibody to the vascular HSPG



L'apparente baisse du rapport acide uronique/protéines dans le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer peut être expliquée par une dérégulation du métabolisme des protéoglycannes. Cela pourrait être expliqué par une diminution du nombre des groupements sulfate (liée par exemple à une plus faible activité de la sulfotransférase) ou encore une dérégulation des enzymes impliqués dans l'anabolisme (xylosyltransférase, galactosyltransférase, N-acetylgalactosaminyltransférase ou N-acetylglucosaminyltransférase) ou le catabolisme des glycosaminoglycannes. Ceci conduirait à une baisse globale de la synthèse des protéoglycannes dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

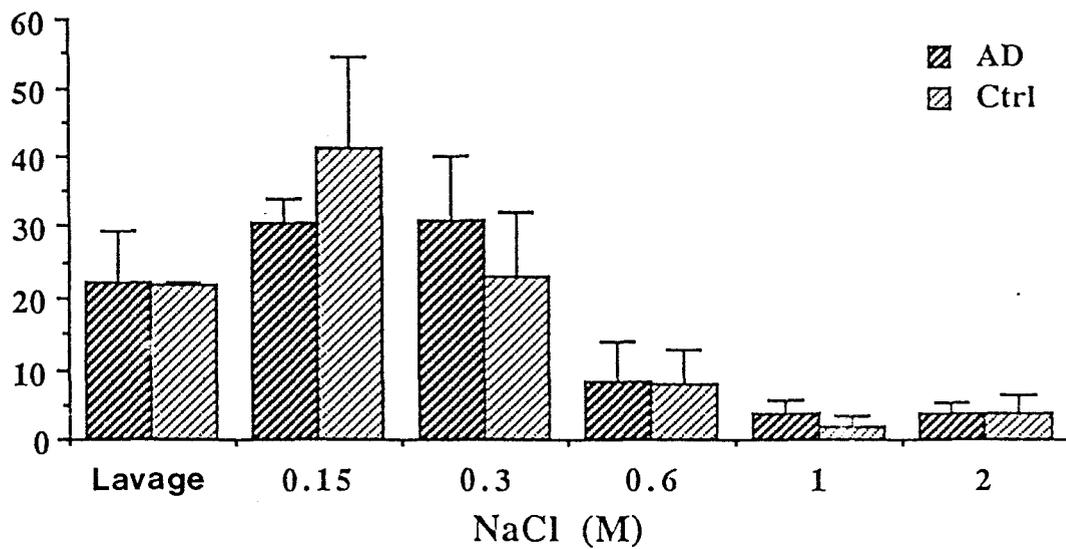
Une telle modification dans la charge des protéoglycannes, qui jouent un rôle fondamental dans la filtration des macromolécules au niveau de la barrière hémato-encéphalique (Simionescu et al., 1981; 1982; Fillit, 1990), pourrait conduire à l'altération de cette dernière.

En résumé, nous avons mis au point une méthode pour la purification des protéoglycannes vasculaires du cerveau. L'application de cette méthode à la maladie d'Alzheimer suggère une modification dans la structure des protéoglycannes, mais ceci doit être confirmé sur un plus grand nombre d'échantillons.

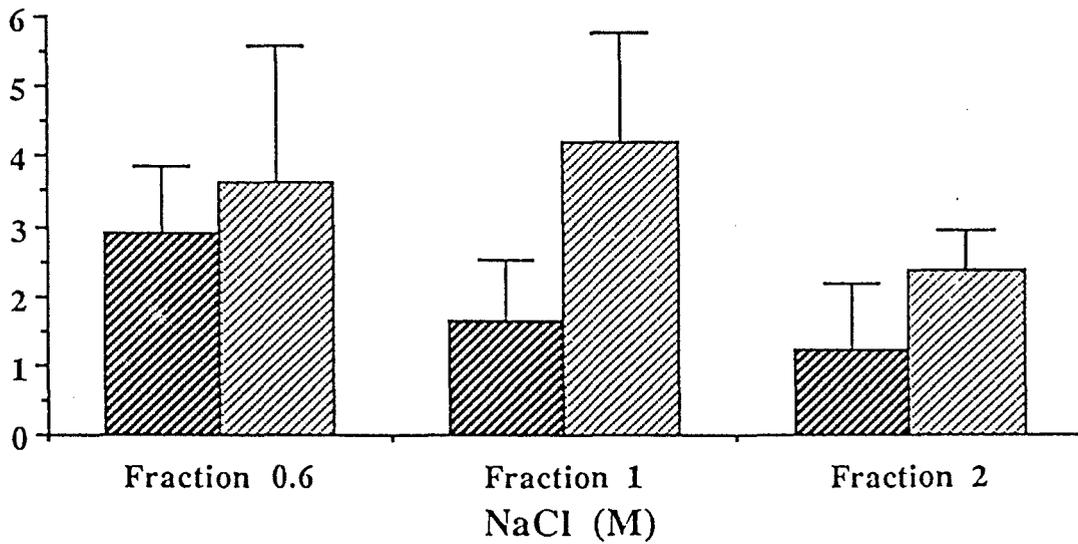
4.3 Conclusion

Nos résultats mettent en évidence une affinité entre un héparane sulfate protéoglycannique et le peptide A4. Nous avons également démontré qu'une première analyse des protéoglycannes vasculaires peut être réalisée sur des petites quantités de cerveau humain. Ces données préliminaires sur un petit échantillon de la population, suggère une modification de la distribution chromatographique en échange d'anions des protéoglycannes vasculaires, entre patients atteints de la maladie d'Alzheimer et témoins. Cette modification pourrait être liée à une différence en sulfatation.

% Protéines



U/P ratio



5 Etude de l'affinité des protéoglycannes de neuroblastomes pour l'APP

Nous avons montré que l'affinité, pour le peptide A4, de l'héparane sulfate protéoglycanne purifié des glomérules de rein s'effectue à la fois par le biais de l'axe protéique et de l'héparane sulfate. Nous disposons maintenant d'une micro-méthode de détection et de purification des protéoglycannes. Par ailleurs, nos résultats immunohistochimiques, obtenus à la fois pour l'HSPG et la thrombospondine laissent suggérer une participation neuronale à l'amyloïdogénèse. Pour compléter notre étude et mieux comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de l'accumulation du peptide A4 avec les constituants de la matrice extracellulaire, nous avons analysé les interactions des protéoglycannes sécrétés d'origine neuronale pour le peptide A4. En effet, les protéoglycannes sécrétés de neuroblastomes participent à l'élaboration de la matrice extracellulaire (Lander et al., 1982; Watanabe et al., 1989). Nous avons pour cela choisi un clone particulier de neuroblastomes: SKN SH-SY 5Y (Perez-Polo et al., 1979; 1982).

5.1 Purification et Caractérisation des protéoglycannes

5.1.1 Concentration et dialyse des surnageants de culture

Les neuroblastomes SKN SH SY5Y ont été cultivés dans un milieu défini sans NGF (voir matériels et méthodes, paragraphe BBB) en présence de marqueurs isotopiques ($\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ et $[^3\text{H}]\text{-Gly}$) pendant 36 heures. Le $[^{35}\text{S}]\text{-sulfate}$ sert à marquer la partie glycosaminoglycannique et la $[^3\text{H}]\text{-glycine}$ les domaines de répétition Ser-Gly de l'axe protéique. Le milieu de culture était alors récupéré et microfiltré sur Diaflo Ultrafilters avec une membrane PM30 (Amicon Co, Danvers MA USA). La fraction concentrée résultante était finalement dialysée contre le tampon de chromatographie d'échange d'anions.

5.1.2 Echange d'anions et Gel filtration

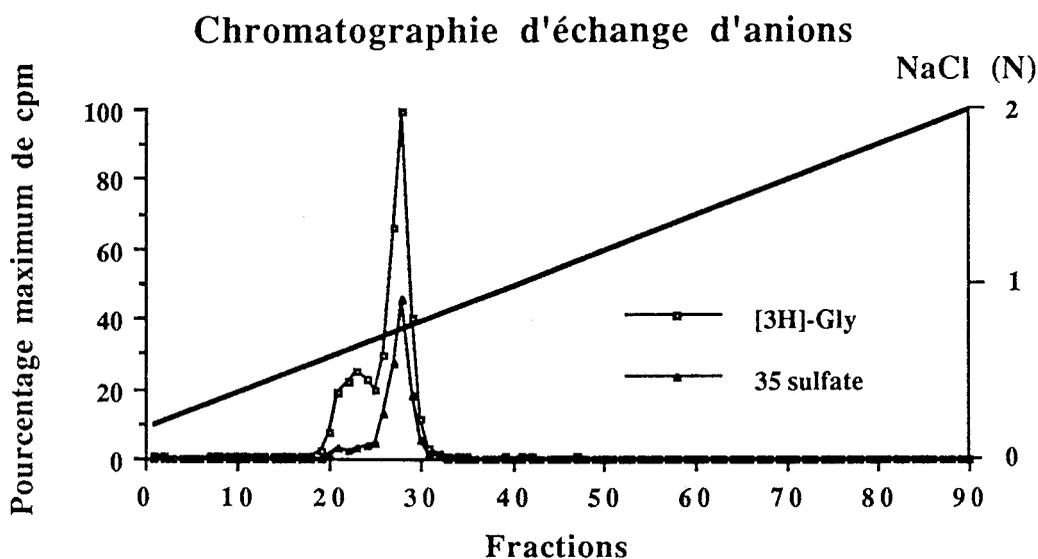
Une chromatographie d'échange d'anions avec un gradient linéaire de chlorure de sodium (0,15-2 N NaCl) a été réalisée.

Deux pics ont été obtenus:

le premier élué à 0,4 N NaCl était seulement [³H]Gly-positif, il doit contenir les protéines non-anioniques et les glycoprotéines

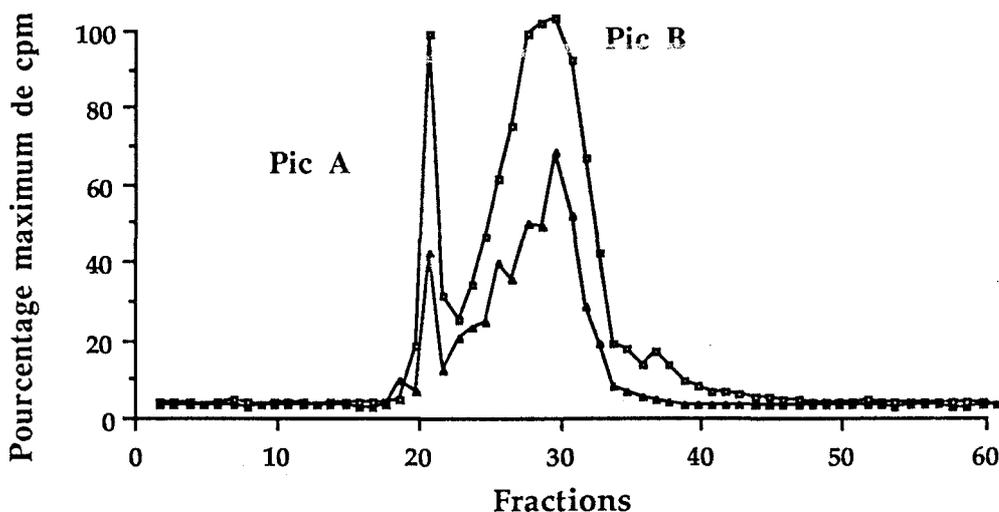
le second était une fraction à la fois [³H] Gly et ³⁵SO₄-positifs.

Cette fraction débutait à 0,7 N NaCl et se terminait à 1 N NaCl, avec un maximum à 0,85 N NaCl (Figure A). Elle doit contenir en majorité des protéoglycannes.



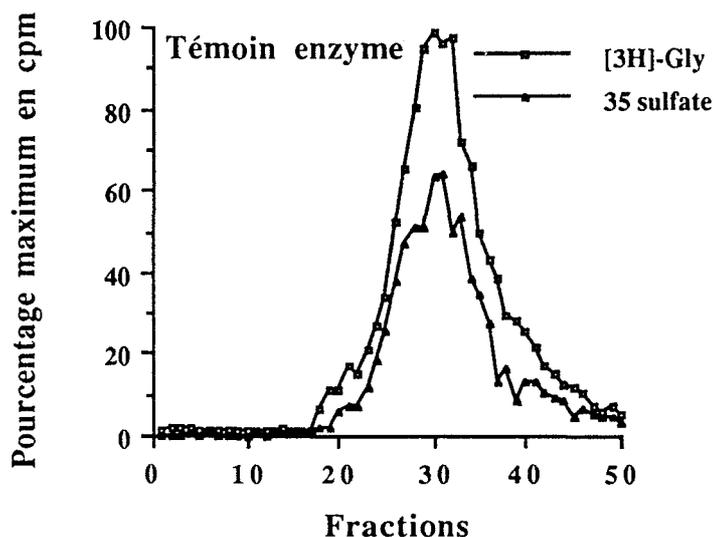
Après concentration par microfiltration, elle a été déposée sur une colonne de chromatographie de tamisage moléculaire. Deux pics ont été également obtenus: le pic B de plus faible masse moléculaire présentait toutefois un double marquage isotopique beaucoup plus important.

Nous avons donc choisi de caractériser les fractions du pic B puisqu'elles présentaient un meilleur rendement de purification.

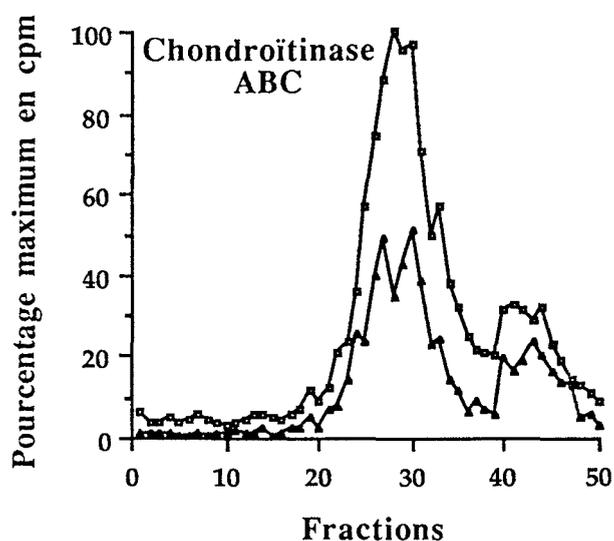
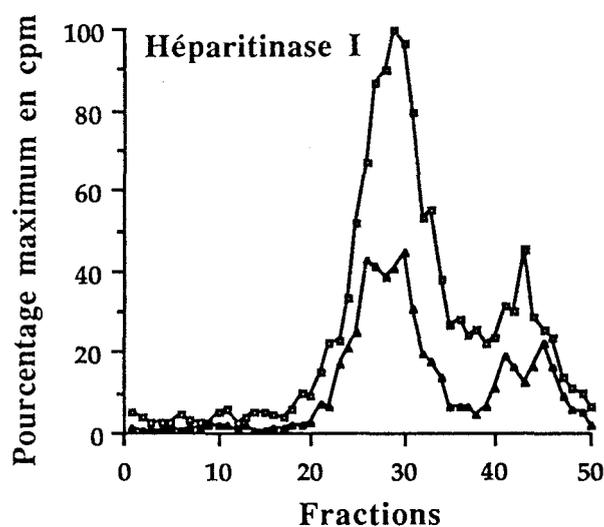


5.1.3 Caractérisation des protéoglycannes par leur sensibilité aux endoglycosidases

Le matériel du pic B doublement marqué a été testé pour sa sensibilité aux glycosidases spécifiques des glycosaminoglycannes: l'héparitinase I (Héparine lyase III, EC 4.2.2.8) et la chondroïtinase ABC (EC 4.2.2.4). Le profil des pics marqués au $^{35}\text{SO}_4$ et à la $[^3\text{H}]$ -Gly en chromatographie de tamisage moléculaire avant:



et après traitement aux endoglycosidases nous ont permis de déterminer si le matériel doublement marqué était sensible à l'un ou l'autre des enzymes.



Le matériel doublement marqué était sensible à la fois à l'héparitinase III et à la chondroïtinase ABC suggérant que le pic B contenait respectivement des chaînes d'héparane sulfate et de chondroïtine sulfate et/ou dermatane sulfate. Il est probable qu'il y ait un mélange de protéoglycannes (héparane sulfate protéoglycannes et chondroïtine sulfate protéoglycannes) dans le pic B, mais nous ne pouvons écarter l'hypothèse d'un hybride héparane sulfate/chondroïtine sulfate protéoglycanne.

Nous avons donc isolé des protéoglycannes de neuroblastomes. Ces derniers sont sécrétés par les cellules tumorales. Les protéoglycannes sécrétés par les lignées neuronales semblent impliquer dans la régulation de la croissance neuritique (Dow et al., 1991), la formation de la matrice extracellulaire (Dow et al., 1988; Culp et al., 1989) et l'activité des facteurs de croissance (FGF acide, FGF basique) (Ruoslahti et Yamaguchi, 1991) en augmentant leur affinité pour leurs récepteurs (Yanagishita et Hascall, 1992). Pour les neuroblastomes SY5Y non différenciés au NGF, ces protéoglycannes pourraient avoir un rôle dans la croissance neuritique puisque cette dernière existe surtout quand les cellules sont cultivées en milieu défini. Néanmoins, un rôle dans l'adhésion cellulaire et la formation de la matrice extracellulaire apparaît comme le plus vraisemblable.

5.2 Comparaison immunochimique de l'HSPG vasculaire et des protéoglycannes de neuroblastomes.

5.2.1 Présence de réactions croisées avec le 7E12

Du fait du marquage neuronal observé en immunohistochimie chez certains patients atteints de la maladie d'Alzheimer, du syndrome de Down et du syndrome de Guam avec dépôts amyloïdes, nous avons recherché si les protéoglycannes sécrétés de neuroblastomes réagissaient avec l'anticorps monoclonal 7E12.

Les fractions obtenues après chromatographie de tamisage moléculaire ont été déposées en dot-blot sur Immobilon-P. La membrane a été incubée avec l'anticorps monoclonal 7E12. Seules les fractions du pic B étaient immunoréactives. Il y a donc dans le pic, un matériel qui montre une réaction croisée avec l'anticorps monoclonal 7E12 caractéristique de l'héparane sulfate protéoglycannique vasculaire. Nous l'avons donc analysé

par la technique des immuno-empreintes, après électrophorèse en gel de polyacrylamide 5% en présence de SDS. L'héparane sulfate protéoglycane a été déposé sur le même gel comme témoin. Ce dernier a une masse moléculaire apparente d'environ 200 kDa. Au contraire, le matériel provenant des neuroblastomes a une masse moléculaire plus importante, supérieure à 300 kDa (Figure XLVA). Nos résultats obtenus en immunohistochimie, qui montrent un marquage de neurones (ou neurones en dégénérescence) (Figure XLVB) pourraient s'expliquer, non pas par une recapture post-mortem de fragments protéolytiques de l'héparane sulfate protéoglycane vasculaire mais bien par la présence d'au moins un protéoglycane neuronal qui est immunoréactif à l'anticorps monoclonal 7E12.

5.2.2 Les protéoglycannes de neuroblastomes et l'héparane sulfate protéoglycane vasculaire sont différents

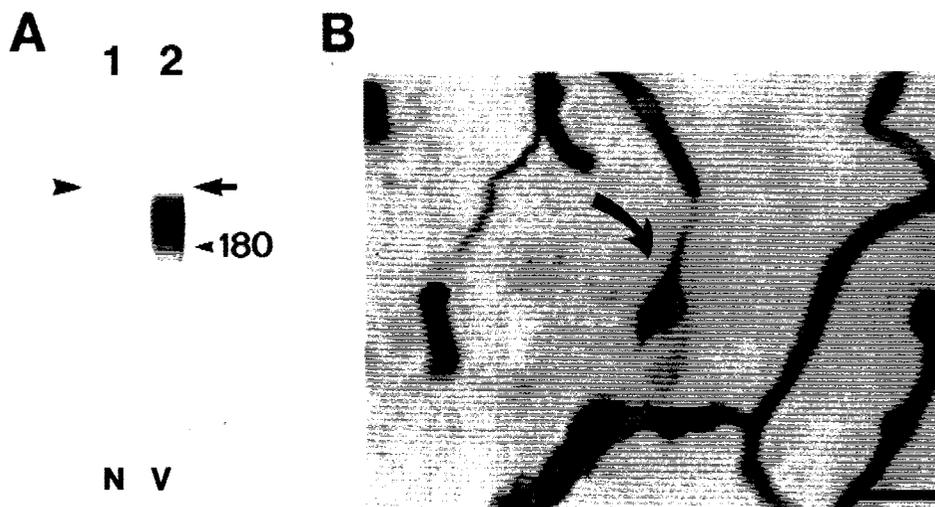
Le protéoglycane sécrété des neuroblastomes et l'héparane sulfate protéoglycane sont-ils apparentés? Lors des expériences de digestion aux endoglycosidases, l'axe protéique après héparitinase III est détecté par l'anticorps 7E12 mais pas le matériel de plus haute masse moléculaire. A l'inverse, le matériel digéré par la chondroïtinase ABC n'est pas immunoréactif. Le matériel sécrété n'est donc pas un hybride mais bien un mélange de protéoglycannes. Le protéoglycane sécrété des neuroblastomes détecté par l'anticorps 7E12 est un héparane sulfate protéoglycane. Nous avons déterminé qu'il a une masse moléculaire plus élevée; nous nous sommes donc demandés si la différence entre l'héparane sulfate protéoglycane vasculaire et l'héparane sulfate protéoglycane de neuroblastome était liée à l'état de glycosylation. La comparaison des deux axes protéiques en gel de polyacrylamide en présence de SDS a été réalisée et

Figure XLV

Analyses immunologiques des protéoglycannes sécrétés de SKNSH SY5Y.

A) Immuno-empreinte avec l'anticorps 7E12: les protéoglycannes de cellules tumorales (N) ont été déposés dans le couloir 1 et l'héparane sulfate protéoglycane des glomérules de rein (V) dans le couloir 2 (bande large). Noter la présence d'un marquage à la limite entre le gel de concentration et celui de séparation qui correspond à l'héparane sulfate protéoglycane de neuroblastome avec une masse moléculaire supérieure à 300 kDa (tête de flèche). Le témoin de masse moléculaire (180) est exprimé en kDa.

B) Marquage immunohistochimique réalisé avec l'anticorps 7E12 dans le cortex temporal d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer. Noter le marquage vasculaire et neuronal (flèche) qui semble être une lésion neurofibrillaire intracellulaire. Echelle = 25 μ m.



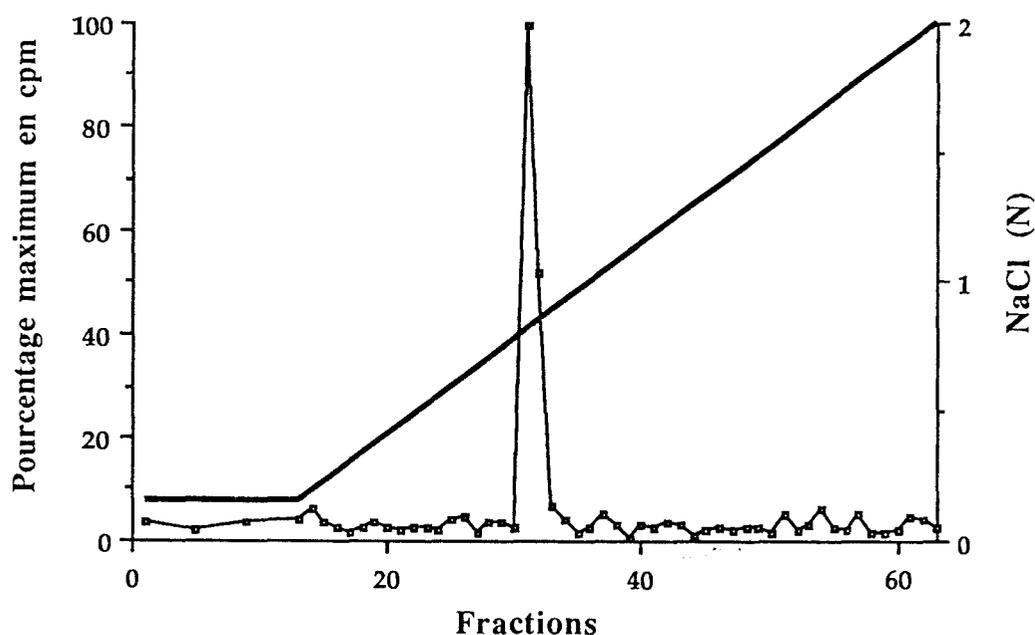
nous avons remarqué que leurs masses moléculaires étaient différentes. Il peut donc s'agir de deux protéoglycannes différents mais avec au moins un domaine commun (celui reconnu par l'anticorps 7E12) ou de deux protéoglycannes codés par le même gène mais résultants d'un épissage différent selon le type cellulaire.

5.3 Etude d'affinité: spécificité pour le peptide A4

Nous avons étudié l'affinité des protéoglycannes, du pic B obtenu après chromatographie de tamisage moléculaire, pour le peptide A4. En effet, le marquage neuronal observé en immunohistochimie avec l'anticorps 7E12 est probablement lié à la présence de l'héparane sulfate protéoglycane neuronal. Il serait intéressant de savoir s'il a les mêmes propriétés que l'héparane sulfate protéoglycane vasculaire, en ce qui concerne son affinité pour le peptide A4. De plus, suite aux expériences de digestions par des endoglycosidases, nous avons déterminé qu'un chondroïtine et/ou dermatane sulfate protéoglycane était présent dans la fraction du pic B. Ce dernier possède-t-il également une affinité pour le peptide A4?

5.3.1 Affinité pour les 28 premiers acides aminés du peptide A4

Une partie du matériel marquée au $^{35}\text{SO}_4$ du pic B, a été déposée sur la colonne de chromatographie d'affinité du peptide A4 (1-28). Après lavage de la colonne, un gradient linéaire de chlorure de sodium de 0,15 N à 2 N a été réalisé. Le matériel radiomarqué a été élué à une concentration de 0,88 N NaCl. Il y a donc une affinité des protéoglycannes de neuroblastomes (héparane sulfate et chondroïtine sulfate et/ou dermatane sulfate) pour la séquence 1-28 du peptide A4.



5.3.2 Affinité pour la séquence R4 et à la séquence R5

De la même façon qu'avec l'héparane sulfate protéoglycane, l'affinité pour deux autres régions de l'APP a été analysée. Le même matériel (cité ci-dessus) a été déposé sur les colonnes de chromatographie du peptide R4 et R5. Pour les deux colonnes, le matériel radiomarqué ne s'est pas fixé et a été élué par le lavage au tampon phosphate. Il n'y a donc aucune affinité entre les protéoglycannes sécrétés de neuroblastomes et les peptides R4 et R5 de l'APP.

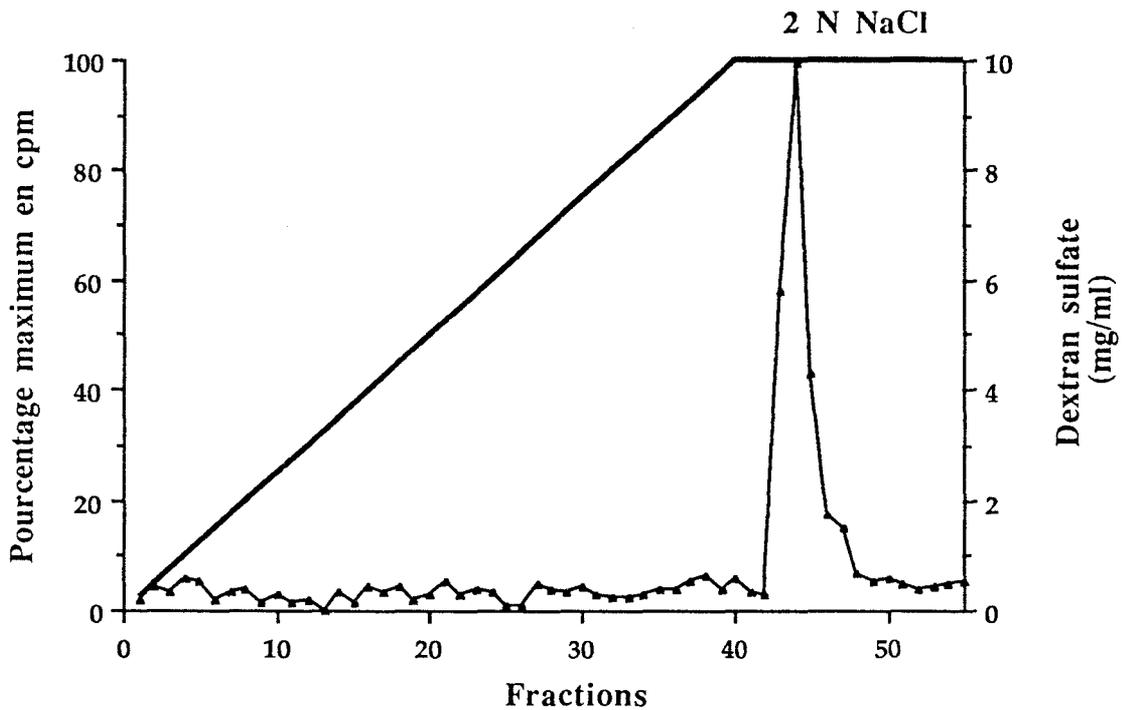
5.4 L'affinité pour le peptide A4 est médiée par la partie protéique ou glycosaminoglycannique

5.4.1 Affinité de la partie glycosaminoglycannique

Etant donné l'affinité des différents types de protéoglycannes sécrétés de neuroblastomes pour le peptide A4, nous avons étudié la spécificité de la liaison en utilisant différentes solutions de polysaccharides (sulfate de dextran, chondroïtine sulfate A, dermatane sulfate, héparine et héparane sulfate).

Elution par le dextran sulfate

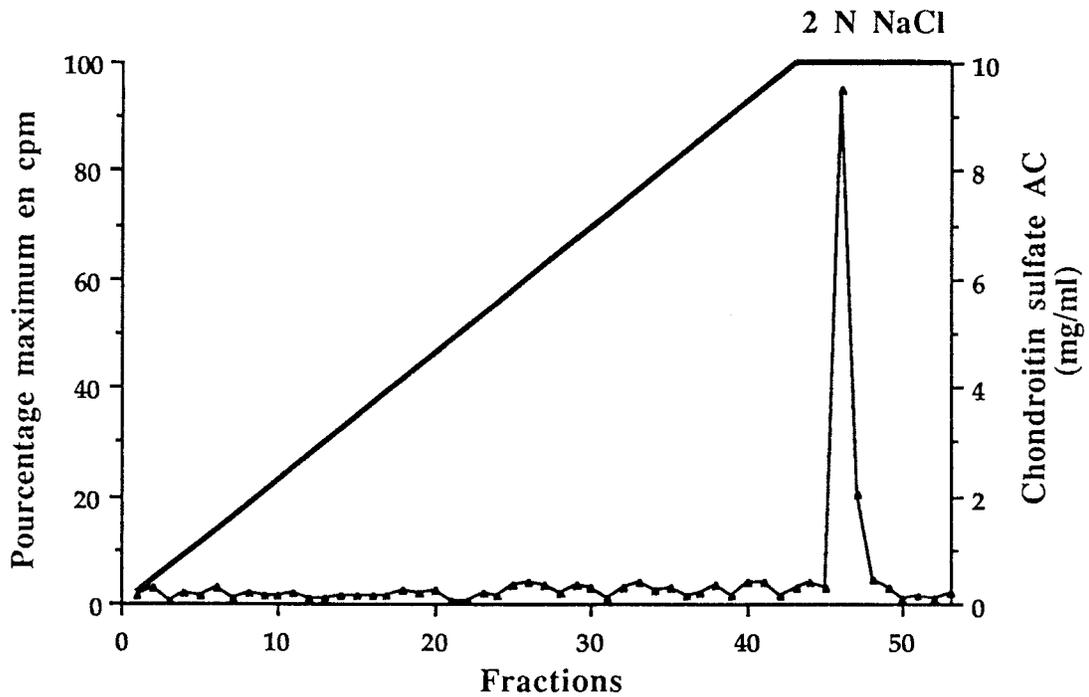
Le matériel marqué au $^{35}\text{SO}_4$ a été déposé sur la colonne de chromatographie d'affinité du peptide A4 et un gradient linéaire de sulfate de dextran a été réalisé mais le matériel n'a pas été élué. La colonne a ensuite été lavée par du NaCl 2 N, ce qui a permis l'élué des protéoglycannes de neuroblastomes.



Ces résultats démontrent que les polysaccharides sulfatés et les groupements sulfates en général ne suffisent pas à rompre la liaison protéoglycannes neuronaux-peptide A4.

Elution par le chondroïtine sulfate AC

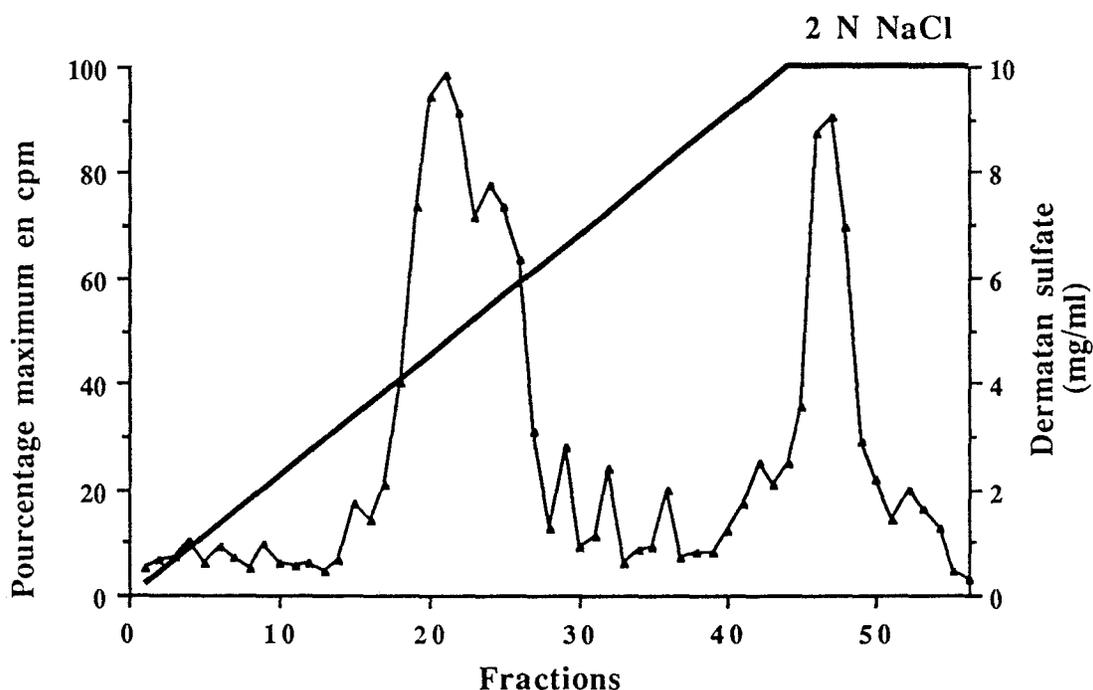
Nous avons ensuite utilisé un gradient (0-10 mg/ml) de chondroïtine sulfate A, contaminé jusqu'à 30% de chondroïtine sulfate C, pour éluer le matériel radiomarqué de la colonne de chromatographie d'affinité du peptide A4. Aucune élution n'a été réalisée et seul un lavage avec 2 N NaCl a permis de décrocher le matériel lié à la colonne.



Il est donc probable que le matériel lié à la colonne ne contenait pas de chondroïtine sulfate A et C. Mais étant donné qu'il est sensible à la chondroïtinase ABC, il est possible qu'il y ait un dermatane sulfate (chondroïtine sulfate B) protéoglycane.

Elution par le dermatane sulfate (chondroïtine sulfate B)

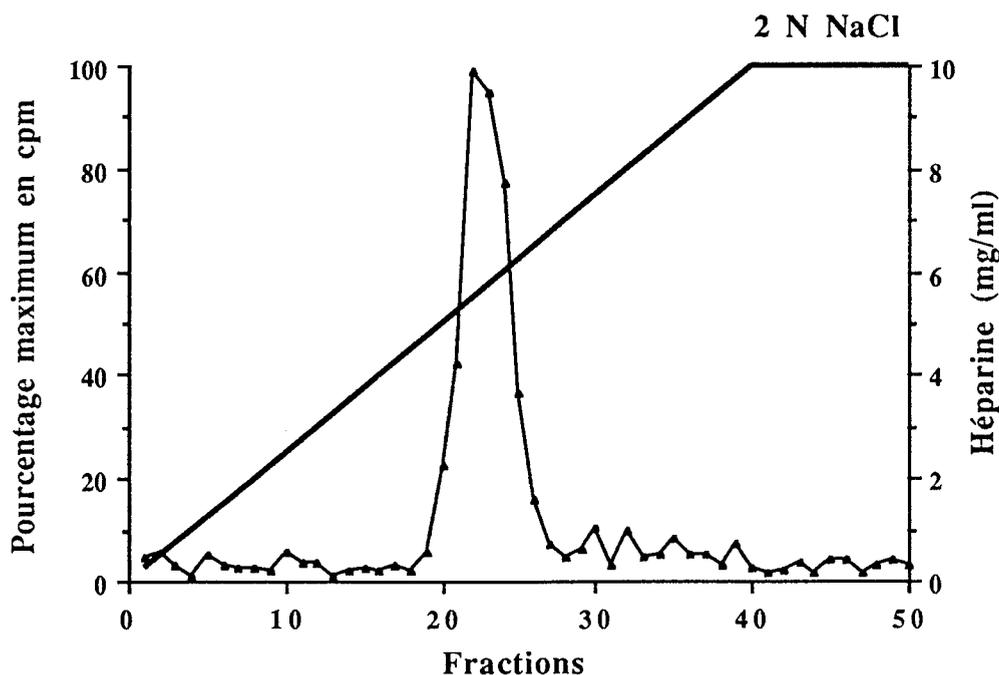
Nous avons donc réalisé un gradient linéaire de 0 à 10 mg/ml de dermatane sulfate, ce qui a permis l'élution partielle du matériel déposé pour une concentration en dermatane sulfate de 4,8 mg/ml. Le reste du matériel a été décroché grâce à un lavage par le NaCl 2 N. Il y a donc bien un dermatane sulfate protéoglycane qui se lie au peptide A4 mais un autre protéoglycane est également présent.



Une partie des fractions obtenues après le lavage au NaCl a été déposée en dot-blot. Les fractions sont immunoréactives à l'anticorps 7E12, elles contiennent donc bien l'autre protéoglycane sensible à l'héparitinase: l'héparane sulfate protéoglycane.

Elution par l'héparine et l'héparane sulfate

Finalement, nous avons réalisé des gradients d'héparine et d'héparane sulfate pour éluer le matériel radiomarqué. L'héparine éluait l'ensemble du matériel pour une concentration de 5,5 mg/ml:



alors que l'héparane sulfate à une concentration de 5,0 mg/ml n'élueait qu'une partie du matériel qui était 7E12 immunoréactif. Un second pic était élué avec le lavage 2 N NaCl. Il est possible que la préparation d'héparine ne soit pas pure et que le dermatane sulfate protéoglycane ait été également élué.

5.4.2 Affinité pour la partie protéique

Nous avons vérifié l'affinité de l'axe protéique du protéoglycane sécrété de neuroblastomes reconnu par l'anticorps monoclonal 7E12 pour le peptide A4. Nous avons donc traité la fraction B à l'héparitinase III et déposé sur la colonne de chromatographie d'affinité au peptide A4 le matériel digéré. Comme dans le cas de l'héparane sulfate protéoglycane vasculaire, l'axe protéique s'est lié au peptide A4 et il a fallu une

5.4.2 Affinité pour la partie protéique

Nous avons vérifié l'affinité de l'axe protéique du protéoglycane sécrété de neuroblastomes reconnu par l'anticorps monoclonal 7E12 pour le peptide A4. Nous avons donc traité la fraction B à l'héparitinase III et déposé sur la colonne de chromatographie d'affinité au peptide A4 le matériel digéré. Comme dans le cas de l'héparane sulfate protéoglycane vasculaire, l'axe protéique s'est lié au peptide A4 et il a fallu une concentration élevée de NaCl pour l'éluer (environ 1 N NaCl). Il y a donc de fortes chances pour que les deux types de protéoglycannes appartiennent à la même famille. Il est même possible qu'ils soient exprimés par le même gène mais subissent un épissage alternatif différent en fonction du type cellulaire.

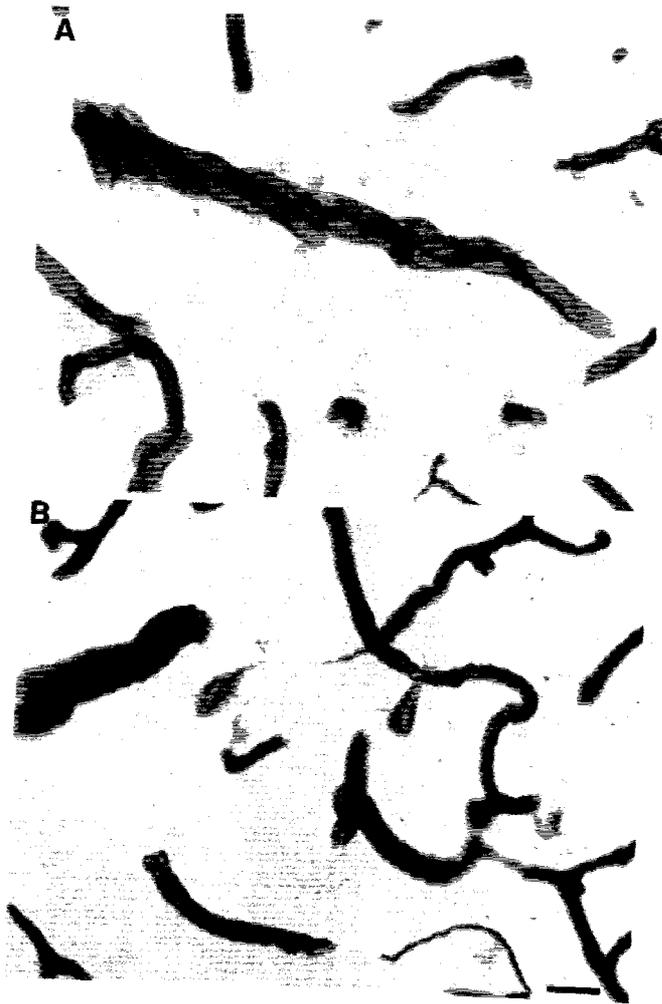
5.5 Bilan: Héparane sulfate protéoglycane neuronal

Malgré la présence d'anomalies vasculaires (Figure XXXVIA), l'héparane sulfate protéoglycane contenu dans les dépôts amyloïdes ne peut donc plus être considéré comme strictement vasculaire, il peut être également neuronal (XLVIB). La caractérisation de protéoglycannes sécrétés neuronaux peut avoir une grande signification dans la maladie d'Alzheimer. Une fois sécrétés, ces protéoglycannes se retrouvent donc dans le milieu extracellulaire et ils pourraient participer à la formation des dépôts amyloïdes. De plus, outre un héparane sulfate protéoglycane, il existe également un dermatane sulfate protéoglycane qui possède une forte affinité pour le peptide A4. Récemment, Snow et coll. (1992) ont démontré la présence d'un dermatane sulfate protéoglycane (decorin) dans les dépôts amyloïdes et les lésions neurofibrillaires. Il est probable qu'il s'agisse du protéoglycane que nous avons purifié à partir des neuroblastomes.

Outre les sites YE[VHHQKL]VF et RHDS décrits pour le protéoglycane vasculaire et les fonctions possibles qui y sont associées, la sécrétion de ces protéoglycannes leur donne un nouveau rôle potentiel dans le métabolisme de l'APP. En effet, la maturation de l'APP conduit à son clivage au niveau du peptide A4. Cette coupure se ferait soit au niveau de l'appareil de Golgi (Sambamurti et al., 1992), soit au niveau de la membrane plasmique (Sisodia et al., 1990; Anderson et al., 1991). L'affinité entre le peptide et un protéoglycane sécrété suivant la même voie d'exocytose que l'APP pourrait empêcher le clivage normal de l'APP à l'intérieur du peptide A4 et conduire à une coupure alternative en dehors du peptide A4. Ce type de protéolyse conduirait à la formation de fragments amyloïdogéniques. L'affinité des protéoglycannes pour le peptide A4 pourrait donc réguler la sécrétion d'APP et modifier les rapports fragments non amyloïdogéniques/fragments amyloïdogéniques.

Les derniers résultats obtenus en immunohistochimie indiquent que l'héparane sulfate protéoglycane est colocalisé dans les neurones avec le peptide A4. Les deux molécules sont probablement métabolisés de manière similaire de l'exocytose à l'endocytose par la voie endosome-lysosome ce qui expliquerait le type d'images parfois obtenu (Figure XLVIC). Les protéoglycannes sont dans des vésicules intracellulaires dans des neurones en voie de dégénérescence qui sont également immunoréactifs avec un anticorps dirigé contre le peptide A4. Les protéoglycannes pourraient servir de molécules d'accompagnement pour l'APP. Une dérégulation cellulaire telle qu'une diminution de la concentration en Zn^{2+} , une modification de la charge des protéoglycannes ou une mutation ponctuelle de l'APP pourrait changer l'affinité des protéoglycannes pour une région de l'APP vers une autre. Par exemple, si l'APP est normalement O-glycosylé par une chaîne de chondroïtine sulfate au niveau du peptide A4 (Shioi et al., 1992), l'affinité

Figure XLVI



Marquage immunohisto-
mique réalisé avec l'anticorps
7E12: différents éléments
caractéristiques obtenus chez
des patients atteints de la
maladie d'Alzheimer.

A) Enchevêtrement de vais-
seaux. B) Marquage neuronal
de type lésions neurofibril-
laires marquées par l'anti-
corps. Echelle = 25 μ m.

C) Noter l'aspect vésiculaire
du marquage neuronal (flèche
courbe) et la forte densité de
coloration du dépôt amyloïde
(flèche). Echelle = 50 μ m.



des protéoglycannes pour l'APP ne serait pas lié au peptide A4 et cela n'affecterait en rien le métabolisme des deux protéines. Par contre, un défaut de glycosylation, suite à un problème de compartimentalisation subcellulaire, une dérégulation d'enzymes de glycosylation ou encore un épissage alternatif modifiant la conformation de l'APP de type L-APP (König et al., 1992), pourrait permettre l'interaction entre le peptide A4 et les protéoglycannes. Le métabolisme des deux protéines serait modifié et une co-déposition dans les dépôts amyloïdes pourrait alors s'expliquer. De même, Masters et Beyreuther (1992) ont mis en évidence que le site d'affinité de l'APP pour l'héparine est situé au niveau de la région R4. Leurs expériences ont été réalisées en présence de Zn^{2+} qui se lie également à l'APP et modifie son organisation spatiale. En absence de Zn^{2+} , nous avons déterminé que le site d'affinité pour les héparane sulfate protéoglycannes et le glycosaminoglycane héparane sulfate est la région 1-28 du peptide A4. Nous pouvons donc suggérer qu'une modification du contenu en Zn^{2+} dans la cellule peut modifier les interactions entre peptide APP et protéoglycannes. Ceci est raisonnable d'autant plus qu'une pathologie liée au zinc dans la maladie d'Alzheimer a déjà été suggérée (Constantinidis, 1991).

Les facteurs modifiant l'affinité entre le peptide A4 et les protéoglycannes sont fondamentaux. Ainsi, les mutations récemment observées dans certains patients atteints de maladie d'Alzheimer familiale (Goate et al., 1991; Chartier-Harlin et al., 1991) pourraient changer cette affinité et conduire à la cascade d'événements qui mène aux dépôts amyloïdes et à la dégénérescence neurofibrillaire. D'autres éléments comme les cytokines tels que l'interleukine-1 et l'interleukine-6, et les facteurs de croissance (NGF) modifient la sulfatation des chaînes des glycosaminoglycannes (Ding, Buée et Fillit, observations non publiées). Lors

de la réaction inflammatoire observée dans la maladie d'Alzheimer (Rogers et al., 1988), il y a une augmentation du taux de certaines cytokines tel que le TNF- α (Fillit et al., 1991) qui pourraient également perturber l'affinité entre le peptide A4 et les chaînes glycosaminoglycanniques, par une modification de leur sulfatation.

CONCLUSION

CONCLUSION

Dans le cadre d'un travail mené dans l'unité INSERM U156 et en collaboration avec le département de Gériatrie et le centre de Neurobiologie du Mount Sinai Medical Center (CUNY), New York, nous avons étudié le rôle des protéoglycannes dans l'amyloïdose au cours de la maladie d'Alzheimer. Nous avons pu mettre en évidence la présence d'un **héparane sulfate protéoglycannique dans les dépôts amyloïdes** par un marquage immunohistochimique avec un anticorps monoclonal préparé à partir de protéoglycannes vasculaires. Nos résultats concordent avec ceux actuellement trouvés dans la littérature décrivant, dans les dépôts amyloïdes, la présence de protéoglycannes vasculaires (Snow et al., 1988b) et d'autres constituants de la membrane basale des vaisseaux (Howard et Pilkington, 1990; Perlmutter et al., 1991). L'origine vasculaire des dépôts amyloïdes a été suggéré par de nombreux auteurs (Hassler, 1965; Ravens, 1978; Miyakawa et al., 1982; Hardy et al., 1986; Scheibel et al., 1986; Behrouz, 1990; Selkoe, 1991) mais il a été également montré que les relations entre les microvaisseaux et les dépôts amyloïdes sont plutôt dues au hasard qu'à un phénomène causal (Kawai et al., 1990). Nous avons donc analysé l'angioarchitecture et les caractéristiques de la microvascularisation chez des témoins (jeune et âgés), chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, du syndrome de Down mais également d'autres maladies neurodégénératives tels que la maladie de Pick, la démence pugilistique ou le syndrome de Guam. Notre étude a porté non seulement sur l'organisation spatiale des dépôts amyloïdes par rapport à la vascularisation mais aussi sur la distribution des anomalies vasculaires détectées grâce à l'anticorps monoclonal.

Nous avons pu démontrer la diversité de ces anomalies vasculaires, tels que l'atrophie, l'enchevêtrement en spirale, la formation en boucle et la tortuosité de certains microvaisseaux et leur distribution laminaire et régionale particulière. De plus, suite à l'atrophie cérébrale, nous avons pu montrer une compression laminaire qui résulte en une perte de l'angioarchitecture de certaines régions.

La forme et la localisation des dépôts amyloïdes marqués avec l'anticorps monoclonal dirigé contre l'héparane sulfate protéoglycane nous ont indiqué que le dépôt de cette molécule au sein de ces structures est un phénomène précoce mais qui n'est pas lié à la vascularisation, avec l'exception des dépôts liés à l'angiopathie amyloïde dont l'origine est probablement vasculaire. Un marquage neuronal était parfois également observé laissant suggérer une autre origine cellulaire. Etant donné l'absence de relation des dépôts amyloïdes avec les microvaisseaux, dans la majorité des cas, l'anticorps 7E12 devait marquer également des protéoglycannes non vasculaires. Nous avons pu détecter avec cet anticorps, un héparane sulfate protéoglycane sécrété par les cellules SKNSH SY 5Y de neuroblastome, apparenté à celui purifié des glomérules de rein, mais de masse moléculaire différente. L'immunoréactivité obtenue par l'anticorps 7E12 suggère la présence de ce protéoglycane dans les dépôts amyloïdes. Finalement, nous avons pu mettre en évidence une affinité spécifique entre le peptide A4 et à la fois la partie glycosaminoglycannique et protéique de l'héparane sulfate protéoglycane vasculaire. Ce type d'affinité a pu être observé également dans le cas de protéoglycannes sécrétés par des neuroblastomes humains. Ces derniers sont constitués d'un mélange d'héparane sulfate protéoglycane (reconnu par l'anticorps monoclonal dirigé contre l'héparane sulfate protéoglycane vasculaire) et de dermatane sulfate protéoglycane tous deux possédant une forte affinité pour le peptide A4.

La présence d'un dermatane sulfate protéoglycane a été récemment décrite dans les dépôts amyloïdes et les lésions neurofibrillaires (Snow et al., 1992). **C'est la première démonstration directe de l'affinité des protéoglycannes pour le peptide A4.** L'hypothèse d'un rôle fondamental des protéoglycannes dans l'amyloïdogénèse (Snow et Wight, 1989; Kisilevsky, 1990; Kisilevsky et al., 1992) nous semble donc particulièrement séduisante.

L'affinité des protéoglycannes pour le peptide A4 existe en absence de toute pathologie. Il y aurait donc au cours de la maladie d'Alzheimer une compartimentalisation qui séparerait les deux constituants ou encore une augmentation de leur affinité. Chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer familiale, la mutation pourrait modifier les interactions entre l'APP et les protéoglycannes et ainsi expliquer leur co-déposition dans les dépôts amyloïdes. Chez les cas sporadiques, d'autres phénomènes doivent intervenir. Nous avons déjà montré un changement dans la structure des glycosaminoglycannes ce qui pourrait modifier leur affinité pour le peptide A4, et d'autres hypothèses, qui ont été décrites au cours de ce travail existent. Les récentes données de la littérature et nos résultats nous ont conduit à l'hypothèse suivante:

Les mutations de l'APP ou les modifications des protéoglycannes et des constituants des membranes basales, au niveau des groupements sulfate ou des chaînes glycosaminoglycanniques conduirait à la formation d'un complexe stable indissociable, par exemple de type protéine amyloïde-glycosaminoglycane. Ce dernier "précipiterait" dans la matrice extracellulaire et formerait un berceau ou "nidus" où s'accumuleraient ces constituants modifiés. Une fois le "nidus" formé, **les molécules des membranes basales pourraient s'y agréger.** Cela expliquerait la présence de protéines tels que le collagène IV, la fibronectine, la laminine, la thrombospondine. Ceux-ci possèdent naturellement une affinité pour

l'APP et les glycosaminoglycannes (Sage et Bornstein, 1991; Kisilevsky et al., 1992, Small et al., 1992) et les modifications nécessaires pour former le complexe qui a conduit à la création du "nidus" ne seraient plus indispensables pour leur accumulation.

L'APP non modifié pourrait lui aussi s'accumuler au sein du "nidus" du fait de son affinité pour les protéoglycannes et autres constituants (Klier et al., 1990; Narindrasorasak et al., 1991; Kisilevsky et al., 1992; Small et al., 1992). De ce fait, les protéoglycannes et l'APP pourraient apparaître sous l'aspect de dépôts pré-amyloïdes ou diffus qui sont considérés comme les premiers à se former (Ikeda et al., 1989, 1990). Nous avons pu montrer qu'ils sont détectés par l'anticorps 7E12, la présence d'héparane sulfate protéoglycanne au sein des dépôts amyloïdes est donc un phénomène précoce et conciliable avec cette hypothèse. **L'APP serait ensuite dégradé et seul le peptide A4 sera protégé de la protéolyse du fait de son affinité pour les protéoglycannes.** Il y aurait alors formation des fibrilles amyloïdes composées du peptide A4 et des protéoglycannes. Un ensemble de constituants possédant alors une affinité pour les protéoglycannes, les *heparin-binding proteins* tels que l' α_1 -antichymotrypsine, les apolipoprotéines, les protéines du complément, et la thrombospondine se retrouverait emprisonné dans ces dépôts. Une partie du peptide A4 se lierait à des protéoglycannes ou d'autres molécules qui seraient réinternalisés au sein des neurones. L'apparition de ces dépôts diffus toucherait tout d'abord une partie du néocortex. Puis, ils s'étendraient à l'ensemble du cortex. Ils s'élargiraient et finiraient par infiltrer une grande partie de la matrice extracellulaire conduisant inéluctablement à la mort neuronale, vers la démence.

PERSPECTIVES

Quels sont les perspectives de recherche après ce travail de thèse?

Au niveau de la recherche fondamentale, nous nous apercevons que la structure et la fonction des protéoglycannes sont très mal connues dans le système nerveux central. Par l'élaboration de sondes immunologiques monoclonales dirigées contre ces protéoglycannes, il nous sera possible de caractériser les protéoglycannes présents dans le système nerveux central. En parallèle, et en complément à cette approche, la biologie moléculaire sera également d'un grand apport. Notre collaboration avec le laboratoire du Dr. H. Fillit devrait nous permettre d'aborder ces deux aspects. Il existe des domaines communs à tous les protéoglycannes riches en Ser-Gly. Une sonde dirigée contre cette région permettra l'identification de l'ensemble des protéoglycannes exprimés dans le système nerveux central. Récemment, une cartographie peptidique par l'anticorps 7E12 a permis d'isoler un peptide de l'axe protéique de l'héparane sulfate protéoglycanne isolé de glomérules de rein (Fillit, Boyle, Eisler, communication personnelle). Ce peptide sera séquencé. Des sondes oligonucléotidiques correspondant à la séquence en acides aminés seront synthétisées et serviront à cribler des banques d'ADN complémentaires du système nerveux central et de cellules de neuroblastome, glioblastome et astrocytome. Finalement, les anticorps monoclonaux pourront servir à cribler des banques d'expression. Ainsi, il sera possible de déterminer les différentes catégories de protéoglycannes du système nerveux central, et d'étudier les éléments régulateurs au niveau de leurs gènes. En effet, il nous semble indispensable de déterminer les facteurs qui influencent le métabolisme des protéoglycannes tels que les facteurs de croissance (EGF, FGF, NGF) et les cytokines (TNF- α , IL-1, IL-6). Ces facteurs modifient non seulement l'expression mais aussi la structure glycosaminoglycannique et son degré de sulfatation.

Par ailleurs, nous pourrions trouver la région de l'axe protéique impliquée dans l'interaction avec le peptide A4 en utilisant les protéines recombinantes entières ou partielles des différents clones obtenus. L'affinité des protéoglycannes pour le peptide A4 pourra être étudiée en fonction de des facteurs de régulation mises en évidence. Cela permettra de mieux cerner les agents importants dans ce phénomène.

Pour la recherche clinique, la purification des protéoglycannes chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer sera poursuivie. De plus, une large variété de cas pré-cliniques, tel que celui décrit récemment par Hof et al., 1992 permettra de suivre les modifications des protéoglycannes au cours de la maladie et non plus en stade final.

De plus, l'identification de la sous-population de neurones pyramidaux sensibles à la dégénérescence neurofibrillaire et donc peut-être à la neurotoxicité du peptide A4, doit être faite pour mieux disséquer les différentes étapes conduisant à la dégénérescence neurofibrillaire. Leur identification pourrait être réalisée par différents marquages immunohistochimiques (SMI-32, anti-thrombospondine, etc...) sur des cultures primaires. Il serait alors possible de réaliser des études de neurotoxicité sur ce modèle in vitro qui permettrait de mieux comprendre pourquoi certains neurones expriment ou accumulent l'héparane sulfate protéoglycannique reconnu par l'anticorps 7E12.

Finalement, ces informations seront exploitées pour rechercher un ou des marqueurs ante-mortem de la maladie d'Alzheimer qui pourraient se trouver dans les liquides périphériques. Par exemple, une modification dans la structure des protéoglycannes pourrait conduire à la formation d'autoanticorps. Des résultats préliminaires ont déjà été publiés par le laboratoire du Dr. Fillit à New York sur la présence d'anticorps anti-protéoglycannes vasculaires dans la maladie d'Alzheimer (Fillit et al., 1987; Fillit, 1990). Une recherche des produits de dégradation des protéoglycannes dans le liquide céphalo-rachidien de patients avec un diagnostic de "maladie d'Alzheimer probable" devrait être également envisagée et couplée aux résultats des taux de cytokines (TNF- α ; IL-1; IL-6) (Fillit et al., 1991).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1 Matériel autopsique

1.1 Cerveaux de bœuf

Ils proviennent d'un proche abattoir, et ont été retirés de l'animal environ une heure après l'abattage pour être placés dans la glace. Ils sont ensuite conservés dans un congélateur à -80°C jusqu'à utilisation.

1.2 Cerveaux humains

L'origine du matériel autopsique est diverse. Les cerveaux de témoins ont été obtenus de l'ADRC (Alzheimer's Disease Research Center) du Mount Sinai Hospital, New York, NY, Département de Psychiatrie, Faculté de Médecine, Université of Genève (IUPG), Suisse, et du CHR de Lille, France. Les patients atteints de maladie d'Alzheimer répondent tous aux critères du NINCDS-ADRDA (McKhann et al., 1984). Ils ont été obtenus des mêmes centres que les témoins, ainsi que de l'Institute of Biogerontology Research, Sun City, AZ. Les cas de syndrome de Down et de maladie de Pick proviennent du Mount Sinai Hospital et du Département de Psychiatrie de Genève, les cas de démence pugilistique et du syndrome de l'île de Guam, du Mount Sinai Hospital, et du Guam Memorial Hospital, Agana, Guam.

Les autopsies sont réalisées quelques heures après la mort. Le matériel est soit fixé pour un travail histologique, soit congelé à -80°C dans l'optique d'une étude biochimique.

2 Analyse Histologique

2.1 Histologie

2.1.1 Coupes en congélation

Dans les cas des patients atteints de maladie d'Alzheimer, du syndrome de l'île de Guam et de témoins, le matériel est fixé par immersion dans un tampon phosphate pH 7,4 contenant 4% de paraformaldéhyde pendant 12 heures. Les régions à étudier sont ensuite disséquées et post-fixées de 48 à 72 heures (Hof et al., 1990). Les régions disséquées* sont le cortex temporal inférieur (aire 20), le cortex frontal supérieur (aire 9), le cortex visuel (aires 17 et 18) et l'hippocampe. Dans les autres cas (syndrome de Down, maladie de Pick et démence pugilistique), le matériel était fixé et conservé dans 10% de formol.

Tous les échantillons, quel que soit le mode de fixation, ont été rincés dans une série de solutions de sucrose de concentration croissante (12%, 16% et 18%), puis congelés et finalement sectionnés à 40 µm avec un cryostat.

(*) La numérotation des régions disséquées correspond à la classification de Brodman (voir Annexe II).

2.1.2 Coupes en paraffine

Pour les patients atteints de la maladie d'Alzheimer et les témoins obtenus en France, le matériel autopsique a été fixé dans le liquide de Carnoy (éthanol/chloroforme/acide acétique: 6/3/1) ou dans le formol. Les blocs disséqués sont ensuite inclus en paraffine et coupés à 6 µm.

2.2 Histochimie

2.2.1 Bleu Alcian

Les coupes sont colorées par une solution de bleu Alcian à 1% (P/V) dans l'HCl pH 1. Après séchage, les coupes sont déshydratées dans l'alcool absolu puis le toluène. Elles sont ensuite montées dans l'Eukitt (Behrouz, 1990).

Les coupes peuvent être également colorées par la méthode de Scott. Il s'agit d'utiliser des concentrations croissantes de chlorure de magnésium qui permettent une coloration sélective des glycosaminoglycannes (Alvarado et Castejon, 1984; Scott, 1985). En effet, le groupement sulfate est parmi les charges négatives celui qui possède en présence d'ion magnésium, la plus forte affinité pour le bleu Alcian. Les coupes sont incubées pendant une nuit dans une solution à 0,05% de bleu Alcian dans l'acétate de sodium 50 mM pH 5,7, avec des concentrations en chlorure de magnésium de 0,05 M à 1,2 M. Tous les glycosaminoglycannes sont colorés à faible concentration de MgCl₂, mais seuls les plus fortement sulfatés restent colorés à forte concentration de MgCl₂.

2.2.2 Thioflavine S

en solution aqueuse

Une solution aqueuse fraîche de thioflavine S à 1% (P/V) est mise en contact avec les coupes à colorer pendant 8 min. Après un rinçage rapide dans l'éthanol à 80% (V/V), les coupes sont montées à l'eau glycinée. Cette coloration peut suivre une réaction immunohistochimique.

en solution tamponnée alcoolique à 40%

Pour utiliser cette méthode, les coupes sont montées sur des lames pré-traitées à la poly-L-lysine. Ces coupes subissent ensuite une oxydation avec 0,25% (P/V) de permanganate de potassium dans du PBS

pendant 20 min. Après un rinçage, les coupes sont ensuite traitées par une solution de PBS contenant 1% (P/V) de métabisulfite de sodium et 1% (P/V) d'acide oxalique jusqu'à ce qu'elles perdent leur coloration violacée (environ 2 à 3 min.). Une série de rinçages successifs est alors réalisée; les coupes sont finalement colorées par une solution PBS de thioflavine S à 0,0125% (P/V) contenant 40% (V/V) d'éthanol. Après rinçage, les coupes sont montées à l'eau glycinée (Vallet et al., 1992).

2.2.3 Coloration de Nissl

Les coupes sont préalablement délipidées, et ensuite colorées pendant 20 min. dans une solution d'acétate de Crésyl violet: 0,02% (P/V) de Crésyl violet dans un mélange (trois volumes 0,2 M d'acide acétique et deux volumes 0,2 M d'acétate de sodium). Après déshydratation et différenciation dans l'éthanol à 95%, les coupes sont ensuite montées au xylène ou un dérivé. Cette coloration peut suivre une réaction immunohistochimique.

2.3 Immunohistochimie

2.3.1 Caractérisation des anticorps

PHF

L'anticorps dirigé contre les PHF a été réalisé à partir d'une préparation de PHF (Persuy et al., 1985) selon la technique de Selkoe et al., 1982. Il reconnaît les neurones en dégénérescence neurofibrillaire en microscopie optique et les PHF en microscopie électronique. Par la technique des immuno-empreintes, il marque uniquement les protéines tau normales (Delacourte et Défossez, 1986; Parent et al., 1988) et pathologiques (Delacourte et al., 1990; Flament, 1990).

Tau

En utilisant leur caractère thermostable, les protéines tau humaines ont pu être partiellement purifiées. Après électrophorèse préparative, la préparation obtenue a été injectée à un lapin. L'immunsérum reconnaît les neurones en dégénérescence neurofibrillaire en immunohistochimie (Delacourte et Défossez, 1986; Défossez et al., 1988) et les protéines tau normales et pathologiques par la technique des immuno-empreintes (Delacourte et Défossez, 1986; Parent et al., 1988; Flament, 1990).

Amyloid A4 1-10

Le peptide Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr a été synthétisé par le Dr. P. Hublau en Pharmacie à Lille. Il a été fixé à l'anatoxine tétanique par le glutaraldéhyde 25%. Le conjugué peptide-protéine est injecté à un lapin. L'immunsérum obtenu marque les dépôts amyloïdes (plaques séniles et angiopathie) en immunohistochimie (Behrouz, 1990).

Amyloid A4 1-28

Le peptide Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Ser-Lys a été synthétisé par la société Néosystem à Strasbourg. Il a été couplé à l'ovalbumine et injecté à un lapin. Il marque les dépôts amyloïdes (plaques séniles et angiopathie) en immunohistochimie.

Héparane sulfate protéoglycane

L'héparane sulfate protéoglycane vasculaire a été purifié à partir de glomérule de rein de bœuf (voir paragraphe 5.8.1.). Il a servi d'immunogène pour faire des anticorps monoclonaux. Ces derniers dont le 7E12 ont été caractérisés par Kemeny et al., 1988. L'anticorps 7E12 reconnaît spécifiquement un héparane sulfate protéoglycane vasculaire, il ne

montre aucune réaction croisée avec la laminine, la fibronectine et le procollagène de type IV. En immunohistochimie, il marque la membrane basale des vaisseaux et les plaques séniles (Perlmutter et al., 1990; Fillit et al., 1991).

Thrombospondine

L'immunsérum dirigé contre la thrombospondine a été obtenu en injectant chez un lapin de la thrombospondine purifiée à partir de plaquettes humaines. Il a déjà été très bien caractérisé (Sherwood et al., 1989). L'anticorps monoclonal A6.1 qui reconnaît un épitope dépendant du calcium dans la partie 70 kDa de la thrombospondine (Dixit et al., 1986) nous a été gracieusement fourni par le Dr. William Frazier, Washington University, St Louis. Il a été purifié par chromatographie d'affinité sur protéine A.

2.3.2 Techniques

Élimination de la peroxydase endogène

Les coupes sont pré-incubées dans un mélange trois volumes de méthanol/un volume d'eau oxygénée à 3% pendant 15 min. Elles sont ensuite rincées avant l'incubation avec les anticorps.

Kit avidine-biotine/DAB

Les coupes sont incubées à 4°C pendant 12 à 48 heures avec le premier anticorps. Après l'incubation, les lames sont rincées et incubées selon la procédure classique des kits avidine-biotine (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Le deuxième anticorps est biotinylé, il est mis en contact avec les lames pendant une heure à température ambiante. Finalement, après rinçage, un mélange avidine DH-peroxydase biotinylée, est incubée avec les coupes. L'activité peroxydasique est révélée par l'eau oxygénée et la diaminobenzidine ou le 4-chloronaphtol.

Intensification à l'osmium

Les sections colorées à la diaminobenzidine sont délipidées, puis réhydratées et intensifiées par des bains successifs dans des solutions d'acide osmique à 0,005%, puis de thiocarbohydrazine à 0,5%, et finalement d'acide osmique à 0,005% pendant respectivement 8, 10 et 4 min. (Willingham et Rutherford, 1984; Hof et al., 1990).

2.4 Techniques d'analyse d'images

2.4.1 Axiophot couplé à l'analyseur

L'analyse d'images est réalisé sur un microscope Zeiss Axiophot couplé à un ordinateur MicroVax II. Les images sont exportées du microscope vers l'ordinateur via un scanner haute résolution Megavision pour coupes observées en lumière blanche et via un scanner TV haute résolution Dage MTI SIT666 pour les coupes observées en fluorescence. Les images sont ensuite formatées (512 bytes, 640 pixels x 480 pixels) sur un Macintosh Iix avec le logiciel Photoshop 2.0™. Les images ainsi formattées sont ensuite sauvées en format TIFF.

2.4.2 Utilisation du scanner et du programme Image 1.43

Les photomontages ont été digitalisés sur Macintosh Iix avec un scanner ScanJet IIC (Hewlet Packard), avec une résolution de 72 points par pouce et sauvés en format TIFF avec une échelle à 256 niveaux de gris. Les images obtenues soit à partir des photomontages, soit à partir de l'analyseur d'images sont ensuite analysées grâce à un programme élaboré par W. Rasband (National Institute of Health, USA).

3 Cultures cellulaires

3.1 Les lignées cellulaires

3.1.1 Phéochromocytomes de rat PC12

Les cellules dérivent d'un phéochromocytome de rat. Elles ont la particularité de présenter un phénotype de cellules nerveuses en réponse au NGF. Elles synthétisent et sont capables d'accumuler les catécholamines, la dopamine et la noradrénaline (Greene et Tischler, 1976). Les PC12 sont des cellules qui adhèrent pauvrement au plastique des flacons de culture et poussent en paquets.

3.1.2 Neuroblastomes humains SKNSH SY 5Y

Les cellules SKNSH SY 5Y (Perez-Polo et al. 1982) dérivent d'un clone de cellules de neuroblastome SKNSH (Biedler et al., 1973). Le sous-clone SY5Y se différencie sous l'action de nombreux constituants tels que le NGF et l'acide rétinoïque alors que les cellules mères ne sont pas sensibles à l'action du NGF. Actuellement, ces cellules tumorales sont utilisées dans de nombreuses études *in vitro*.

3.2 Cultures avec du sérum de veau fœtal

Les cellules sont généralementensemencées dans un milieu Dulbecco's modified Eagle's medium ou RPMI 1640 supplémenté en L-glutamine et contenant 10% de sérum de veau fœtal. Des antibiotiques sont également ajoutés tels que la streptomycine (50 µg/ml) et la pénicilline (50 U/ml).

3.3 Cultures en milieu défini

Il est courant de vouloir étudier l'effet de certains composés tels que des facteurs de croissance ou des facteurs de régulation neuronale, sur des cellules en culture. La présence de sérum de veau fœtal dans le milieu pose alors un problème. En effet, ce dernier a une composition biochimique propre à chaque animal. Il contient des facteurs de croissance ou autres

constituants qui peuvent modifier les effets biologiques observés. Il est donc important d'utiliser un milieu défini. Ce dernier a la composition suivante: mélange à 50% de milieu nutritif Hamm's F12 et à 50% de milieu Dulbecco's modified Eagle's medium additionné de 5 µg d'insuline par ml, 100 µg de transferrine par ml, 20 nM de progestérone, 100 µM de putrescine et 30 nM de sélénite de sodium.

3.4 Cultures en présence de NGF

La plupart des cultures en présence de NGF ont été faites en milieu défini. La seule différence est la présence de β-NGF à une concentration de 50 ng/ml.

4 Techniques biochimiques

4.1 Chromatographies

4.1.1 d'échange d'anions

DEAE Sépharose CL-6B

Il s'agit d'un gel d'agarose polymérisé par le 2,3-dibromopropanol auquel un groupement diéthylaminoéthyle a été couplé par une liaison éther sur les unités monosaccharidiques. Le gel est insoluble dans tous les solvants et possède une haute stabilité en présence de tampons et de solvants organiques dans des échelles de pH allant de 3 à 10 (y compris avec des agents de dissociation, par exemple 7 M urée et des détergents non-ioniques tels que le Triton X-100 et le CHAPS. Il est couramment utilisé pour la purification des protéoglycannes par chromatographie d'échange d'anions.

Mono Q (FPLC, LKB Pharmacia)

Mono Q est un gel constitué de microbilles d'environ 10 µm faites d'une résine hydrophilique. Ce gel est un puissant échangeur d'anions grâce à ses groupements d'amines quaternaires qui est utilisé en

Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC). Il est stable pour les tampons classiquement utilisés en chromatographie classique (pH 2-12) et solutions alcooliques (C₁-C₄) mais supporte mal les agents d'oxydation, l'acide formique, 100% de diméthylsulfoxyde ou diméthylformamide. Sa limite de résistance à la pression est de 10 MPa pour la colonne utilisée HR 5/5.

4.1.2 de tamisage moléculaire (gel filtration)

Elle a été réalisée sur le même type de matrice que celle de la chromatographie d'échange d'anions: un gel d'agarose polymérisé par le 2,3-dibromopropanol auquel un groupement diéthylaminoéthyle.

Sépharose CL-4B

Le gel est formé de billes de 60 à 140 µm de diamètre. La limite de fractionnement s'échelonne de 60 à 20000 kDa pour les peptides et protéines globulaires et de 30 à 5000 kDa pour les polysaccharides. Les protéoglycannes ont une séparation intermédiaire.

Sépharose CL-6B

Le gel est formé de billes de 45 à 165 µm de diamètre. La limite de fractionnement s'échelonne de 10 à 4000 kDa pour les peptides et protéines globulaires et de 10 à 1000 kDa pour les polysaccharides.

4.1.3 d'affinité

Héparane sulfate

Les groupements carboxyliques de l'héparane sulfate ont été couplés aux fonctions amines d'une colonne AH sépharose (LKB Pharmacia) par le 1 - éthyl - 3 - (3 - diméthylaminopropyl) - carbodiimide (EDAC) selon un protocole modifié de Tengblad (1979) qui couplait de l'acide hyaluronique. Une colonne de 1 ml a été préparée avec 5 mg HS. L'efficacité du couplage a été vérifiée par deux méthodes: comparaison des teneurs en acide uronique des billes non couplées à l'HS contre les billes couplées à l'HS. De plus, un colorant cationique (bleu Alcian) a confirmé la

présence d'héparane sulfate sur la colonne. Le colorant n'a pu être élué de la colonne qu'avec des concentrations en $MgCl_2$ supérieures à 3,5 M.

Peptide A4, couplage EDAC

Le peptide A4 (1-28) est celui qui a servi d'immunogène pour faire l'immunsérum anti-A4 (1-28). 2.5 ml AH Sépharose 4B (LKB Pharmacia, Uppsala, Sweden) sont lavés à pH 4 avec 2 N NaCl, puis avec de l'eau distillée. 5,2 mg de peptide A4 (1-28) sont mélangés avec 40 mg EDAC (Sigma, St Louis, MO) dans l'eau distillée pH 4. Le mélange est ensuite incubé pendant une nuit avec le gel. Le gel est ensuite lavé par de l'eau distillée pH 4, suivi par de l'acide acétique (l'équivalent de 10 volumes de la colonne) afin de bloquer les groupements qui n'auraient pas réagi. La colonne est ensuite lavée à l'eau distillée pH 4 et finalement équilibrée dans le PBS avec 0.5% Tween 20 (PBST). La présence du peptide A4 sur la colonne a été confirmée par la fixation d'un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la même région du peptide A4 (1-28). La spécificité de cet anticorps a été déterminée par ELISA ainsi qu'en microscopie optique et électronique.

Peptide R4

Le peptide R4 correspond à une séquence extracellulaire de l'APP (acides aminés 365-386 of APP₇₅₁): DENEHAHFQKAKERLEAKHRER. Il a une séquence homologue à l'héparine binding-site de N-CAM (Cole and Akeson, 1989). Il a été couplé à un gel sépharose CL-6B (LKB Pharmacia).

Peptide R5

Le peptide R5 correspond également à une séquence extracellulaire de l'APP (acides aminés 476-441) (Refolo et al., 1989) couplée à une epoxy-activated Sépharose CL-6B.

4.2 Le dot-blot

L'appareil de dot-blot utilisé est le système de microfiltration Bio-Dot de chez Biorad, Richmond CA, USA. La membrane (Nitrocellulose, Immobilon-P, Zetabind, etc...) réhydratée par le tampon PBS est installée dans l'appareil. Les échantillons de 50 à 500 µl sont déposés dans chaque puits et s'adsorbent sur la membrane par diffusion passive sous l'effet de la gravité. Un rinçage par le tampon PBS est réalisé selon les mêmes principes afin de récupérer sur les parois des puits le restant de l'échantillon. Ensuite, un lavage sous vide est réalisé avec un excès de tampon et finalement, la membrane est récupérée pour être mise en contact avec une solution de saturation. La coloration ou l'incubation avec l'anticorps peuvent être ensuite réalisées.

4.3 Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS

Les échantillons sont solubilisés dans la solution de Laemmli (1970): SDS 5% (P/V), Tris 50 mM, EDTA 4mM, EGTA 3mM, glycérol 10%, bleu de bromophénol en présence ou non de réducteur: dithiothreitol 0,25% (P/V).

Les électrophorèses sont réalisées sur des gels de polyacrylamide 7,5% ou 10% en présence de SDS (0,1%).

4.4 Immunoblotting ou technique des immuno-empreintes

Après électrophorèse, les protéines sont transférées sur des membranes Immobilon-P (0.45 µm de Millipore) pendant 45 min (courant: 0.8 mA par cm²) en milieu semi-liquide sur un LKB Multiphor II Nova Blot selon les instructions du fabricant (tampon "anode" (Tris 0,3 M pH 10,4; méthanol 20% (V/V)) et tampon "cathode" (acide 6-amino-n-hexanoïque 40 mM pH 7,6; méthanol 20% (V/V)). La technique des immuno-empreintes (immunoblotting) est réalisée selon une modification de la méthode de Towbin. La saturation est réalisée par du PBS contenant 0.5 % (V/V) Tween 20 ou 5% (P/V) de lait délipidé.

4.5 Dosages colorimétriques

4.5.1 Des protéines

La méthode utilisée est le dosage à l'acide bichoninique (Smith et al., 1985). Il s'agit d'une variante de la réaction du Biuret. Les protéines réagissent avec les ions cuivriques pour former des ions cuivreux. Ces derniers se complexent avec l'acide bichoninique. L'ensemble a une forte absorbance à 562 nm. Cette technique permet donc une quantification des protéines en solution aqueuse. Les protéines peuvent être solubilisées dans des solutions avec détergents (jusqu'à 1% CHAPS) ou de force ionique importante (jusqu'à 1 N NaCl).

La limite de détection de la méthode est de l'ordre de 50 µg/ml dans les meilleures conditions.

4.5.2 L'acide uronique

L'acide uronique est dosé selon la méthode de Bitter et Muir, 1962. Les échantillons à doser subissent une hydrolyse acide par l'acide sulfurique. Les acides uroniques libérés en présence de borate forment avec le carbazole un chromophore de couleur rose. L'absorbance de la solution est lue à 530 nm et comparée à une courbe d'étalonnage établie à partir d'une solution-mère de glucuronolactone dans le PBS. La limite de détection est de l'ordre de 10 µg/ml dans les meilleures conditions.

4.5.3 Les groupements sulfates

Par la méthode de rhodizonate/barium

Le dosage colorimétrique des ions sulfates est réalisé avec le rhodizonate de sodium. Ce dernier, en présence d'ions Ba²⁺, donne une couleur rose/orangée qui peut être quantifiée par spectrophotométrie à 520 nm. Cette coloration diminue proportionnellement en fonction de la quantité d'ions sulfate présents dans la solution (Terho et Hartiala, 1971).

Une série de dilutions de 4 à 24 µg de sulfate (Na_2SO_4 ou H_2SO_4) par ml d'eau est réalisée. Les glycosaminoglycannes sont hydrolysés dans une solution de HCl (0,5-1 N) à 100°C pendant 1 à 2 heures. Après évaporation, le matériel résiduel est quantifié pour sa teneur en sulfate. Etant donné la présence de sulfate inorganique dans les préparations de glycosaminoglycanne, un témoin non hydrolysé est nécessaire.

Deux ml d'éthanol absolu sont mélangés à 0,5 ml d'échantillon ou de standard. Un ml du tampon de chlorure de barium (2 M acide acétique (5V), 0,005 M BaCl_2 (1V) et 0,02 M NaHCO_3 (4V)) et 1,5 ml de la solution de 5% (P/V) de rhodizonate de sodium dans 80% (V/V) d'éthanol contenant 0,1% (P/V) d'acide ascorbique sont ajoutés. Après mélange, les tubes sont laissés à l'obscurité pour 10 min. La couleur est ensuite mesurée par spectrophotométrie à 520 nm.

Par le bleu Alcian

Cinquante µl d'échantillon ou de standard sont déposés en dot-blot sur membrane Zetabind. Après passage à travers la membrane, cette dernière est placée dans une solution de bleu Alcian. Après 10 min, elle est rincée à l'eau. L'intensité de chaque spot est quantifiée par densitométrie.

5 Purification

5.1 des protéoglycannes

5.1.1 du rein de bœuf

Les glomérules sont isolés par une méthode de tamisage (Misra, 1972) à partir de rein de bœuf. La suspension est ensuite centrifugée à 2000 g pendant 10 min. Le culot est repris par 100 volumes d'eau distillée contenant des inhibiteurs de protéases (0,1 M acide 6-aminohexanoïque, 0,01 M EDTA, et 0,005 M benzamidine-HCl). L'ensemble est laissé sous agitation pendant trois heures à 4°C, puis centrifugé à 17700 g pendant 10

min. Le culot est resuspendu dans 10 volumes du premier culot avec un tampon acétate de sodium 50 mM pH 5,8 contenant du chlorure de guanidine 4 M, et les inhibiteurs de protéases décrits précédemment. La solution est mise sous agitation pendant 48 heures, elle est ensuite centrifugée à 17700 g. Le surnageant S1 est conservé et le culot est repris comme précédemment. Cette deuxième solution est sous agitation pendant 18 heures, elle est également centrifugée à 17700 g. Le surnageant est ajouté à S1 et l'ensemble est dialysé contre un tampon Tris-HCl 50 mM pH 6,5 contenant de l'urée 7 M désionisé et de l'EDTA 0,05 M. Après filtration, le dialysat est déposé sur échange d'anions (DEAE sépharose CL-6B (80 ml volume total Vt)) équilibré dans le tampon Tris-urée. L'élution est réalisée en faisant passer cinq volumes Vt de tampon Tris-urée, cinq Vt Tris-urée, NaCl 0,3 M, cinq Vt Tris-urée, NaCl 0,6 M, cinq Vt Tris-urée, NaCl 1,2 M, et cinq Vt Tris-urée, NaCl 2 M. La fraction NaCl 0,6 M, après ultrafiltration sous azote sur membrane PM 30 d'un appareil Amicon, est déposée sur gel filtration sépharose CL-4B ou sépharose CL-6B. Trois pics d'élution sont obtenus, seuls les deux premiers contiennent des protéoglycannes. Le dernier ne contient pas d'acide uronique et n'est pas mis en évidence par la méthode de dot-blot au bleu Alcian.

5.1.2 du cerveau de bœuf

Des extraits de cortex sont homogénéisés dans 10 volumes d'eau distillée contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (acide 6-amino hexanoïque, 0.01 M EDTA, 0.001 M benzamidine, 0.01 M N-éthyl maléimide et 0.001 M PMSF). L'homogénat est mélangé une nuit à 4°C. Il est ensuite incubé pendant 2 heures à température ambiante avec une solution de 40 unités Kunitz de DNase I type IV de pancréas de bœuf (Sigma, MO) en présence de 20 mM MgCl₂. Le mélange est ensuite centrifugé à 1000g

pendant 20 min. Le culot (C1) est délipidé par 20 volumes de chloroforme-méthanol (2:1, V/V) (Singh et Bachhawat, 1968). Après filtration sur Whatman 3, le résidu protéique délipidé est repris dans un minimum d'eau distillée contenant les inhibiteurs de protéases, et dialysé contre un tampon acétate de sodium 50 mM pH 6,4 de concentration croissante en urée (urée 0, 2, 4 et 7M). Pour extraire les protéoglycannes, le résidu dialysé est repris dans dix volumes C1 d'un tampon acétate de sodium 50 mM pH 6,4, urée 7 M et 0,5% (concentration finale P/V) de CHAPS. Après centrifugation à 35000 tours/min pendant 45 min., le surnageant est déposé sur DEAE-Sépharose CL-6B (Pharmacia, Piscataway, NJ). Après un gradient d'éluion de chlorure de sodium, les fractions bleu Alcian positives sont déposées en chromatographie de gel filtration Sépharose CL-6B.

5.1.3 de neuroblastomes humains

Les cellules SKNSH-SY 5Y ($2,3 \cdot 10^7$ cellules) sont cultivées dans un milieu défini qui consiste d'un mélange 1:1 de nutriment Hamm's F12 et de Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco) avec 5 µg/ml d'insuline, 100 µg/ml de transferrine, 20 nM de progestérone, 100 µM de putrescine et 30 nM de sélénite de sodium (Sigma, St Louis, MO). Elles sont mises en présence pendant 36 heures, soit 50 µCi/ml de sodium $^{35}\text{SO}_4$ qui permet un marquage des glycosaminoglycannes, soit de sodium $^{35}\text{SO}_4$ et de [^3H]-Glycine tous deux à une concentration de 50 µCi/ml qui permettent à la fois le marquage des glycosaminoglycanne et de l'axe protéique.

Après 36 heures, le milieu de culture est dialysé contre un tampon urée (Urée 7 M, acétate de Na 50 mM pH 6.4, NaCl 150 mM, N-éthyl-maléimide 5 mM, PMSF 1 mM, Na_2SO_4 5 mM et 0.05% CHAPS). La dernière dialyse se fait sans Na_2SO_4 . Le milieu équilibré est ensuite déposé sur chromatographie d'échange d'anions DEAE Sépharose CL-6B. Après lavage

de la colonne par le tampon urée, un gradient linéaire de chlorure de sodium est réalisé de 0,15 N à 2 N NaCl. Les fractions $^{35}\text{SO}_4$ -positives contenant les protéoglycannes sont regroupées, concentrées et déposées sur chromatographie de tamisage moléculaire Sépharose CL-6B (55 × 0.95 cm) équilibrée dans le même tampon urée à pH 5,8. Pour le matériel non radiomarké, les quantités de milieu de culture étaient beaucoup plus importantes (environ 2 litres). Dans ce cas, les protéoglycannes étaient détectées par coloration au bleu Alcian ou par marquage avec l'anticorps 7E12.

5.2 Purification du précurseur amyloïde

Le précurseur amyloïde a été purifié à partir d'un milieu de culture défini de PC12 en présence de NGF (Anderson et al., 1991). Les concentrations en APP atteignent un maximum après trois jours de culture et restent stables pendant environ une semaine. Le milieu est dialysé et déposé sur une colonne de dextran sulfate-sépharose. Un gradient linéaire de NaCl est appliqué, les fractions APP-positives en dot-blot sont groupées, dialysées et déposées sur une colonne d'échange d'anions (Mono Q) en FPLC (LKB Pharmacia). Un gradient linéaire de NaCl est réalisé, une fraction enrichie en APP est alors obtenue. Elle sera utilisée dans les études d'affinité avec les GAG/PG.

6 Caractérisation des protéoglycannes

6.1 Par sensibilité au glycosaminoglycanases

6.1.1 Héparitinase

Les digestions par l'héparitinase III (Sigma, St Louis, MO) ont été réalisées dans un tampon 100 mM Tris-HCl pH 7.2, 5 mM Ca acétate et 1 mM PMSF à 37°C pendant 7 heures.

6.1.2 Chondroïtinase ABC

Les digestions par la chondroïtinase ABC ont été réalisées dans un tampon Tris-HCl 100 mM pH 8, 10 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 mM N-éthyl-maléimide et 0.3 mM pepstatine à 27°C pendant 50 min.

6.2 Préparation de l'axe protéique

6.2.1 par digestion enzymatique

La digestion protéique des protéoglycannes par la papaine a été réalisée dans un tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 6,8, cystéine 0,01 M, et EDTA 0,01 M à 64°C pendant 18 heures avec un taux de protéoglycane-papaine de 100 pour 1.

6.2.2 par digestion chimique (TFMS)

Les protéoglycannes sont déglycosylés par l'acide trifluorométhanesulfonique dans l'anisole (2:1, V/V) pour un rapport 1 mg dans 200 µl.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abraham CR, Selkoe DJ, Potter H (1988) Immunochemical identification of the serine protease inhibitor, alpha-1-antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Cell*, 52: 487-501.
- Albelda SM, Buck CA (1990) Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J*, 4: 2868-2880.
- Alvarado MV, Castejon HV (1984) Histochemical demonstration of cytoplasmic glycosaminoglycans in the macroneurons of the human central nervous system. *J Neurosci Res*, 11: 13-26.
- Alzheimer A (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Z Psychiat* 64: 146-148.
- Amaducci LA, Rocca WA, Schoenberg BS (1986) Origin of the distinction between Alzheimer's disease and senile dementia: how history can clarify nosology. *Neurology*, 36: 1497-1499.
- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. IIIrd edition revised (DSM III R). Washington DC, 1987, 567 pages.
- Anderson JP, Esch FS, Keim PS, Sambamurti K, Leiberburg I, Robakis NK (1991) Exact cleavage site of Alzheimer amyloid precursor in neuronal PC-12 cells. *Neurosci Lett*, 128: 126-128.
- Anderton BH, Breinburg HD, Downes MJ, Green PJ, Tomlinson BE, Ulrich J, Wood JN, Kahn J (1982) Monoclonal antibodies show that neurofibrillary tangles and neurofilaments share antigenic determinants. *Nature* 298: 84.
- Araujo DM, Cotman CW (1992) Beta-amyloid stimulates glial cells in vitro to produce growth factors that accumulate in senile plaques in Alzheimer's disease. *Brain Res*, 569: 141-145.
- Ard MD, Bunge RP (1988) Heparan sulfate proteoglycan and laminin immunoreactivity on cultured astrocytes: relationship to differentiation and neurite outgrowth. *J Neurosci*, 8: 2844-2858.
- Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, Van Hoesen GW (1991) The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cerebral Cortex*, 1: 103-116.
- Asch AS, Leung LL, Shapiro J, Nachman RL (1986) Human brain glial cells synthesize thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83: 2904-2908.
- Autilio-Gambetti L, Morandi A, Tabaton M, Schaetzle B, Kovacs D, Perry G, Green B (1988) The Amyloid Precursor Protein of Alzheimer Disease is Expressed as a 130-Kda Polypeptide in Various Cultured Cell Types. *FEBS Lett*, 241: 94-98.

- Bakir AA, Hryhorczuk DO, Berman E, Dunes G (1986) Acute fatal hyperaluminemic encephalopathy in undialyzed and recently dialyzed uremic patients. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*, 32: 171-176.
- Bancher C, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Fried VA, Smith HT, Wisniewski HM (1991) Abnormal Phosphorylation of Tau-Precedes Ubiquitination in Neurofibrillary Pathology of Alzheimer Disease *Brain Research* 539: 11-18.
- Barbas H (1986) Pattern in the laminar origin of corticocortical connections. *J Comp Neurol*, 252: 415-422.
- Barrow CJ, Zagorski MG (1991) Solution structures of β peptide and its constituent fragments: relation to amyloid deposition. *Science*, 253: 179-182.
- Bartold PM, Page RC (1985) A microdetermination method for assaying glycosaminoglycans and proteoglycans. *Anal Biochem*, 150: 320-324.
- Baudier J, Cole RD (1987) Phosphorylation of tau proteins to a state like that in Alzheimer's brain is catalyzed by a Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase and modulated by phospholipids. *J Biol Chem*, 262: 17577-17583.
- Behrouz N (1990) La substance amyloïde dans la maladie d'Alzheimer: étude histochimique et immunohistochimique à l'échelle optique et électronique. Thèse de troisième cycle (nouveau régime) de l'Université du Droit et de la Santé de Lille.
- Bell MA, Ball MJ (1981) Morphometric comparison of hippocampal microvasculature in ageing and demented people: diameters and densities. *Acta Neuropathol*, 53: 299-318.
- Bell MA, Ball MJ (1990) Neuritic plaques and vessels of visual cortex in aging and Alzheimer's dementia. *Neurobiol Aging*, 11: 359-370.
- Benson DF, Davis RJ, Snyder BD (1988) Posterior cortical atrophy. *Arch Neurol*, 45: 789-793.
- Benson RL (1975) Assay for 2-amino-2-deoxy-D-glucose in the presence of other primary amines. *Carbohydr Res*, 42: 192-196.
- Berkenbosch F, Refolo LM, Friedrich VL, Casper D, Blum M, Robakis NK (1990) The Alzheimer's amyloid protein precursor is produced by type-I astrocytes in primary cultures of rat neuroglia. *J Neurosci Res*, 25: 431-440.
- Bernstein HG, Kirschke H, Wiederanders B, Khudoerkov RM, Hinz W, Rinne A (1992) Lysosomal proteinases as putative diagnostic tools in human neuropathology: Alzheimer's disease (AD) and schizophrenia. *Acta Histochem, Suppl Band XLII*: S. 19-24.
- Berthier ML, Leiguarda R, Starkstein SE, Sevlever G, Taratuto AL (1991) Alzheimer's disease in a patient with posterior cortical atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 54: 1110-1111.

- Biedler JL, Helson L, Spengler BA (1973) Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res*, 33: 2643-2652.
- Biernat J, Mandelkow EM, Schröter C, Lichtenberg-Kraag B, Steiner B, Berling B, Meyer H, Mercken M, Vandermeeren A, Goedert M, Mandelkow E (1992) The switch of tau protein to an Alzheimer-like state includes the phosphorylation of two serine-proline motifs upstream of the microtubule binding region. *EMBO J*, 11: 1593-1597.
- Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI (1985) The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol*, 101: 1371-1378.
- Bitter T, Muir H (1962) A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal Biochem*, 4: 330-334.
- Blessed G, Tomlinson BE, Roth M (1968) The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Brit J Psychiat*, 114: 797-811.
- Blume AJ, Vitek MP (1989) Focusing on IL-1 promotion of β -amyloid precursor protein synthesis as an early event in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 10: 406-408.
- Bornstein P, Devarayalu S, Li P, Distèche CM, Framson P (1991) A second thrombospondin gene in the mouse is similar in organization to thrombospondin 1 but does not respond to serum. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 8636-8640.
- Braak H, Braak E (1990) Alzheimer's disease: striatal amyloid deposits and neurofibrillary changes. *J Neuropathol Exp Neurol*, 49: 215-224.
- Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, 82: 239-259.
- Brandt J, Andersson LO, Porath J (1975) Covalent attachment of proteins to polysaccharide carriers by means of benzoquinone. *Biochim Biophys Acta*, 386: 196-202.
- Breen KC, Bruce M, Anderton BH (1991) Beta amyloid precursor protein mediates neuronal cell-cell and cell-surface adhesion. *J Neurosci Res*, 28: 90-100.
- Brion JP, Passareiro H, Nunez J, Flament-Durand J (1985) Immunological determinants of tau proteins are present in NFT of AD. *Arch Biol (Brux)* 95: 229-235.
- Brion JP, Hanger DP, Couck AM, Anderton BH (1991) A68 proteins in Alzheimer's disease are composed of several tau isoforms in a phosphorylated state which affects their electrophoretic mobilities. *Biochem J*, 279: 831-836.
- Brion S, Plas J (1991) La maladie de Pick. In Signoret JL, Hauw JJ (eds), *Maladie d'Alzheimer et autres démences*. Flammarion, Paris. pp. 237-242.
- Burg M, Cole GJ (1990) Characterization of cell-associated proteoglycans synthesized by embryonic neural retinal cells. *Arch Biochem Biophys*, 276: 396-404.

- Bush AI, Moir RD, Multhaup G, Williamson TG, Rumble B, Small DH, Beyreuther K, Masters CL (1992) Specific and saturable binding of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease by Zinc (II). *Neurobiol Aging*, 13: S84.
- Buxbaum JD, Gandy SE, Cicchetti P, Ehrlich ME, Czernik AJ, Fracasso RP, Ramabhadran TV, Unterbeck AJ, Greengard P (1990) Processing of Alzheimer β /A4 amyloid precursor protein: modulation by agents that regulate protein phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci*, 87: 6003-6006.
- Cambray-Deakin MA (1991) Cytoskeleton of the growing axon. In Burgoyne RD (eds), *The neuronal cytoskeleton*. Wiley-Liss, New York, pp. 233-255.
- Campbell SK, Switzer RC, Martin TL (1987) Alzheimer's plaques and tangles: a controlled and enhanced silver staining method. *Soc Neurosci Abstr*, 13: 678.
- Caparaso GL, Gandy SE, Buxbaum JD, Ramabhadran TV, Greengard P (1992) Protein phosphorylation regulates secretion of Alzheimer β /A4 amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci*, 89: 3055-3059.
- Caputo CB, Sobel IRE, Scott CW, Brunner WF, Barth PT, Blovers DP (1992) Association of the carboxy-terminus of β -amyloid protein precursor with Alzheimer paired helical filaments. *Biochem Biophys Res Commun*, 185: 1034-1040.
- Cardin AD, Weintraub HJR (1989) Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis* 9: 21-32.
- Cataldo AM, Paskevich PA, Kominami E, Nixon RA (1991) Lysosomal hydrolases of different classes are abnormally distributed in brains of patients with Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 10998-11002.
- Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H et al. (1991) Early onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the β -amyloid precursor protein gene. *Nature*, 353: 844-846.
- Chen M, Yankner B (1991) An antibody to β amyloid precursor protein inhibits cell-substratum adhesion in many mammalian cell types. *Neurosci Lett*, 125: 223-226.
- Chui HC, Lee Teng E, Henderson VW, Moy AC (1985) Clinical subtypes of dementia of the Alzheimer type. *Neurology*, 35: 1544-1550.
- Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW (1977a) Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol*, 116: 207-225.
- Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW (1977b) Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J Mol Biol*, 116: 227-247.
- Cole GJ, Akeson R (1989) Identification of a heparin binding domain of the neural cell adhesion molecule N-CAM using synthetic peptides. *Neuron*, 2: 1157-1165.

- Cole GM, Masliah E, Shelton ER, Chan HW, Terry RD, Saitoh T (1991) Accumulation of amyloid precursor fragment in Alzheimer plaques. *Neurobiol Aging*, 12: 85-91.
- Constantinidis J (1991) Hypothesis regarding regarding Amyloid and zinc deficiency in the pathogenesis of Alzheimer's disease: potential for preventive intervention. *Alzheimer's Disease and Related Disorders*, 5: 31-35.
- Constantinidis J, Richard J (1985) Alzheimer's disease. In Vinken PJ, Bruyn JW, Klawans HK (eds). *Handbook of clinical neurology*, Elsevier, Amsterdam. Vol 46: pp. 247-282.
- Corsellis JAN (1978) Posttraumatic dementia. In Katzman R, Terry RD, Bick KL (eds). *Aging, Alzheimer's disease: senile dementia and related disorders*. Raven Press, New York. Vol 7: pp. 125-133.
- Crystal HA, Horoupian DS, Katzman R, Jotkowitz S (1982) Biopsy proved Alzheimer disease presenting as a right parietal lobe syndrome. *Ann Neurol*, 12: 186-188.
- Culp LA, Mugnai G, Lewandowska K, Vallen EA, Kosir MA, Houmiel KL (1989) Heparan sulfate proteoglycans of Ras-transformed 3T3 or neuroblastoma cells. Different functions in adhesion on fibronectin. *Annu NY Acad Sci*, 556: 194-216.
- Curwen KD, Smith SC (1977) Quantitative microanalysis of aortic glycosaminoglycans. *Anal Biochem*, 79: 291-301.
- Dammerman M, Yen SH, Shafitzagardo B (1989) Sequence of a human MAP-2 region sharing epitopes with Alzheimer neurofibrillary tangles. *J Neurosci Res*, 24: 487-495.
- Damon DH, D'Amore PA, Wagner JA (1988) Sulfated glycosaminoglycans modify growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *J Cell Physiol*, 135: 293-300.
- Défossez A, Beauvillain JC, 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.
- Delacourte A, Défossez A (1986) Alzheimer's disease : Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major antigenic components of paired helical filaments. *J. Neurol. Sci.* 76 : 173-186.
- Delacourte A, Défossez A, Persuy P, Peers MC (1987) Observation of morphological relationships between angiopathic blood vessels and degenerative neurites in Alzheimer's disease. *Virchows Archiv A*, 411: 199-204.
- Delacourte A, Flament S, Défossez A, Buée L, Hémon B, Parent M, Furby A, Leys D, Goudemand M, Destée A, Petit H (1989) Tau 64 and Tau 69: Two early biochemical markers of neurofibrillary degeneration in "Biological Markers of Alzheimer's

- disease." Eds: Boller F, Katzmann R, Rascol A, Signoret JL, Christen Y. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 39-55
- Delacourte A, Flament S, Dibe EM, Hublau P, Sablonnière B, Hémon B, Scherrer V, Défossez A (1990) 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.
- Delaère P, Duyckaerts C, He Y, Piette F, Hauw JJ (1991) Subtypes and differential laminar distributions of β A4 deposits in Alzheimer's disease: Relationship with the intellectual status of 26 cases. *Acta Neuropathol*, 81: 328-335.
- Derouesné C (1991) Etude clinique. In: Signoret JL, Hauw JJ (eds) *Maladie d'Alzheimer et autres démences*. Flammarion Paris, pp. 93-115.
- De Sauvage F, Octave JN (1989) A novel mRNA of the A4 amyloid precursor gene coding for a possibly secreted protein. *Science* 245: 651-653.
- Dixit VM, Galvin NJ, O'Rourke KM, Frazier WA (1986) Monoclonal antibodies that recognize calcium-dependent structures of human thrombospondin. *J Biol Chem*, 261: 1962-1968.
- Dow KE, Mirski SEL, Riopelle RJ (1988) Neuronal proteoglycans: biosynthesis and functional interaction with neurons in vitro. *J Neurosci*, 8: 3278-3289.
- Dow KE, Riopelle RJ, Kisilevsky R (1991) Domains of neuronal heparan sulphate proteoglycans involved in neurite growth on laminin. *Cell Tissue Res*, 265: 345-351.
- Drewes G, Lichtenberg-Kraag B, Döring F, Mandelkow EM, Biernat J, Goris J, Dorée M, Mandelkow E (1992) Mitogen activated kinase (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *EMBO J*, 11: 2131-2138.
- Drubin DG, Kirshner MW (1986) Tau protein function in living cells. *J Cell Biol*, 103: 2739-2746.
- Duvernoy HM, Delon S, Vannson JL. Cortical blood vessels of the human brain. *Brain Res Bull* 1981;7:519-79
- Duvernoy HM. The human hippocampus. New York: Springer Verlag, 1988
- Dyrks T, Weidemann A, Multhaup G, Salbaum JM, Lemaire HG, Kang J, Müller-Hill B, Masters CL, Beyreuther K (1988) Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. *EMBO J*, 7: 949-957.
- Edge ASB, Faltynek CR, Hof L, Reichert LE, Weber P (1981) Deglycosylation of glycoproteins by trifluoromethanesulfonic acid. *Anal Biochem*, 118: 131-137.
- Eikelenboom P, Stam FC (1984) Immunoglobulins and complement factors in senile plaques: an immunoperoxidase study. *Acta Neuropathol*, 57: 239-242.

- Eisler J, Buée L, Ding W, Kisilevsky R, Narindrasorasak S, Fillit H (1992) Three different heparan sulfate proteoglycan protein cores are present in the amyloid plaques of Alzheimer's disease. *Soc Neurosci Abstr*, 18: xxx.
- Elshourbagy NA, Liao WS, Mahley RW, Taylor JM (1985) Apolipoprotein E m RNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proc Natl Acad Sci*, 82: 203-207.
- Erneux C, Passareiro H, Nunez J (1984) Interaction between calmodulin and microtubule-associated proteins prepared at different stages of brain development. *FEBS Lett*, 172: 315-320.
- Estus S, Golde TE, Kunishita T, Blades D, Lowery D, Eisen M, Usiak M, Qu X, Tabira T, Greenberg BD, Younkin SG (1992) Potentially amyloidogenic, carboxy-terminal derivatives of the amyloid protein precursor. *Science*, 255: 726-728.
- Evans DA, Funkenstein H, Albert MA, et al (1989) Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. *JAMA* 262: 2551-2556.
- Farrar G, Altmann P, Welch S, et al. Defective gallium-transferrin binding in Alzheimer disease and Down syndrome: possible mechanism for accumulation of aluminium in brain. *Lancet* 1990;335:747-50.
- Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ (1986) Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta*, 883: 173-177.
- Fauconnet M, Rochemont J (1978) A single amino acid analysis method which resolves hexosamines and several cysteine derivatives. *Anal Biochem*, 91: 403-409.
- Ferreira A, Caceres A (1989) The expression of acetylated microtubules during axonal and dendritic growth in cerebellar macroneurons which develop in vitro. *Dev Brain Res*, 49: 205-213.
- Ferreira A, Busciglio J, Caceres A (1989) Microtubule formation and neurite growth in cerebellar macroneurons which develop in vitro: evidence for the involvement of the microtubule -associated proteins, MAP-1a, HMW-MAP2 and tau. *Dev Brain Res*, 49: 215-228.
- Fillit H, Damle SP, Gregory JD, Volin C, Poon-King T, Zabriskie J (1985) Sera from patients with poststreptococcal glomerulonephritis contain antibodies to glomerular heparan sulfate proteoglycan. *J Exp Med*, 161: 277-289.
- Fillit HM, Kemeny E, Luine V, Weksler ME, Zabriskie JB (1987) Antivascular antibodies in the sera of patients with senile dementia of the Alzheimer type. *J Gerontol*, 42, 180-184.

- Fillit H, Foley P, Bradford HF, et al. (1988) Autoimmunity to cholinergic-specific antigens of the brain in senile dementia of the Alzheimer's type. *Drug Dev Res*, 15: 143-151
- Fillit H (1990) Immune mechanisms of microvascular and neuronal injury in dementia. In Hasegawa K, Homma A, (eds). *Psychogeriatrics: Biomedical and Social Advances*. Amsterdam: Excerpta Medica, 76-79.
- Fillit HM, Ding W, Buée L, Kalman J, Altstiel L, Lawlor B, Wolf-Klein G (1991) Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 129: 318-320.
- Fischer VW, Siddiqui A, Yusufaly Y (1990) Altered angioarchitecture in selected areas of brains with Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 79: 672-679.
- Flament S (1990) Mise en évidence de protéines tau anormales au cours de la dégénérescence neurofibrillaire de type Alzheimer. Thèse de troisième cycle (nouveau régime) de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois.
- Flament S, Delacourte A, Hémon B, Défossez A (1989a) Direct biochemical evidence for an abnormal phosphorylation of tau proteins during Alzheimer's disease. *C R Acad Sci Paris Série III*, 308: 77-82.
- Flament S, Delacourte A, Hémon B, Défossez A (1989b) Characterization of two pathological Tau protein variants in Alzheimer brain cortices. *J. Neurol. Sci.* 92 : 133-141.
- Flament S, Delacourte A (1989c) Abnormal tau species are produced during Alzheimer's disease neurodegenerating process. *FEBS Lett*, 247: 213-216.
- Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR (1975) "Mini mental test". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiat Res*, 2: 189-198.
- Frazier WA (1991) Thrombospondins. *Current Opinion in Cell Biol*, 3: 792-799.
- Friedrich N, Kekule A (1859) Zür Amyloidfrage. *Virch Arch Pathol Anat Physiol*, 16: 50-65.
- Frohman EM, Frohman TC, Gupta S, de Fougères A, van den Noort S (1991) Expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*, 106: 105-111.
- Funkenstein HH (1988) Cerebrovascular disorders. In: Albert MS, Moss MB (eds). *Geriatric Neuropsychology*. New York: The Guilford Press, 179-207.
- Gadjusek DC, Beyreuther K, Brown P, et al. (1991) Regulation and genetic control of brain amyloid. *Brain Res Rev*, 16: 83-114.
- Gallo V, Bertolotto A (1990) Extracellular matrix of cultured glial cells: selective expression of chondroitin 4 sulfate by type-2 astrocytes and their progenitors. *Exp Cell Res*, 187: 211-223.

- Gallyas F (1971) Silver staining of Alzheimer's neurofibrillary changes by mean of physical development. *Acta Morphol Acad Sci Hung*, 19: 1-8.
- Gandy S, Greengard P (1992) Amyloidogenesis in Alzheimer's disease: some possible therapeutic opportunities. *TIPS*, 13: 108-113.
- Garruto RM (1991) Pacific paradigms of environmentally-induced neurological disorders: clinical, epidemiological and molecular perspectives. *Neurotoxicology*, 12: 347-378.
- Ghiso J, Rostagno A, Frangione B (1991) Alzheimer's amyloid precursor protein contains a tetrapeptide that promotes cell adhesion. *Soc Neurosci Abstr*, 17: 913.
- Giaccone G, Tagliavini F, Linoli G, Bouras C, Frigero B, Bugiani O (1989) Down patients: extracellular preamyloid deposits precede neuritic degeneration and senile plaques. *Neurosci Lett*, 97: 232-238.
- Glenner GG, Wong CW (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebro-vascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 120: 885-890.
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M et al. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 349: 704-706.
- Godfroid E, Octave JN (1990) Glycosylation of the amyloid peptide precursor containing the Kunitz protein inhibitor domain improves the inhibition of trypsin. *Biochem Biophys Res Comm*, 171: 1015-1021.
- Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA (1992) Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron*, 8: 159-168.
- Goedert M, Jakes R (1990) Expression of separate isoforms of human tau protein. Correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerisation. *EMBO J*, 9: 4225-4230.
- Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J, Crowther RA (1989) 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. *EMBO J*, 8: 393-399.
- Golaz J, Bouras C, Hof PR (1992) Motor cortex involvement in presenile dementia: report of a case. *J Geriatr Psychiatr Neurol*
- Golde TE, Estus S, Usiak M, et al (1990) Expression of extracellular amino terminal portion β -amyloid protein precursor mRNAs: recognition of a novel alternatively spliced form and quantitation in Alzheimer's disease. *Neuron* 4: 253-267.

- Goldgaber D, Harris HW, Hla T, Maciag T, Donnelly RJ, Jacobsen JS, Vitek MP, Gadjusek CD (1989) Interleukin 1 regulates synthesis of amyloid β -protein precursor mRNA in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci*, 86: 7606-7610.
- Goldgaber D, Lerman MI, McBride OW, Saffiotti U, Gadjusek DC (1987) Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* 235: 877-880.
- Good DJ, Polverini P, Rastinejad F, Le Beau MM, Lemons RS, Frazier WA, Bouck NP (1990) A tumor suppressor dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 6624-6628.
- Gowda DC, Goosen B, Margolis RK, Margolis RU (1989) Chondroitin sulfate and heparan sulfate proteoglycans of PC12 pheochromocytoma cells. *J Biol Chem*, 264: 11436-11443.
- Gowda DC, Margolis RK, Frangione B, Ghiso J, Larrando-Lillo M, Margolis RU (1989) Relation of the amyloid beta protein precursor to heparan sulfate. *Science*, 244: 826-828.
- Greenberg SG, Davies PA (1990) Preparation of Alzheimer Paired Helical Filaments That Displays Distinct Tau-Proteins by Polyacrylamide Gel Electrophoresis *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5827-5831
- Green J, Morris JC, Sandson J, McKeel DW Jr, Miller JW (1990) Progressive aphasia: a precursor of global dementia? *Neurology*, 40: 423-429.
- Greene LA, Tischler AS (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to NGF. *Proc Natl Acad Sci USA*, 73: 2424-2428.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83: 4913-4917
- Guiroy DC, Yanagihara R, Gadjusek DC (1991) Localization of amyloidogenic proteins and sulfated glycosaminoglycans in nontransmissible and transmissible cerebral amyloidosis. *Acta Neuropathol*, 82: 87-92.
- Guntern R, Bouras C, Hof PR, Vallet PG (1992) An improved thioflavine S method for neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease. *Experientia*, 48: 8-10.
- Gustafson L (1985) Differential diagnosis with special reference to treatable dementia and pseudo-dementia conditions. *Dan Med Bull*, 32 (Suppl. 1): 55-60.
- Haass C, Koo EK, Mellon A, Hung AY, Selkoe DJ (1992) Targeting of cell-surface β -amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature*, 357: 500-503.

- Hachinski VC, Iliff LD, Zilhka E, Du Boulay GH, McAllister VL, Marshall J, Russell RWR, Symon L (1975) Cerebral blood flow in dementia. *Arch Neurol*, 32: 632-637.
- Hagestedt T, Lichtenberg B, Wille H, Mandelkow EM, Mandelkow E (1989) Tau protein becomes long and stiff upon phosphorylation: correlation between paracrystalline structure and degree of phosphorylation. *J Cell Biol*, 109: 1643-1651.
- Hamilton M (1967) Development of a rating scale for primary depressive illness. *Br J Soc Clin Psychol*, 6: 278-296).
- Hanger DP, Brion JP, Gallo JM, Cairns NJ, Luthert PJ, Anderton BH (1991) Tau in Alzheimer's disease and Down's syndrome is insoluble and abnormally phosphorylated. *Biochem J*; 275: 99-104.
- Hardy JA, Higgins GA (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256: 184-185.
- Hardy JA, Allsop D (1991) Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol*, 12: 383-388.
- Hardy JA, Mann DMA, Wester P, Winblad B (1986) An integrative hypothesis concerning the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 7: 489-502.
- Hasegawa M, Arai T, Ihara Y (1990) Immunochemical evidence that fragments of phosphorylated maps (MAPLB) are bound to neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neuron*, 4: 909-918.
- Haskell BE, Stach RW, Werrbach-Perez K, Perez-Polo JR (1987) Effect of retinoic acid on nerve growth factor receptors. *Cell Tissue Res*, 247: 67-73.
- Hassell JR, Kimura JH, Hascall VC (1986) Proteoglycan core protein families. *Ann Rev Biochem*, 55: 539-567.
- Hassler O (1965) Vascular changes in senile brains. *Acta Neuropathol*, 5: 40-53.
- Heimer R, Sampson PM (1987) Detecting proteoglycans immobilized on positively charged nylon. *Anal Biochem*, 162: 330-336.
- Heimer R, Molinaro Jr L, Sampson PM (1987) Detection by ¹²⁵I-cationized cytochrome c of proteoglycans and glycosaminoglycans immobilized on unmodified and on positively charged nylon 66. *Anal Biochem*, 165: 448-455.
- Herndon ME, Lander AD (1990) A diverse set of developmentally regulated proteoglycans is expressed in the rat central nervous system. *Neuron*, 4: 949-961.
- Heyman A, Wilkinson WE, Hurwitz BJ, Helms MJ, Haynes CS, Utley CM, Gwyther LP (1987) Early-onset Alzheimer's disease; clinical predictors of institutionalization and death. *Neurology*, 37: 980-984.
- Hof PR, Bouras C, Constantinidis J, Morrison JH (1989) Balint's syndrome in Alzheimer's disease: specific disruption of the occipito-parietal visual pathway. *Brain Res*, 493: 368-375.

- Hof PR, Morrison JH (1990) Quantitative analysis of a vulnerable subset of pyramidal neurons in Alzheimer's disease: II. Primary and secondary visual cortex. *J Comp Neurol*, 301: 55-64.
- Hof PR, Bouras C, Constantinidis J, Morrison JH (1990a) Selective disconnection of specific visual association pathways in cases of Alzheimer's disease presenting with Balint's syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol*, 49: 168-184.
- Hof PR, Cox K, Morrison JH (1990b) Quantitative analysis of a vulnerable subset of pyramidal neurons in Alzheimer's disease: I. Superior frontal and inferior temporal cortex. *J Comp Neurol*, 301: 44-54.
- Hof PR, Bouras C (1991) Object recognition deficit in Alzheimer's disease: possible disconnection of the occipito-temporal component of the visual system. *Neurosci Lett*, 122: 53-56.
- Hof PR, Knabe R, Bovier P, Bouras C (1991a) Neuropathological observations in a case of autism presenting with self-injury behavior. *Acta Neuropathol*, 82: 321-326.
- Hof PR, Perl DP, Loerzel AJ, Morrison JH (1991b) Neurofibrillary tangle distribution in the cerebral cortex of parkinsonism-dementia cases from Guam: differences with Alzheimer's disease. *Brain Res*, 564: 306-313.
- Hof PR, Bouras C, Buée L, Delacourte A, Perl DP, Morrison JH (1992) Differential distribution of neurofibrillary tangles in the cerebral cortex of dementia pugilistica and Alzheimer's disease cases. *Acta Neuropath (sous presse)*.
- Hof PR, Bierer LM, Perl DP, Bouras C, Delacourte A, Buée L, Morrison JH (1992) Evidence for early vulnerability of the medial and inferior temporal lobe in a 82-year-old patient with possible preclinical signs of dementia: regional and laminar distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques. *Arch Neurol (sous presse)*.
- Hoffman K, Finn FM, Friesen HJ, Diaconescu C, Zahn H (1977) Biotinylinsulins as potential tools for receptor studies. *Proc Natl Acad Sci*, 74: 2697-2700.
- Howard J, Pilkington GJ (1990) Antibodies to fibronectin bind to plaques and other structures in Alzheimer's disease and control brain. *Neurosci Lett*, 118: 71-76.
- Hronowski LJ, Anastassiades TP (1988) Detection and quantitation of proteoglycans extracted from cell culture medium and cultured cartilage slices. *Anal Biochem*, 174: 501-511.
- Hsu D, Hoffman P, Mashburn Jr TA (1972). Toluidine blue. *Anal Biochem*, 46: 156-163.
- Hyman BT, VanHoesen GW, Kromer LJ, Damasio AR (1986) Perforant pathway changes in the memory impairment of Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 20: 472-481
- Ihara Y, Nukina N, Miura R, Ogawara M (1986) Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J Biochem (Jp)*, 99: 1807-1810.

- Ikeda SI, Allsop D, Glenner GG (1989) Morphology and distribution of plaque and related deposits in the brains of Alzheimer's disease and control cases. *Lab Invest*, 60: 113-122.
- Ikeda SI, Yanagisawa N, Allsop D, Glenner GG (1990) Early senile plaques in Alzheimer's disease demonstrated by histochemistry, immunocytochemistry and electron microscopy. *Hum Pathol*, 21: 1221-1226.
- Iqbal K, Smith AJ, Zaidi T, Grundke-Iqbal, I (1989) Microtubule-associated protein tau: Identification of a novel peptide from bovine brain. *FEBS Lett*, 248: 87-91.
- Ishiguro K, Omori A, Sato K, Tomizawa K, Imahori K, Uchida T (1991) A serine/threonine proline kinase activity is included in the tau protein kinase fraction forming a paired helical filament epitope. *Neurosci Lett*, 128: 195-198.
- Ishii T, Haga S (1984) Immuno-electron-microscopic localization of complements in amyloid fibrils of plaques. *Acta Neuropathol*, 36: 296-300.
- Jackson RL, Busch SJ, Cardin AD (1991) Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol Rev*, 71: 481-538.
- Jacobsen JS, Muenkel HA, Blume AJ and Vitek MP (1991) A novel species-specific RNA related to alternatively spliced amyloid precursor protein mRNAs. *Neurobiol Aging* 12: 575-583.
- Jagust WJ, Budinger TF, Reed BR (1987) The diagnosis of dementia with single photon emission tomography. *Arch Neurol*, 44: 258-262.
- Jagust WJ, Davies P, Tiller-Borcich JK, Reed BR (1990) Focal Alzheimer's disease. *Neurology*, 40: 14-19.
- Joachim C, Games D, Morris J, Ward P, Frenkel D, Selkoe D (1991) Antibodies to non-beta regions of the beta-amyloid precursor protein detect a subset of senile plaques. *Am J Pathol*, 138: 373-384.
- Kalaria RN, Galloway PG, Perry G (1991) Widespread serum amyloid P immunoreactivity in cortical amyloid deposits and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease and other degenerative disorders. *J Neuropath Appl Neurobiol*, 17: 189-201.
- 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 JM, Masters CL, Grzeschik K-H, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325: 733-736.
- Kato M, Koike Y, Suzuki S, Kimata K (1988) Basement membrane proteoglycan in various tissues: characterization using monoclonal antibodies to the Engelbreth-

- Holm-Swarm mouse tumor low density heparan sulfate proteoglycan. *J Cell Biol*, 106: 2203-2210.
- Kawai M, Kalaria RN, Harik SI, Perry G (1990) The relationship of amyloid plaques to cerebral capillaries in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 137: 1435-1446.
- Kemeny E, Fillit HM, Damle SD, Mahabir R, Kefalides NA, Gregory JD, Antonovych T, Sabnis S, Zabriskie JB (1988) Monoclonal antibodies to heparan sulfate proteoglycan: development and application to the study of normal tissue and pathologic human kidney biopsies. *Connect Tissue Res*, 18: 9-25.
- Kidd M (1963) Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature*, 197: 192-193.
- Kisilevsky R (1987) From arthritis to Alzheimer's disease: current concepts on the pathogenesis of amyloidosis. *Can J Physiol Pharmacol*, 65: 1805-1815.
- Kisilevsky R (1990) Heparan sulfate proteoglycans in amyloidogenesis: an epiphenomenon, a unique factor, or the tip of a more fundamental process? *Lab Invest* 63: 589-591.
- Kisilevsky R, Lyon AW, Young ID (1992a) A critical analysis of postulated pathogenetic mechanisms in amyloidogenesis. *Crit Rev Lab Serv*, sous presse.
- Kisilevsky R, Narindrasorasak S, Altman RA, Fairbanks MB, Gonzalez-DeWhitt P, Greenberg B (1992b) Characterization of fibronectin binding to Alzheimer's beta amyloid protein precursors. *Neurobiol Aging*, 13: S81.
- Kitaguchi N, Takahashi Y, Tokushima Y, Shiojiri S, Hirataka I (1988) Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature* 331: 530-532.
- Kjellen LJ, Lindahl U (1991) Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem*, 60: 443-475.
- Klier FG, Cole G, Stallcup W, Schubert, D (1990) Amyloid β -protein precursor is associated with extracellular matrix. *Brain Res*, 515: 336-342.
- Knesevich JW, Toro FR, Morris JC, Labarge E (1985) Aphasia, family history and the longitudinal course of senile dementia of the Alzheimer type. *Psychiatry Res*, 14: 255-263.
- Koh JV, Yang LL, Cotman CW (1990) Beta-amyloid increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage. *Brain Res*, 533: 315-320.
- König G, Masters CL, Beyreuther K (1990) Retinoic acid induced differentiated neuroblastoma cells show increased expression of the β A4 amyloid gene of Alzheimer's disease and an altered splicing pattern, *FEBS Lett.*, 269: 305-310.
- König G, Mönning U, Czech C, Prior R, Banati R, Schreiter-Gasser U, Bauer J, Masters CL, Beyreuther K (1992) Identification and differential expression of a novel

- alternative splice isoform of the β A4 amyloid precursor protein (APP) mRNA in leukocytes and brain microglial cells. *J Biol Chem*, 267: 10804-10809.
- Kosik KS, Duffy LK, Dowling MM, Abraham C, McCluskey A, Selkoe DJ (1984) Microtubule-associated protein 2: monoclonal antibodies demonstrate the selective incorporation of certain epitopes into Alzheimer neurofibrillary tangles. *Proc Natl Acad Sci*, 81: 7941-7945.
- Kosik KS, Nukina N, Ihara Y, Selkoe DJ (1986) Tau specific monoclonal and polyclonal antibodies suggest that tau is a major antigenic component of Alzheimer neurofibrillary tangle. *J. Neuropathol Exp Neurol* 45: 378.
- Kosik KS (1992) Alzheimer's disease: a cell biological prospective. *Science*, 256: 780-783.
- Kowall NW, Beal MF, Busciglio J, Duffy LK, Yankner BA (1991) An in vivo model for the neurodegenerative effects of β amyloid and protection by substance P. *Proc Natl Acad Sci*, 88: 7247-7251.
- Ksiazek-Reding H, Binder LI, Yen SH (1990) Alzheimer Disease Proteins (A68) Share Epitopes with Tau But Show Distinct Biochemical Properties. *J Neurosci Res* 25: 420-430
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during head assembly of bacteriophage T4. *Nature*, 227 : 680-685.
- Laherty CD, Orourke K, Wolf FW, Katz R, Seldin MF, Dixit VM (1992) Characterization of mouse thrombospondin-2 sequence and expression during cell growth and development. *J Biol Chem*, 267: 3274-3281.
- Lander AD, Fujii DK, Gospodarowicz D, Reichardt LF (1982) Characterization of a factor that promotes neurite outgrowth: evidence linking activity to a heparan sulfate proteoglycan. *J Cell Biol*, 94: 574-585.
- Lankes WT, Furthmayr H (1991) Moesin: a member of the protein 4.1-talin-ezrin family of proteins. *Proc Natl Acad Sci*, 88: 8297-8301.
- Lawler J, Hynes RO (1986) The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins. *J Cell Biol*, 103: 1635-1648.
- Lazarus LW, Newton N, Cohler B et al. (1987) Frequency and presentation of depressive symptoms in patients with primary degenerative dementia. *Am J Psychiatry*, 144: 41-45.
- LeBlanc AC, Kovacs DM, Chen HY, Villaré F, Tykocinski M, Autilio-Gambetti L, Gambetti P (1992) Role of amyloid precursor protein (APP): study with antisense transfection of human neuroblastoma cells. *J Neurosci Res*, 31: 635-645.

- Lee VMY, Otvos L, Schmidt ML, Trojanowski JQ (1988) Alzheimer disease tangles share immunological similarities with multiphosphorylation repeats in the two large neurofilament proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7384-7388
- Lee VMY, Balin BJ, Otvos L, Trojanowski JQ (1991) A68: a major subunit of Paired Helical Filaments and Derivatized forms of normal Tau. *Science* 251: 675-678
- Lemaire HG, Salbaum JM, Multhaup G, Kang J, Bayney RM, Unterbeck A, Beyreuther K, Müller-Hill (1989) The preA4695 precursor protein of Alzheimer's disease A4 amyloid is encoded by 16 exons. *Nucleic Acids Res*, 17: 517-522.
- Lenders MB, Peers MC, Tramu G, Delacourte A, Défossez A, Petit H, Mazzuca M (1989) Dystrophic peptidergic neurites in senile plaques of Alzheimer's disease hippocampus precede formation of Paired Helical Filaments. *Brain Res*, 481: 344-349.
- Leterrier JF, Liem RK, Shelanski ML (1982) Interactions between neurofilament and microtubule-associated proteins: a possible mechanism for intraorganellar bridging. *J Cell Biol*, 95: 982-986.
- Levy E, Lopez-Otin C, Ghiso J, Frangione B (1989) Stroke in Icelandic patients with hereditary amyloid angiopathy is related to a mutation in the cystatin C gene, an inhibitor of cysteine proteases. *J Exp Med*, 169: 1171-1178.
- Levy E, Carman MD, Fernandez-Madrid IJ, Power MD, Lieberburg I, van Duinen SG, Bots BThAM, Luyendijk W, Frangione B (1990) Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science*, 248: 1124-1126.
- Lewis DA, Campbell MJ, Terry RD, Morrison JH. Laminar and regional distributions of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in Alzheimer's disease: a quantitative study of visual and auditory cortices. *J Neurosci* 1987;7:1799-808
- Leys D, Pruvo JP, Petit H, Gaudet Y, Clarisse J (1989a) Maladie d'Alzheimer: analyse statistique des résultats du scanner X. *Rev Neurol (Paris)*, 145: 134-139.
- Leys D, Steinling M, Petit H, Salomez JL, Gaudet Y, Ovelacq E, Vergnes R (1989b) Maladie d'Alzheimer: étude par tomographie d'émission monophotonique (HmPao Tc^{99m}). *Rev Neurol (Paris)*, 145: 443-450.
- Lichtenberg B, Mandelkow EM, Hagestedt T, Mandelkow E (1988) Structure and elasticity of microtubule associated protein tau. *Nature*, 334: 359-362.
- Lindwall G, Cole RD (1984) Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol Chem*, 259: 5301-5305.
- Longas MO, Breitweiser KO (1991) Sulfate composition of glycosaminoglycans determined by infrared spectroscopy. *Anal Biochem*, 192: 193-196.
- Mandybur TI, Chuirazzi CC (1990) Astrocytes and the plaques of Alzheimer's disease. *Neurology*, 40: 635-639.

- Mann DMA, Eaves NR, Marcyniuk B, Yates PO (1986) Quantitative changes in cerebral cortical microvasculature in ageing and dementia. *Neurobiol Aging*, 7: 321-330.
- Mann DMA, Brown A, Prinja D, Davies CA, Landon M, Masters CL, Beyreuther K (1989a) An analysis of the morphology of senile plaques in Down's syndrome patients of different ages using immunocytochemical and lectin histochemical techniques. *Neuropathol and Applied Neurobiol*, 15: 317-329.
- Mann DMA, Prinja D, Davies CA, Ihara Y, Delacourte A, Défossez A, Mayer RJ, Landon M (1989b) Immunocytochemical profile of neurofibrillary tangles in Down's syndrome patients of different ages. *J Neurol Sci*, 92: 247-260.
- Mann DMA, Esiri MM (1989c) 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.
- Maresh GA, Chernoff EAG, Culp LA (1984) Heparan sulfate proteoglycans of human neuroblastoma cells: affinity fractionation on columns of platelet factor-4. *Arch Biochem Biophys*, 233: 428-437.
- Masliah E, Terry RD, Mallory M, Alford M, Hansen LA (1990) Diffuse plaques do not accentuate synapse loss in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 137: 1293-1297
- Masters CL, Multhaup G, Simms G, Pottgiesser J, Martins RN, Beyreuther K (1985) Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO J*, 4: 2757-2763.
- Masters CL, Beyreuther K (1992) The pre-eminent role of β -A4 amyloid and its precursor (APP) in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 9: S82.
- Matthew WD, Greenspan RJ, Lander AD, Reichardt LF (1985) Immunopurification and characterization of a neuronal heparan sulfate proteoglycan. *J Neurosci*, 5: 1842-1850.
- Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE (1992) Beta amyloid peptide destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci*, 12: 376-389.
- Mayeux R, Stern Y, Spanton S (1985) Heterogeneity in dementia of the Alzheimer type: evidence of subgroups. *Neurology*, 35: 451-453.
- McGeer PL, Akiyama H, Itagaki S, McGeer EG. Immune system response in Alzheimer's disease. *Can J Neurol Sci* 1989;16:516-27
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan E (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.
- Meezan E, Hjelle JT, Brendel K, Carlson K (1976) *Life Sciences* 17, 1721-1732.

- Melamed E, Lavy S, Bentin S, Cooper G, Rinot Y (1980) Reduction in regional cerebral blood flow during normal aging in man. *Stroke*, 11: 31-35.
- Merz PA, Wisniewski HM, Sommerville RA, Bobin SA, Masters CL, Iqbal K (1983) Ultrastructural morphology of amyloid fibrils from neuritic and amyloid plaques. *Acta Neuropathol*, 60: 113-124.
- Miller AKH, Corsellis JAN (1977) Evidence for a secular increase on human brain weight during the past century. *Ann Human Biol*, 4: 253-257.
- Misra RP (1972) Isolation of glomeruli from mammalian kidneys by graded sieving. *Am J Clin Pathol*, 58: 135.
- 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 Ser A*, 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.
- Mölsä PK, Martilla RJ, Rinne UK (1984) Extrapyrarnidal signs in Alzheimer's disease. *Neurology*, 34: 1114-1116.
- Morel F (1943) Angiopathie topistique atteignant électivement la IVème couche de l'aire striée. *Mshr Psychiat Neurol* 108: 248-254.
- Mori H, Konda J, Ihara Y (1987) Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Science* 235 : 1641-1644.
- Mori S, Sternberger NH, Herman MM, Sternberger LA (1991) Leakage and neuronal uptake of serum protein in aged and Alzheimer brains. *Lab Invest*, 64: 345-351.
- Morrison JH, Lewis DA, Campbell MJ, Huntley GW, Benson DL, Bouras C (1987) A monoclonal antibody to non-phosphorylated neurofilament protein marks the vulnerable cortical neurons in Alzheimer's disease. *Brain Res*, 416:331-336.
- Morrison JH, Hof PR, Campbell MJ, DeLima AD, Voigt T, Bouras C, Cox K, Young WG (1990) Cellular pathology in Alzheimer's disease: implications for corticocortical disconnection and differential vulnerability. In Rapoport SI, Petit H, Leys D, Christen Y, eds. *Imaging, cerebral topography and Alzheimer's disease*. Berlin: Springer Verlag, 19-40
- Morris RG (1986) Short-term forgetting in senile dementia of the Alzheimer type. *Cognitive Neuropsychol*, 3: 77-97.
- Mosher DF (1990) Physiology of thrombospondin. *Annu Rev Med* 41:85-97.
- Mountjoy CQ, Roth M, Evans NJR (1983) Cortical neuronal counts in normal elderly controls and demented patients. *Neurobiol Aging*, 4: 1-11.

- Mulvihill P, Perry G (1989) Immunoaffinity demonstration that paired helical filaments of Alzheimer's disease share epitopes with neurofilaments, MAP2 and tau. *Brain Res*, 484: 150-156.
- Murphy-Ullrich JE, Höök M (1989) Thrombospondin modulates focal adhesions in endothelial cells. *J Cell Biol*, 109: 1309-1319.
- Murrell J, Farlow M, Ghetti B, Benson M (1991) A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science*, 254: 97-99.
- Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, Otomo E, Ikeda K (1991) Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease, *Brain Research*, 541: 163-166.
- Namba Y, Tsuchiya H, Ikeda K (1992) Apolipoprotein B immunoreactivity in senile plaques and vascular amyloids and neurofibrillary tangles in the brains of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 134: 264-266.
- Narindrasorasak S, Lowery D, Gonzalez-DeWhitt P, Poorman RA, Greenberg B, Kisilevsky R (1991) High affinity interactions between the Alzheimer's β -amyloid precursor proteins and the basement membrane form of heparan sulfate proteoglycan. *J Biol Chem*, 266: 12878-12883.
- Neugebauer KM, Emmet CJ, Venstrom KA, Reichardt LF (1991) Vitronectin and thrombospondin promote retinal neurite outgrowth: developmental regulation and role of integrins. *Neuron*, 6: 345-358.
- Noonan DM, Fulle A, Valente P, Cai S, Horigan E, Sasaki M, Yamada Y, Hassell JR (1991) The complete sequence of perlecan, a basement membrane heparan sulfate proteoglycan, reveals extensive similarity with laminin A chain, low density lipoprotein-receptor, and the neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem*, 266: 22939-22947.
- Nukina N, Kosik KS, Selkoe DJ (1987) Recognition of an anti-PHF by monoclonal neurofilament antibodies is due to crossreaction with Tau proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 3415-
- O'Shea KS, Dixit VM (1988) Unique distribution of the extracellular matrix component thrombospondin in the developing mouse embryo, *J. Cell. Biol.*, 107: 2737-2748.
- O'Shea KS, Liu LHJ, Dixit VM (1991) Thrombospondin and a 140 kd fragment promote adhesion and neurite outgrowth from embryonic central and peripheral neurons and from PC12 cells, *Neuron*, 7: 231-237.
- O'Shea, K.S., Rheinheimer, J.S.T. and Dixit, V.M., Deposition and role of thrombospondin in the histogenesis of the cerebellar cortex, *J.Cell. Biol.*, 110 (1990) 1275-1283.

- Ohgami T, Kitamoto T, Shin RW, Kaneko Y, Ogomori K, Tateishi J (1991) Increased senile plaques without microglia in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 81: 242-247.
- Oltersdorf T, Fritz LC, Schenk DB, Lieberburg I, Johnson-Wood KL, Beattie EC, Ward PJ, Blacher RW, Dovey HF, Sinha S (1989) The secreted form of the Alzheimer's amyloid precursor protein with the Kunitz domain is protease nexin-II. *Nature* 341: 144-147.
- Orlando R, Kenny PTM, Zagorski MG (1992) Covalent modification of Alzheimer's amyloid β -peptide in formic acid solutions. *Biochem Biophys Res Commun*, 184: 686-691.
- Pearce J (1974) The extrapyramidal disorder of Alzheimer's disease. *Eur Neurol*, 12: 94-103.
- Pearson RCA, Esiri MM, Hiorns RW, Wilcock GK, Powell TPS (1985) Anatomical correlates of the distribution of the pathological changes in the neocortex in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82: 4531-4534.
- Peers MC, Lenders MB, Défossez A, Delacourte A, Mazzuca M (1988) Cortical angiopathy in Alzheimer's disease: the formation of dystrophic perivascular neurites is related to the exudation of amyloid fibrils from the pathological vessels. *Virch Arch*, 414: 15-20.
- Perez-Polo JR, Werrbach-Perez K, Tiffany-Castiglioni E (1979) A human clone line of differentiating neurons. *Dev Biol*, 71: 341-355.
- Perez-Polo JR, Tiffany-Castiglioni E, Zeigler MG, Werrbach-Perez K (1982) Effect of nerve growth factor on catecholamine metabolism in human neuroblastoma clone (SY5Y). *Dev Neurosci*, 5: 418-423.
- Perl DP, Gadjusek DC, Garruto RM, Yanagihara RT, Gibbs CJ (1982) Intraneuronal aluminium accumulation in amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia of Guam. *Science*, 217: 1053-1055
- Perlmutter L, Barrón E, Saperia D, Chui HC (1991) Association between vascular basement membrane components and the lesions of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*, 30: 673-681.
- Perlmutter LS, Chui HC, Saperia D, Athanikar J (1990a) Microangiopathy and the colocalization of heparan sulfate proteoglycan with amyloid in senile plaques of Alzheimer's disease. *Brain Res*, 508: 13-19.
- Perlmutter L, Barrón E, Chui HC (1990b) Morphologic association between microglia and senile plaque amyloid in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 119: 32-36.
- Perry G, Siedlak SL, Richey P, et al. (1991) Association of heparan sulfate proteoglycan with the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 11: 3679-83.

- Perry G, Cras P, Siedlak SL, Tabaton M, Kawai M (1992a) Beta-protein immunoreactivity is found in the majority of neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 140: 283-290.
- Perry G, Kawai M, Kalaria R, Tabaton M, Cras P (1992b) Transformation of neurofibrillary tangles. *Neurobiol Aging*, 13: S37.
- 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.
- Pomponi M, Giacobini E, Brufani M (1990) Present state and future development of the therapy of Alzheimer disease. *Aging*, 2: 125-153.
- Ponte P, Gonzaler-Dewhitt P, Schilling J, Miller J, Hsu D, Greenberg B, Davis K (1988) A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors. *Nature* 331: 525-527
- Potter H, Abraham CR, Dressler D (1991) The Alzheimer amyloid components alpha-1-antichymotrypsin and β -protein form a stable complex in vitro. Iqbal K, McLachlan DRC, Winblad B, Wisniewski HM, eds. *Alzheimer's disease: basic mechanisms, diagnosis and therapeutic strategies*. Chichester: Wiley and sons, :275-279.
- Price JL, Davis PB, Morris JC, White DL. The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1991;12:295-312
- Prusiner SB (1990) Novel structure and genetics of prions causing neurodegeneration in humans and animals. *Biologicals*, 18: 247-262.
- Ravens JR (1978) Vascular changes in the human senile brain. *Adv Neurol*, 20: 487-501.
- Refolo LM, Salton SRJ, Anderson JP, Mehta P, Robakis NK (1989) Nerve and epidermal growth factors induce the release of the Alzheimer amyloid precursor from PC12 cell cultures. *Biochem Biophys Res Commun*, 164: 664-670.
- Refolo LM, Wittenberg JS, Friedrich VL, Robakis NK (1991) The Alzheimer amyloid precursor is associated with the detergent-insoluble cytoskeleton. *J Neurosci*, 11: 3888-3897.
- Reichardt LF, Tomaselli KJ (1991) Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. *Annu Rev Neurosci*, 14: 531-570.
- Reisberg B, Ferris SH, De Leon MJ (1982) The global Deterioration Scale for assessment of Primary Degenerative Dementia. *Am J Psychiatry* 139: 1136-1139.
- Robakis NK, Ramakrishna N, Wolfe G, Wisniewski HM (1987a) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 4190-4193.

- Robakis NK, Wisniewski HM, Jenkins EC, Devine-Gage EA, Houck GE, Yao XL, Ramakrishna N, Wolfe G, Silverman WP, Brown WT (1987b) Chromosome 21q21 sublocalisation of gene encoding β amyloid peptide in cerebral vessels and neuritic (senile) plaque of people with Alzheimer disease and Down syndrome. *Lancet*, i: 384-385.
- Roberts DD, Sherwood JA, Ginsburg V (1987) Platelet thrombospondin mediates attachment and spreading of human melanoma cells. *J Cell Biol.*, 104: 131-139.
- Roberts DD (1988) Interactions of thrombospondin with sulfated glycoproteins and proteoglycans of human melanoma cells. *Cancer Res*, 48: 6785-6793.
- Rogers J, Morrison JH (1985) Quantitative morphology and regional and laminar distribution of senile plaques in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 5: 2801-2808.
- Rogers J, Luber-Narod J, Styren S, Civin H (1988) Expression of immune system-associated antigens by cells of the human central nervous system: relationship to the pathology of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 9: 339-349.
- Rogers J, Schultz J, Webster S, Brachova L, Ward P, Lieberberg I (1991) C1q binding to β -amyloid and amyloid precursor protein (APP). *Soc Neurosci Abstr*, 17: 912.
- Rosenblatt DE, Geula C, Mesulam MM (1989) Protease Nexin I immuno-staining in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.*, 26: 628-634.
- Roseblatt M, Fellous A, Mazié JC, Delacourte A, Défossez A (1989) Alzheimer's disease: microtubule-associated proteins 2 (MAP2) are not components of paired helical filaments. *FEBS Lett*, 252: 91-94.
- Ruoslahti E, Yamaguchi Y (1991) Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell*, 64: 867-869.
- Sabiston P, Adams ME, Ho YA (1985) Automation of 1,9-dimethylmethylene blue dye-binding assay for sulfated glycosaminoglycans with application to cartilage microcultures. *Anal Biochem*, 149: 543-548.
- Sage EH, Bornstein P (1991) Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. *J Biol Chem*, 266: 14831-14834.
- Salbaum JM, Weidemann A, Lemaire HG, Masters CL, Beyreuther K (1989) The promoter of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor gene. *EMBO J*, 7: 2807-2813.
- Sambamurti K, Shioi J, Anderson JP, Pappolla MA, Robakis NK (1992) The Alzheimer's amyloid precursor is cleaved by APP-secretase intracellularly in either the trans-Golgi network or in post-Golgi vesicles. *Neurobiol Aging*, 13: S79.
- Scheibel AB, Duong T, Tomiyasu U. Microvascular changes in AD. In: Scheibel AB, Wechsler AF, Brazier MAB, eds. *The biological substrates of Alzheimer's disease*. UCLA Forum in Medical Sciences, Volume 27. Orlando: Academic Press, 1986:177-92

- Scheltens P, Vermesch P, Leys D (1992) Hétérogénéité de la maladie d'Alzheimer. *Rev Neurol*, 148: sous presse.
- Scheltens P, Barkhof F, Valk J, Algra PR, Gerritsen Van Der Hoop R, Nauta J, Wolters EC (1992) White matter lesions on Magnetic Resonance imaging in Alzheimer's disease: evidence for heterogeneity. *Brain* (sous presse).
- Scheltens P, Leys D, Barkhof F, Huglo D, Weinstein H, Vermersch P, Kuiper M, Steinling M, Wolters EC, Valk J (1992) Atrophy of the medial temporal lobes on magnetic resonance imaging in probable Alzheimer's disease and normal aging. Diagnostic value and neuropsychological correlates. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, (sous presse).
- Schmidt KE, Cooper DN (1988) A comprehensive list of cloned human DNA sequences. *Nucleic Acid Res*, 16: 1403-1480.
- Schubert D, Jin LW, Saitoh T, Cole G (1989c) The regulation of amyloid β protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion. *Neuron*, 3: 689-694.
- Schubert D, Schroeder R, La Corbiere M, Saitoh T, Cole G (1988) Amyloid β protein precursor is possibly a HSPG core protein. *Science* 241: 223-225.
- Schubert D, Cole G, Saitoh T, Oltersdorf T (1989b) Amyloid β protein precursor is a mitogen. *Biochem Biophys Res Commun*, 162: 83-88.
- Schubert D, La Corbiere M, Saitoh T, Cole G (1989a) Characterization of an amyloid beta precursor protein that binds heparin and contains tyrosine sulfate. *Proc Natl Acad Sci*, 86: 2066-2071.
- Schubert W, Prior R, Weidemann A, Dirksen H, Multhaup G, Masters CL, Beyreuther K (1991) Localization of Alzheimer β A4 amyloid precursor protein at central and peripheral synaptic sites. *Brain Res*, 563: 184-194.
- Scott JE (1973) Affinity, competition and specific interactions in the biochemistry and histochemistry of polyelectrolytes. *Biochem Soc Trans*, 1: 787-806.
- Scott JE (1985) Proteoglycan Histochemistry - A valuable tool for connective tissue biochemists. *Collagen Res Rel*, 6: 541-575.
- Seldin DC, Seno N, Austen KF, Stevens RL (1984) Analysis of polysulfated chondroitin disaccharides by HPLC. *Anal Biochem*, 141: 291-300.
- Selkoe DJ, Ihara Y, Salazar FJ (1982) Alzheimer's disease: insolubility of partially purified paired helical filaments in sodium dodecyl sulfate and urea. *Science*, 215: 1243-1245.
- Selkoe DJ, Podlisny MB, Joachim CL, Vickers EA, Lee G, Fritz LC, Oltersdorf T (1988) Beta amyloid protein precursor occurs as 110- to 135 kilodaltons membrane associate proteins in neural and non neural tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85: 7341-7345.
- Selkoe DJ (1990) The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*, 6: 487-498.

- Selkoe DJ (1991) Amyloid protein and Alzheimer's disease. *Scientific American*, 265: 68-78.
- Selkoe DJ (1992) β -amyloidosis: a seminal pathogenetic event in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 13: S74.
- Selnes OA, Carson K, Rovner B, Gordon B (1988) Language dysfunction in early- and late-onset possible Alzheimer's disease. *Neurology*, 38: 1053-1056.
- Sherwood JA, Roberts DD, Spitalnik SL, Marsch K, Harvey EB, Miller LH, Howard RJ (1989) Studies of the receptors on melanoma cells for *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes, *Am J Trop Med Hyg*, 40: 119-127.
- Shioi J, Anderson JP, Ripellino JA, Robakis NK (1992) Chondroitin sulfate proteoglycan form of the Alzheimer's β -amyloid precursor. *J Biol Chem*, 267: 13819-13822.
- Shivers BD, Hilbich C, Multhaup G, Salbaum JM, Beyreuther K, Seeburg P (1988) Alzheimer's disease amyloidogenic glycoprotein: expression pattern in rat brain suggests a role in cell contact. *EMBO J*, 7: 1365-1370.
- Simionescu M, Simionescu N, Palade GE (1982) Differentiated microdomains on the luminal surface of capillary endothelium. Distribution of lectin receptors. *J Cell Biol*, 94: 406-413.
- Simionescu M, Simionescu N, Silbert JE, Palade GE (1981) Differentiated microdomains on the luminal surface of capillary endothelium. II Partial characterization of their anionic sites. *J Cell Biol*, 90: 614-621.
- Singh M, Bachhawat BK (1968) Isolation and characterization of glycosaminoglycans in human brain of different age groups. *J Neurochem*, 15: 249-258.
- Sinha S, Knops J, Esch F, Moyer ED, Oltersdorf T (1991) Conversion of the Alzheimer's β -amyloid precursor protein (APP) Kunitz domain into a potent human neutrophil elastase inhibitor. *J Biol Chem*, 266: 21011-21013.
- Sisodia SS, Koo EH, Beyreuther K, Unterbeck A, Price DL (1990) Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science*, 248: 492-495.
- Small DH, Nurcombe V, Moir R, Michaelson S, Monard D, Beyreuther K, Masters CL (1992) The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease binds to chick brain extracellular matrix and is released by an acetylcholinesterase protease. *Neurobiol Aging*, 13: S81.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using Bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150: 76-85.
- Snow AD, Willmer J, Kisilevsky R (1987a) Sulfated glycosaminoglycans: a common constituent of all amyloids? *Lab Invest*, 56: 120-123.

- Snow AD, Kisilevsky R, Stephens C, Anastassiades T (1987b) Characterization of tissue and plasma glycosaminoglycans during experimental AA amyloidosis and acute inflammation. *Lab Invest*, 56: 665-675.
- Snow AD, Willmer J, Kisilevsky R (1987c) A close ultrastructural relationship between sulfated proteoglycans and AA amyloid fibrils. *Lab Invest*, 57: 687-698.
- Snow AD, Willmer J, Kisilevsky R (1987d) Sulfated glycosaminoglycans in Alzheimer's disease. *Human Pathol*, 18: 506-510.
- Snow AD, Kisilevsky R, Wight TN (1988a) Immunolocalization of heparan sulfate proteoglycans to AA amyloid deposition sites in spleen and liver during experimental amyloidosis. *Amyloid and amyloidosis*. In Isobe T, Araki S, Uchino F, Kico S, Tsubura E (eds), Plenum Publishing corporation, 87-93.
- Snow AD, Mar H, Nochlin D, Kimata K, Kato M, Suzuki S, Hassell J, Wight TN (1988b) The presence of heparan sulfate proteoglycan in the neuritic plaques and congophilic angiopathy in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 133: 456-463.
- Snow AD, Wight TN (1989) Proteoglycans in the pathogenesis of Alzheimer's disease and other amyloidoses, *Neurobiol Aging*, 10: 481-497.
- Snow AD, Kisilevsky R, Willmer J, Prusiner SB, DeArmond SJ (1989a) Sulfated glycosaminoglycans in amyloid plaques of prion diseases. *Acta Neuropathol*, 77: 337-342.
- Snow AD, Lara S, Nochlin D, Wight TN (1989b) Cationic dyes reveal proteoglycans structurally integrated within the characteristic lesions of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 78: 113-123.
- Snow AD, Wight TN, Nochlin D, Koike Y, Kimata K, DeArmond SJ, Prusiner SB (1990) Immunolocalization of heparan sulfate proteoglycans to the prion protein amyloid plaques of Gerstmann-Straussler syndrome, Creutzfeldt-Jakob disease and Scrapie. *Lab Invest*, 63: 601-611
- Snow AD, Mar H, Nochlin D, Kresse H, Wight TN (1992) Peripheral distribution of dermatan sulfate proteoglycans (decorin) in amyloid-containing plaques and their presence in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *J Histochem Cytochem*, 40: 105-113.
- Spencer PS (1987) Guam ALS/parkinsonism-dementia: a long-latency neurotoxic disorder caused by "slow toxin(s)" in food? *Can J Neurol Sci*, 14: 347-357.
- St George-Hyslop PH, Tanzi RE, Polinski AJ et al. (1987) The genetic defect causing familial AD maps on chromosome 21. *Science*, 235: 885-890.
- Steiner B, Mandelkow EM, Biernat J, Gustke N, Meyer HE, Schmidt B, Mieskes G, Söling HD, Drechsel D, Kirschner MW, Goedert M, Mandelkow E (1990) Phosphorylation of microtubule-associated protein tau: identification of the site for

- Ca²⁺-calmodulin dependent kinase and relationship with tau phosphorylation in Alzheimer tangles. *EMBO J*, 9: 3539-3544.
- Stern Y, Mayeux R, Sano M, Hauser WA, Bush T (1987) Predictors of disease course in patients with probable Alzheimer's disease. *Neurology*, 37: 1649-1653.
- Suzuki K, Katzman R, Korey SR (1965) Chemical studies on Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 14: 211-224.
- Tagliavini F, Ghiso J, Timmers WF, Giaccone G, Bugiani O, Frangione B (1990) Coexistence of Alzheimer's amyloid precursor protein and amyloid protein in cerebral vessel walls. *Lab Invest*, 62: 761-767.
- Tanaka S, Shiojiri S, Takahashi Y, Kitaguchi N, Kimura J, Nakamura S, Ueda K (1991) Differential expression of three types of amyloid β -protein precursor mRNA in the brain and nonneural tissues. In Iqbal K, McLachlan DRC, Winblad B, Wisniewski HM (eds). *Alzheimer's disease: Basic mechanisms, diagnosis and therapeutic strategies*. Chichester: Wiley & Sons, 313-319.
- Tanzi RE, McClatchey AI, Lamperti ED, Villa-Komaroff L, Gusella JF, Neve RL (1988) Protease inhibitor domain encoded by an amyloid precursor protein mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature*, 331: 528-530.
- Taraboletti G, Roberts DD, Liotta LA (1987) Thrombospondin-induced tumor cell migration: haptotaxis and chemotaxis are mediated by different molecular domains. *J Cell Biol*, 105: 2409-2415.
- Taraboletti G, Roberts DD, Liotta LA, Giavazzi R (1990) Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth: a potential angiogenesis regulatory factor. *J Cell Biol*, 111: 765-772.
- Tengblad A (1979) Affinity chromatography on immobilized hyaluronate and its application to the isolation of hyaluronate binding proteins from cartilage. *Biochem Biophys Acta*, 578: 281-289.
- Terho TT, Hartiala K (1971) Method for determination of the sulfate content of glycosaminoglycans. *Anal Biochem*, 41: 471-476.
- Terry RD, Peck A, DeTeresa R, Schechter R, Horoupian DS (1981) Some morphometric aspects of the brain in senile dementia of the Alzheimer type. *Ann Neurol*, 10: 184-192.
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synaptic loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol*, 30: 572-580.
- Tomski SJ, Murphy RM (1992) Kinetics of aggregation of synthetic β -amyloid peptide. *Arch Biochem Biophys*, 294: 630-638.

- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci*, 76: 4350-4354.
- Vallet PG, Guntern R, Hof PR, et al. A comparative study of histological and immunohistochemical methods for neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 1992;83:170-8
- Van Broeckhoven C, Haan J, Bakker E, Hardy JA, Van Hul W, Wehnert A, Vegter-Van der Vlis M, Roos RAC (1990) Amyloid β protein precursor gene and hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch). *Science*, 248: 1120-1123.
- Van Duijn CM, Hendriks L, Cruts M, Hardy JA, Hofman A, Van Broekhoven C (1991) Amyloid precursor protein gene mutation in early-onset Alzheimer's disease. *Lancet*, 337: 978.
- Van Nostrand WE, Wagner SL, Suzuki M, Choi BH, Farrow JS, Geddes JW, Cotman CW, Cunningham DD (1989) Protease nexin II, a potent antichymotrypsin, shows identity to amyloid β -protein precursor. *Nature*, 341: 546-549.
- Vermersch P, Frigard B, Delacourte A (1992) Mapping of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease: evaluation of heterogeneity using the quantification of abnormal tau proteins. *Acta Neuropathol*, sous presse.
- Vinters HV, Mah VH (1991) Vascular diseases. In Duckett S (eds). *The pathology of the aging human nervous system*. Philadelphia: Lea & Febiger, 20-76.
- Virchow R (1854) Zür Cellulosefrage. *Virch Arch Pathol Anat Physiol*, 6: 416-426.
- Watanabe K, Oohira A, Katoh-Semba R, Totsuka T, Yoshida K (1989) Sulfated proteoglycans synthesized by Neuro 2a neuroblastoma cells: comparison between cells with and without ganglioside-induced neurites. *Neurochem Res*, 14: 707-716.
- Wechsler D (1989) Echelle d'intelligence de Wechsler pour adultes, forme révisée (WAISR). Paris, Centre de psychologie appliquée, 156 pages.
- Weidemann A, König G, Bunke D, Fischer P, Salbaum JM, Masters CL, Beyreuther K (1989) Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell*, 57: 115-126.
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci*, 72: 1858-1862.
- Weinstein HC, Hijdra A, Van Royen EA, Derix MMA, Teunisse S, Walstra G, Jonker C (1992) SPECT in Alzheimer's disease: difference between patients with early and late disease onset. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* (sous presse).
- Willingham MC, Rutherford AV (1984) The use of osmium-thiocarbo-hydrazide-osmium and ferrocyanide-reduced osmium methods to enhance membrane contrast and preservation in cultured cells, *J Histochem Cytochem*, 32: 455-460.

- Wisniewski HM, Barcikowska M, Kida E (1991) Phagocytosis of β /A4 amyloid fibrils of the neuritic neocortical plaques. *Acta Neuropathol*, 81: 588-590.
- Wisniewski T, Frangione B (1992) Apolipoprotein E: a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid. *Neurosci Lett*, 135: 235-238.
- Wood JG, Mirra SS, Pollock NJ, Binder LI (1986) Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83: 4040-4043.
- Yamaguchi H, Yamazaki T, Lemere CA, Frosch MP, Selkoe DJ (1992) Beta-amyloid is focally deposited within the outer basement membrane in the amyloid angiopathy of Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 141: 249-259.
- Yanagishita M and Hascall VC (1992) Cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem*, 267: 9451-9454.
- Yankner BA, Dawes LR, Fisher S, Villa-Komaroff L, Oster-Granite ML, Neve RL (1989) Neurotoxicity of a Fragment of the Amyloid Precursor Associated with Alzheimer's Disease. *Science*, 245: 417-420.
- Yankner BA, Caceres A, Duffy LK (1990a) Nerve growth factor potentiates the neurotoxicity of β amyloid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 9020-9023.
- Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA (1990b) Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid β protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science*, 250: 279-282.
- Yankner BA, Busciglio J (1992) Is β amyloid neurotoxicity the cause of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 13: S82.
- Young ID, Willmer JP, Kisilevsky R (1989) The ultrastructural localization of sulfated proteoglycans is identical in the amyloids of Alzheimer's disease and AA, AL, senile cardiac and medullary carcinoma-associated amyloidosis. *Acta Neuropathol*, 78: 202-209.

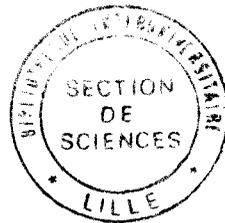
TABLE DES MATIERES

Généralités.....	11
1 Aspects cliniques.....	13
1.1 la démence de la maladie d'Alzheimer	13
1.2 Le diagnostic clinique.....	20
1.3 Les traitements.....	21
2 Aspects neuropathologiques.....	22
2.1 L'atrophie cérébrale	22
2.2 La dégénérescence neurofibrillaire.....	23
2.3 La substance amyloïde.....	27
2.4 Les relations dépôts amyloïdes et dégénérescence neurofibrillaire	31
3 Aspects biochimiques et génétiques	32
3.1 La dégénérescence neurofibrillaire.....	32
3.2 Les dépôts amyloïdes	37
3.3 Les relations dépôts amyloïdes et dégénérescence neurofibrillaire	50
4 L'importance de la présence de PG dans les amyloïdoses.....	51
4.1 Définition et structure des protéoglycannes.....	51
4.2 Rôles des protéoglycannes.....	54
4.3 Amyloïde et protéoglycannes dans les amyloïdoses systémiques et cérébrales	55
Résultats personnels: Amyloïde et Protéoglycannes dans la Maladie d'Alzheimer.....	60
1 Caractérisation de l'anticorps monoclonal 7E12 dirigé contre l'héparane sulfate protéoglycanne vasculaire.....	61
1.1 Caractéristiques et spécificité.....	61
1.2 Profil biochimique	61
1.3 Profil immunohistochimique dans le cerveau.....	62

2 Hypothèse de formation des dépôts amyloïdes d'origine vasculaire	63
2.1 Etude de la microvascularisation cérébrale.....	64
2.2 Les dépôts amyloïdes.....	76
2.3 Les thrombospondines: heparin binding proteins	79
2.4 Bilan des études immunohistochimiques	84
3 Etude de l'affinité de l'héparane sulfate protéoglycane vasculaire pour le précurseur de la protéine amyloïde	86
3.1 Choix de la méthode de mise en évidence de l'affinité.....	86
3.2 Etude de l'affinité de l'APP sécrété pour l'héparane sulfate	86
3.3 Etude de l'affinité de l'héparane sulfate protéoglycane vasculaire pour deux isoformes de l'APP.....	90
3.4 Etude de l'affinité de l'héparane sulfate protéoglycane vasculaire pour différentes séquences de l'APP riche en acides aminés basiques dont l'A4	91
3.5 Conclusion.....	94
4 Analyse biochimique des protéoglycannes vasculaires	96
4.1 Mise au point d'une micro-méthode (Bleu Alcian par dot-blot).....	96
4.2 Recherche d'une modification des protéoglycannes vasculaires dans la maladie d'Alzheimer (au niveau des sulfates et de l'acide uronique).....	105
4.3 Conclusion.....	110
5 Etude de l'affinité des protéoglycannes de neuroblastomes pour l'APP	111
5.1 Purification et Caractérisation des protéoglycannes.....	111

5.2 Comparaison immunochimique de l'HSPG vasculaire et des protéoglycannes de neuroblastomes.....	115
5.3 Etude d'affinité: spécificité pour le peptide A4.....	117
5.4 L'affinité pour le peptide A4 est médiée par la partie protéique ou glycosaminoglycannique.....	119
5.5 Bilan: Héparane sulfate protéoglycanne neuronal.....	124
Conclusion.....	128
Matériels et Méthodes	135
1 Matériel autopsique	135
1.1 Cerveaux de bœuf	135
1.2 Cerveaux humains	135
2 Analyse Histologique.....	136
2.1 Histologie.....	136
2.2 Histochimie.....	137
2.3 Immunohistochimie.....	138
2.4 Techniques d'analyse d'images.....	141
3 Cultures cellulaires	142
3.1 Les lignées cellulaires.....	142
3.2 Cultures avec du sérum de veau fœtal	142
3.3 Cultures en milieu défini.....	142
3.4 Cultures en présence de NGF.....	143
4 Techniques biochimiques.....	143
4.1 Chromatographies	143
4.2 Le dot-blot	146
4.3 Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS.....	146
4.4 Immunoblotting ou technique des immuno-empreintes.....	146
4.5 Dosages colorimétriques.....	147

5 Purification	148
5.1 des protéoglycannes.....	148
5.2 Purification du précurseur amyloïde.....	151
6 Caractérisation des protéoglycannes	152
6.1 Par sensibilité au glycosaminoglycanases	152
6.2 Préparation de l'axe protéique.....	152
Bibliographie	153



ANNEXES

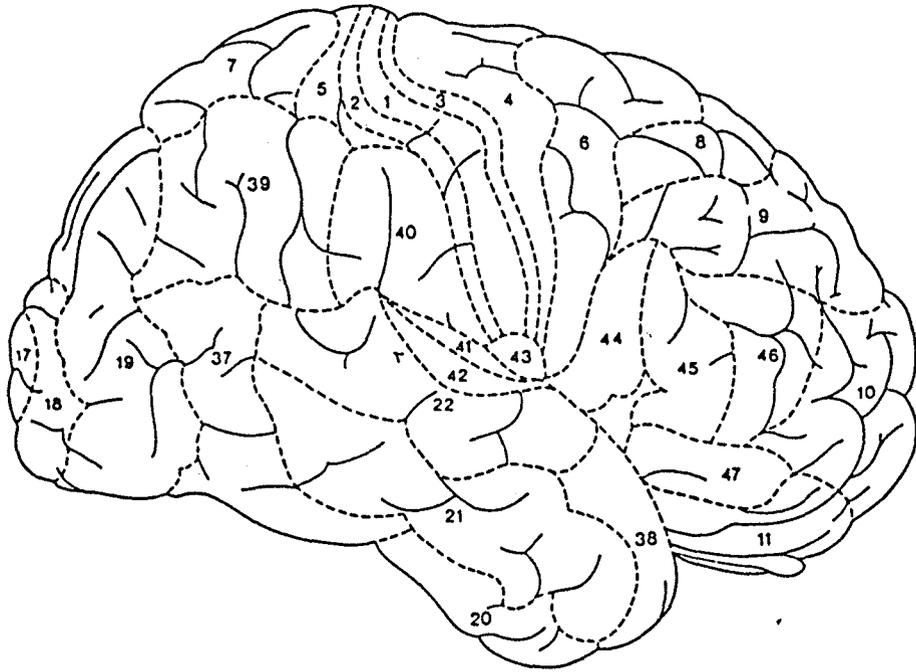
Annexe I

5'Première position	Deuxième position				3'Troisième position
	U	C	A	G	
U	Phe (F)	Ser (S)	Tyr (Y)	Cys (C)	U
	Phe (F)	Ser (S)	Tyr (Y)	Cys (C)	C
	Leu (L)	Ser (S)	<i>Arrêt (och)</i>	<i>Arrêt</i>	A
	Leu (L)	Ser (S)	<i>Arrêt (amb)</i>	Trp (W)	G
C	Leu (L)	Pro (P)	His (H)	Arg (R)	U
	Leu (L)	Pro (P)	His (H)	Arg (R)	C
	Leu (L)	Pro (P)	Gln (Q)	Arg (R)	A
	Leu (L)	Pro (P)	Gln (Q)	Arg (R)	G
A	Ile (I)	Thr (T)	Asn (N)	Ser (S)	U
	Ile (I)	Thr (T)	Asn (N)	Ser (S)	C
	Ile (I)	Thr (T)	Lys (K)	Arg (R)	A
	<i>Met (M)</i>	Thr (T)	Lys (K)	Arg (R)	G
G	Val (V)	Ala (A)	Asp (D)	Gly (G)	U
	Val (V)	Ala (A)	Asp (D)	Gly (G)	C
	Val (V)	Ala (A)	Glu (E)	Gly (G)	A
	Val (V) <i>(Met (M))</i>	Ala (A)	Glu (E)	Gly (G)	G

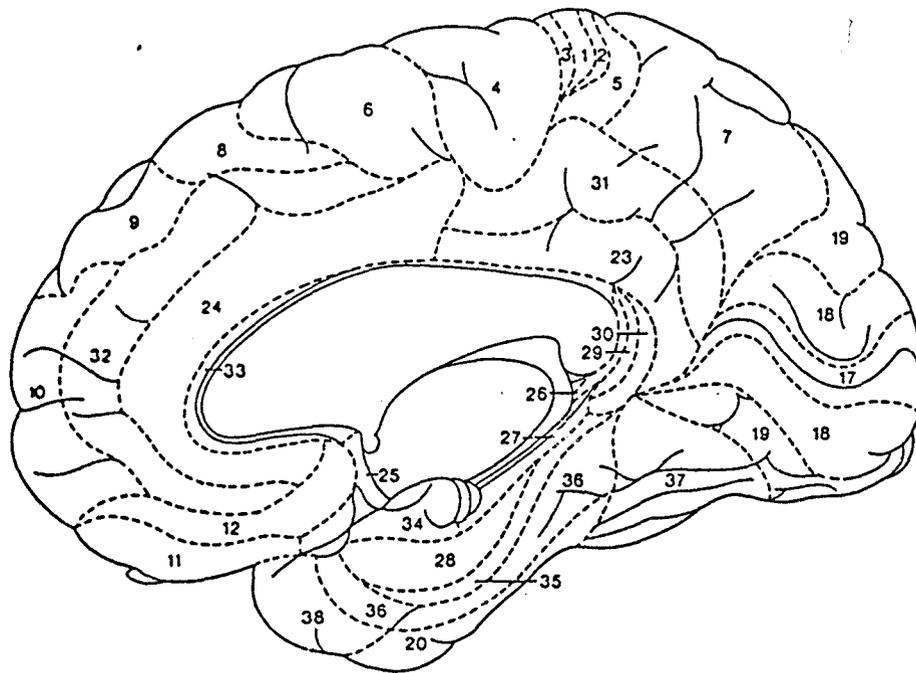
Les bases données sont celles des ribonucléotides. U remplace donc T dans le tableau. Les acides aminés sont à la fois présentés avec un code: trois lettres et une lettre, entre parenthèses.

ANNEXE II

Aires de Brodmann



A



B

ANNEXE III

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 - CAPACITÉ COMPLÈTE	NON - CAPACITÉ PARTIELLE	NON - CAPACITÉ TOTALE
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. Mémoire des faits personnels :			
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. Mémoire des faits non personnels :			
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. Épreuve de mémoire à court terme : 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 1 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
Compter de 20 à 1	0		2
Mois de l'année à l'envers	0		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.

ANNEXE IV

MINI MENTAL TEST

INSTRUCTIONS POUR LE PASSAGE DU TEST

ORIENTATION

- 1 à 5 : demander la date, ensuite demander spécialement ce qui a été omis, par exemple : « Pouvez-vous aussi me dire en quelle saison nous sommes ? (1 point par bonne réponse) »
- 6 à 10 : demander de la façon suivante : « Pouvez-vous me dire le nom de cet hôpital ? » (la ville, le pays...) (1 point par bonne réponse)

ENREGISTREMENT DES DONNÉES

- 11 à 13 : Demander au patient s'il accepte de tester sa mémoire. Nommer alors 3 objets différents clairement et lentement (6 sec./objet). Après avoir cité les 3 noms, demandez-lui de répéter. Cette première répétition détermine son score. Continuer à lui citer les 3 objets jusqu'à ce qu'il puisse tous les répéter, effectuer 6 essais. S'il ne peut réellement pas apprendre les 3 noms, le test « mémoire rappel » ne peut être fait.

ATTENTION ET CALCUL MENTAL

- 14 à 18 : Demander au patient de soustraire le nombre de 7 de 100, et de soustraire à nouveau 7 du résultat obtenu et ainsi de suite 5 fois (soit 93, 86, 79, 72 et 65). Chiffrer le nombre total de bonnes réponses. Si le patient ne veut pas ou ne peut pas réaliser cette tâche, lui demander d'épeler le mot « rouge » à l'envers. Le score est déterminé par le nombre de lettres présentes à la bonne place (ex. EGUOR = 5 points, EGOUR = 3 points).

MÉMOIRE — RAPPEL

- Redemander au sujet de vous citer les 3 objets (citron, clé, ballon) déjà appris (1 point par réponse correcte).

LANGAGE

- 22-23-24 : Montrer au patient une montre et lui demander ce que c'est, recommencer avec un crayon. Demander au patient de répéter la phrase « pas de si ni de mais » après vous. Ne permettre qu'un seul essai.
- 25-26-27 : Donner au patient une feuille de papier blanc, et lui donner l'ordre. Compter 1 point pour chaque partie exécutée correctement.
- 28 : Sur une feuille de papier écrire la phrase « Fermez vos yeux » en lettres assez grandes pour que le patient lise facilement. Demandez-lui de lire et de faire ce qui est écrit. Compter 1 point s'il ferme effectivement ses yeux.
- 29 : Donner au patient une feuille de papier blanc et demandez-lui d'écrire une phrase. Ne pas dicter de phrase, elle doit être écrite spontanément. Elle doit posséder un sujet et un verbe et être sensée. L'orthographe et la ponctuation ne sont pas obligatoires — 1 point —.

ACTIVITÉ MOTRICE

- 30 : Sur une feuille de papier vierge dessiner 2 pentagones d'au moins 2 cm de côté qui se superposent. Demander au patient de recopier ce dessin exactement. Les 10 angles doivent être présents et 2 angles doivent se croiser pour compter 1 point. Ne pas tenir compte d'un tremblement ou d'une rotation du dessin.

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

* MINI MENTAL TEST — Folstein et coll. (1975), traduit par L. Israël.

* M.F. Folstein, S.E. Folstein, P.R. Mc Hugh : « Mini-Mental Test ». A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. J. Psychiat. Res., 1975, vol. 12, 189-198.

TEST (score de 30 à 0) :

ORIENTATION

- | | |
|---|-------|
| 1. Quel jour de la semaine sommes-nous ? | |
| 2. Quelle est la date aujourd'hui ? | |
| 3. En quel mois sommes-nous ? | |
| 4. En quelle saison sommes-nous ? | |
| 5. En quelle année sommes-nous ? | |
| 6. Où sommes-nous ici ? (Quel hôpital, quelle maison de retraite ?) | |
| 7. A quel étage sommes-nous ? | |
| 8. Dans quelle ville sommes-nous ? | |
| 9. Dans quel département (province) sommes-nous ? | |
| 10. Dans quel pays sommes-nous ? | |

ENREGISTREMENT DE DONNÉES

- | | |
|---|-------|
| 11. Répétez les mots suivants : « citron, clé, ballon » | |
| 12. (l'examineur doit prononcer ces mots au rythme de un par seconde). | |
| 13. Chaque réponse correcte = 1. En cas de difficultés, recommencez jusqu'à 5 fois. | |

ATTENTION ET CALCUL MENTAL

- | | |
|--|-------|
| 14. | |
| 15. Soustraire 7 de 100 et ainsi de suite. | |
| 16. (Chaque soustraction juste = 1) | |
| 17. Maximum 5 réponses correctes. | |
| 18. | |

MÉMOIRE

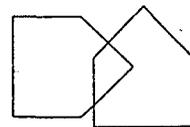
- | | |
|--|-------|
| 19. | |
| 20. Vous souvenez-vous des trois mots que vous avez répétés tout à l'heure ? | |
| 21. | |

LANGAGE

- | | |
|---|-------|
| 22. Qu'est-ce que c'est que cela ? (Montrer un crayon) | |
| 23. Qu'est-ce que c'est que cela ? (Montrer la montre) | |
| 24. Répétez : « Pas de si ni de mais » (chaque réponse correcte : 1) | |
| 25. Faire exécuter au sujet les 3 ordres successifs suivants : | |
| 26. « Prenez cette feuille de papier, pliez-la par le milieu, et posez-la par terre » | |
| 27. (maximum 3 points). | |
| 28. Lisez et faites ce qu'il y a sur cette feuille de papier (« fermez vos yeux »). | |
| 29. Écrivez une phrase de votre choix sur cette feuille. | |

ACTIVITÉ MOTRICE

- | | |
|---|-------|
| 30. Copiez ce dessin sur cette feuille. | |
|---|-------|



Annexe V

Critères du NINCDS-ADRDA

Selon MCKHANN et Coll. (1984)

I. The criteria for the clinical diagnosis of PROBABLE Alzheimer's disease include:

dementia established by clinical examination and documented by the Mini-Mental Test, Blessed Dementia Scale, or some similar examination, and confirmed by neuropsychological tests;

deficits in two or more areas of cognition;

progressive worsening of memory and other cognitive functions;

no disturbance of consciousness;

onset between ages 40 and 90, most often after age 65; and

absence of systemic disorders or other brain diseases that in and of themselves could account for the progressive deficits in memory and cognition.

II. The diagnosis of PROBABLE Alzheimer's disease is supported by:

progressive deterioration of specific cognitive functions such as language (aphasia), motor skills (apraxia), and perception (agnosia);

impaired activities of daily living and altered patterns of behavior;

family history of similar disorders, particularly if confirmed neuropathologically; and

laboratory results of:

normal lumbar puncture as evaluated by standard techniques,

normal pattern or nonspecific changes in EEG, such as increased slow-wave activity, and

evidence of cerebral atrophy on CT with progression documented by serial observation.

III. Other clinical features consistent with the diagnosis of PROBABLE Alzheimer's disease, after exclusion of causes of dementia other than Alzheimer's disease, include:

plateaus in the course of progression of the illness;

associated symptoms of depression, insomnia, incontinence, delusions, illusions, hallucinations, catastrophic verbal, emotional, or physical outbursts, sexual disorders, and weight loss;

other neurologic abnormalities in some patients, especially with more advanced disease and including motor signs such as increased muscle tone, myoclonus, or gait disorder;

seizures in advanced disease; and

CT normal for age.

IV. Features that make the diagnosis of PROBABLE Alzheimer's disease uncertain or unlikely include:

sudden, apoplectic onset;

focal neurologic findings such as hemiparesis, sensory loss, visual field deficits, and incoordination early in the course of the illness; and

seizures or gait disturbances at the onset or very early in the course of the illness.

V. Clinical diagnosis of POSSIBLE Alzheimer's disease:

may be made on the basis of the dementia syndrome, in the absence of other neurologic, psychiatric, or systemic disorders sufficient to cause dementia, and in the presence of variations in the onset, in the presentation, or in the clinical course;

may be made in the presence of a second systemic or brain disorder sufficient to produce dementia, which is not considered to be the cause of the dementia; and

should be used in research studies when a single, gradually progressive severe cognitive deficit is identified in the absence of other identifiable cause.

VI. Criteria for diagnosis of DEFINITE Alzheimer's disease are:

the clinical criteria for probable Alzheimer's disease and

histopathologic evidence obtained from a biopsy or autopsy.

VII. Classification of Alzheimer's disease for research purposes should specify features that may differentiate subtypes of the disorder, such as:

familial occurrence;

onset before age of 65;

presence of trisomy-21; and

coexistence of other relevant conditions such as Parkinson's disease.

