13 UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

ANNÉE UNIVERSITAIRE

50376

1994

 $N^{\circ} D'ORDRE : 1264$

1993-1994

THÈSE

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

PAR

PIERRE-ERIC SAUTIÈRE

MISE AU POINT D'UN MODÈLE CELLULAIRE DE DÉGÉNÉRESCENCE NEUROFIBRILLAIRE DE TYPE ALZHEIMER

Soutenue le 21 janvier 1994 devant le jury composé de:

Rapporteurs:	Monsieur le Professeur J. HUGON		
	Monsieur le Professeur J.N. OCTAVE		
Examinateurs:	Monsieur le Professeur A. VERBERT		
	Monsieur le Docteur F. HYAFIL		
Directeur de Thèse:	Monsieur le Docteur A. DELACOURTE		



50376 1994 13

A Véronique

A Héloïse et Jean-Baptiste, mes enfants A Claudine, mon épouse, A mes Parents A toute ma Famille A mes Amis

Aux patients atteints de la maladie d'Alzheimer

J'exprime tous mes remerciements,

à Monsieur A. Verbert, Professeur,

qui me fait le grand honneur de s'intéresser à ce travail et de juger ce mémoire. Je tiens à vous assurer de mon plus profond respect et à vous exprimer ma profonde admiration pour votre enseignement de qualité qui a toujours été clair et passionnant.

à Monsieur J. Hugon, Professeur,

pour avoir accepté de juger cette thèse. Notre collaboration a été pour moi très enrichissante, et nos rencontres toujours chaleureuses. Je vous prie d'accepter l'expression de ma reconnaissance et de mon respectueux attachement.

à Monsieur J.N. Octave, Professeur,

Votre compétence scientifique me rend votre avis précieux. Je suis très heureux de vous compter parmi mes juges.

à Monsieur Hyafil, Directeur de recherche,

pour l'honneur que vous me faites de juger mon travail. Je tiens à vous remercier également pour l'indispensable soutien dont j'ai bénéficié tout au long de ce travail, et vous prie d'accepter l'expression de ma profonde et respectueuse gratitude. à Monsieur A. Delacourte, Directeur de Recherches,

qui m'a confié ce thème de recherche passionnant et a dirigé ce travail. Vous avez su monter à Lille un groupe de recherches sur la Maladie d'Alzheimer et l'entraîner par votre dynamisme, dans la compétition internationale. Aussi, je tiens à vous exprimer ma profonde admiration. Vous m'avez accordé votre confiance en m'entraînant avec vous dans cette compétition, que cette thèse soit le témoignage de ma profonde reconnaissance.

à Monsieur M. Mazzuca, Professeur,

qui m'a aimablement accueilli dans son laboratoire et m'a permis de réaliser ce travail. Je vous en suis très reconnaissant.

Annick, permets-moi de te remercier vivement pour ta gentillesse, tes conseils et ton assistance précieuse, ton soutien moral et calorique tout au long de ce travail.

A Valérie, Luc et Stéphane, pour les moments passés ensemble dans une ambiance de travail stimulante et agréable.

A André Défossez et Patrick,

à Brigitte, Françoise, Laetitia, Marie-Christine, Marie-Laure, Ségolène, Valérie, André, Bernard, Bruno, Didier, Jordi, Matt, Pédrito, Philippe, et tous les membres de l'unité 156, avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler.

A tous ceux qui ont contribué à la réalisation de cette thèse.

Aux Laboratoires Glaxo et au Conseil Régional Nord Pas-de-Calais pour leur soutien financier. Ce travail à donné lieu aux publications suivantes:

avec comité de lecture

SAUTIÈRE P. E., SINDOU P., COURATIER P., HUGON J., WATTEZ A., DELACOURTE A. Tau antigenic changes induced by glutamate in rat primary culture model: a biochemical approach.

Neurosci. Lett. 140 (1992) 206-210.

SAUTIÈRE P. E., CAILLET-BOUDIN M.L., WATTEZ A., BUEE-SCHERRER V., DELACOURTE A. Alzheimer -type Tau epitope detection after okadaic acid treatment of neuroblastoma cells. C. R. Acad. Sci. Paris 316 (1993) 533-536.

SAUTIÈRE P. E., CAILLET-BOUDIN M.L., WATTEZ A., DELACOURTE A. Detection of Alzheimer-type Tau proteins in okadaic acid-treated SKNSH-SY 5Y neuroblastoma cells.

Neurodegeneration (1994) (sous presse)

 SINDOU P., <u>SAUTIÈRE P. E.</u>, COURATIER P., DELACOURTE A., HUGON J.
Modifications antigéniques de la protéine Tau induite sur des cultures primaires de neurones: études immunocytochimique.
C. R. Soc. Biol. 187 (1993) 87-95.

VERMERSCH P., SAUTIÈRE P. E., GOUDEMAND M., DELACOURTE A.

General cortical involvement in a late onset case of Alzheimer's disease: a biochemical approach by quantitation of abnormal Tau proteins. Mol. Chem. Neuropathol. 118 (1993) 213-224.

sans comité de lecture

SAUTIÈRE P. E., SINDOU P., COURATIER P., HUGON J., WATTEZ A., DELACOURTE A. The effectes of glutamate on Tau immunoreactivity in rat primary neuronal culture. Neurobiol. Aging, 13 (1992) S102.

SAUTIÈRE P. E., SINDOU P., COURATIER P., HUGON J., WATTEZ A., DELACOURTE A.
The effects of glutamate on Tau immunoreactivity in rat primary neuronal culture.
Alzheimer's Disease and Related Disorders in: Advances in the Biosciences Volume 87, 321-322 (eds Nicolini M., Zatta P.F. Corain B.) (1993) Pergamon Press Ltd., Oxford U.K.

SAUTIÈRE P. E., CAILLET-BOUDIN M.L., WATTEZ A., BUÉE-SCHERRER V., DELACOURTE A. Phosphorylation anormale de type Alzheimer induite sur les protéines Tau de cellules de neuroblastome en culture.

Bulletin de l'Association des Anatomistes, (1993) (sous presse).

SAUTIÈRE P. E., CAILLET-BOUDIN M.L., WATTEZ A., DELACOURTE A.

Inhibiton of phosphatases in neuroblastoma cells induces the formation of Alzheimer-type Tau proteins.

Soc. Neurosci. Abstr., (1993) S670.5.

SINDOU P., <u>SAUTIÈRE P. E.</u>, COURATIER P., DELACOURTE A., HUGON J. Immunocytochemical characterization of experimental Tau protein accumulation. Neurobiol. Aging, 13 (1992) S102.

HUGON J., SINDOU P., <u>SAUTIÈRE P. E.</u>, COURATIER P., YARDIN C., ESCLAIRE F., DELACOURTE A.

Tau neuronal modifications induced by calcium mediated glutamate toxicity.

Alzheimer's Disease and Related Disorders in: Advances in the Biosciences Volume 87, 307-308 (eds Nicolini M., Zatta P.F. Corain B.) (1993) Pergamon Press Ltd., Oxford U.K.

SINDOU P., COURATIER P., ESCLAIRE F., <u>SAUTIÈRE P. E.</u>, DELACOURTE A., BARTHE D., HUGON J.

Modification de la protéine Tau neuronale induite par le glutamate: immunocytochimie confocale, immunoblotting.

Bulletin de l'Association des Anatomistes, (1993) (sous presse).

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	3
ABRÉVIATIONS	4
INTRODUCTION	6
I. Description clinique de la maladie d'Alzheimer	6
I.1. La démence de type Alzheimer	6
I.2. Les troubles de la mémoire	6
I.3. Les troubles du langage	7
I.4. Les troubles praxiques	8
I.5. Les troubles gnosiques	8
I.6. Les troubles comportementaux	8
I.7. Les manifestations neurologiques	9
II. Description du système nerveux central au cours de la maladie d'Alzheimer	9
II.1. Aspect macroscopique	
II 2 Aspect microscopique	10
II 2 1 La perte neuronale	10
II.2.2. La réaction gliale	
II.3. Aspect histologique	10
II.4. Altérations neurochimiques	16
II.5. Etiopathogénie des lésions	17
II.6. Étiologie	
II.6.1. Facteurs génétiques	19
II.6.2. Autres facteurs de risque	24
II.7. Les traitements	24
III. Protéines Tau et dégénérescence neurofibrillaire	25
III.1. les protéines Tau normales	25
III.1.1. Structure des protéines Tau	26
III.1.2. Rôle des protéines Tau	27
III.1.3. Modifications post-traductionnelles	28
III.2. Phosphorylation des protéines Tau	28
III.2.1. Rôle de la phosphorylation	29
III.2.2. Hyperphosphorylation des protéines Tau	29
III.2.3. Sites de phosphorylation pathologique	
III.2.4. Phosphorylation anormale des protéines Tau in vitro	33
III.2.5. Kinases impliquées.	34
III.2.6. Les protéines phosphatases	40

IV. Approche des modèles expérimentaux de la maladie d'Alzheimer	42
IV.1. Marqueurs de la maladie d'Alzheimer	42
IV.2. Modèles existants de la maladie d'Alzheimer	47
IV.2.1. Modèles "amyloïde"	47
IV.4.2. Modèles d'induction de Tau	50
V. Conclusion	55
RÉSULTATS	56
I. Effet du glutamate sur des neurones corticaux de rats en culture:	56
II. Induction de Tau ^{PHF} dans des cellules de neuroblastome SKNSH-SY	
5Y	65
II.1. Influence de la différenciation sur le profil des protéines Tau	65
II.2. Effets du glutamate	66
II.3. Effet du peptide neurotoxique	66
II.4. Effet de l'acide okadaïque	70
II.4.1. Changements morphologiques	70
II.4.2. Induction de protéines Tau de type Alzheimer dans les	
cellules SKNSH-SY 5Y	72
II.4.3. Cinétique d'apparition des épitopes pathologiques de type	
Alzheimer	79
II.4.4. Effet dose	82
II.4.5. Réversibilité	82
II.4.6. Effets d'inhibiteurs de kinases	87
II.4.7. Traitement des protéines Tau à la phosphatase alcaline	90
CONCLUSION - PERSPECTIVES	96
MATÉRIEL ET MÉTHODES	102
I. Culture primaire de neurones d'embryons de rats	102
II. Culture des cellules SKNSH-SY 5Y	102
III. Traitement des cellules et des tissus	106
IV. Electrophorèses	107
V. Electrotransfert	110
VI. Analyse immunologique	110
BIBLIOGRAPHIE	114
ANNEXE	

<u>RÉSUMÉ</u>

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative caractérisée par la présence simultanée de deux types de lésions dans l'isocortex cérébral: les plaques séniles et les neurones en dégénérescence neurofibrillaire (DNF). La DNF se manifeste par l'accumulation intraneuronale de filaments appariés en hélice (PHF), dont les principaux constituants sont les protéines Tau. Celles ci sont anormalement phosphorylées, ce qui leur confère une masse moléculaire apparente de 55, 64, et 69 kDa. Pour élaborer un modèle expérimental de la maladie d'Alzheimer, nous avons recherché la présence de ce triplet de protéines Tau pathologiques, marqueur spécifique et fiable de la DNF, dans des neurones d'embryons de rats traités au glutamate et dans des cellules de neuroblastome humain SKNSH-SY 5Y, traitées a l'acide okadaïque, un inhibiteur des phosphatases 1 et 2A. Dans les neurones de rat, le glutamate induit des modifications d'immunoréactivité des protéines Tau, une masse moléculaire apparente plus élevée et un point isoélectrique plus acide. Cependant les épitopes caractéristiques des Tau^{PHF} ne sont pas détectés sur ces protéines Tau. Après différenciation et traitement des cellules SKNSH-SY 5Y par l'acide okadaïque, les protéines Tau hyperphosphorylées produites portent des épitopes caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. Elles ont une masse moléculaire de 55 et 64 kDa et un point isoélectrique plus acide. A l'aide d'inhibiteurs spécifiques de kinases, nous avons pu montrer que la protéine kinase C joue un rôle important dans la phosphorylation des protéines Tau. Le modèle cellulaire utilisant les cellules SKNSH-SY 5Y devrait déboucher sur la caractérisation des dysfonctionnements biochimiques responsables de la DNF et sur la recherche d'agents thérapeutiques capables de ralentir ou d'arrêter ce processus.

ABRÉVIATIONS

AchE	acetylcholinestérase
ACTH	adrenocorticotropic hormone
Alz	Alzheimer
AO	acide okadaïque
АроЕ	apolipoprotéine E
APP	amyloid protein precursor
AR	acide rétinoïque
ARNm	ARN messager
ßA4	peptide ß amyloïde
CAM PK	protéine kinase dépendante du calcium et de la calmoduline
cdK	kinase dépendante de cyclines
СН	chélérythrine
Chr	chromosome
COS	african green monkey kidney cells
CRF	corticotropin-releasing factor
DNF	dégénérescence neurofibrillaire
DTT	dithiotréitol
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
ERKs	extracellular signal-regulated kinase
FGF	fibroblast growth factor
GABA	acide gamma aminobutyrique
GAP	GTPase activating protein
GFAP	glial fibrillary acidic protein
Glu	glutamate
GSK	glycogen synthase kinase 3
HCHWA-D	hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis - Dutch type
HSP	heat-shock protein
KPI	kunitz protease inhibitor
MA	maladie d'Alzheimer
MAP	microtubule associated protein
МАР К	mitogen-activated protein kinase
МАРК-К	mitogen-activated protein kinase kinase
MBP Kinase	myelin basic protein kinase
MEM	modified Eagle's medium
musc	muscarinique

- 4 -

NGF	nerve growth factor
nic	nicotinique
NMDA	N-methyl-D-aspartate
PDGF	platelet-derived growth factor
PDPK	proline directed protein kinase
PHF	paired helical filament
pI	point isoélectrique
РІ-3-К	phosphatidyl inositol kinase 3
PKA	proteine kinase dépendante de l'AMPc
PKC	proteine kinase C
PP; Pase	phosphatase
PSP	paralysie supranucléaire progressive
Rsk	ribosomal S6 kinase
SDS	dodecyl sulfate de sodium
SLA	sclérose latérale amyotrophique
SOD	superoxyde dismutase
TPK	Tau protein kinase
VIP	vasoactive intestinal peptide

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I. DESCRIPTION CLINIQUE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

D'après les derniers chiffres publiés par l'INSEE, l'espérance de vie des Français est en augmentation constante: 81,1 ans pour les femmes et 72,9 ans pour les hommes en 1991, alors qu'elle était de 76,9 ans pour les femmes et 69 ans pour les hommes en 1975. Cette augmentation de l'espérance de vie dans les pays industrialisés, et la baisse de la natalité font de la maladie d'Alzheimer un problème social et économique préoccupant. En effet cette maladie, cause la plus fréquente de démence progressive de la personne âgée, frappe 5% de la population au delà de 65 ans et 15 à 20 % de la population après 80 ans. La maladie existe dans tous les pays avec une prévalence à peu près équivalente, et est observée avec la même fréquence dans toutes les races.

I.1. LA DÉMENCE DE TYPE ALZHEIMER

La démence de type Alzheimer résulte d'une affection qui détériore progressivement les fonctions intellectuelles. Les symptômes cliniques incluent des pertes de mémoire importantes, l'incapacité progressive à réaliser des tâches routinières, la perte du jugement, la désorientation, le changement de personnalité, la difficulté d'apprendre, et la perte du langage. Progressivement, les malades ne peuvent plus parler ou marcher et deviennent totalement invalides. La mort survient après une moyenne d'environ 7 ans d'évolution.

I.2. LES TROUBLES DE LA MÉMOIRE

Dans la maladie d'Alzheimer, les troubles de la mémoire sont constants. Ils apparaissent de façon insidieuse et sont volontiers mis sur le compte de l'âge. Ces troubles s'accentuent et retentissent rapidement sur les activités de la vie quotidienne et

- 6 -

constituent une source importante de réduction de l'autonomie. L'altération des diverses mémoires ne débute pas simultanément et n'évolue pas au même rythme: ainsi par exemple, la détérioration de la mémoire à long terme, caractérisée par le stockage illimité d'informations dans la durée et dans la quantité, est plus précoce et plus profonde que celle de la mémoire à court terme. De la même manière, la mémoire explicite, directement accessible à la conscience, est touchée très tôt, alors que certaines formes de mémoires implicites, ou mémoires inconscientes, semblent longtemps préservées.

L'hétérogénéité des troubles mnésiques des démences de type Alzheimer est extrême, dépendant du stade de la maladie, de la localisation des lésions, du niveau intellectuel prémorbide, de la psychopathologie associée, des circonstances de passage des tests et de nombreux autres paramètres. Elle se traduit par une grande variabilité des performances d'un patient à un autre, mais également d'un moment à un autre chez un même patient. (Derouesné, 1991).

I.3. LES TROUBLES DU LANGAGE

Les troubles du langage sont considérés avec les troubles mnésiques comme les troubles cognitifs les plus fréquents. Ils sont retrouvés dans 40 à 100 % des cas. Leur présence semble dépendre de la sévérité de la maladie et de sa durée au moment de l'examen (Selnes *et al.*, 1988). Elle pourrait être révélatrice chez les patients ayant une vulnérabilité particulière de l'hémisphère gauche (Jagust *et al.*, 1987; Green *et al.*, 1990).

Le langage oral est surtout perturbé au niveau de la capacité de traitement sémantique alors que les capacités de traitement syntaxique et phonologique sont respectées, ce qui témoigne d'une atteinte des processus contrôlés et d'une conservation relative des processus automatiques. Les troubles consistent principalement en un manque du mot et une réduction dans les épreuves de fluence verbale. Le langage écrit est plus précocement altéré que le langage oral. La lecture à haute voix est toutefois préservée.

- 7 -

I.4. LES TROUBLES PRAXIQUES

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'incapacité de reproduire correctement sur imitation des gestes bimanuels sans signification et l'incapacité à reproduire des figures ou des dessins géométriques sont des signes précocement observés dans la maladie d'Alzheimer.

I.5. LES TROUBLES GNOSIQUES

Les troubles gnosiques correspondent à l'incapacité à reconnaître un objet par l'intermédiaire de l'un de ses sens. Les troubles visuels sont les plus fréquents. Avec l'évolution de la maladie, les patients ont du mal à reconnaître des visages, même familiers.

I.6. LES TROUBLES COMPORTEMENTAUX

I.6.1. DÉPRESSION

Elle a d'abord été considérée comme une réaction psychologique du malade à la diminution de ses capacités intellectuelles, mais elle pourrait constituer une complication spécifique en rapport direct avec les lésions de la maladie d'Alzheimer. Étant donné la présence d'une démence, cette dépression est difficilement mesurable par les critères de diagnostic généralement utilisés pour les démences "primaires". De ce fait, les évaluations sur la fréquence de la dépression varient beaucoup selon les études (Derouesné, 1991).

I.6.2. COMPORTEMENTS PSYCHOPATHOLOGIQUES

Dans la vie quotidienne, le patient au début de la maladie, peut réduire son activité pour éviter de se mettre dans des situations qu'il ne peut assumer, ou parce qu'il a perdu l'initiative ou la motivation d'agir. Plus tardivement, la réduction d'activité peut témoigner de l'incapacité à effectuer diverses tâches du fait des difficultés à mémoriser les éléments nécessaires à leur exécution, à les planifier ou à les réaliser.

- 8 -

Les comportements d'agitation sont définis comme des activités verbales, vocales ou motrices qui ne sont pas expliquées par les besoins du patient ou les troubles cognitifs eux mêmes (Cohen-Mansfield & Billig, 1986). Ainsi, certains malades ont des conduites stéréotypées, ils réalisent des tâches sans raison. Les fugues sont fréquentes. Des comportements agressifs sont observés plus volontiers chez les patients qui ne comprennent pas les remarques de leur entourage ni pourquoi on leur interdit certaines choses. Ils se limitent habituellement à une irritabilité verbale et les violences physiques sont rares.

Une incontinence sphinctérienne est fréquemment rapportée lorsque la démence est évoluée.

I.7. LES MANIFESTATIONS NEUROLOGIQUES

Une augmentation du tonus musculaire est fréquemment mise en évidence au cours de la maladie d'Alzheimer: dans 30 % des cas dans les démences légères et dans 40 à 90 % des cas dans les démences plus évoluées. Des anomalies discrètes de la marche et de l'équilibre sont parfois rapportées.

Les myoclonies ne sont habituellement observées que dans les démences sévères.

II. DESCRIPTION DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL AU COURS DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

II.1. ASPECT MACROSCOPIQUE

Le poids des cerveaux de patients atteints de maladie d'Alzheimer est inférieur de 8 % à celui des sujets témoins du même âge. 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.*, 1989). L'évaluation de

-9-

l'atrophie temporale et hippocampique permet mieux de différencier les patients des témoins (Scheltens *et al.*, 1992).

II.2. ASPECT MICROSCOPIQUE

II.2.1. LA PERTE NEURONALE

L'atrophie cérébrale, contrairement au vieillissement cérébral normal où s'observe une diminution du volume des grands neurones, est due à une véritable perte neuronale dans la maladie d'Alzheimer qui est de l'ordre de 22 à 26 % (Terry *et al.*, 1981; Mountjoy *et al.*, 1983)

II.2.2. LA RÉACTION GLIALE

La réaction gliale est caractérisée par une gliose astrocytaire (Mandibur & Chuirazzi, 1990) et par une présence de cellules microgliales à la périphérie des lésions (Perlmutter *et al.* 1990). Ces cellules microgliales auraient pour fonction de phagocyter les constituants des lésions (Itagaki *et al.*, 1989; Wisniewski *et al.*, 1991), ou seraient un élément fondamental dans l'amyloïdose (Perlmutter *et al.*, 1990).

La protéine fibrillaire acide des cellules gliales (GFAP), marqueur du cytosquelette des astrocytes est augmentée d'une manière considérable dans l'ensemble du système nerveux central au cours de la maladie d'Alzheimer (Delacourte, 1990).

II.3. ASPECT HISTOLOGIQUE

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par la présence simultanée de deux types de lésions : les plaques séniles et les neurones en dégénérescence neurofibrillaire (figure 1). D'autres lésions comme la dégénérescence granulovacuolaire, l'accumulation, intraneuronale de lipofuschine, les corps de Hirano (au niveau de la corne d'Ammon) et les corps amylacés sont observées mais ne semblent pas avoir de signification pathologique précise.



FIGURE:1

Lésions rencontrées dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

A] Coupe histologique de cortex temporal - Réaction immunohistochimique avec un anticorps polyclonal anti BA4. L'anticorps marque les plaques séniles (grosses flèches) et l'angiopathie amyloïde (flèches fines).

B] Coupe histologique de cortex temporal. Réaction immunohistochimique avec un anticorps polyclonal anti Tau. L'anticorps marque les corps cellulaires neuronaux et de nombreux neurites disséminés dans le neuropile.

C] Coupe ultrafine de cortex frontal. Les PHF s'accumulent dans le cytoplasme des neurones en dégénérescence.

II.3.1. PLAQUES SÉNILES

II.3.1.1. description:

Les plaques séniles sont des dépôts de substance amyloïde sous forme de plaques plus ou moins compactes dans le domaine extra-cellulaire. Elle peut aussi s'accumuler dans la paroi des vaisseaux, il s'agit alors de l'angiopathie amyloïde.

En raison de sa structure secondaire en feuillets ß plissés, la substance amyloïde possède certaines propriétés telles que la diffraction des rayons X, la coloration élective par le rouge congo et la thioflavine S, la biréfringence lors d'une observation en lumière polarisée après coloration par le rouge congo. La structure filamenteuse des dépôts amyloïdes leur confère également une affinité pour les sels d'argent (Gallyas, 1971; Campbell *et al.*, 1987).

En microscopie électronique, la substance amyloïde est constituée de filaments droits de 7 à 10 nm de diamètre (Merz *et al.*, 1983).

II.3.1.2. constituants majeurs

Le constituant majeur des plaques séniles est un peptide de 40-43 acides aminés de 4 kDa environ, appelé peptide BA4 ou ß protéine (Glenner & Wong, 1984; Mori *et al.*, 1992). Il dérive du clivage aberrant d'un précurseur nommé précurseur de la protéine amyloïde (APP) qui a la structure d'un récepteur transmembranaire (Kang *et al.*, 1987). Les isoformes de l'APP identifiées, résultant d'un épissage alternatif, ont une taille variant entre 365 et 770 acides aminés (Kang *et al.*, 1987; Kitaguchi *et al.*, 1988; Ponte *et al.*, 1988; Tanzi *et al.*, 1988; De Sauvage & Octave, 1989; Jacobsen *et al.*, 1991).

II.3.1.3. constituants mineurs

D'autres constituants ont été mis en évidence dans les plaques par des techniques immunohistochimiques: α_1 -antichymotrypsine, apolipoprotéine B, apolipoprotéine E, collagène IV, protéines du complément, composé P amyloïde, facteur de croissance basique du fibroblaste (FGF), fibronectine, laminine,

- 12 -

glycosaminoglycannes, immunoglobulines, molécule 1 d'adhésion intercellulaire, protéase nexine I, protéoglycannes, etc...

II.3.1.4. origine

L'origine de la substance amyloïde reste inconnue. Les neurones (Masters *et al.*, 1985; Perry *et al.*, 1992), les cellules gliales (Wisniewski *et al.*, 1991; Perlmutter *et al.*, 1990) et les cellules endothéliales (Selkoe, 1990) pourraient en produire.

II.3.2. DÉGÉNÉRESCENCE NEUROFIBRILLAIRE

II.3.2.1. description

La dégénérescence neurofibrillaire se manifeste par l'accumulation de filaments appariés en hélice (PHF) dans le cytoplasme des neurones. Ces PHF ont un diamètre de 10 à 12 nm et forment une hélice d'un pas de 80 nm (Kidd 1963).

Les PHF possèdent des propriétés argyrophiles et peuvent être mis en évidence par imprégnation argentique. Il est ainsi possible de visualiser les péricaryons et les neurites des neurones en dégénérescence.

II.3.2.2. constituants majeurs

Les PHF sont des structures très insolubles et interdisent donc les analyses biochimiques conventionnelles. C'est par des techniques immunohistochimiques qu'on a montré que les protéines Tau sont le constituant antigénique majeur des PHF (Brion *et al.*, 1985; Delacourte & Défossez, 1986; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986a; Kosik *et al.*, 1986; Nukina & Ihara, 1986; Wood *et al.*, 1986). Le caractère insoluble des PHF leur permet de survivre après la mort des neurones. Ils forment alors des enchevêtrements neurofibrillaires extracellulaires ou "ghost tangles", et s'accumulent dans le neuropile.

Les protéines Tau incorporées dans les PHF (Tau^{PHF})

--> Les Tau^{PHF} sont anormalement phosphorylées (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986b; Ihara *et al.*, 1986; Wood *et al.*, 1986). Elles ont une masse moléculaire apparente de 55, 64 et 69 kDa en gel de polyacrylamide alors que les protéines Tau normales ont une masse moléculaire apparente comprise entre 45 et 62 kDa (Delacourte *et al.*, 1989a; Flament *et al.*, 1989a,b,c; Delacourte *et al.*, 1990; Ksiezak-Reding *et al.*, 1990; Brion *et al.*, 1991b) (voir shéma ci-dessous).

--> Elles ont un point isoélectrique plus acide compris entre 5,5 et 6,5 (Ksiezak-Reding *et al.*, 1992).

--> Elles sont incapables de se lier aux microtubules (Iqbal *et al.*, 1986) et s'assemblent pour former les PHF. Après leur déphosphorylation, les Tau^{PHF}, retrouvent la capacité de se lier aux microtubules (Bramblett *et al.*, 1993).

---> Elles sont particulièrement insolubles.



Schéma de migration électrophorétique en gel de polyacrylamide SDS des protéines Tau normales (T) et "Alzheimer" (Alz)

Dans le neurone, la déstabilisation des microtubules et l'accumulation des PHF perturbent le transport axonal. Le neurone gorgé de PHF ne pouvant plus assurer sa survie, dégénère.

Les parties N- et C-terminales des Tau^{PHF} ont une sensibilité différente à la pronase (Kondo *et al.*, 1988; Wischik *et al.*, 1988a; Brion *et al.*, 1991a). Elle doit être due à l'agencement des Tau^{PHF} dans les PHF: la partie N-terminale des Tau^{PHF} s'étendant à l'extérieur de l'axe des PHF est plus accessible aux protéases que la partie C-terminale étroitement insérée dans l'axe (Jakes *et al.*, 1991).



II.3.2.3. constituant mineur

La présence d'ubiquitine est détectée dans des préparations de PHF, et ceux-ci sont marqués par des anticorps anti ubiquitine (Mori *et al.*, 1987; Perry *et al.*, 1987; Grunke-Iqbal *et al.*, 1988). L'ubiquitine, en se fixant sur les protéines servirait de marqueur signal pour leur dégradation par les protéases (Hershko & Ciechanover, 1982).

II.4. ALTÉRATIONS NEUROCHIMIQUES

La plupart des études sont faites sur du matériel autopsique. Dans ce cas les lésions cérébrales peuvent être massives et la spécificité des déficits observée n'est pas certaine. Certains systèmes de neurotransmetteurs peuvent cependant être étudiés du vivant du malade par caméra à positons.

Il semble que l'atteinte des systèmes de neurotransmetteurs soit relativement spécifique et affecte principalement:

- les systèmes à projection diffuse, surtout cholinergiques, et dans une certaine mesure noradrénergiques et sérotoninergiques qui innervent le cortex cérébral.

- des neurones corticaux de projection, synthétisant des acides aminés excitateurs comme le glutamate;

- et enfin certaines catégories d'interneurones corticaux, en particulier ceux contenant du GABA (acide gamma amino butyrique) et de la somatostatine, et peut être d'autres neuropeptides.

L'atteinte d'un système de neurotransmetteur est d'autant plus probable et d'autant plus sévère que la maladie a eu un début plus précoce. La sélectivité de l'atteinte des neurones suggère fortement une atteinte rétrograde. Il est possible que les systèmes dégénèrent parce qu'une substance toxique est présente au niveau de leurs terminaisons. Une substance indispensable à leur survie comme par exemple le facteur de croissance nerveuse (NGF) peut être absente. Cette substance serait normalement transportée de façon rétrograde jusqu'aux corps cellulaires des neurones cholinergiques, à partir des zones de projection corticales ou hippocampiques. On peut également concevoir que la présence anormale de paires de filaments en hélice dans ces neurones suffise, ne serait-ce qu'en bloquant le transport axonal, à entraîner une altération de la synthèse du neurotransmetteur, et ultérieurement la mort du neurone aggravant les déficits neurochimiques. Il existe dans la maladie d'Alzheimer des altérations de nombreux systèmes de neurotransmetteurs, mais les relations entre ces déficits et les lésions cérébrales sont encore loin d'être éclaircies.

Neurotransmetteur	Enzyme de synthèse	Contenu en neurotransmetteur	Récepteurs	Neurones d'origine
Acétylcholine	(-)	(-)	N (musc) (-) (nic)	(-)
Noradrénaline	(-)	(-)	(-)	(-)
Sérotonine	?	(-)	(-) (S2)	(-)
GABA	N	N	(-) ou N (GABA _B)	(-)
Glutamate	?	N	(-) ou N	(-)
Somatostatine	1	(-)	(-)	(-) ou N
CRF	1	(-)	(+)	?

Tableau 1 récapitulatif des déficits neurochimiques: (N = normal)

II.5. ETIOPATHOGÉNIE DES LÉSIONS

Les personnes atteintes de la Trisomie 21, vivant au delà de 35-40 ans développent les deux types de lésions, plaques séniles et neurones en dégénérescence neurofibrillaire, caractéristiques de la maladie d'Alzheimer.

II.5.1. Évolution des plaques séniles

Différents types de plaques séniles contenant la protéine $\beta A4$ ont été décrits. Ils sont le reflet des différentes étapes de maturation des plaques. L'étude de l'évolution des dépôts du peptide $\beta A4$ dans le cerveau de personnes atteintes de Trisomie 21 a permis de mieux comprendre le processus de maturation des plaques séniles.

Les premières lésions sont vraisemblablement des plaques diffuses, non fibrillaires, qui consistent en une infiltration focalisée extracellulaire du peptide $\beta A4$, avec peu ou pas de neurites en dégénérescence sur le pourtour (Davies *et al.*, 1988; Tagliavini *et al.*, 1988; Yamaguchi *et al.*, 1988; Joachim *et al.*, 1989). C'est le type de plaques qui prédomine au cours de la maladie d'Alzheimer: ces plaques ne causent que peu d'altérations structurales dans le neuropile (Wisniewski *et al.*, 1989a). L'apparition des dépôts de BA4 précède la perte synaptique; l'inverse n'a pas été démontré. Ces infiltrations apparaissent bien avant les plaques séniles extracellulaires matures et les enchevêtrements neurofibrillaires extracellulaires (Giaccone *et al.*, 1989; Mann *et al.*, 1990; Mann & Esiri, 1989). Avec la progression de la maladie, les plaques immatures ou matures sont plus abondantes. Les dépôts de BA4 sont entourés de neurites dystrophiques, qui peuvent être immunomarqués par des anticorps dirigés contre les protéines Tau, les PHF ou l'ubiquitine. Les dépôts dans ces plaques sont denses, et contiennent des filaments droits de 7 à 10 nm de BA4, associés en feuillets ß plissés. Ces plaques créent des altérations dans le neuropile et sont souvent entourées d'astrocytes et de cellules microgliales (Delacourte, 1990; Wisniewski *et al.*, 1989b).

Les régions néocorticales sont particulièrement affectées dans la maladie d'Alzheimer. Les lobes temporaux et occipitaux sont les plus riches en plaques séniles, suivis des lobes pariétaux et frontaux. La région limbique contient en général peu de dépôts amyloïdes (Arnold *et al.*, 1991 ; Price *et al.*, 1991). L'utilisation d'anticorps dirigés contre le peptide A4 a permis de montrer que les dépôts amyloïdes ont en fait une distribution moins restreinte. Ils sont retrouvés dans toutes les couches du cortex (Braak & Braak, 1991; Delaère *et al.*, 1991) et même à la limite substance blanche substance grise (Braak & Braak, 1991) ou au niveau de certains microvaisseaux dans la substance blanche (Behrouz *et al.*, 1991).

I.5.2. Évolution de la dégénérescence neurofibrillaire

Le développement des lésions neurofibrillaires dans la maladie d'Alzheimer a été divisé en six stades. Les premières lésions neurofibrillaires sont localisées dans la couche pré-alpha de la région trans-entorhinale (stade I et stade II). A ces stades, les patients ne présentent pas encore de troubles de la mémoire. Ceux-ci n'apparaissent qu'aux stades III et IV quand il y a une atteinte plus sévère des couches pré-alpha des régions entorhinales et trans-entorhinales. La plupart de ces neurones présentent des enchevêtrements neurofibrillaires intracellulaires et des neurites en dégénérescence. Les premiers enchevêtrements neurofibrillaires extra-cellulaires (ghost tangles) apparaissent. Une atteinte plus modérée de la couche I de la corne d'Amon de l'hippocampe et des noyaux sous corticaux est également observée. Aux stades V et VI, les lésions neurofibrillaires envahissent les aires associatives de l'isocortex (Braak & Braak, 1991). A ces stades, les patients présentent une démence sévère.

II.6. ÉTIOLOGIE

Il semble exister une prédominance de cas chez les femmes, mais ceci est assez difficile à démontrer, car elles ont une espérance de vie plus élevée que les hommes et donc plus de risque de développer ce type de maladie. D'autres facteurs de risque ont été identifiés, mais pour la plupart d'entre eux, il reste à confirmer le rôle par des études plus précises. C'est le cas de la prédominance de la maladie chez les gauchers, de l'influence de l'âge de la mère à la naissance du sujet, des antécédents de traumatisme crânien. Enfin, il vient d'être démontré que l'ApoE est un facteur de risque important (voir chapitre suivant)

II.6.1. FACTEURS GÉNÉTIQUES

Bien que la majorité des cas de maladie d'Alzheimer soient sporadiques, plusieurs arguments suggèrent que des facteurs génétiques sont impliqués dans la maladie. Ainsi chez les jumeaux monozygotes, si l'un des jumeaux est atteint de la maladie d'Alzheimer, l'autre a un risque élevé, de l'ordre de 40 %, de développer aussi la maladie (Nee *et al.*, 1987). Des études épidémiologiques ont montré d'une façon constante que la présence d'antécédents familiaux constituaient un risque majeur de développer la maladie (Heston *et al.*, 1981). De plus, dans quelques familles (environ 15 %)(Campion *et al.*, 1993), la maladie est transmise selon une loi génétique classique: le mode autosomique dominant (Folstein, 1989). Dans ce cas, chaque enfant d'un malade a un risque de 50 % d'être atteint.

- 19 -

Les similitudes histologiques observées entre la Trisomie 21 et la maladie d'Alzheimer ont orienté les premières études génétiques sur le chromosome 21. Dans la Trisomie 21, le taux d'expression d'ARN messager (ARNm) du précurseur de l'APP est augmenté (Tanzi *et al.*, 1987; Rumble *et al.*, 1989).

II.6.1.1. Le chromosome 21

Plusieurs mutations du gène de l'APP ont été identifiées. Certaines sont reliées spécifiquement à la maladie d'Alzheimer (mutations 717 et 670/671), alors que d'autres ne le sont pas (692 et 693).

Des mutations sur le codon 717 du gène responsable de la production de l'APP, situées sur le chromosome 21 à proximité de la région incriminée par les études génétiques, ont été identifiées chez des membres atteints des formes familiales de la maladie d'Alzheimer à début précoce. Ces mutations transforment la valine en une isoleucine (Goate *et al.*, 1991; Naruse *et al.*, 1991), en une phenylalanine (Murell *et al.* 1991) ou en une glycine (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; Tanzy *et al.*, 1992). Ces mutations du codon 717 provoqueraient un dérèglement du métabolisme de l'APP qui conduit à la maladie d'Alzheimer (Hardy & Allsop 1991).

D'autres mutations ont été mises en évidence sur le gène du précurseur amyloïde

- aux codons 670/671 transformant la lysine et la methionine en asparagine et leucine respectivement (Mullan *et al.*, 1992a) dans les cas d'Alzheimer familiaux à début précoce.

- au codon 692 transformant l'alanine en une glycine trouvée à la fois chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer et également chez des patients présentant des hémorragies cérébrales héréditaire avec angiopathie de type hollandais (HCHWA-D) (Hendriks *et al.*, 1992). - au codon 693 transformant l'acide glutamique en glutamine trouvée chez des patients présentant des hémorragies cérébrales héréditaire avec angiopathie de type hollandais (HCHWA-D) (Hendriks *et al.*, 1992).

Comment des mutations sur le gène de l'APP peuvent conduire à la maladie d'Alzheimer ?

L'APP est une glycoprotéine membranaire de fonction inconnue (figure 2). Les mutations pathogéniques, spécifiques des formes familiales précoces de la maladie d'Alzheimer, sont situées de part et d'autre de la séquence du peptide BA4. Ces mutations pourraient modifier d'une façon ou d'une autre la dégradation de l'APP et aboutir à l'accumulation de la protéine BA4 dans le tissu cérébral.

Par exemple, la transfection de cellules avec le gène de l'APP portant la double mutation 670/671 entraîne une forte augmentation de la production du peptide BA4 (Citron *et al.*, 1992; Cai *et al.*, 1993).

Des molécules synthétiques de BA4 ont la propriété de s'autoagréger, formant des polymères insolubles difficiles à métaboliser (Masters *et al.*, 1985; Castaño *et al.*, 1986; Kirschner *et al.*, 1987; Hilbich *et al.*, 1991). De plus il a été montré que des peptides synthétiques fabriqués à partir de la séquence de la BA4 sont neurotoxiques pour des neurones en culture ou quand ils sont injectés dans le cerveau de rat (Kowall *et al.*, 1991; Yankner *et al.*, 1989; Frautschy *et al.*, 1991). La présence d'un grand nombre de dépôts de substance amyloïde perturberait l'homéostasie calcique des neurones soit directement (Mattson *et al.*, 1993), soit en potentialisant la neurotoxicité d'acides aminés excitateurs comme le glutamate (Koh *et al.*, 1990; Carette *et al.* 1993; Mattson *et al.* 1992, 1993). Le peptide BA4 induirait alors la dégénérescence neurofibrillaire.

II.6.1.2. Le chromosome 14

Les mutations découvertes sur le gène de l'APP ne sont détectées que dans une faible proportion des cas de maladie d'Alzheimer familiale à début précoce. La présence d'un autre gène inconnu, localisé sur le bras long du chromosome 14, serait reliée à certaines formes familiale de la maladie d'Alzheimer à début précoce (Schellenberg *et*



FIGURE 2:

Représentation schématique de l'APP770 et de la séquence du peptide BA4.

Les sites potentiels de liaison à l' α 1-antichymotrypsine et à l'Apo E, la région neurotoxique, ansi que les sites de clivage de la voie majeure et de la voie mineure sont indiqués sur la séquence du peptide β A4. al., 1992; St George-Hyslop et al., 1992; Van Broeckhoven et al., 1992; Mullan et al., 1992b). Des gènes candidats de la maladie d'Alzheimer sont localisés dans cette région. Il s'agit des gènes de la protéine de choc thermique (HSP 70), de la protéine cFos, et de l'alpha-1-antichymotrypsine (constituant des plaques séniles). Toutefois, des mutations sur les gènes de l'HSP 70 et de cFos n'ont pas été mises en évidence et la position du gène de l'alpha-1-antichymotrypsine situé dans la partie distale du chromosome 14 l'exclut également comme étant responsable de la maladie.

II.6.1.3. Le chromosome 19

Les mutations sur un seul gène ne peuvent pas expliquer l'ensemble des maladies d'Alzheimer à début tardif. D'autres familles peuvent être porteuses de mutations qui n'ont pas encore été découvertes. Dans une même famille, il peut y avoir plusieurs gènes mutés. Il est également possible que des facteurs non génétiques interviennent. Ainsi, à côté des analyses de liaisons portant sur le chromosome 21 et le chromosome 14, des études familiales ont montré une association possible entre la région q13.2 du chromosome 19 et la démence de type Alzheimer à début tardif.

Parmi les produits des gènes présents dans cette région se trouve l'apolipoprotéineE ou ApoE, protéine pouvant jouer un rôle particulier dans le système nerveux et les maladies neurodégénératives. L'ApoE est notamment un constituant des plaques séniles. Il existe trois isoformes de 299 acides aminés issues de polymorphismes du gène. Les polymorphismes portent uniquement sur les acides aminés 112 et 158, les trois isoformes majoritaires sont l'ApoE₂, l'ApoE₃ et l'ApoE₄. L'isoforme ApoE₄ possède 2 arginines en 112 et 158, l'isoforme ApoE₃ possède une cystéine en 112 et l'isoforme ApoE₂ possède 2 cystéines sur les 2 sites. La fréquence de l'allèle E₄ dans la population serait de 16 % chez les personnes témoins alors qu'elle serait de 50 % dans les familles des patients atteints d'une maladie d'Alzheimer (Strittmatter *et al.* 1993a). Dans une étude portant sur 42 familles (comprenant 234 individus), Corder *et al.*, (1993) montrent que le risque de maladie (à l'âge de 75 ans) atteint 90 % quand le sujet possède deux allèles E₄, il est de 45 % chez ceux qui n'ont qu'un seul allèle et de 20 % chez ceux qui n'en n'ont aucun. Chez 500 patients de cas sporadiques d'Alzheimer, Saunders *et al.*, (1993) ont trouvé une fréquence de 64 % d'individus ayant au moins une copie de l'allèle E4 contre 31 % dans les différents groupes témoins. C'est la plus fréquente de toutes les associations génétiques trouvées avec la maladie. L'apolipoprotéine E4 qui participe au transport du cholestérol véhiculet-elle la protéine amyloïde ? L'ApoE serait-elle une protéine chaperonne qui participerait à la rétention de la protéine amyloïde dans les plaques. Certaines observations vont dans ce sens. La détection du peptide amyloïde dans les plaques serait plus intense dans le cerveau de personne porteuse des deux l'allèles E4 (Schmechel *et al.*, 1993). Par ailleurs, la formation d'un dimère de l'ApoE3 avec la protéine β A4 est plus lente que celui de l'ApoE4 avec la protéine β A4 (Strittmatter *et al.*, 1993b).

II.6.2. AUTRES FACTEURS DE RISQUE

Ces derniers résultats montrent qu'un constituant des plaques séniles, l'ApoE4 peut être impliqué dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer. D'autres constituants présents dans les dépôts amyloïdes peuvent jouer un rôle dans l'amyloïdogénèse en interagissant avec le peptide BA4 et en favorisant son accumulation. La surexpression de l'alpha 1 antichymotrypsine humaine entraine chez des souris transgéniques l'apparition de dépôts diffus de BA4 (Kuljis *et al.*, 1993). Certains héparanes sulfates protéoglycannes possèdent une affinité spécifique pour le peptide BA4 (Buée *et al.*, 1993).

II.7. LES TRAITEMENTS

Si la recherche d'une thérapie tendant à 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 à

- 24 -

cause du caractère excitotoxique de ce neurotransmetteur. Il a été aussi envisagé d'agir sur les phénomènes biologiques tels que la protéolyse ou la phosphorylation, qui conduisent à l'accumulation des constituants des lésions neuropathologiques. De même, l'utilisation de facteurs trophiques et de greffes cellulaires a été proposée (pour revue, voir Pomponi *et al.*, 1990).

III. PROTÉINES TAU ET DÉGÉNÉRESCENCE NEUROFIBRILLAIRE

Les signes cliniques de démence sont très bien corrélés à la dégénérescence neurofibrillaire et à la perte neuronale. Les protéines Tau 55, 64 et 69, constituants de base des lésions neurofibrillaires, semblent donc être des marqueurs biochimiques de choix pour élaborer des modèles cellulaires ou animaux de dégénérescence de type Alzheimer.

III.1. LES PROTÉINES TAU NORMALES

Le gène des protéines Tau chez l'homme, se situe sur le chromosome 17 (Neve *et al.*, 1986) et s'étend sur 100 kb . L'ADN est transcrit en un ARN immature appelé transcrit primaire qui contient 16 exons, dont 3 ne sont jamais transcrits chez l'homme (exons 4A, 6 et 8). Les exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 et 13 sont exprimés de manière constitutives. (Andreadis *et al.*, 1992).



Par épissage alternatif, ce transcrit primaire peut donner naissance à plusieurs ARN messagers.

ARNm des protéines Tau



Les ARN messagers seront traduits en autant de protéines différentes. La traduction ne commence qu'à partir de l'exon 1 (Andreadis *et al.*, 1992).

III.1.1. STRUCTURE DES PROTÉINES TAU

Dans le cerveau adulte humain, six isoformes des protéines Tau sont présentes (isoformes A, B, C, D, E et F sur le schéma ci-dessous). Elles diffèrent par la présence ou non

- d'un ou deux inserts du côté N-terminal de 29 ou 58 acides aminés

- d'une séquence répétitive de 31 ou 32 acides aminés dans la partie Cterminale.

La présence ou non des inserts du côté N-terminal et de la séquence répétitive du côté C-terminal confère aux protéines Tau une masse moléculaire apparente, déterminée en gel de polyacrylamide, qui varie entre 45 et 62 kDa.

Introduction



Les isoformes avec l'insert de 58 acides aminés (C et F) seraient présentes en plus faible quantité, à la fois dans les protéines Tau normales et les Tau^{PHF} (Hasegawa *et al.*, 1992).

Selon les espèces, le nombre d'isoformes et la masse moléculaire sont variables.

L'expression des protéines Tau est régulée au cours du développement: une seule isoforme est présente à la naissance, l'isoforme foetale. Elle ne contient pas d'insert ni de séquence répétitive supplémentaire (Goedert *et al.*, 1989b; Kosik *et al.*, 1989) (dans la figure ci-dessus, elle correspond à l'isoforme A).

III.1.2. RÔLE DES PROTÉINES TAU

Les protéines Tau sont des protéines associées aux microtubules (Cleveland *et al.*, 1977a,b). Des régions répétées 3 ou 4 fois dans la partie C-terminale des protéines Tau contenant toutes une séquence Pro-Gly-Gly-Gly, correspondent à des sites de liaison aux microtubules (Lee *et al.*, 1988; Goedert *et al.*, 1988, 1989b; Himmler *et al.*, 1989; Mori *et al.*, 1989; Kosik *et al.*, 1989; Andreadis *et al.*, 1992). Pour cette raison,

- 27 -
les isoformes des protéines Tau n'interagissent pas avec la tubuline de la même manière (Goedert & Jakes, 1990).



III.1.3. MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES

Les différences existant entre les protéines Tau normales et les protéines Tau incorporées dans les PHF (appelées Tau^{PHF} ou triplet pathologique) proviennent de modifications post-traductionnelles car l'épissage des ARNm des protéines Tau semble identique chez les témoins et chez les Alzheimer.

Des modifications post-traductionnelles autres que la phosphorylation peuvent exister comme la déamidation (Montejo de Garcini *et al.*, 1986), la ε -N-methylation des résidus de lysine (Wischik *et al.*, 1988b). En fait, Hasegawa *et al.*, (1992) ont montré que les protéines Tau normales et les Tau^{PHF} commencent toutes par une alanine acétylée et non pas par une méthionine. La ε -N-méthylation des résidus de lysine dans la partie C-terminale des protéines Tau n'a pas été mise en évidence.

III.2. PHOSPHORYLATION DES PROTÉINES TAU

Les protéines Tau sont des phosphoprotéines. Par analyse bidimensionnelle, environ vingt protéines sont détectées avec des points isoélectriques (pI) variant entre 6,5 et 8,5 (Cleveland *et al.*, 1977 a,b).

Les protéines Tau foetales sont plus phosphorylées que les protéines Tau adultes. Ceci a été montré par des études de déphosphorylation à la phosphatase alcaline: une diminution de masse moléculaire plus importante est observée avec des protéines Tau foetales qu'avec les protéines Tau normales (Goedert *et al.*, 1992).

III.2.1. RÔLE DE LA PHOSPHORYLATION

La phosphorylation régule la liaison des protéines Tau aux microtubules. Les protéines Tau déphosphorylées favorisent la polymérisation des microtubules (Lindwall & Cole, 1984; Drubin & Kirschner, 1986). Ceci a été montré par plusieurs études: - Des protéines Tau phosphorylées *in vitro* par la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) et la protéine kinase dépendante du calcium et de la calmoduline (CaM PK) et déphosphorylées ensuite par un mélange des sous-unités catalytiques de phosphatases 1 et 2A, favorisent à nouveau la polymérisation des microtubules (Yamamoto *et al.*, 1988).

- Plus récemment, Biernat *et al.*, (1993) ont montré que la phosphorylation de la Ser²⁶² située dans le premier domaine de liaison aux microtubules (motif Ile-Gly-Ser) réduit d'un facteur 3 ou 4, la quantité de protéines Tau qui se lient aux microtubules. La kinase phosphorylant ce site n'a pas encore été identifiée.

III.2.2. HYPERPHOSPHORYLATION DES PROTÉINES TAU

La plupart des sites phosphorylés qui ont été déterminés sur les Tau^{PHF} sont des sites phosphorylés sur les protéines Tau foetales. Il semble donc que les mécanismes de phosphorylation qui sont actifs pendant le développement et progressivement réprimés avec la maturation du cerveau soient réactivés au cours de la maladie d'Alzheimer.

Les effets de l'hyperphosphorylation des protéines Tau ne sont pourtant pas identiques chez le foetus et chez l'Alzheimer. Dans le cerveau foetal, une seule isoforme est présente, sans insert côté N-terminal avec trois domaines répétitifs (isoforme A). L'hyperphosphorylation n'entraîne pas son agrégation. Dans le cerveau d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer, six isoformes sont présentes, deviennent anormalement phosphorylées (voir shéma page 14) et s'assemblent sous forme de PHF (Goedert *et al.*, 1993).

- 29 -

L'isoforme foetale contribuerait à la plasticité neuronale au cours du développement. La présence de seulement trois domaines de liaison aux microtubules permettant de changer rapidement l'équilibre des microtubules entre l'état polymérisé et l'état dépolymérisé, doit augmenter la faculté des dendrites et des axones à se repositionner entre eux quand ils établissent des contacts avec d'autres neurones. La phosphorylation des résidus de sérine ou de thréonine dans un domaine de liaison ou une région proche des domaines de liaison aux microtubules, la Ser²⁰² (Goedert et al., 1993) la Thr²³¹ (Hasegawa et al., 1993) la Ser³⁹⁶ (Lee et al., 1991; Kanemaru et al., 1992; Bramblett et al., 1993; Pope et al., 1993), qui n'apparaît qu'au stade foetal doit réduire encore plus l'affinité des protéines Tau pour les microtubules. Plus tard au cours du développement, la stabilisation du cytosquelette peut se faire par déphosphorylation des différentes sérines puis par la synthèse de protéines Tau contenant quatre domaines répétitifs. En effet, Pope et al. (1993) ont montré que des cellules ganglionnaires de rétine de poulet, présentaient une immunoréactivité avec l'anticorps PHF 1 très sélective du stade E10 au stade P 0. Cette immunoréactivité exprimée au cours du développement n'est pas liée à la mort programmée des neurones ganglionnaires qui a lieu au cours de l'embryogenèse. Elle est localisée dans les axones en cours de différenciation. Ces résultats sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle les neurones dans le cerveau des personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer tentent de régénérer leurs extensions neuritiques. Cependant, la présence d'un phosphate à proximité du domaine de fixation aux microtubules, doit gêner la liaison protéines Tau-microtubules.

III.2.3. SITES DE PHOSPHORYLATION PATHOLOGIQUE

Les sites de phosphorylation pathologique sont situés en majorité autour des sites de fixation aux microtubules, c'est à dire dans le milieu et à l'extrémité C-terminale de la protéine Tau.

Les sites de phosphorylation qui transforment les Tau normales en Tau^{PHF} sont souvent suivis par des prolines.

Des anticorps, dont la fixation dépend de l'état de phosphorylation du site reconnu, ont permis d'identifier certains sites de phosphorylation anormale sur les Tau^{PHF} (Cf. tableau 2).

Il est par ailleurs intéressant de noter que des anticorps anti-phosphotyrosine ne reconnaissent pas les Tau^{PHF}. Cela signifie que la phosphorylation anormale ne concerne probablement pas les résidus de tyrosine (Brion *et al.*, 1993).

Au total les Tau^{PHF} sont phosphorylées sur au moins 7 sites répartis sur toute la molécule. Quant aux protéines Tau normales, elles sont phosphorylées sur un ou deux sites localisés dans la région C-terminale (Hasegawa *et al.*, 1992). Des résultats sensiblement différents sont obtenus lors de l'analyse du contenu en phosphate des Tau^{PHF} par Iqbal & Grunke-Iqbal, (1991) qui trouvent une moyenne de 12 moles de phosphate / mole de protéine. Ksiezak-Reding *et al.*, (1992) trouvent une moyenne de 6 à 8 moles de phosphate / mole de protéine, mais les résultats varient entre 3 et 15 moles de phosphate / mole de protéine selon les aires et les patients étudiés. En fait, dans chaque analyse, les Tau^{PHF} sont 3 à 4 fois plus phosphorylées que les protéines Tau normales.

				Marq			
Nom	Localisation	Site	Tau foctales	Tau adultes	TauPHF	Autres	Références
Abz 50	2 - 10		+	+	+	Í	Kosik et al., 1988; Goedert e al., 1991
RT97	45 - 73	Site KESP, Ser 48 phosphorylée. Conformation importante.	-	+	+	neurofilaments	Anderton et al., 1982; Miller al., 1986
Tau 2	95 - 108	Ser 101 est très importante, chez le rat, la souris et l'homme, elle est remplacée par une Pro, mais le marquage est plus faible	•	+	+		Papasozomenos et Binder 198 Watanabe et al., 1992
5 E2	156 - 175		+	+	+		Kosik et al., 1988
Tau 1	192 - 204	Ser 199 et Ser 202 non phosphorylées	+/-	+			Binder et al., 1985; Liu et al. 1993; Szendrei et al., 1993
AT8	198 - 220	Ser 199 et/ou Ser 202 phosphorylées	+/-	•	+		Biernat et al., 1992; Merken al., 1992
M4	198 - 250	Thr 231 probablement phosphorylée.	+	-	+		Hasegawa et al., 1993
SMI33	KSP	Ser 235 non phosphorylée	+/-	+	-	neurofilaments	Sternberger et al., 1985; Lichtenberg-Kraag et al., 199
8D8	222 - 427	Site KSP, Ser 235 ou Ser 435 phosphorylées	+	-	+	neurofilaments	Anderton et al., 1982; Miller al., 1986
C5	386 - 406	Ser 396 ou Tyr 394 phosphorylées	+	-	+		Hasegawa et al., 1993
PHF 1	389 - 402	Site de TP3 (équivalent polyclonal)Ser 396 phosphoprylée. Reconnait également Ser 400 phosphorylée	+	•	+		Greenberg et al., 1992; Lang al., 1992a,b; Pope et al., 199
SMI31	386 - 406	Ser 396 et Ser 404 phosphorylées	+	-	+	neurofilaments	Stemberger et al., 1982; Lichtenberg-Kraag et al., 199
ptau 1	402 - 417		+	-	+		Kanemaru et al., 1992
ptau 2	402 - 417	Ser 404 importante	+	•	+		Kanemaru et al., 1992
SMI 34		Dépend d'interactions situées de chaque côté du domaine de fixation aux microtubules et de la phosphorylation	+	-	+		Sternberger et al., 1982; Lichtenberg-Kraag et al., 199

TABLEAU 2

Tableau récapitulatif de quelques anticorps monoclonaux reconnaissant les protéines Tau.



III.2.4. PHOSPHORYLATION ANORMALE DES PROTÉINES TAU IN VITRO

La phosphorylation *in vitro* de protéines Tau recombinantes par des activités kinasiques présentes dans des homogénats de cerveau de porc (Gustke *et al.*, 1992) a permis de proposer un modèle de phosphorylation anormale en trois étapes. Elles acquièrent les propriétés des Tau^{PHF}:

- une migration en gel de polyacrylamide ralentie

- la détection par des anticorps spécifiques des Tau^{PHF} (Biernat *et al.*, 1992; Lichtenberg-Kraag *et al.*, 1992).

- une diminution de l'affinité pour les microtubules

Ces trois étapes de phosphorylation ont été également observées avec des protéines Tau normales purifiées, en présence d'ATP et d'acide okadaïque, un inhibiteur des phosphatases 1 et 2A (Furiya *et al.*, 1993).

La première étape dure environ 2 à 3 heures, la phosphorylation réduit l'affinité des protéines Tau pour les microtubules d'un facteur trois (Guske *et al.*, 1992). Les sérines Ser⁴⁰⁴ (responsable d'une augmentation de la masse moléculaire apparente), Ser²⁰², Ser²³⁵ et Ser²⁶² (qui n'est pas suivie d'une proline) sont phosphorylées. C'est à la deuxième étape que la sérine Ser³⁹⁶ est phosphorylée, mais elle n'est pas la seule à être responsable du ralentissement de mobilité électrophorétique et de la diminution de l'affinité des Tau pour les microtubules. Les différents sites phosphorylés doivent interagir entre eux pour générer une nouvelle conformation. Les protéines Tau sont alors reconnues par des anticorps spécifiques des Tau^{PHF}. Il faut environ 10 heures pour atteindre l'état de phosphorylation de la deuxième étape et approximativement 24 heures pour la troisième étape, toutes les Ser/Pro des protéines Tau sont alors phosphorylées (environ 6 ou 7 selon les isoformes). Ces étapes sont bien distinctes suggérant un mécanisme de phosphorylation séquentiel (Lichtenberg-Kraag *et al.*, 1992).

III.2.5. KINASES IMPLIQUÉES.

Quelles sont les protéines kinases impliquées dans la phosphorylation pathologique des protéines Tau ? Il est difficile de répondre à cette question car les études sont généralement réalisées *in vitro*.

La PKA (Pierre & Nunez, 1983; Steiner et al., 1990), la protéine kinase C (PKC) dépendante du calcium et des phospholipides, (Baudier et al., 1987; Hoshi et al., 1987), la protéine kinase II dépendante du calcium et de la calmoduline (Yamamoto et



DSP QLATLAD EVSASLAKQG L

Introduction

FIGURE: 3

Séquence des protéines Tau humaines décrite par Goedert *et al.* (1989a) sur laquelle est indiqué l'emplacement des sites de phosphorylation des protéines Tau^{PHF}.

Les séquences entre les accolades correspondent aux inserts qui différencient les isoformes entre-elles.

L'isoforme foetale ne contient pas d'insert.

Les isoformes adultes sont des isoformes:

- Sans insert côté N-terminal, avec ou sans l'insert côté C-terminal [275-305]

- Avec l'insert 1^[45-73], avec ou sans l'insert côté C-terminal ^[275-305]

- Avec l'insert 1^[45-73] et l'insert 2^[74-102], avec ou sans l'insert côté C-terminal ^[275-305]

Les séquences encadrées sont celles qui interagissent avec les microtubules, il y en a 3 ou 4 selon les isoformes.

Les étoiles correspondent aux sites anormalement phosphorylés des protéines Tau^{PHF}.

Les séquences soulignées sont les sites reconnus par les anticorps mentionnés dessous.

Introduction

al., 1983, 1985; Baudier & Cole, 1987) et la caséine kinase (Steiner et al., 1990) peuvent phosphoryler les protéines Tau.

La phosphorylation (normale) des isoformes Tau par la PKA et la CaM PK réduit leur mobilité électrophorétique en gel de polyacrylamide (Litersky & Johnson, 1992). Mais seule la phosphorylation par la PKA altère les interactions entre les protéines Tau et la tubuline (Litersky & Johnson, 1992; Scott *et al.*, 1993a) et diminue la sensibilité des protéines Tau à l'hydrolyse par la calpaïne (Litersky & Johnson, 1992). Les sérines en position 214, 324, 356, 409, et 416 sont phosphorylées par la PKA (Scott *et al.*, 1993a). La CaM PK phosphoryle également la Ser⁴¹⁶ (Steiner *et al.*, 1990), ce qui induit un ralentissement de la mobilité électrophorétique des protéines Tau. La phosphorylation des protéines Tau par ces kinases n'induit pas l'apparition d'épitopes pathologiques (Gustke *et al.*, 1992).

En fait, les sites de phosphorylation qui transforment les Tau normales en Tau^{PHF} sont souvent suivis par une proline. La recherche des kinases responsables de cette phosphorylation s'est donc portée sur des kinases de type "proline directed protein kinase" (PDPK), notamment des kinases intervenant dans le cycle cellulaire, activées par des substances mitogènes (Drewes *et al.*, 1992; Vulliet *et al.*, 1992) et des facteurs de croissance. Citons par exemple les kinases de la classe des $p34^{cdc2}$ qui sont complexées avec des cyclines comme sous unités régulatrices, ou les kinases de type MAPK aussi connues comme ERKs (extra cellular signal-regulated kinase) (Boulton *et al.*, 1991) ou MBP kinase (myelin basic protein kinase) (Ahn *et al.*, 1990). Ces kinases font partie des kinases impliquées dans les cascades de phosphorylation en réponse à un stimulus extracellulaire.

III.2.5.1. LES KINASES DÉPENDANTES DE CYCLINES (cdK)

Ces kinases ont des homologies importantes avec les kinases impliquées dans la progression du cycle cellulaire du type cdc2. Elles sont associées à des sous-unités régulatrices et ont plutôt un rôle dans la différenciation des neurones. Elles font partie des "proline-directed protein kinase" (PDPK). Elles sont présentes dans les neurones en dégénérescence neurofibrillaire (Ledesma *et al.*, 1992) mais également dans les neurones normaux associés aux microtubules (Wood *et al.*, 1993).

La p34^{cdc2}/p58^{cyclinA} a été identifiée dans des cellules de phéochromocytome de rat où elle est activée par le facteur de croissance nerveuse, le NGF. Purifiée, cette PDPK peut être activée *in vitro* par phosphorylation de la tyrosine par la pp60^{src} (Hall *et al.*, 1991). Elle peut phosphoryler plusieurs protéines du cytosquelette des neurones *in vitro* incluant la synapsine 1, les neurofilaments, et les protéines Tau recombinantes. La phosphorylation de ces protéines Tau recombinantes, à la fois sur les sérines et les thréonines, diminue leur capacité à promouvoir l'assemblage des microtubules. Elle empêche leur détection par l'anticorps SMI 33 (Ser²³⁵ phosphorylée), mais n'induit pas la détection de l'anticorps SMI 31. En fait, la phosphorylation par cette PDPK des protéines Tau recombinantes se fait avec une stoechiométrie faible, (2 mol/mol) (Scott *et al.*, 1993b, Drewes *et al.*, 1992), il n'est donc pas certain qu'elle ait pour substrats les protéines Tau *in vivo*.

La cdk5 est une PDPK physiquement associée aux microtubules et est détectée dans les préparations de microtubules. De plus, des MAP2 sont détectés dans des immunoprécipités de cdk5 (Kosik, 1993). Elle semble être une bonne candidate pour la phosphorylation des protéines Tau de type Alzheimer (Kosik, 1993; Mandelkow, 1993).

III.2.5.2. MAP KINASES

La MAP kinase, aussi appelée ERK pour extra cellular regulated kinase, phosphoryle des résidus Ser/Pro et des résidus Thr/Pro (Mandelkow *et al.*, 1992). Sa synthèse est augmentée au cours du développement (Boulton *et al.*, 1991). Elle phosphoryle les protéines Tau recombinantes avec une stoechiométrie de 14 mol de phosphates /mol de Tau (Scott *et al.*, 1993b; Roder *et al.*, 1993). Les protéines Tau sont alors reconnues par des anticorps spécifiques de sites phosphorylés présents dans les PHF, et absents sur les protéines Tau normales (SMI 34, AT8, SMI 31, SMI 35, SMI 310) (Drewes *et al.*, 1992). La MAP kinase est activée par phosphorylation de la tyrosine (Lu et al., 1993).

La MAP kinase est présente dans des homogénats de cerveau normal de boeuf (Roder *et al.*, 1993), de cerveau humain normal et de cerveau d'Alzheimer (Ledesma *et al.*, 1992). Elle est présente dans les enchevêtrements neurofibrillaires et les neurites dystrophiques (Trojanowski *et al.*, 1993). Elle est associée aux microtubules (Fiore *et al.*, 1993) et aux PHF et est copurifiée avec les MAP par cycles répétés d'assemblages et de désassemblages (Drewes *et al.*, 1992).

III.2.5.3. GLYCOGEN SYNTHASE KINASE 3 (GSK3)

La GSK3 a d'abord été identifiée comme une protéine phosphorylant et inactivant la glycogène synthase, enzyme limitant la glycogenèse (Embi *et al.*, 1980). La GSK3 est identique:

- au facteur A, qui active la protéine phosphatase A dépendante du magnésium et de l'ATP par phosphorylation de la sous unité régulatrice (Vandenheede *et al.*, 1980).

- à la c-jun kinase (Boyle et al., 1991)

La GSK3 peut être activée par phosphorylation de la tyrosine dans les cellules quiescentes, à l'inverse de la MAP kinase qui est n'est activée qu'au cours du développement (Hughes *et al.*, 1993).

GSK3 α et β phosphorylent les protéines Tau recombinantes avec l'apparition de l'épitope 8D8 (Ser³⁹⁶) et la diminution de l'immunoréactivité de Tau 1 sur les protéines Tau qui ont une migration ralentie en gel de polyacrylamide (Hanger *et al.*, 1992). La GSK3 phosphoryle également les protéines Tau normales humaines avec une stoechiométrie de 4 moles de phosphate / mole de Tau. Les sérines 235 et 404 sont alors phosphorylées (Yang *et al.*, 1993).

La GSK3 est associée au microtubules et aux PHF et est copurifiée avec les MAP par cycles répétés d'assemblages et de désassemblages. Comparée à la MAP K, elle est plus spécifique des résidus Ser/Pro. La phosphorylation par la GSK3 ne semble pas affecter la liaison des protéines Tau recombinantes aux microtubules (Mandelkow *et al.*, 1992).

III.2.5.4. TAU PROTÉINES KINASES (TPK)

Une activité kinasique pouvant phosphoryler des protéines Tau et induire des épitopes des Tau^{PHF} a permis de purifier les TPK à partir d'homogénats de cerveau de boeuf. Ces TPK sont activées en présence de tubuline et se lient aux protéines Tau (Ishiguro *et al.*, 1992b).

La TPK II

La TPK II phosphoryle les protéines Tau de boeuf sur la Ser²⁰², Thr²⁰⁵, Ser²³⁵, Ser⁴⁰⁴ sans apparition d'épitopes de type Tau^{PHF} (Ishiguro *et al.*, 1992a). Il faut cependant noter que la Ser⁴⁰⁴ est phosphorylée dans les Tau^{PHF} (Kanemaru *et al.*, 1992). Elle ressemble à la cdc2 kinase de par la spécificité de ses substrats et de sa séquence partielle en acides aminés (Ishiguro *et al.*, 1993), cependant la TPKII est active dans le cerveau normal (Arioka *et al.*, 1993)

La TPK I

La TPK I phosphoryle les protéines Tau de boeuf sur la Ser¹⁹⁹, la Thr²³¹, la Ser³⁹⁶ et la Ser⁴¹³ (sérine suivie d'une thréonine) avec apparition d'épitopes de type Tau^{PHF}. La phosphorylation est plus complète quand les protéines Tau ont d'abord été phosphorylées par la TPKII (Ishiguro *et al.*, 1992a). En fait, cette TPKI est identique à la GSK3ß car elles ont la même séquence en acides aminés, de plus, l'activité de TPKI ne peut être séparée de celle de la GSK3 au cours de leur purification (Ishiguro *et al.*, 1993).

Une analyse immuno-histochimique réalisée avec des anticorps dirigés contre cette GSK3/TPKI semble montrer que la kinase intervient dans la croissance des axones au cours du développement (Takahashi, 1993 résultats non publiés).

Par ailleurs, le traitement de cultures primaires de neurones d'embryons de rats avec le peptide neurotoxique BA4 augmente l'activité de la TPKI. Celle-ci est corrélée à la toxicité induite du peptide BA4 et à l'augmentation de l'immunoréactivité des protéines Tau avec l'anticorps Alz 50 et T3P (anticorps polyconal décrit par *Lee et al.*, (1991), équivalent à l'anticorps PHF 1). L'inhibition de la transcription, de la synthèse

- 39 -

des protéines ou l'utilisation d'oligonucléotides antisens de la TPKI préviennent cette toxicité (Takashima et al., 1993).

III.2.6. LES PROTÉINES PHOSPHATASES

La régulation de la phosphorylation des protéines Tau et des MAP se fait également par les phosphatases. Une diminution de l'activité des protéines phosphatases dans certains neurones, augmenterait l'état de phosphorylation des protéines Tau, diminuerait l'affinité de la liaison des protéines Tau aux microtubules et pourrait mener à l'apparition d'épitopes Tau^{PHF} sur les protéines Tau et à la formation de PHF.

Il existe quatre types de protéines Ser/Thr phosphatases: les phosphatases 1, 2A, 2B et 2C (Ingebristen & Cohen, 1983). La phosphatase 2B est également appelée calcineurine, son activité est dépendante du calcium et de la calmoduline (Goto *et al.*, 1985). L'activité de la phosphatase 2C nécessite des concentrations élevées de magnésium. Toutes les protéines phosphatases sont détectées dans le cerveau, cependant, la concentration de la protéine phosphatase 2A y est 4 fois plus importante que celle de la protéine phosphatase 1. La majorité des Ser/Thr phosphatases ont un état d'activation qui dépend considérablement de leur aptitude à s'associer à une multitude d'autres protéines, ce qui influence également leur régulation, leur localisation cellulaire et la spécificité du substrat.

Une étude récente comparant l'activité des protéines phosphatases 1, 2A, 2B, 2C et des tyrosines phosphatases de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer à celles de cerveaux témoins a montré que les activités des protéines phosphatases 1 et 2A étaient diminuées de manière significative chez les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer.



FIGURE 4

Schéma montrant le rôle potentiel des kinases et des phosphatases lors de la transduction d'un signal dans la cellule.

Les protéines phosphatases 1, 2A et la calcineurine sont capables de déphosphoryler les protéines Tau *in vitro* (Goto *et al.*, 1985; Yamamoto *et al.*, 1988). Les phosphatases actives *in vivo* n'ont cependant pas été identifiées.

L'hyperphosphorylation des protéines Tau dans la maladie d'Alzheimer pourrait ainsi résulter d'une diminution de l'activité des phosphatases (Gong *et al.*, 1993).

IV. APPROCHE DES MODÈLES EXPÉRIMENTAUX DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

IV.1. MARQUEURS DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

Les modèles expérimentaux animaux ou cellulaires de la maladie ont pour but de nous faire comprendre les dysfonctionnements biochimiques, enzymatiques, physiologiques..., à l'origine des lésions. Ces informations devraient être ensuite exploitables pour le diagnostic et le traitement de la maladie d'Alzheimer.

Les stratégies pour développer un tel modèle sont nombreuses. Elles reposent sur l'analyse étiopathogénique des lésions et reposent également sur certains déficits neurochimiques, malgré les nombreuses controverses à ce sujet. Dans le système cholinergique, l'affinité des récepteurs nicotiniques au niveau cortical est fortement diminué dans la maladie d'Alzheimer alors que le nombre de récepteurs muscariniques est augmenté dans le cortex mais pas dans l'hippocampe (Nordberg, 1992). L'activité de la forme G4 de l'acétylcholinestérase (AchE) est diminuée de 70 % dans le cortex frontal, 45 % dans le cortex pariétal et 47 % dans le putamen (Ogane *et al.*, 1992). Ainsi dans la maladie d'Alzheimer, le nombre ou l'affinité d'un récepteur varient en fonction des tissus, de l'aire corticale, de la cellule. De même, l'activité de l'AchE varie suivant les formes moléculaires de l'enzyme. Nous constatons que le problème est extrêmement compliqué. Par ailleurs, cette atteinte cholinergique massive a été la seule piste pharmacologique dans les années 80. La stratégie consistait à utiliser la même approche que celle de la maladie de Parkinson. En d'autres termes, il semblait possible de

:

soutenir l'activité cholinergique défaillante comme on avait pu le faire pour l'activité dopaminergique du Locus Niger des Parkinsoniens. C'était ignorer que la maladie d'Alzheimer ne touche pas un petit noyau de plusieurs centaines de milliers de neurones mais la presque totalité des populations neuronales, c'est à dire peut-être 80 milliards de neurones en fin d'évolution. Nous constatons que l'hypothèse cholinergique n'a pas permis, à l'heure actuelle, de produire des molécules enrayant la maladie. Il semble donc préférable de s'orienter vers la mise au point d'un modèle expérimental basé sur les lésions de la maladie d'Alzheimer plutôt sur les déficits neurochimiques. En effet, nous pensons que la maladie d'Alzheimer est plus une maladie de "terrain", avec l'envahissement complet du système nerveux central, qu'une maladie d'un système de neuromédiateur.

Il semble maintenant admis que ce sont les dépôts amyloïdes qui sont à l'origine de la maladie d'Alzheimer. Ceux-ci entraîneraient progressivement la formation de la dégénérescence neurofibrillaire et la perte neuronale (figure 5) (Delacourte, 1993). Si cette hypothèse est correcte, le modèle idéal consiste à induire la formation de plaques séniles qui provoqueront ensuite une dégénérescence neurofibrillaire, débutant dans la formation hippocampique puis affectant progressivement dans les couches III et V de l'isocortex. Ce doit être un phénomène lent car la maladie d'Alzheimer évolue vraisemblablement sur deux décennies.

Le modèle sera mis au point en fonction des marqueurs de la maladie, mais encore faut-il trouver les bons marqueurs.

IV.1.1. MARQUEURS GÉNÉTIQUES

Les marqueurs génétiques ne concernent qu'une partie des cas de maladie d'Alzheimer mais peuvent permettre la mise au point de modèles animaux de la maladie. Sur le chromosome 21, les mutations sur le gène de l'APP 717 et 670/671 sont spécifiques de la maladie d'Alzheimer, mais pas la mutations 692. Ces mutations concernent un petit nombre de formes familiales à début précoce. Sur le chromosome 19, l'association de l'allèle E4 de l'apolipoprotéine E avec la maladie a été décrite dans

- 43 -



1ère étape: AMYLOÏDOGÉNÈSE.

- A: Facteurs génétiques conduisant à une dégradation anormale de APP. (Maladie d'Alzheimer familiale: cas rares).
- B: Facteurs tissulaires, cellulaires, environnementaux conduisant à une dégradation anormale de APP et à la formation du peptide amyloïde. (Cas sporadiques: la majorité des cas).
- A ou B: Accumulation du peptide amyloïdé sous forme de plaques séniles.

2ème étape: DÉGÉNÉRESCENCE NEUROFIBRILLAIRE.

- C: Le peptide amyloïde provoque la dégénérescence des neurones appelée la dégénérescence neurofibrillaire (accumulation de fibrilles de PHF dans les neurones).
- D: Les neurones en dégénérescence meurent. Les débris cellulaires sont phagocytés par les cellules gliales.
- E: La mort neuronale provoque progressivement l'altération des fonctions intellectuelles.

FIGURE 5

Grandes étapes physiopathologiques de la maladie d'Alzheimer.

des formes familiales à début tardif et également pour des formes sporadiques. Sur le chromosome 14, un gène marqueur de certaines formes familiales à début précoce n'a pas encore été identifié. Des souris transgéniques avec le gène de l'APP muté en 670/671 ou avec le polymorphisme E4/E4 pour l'ApoE semblent être de bons modèles potentiels de la maladie d'Alzheimer.

IV.1.2. MARQUEURS BIOCHIMIQUES

-> La présence de dépôts de la protéine ßA4 n'est pas un marqueur spécifique de la maladie d'Alzheimer. Les dépôts de substance amyloïde apparaissent parfois, à des taux variables, au cours du vieillissement normal dans le cerveau de certains sujets âgés de plus de 50 ans et augmentent avec l'âge (Delaère *et al.*, 1993). Ils apparaissent également dans le cerveau des trisomiques 21 âgés de plus de 20 ans. Ces dépôts peuvent donc soit faire partie d'un processus de vieillissement normal, soit être indicateur d'une pathologie.

-> D'autres constituants comme l'alpha-1-antichymotrypsine, l'ApoE, les protéoglycannes, les constituants de la matrice extracellulaire, sont détectés au sein des plaques séniles, mais leur rôle dans la formation de ces plaques est inconnu.

-> La dégénérescence neurofibrillaire n'est pas non plus spécifique de la maladie d'Alzheimer. Elle est rencontrée systématiquement dans la région hippocampique et para-hippocampique des personnes âgée de plus de 75 ans (Vermersch *et al.*, 1992b). Elles s'observe également dans le cerveau des trisomiques 21 (Wisniewski *et al.*, 1979) et les parkinsoniens déments chez qui la distribution est différente (Vermersch *et al.*, 1993). Cependant, le triplet de protéines Tau pathologiques (Tau 55, 64 et 69) ou Tau^{PHF} est un marqueur spécifique et fiable de la dégénérescence neurofibrillaire chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. La détection des protéines Tau 55, 64 et 69 peut servir au diagnostic de la maladie sur du matériel biopsique (Buée-Scherrer *et al.*, 1993). Des variants de protéines Tau pathologiques, d'un profil de migration différent des protéines Tau pathologiques de type Alzheimer sont également observés dans d'autre pathologies neurodégénératives: la dégénérescence de type PSP (Flament et al., 1991), retrouvée également dans le Parkinson-SLA de Guam (Buée-Scherrer et al., 1993) et dans la dégénérescence de type Pick (Greenberg, 1993).

-> L'ubiquitine, associée aux PHF est un marqueur non spécifique de la dégénérescence neurofibrillaire.

-> La réaction gliale n'est pas spécifique de la maladie d'Alzheimer, par conséquent, elle ne constitue pas un bon marqueur de la maladie.

-> Les études de corrélation entre les signes cliniques de démence de type Alzheimer et les lésions histopathologiques montrent que le nombre de plaques séniles n'est pas corrélé avec la sévérité de la démence. Par contre, il y a une corrélation positive entre l'étendue de la dégénérescence neurofibrillaire, la perte neuronale et la sévérité de la démence de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Braak & Braak, 1991; Arriagada *et al.*, 1992).

A l'heure actuelle, il semble que le modèle idéal consiste en l'induction de plaques séniles cérébrales suivie par une dégénérescence neurofibrillaire. Un tel modèle n'existe pas encore. Un modèle partiel peut également être intéressant, produisant des plaques séniles ou la dégénérescence neurofibrillaire.

Pour notre part, il nous semble plus intéressant de faire un modèle basé sur la dégénérescence neurofibrillaire, car c'est celle ci, même si elle est une conséquence, qui est liée directement à l'expression des signes cliniques. Le modèle doit reposer sur l'expression des protéines Tau^{PHF}. La compréhension des phénomènes conduisant à une phosphorylation anormale des protéines Tau pourrait permettre le développement de stratégies visant à prévenir ou retarder la dégénérescence neurofibrillaire au cours de la maladie d'Alzheimer.

IV.2. MODÈLES EXISTANTS DE LA MALADIE D'ALZHEIMER.

La plupart des animaux de laboratoire n'ont pas un cortex cérébral suffisamment évolué pour être comparé à celui de l'homme. En fait le seul modèle qui se rapproche de la pathologie humaine est celui du singe âgé qui présente à la fois des déficits comportementaux évoquant un trouble de la mémoire et des lésions cérébrales de type plaques séniles (Price *et al.*, 1986). Un tel modèle n'est pas très facile à utiliser, sachant que les primates vivent 20 à 30 ans, voire plus, et leur coût élevé.

Des comportements anormaux ont déjà été rencontrés chez des rats âgés, cependant la présence de DNF ou de plaques séniles chez les rongeurs n'a pas été démontrée. Il est possible qu'ils soient incapables de développer de telles lésions.

Des altérations comportementales ont également été observées chez certains microcèbes âgés (Lémuriens). Elles s'accompagnent d'une dilatation ventriculaire et d'un amincissement du cortex. Les deux lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer sont présentes. Des dépôts de substance amyloïde sous la forme de plaques séniles diffuses et compactes apparaissent dans le parenchyme cortical. La dégénérescence neurofibrillaire est également détectée (Bons *et al.*, 1991). C'est un modèle qui semble prometteur.

IV.2.1. MODÈLES "AMYLOÏDES"

Les dépôts de substance amyloïde ont été observés chez les singes âgés, l'ours polaire, le cheval, le chien (Selkoe *et al.*, 1987). Ils ne sont cependant pas accompagnés de dégénérescence neurofibrillaire et par conséquent ne sont pas de bon modèle de la maladie d'Alzheimer.

Il semble que la surexpression d'un (de plusieurs) gène(s) du chromosome 21 puisse favoriser le développement de la maladie d'Alzheimer car les deux types de lésions, plaques séniles et neurones en dégénérescence neurofibrillaire, caractéristiques de la maladie d'Alzheimer, sont également trouvés dans le cerveau des personnes atteintes de Trisomie 21 qui vivent au delà de 35-40 ans. Chez les personnes atteintes de

- 47 -

Trisomie 21, les premiers dépôts amyloïdes sont détectés vers l'âge de 20 ans et la dégénérescence neurofibrillaire vers 35 ans (Mann & Esiri, 1989). Ainsi, la Trisomie 21 semble être un bon modèle pour connaître l'étiopathogénie des lésions observées dans la maladie d'Alzheimer. Pour autant, il est à noter que les trisomiques âgés ne développent pas systématiquement une démence, comme dans la maladie d'Alzheimer.

IV.2.1.1. GREFFES DE NEURONES

Le gène codant pour le précurseur de la protéine amyloïde (APP) est localisé sur le chromosome 21. Chez la souris, ce gène est localisé sur le chromosome 16. La trisomie 16 n'induit cependant aucun changement neuropathologique qui pourrait résulter de la surexpression des gènes portés par le chromosome 16 supplémentaire, car ces souris ne survivent pas au delà du $20^{\text{ème}}$ jour de gestation. Des neurones hippocampiques de foetus de ces souris, transplantés dans le cerveau de souris receveuses, peuvent cependant survivre et se développer. Après 4 mois, quelques neurones des implants (1 à 5%) sont immunomarqués par des anticorps anti- β A4, anti Tau et anti- α 1-antichymotrypsine mais l'immunomarquage est essentiellement intracellulaire (Richards *et al.*, 1991) et n'est pas comparable à celui observé dans le cerveau des personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer.

IV.2.1.2. ANIMAUX TRANSGÉNIQUES

L'expression d'une ou de plusieurs isoformes humaines de l'APP dans des souris transgéniques pourrait permettre de comprendre le rôle joué par l'APP dans la pathologie de la maladie d'Alzheimer. A l'heure actuelle, seule une équipe semble avoir réussi à induire la formation de dépôts de BA4 dans le cerveau de souris transgéniques. Ces souris ont intégré dans leur génome le gène humain codant pour l'APP₇₅₁ sous le contrôle du promoteur de l'énolase neuronale spécifique de rat (Quon *et al.*, 1991). L'expression de l'APP₇₅₁ est augmentée dans le cerveau de ces souris transgéniques et les dépôts de BA4 extracellulaires apparaissent entre 4 et 15 mois. Des indices de mort ou de dégénérescence neuronale, ou des signes évidents de dysfonctionnement du système nerveux central, n'ont pas été mis en évidence chez les souris transgéniques

- 48 -

âgées de 1 an. Il serait intéressant de déterminer si la qualité et/ou la quantité des dépôts changent avec l'âge et s'ils peuvent induire une dégénérescence neurofibrillaire.

Le gène de la superoxyde dismutase dépendante du Cu/Zn (SOD 1) se trouve également sur le chromosome 21. L'accroissement des réactions oxydatives catalysées par cette enzyme pourrait endommager les neurones (Ceballos-Picot *et al.*, 1991). Cependant, ces souris transgéniques pour la SOD 1 humaine ne développent pas les lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. A plus long terme, il devrait être possible d'obtenir des animaux transgéniques pour plusieurs gènes dont on pense qu'ils ont une responsabilité conjointe dans la maladie.

IV.2.1.3. TRANSFECTIONS

La formation de fibrilles d'amyloïde a été rapportée dans des cellules COS-1, transfectées avec l'ADNc codant pour les 100 acides aminés de la partie C-terminale de l'APP (Maruyama *et al.*, 1990). Une faible partie des cellules transfectées développent des dépôts périnucléaires détectés par des anticorps dirigés contre la partie C-terminale de l'APP et contre la BA4. Il semblerait donc qu'un simple clivage de l'APP dans la partie N-terminale de la BA4 génère des peptides capables de s'agréger pour former des fibrilles. Cette agrégation serait facilitée par un stress oxydatif (Dyrks *et al.*, 1992).

IV.2.1.4. TOXICITÉ DU PEPTIDE BA4

Le peptide $\beta A4_{1.40}$ et le peptide $\beta A4_{25-35}$ ont des effets neurotrophiques pour des neurones d'embryons de rats quand ils sont ajoutés dès le début de la culture mais ils ont des effets neurotoxiques quand ils sont ajoutés sur des cultures plus vieilles. (Yankner *et al.*, 1990a).

Les effets varient également en fonction de la solubilité du peptide utilisé. Les peptides contenant la partie 25-35 de la β A4 ($\beta_{(25-35)}$) créent un influx de calcium dans certains neurones, dépendant de la dose (Joseph & Han, 1992) et rendent les neurones plus vulnérables à la toxicité du glutamate (Koh *et al.*, 1990; Carette *et al.*, 1993; Mattson *et al.*, 1992, 1993). Des résultats contradictoires ont également été obtenus lors de l'injection *in vivo* du peptide $\beta_{(1-40)}$ ou du peptide neurotoxique $\beta_{(25-35)}$, qu'ils

soient injectés chez le singe ou chez le rat. Kowall *et al.* (1992) détectent des neurites anormaux autour des points d'injection, alors que Games *et al.* (1992) montrent que l'injection de peptides amyloïdes n'est pas un modèle approprié pour l'étude de la neurotoxicité ayant un rapport avec la maladie d'Alzheimer.

IV.4.2. MODÈLES D'INDUCTION DE TAUPHF

La présence de DNF a été décrite chez le mouton âgé, avec un marquage spécifique des neurones en dégénérescence. Cependant, ces neurones ne sont pas localisés dans la formation hippocampique et la présence de dépôts de substance amyloïde n'est pas détectée (Nelson & Saper 1993).

IV.4.2.1. LES LÉSIONS

Les injections d'agonistes d'acides aminés excitateurs comme le N-methyl-Daspartate (NMDA) réalisées dans l'hippocampe ou dans le noyau basal de Meynert induisent une dégénérescence neuronale sévère de la région injectée. Il en résulte une diminution de la quantité d'enzyme acétylcholinestérase. Cependant, les lésions de la maladie d'Alzheimer ne sont pas reproduites (Wang *et al.*, 1991).

Une autre approche consiste à tenter d'induire la formation des protéines Tau^{PHF} par des cellules nerveuses en culture (neurones provenant de d'embryons de rats ou de neuroblastomes).

IV.4.2.2. AGENTS AGISSANT SUR L'HOMÉOSTASIE DU CALCIUM

Il existe une hypothèse selon laquelle des altérations de l'homéostasie du calcium dans les neurones est responsable de la dégénérescence des neurones, observée au cours de la maladie d'Alzheimer (Gibson & Peterson, 1987; Choï, 1988; Greenamyre & Young, 1989; Mattson, 1990).

Le calcium joue un rôle important dans le développement et le fonctionnement des neurones. Dans des cultures primaires, le glutamate peut moduler la croissance neuritique et la synaptogénèse en augmentant l'influx calcique. Ce qui potentialise alors

- 50 -

la transmission synaptique dite "à long terme" (Del Cerro *et al.*, 1990). Cependant l'activation des voies calciques n'est pas toujours bénéfique pour le neurone: un influx de calcium soutenu dans le neurone, associé à la libération de calcium des réserves intracellulaires, augmentant considérablement la concentration de calcium cytosolique libre, est cytotoxique.

La compréhension des événements qui suivent l'activation des récepteurs au glutamate permet de mieux comprendre les mécanismes conduisant à la mort cellulaire. Le processus excitotoxique se déroule en deux phases, une phase précoce dépendante d'un influx de Na⁺ et une phase tardive dépendante d'un influx de Ca⁺⁺.

L'influx de sodium crée une dépolarisation des cellules qui engendre un influx passif des ions Cl⁻. Il y a alors une augmentation de la concentration intracellulaire de chlorure de sodium qui crée une différence de pression osmotique et une entrée d'eau massive: les cellules sont alors endommagées. Le fait de supprimer du milieu extracellulaire les ions Na⁺ ou Cl⁻ permet d'éviter cet effet toxique.

L'influx de calcium, à l'origine du processus de toxicité retardé, peut perturber l'organisation du cytosquelette en activant directement certaines enzymes qui agissent à différents niveaux dans les neurones. Par exemple:

- La calpaine (protéase calcium-dépendante) dégrade des protéines du cytosquelette comme la spectrine, les MAP2 (Siman & Noszek, 1988) et ainsi contribue directement à la désorganisation des cellules.

- La conversion irréversible de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase conduit à la production de radicaux hydroxyles et de superoxydes hautement cytotoxiques.

- La translocation de la PKC du cytoplasme vers la membrane où l'enzyme phosphoryle probablement des protéines impliquées dans le processus de dégénérescence.

- L'activation d'endonucléases qui peuvent aboutir à la fragmentation de l'ADN.

- L'activation de phospholipases.

FIGURE 6



Pathogenèse des dommages excitotoxiques

NMDA: N-methyl-D-aspartate PPI: phosphatidyl inositol Enfin, l'influx de calcium soutenu est responsable de la déplétion des réserves énergétiques du neurone.

De Boni & McLachlan, (1985) ont montré qu'un milieu de culture contenant du glutamate (1,1 mM) et de l'aspartate (0,45 mM) est cytotoxique pour des neurones d'explants de moelle épinière de foetus humain maintenus en survie. Dans les neurones vacuolisés, les neurites qui dégénèrent, contiennent généralement des filaments intermédiaires très souvent appariés. Ils ont un diamètre de $10 \pm 0,9$ nm et une périodicité de l'hélice de 140 ± 68 nm, mais 4 % environ sont morphologiquement similaires aux PHF observées dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Ces travaux n'ont jamais été confirmés.

Dans des neurones hippocampiques en culture, le glutamate induit une augmentation de l'immunomarquage des protéines Tau et de l'ubiquitine, qui est dépendante du calcium (Mattson, 1990; Mattson *et al.*, 1991; Sindou *et al*, 1992). L'ubiquitine, en se fixant sur les protéines, sert de marqueur signal pour leur dégradation par les protéases. Le nombre de neurones immunoréactifs et l'intensité du marquage dépendent directement de la concentration de glutamate utilisée.

IV.4.2.3. AGENTS AGISSANT SUR LA DIFFÉRENCIATION

D'autres études ont montré que des facteurs de différenciation pouvaient agir sur la formation de PHF.

Ko et al. (1990) ont testé l'immunoréactivité de différentes lignées de neuroblastomes humains: IMR32, SKNMC et SKNSH avec des anticorps dirigés contre les PHF. Seule la souche de neuroblastome humain IMR32 présente une augmentation d'immunoréactivité anti PHF quand les cellules sont placées dans un milieu de différenciation. L'analyse ultrastructurale montre que ces cellules accumulent dans leur péricaryons et dans leurs extensions neuritiques quelques fibrilles disposées en rangées distinctes, parfois associées par deux comme des PHF. Cependant, ces fibrilles ressemblant aux PHF sont moins compactes. Seules certaines fibrilles qui apparaissent plus épaisses ou qui sont agrégées en bottes sont marquées par un anti PHF. Argasinski *et al.*, en 1989 ont exposé à la doxorubicine, des cellules LAN-5 différenciées ou non par l'acide rétinoïque. La doxorubicine est une anthracycline glycosidique d'activité antinéoplasique, s'intercalant entre des paires de bases adjacentes de l'ADN, inhibant alors les ADN-polymérases dépendantes de l'ADN et de l'ARN. Dans les cellules non différenciées, la doxorubicine induit l'apparition d'une protéine Tau de masse moléculaire inférieure à celles des protéines Tau présentes dans les cellules témoins.

Bien qu'il n'y ait pas d'induction de Tau^{PHF} dans ces cellules humaines de neuroblastomes, ces études ont cependant montré qu'il est possible d'agir sur les protéines Tau de ces cellules, et ont contribué au développement des modèles utilisant les neuroblastomes pour l'étude *in vitro* des changements normaux et pathologiques du cytosquelette.

IV.4.2.4. INHIBITEURS DE PROTÉINES PHOSPHATASES

La phosphorylation dans les cellules est régulée par les phosphatases. Bloquer les phosphatases peut donc accroître le taux de phosphorylation dans les cellules. L'inhibition de protéines phosphatases peut-elle induire la formation de protéines Tau^{PHF} dans les neurones ?

Les inhibiteurs de protéines phosphatases comme le pyrophosphate (Ballou *et al*, 1986), le ß glycérophosphate (Cicirelli *et al*, 1988), le fluorure de sodium (Anderson *et al*, 1990), le vanadate de sodium (Pelech *et al*, 1986) servent à maintenir l'état de phosphorylation des protéines dans des extraits cellulaires. Non spécifiques, ces inhibiteurs ont permis de rapides progrès dans la compréhension des protéines kinases et non celle des phosphatases.

Par contre, l'acide okadaïque, un inhibiteur spécifique des protéines phosphatases 1 et 2A, devrait nous permettre d'étudier la phosphorylation des protéines Tau dans un modèle expérimental de la maladie d'Alzheimer.

- 54 -

V. CONCLUSION

De ce premier chapitre, nous retiendrons que:

--> les protéines Tau incorporées dans les PHF sont insolubles et ont un point isoélectrique plus acide que les protéines Tau normales. Ces protéines Tau^{PHF} sont en fait anormalement phosphorylées.

	Tau foetales	Tau adultes	Tau ^{PHF}	
Isoformes présentes	Α	A, B, C, D, E, F	A, B, C, D, E, F	
Phosphorylation	Très hétérogène		Uniforme	
Masse moléculaire	environ 48 kDa	de 45 à 62 kDa	55, 64 et 69 kDa	
pI		6,5 - 8,5	5,5 - 6,5	
Solubilité	Solubles	Solubles	Insolubles	
Polymérisation des microtubules	Compétentes	Compétentes	Incompétentes	

--> pratiquement tous les sites phosphorylés sur les Tau^{PHF} sont de type Ser-Pro ou Thr-Pro, ce qui induit des changements de conformation et l'apparition d'épitopes spécifiques aux protéines Tau^{PHF}. De ce fait, les sondes immunologiques dirigées contre les sites de phosphorylation anormale des Tau^{PHF} permettent de détecter spécifiquement les variants Tau pathologiques.

--> les dysfonctionnements biochimiques à l'origine de la phosphorylation anormale des protéines Tau sont inconnus.

--> il n'existe pas de véritable modèle animal, ou cellulaire de la maladie d'Alzheimer, mais seulement des modèles d'étude partiels *in vivo* ou *in vitro* de la maladie qui sont en cours de développement.

A l'heure actuelle, de nombreuses questions n'ont toujours pas trouvé de réponse: quels sont les dysfonctionnements biochimiques à l'origine de la phosphorylation anormale des protéines Tau observée au cours du processus dégénératif. L'hyperphosphorylation des protéines Tau survient-elle avant ou après dépolymérisation des microtubules ? Ce phénomène est-il une cause ou une conséquence de la mort neuronale. Est-il possible d'élaborer un modèle expérimental de la dégénérescence neurofibrillaire de type Alzheimer ?

RÉSULTATS

RÉSULTATS

I. EFFET DU GLUTAMATE SUR DES NEURONES CORTICAUX DE RATS EN CULTURE:

Dans les modèles expérimentaux de la maladie d'Alzheimer, exposés au chapitre précédent, nous avons vu que des concentrations croissantes de glutamate induisaient la dégénérescence de neurones en culture. Le nombre de neurones marqués par un anti Tau augmente avec la concentration de glutamate utilisée (Sindou *et al.*, 1992).

En collaboration avec l'équipe du Professeur Hugon, nous avons entrepris l'analyse des modifications biochimiques des protéines Tau dans ce modèle de dégénérescence neuronale induite par la glutamate. Nous avions pour objectif de déterminer si l'augmentation du nombre de neurones marqués par un anticorps anti Tau dans ce modèle était due à l'apparition de protéines Tau hyperphosphorylées caractéristiques de la maladie d'Alzheimer.

I.1. ANALYSE DES PROTÉINES TAU SÉPARÉES SUIVANT LEUR MASSE MOLÉCULAIRE

Nous avons étudié le profil des protéines Tau de neurones d'embryons de rats en cultures après migration en gel de polyacrylamide SDS et électrotransfert sur membrane de nitrocellulose. L'immunodétection des protéines Tau a été réalisée avec les anticorps anti Tau et anti PHF. L'anti Tau est un immunsérum dirigé contre des protéines Tau normales humaines thermostables. L'anti PHF est un immunsérum dirigé contre une préparation de PHF.

Dans les cultures témoins, le profil des protéines Tau détectées par l'anticorps anti Tau polyclonal consiste en trois bandes migrant entre 40 et 50 kDa. Avec l'anti PHF, seules les 2 bandes de plus haut poids moléculaire sont détectées (figures 7 et 8).

Les neurones en cultures ont été exposés à 50, 100, 200 et 500 μ M de glutamate pendant 5 mn et homogénéisés 12 heures après le traitement dans la solution de Laemmli. Ce sont les conditions dans lesquelles une augmentation de l'immunoréactivité des protéines Tau est observée par immunocytochimie (Sindou *et al.*, 1992).



Sur les immuno-transferts, nous n'avons pas constaté de différence de profil de migration ou d'immunoréactivité des protéines Tau des cellules traitées au glutamate par rapport aux protéines Tau des cellules témoins, qu'elles soient détectées par l'anticorps anti Tau ou l'anticorps anti PHF. Une phosphorylation des protéines Tau similaire à celle rencontrée dans la maladie d'Alzheimer avec ralentissement de la migration des protéines Tau en gel de polyacrylamide n'a pas été observée aux différentes concentrations de glutamate utilisées.







. . .
Analyse du profil des protéines Tau dans les cellules non traitées et traitées par différentes concentrations de glutamate avec les anticorps anti Tau et anti PHF.

Les neurones ont été traités par 0 (1), 50 (2), 100 (3), 200 (4) et 500 μ M (5) de glutamate dans un milieu sans sodium ni magnésium, pendant 5 minutes, lavés et remis en culture. 12 heures après l'exposition au glutamate, les neurones ont été traités par la solution de Laemmli.

La comparaison des profils de migration des protéines Tau des cellules traitées, des cellules Témoins et d'un homogénat de cerveau de patient atteint de la maladie d'Alzheimer (6) montre que le glutamate n'induit pas de changement de masse moléculaire ou d'immunoréactivité des protéines Tau dans ces conditions. Aucune modification de la migration ou de l'immunoréactivité n'étant observée 12 heures après le traitement au glutamate, nous avons diminué la concentration du glutamate et augmenté la durée de l'exposition, pour nous placer dans des conditions plus proches de la maladie d'Alzheimer et peut-être voir apparaître des Tau^{PHF} dans ces cultures.

Les neurones ont cette fois été exposés à 5 μ M de glutamate pendant 30 min puis ont été remis en culture pendant 48 et 96 heures avant d'être homogénéisés dans la solution de Laemmli. Après 96 heures, la toxicité induite par cette concentration de glutamate est très faible, le taux de survie de neurones est de 75 %.

Comparé à la migration des protéines Tau des cellules témoins, le glutamate n'induit pas de retard dans la migration des protéines Tau (figure 8). Par contre, la bande supérieure Tau a faiblement détectée dans les cellules témoins, est plus fortement marquée dans les cellules exposées au glutamate et homogénéisées 96 heures après le traitement. L'augmentation d'immunoréactivité de cette bande Tau a est observée à la fois avec l'anticorps anti Tau et avec l'anti PHF (figure 8). Ceci est confirmé par la mesure de l'intensité de chaque protéine Tau sur l'immunoempreinte: l'intensité de la protéine Tau a détectée par l'anticorps anti Tau ou par l'anti PHF passe respectivement de 10,8 % à 53,1 et de 26,9 à 70,2 %.

		Anti Tau		Anti PHF	
		Témoins	Glutamate	Témoins	Glutamate
•	Tau <i>a</i>	10,8	53,1	26,9	70,2
	Tau <i>b</i>	37,2	22,1	73,1	28,8
	Tau c	52,0	24,8	1	/

Pourcentage d'immunoréactivité des différentes protéines Tau (a,b,c) dans les cellules témoins et dans les cellules exposées au glutamate de la figure 8



:

:

1

Résultats

FIGURE: 8

Analyse du profil des protéines Tau dans les cellules non traitées et traitées par le glutamate.

Les neurones ont été traités par 5 μ M de glutamate dans un milieu sans sodium ni magnésium, pendant 30 minutes, lavés et remis en culture pour 48 (3) ou 96 heures (4).

La comparaison des profils de migration des protéines Tau des cellules traitées, des cellules témoins et d'un homogénat de cerveau de patient atteint de la maladie d'Alzheimer (1) montre que le glutamate induit un changement d'immunoréactivité des protéines Tau 96 heures après le traitement au glutamate.

Avec l'anticorps anti Tau, trois bandes sont détectées dans les cellules témoins et dans les cellules exposées au glutamate (Tau a,b,c). Avec l'anti PHF seules deux bandes sont détectées (Tau a,b).

- Dans les cellules témoins, la bande Tau *b* est la plus immunoréactive, qu'elle soit détectée avec l'anti Tau ou avec l'anti PHF.

- Dans les cellules exposées au glutamate, la bande Tau *a* est cette fois plus immunoréactive que la bande Tau *b*, qu'elle soit détectée par l'anticorps anti Tau ou par l'anticorps anti PHF.

I.2. ANALYSE DES PROTÉINES TAU SÉPARÉES SUIVANT LEUR POINT ISOÉLECTRIQUE ET LEUR MASSE MOLÉCULAIRE

Nous avons alors comparé par électrophorèse bidimensionnelle le profil des protéines Tau dans les homogénats de cellules témoins et de cellules exposées au glutamate, révélées par l'anticorps anti Tau.

L'isoélectrofocalisation des protéines a été réalisée sur une gamme de pH restreinte (4 à 6,5), nous permettant ainsi de détecter les faibles variations de point isoélectrique des protéines Tau. Dans les cellules exposées au glutamate, les protéines Tau sont plus acides que celles des cellules témoins. Les isoformes ont un point isoélectrique variant entre 4,6 et 5,7 dans les cellules exposées au glutamate alors que dans les cellules témoins leurs points isoélectriques varient entre 5 et 6,2.

Ces membranes de nitrocellulose ont ensuite été réincubées avec les anticorps anti-actine et anti-GFAP (protéine fibrillaire acide des cellules gliales) comme standard interne de migration. La GFAP et l'actine, dans les homogénats de cellules témoins comme dans ceux de cellules exposés au glutamate, migraient à la même position (entre 5,5 et 5,7 pour la GFAP, et entre 5 et 5,25 pour l'actine).

I.3. RECHERCHE D'ÉPITOPES PATHOLOGIQUES

Nous avons alors recherché si ces protéines Tau portaient des épitopes caractéristiques des Tau^{PHF}. Pour cela, nous avons utilisé l'anti PHF. C'est un anticorps reconnaissant à la fois les sites normaux et les sites pathologiques présents sur les Tau^{PHF}. En incubant le sérum avec un homogénat de cerveau normal, les sites des anticorps reconnaissant les épitopes des protéines Tau normales sont saturés. De ce fait, l'anti PHF absorbé (abs PHF) obtenu est spécifique des épitopes pathologiques de type Alzheimer (Delacourte *et al.*, 1990).



Analyse bidimensionnelle des protéines Tau de neurones de rats A: cellules témoins ; B: cellules exposées à 5 µM de glutamate, per et homogénéisées 96 heures après.

Les protéines ont d'abord été séparées suivant leur point isoélé isoélectrofocalisation dans un gradient de pH compris entre 4 et 6,5 puis séparées suivant leur masse moléculaire. Dans la seconde dimension échantillon et un homogénat de cortex d'un patient atteint de la maladie (Alz) ont été déposés sur le côté droit du gel.

La migration des protéines Tau a été comparée à la position de la GF de flèches) et de l'actine (flèches)

- Les protéines Tau dans les cellules témoins ont un point isoélectric entre 5 et 6,2.

- Les protéines Tau dans les cellules exposées au glutamate ou isoélectrique compris entre 4,6 et 5,7.

Résultats

Dans les neurones en culture, les protéines Tau ne sont pas marquées par l'abs PHF, que ce soit dans les cellules témoins ou dans les cellules exposées au glutamate. Ces résultats montrent que le glutamate n'induit pas l'apparition d'épitopes pathologiques de type Alzheimer dans les cultures primaires de neurones d'embryons de rats.

Contrairement à ce qui à été observé en immunocytochimie, nous n'avons pas détecté d'augmentation de l'immunoréactivité globale des protéines Tau dans les cellules exposées au glutamate. Dans les cellules il semblerait qu'il y ait une agrégation des protéines Tau et la présentation de nouveaux antigènes plutôt que la synthèse de nouvelles protéines. Ce qui est en accord avec les résultats de Mattson, (1990) qui observe également, dans des neurones d'embryons de rats en culture exposés au glutamate, une augmentation d'immunoréactivité des protéines Tau avec l'anticorps Alz-50 en présence de cycloheximide.

Même si nous n'avons pas réussi à le démontrer de manière directe, la phosphorylation pourrait expliquer à la fois l'augmentation de l'immunoréactivité de la bande supérieure des protéines Tau dans les homogénats de cellules exposées au glutamate et l'acidification du point isoélectrique des protéines Tau.

Dans ces neurones d'embryons de rats en cultures traités au glutamate, nous n'avons cependant pas détecté l'apparition d'épitopes caractéristiques des protéines Tau^{PHF}. Cela signifie-t-il que le glutamate n'intervient pas dans le processus de dégénérescence neurofibrillaire de type Alzheimer ?

Nous ne sommes pas en mesure de l'affirmer. Plusieurs facteurs peuvent agir en synergie pour modifier les protéines Tau.

- La phosphorylation des protéines Tau induite par le glutamate dans les neurones n'est peut être que temporaire et régulée par des phosphatases actives ou activées également par le glutamate. Ainsi, Hugon *et al.* (1993) montrent que le glutamate à des concentrations de 200 et 500 μ M induit la phosphorylation de l'épitope AT8 sur les

- 63 -

protéines Tau de neurones d'embryons de rats en culture, dans les premières minutes qui suivent le traitement. La concentration de glutamate est cependant beaucoup plus élevée que celle utilisée dans nos expériences.

- L'influx de calcium induit par glutamate à faible concentration n'est peut être pas suffisant pour activer les kinases et/ou inhiber les phosphatases impliquées dans la régulation des protéines Tau.

- Nous avons vu au premier chapitre que la phosphorylation anormale des protéines Tau s'effectuait *in vitro* en trois étapes bien distinctes suggérant un mécanisme de phosphorylation séquentiel (Lichtenberg-Kraag *et al.*, 1992), les épitopes des Tau^{PHF} n'étant détectés qu'à la deuxième étape. La phosphorylation des protéines Tau s'arrête peut-être à la première étape. L'affinité des protéines Tau pour les microtubules est alors réduite.

- Les neurones de rats en culture ne permettent peut être pas d'observer l'apparition de protéines Tau^{PHF}, car les isoformes des protéines Tau présentes dans ces neurones sont peut être incapables de s'associer pour former des PHF.

Bien des paramètres peuvent encore être changés pour induire des modifications stables sur les protéines Tau des neurones de rats en culture, ressemblant à celles observées sur les protéines Tau^{PHF}.

II. INDUCTION DE TAU^{PHF} DANS DES CELLULES DE NEUROBLASTOMES SKNSH-SY 5Y

Comme nous l'avons vu précédemment, des études réalisées par Argasinski *et al.*, (1989) et Ko *et al.*, (1990) ont montré qu'il était possible d'induire des modifications sur les protéines Tau de cellules de neuroblastomes. Pour mettre au point un modèle cellulaire d'étude de l'hyperphosphorylation de type Alzheimer des protéines Tau, nous avons entrepris l'étude des protéines Tau dans de cellules d'origine humaine, les cellules de neuroblastome de la lignée SKNSH-SY 5Y (Biedler *et al.*, 1978). Ces cellules sont très souvent utilisées dans des études sur les mécanismes d'induction de la différenciation et sont décrite plus en détaille dans le chapître I du matériel et méthodes. Nous avons tout d'abord étudié l'influence de la différenciation sur les protéines Tau. Puis, nous avons exposé les cellules au glutamate ou au peptide neurotoxique $\beta(25-35)$ pour induire une dégénérescence neurofibrillaire de type Alzheimer, et nous avons recherché la présence de protéines Tau pathologiques dans ces cellules. Enfin, nous avons étudié les effets de l'inhibition des protéines Tau.

II.1. INFLUENCE DE LA DIFFÉRENCIATION SUR LE PROFIL DES PROTÉINES TAU

Que la différenciation des cellules soit induite par l'acide rétinoïque (AR), le facteur de croissance des nerfs (NGF) ou le peptide intestinal vasoactif (VIP), en milieu défini ou en milieu contenant du sérum de veau foetal, nous n'avons pas observé de changement dans le profil de migration des protéines Tau en gel de polyacrylamide des cellules SKNSH-SY 5Y par rapport à celui des cellules témoins, après 3 jours de différenciation. La kinase responsable de la phosphorylation anormale des protéines Tau n'est apparemment pas activée par le processus de différenciation.

Cependant Fukuchi *et al.*, (1992) ont montré que la transcription du gène des protéines Tau est plus élevé dans des cellules P19 différenciées. Si la quantité de protéines Tau est augmentée dans les cellules différenciées, il devient plus facile de les détecter. Nous avons donc poursuivi les expériences suivantes avec des cellules différenciées au NGF car la différenciation des cellules obtenue avec le VIP nous semblait incomplète et une certaine toxicité était constatée avec l'acide rétinoïque. Dans des cellules différenciées au NGF nous n'avons jamais détecté de protéines Tau portant des épitopes pathologiques de type Alzheimer, que ce soit 5, 15, 30, 60 min, 6, 24 heures, 4 ou 8 jours après avoir initié la différenciation (figure 10).

Nous avons recherché d'autres substances pouvant induire l'induction des Tau^{PHF} dans des neuroblastomes humains.

II.2. EFFETS DU GLUTAMATE

Aucun signe de dégénérescence n'a été observé dans les cellules de neuroblastome différenciées au NGF et exposées à des concentrations de glutamate allant jusqu'à 1 mM. Nous n'avons pas non plus détecté de variation du profil des protéines Tau dans ces cellules exposées au glutamate, bien que ces cellules expriment des recepteurs au glutamate (Naarala *et al.*, 1993).

II.3. EFFET DU PEPTIDE NEUROTOXIQUE

Les cellules SKNSH-SY 5Y différenciées au NGF ont été exposées au peptide synthétique correspondant à la séquence 25-35 du peptide amyloïde (β_{25-35}). Ce peptide a été décrit par Yankner *et al.*, (1990a) comme ayant une activité trophique précoce à faible concentration sur des cultures primaires d'embryons de rats et une activité toxique sur des cultures plus âgées. Le NGF potentialiserait la neurotoxicité de la protéine amyloïde (Yankner *et al.*, 1990b). Sur des tranches de cerveau de cobaye en survie, ce peptide provoque une dépolarisation des neurones accompagnée d'une baisse de résistance membranaire et une augmentation importante des dépolarisations obtenues par une application locale de glutamate (Carette *et al.*, 1993).



Immunoréactivité des protéines Tau au cours de l'induction de la différenciation par le NGF

La différenciation des cellules de neuroblastome a été induite par le NGF pour différents temps: 5, 15, 30, 60 minutes, 3 et 6 heures.

L'initiation de la différenciation n'affecte pas l'immunoréactivité des protéines Tau.

Ce même peptide a été utilisé à des concentrations allant de 10⁻¹² M à 10⁻⁶ M sur des neuroblastomes différenciés au NGF. Cependant, aucun effet neurotoxique ou neurotrophique n'a été observé. De même, aucun changement dans le profil de migration des protéines Tau des cellules exposées au peptide ß25-35 n'a été observé par rapport aux cellules exposées au peptide de même composition en acides aminés mais synthétisés dans un ordre aléatoire (figure 11).

:



Résultats

FIGURE: 11

Effet du peptide neurotoxique 825-35 sur les cellules SKNSH-SY 5Y

Protéines Tau de cellules différenciées cultivées pendant 3 jours dans un milieu contenant 5 μ M de peptide neurotoxique β 25-35 (G11M) ou un peptide de même composition en acide aminés mais synthétisés dans un ordre aléatoire (A11G).

La présence du peptide ß25-35 dans le milieu de culture n'est pas toxique pour les cellules de neuroblastome et n'induit pas de modification dans la migration des protéines Tau.

II.4. EFFET DE L'ACIDE OKADAÏQUE

L'acide okadaïque est un polyéther d'acide gras, isolé pour la première fois d'éponges marines Halichondria okadaii et Halichondria melanodocia (Tachibana et al., 1981) mais produit en fait par plusieurs espèces de dinoflagellées.

L'acide okadaïque inhibe trois des Ser/Thr protéines phosphatases (PP1, PP2A et PP2C). L'inhibition est très spécifique pour les protéines phosphatases 1 et 2A *in vitro*. A 1 nM d'acide okadaïque, la protéine phosphatase 2A est inhibée à 50 %. 10 à 15 nM d'acide okadaïque sont nécessaires pour obtenir 50% d'inhibition de la protéine phosphatase 1. La protéine phosphatase 2B dépendant du système Ca⁺⁺/calmoduline est beaucoup moins sensible à l'acide okadaïque (dose d'inhibition environ 1 μ M). Cependant, elle se distingue des trois autres protéines phosphatases car elle est inhibée par l'EGTA ou par la trifluoropiperazine, antagoniste de la calmoduline (Cohen, 1989; Cohen *et al.*, 1990).

L'acide okadaïque est très utile pour identifier les substrats physiologiques des protéines phosphatases 1 et 2A. En effet sa "structure hydrophobe" lui permet de pénétrer dans les cellules. Cependant, la concentration d'acide okadaïque utilisée pour obtenir l'inhibition ne permet pas de déterminer laquelle des protéines phosphatase 1 ou 2A est inhibée.

II.4.1. CHANGEMENTS MORPHOLOGIQUES

Les cellules différenciées par le NGF pendant 4 jours présentent de longs prolongements neuritiques (figure 12). En présence d'acide okadaïque (0,25 μ M), les neurites des cellules se rétractent progressivement. Les cellules semblent rester en contact par les corps cellulaires, puis deviennent rondes et se détachent de leur support.



Effets de l'acide okadaïque sur la morphologie des cellules

Quand les cellules de neuroblastomes sont exposées à l'acide okadaïque $(0,25 \ \mu\text{M})$, les neurites établis au cours de la différenciation [A] se rétractent progressivement [B]. Les cellules s'arrondissent [C] et se détachent de leur support pour se regrouper [D].

Le décollement survient en 50 mn environ et 70 à 80% des cellules sont encore viables. Par la suite, la morphologie des cellules ne change plus, mais leur taux de survie diminue.

II.4.2. INDUCTION DE PROTÉINES TAU DE TYPE ALZHEIMER DANS LES CELLULES SKNSH-SY 5Y

II.4.2.1. Comparaison du profil électrophorétique des protéines Tau dans les cellules exposées à l'acide okadaïque par rapport aux cellules témoins

Dans les cellules témoins, un doublet majeur de protéines Tau vers 52-53 kDa et une bande mineure vers 48 kDa sont détectés par un anticorps dirigé contre les 19 premiers acides aminés des protéines Tau (Nterm). Dans les cellules exposées à l'acide okadaïque, les protéines Tau ont une masse moléculaire apparente plus élevée. Les protéines Tau sont détectées par l'anticorps Nterm à 55 kDa pour la bande majeure et à 64 kDa pour la bande mineure (figure 13).

II.4.2.2. Hyperphosphorylation des protéines Tau dans les cellules exposées à l'acide okadaïque

Ces modifications de migration en gel de polyacrylamide s'accompagnent d'une acidification du point isoélectrique des protéines Tau. Trois anticorps successifs sont utilisés sur les immuno-empreintes: l'anti PHF absorbé, l'anti Nterm et l'anti-actine. La position de l'actine sert de témoin interne de migration. Le point isoélectrique des protéines Tau des cellules exposées à l'acide okadaïque est compris entre 5,3 et 7 alors qu'il est compris entre 6 et 7,3 pour les cellules témoins (figure 14). (Le point isoélectrique des protéines Tau normales dans le cerveau et compris entre 6,5 et 8,5 et celui des Tau^{PHF} est compris entre 5,5 et 6,5). L'anti PHF absorbé, qui ne détecte que les épitopes pathologiques présents sur les protéines Tau^{PHF}, marque essentiellement les protéines Tau les plus acides des cellules exposées à l'acide okadaïque.

- 72 -





Comparaison par immunotransfert du profil des protéines Tau dans les cellules témoins et les cellules exposées à l'acide okadaïque.

La détection des protéines Tau a été réalisée avec l'immunsérum N term. Dans les homogénats de cellules témoins (-) (dépôts de 90, 60 et 30 μ l), il détecte une bande mineure de 48 kDa et un doublet d'environ 52-53 kDa. Dans les homogénats de cellules traitées à l'acide okadaïque (+) (dépôts de 10, 20 et 30 μ l), il détecte une bande majeure de 55 kDa et une bande mineure de 64 kDa, qui s'alignent avec les protéines Tau^{PHF} de 55 et 64 kDa présentes dans les homogénats de cerveaux d'Alzheimer (Alz).



Résultats

FIGURE: 14

Analyse bidimensionnelle des protéines Tau des cellules non traitées (Ctrl) et des cellules traitées (OA) détectées par les sérums Nterm et abs PHF

Les protéines Tau dans les cellules témoins ont un point isoélectrique compris entre 6 et 7,3. Le traitement des cellules par l'acide okadaïque fait apparaître des protéines Tau plus acides de point isoélectrique compris entre 5,3 à 7,3. Celle-ci sont détectées plus fortement par l'anticorps abs PHF.

Sur la droite, les homogénats de cellules et un homogénat de cerveau d'Alzheimer ont été déposés pour la deuxième migration. La position des protéines Tau^{PHF} de 64 et 69 kDa présentes dans les homogénats de cerveau d'Alzheimer par rapport à la position des protéines Tau des cellules montrent qu'une augmentation de masse moléculaire apparente est effectivement survenue dans les cellules exposées à l'acide okadaïque.

La position de l'actine, indiquée par une flèche a été déterminée en incubant à nouveau les immuno-empreintes avec l'anti-actine.

La position de l'actine par rapport à celle des protéines Tau montre que l'acide okadaïque induit réellement l'acidification des protéines Tau.

La quantité de ³²P incorporée dans les cellules exposées à 0,25 μ M d'acide okadaïque pendant 4 heures, déterminée par précipitation des protéines à l'acide trichloroacétique et comptage de la radioactivité par effet Cerenkov, est au moins deux fois plus importante que celle incorporée dans les cellules témoins. Dans les cellules traitées, l'acide okadaïque induit la phosphorylation d'un grand nombre de protéines. Les protéines Tau immuno-précipitées par l'anticorps Nterm sont radioactives. L'acide okadaïque induit effectivement une phosphorylation progressive des protéines Tau (figure 15). La mesure de la radioactivité des protéines Tau immunoprécipitées montre qu'elles sont 2 à 2,5 fois plus radioactives dans les cellules exposées à l'acide okadaïque que celles dans les cellules témoins.

Quand les homogénats de cellules sont traités à la phosphatase alcaline, les protéines Tau ont une masse moléculaire apparente qui décroît, que ce soit dans les cellules témoins ou dans les cellules exposées à l'acide okadaïque. Les protéines Tau normales dans les cellules différenciées sont phosphorylées. Cette phosphorylation leur donne une conformation qui ralentit leur migration en gel de polyacrylamide. Les protéines Tau des cellules exposées à l'acide okadaïque et déphosphorylées par la phosphatase alcaline, migrent à la même position que les protéines Tau des cellules témoins déphosphorylées (figures 15 et 23). L'augmentation de masse moléculaire apparente des protéines Tau dans les cellules de neuroblastome SKNSH-SY 5Y traitées à l'acide okadaïque, n'est pas due à la synthèse de nouvelles isoformes contenant des inserts ou des domaines répétitifs supplémentaires, mais bien à l'hyperphosphorylation des protéines Tau.



Étude de la phosphorylation des protéines Tau dans les cellules exposées à l'acide okadaïque.

A] Incorporation de ³²P dans les cellules témoins (-) pendant 4 h, comparée à l'incorporation de ³²P dans les cellules exposées à l'acide okadaïque (+) pendant 1 h 35, 1 h 50 et 4 h. L'autoradiogramme montre que l'acide okadaïque induit la phosphorylation de nombreuses protéines dans les cellules, les pointes de flèches indiquent des protéines qui deviennent phosphorylées ou des protéines qui soit ne le sont plus, soit migrent différemment. Les flèches indiquent la position des protéines Tau de 55 et 64 kDa déterminée par immunodétection.

B] Autoradiogramme des protéines Tau radiomarquées par le ³²P dans les homogénats de cellules témoins (-) et traitées à l'acide okadaïque (+), immunoprécipitées par l'anticorps N term. Les protéines Tau des cellules traitées à l'acide okadaïque sont bien phosphorylées.

C] Immunodétection par l'anticorps N term des protéines Tau d'un homogénat de cellules exposé à l'acide okadaïque avant (-) et après (+) déphosphorylation par la phosphatase alcaline. Une diminution de la masse moléculaire apparente des protéines Tau est observée quand elles sont déphosphorylées.

II.4.2.3. Détection d'épitopes spécifiques des protéines Tau pathologiques dans les cellules exposées à l'acide okadaïque

Les changements de conformation des protéines Tau induits par la phosphorylation font apparaître de nouveaux épitopes détectés par des sondes immunologiques spécifiques des Tau^{PHF}.

- Dans les neuroblastomes, l'abs PHF (spécifique des protéines Tau^{PHF}) ne détecte que les protéines Tau des cellules exposées à l'acide okadaïque (figure 16).

- L'anticorps monoclonal Tau 1 est dirigé contre les sérines 199 et/ou 202 des protéines Tau quand le site n'est pas phosphorylé (Ksiezak-Reding *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1991). Il reconnaît les protéines Tau normales présentes dans le cerveau adulte et les protéines Tau des cellules SKNSH-SY 5Y différenciées, mais ne reconnaît pas les protéines Tau^{PHF} ni les protéines Tau des cellules exposées à l'acide okadaïque (figure 16).

 L'anticorps monoclonal SMI 31 reconnaît un site phosphorylé sur les neurofilaments (Sternberger & Sternberger, 1983). Il reconnaît également les sérines 396 et 404 phosphorylées dans les protéines Tau^{PHF} (Lichtenberg-Kraag *et al.*, 1992). L'anticorps marque les protéines Tau des cellules exposées à l'acide okadaïque.

En inhibant les phosphatases par une concentration d'acide okadaïque de 0,25 μ M pendant 6 heures dans les cellules de neuroblastomes, nous détectons des protéines Tau ayant des caractéristiques des Tau^{PHF}. Nous avons poursuivi l'étude de ce modèle en tentant de répondre à plusieurs questions. A quel moment ces protéines Tau sont détectables dans les cellules ? L'acide okadaïque est-il toxique pour les cellules aux concentrations qui permettent d'induire les protéines Tau hyperphosphorylées ? L'inhibition des phosphatases est-elle réversible ? La synthèse d'ARN ou de protéines est elle nécessaire ? Quelles sont les kinases actives ?

:

-



. . . .

Effets de l'acide okadaïque sur l'immunodétection des protéines Tau par différents anticorps N term, abs PHF, Tau 1 et SMI 31.

Les protéines Tau hyperphosphorylées des cellules exposées à l'acide okadaïque portent des épitopes spécifiques des Tau^{PHF}.

- L'anticorps N term marque à la fois les protéines Tau des cellules témoins (-) et des cellules exposées à l'acide okadaïque (+).

- L'anticorps Tau 1 ne reconnaît les protéines Tau que dans les cellules témoins.

- Les anticorps abs PHF et SMI 31 marquent uniquement les protéines Tau dans des homogénats de cellules exposées à l'acide okadaïque.

II.4.3. CINÉTIQUE D'APPARITION DES ÉPITOPES PATHOLOGIQUES DE TYPE ALZHEIMER

Des cellules différenciées 4 jours au NGF ont été traitées à l'acide okadaïque pour des temps allant de 30 min à 6 h. Après 30 min d'exposition, les neurites des cellules sont plus courts. Cependant, le profil des protéines Tau de ces cellules reste inchangé. Après 50 min, quand les cellules n'ont plus de neurite, elles se détachent de leur support. Des protéines Tau, de masse moléculaire plus élevée, portants des épitopes de type Alzheimer sont détectées (figure 12). Des protéines Tau normales sont également détectées par l'anticorps Tau 1 (figure 17). Après 1 heure d'exposition à l'acide okadaïque, toutes les cellules sont détachées de leur support. Par rapport au temps 40 minutes, il n'y a pas de changement dans le profil de migration et la détection des protéines Tau. Après 3 et 6 heures d'exposition à l'acide okadaïque, seules des protéines Tau portant des épitopes de type Alzheimer sont détectées, les protéines Tau ne sont plus marquées par l'anticorps Tau 1 (figure 18).

Avec l'anticorps Tau 1, nous avons remarqué que l'immunoréactivité des protéines Tau dans les cellules exposées à l'acide okadaïque augmentait au moment du décollement pour disparaître ensuite. Or, cet anticorps est décrit comme dépendant de la phosphorylation. Pour qu'il puisse se fixer, les sérines 199 et/ou 202 des protéines Tau ne doivent pas être phosphorylées. L'acide okadaïque induit progressivement la phosphorylation de nombreuses protéines dans les cellules et notamment celle des protéines Tau (figure 15). L'augmentation de l'immunoréactivité de Tau 1 n'est pas due à une déphosphorylation du site mais probablement aux changements de conformation induits par la phosphorylation de certains sites sur les protéines Tau, et détectés par l'anticorps abs PHF. Une telle augmentation de l'immunomarquage a déjà été montrée pour le phosphopeptide PT4, contenant un phosphate près du site de Tau 1 (Liu *et al.*, 1993) sur la serine 191.



B Taux de survie



Cinétique d'apparition des épitopes TauPHF

Les cellules ont été traitées avec $0,25 \,\mu\text{M}$ pour des temps allant de 30 min à 6 heures.

A] Immunoréactivité des protéines Tau détectées par les anticorps Tau 1 et abs PHF quantifiée par analyse densitométrique. L'immunoréactivité de Tau 1 augmente peu après le décollement pour disparaître ensuite. Des épitopes pathologiques ne sont pas détectés dans les cellules témoins par l'abs PHF. Cependant, une forte immunoréactivité des protéines Tau est observée après 1 heure de traitement à l'acide okadaïque.

B] Taux de survie des cellules en fonction de la durée du traitement.

Les flèches indiquent le moment de détachement des cellules.



:

.

Figure: 18

Augmentation de l'immunoréactivité des protéines Tau au moment du décollement suivie par l'anticorps SMI 31.

Les cellules ont été traitées par l'acide okadaïque le temps nécessaire pour obtenir le décollement plus 5, 15 ou 30 minutes (d_{+5} , d_{+15} , d_{+30}). L'immunodétection des protéines Tau a été réalisée par l'anticorps SMI 31. Cet anticorps détecte un site phosphorylé répété un grand nombre de fois sur les neurofilaments. Ceux-ci sont d'ailleurs fortement marqués dans le haut de la photo. Le site reconnu par l'anticorps SMI 31 est également présent en un exemplaire sur les protéines Tau. Il est localisé sur les sérines 396 et 404 lorsqu'elles sont phosphorylées.

Les protéines Tau ne sont pas marquées par l'anticorps SMI 31 dans les cellules témoins. Par contre l'intensité de l'immunomarquage de la protéine Tau de 55 kDa augmente entre 5 et 30 minutes après le décollement.

Résultats

Ainsi, les protéines Tau pathologiques ne sont détectées qu'au moment où les cellules se décollent, l'anticorps Tau 1 détectant encore des protéines Tau normales. La toxicité de l'acide okadaïque augmente avec le temps. Ainsi, 60 % des cellules sont viables après 1 heure d'exposition à l'acide okadaïque, alors qu'il n'en reste plus que 10 à 20 % après 6 heures.

II.4.4. EFFET DOSE

Nous avons recherché la concentration minimale d'acide okadaïque qui induit l'apparition des épitopes pathologiques sur les protéines Tau après 6 heures d'exposition. Nous avons testé sur les cellule des concentrations allant de 50 nM à 1 μ M. 0,1 μ M est la concentration d'acide okadaïque minimale pour laquelle nous avons observé le détachement des cellules, la perte d'immunoréactivité de Tau 1 et l'immunomarquage des protéines Tau par l'anticorps anti PHF absorbé (figure 19). Avec une concentration d'acide okadaïque de 50 nM nous n'avons pas observé le détachement des cellules. La taille des neurites était cependant diminuée par rapport à celle des neurites des cellules témoins. Plus les concentrations d'acide okadaïque étaient élevées, plus le temps de détachement des cellules était court, mais le pourcentage de cellules viables était diminué.

II.4.5. RÉVERSIBILITÉ

Pour évaluer la réversibilité de l'inhibition des phosphatases, nous avons exposé les cellules SKNSH-SY 5Y différenciées pendant 4 jours au NGF, à 0,25 μ M d'acide okadaïque, le temps nécessaire pour obtenir le détachement des cellules. Rincées alors avec du milieu, les cellules ont été remises en culture sans acide okadaïque pour 1, 2 ou 4 heures.




FIGURE: 19

Détection des épitopes Tau^{PHF} après 6 heures d'exposition à différentes concentrations d'acide okadaïque.

A] Immunoréactivité des protéines Tau pour les anticorps Tau 1 et abs PHF quantifiée par analyse densitométrique.

B] Taux de survie des cellules en fonction de la concentration d'acide okadaïque.

C] Temps mis par les cellules pour se détacher en fonction de la concentration d'acide okadaïque. Après 6 heures d'exposition à 50 nM d'acide okadaïque, les cellules ne se sont pas détachées. L'immunoréactivité des protéines Tau avec l'anticorps Tau 1 augmente au décollement puis diminue dans les échantillons analysés après 1 heure et 2 heures pour augmenter à nouveau après 4 heures de remise en culture (figure 20). Avec l'anticorps abs PHF, les épitopes pathologiques sont détectés au décollement, et après la remise en culture jusqu'à 4 heures. Cependant, après 4 heures de remise en culture, une diminution de la détection des épitopes pathologiques est observée.

L'action de l'acide okadaïque semble temporaire puisque la détection des épitopes pathologiques décroît 4 heures après la remise en culture des cellules SKNSH-SY 5Y tandis que l'imunoréactivité de Tau 1 réapparaît. De même, nous avons exposé les cellules à 0,25 µM d'acide okadaïque pendant 30 min, les cellules ont été lavées puis remises en culture le temps théorique nécessaire pour obtenir le détachement, pour obtenir le détachement plus 1 heure, plus 2 heures et plus 4 heures. L'exposition plus courte des cellules à l'acide okadaïque (30 min) est suffisante pour que les épitopes pathologiques soient détectés sur les protéines Tau par l'abs PHF. C'est au moment du décollement et 1 heure après que la détection est la plus forte. Elle est cependant de plus courte durée quand l'acide okadaïque est laissé jusqu'au moment du décollement.

Le traitement des cellules soit à l'actinomycine D, inhibiteur de transcription, soit à la cycloheximide, inhibiteur de la synthèse protéique n'empêche pas l'apparition des épitopes pathologiques spécifiques des Tau PHF sur les protéines Tau. Ce résultat indique que la synthèse *de novo* de nouvelles isoformes n'est pas nécessaire pour la formation des protéines Tau de 55 et 64 kDa dans notre modèle.

En inhibant les protéines phosphatases 1 et 2A par la calyculine A (1 à 50 nM), nous avons également induit des protéines Tau hyperphosphorylées dans les cellules traitées, comme avec l'acide okadaïque (figure 21).



FIGURE: 20

Réversibilité de la phosphorylation induite par l'acide okadaïque

Immunodétection des protéines Tau par l'anticorps Tau 1 et l'anticorps abs PHF

- dans des cellules témoins (T) dans des cellules exposées à 0,25 μ M d'acide okadaïque le temps nécessaire pour obtenir le décollement (D₀), puis lavées et remises en culture 1 heure (D₊₁), 2 heures (D₊₂) ou 4 heures (D₊₄).

- Dans des cellules exposées 30 min à l'acide okadaïque (d) puis lavées et remises en culture le temps nécessaire théorique pour obtenir le décollement (d₀), le décollement plus 1 heure (d₀₊₁), 2 heures (d₀₊₂) ou 4 heures (d₀₊₄).

L'immunoréactivité de Tau 1 réapparaît après 4 heures de remise en culture alors que celle de l'abs PHF disparaît. Quand la durée d'exposition des cellules à l'acide okadaïque est diminuée, la disparition des épitopes pathologiques survient plus rapidement.



1 nM 10 nM 20 nM 50 nM calyculine A

;

. . .

Résultats

FIGURE: 21

Induction d'épitopes spécifiques des TauPHF sur les protéines Tau par différentes concentrations de calyculine A.

Les cellules différenciées pendant 4 jours au NGF sont mises en présence de différentes concentrations de calyculine A (1, 10, 20, 50 nM) le temps nécessaire pour obtenir le détachement des cellules plus 2 heures.

La masse moléculaire apparente des protéines Tau dans les cellules traitées à la calyculine A est de 55 et 64 kDa, comme lors du traitement à l'acide okadaïque. Au dessus de 20 nM de calyculine A, des épitopes pathologiques sont détectés sur les protéines Tau des cellules SKNSH-SY 5Y. A 1nM et 10 nM la présence de ces épitopes pathologiques est détectée sur les protéines Tau mais en quantité moindre.

II.4.6. EFFETS D'INHIBITEURS DE KINASE

Nous avons recherché les kinases intervenant dans la phosphorylation des protéines Tau dans les cellules SKNSH-SY 5Y différenciées au NGF non traitées ou traitées à l'acide okadaïque. Trois inhibiteurs spécifiques de kinases (décrit dans l'annexe) ont été utilisés.

- L'inhibiteur spécifique de la PKA: [N-[2-(p-Bromocinnamylamino)ethyl]-5isoquinolinesulfonamide] ou H89 utilisé à 1, 15 et 30 μM.

- L'inhibiteur spécifique de la CaM PK: {1-[N,O-Bis(5-isoquinolinesulfonyl)-Nmethyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine} ou KN 62 utilisé à 0,1, 1 et 10 μM.

- L'inhibiteur spécifique de la PKC: Chelerythrine (C₂₁H₁₈NO₄Cl H₃ S₂) utilisé
à 0,1, 1 et 10 μM.

Les cellules ont été prétraitées pendant une heure avec les différents inhibiteurs avant l'exposition à l'acide okadaïque. 15 min après le décollement, les cellules ont été reprises dans la solution de Laemmli pour l'analyse des protéines Tau.

D'après nos premiers résultats, l'inhibition de la PKA et de CaM PK ne semble pas modifier le profil de migration des protéines Tau dans les cellules ni empêcher l'apparition d'épitopes pathologiques sur les protéines Tau. L'inhibition de la PKA (H89 30 μ M) conduit au décollement des cellules en une heure. L'immunoréactivité des protéines Tau est diminuée pour cette concentration de l'inhibiteur H89, mais leur vitesse de migration ne semble pas modifiée. Cependant, ce sont des résultats préliminaires que nous devons encore confirmer.

L'inhibition de la PKC, par contre, modifie le profil de migration des protéines Tau dans les cellules témoins. Aux concentrations 5 et 10 μ M, la chélérythrine induit une augmentation de la vitesse de migration des protéines Tau. 3 nouvelles isoformes de plus faible masse moléculaire sont alors détectées (figure 22). Elles sont marquées par l'anticorps Tau 1. La chélérythrine retarde le décollement des cellules induit par l'acide okadaïque.

- 87 -



69 kDa ↓ 64 kDa ↓ 55 kDa ↓

FIGURE: 22

Effet de l'inhibition de la PKC sur la migration des protéines Tau avec ou sans acide okadaïque.

Les cellules SKNSH-SY 5Y ont été prétraitées 1 heure avec différentes concentrations de chélérythrine avant l'addition d'acide okadaïque dans le milieu. Les cellules sont homogénéisées dans la solution de Laemmli 15 minutes après le décollement des cellules des boites traitées uniquement à l'acide okadaïque.

Le profil de migration des protéines Tau est modifié lors de l'inhibition de la PKC, la masse moléculaire apparente des protéines Tau diminue. L'inhibition dépend de la concentrations de chélérythrine utilisée.

L'apparition d'épitopes pathologiques sur les protéines Tau n'est plus détectée dans ces cellules. Avec l'anticorps Nterm, seule l'immunoréactivité de la bande de masse moléculaire la plus faible semble moins intense par rapport à celle des cellules traitées uniquement à la chélérythrine.

Quand la PKC est inhibée par 5 μ M de chélérythrine, seules les protéines Tau dont la masse moléculaire n'a pas été modifiée par l'inhibition de la PKC acquièrent une masse moléculaire plus élevée sous l'action de l'acide okadaïque. Les épitopes pathologiques ne sont détectés que sur ces protéines Tau, et non pas sur les protéines Tau de masse moléculaire diminuée par l'inhibition de la PKC. Avec 10 μ M de chélérythrine, toutes les protéines Tau ont une masse moléculaire apparente diminuée. Dans ces cellules, l'acide okadaïque n'induit pas la formation de protéines Tau hyperphosphorylées. Il semble que la phosphorylation des protéines Tau, régulée par la PKC, soit indispensable pour que les épitopes pathologiques caractéristiques des Tau^{PHF} apparaissent.

Les épitopes pathologiques induits par l'acide okadaïque sont détectés dans les cellules exposées à 1 et 5 μ M de chélérythrine. La détection est cependant très faible pour cette dernière concentration de chélérythrine. La phosphorylation des protéines Tau par la PKC est donc nécessaire pour induire la formation d'épitopes pathologiques sur les protéines Tau.

A quel niveau agit la PKC dans la phosphorylation des protéines Tau ? Baudier et al., (1987) Hoshi et al., (1987) ont montré que les protéines Tau étaient phosphorylées *in vitro* par la PKC. Il est donc possible que la PKC phosphoryle les protéines Tau *in vivo*. Mais il est possible également que la PKC intervienne plus en amont de la phosphorylation et régule l'activité d'une TPK. La TPK II par exemple, pourrait phosphoryler normalement les protéines Tau et permettre leur phosphorylation plus complète par la TPK I, induisant l'apparition d'un plus grand nombre d'épitopes pathologiques (Ishiguro et al., 1992a).

Résultats

Une certaine conformation adoptée par les protéines Tau lors de la phosphorylation à laquelle participerait la PKC, permettrait aux protéines kinases de type GSK3, MAPK ou cdK... de reconnaître et phosphoryler certains sites des protéines Tau.

II.4.7. TRAITEMENT DES PROTÉINES TAU À LA PHOSPHATASE ALCALINE

Quelle est la nature des modifications induite par la chélérytrine sur les protéines Tau ? Une protéolyse des protéines Tau ? Une diminution du nombre de sites phosphorylés ? Ces deux types de modifications se traduiraient par une diminution de la masse moléculaire apparente des protéines Tau. Pour répondre à ces questions, et pour tenter d'identifier les isoformes présentes dans les cellules, nous avons analysé le profil des protéines Tau des cellules SKNSH-SY 5Y et d'homogénats de cerveaux humain, avec ou sans déphosphorylation par la phosphatase alcaline. Les échantillons ont d'abord été dialysés. La déphosphorylation a été effectuée sur la moitié de chaque dialysat, l'autre moitié servant de témoin de déphosphorylation. Nous avons comparé la déphosphorylation des protéines Tau dans des cellules témoins, dans des cellules traitées par 10 μ M de chélérythrine, dans des cellules traitées par 10 μ M de chélérythrine, dans des cellules traitées par 10 μ M de chélérythrine, dans des cellules traitées par 10 μ M de chélérythrine, dans des cellules traitées par 10 μ M de chélérythrine, dans des cellules traitées par 10 μ M de chélérythrine puis exposées à 0,25 μ M d'acide okadaïque, dans des homogénats de cerveaux, adultes et de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (figure 23).

Les protéines Tau des cellules SKNSH-SY 5Y témoins migrent à la même position que les protéines Tau foetales les plus immunoréactives. Lorsqu'elles sont déphosphorylées par le traitement à la phosphatase alcaline, leur migration en gel de polyacrylamide est plus rapide et 2 bandes de masse moléculaire inférieure sont alors détectées. La plus rapide est la plus immunoréactive. Elle est alignée avec l'isoforme foetale déphosphorylée, l'isoforme des protéines Tau^{PHF} déphosphorylée la plus rapide, faiblement immunoréactive dans la figure, et l'isoforme A des protéines Tau adultes déphosphorylées ou non. La vitesse de migration de ces protéines Tau adultes ne semble pas varier avec le traitement à la phosphatase alcaline.

- 90 -



: : .

FIGURE: 23

Déphosphorylation des protéines Tau de cellules SKNSH-SY 5Y et de protéines Tau adultes, foetales et de patient atteint de la maladie d'Alzheimer.

Analyse des protéines Tau déphosphorylées (+) ou non (-)

-> de cellules SKNSH-SY 5Y témoins (T), traitées par la chélérythrine (CH), par la chélérytrine puis par l'acide okadaïque (CH+AO), par l'acide okadaïque (AO),

-> adultes (Tau N), foetales (Tau F), de patient atteint de la maladie d'Alzheimer (Alz).

Les protéines Tau des cellules SKNSH-SY 5Y déphosphorylées ont une masse moléculaire apparente diminuée. Les plus immunoréactives migrent à la même vitesse que les protéines Tau foetales déphosphorylées.

Les protéines Tau des cellules exposées à la chélérytrine sont moins phosphorylées que les protéines Tau des cellules témoins. L'inhibition de la PKC ne semble pas induire d'autres modifications sur ces protéines Tau. En effet, lorsqu'elles sont déphosphorylées, elles ont une masse moléculaire apparente identique aux protéines Tau déphosphorylées des cellules témoins. Une isoforme moins phosphorylée, ou un produit de protéolyse des protéines Tau est détectée dans ces cellules.

Résultats

Dans les cellules exposées à l'acide okadaïque, la déphosphorylation des protéines Tau augmente leur vitesse de migration, Avec les anticorps Tau 1 et SMI 31 nous avons montré que les Ser¹⁹⁹ et/ou Ser²⁰², Ser³⁹⁶ et Ser⁴⁰⁴ sont phosphorylées sur les protéines Tau des cellules exposées à l'acide okadaïque. Ces sérines sont également phosphorylées dans les protéines Tau foetales (Kanemaru *et al.*, 1992; Goedert *et al.*, 1993; Hasegawa *et al.*, 1993; Bramblett *et al.*, 1993). Le ralentissement de migration observé pour les protéines Tau des cellules exposées à l'acide okadaïque déphosphorylées est identique à celui observé pour les protéines Tau foetales. Leur masse moléculaire apparente est alors identique à celle des protéines Tau des cellules témoins déphosphorylées.

Il semblerait donc que les isoformes présentes majoritairement dans les cellules soient les mêmes que celles exprimées dans le cerveau foetal c'est à dire l'isoforme A sans insert côté N- et C-terminal. Cela pourrait expliquer l'abondance de l'isoforme de 55 kDa et l'absence de la protéine Tau^{PHF} de 69 kDa dans les cellules exposées à l'acide okadaïque. La deuxième isoforme observée lors des déphosphorylations pourrait être l'isoforme foetale contenant une modification post-traductionnelle résistante à la phosphatase alcaline, ou bien une isoforme qui n'a pas été détectée par clonage moléculaire (Goedert & Jakes 1990) ou enfin, l'isoforme D avec un insert côté Cterminal.

Dans les cellules traitées à la chélérythrine, une bande supplémentaire inférieure est détectée. Elle peut correspondre à un produit de protéolyse des protéines Tau car elle est présente avant la déphosphorylation. Cette protéolyse est bien observée dans les cellules témoins, elle donne un aspect flou aux échantillons qui ont été dialysés. Cependant elle peut également correspondre à la plus petite isoforme des protéines Tau sans phosphate. Dans ce cas les protéines Tau des cellules témoins porteraient encore un (ou plusieurs) site(s) phosphorylé(s) inaccessible(s) pour la phosphatase alcaline. Ce(s) site(s) serai(en)t phosphorylé(s) directement ou indirectement par la PKC.

- 92 -

Les protéines Tau déphosphorylées les plus immunoréactives dans les cellules traitées à la chélérythrine ont une masse moléculaire apparente identique à celle des protéines Tau déphosphorylées les plus immunoréactives des cellules témoins. Ces protéines Tau n'apparaissent donc pas protéolysées. La PKC semble primordiale pour maintenir le niveau de phosphorylation des différentes isoformes Tau dans les cellules. La bande supérieure qui était présente dans les cellules témoins déphosphorylées n'est pas détectée dans les cellules traitées à la chélérythrine et déphosphorylées. La chélérythrine semble permettre une déphosphorylation plus complète des protéines Tau par la phosphatase alcaline, mais dans ce cas la bande inférieure devrait être plus immunoréactive que la bande supérieure.



Dans les cellules prétraitées par la chélérythrine puis exposées à l'acide okadaïque, l'immunodétection des protéines Tau paraît diffuse. L'acide okadaïque n'induit qu'une faible phosphorylation des protéines Tau. Après déphosphorylation, le profil des protéines Tau de ces cellules est similaire à celui des protéines Tau des cellules uniquement traitées à la chélérythrine. Les variations de masse moléculaire des protéines Tau consécutives à l'inhibition de la PKC semblent dues essentiellement à la phosphorylation.



D'autres études réalisées également avec l'acide okadaïque ont montré que l'inhibition des protéines phosphatases permettait d'induire la formation de protéines Tau hyperphosphorylées ayant des caractéristiques des protéines Tau^{PHF}. Ces protéines Tau hyperphosphorylées ont été observées en purifiant des protéines Tau (Furiya *et al.*, 1993), dans des tranches de cerveau humain maintenues en survie (Harris *et al.*, 1993), dans des cultures primaires de neurones (Arias *et al.*, 1993), dans des cultures de neuroblastomes humains de type LA-N-5 (Vandermeeren *et al.*, 1993).

Lors d'une préparation de protéines Tau, si de l'ATP et l'acide okadaïque sont ajoutés pendant les étapes de polymérisation des microtubules, les protéines Tau purifiées sont hyperphosphorylées. Elles migrent plus lentement en gel de polyacrylamide, et sont moins performantes à promouvoir la polymérisation des microtubules (Furiya *et al.*, 1993).Dans les tranches de cerveau humain maintenues en survie, l'inhibition des protéines phosphatases par des concentrations allant de 5 à 20 μ M d'acide okadaïque induit un ralentissement de mobilité éléctrophorétique des protéines Tau hyperphosphorylées. La phosphorylation entraîne une diminution de l'immunoréactivité des protéines Tau avec l'anticorps Tau 1. Dans ce modèle le Nmethyl-D-aspartate, le kaïnate ou le quisqualate ne sont pas capables d'induire une telle phosphorylation des protéines Tau. Nous n'avons pas non plus observé des modifications des protéines Tau dans les cellules SKNH-SY 5Y exposées au glutamate. La concentration d'acide okadaïque utilisée dans les tranches de cerveau en survie est élevée, cependant, elle induit la formation du triplet de protéine Tau pathologique. La

Résultats

présence de toutes les isoformes des protéines Tau semble nécessaire pour la formation du triplet pathologique. L'induction des protéines Tau^{PHF} par l'acide okadaïque semble être bloquée par la staurosporine, inhibiteur de la PKC ce qui est en accord avec nos résultats. Par contre l'inhibiteur de la CaM PK, le KN 62 empêche l'apparition des épitopes pathologiques dans les tranches de cerveau en survie (Harris *et al.*, 1993) alors qu'il ne semblait pas empêcher leur apparition dans les cellules de neuroblastome.

Dans des cultures primaires de neurones de rats, l'acide okadaïque induit la phosphorylation des protéines Tau et un ralentissement de leur mobilité électrophorétique. L'anticorps PHF-1 détecte principalement les protéines Tau dans les extensions neuritiques des cellules témoins. Les cellules exposées à l'acide okadaïque ont leurs extensions neuritiques qui se rétractent, tandis que le marquage des corps cellulaires par l'anticorps PHF-1 devient plus intense. Après 24 h d'exposition à 250 nM d'acide okadaïque, plus de 50 % de l'activité de la lactate déshydrogénase se retrouve dans le milieu de culture. L'acide okadaïque est donc cytotoxique pour ces neurones en culture (Arias *et al.*, 1993).

Le traitement de cellules de neuroblastome humain de type LA-N-5 par des concentrations d'acide okadaïque comprises entre 0,5 et 2 μ M pour une durée variant entre 30 min et 8 heures, induit la phosphorylation de la Ser¹⁹⁹ et/ou de la Ser²⁰² des protéines Tau, épitope alors reconnu par l'anticorps AT8. L'effet est dépendant de la durée et de la dose, il est réversible. L'acide okadaïque ne semble pas cytotoxique dans les cellules LA-N-5 (Vandermeeren *et al.*, 1993) alors qu'une certaine toxicité est observée dans les neuroblastomes SKNSH-SY 5Y.

CONCLUSION - PERSPECTIVES

CONCLUSION - PERSPECTIVES

La dégénérescence neurofibrillaire qui se manifeste au cours de la maladie d'Alzheimer est caractérisée par la présence du triplet de protéines Tau pathologiques, Tau 55, 64 et 69, dans les neurones qui dégénèrent. Depuis sa découverte (Delacourte *et al.*, 1989a; Flament *et al.*, 1989a,b,c; Delacourte *et al.*, 1990; Ksiezak-Reding *et al.*, 1990; Greenberg & Davis, 1990) l'importance de ce triplet de protéines Tau pathologiques comme marqueur fiable et précoce de la dégénérescence neurofibrillaire a été confirmée par de nombreuses études. Ainsi, il a été montré que la distribution topographique des lésions neurofibrillaires est parfaitement corrélée avec le degré de la démence (Braak & Braak, 1991; Arriagada *et al.*, 1992). Ces protéines Tau pathologiques peuvent servir au diagnostic de la maladie d'Alzheimer sur du matériel biopsique (Buée-Scherrer *et al.*, 1993). Elles peuvent permettre l'élaboration de modèles de dégénérescence neurofibrillaire de type Alzheimer (Delacourte *et al.*, 1989b).

Ces protéines Tau pathologiques ont des propriétés particulières qui les distinguent des protéines Tau normales. Elles sont anormalement phosphorylées et ont de ce fait, une masse moléculaire apparente en gel de polyacrylamide plus importante et un point isoélectrique plus acide que les protéines Tau normales. Pratiquement tous les sites phosphorylés sont de type Ser/Pro ou Thr/Pro. Les changements de conformation induits par cette phosphorylation font apparaître de nouveaux épitopes sur les protéines Tau qui sont détectés par des sondes immunologiques spécifiques.

Ce sont ces propriétés des protéines Tau que nous avons cherché à mettre en évidence dans les modèles expérimentaux de dégénérescence neurofibrillaire suivants: les neurones d'embryons de rats traités au glutamate et les cellules de neuroblastome humain de type SKNSH-SY 5Y traités à l'acide okadaïque.

Dans le modèle de dégénérescence neurofibrillaire induite par le glutamate, l'analyse immuno-cytochimique montre que le nombre de neurones d'embryons

- 96 -

marqués par un anticorps anti Tau augmente en fonction de la concentration de glutamate utilisée (Sindou et al., 1992). Toutefois, l'analyse biochimique n'a pas mis en évidence de différences qualitatives ou quantitatives entre ces protéines Tau avant et après traitement par le glutamate. En diminuant la concentration de glutamate et en augmentant la durée du traitement, des modifications d'immunoréactivité des protéines Tau ont été observées dans les cellules traitées. L'immunoréactivité des protéines Tau de masse moléculaire apparente plus élevée est augmentée par le traitement au glutamate. Par contre, celle des protéines Tau de masse moléculaire apparente plus faible est diminuée. Ces protéines Tau ont également un point isoélectrique plus acide. Cependant, les épitopes caractéristiques des protéines Tau^{PHF} n'ont pas été détectés sur ces protéines Tau. La dégénérescence neurofibrillaire induite par le glutamate n'est donc pas de type Alzheimer. Comment expliquer alors l'augmentation de l'immunomarquage des neurones observée après traitement au glutamate ? Nous avons montré que les protéines Tau ont un point isoélectrique plus acide qui pourrait résulter de la phosphorylation induite par le glutamate. Une phosphorylation pourrait entraîner une diminution de leur affinité pour les microtubules. Un plus grand nombre de protéines Tau seraient détectées dans les neurones.

Dans des conditions d'intoxication différentes, Hugon *et al.*, (1993) montrent avec l'anticorps AT8 que le glutamate induit l'apparition d'un épitope pathologique sur les protéines Tau, (phosphorylation des sérines 199 et/ou 202). La phosphorylation est détectée une et deux minutes après l'exposition des neurones au glutamate, mais semble décroître par la suite. Jouer sur la concentration et la durée du traitement au glutamate devrait permettre l'activation plus soutenue et plus longue des kinases impliquées dans la phosphorylation des Tau^{PHF}. L'inhibition des phosphatases devrait également intensifier la phosphorylation des protéines Tau induite par le glutamate.

Des neurones en culture sont-ils capables de produire le triplet de protéines Tau pathologiques, Tau 55, 64 et 69 ?

- 97 -

Étant donné que les protéines Tau 55, 64, 69 sont d'excellents marqueurs de la pathologie Alzheimer, il nous a semblé prioritaire de rechercher leur présence dans un modèle expérimental de dégénérescence. Pour ce faire, nous avons choisi de mettre au point un modèle cellulaire de dégénérescence neurofibrillaire de type Alzheimer avec la souche de neuroblastome SKNSH-SY 5Y. Il s'agit d'une lignée humaine, stable, bien connue et différenciable au NGF.

Nous avons tout d'abord procédé à l'analyse des protéines Tau en fonction des conditions de différenciation. En agissant sur la différenciation de ces cellules nous aurions pu induire la synthèse des protéines Tau (Fukuchi *et al.*, 1992) et notamment, la synthèse d'isoformes de masse moléculaire apparente plus élevée, contenant une séquence de liaison supplémentaire au microtubules. Cependant, l'apparition de ces nouvelles isoformes n'a pas été observé.

Le glutamate et le peptide neurotoxique $\beta_{(25-35)}$ n'ont induit aucun signe de dégénérescence des cellules ni de variation de migration ou d'immunoréactivité des protéines.

Nous avons alors analysé les effets l'induction de l'hyperphosphorylation des protéines des cellules SKNSH-SY 5Y par des inhibiteurs de protéines phosphatases et notamment par l'acide okadaïque. Nous avons pu observer la formation de protéines Tau modifiées, qui ont beaucoup d'analogies avec les protéines Tau pathologiques.

-> Elles ont une masse moléculaire apparente plus élevée en gel de polyacrylamide.

-> Elles ont un point isoélectrique comparable à celui des Tau^{PHF}.

-> Elles sont anormalement phosphorylées, ce qui induit des changements de conformation détectés par des anticorps dirigés contre des sites pathologiques des Tau^{PHF}.

Cependant, seules deux protéines du triplet pathologique sont détectées, les protéines Tau 55 et Tau 64.

- 98 -

L'induction des protéines Tau pathologiques dans les cellules SKNSH-SY 5Y pose les questions suivantes. 1] Quelle(s) est(sont) la(les) kinases responsable(s) de la phosphorylation pathologique des protéines Tau ? Comment expliquer l'absence de la protéine Tau 69 ?

Nos résultats ont montré que la protéine kinase C joue un rôle important dans la phosphorylation des protéines Tau. Quand celle-ci est inhibée, la masse moléculaire apparente des protéines Tau diminue. Dans les cellules traitées à l'acide okadaïque, l'inhibition de la PKC empêche la formation des protéines Tau pathologiques. Ainsi, la PKC semble jouer un rôle fondamental dans la phosphorylation des protéines Tau dans les cellules. L'étude fine de la phosphorylation des protéines Tau par la PKC devrait nous permettre de mieux comprendre les mécanismes de phosphorylation pathologique. (activation spécifique de la PKC).

Au total, nous montrons ici que le modèle SKNSH-SY 5Y permet d'étudier la formation des protéines Tau pathologiques. Il s'agit d'un premier pas qui nous montre que ces cellules possède le stock enzymatique de phosphatases et kinases nécessaire à la production des épitopes pathologiques. Le modèle nous semble particulièrement intéressant dans la mesure où il correspond à une lignée humaine dont la différenciation est inductible par le NGF.

Nous avons montré que les cellules SKNSH-SY 5Y peuvent produire des protéines Tau pathologiques: Tau 55 et en plus faible quantité Tau 64. L'analyse des isoformes après traitement à la phosphatase alcaline semble indiquer que les isoformes des protéines Tau présentes dans les cellules ne contiennent pas d'inserts du côté N-terminal. L'étude des ARNm le confirme, les exons 2 et 3 ne sont pas détectés dans les cellules. Comment expliquer alors la présence de la protéine Tau 64 dans les cellules traitées à l'acide okadaïque ? Car selon Goedert *et al.*, (1992), les protéines Tau 64 correspondraient aux isoformes hyperphosphorylées ne contenant qu'un insert dans la partie N-terminale. Cependant si nous montrons que la protéine Tau 64 peut contenir des isoformes sans l'insert de 29 acides aminés côté N-terminal, cela pourrait expliquer



pourquoi dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, la protéine Tau 64 paraît majoritaire par rapport aux formes Tau 55 et 69. De ce fait, nous envisagerons d'induire par transfection l'expression des isoformes adultes dans les cellules afin de vérifier leur rôle dans la formation du triplet Tau pathologiques et de voir alors si elles sont capables de s'assembler pour former des PHF.

Le but ultime d'un bon modèle est d'intégrer les étapes physiopathologiques de la maladie d'Alzheimer, l'amyloïdogénèse puis la dégénérescence neurofibrillaire. Ainsi la substance amyloïde qui se dépose dans les plaques peut avoir pour origine les neurones. Dans cette hypothèse nous pourrons étudier le métabolisme de l'APP dans les cellules SKNSH-SY 5Y, et les conditions pouvant favoriser celle-ci. Des études réalisées sur le métabolisme de l'APP montrent que l'expression de l'APP sécrétée non amyloïdogénique, est augmentée dans des cellules PC12 traitées avec un ester de phorbol (phorbol 12,13-dibutyrate). Elle augmente également en présence d'acide okadaïque (Caporaso *et al.*, 1992). L'enzyme responsable de ce clivage dans la séquence du peptide ß-amyloïde a été appelée alpha-sécrétase, par opposition à l'enzyme qui clive l'APP en dehors de la séquence du peptide amyloïde appelée betasécrétase.

La PKC semble jouer un rôle important dans la phosphorylation de l'APP et de protéines Tau. Comment intervient-elle ? Est-ce par phosphorylation de l'APP ou alors est-ce par l'activation de l'alpha-sécrétase ? Dans les cellules de neuroblastome, nous pourrons regarder si l'APP sécrétée est ou non augmentée dans les cellules traitées par l'acide okadaïque, nous regarderons également les effets de l'inhibition de la PKC. Si l'alpha-sécrétase est activé par la PKC, qu'en est-il de la ß-sécrétase ?

Il est maintenant reconnu que le peptide $\beta A4$ est neurotoxique lorsqu'il est agrégé (Busciglio *et al.*, 1992). Qu'en est-il pour les cellules de neuroblastome ? Nous n'avons pas induit la dégénérescence des cellules de neuroblastome avec le peptide neurotoxique. Quels sont les facteurs pouvant influencer cette neurotoxicité ? Avec différents peptides $\beta A4$ de synthèse agrégés ou avec une purification de dépôts de

- 100 -

substance amyloïde, nous étudierons les effets neurotoxiques du peptide BA4 sur les cellules SKNSH-SY 5Y et sur la phosphorylation des protéines Tau, en présence ou non d'acide acide okadaïque.

Au total, ce modèle cellulaire devrait nous permettre de mieux comprendre les mécanismes de la dégénérescence neurofibrillaire de type Alzheimer, le but ultime étant de trouver des agents thérapeutiques capables de ralentir ou d'arrêter ce processus. **MATERIEL ET METHODES**

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. CULTURE PRIMAIRE DE NEURONES D'EMBRYONS DE RATS

La culture et le traitement des neurones au glutamate sont réalisés à Limoges par l'équipe du Professeur Hugon suivant la technique décrite par Sindou et al (1992). Les cortex d'embryons de rats de 18 jours sont prélevés. Les meninges retirés, ils sont dilacérés dans un tampon PBS glucose sans calcium ni magnésium, puis les cellules sont mécaniquement dissociés en utilisant une pipette pasteur. La suspension de cellule est centrifugée à 300 x g pendant 10 min. le culot obtenu est resuspendu dans du milieu MEM contenant des sels de Earle contenant 5 μ g/ml d'insuline, 100 μ g/ml de transférine, 20 nM de progestérone, 30 nM de sélénite de sodium et 100 μ M de putrescine.

Les boîtes de culture sont prétraitées à la poly-L-lysine (MM comprise entre 30 et 70 kDa) pendant une heure à 37°C dans une étuve régulée à 5% de CO₂. Puis, les boîtes sont traitées par un tampon PBS glucose sans calcium ni magnésium contenant 10 % de sérum de veau foetal décomplémenté pendant une heure et rincées avec le tampon PBS glucose sans calcium ni magnésium. Les cellules sont mises en culture dans ces boîtes à une concentration de 1,25 M de cellules / ml.

Les neurones sont traitées avec le glutamate après 8 à 12 jours de culture.

I. CULTURE DES CELLULES SKNSH-SY 5Y

La lignée cellulaire SKNSH-SY 5Y a été établie à partir de cellules de neuroblastome d'origine humaine (Biedler et al., 1973).

Différenciation

Sous l'effet de différents agents, ces cellules sont capables de se différencier en cellules de type neuronales en émettant de long prolongements neuritiques. Les neurites des cellules différenciées ont alors une morphologie similaire à celle des cellules

- 102 -

Matériel et méthodes

ganglionaires du système sympathique au cours du développement. La différenciation peut être induite par des facteurs de croissance comme le NGF (nerve growth factor) (Biedler *et al.*, 1978), l'insuline, l'IGF (insulin like growth factor) (Recio-Pinto & Ishii, 1984), le PDGF (plateleted derived growth factor). Elle est également induite par l'acide rétinoïque (Biedler *et al.*, 1978), par des activateurs de PKC, comme le TPA (12-Otetradecanoyl-phorbol-13-acetate), ou des inhibiteurs de PKC comme la staurosporine (Leli et al., 1992).

Les cellules expriment les isoformes α , $\beta 1$, δ et ϵ des PKC, qui sont distribuées à la fois dans le cytoplasme et la membrane plasmique. La différenciation des cellules est accompagnée d'une diminution de l'activité des PKC (Leli et al., 1993).

Le TPA augmente le contenu en catecholamine des cellules et l'activité de la NSE (neuron-specific enolase). Il augmente également la synthèse du recepteur de l'IGF I. Au cours de la différenciation induite par le TPA et le PDGF l'expression des gènes codant pour les protéines GAP 43 et NPY est augmentée (Pahlman et al., 1992). La différenciation induite par l'IGF augmente l'expression des ARNm des neurofilaments de 68 et 170 kDa, des ARNm de la tubuline α et β (Wang *et al.*, 1992), et diminue celle des ARNm de c myc (Sumantran & Feldman, 1993).

Récepteurs exprimés

Les cellules expriment différents types de récepteurs et notamment des récepteurs au PDGF de type α et β (Pahlman et al., 1992), des récepteurs nicotiniques (Gould et al., 1992), des récepteurs muscariniques m1, m2 et m3 (Steel & Buckley, 1993), des récepteurs au glutamate (Naarala et al., 1993).

Les récepteurs muscariniques m3 exprimés par les cellules sont couplés au métabolisme des phospholipides et à l'entrée de calcium (Lambert & Nahorski, 1992).

L'activation des récepteurs nicotiniques conduit à la libération de noradrénaline (Gould et al., 1992) par activation des canaux calciques de type L (Vaughant et al., 1993), (des canaux calciques de type N et L étant présent à la surface des cellules (Reuveny & Narahashi, 1993)).

- 103 -

Elles expriment également des recepteurs au glutamate ionotropiques (Nmethyl-D-aspartate (NMDA, α -amino-3 hydroxy-5-methyl-4-isoxazol propionate (AMPA), et kainate) ainsi que des récepteurs métabotropiques qui sont couplés aux protéines G et liés au métabolisme des phospholipides (Naarala et al., 1993). Les sous unités de protéines G présentes dans les cellules sont Gi α 1, Gi α 2, Gs α , Gz α et G β . Ce profil ressemble à celui observé dans les tissus du système nerveux centrale (Ammer et Schulz, 1993). Une augmentation de calcium dans les cellules entraine une augmentation de l'expression de mRNA du VIP dans les cellules (Adler et al., 1993).

Utilisation

Les cellules SKNSH-SY 5Y sont donc très utilisées pour l'étude des mécanismes de différenciation. Elles sont également utilisées pour des études sur les mécanismes de tolérance des cellules aux opioïdes (Carter & Medzihradsky, 1993; Zadina et al., 1993).

II.1. ENTRETIEN

Les cellules sont cultivées stérilement en boites de 25 ou 75 cm² dans du milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal décomplémenté, 2 mM de glutamine, 50 U/ml de pénicilline et 50 μ g/ml de streptomycine, à 37°C dans une étuve régulée à 5 % de CO₂.

Le milieu est changé tous les trois jours.

II.2. REPIQUAGE OU RÉCUPÉRATION DES CELLULES :

Après avoir retiré le milieu des boites, les cellules sont placées dans une solution PBS sans calcium ni magnésium, à laquelle est ajouté une solution de PBS contenant 2 % de trypsine puis du milieu DMEM. Les cellules sont doucement dissociées à la pipette pasteur, centrifugées à 1500 tr/min pendant 5 mn. Le culot de cellules est remis en suspension dans du DMEM et réparti dans de nouvelles boites ou traité par la solution réductrice de Laemmli (50 μ l/10⁶ cellules).

II.3. CULTURE EN MILIEU DÉFINI

La composition du sérum de veau variant selon les lots, la différenciation des cellules s'effectue dans un milieu sans sérum. Les cellules sont cultivées dans un milieu DMEM/Hams F12 (1:1) contenant $5 \mu g/ml$ d'insuline, 100 $\mu g/ml$ de transférine, 20 nM de progestérone, 30 nM de sélénite de sodium, 50 U/ml de pénicilline, 50 $\mu g/ml$ de streptomycine et 10 ng/ml de NGF 2,5 S (Nerve Growth Factor). Le milieu est changé tous les 2 jours.

II.4. MARQUAGE DES CELLULES AU 32P

Les cellules sont placées dans un milieu sans phosphate 15 minutes avant le marquage. Le ³²P est ensuite ajouté dans le milieu de culture à 50 μ Ci/ml, en même temps que l'acide okadaïque. La radioactivité incorporée est déterminée sur les extraits cellulaires: 10 et 20 μ l d'homogénat sont précipités par 10 % d'acide trichloroacétique à 4°C pendant 30 min. Les précipités sont recueillis sur des filtres GF/C en fibre de verre et comptés sur compteur à effet Cerenkov.

II.5. TAUX DE SURVIE DES CELLULES

La viabilité des cellules est déterminée par la technique d'exclusion au bleu Trypan.

La numération est effectuée sur cellules de Mallasez en utilisant une solution de bleu Trypan (les cellules mortes apparaissent colorées en bleu). 10 μ l de la suspension cellulaire sont dilués dans 90 μ l d'une solution de bleu Trypan préparée extemporanément à partir de 3 volumes d'une solution mère de bleu Trypan à 0,1 % ajoutée à 1 volume d'une solution de Hanks hypertonique (Hanks + 2,55 g de NaCl/100 ml).

III. TRAITEMENT DES CELLULES ET DES TISSUS

III.1. SOLUTION RÉDUCTRICE DE LAEMMLI (LAEMMLI, 1970)

Les échantillons sont homogénéisés dans la solution de Laemmli:

Tris HCl	50 mM	pH 6,8
SDS	5 % (P/V)	
EDTA	4 mM	
Glycérol	10 % (V/V)	
cette solution est stockée à -20°C	Ajouter extemporanément:	
Dithiotréitol	0,25 % (P/V)	
Bleu de bromophénol	traces	

III.2. TRAITEMENT À LA PHOSPHATASE ALCALINE

Les extraits cellulaires, repris dans la solution de Laemmli, sont dialysés contre un tampon Tris 50 mM pH 8,3 contenant 50 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,2 mM DTT pendant une nuit à 4°C. La phosphatase alcaline d'intestin de veau est alors ajoutée au dialysat à 10 U/ml pendant 4 heures à température ambiante. La réaction est arrêtée en ajoutant un volume de solution réductrice de Laemmli et par chauffage à 100°C pendant 10 min. Les échantillons sont ensuite analysés par la technique des immuno-transferts.

III.3. IMMUNOPRÉCIPITATION

Le protéine A est une protéine de surface synthétisée par certaines souche de *Staphylococcus aureus*. Cette protéine possède une forte affinité pour la région Fc de la plupart des classes d'IgG. Cette propriété de la protéine A peut être utilisé pour précipiter des complexes antigène-anticorps (Crawford & lane, 1977).

Avant de permettre la formation du complexe antigène-anticorps, les constituants des cellules reconnus de manière aspécifique par la protéine A sont

Matériel et méthodes

éliminés de la manière suivante. 75 μ l d'un homogénat de cellules est incubé avec 5 μ l de protéine A-agarose pendant 30 min à température ambiante puis centrifugé.

Le surnageant est repris dans 900 μ l de tampon TNT (Tris-HCl 15 mM, pH 8; NaCl 0,3 M; Tween-20 0,05 % (P/V)) contenant 1 % de triton X 100 et 20 μ l d'anticorps polyclonal N-term, et mis à incubé une nuit à 4 °C en agitation douce. Un témoin blanc sans immunsérum est réalisé simultanément.

Les complexes anticorps-protéines Tau sont alors précipités par incubation avec 15 μ l de protéine A-agarose pendant 30 min à température ambiante sous agitation douce, et centrifugation 14000 x g pendant 5 min. Le précipité obtenu est lavé 3 fois dans du tampon TNT-triton. Le dernier culot est repris dans la solution de Laemmli, chauffé 10 min à 100°C et déposé sur gel de polyacrylamide.

Après séparation des protéines et électrotransfert sur membrane de nitrocellulose, les protéines sont colorées au rouge ponceau. Les membranes sont séchées et mise en impresssion avec des films autoradiographiques à - 70°C pour des temps variables.

IV. ELECTROPHORÈSES

IV.1. SÉPARATION DES PROTÉINES SELON LEUR MASSE MOLÉCULAIRE

IV.1.1. GEL DE SÉPARATION

Les électrophorèses sont réalisées dans des gradients d'acrylamide 10 - 20 %.

Solution d'acrylamide 10 %	Solution d'acrylamide 20 %
0,3 M	0,3 M
10 %	20 % (P/V)
0,266 %	0,532 % (P/V)
0,1 %	0,1 % (P/V)
300 µl	300 µl
	200 ml
qsp 1000 ml	qsp 1000 ml
	Solution d'acrylamide 10 % 0,3 M 10 % 0,266 % 0,1 % 300 µl qsp 1000 ml

- 107 -

IV.1.2. GEL DE CONCENTRATION

рН 6,8	Solution d'acrylamide 10 %
Tris HCl	0,1 M
Acrylamide	5 % (P/V)
Bis acrylamide	0,08 % (P/V)
SDS	0,1 % (P/V)
Temed	500 µl
H ₂ O	qsp 1000 ml

La polymérisation des gels est amorcée par l'addition de 200 μ l de persulfate d'ammonium à (100 mg/ml) par 27 ml de solution d'acrylamide. La dimension des plaques est de 140 x 140 x 1,5 mm.

IV.1.3. TAMPON D'ÉLECTROPHORÈSE

pH 8,3	
Tris HCl	25 mM
Glycine	0,2 M
SDS	0,1 % (P/V)
H ₂ O	qsp 1000 ml

La séparation des protéines est généralement réalisée pendant la nuit, à 18 mA constants.

IV.2. SÉPARATION DES PROTÉINES SELON LEUR CHARGE ET SELON LEUR MASSE MOLÉCULAIRE

IV.2.1. L'ISOÉLECTROFOCALISATION

Elle permet de séparer les protéines en fonction de leur charge. La technique utilisée est adaptée de celle décrite par O'Farell, (1975).

IV.2.1. Gel d'isoélectrofocalisation

Solution d'acrylamide pour l'isoélectrofocalisation

Urée	9,5 M	
Acrylamide	4,17 % (P/V)	
Bis acrylamide	0,11 % (P/V)	
Triton X100	2,7 % (V/V)	
Pharmalytes	5 % (V/V)	

Les pharmalytes sont choisies en fonction du gradient de pH que l'on veut obtenir (4 - 6,5 ou 3 - 10).

IV.2.2. Préparation des gels

La solution d'acrylamide est dégazée sous vide pendant 15 min. La polymérisation des gels est ensuite amorcée par l'addition dans 10 ml de solution d'acrylamide, de 10 μ l de Temed et de 15 μ l de persulfate d'ammonium à 10 % (P/V) préparé extemporanément. La polymérisation des gels est effectuée dans des tubes de verre de 2,5 mm de diamètre x 130 mm de long. La longueur des gels une fois polymérisés est d'environ 10 cm.

IV.2.3. Pré-isoélectrofocalisation

Les solutions de cathode (NaOH 0,1 N) et d'anode (acide phosphorique 0,06 %) sont dégazées sous vide pendant 30 min.

Une pré-isoélectrofocalisation est réalisée de la manière suivante: 200 V pendant 15 min, 300 V pendant 30 min et 400 V pendant 60 min.

IV.2.4. Isoélectrofocalisation

Dans les échantillons traités par la solution de Laemmli que l'on veut analyser, 50 % d'urée (P/V) et 2 % triton X100 (V/V) sont ajoutés. Ces échantillons sont agités, chauffés à 100°C pendant 2 min, centrifugés et déposés au sommet des gels.

- 109 -

Matériel et méthodes

L'isoélectrofocalisation est réalisée à 500 V pendant 20 heures puis 700 V pendant 30 min.

IV.2.2. DEUXIÈME DIMENSION

Les gels d'isoélectrofocalisation sont équilibrés pendant 5 min dans un tampon Tris 0,25 M, pH 6,8 contenant 3 % de SDS (P/P); 0,5 % de DTT (P/P) et 0,01 % de bleu de bromophénol (P/P) avant d'être déposés sur un gel de polyacrylamide 10-20 % afin de séparer les protéines selon leur masse moléculaire.

V. ELECTROTRANSFERT

Après électrophorèse, selon une modification de la méthode de Towbin, (1979), les protéines sont transférées sur des membranes de nitrocellulose (0.45 μ m de Schlecher et Schuell) pendant 1 h 30 (courant: 0,8 mA par cm²) en milieu semi-liquide sur Multiphor II Nova Blot (LKB) selon les instructions du fabricant (tampon "anode" (Tris 0,3 M pH 10,4; méthanol 20% (V/V)) et tampon "cathode" (acide 6-amino-nhexanoïque 40 mM pH 7,6; méthanol 20% (V/V)).

Une coloration réversible des protéines au rouge ponceau (acide trichloroacetique 3 % (P/V); rouge ponceau 0,2 % (P/V); H₂O) permet de contrôler l'efficacité du transfert.

VI. ANALYSE IMMUNOLOGIQUE

La saturation des membranes est réalisée par un tampon TNT (Tris-HCl 15 mM, pH 8; NaCl 0,3 M; Tween-20 0,05 % (P/V)) contenant 5% (P/V) de lait délipidé.

Les anticorps sont dilués dans le tampon TNT avec ou sans lait, et l'incubation est réalisé 1 ou 2 heures à température ambiante ou toute la nuit à 4°C.

La révélation des protéines immunomarquées se fait avec le kit de détection ECL (enhanced chemiluminescence) d'Amersham.

<u>VI.1. ANTICORPS UTILISÉS</u>

VI.1.1. ANTICORPS POLYCLONAUX

VI.1.1.1. Anticorps N term

Le peptide correspondant aux 19 premiers acides aminés de la protéine Tau (Met-Ala-Glu-Pro-Arg-Gln-Glu-Phe-Glu-Val-Met-Glu-Asp-His-Ala-Gly-Thr-Tyr-Gly) a été synthétisé et purifié par la société Néosystem (Strasbourg). Il a été couplé à l'ovalbumine par l'intermédiaire de la glutaraldhéhyde

Préparation de l'immunogène:

Le peptide (12 μ M) et l'ovalbumine (0,3 μ M) sont dissous dans 3 ml de tampon PBS 0,1 M à pH 7,4. 1 ml de glutaraldéhyde à 6 % est ajouté goutte à goutte à la solution. Le couplage est effectué pendant une heure à 4°C sous agitation constante. La réaction est arrêtée par addition de borohydrure de sodium (5 mg dans 200 μ l d'H2O) et l'ensemble est mis à dialysé à 4°C pendant 48 h contre une solution à 0,9 % de NaCl. Le volume du dialysat est ajusté à 5 ml, réparti en 10 doses de 500 μ l qui sont conservées à -20°C.

Le protocole d'immunisation

Le protocole d'immunisation employé est celui décrit par Vaitukaitis *et al.*, (1971).

Le lapin, préalablement saigné, reçoit une dose d'antigène émulsionnée dans de l'adjuvant complet de freund, en injections intradermiques multiples. Il reçoit en plus une dose de vaccin anticoquelucheux (Vaxicoq, Institut Mérieux) et une dose de vaccin B. C. G. (Monovax, Institut Mérieux) pour potentialiser sa réponse immunitaire.

3 rappels sont ensuite effectués à 15 jours d'intervalle, toujours en injections intradermiques multiples, avec l'antigène émulsionné cette fois-ci dans l'adjuvant incomplet de freund.
Matériel et méthodes

3 semaines après le dernier rappel, puis chaque mois, une dose d'antigène non émulsionnée est injectée dans la veine marginale de l'oreille du lapin. Une semaine après, l'animal est saigné à l'oreille, environ 30 ml de sang sont prélevés.

Les immunsérums obtenus sont additionnés d'un volume égal de glycérol et stockés à -20°C.

Caractérisation

Sur immuno-empreintes, l'anticorps Nterm reconnaît les protéines Tau normales présentes dans les homogénats de cerveaux témoins et les protéines Tau normales et Tau^{PHF} présentes dans les homogénats de cerveaux d'Alzheimer. Ce sérum reconnaît les neurones en dégénérescence neurofibrillaire présents dans le cortex de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, sur des coupes à congélation et sur coupes en paraffine. Il réagit de façon similaire à l'anticorps Alz-50.

VI.1.1.2. Les anticorps anti Tau: MV4S2 et anti PHF

L'immunsérum anti Tau a été obtenu en injectant à un lapin une purification de protéines Tau normales humaines thermostables.

L'immunsérum anti PHF a été obtenu en injectant à un lapin une préparation de PHF (Persuy et al., 1985).

Les anticorps reconnaissent tous deux les neurones en dégénérescence neurofibrillaire en microscopie optique, et les PHF en microscopie électronique. Sur des immunotransferts, ils détectent les protéines Tau normales (Delacourte & Défossez, 1986; Parent *et al.*, 1988) et les protéines Tau pathologiques (Delacourte *et al.*, 1990).

VI.1.1.3. L'anti PHF absorbé (abs PHF)

L'anti PHF reconnaît les sites de phosphorylation pathologique présents sur les protéines Tau^{PHF} et ainsi que les sites normaux. En incubant le sérum anti PHF (1/800) avec du tissus cérébral sain (P/8V), les anticorps dirigés contres les sites normaux des

- 112 -

protéines Tau^{PHF} vont se fixer sur les protéines Tau normales. Cette incubation est réalisée en présence d'inhibiteurs de protéases PMSF (phenyl methane-sulfonyl fluoride) 1 mM, TPCK (L-1-chloro-3-[4-tosylamido]-4-phenyl-2-butanone 0,1 mM, TLCK (L-1-chloro-3-[4-tosylamido]-7-amino-2-heptanone 0,1 mM, leupeptine 1 μ M.

VI.1.2. LES ANTICORPS MONOCLONAUX TAU 1 ET SMI 31

Les anticorps monoclonaux Tau 1 et SMI 31 sont utilisés dilués au 1/500 et 1/1000 respectivement dans du TNT contenant 5 % de lait.

L'anticorps Tau 1 reconnaît la séquence Gly¹⁹²-Asp-Arg-Ser-Gly-Tyr-Ser-Ser-Pro-Gly-Ser-Pro-Gly²⁰⁴ des protéines Tau lorsque les sérines 199 et 202 ne sont pas phosphorylées (Binder et al., 1985; Liu et al., 1993; Szendrei et al., 1993).

L'anticorps SMI 31 reconnaît la séquence Lys³⁹⁵-Ser-Pro-Val-Val-Ser-Gly-Asp-Thr-Ser-Pro⁴⁰⁵ des protéines Tau lorsque les sérines 396 et 404 sont phosphorylées (Sternberger et al., 1982; Lichtenberg-Kraag et al., 1992)

VI.2. QUANTIFICATIONS

Les films ECL ont été digitalisés sur Macintosh IIx avec un scanner ScanJet IIC (Hewlet Packard), avec une résolution de 300 points par pouce et sauvés en format PICT avec une échelle à 256 niveaux de gris.

Les images numérisées sont ensuite analysées grâce à un programme Image 1,43 élaboré par W. Rasband (National Institute of Health, USA)

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Adler E.M. & Fink J.S. (1993) Calcium regulation of vasoactive intestinal polypeptide messenger RNA abundance in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. J. Neurochem. 61: 727-737.
- Ahn N.G., Weiel J.E., Chan C.P. & Krebs E.G. (1990) Identification of multiple epidermal growth factor-stimulated protein serine/threonine kinases from swiss 3T3 cells. J. Biol. Chem. 265: 11487-11494.
- Ammer H. & Schulz R. (1993) Alteration in the expression of G-proteins and régulation of adenylate cyclase in human neuroblastoma SH-SY5Y cells chronically exposed to low-effficacy mu-opioids. Biochem. J. 295: 263-271.
- Anderson N.G., Maller J.L., Tonks N.K. & Sturgill T.W. (1990) Requirement for integration of signals from two distincts phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. Nature 343, 651-653.
- Anderton B.H, Breinburg H.D., Downes M.J., Green P.J., Tomlinson B.E., Ulrich J., Wood J.N. & Kahn J. (1982) Monoclonal antibodies show that neurofibrillary tangles and neurofilaments share antigenic determinants. Nature 298: 84.
- Andreadis K., Brown W.M. & Kosik K.S. (1992) Structure and novel exons of the human-Tau gene. Biochemistry 31: 10626-10633.
- Argasinski A., Sternberg H., Fingado B. & Huynh P. (1989) Doxorubicin affects Tau metabolism in human neuroblastoma cells. Neurochem. Res. 14: 927-931.
- Arias C., Sharma N., Davies P. & Shafit-Zagardo B. (1993) Okadaic acid induces early changes in microtubule-associated protein 2 and Tau phosphorylation prior to neurodegeneration in cultured cortical neurons. J. Neurochem. 61: 673-682.
- Arioka M., Tsukamoto M., Ishiguro K., Kato R., Sato K., Imahori K. & Uchida (1993) Tau-protein kinase-II is involved in the regulation of the normal phosphorylation state of tau-protein. J. Neurochem. 60: 461-468.

- Arnold S.E., Hyman B.T., Flory J., Damasio A.R. & Van Hoesen G.W. (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.
- Arriagada P.V., Growdon J.H., Hedleywhyte E.T. & Hyman B.T. (1992) Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's Disease. Neurology 42: 631-639.
- Ballou L. M. & Fisher E.H. (1986) The Enzymes, Vol XVII, Academic. Press, Inc., p.311.
- Baudier J. & Cole R.D. (1987) Phosphorylation of Tau proteins to a state like that in Alzheimer's brain is catalyzed by a calcium/calmodulin-dependant kinase and modulated by phospholipids. J. Biol. Chem. 262: 17577-17583.
- Baudier J., Lee S.H. & Cole R.D. (1987) Separation of the different microtubuleassociated Tau protein species from bovine brain and their mode II phosphorylation by Ca++/phospholipid-dependent protein kinase C. J. Biol. Chem. 262: 17584-17590.
- Behrouz N., Defossez A., Delacourte A., & Mazzuca M. (1991) The immunohistochemical evidence of amyloid diffuse deposites as a pathological hallmark in Alzheimer's disease. J. Gerontology 46: 209-212.
- Biedler J.L., Helson L. & Spengler B.A. (1973) Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. Cancer Res. 33: 2643-2652.
- Biedler J.L., Roffler-Tarlow S., Schachner M. & Freedman L.S. (1978) Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cells and clones. Cancer Res 38: 3751-3757.
- Biernat J., Mandelkow E.M., 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.

- Biernat J., Gustke N., Drewes G., Mandelkow E.M. & Mandelkow E. (1993) Phosphorylation of Ser(262) strongly reduces binding of Tau-Protein to microtubules - distinction between PHF-Like immunoreactivity and microtubule binding. Neuron 11: 153-163.
- Bons N., Mestre N. & Petter A. (1991) Senile plaques and neurofibrillary changes in the brain of an aged lemurian primate Microcebus murinus. Neurobiol. Aging 13: 99-105.
- Boulton T.G., Nye S.H., Robin D.J., Ip N.Y., Radziejewska E., Morgenbesser S., DePinho R., Panayotatos N., Cobb M. & Yancopoulos G. (1991) Cell 65: 663-665.
- Boyle W.B., Smeal T., Defize L.H.K., Angel P., Woodgett J.R., Karin M. & Hunter T. (1991) Activation of protein kinase C decrease phosphorylation of cJun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity Cell 64: 573-584.
- Braak H & Braak E (1991) Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathol 82: 239-259.
- Bramblett G.T., Goedert M., Jakes R., Merrick S.E., Trojanowski J.Q. & Lee V.M.Y. (1993) Abnormal tau phosphorylation at Ser 396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. Neuron 10: 1089-1099
- Brion J.P., Passareiro H., Nunez J & Flament-Durand J (1985) Immunological detection of tau protein in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. Arch.Biol. 95: 229-235
- Brion J.P., Hanger D.P., Bruce M.T., Couck A.M., Flament-Durand J. & Anderton B.H. (1991a) Tau in Alzheimer neurofibrillary tangles - N-terminal and C-terminal regions are differentially associated with paired helical filaments and the location of a putative abnormal phosphorylation site. Biochem. J. 273: 127-133.
- Brion J.P., Hanger D.P., Couck A.M. & Anderton B.H. (1991b) 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 J.P., Couck A.M., Robertson J., Loviny T.L.F. & Anderton B.H. (1993) Neurofilament monoclonal antibodies RT97 and 8D8 recognize different modified

epitopes in paired helical filament-tau in Alzheimer's disease. J. Neurochem 60: 1372-1382.

- Busciglio J., Lorenzo A. & Yankner B.A. (1992) Methodological assessment of ß amyloid neurotoxicity. Neurobiol. Aging 13: 609-612.
- Buée L., Ding W., Delacourte A. & Fillit H. (1993) Binding of secreted human neuroblastoma proteoglycans to the Alzheimer's amyloid A4 peptide. Brain Res. 601: 154-163.
- Buée-Scherrer V., Buée L., Vermersch P., Hof P.R., Leveugle B., Loerzel A., Steele J.C., Delacourte A. & Perl D.P. (1993) Biochemical characterization of the Tau proteins in Lateral Sclerosis/Parkinsonism dementia complex (ALS/PDC) of Guam. Soc. Neurosci. Abstr. 82.6.
- Buée-Scherrer V., Vermersch P., Condamines O., Mourtons-Gilles C., Pau B., Destée A., Leys D., Petit H. & Delacourte A. (1993) Diagnostic de la maladie d'Alzheimer à partir de biopsies de patients présentant une démence atypique: intéret de l'approche biochimique. Ilème réunion Francophone sur la maladie d'Alzheimer et les syndromes apparentés. Marseille, 26 et 27 novembre 1993.
- Cai X.D., Golde T.E. & Younkin S.G. (1993) Release of excess amyloid β-protein from a mutant amyloid β-protein precursor. Science 259: 514-516.
- Campbell S.K., Switzer R.C. & Martin T.L. (1987) Alzheimer's plaques and tangles: a controlled and enhanced silver staining method. Soc. Neurosci. Abstr. 13: 678.
- Campion D., Martinez M. & Clerget-Darpoux F. (1993) Caractéristiques de la concentration familiale dans les formes précoces de D.T.A. Ilème réunion Francophone sur la maladie d'Alzheimer et les syndromes apparentés. Marseille, 26 et 27 novembre 1993.
- Caporaso G.L., Gandy S.E., Buxbaum J.D., Ramabhadran T.V. & Greengard P. (1992) Protein phosphorylation regulates secretion of Alzheimer B/A4 amyloid precursor protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 3055-3059.
- Carette B., Poulain P., Delacourte A. (1993) Electrophysiological effects of 25-35 amyloid-ß-protein on guinea-pig lateral septal neurons. Neurosci. Lett. 151: 111-114.

- Carter B.D. & Medzihradsky F. (1993) Receptor mechanisms of opioid tolerance in SH-SY5Y human neural cells. Molecular Pharmacology 43: 465-473.
- Castaño E.M., Ghiso J., Prelli F., Gorevic P.D., Migheli A. & Frangione B. (1986) In vitro formation of amyloid formation fibrils from two synthetic peptides of different lengths homologous to Alzheimer's disease β-protein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 141: 782-789.
- Ceballos-Picot I., Nicole A., Briand P., Grimber G., Delacourte A., Défossez A., Javoy-Agid F., Lafon M., Blouin J.L. & Sinet P.M. (1991) Neuronal-specific expression of human copper-zinc superoxide dismutase gene in transgenic mice: animal model of gene dosage effects in Down's syndrome. Brain Res. 552: 198-214.
- Chartier-Harlin M.C., Crawford F., Houlden H. Warren A., Hughes D., Fidani L., Goate A., Rossor M., Roques P., Hardy J. & Mullan M. (1991) Early onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the ß-amyloid precursor protein gene. Nature 353: 844-846.
- Choi D.W. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. Neuron 1: 623-634.
- Cicirelli M.F., Pelech S.L.& Krebs E.G. (1988) Activation of multiple protein kinases during the burst in protein phosphorylation that precedes the first meiotic cell division in Xenopus oocytes. J. Biol. Chem. 263, 2009-2019.
- Citron M., Oltersdorf T., Haass C., McConlogue L., Hung A.Y., Seubert P.Vigo-Pelfrey C. Lieberburg I. & Selkoe D. (1992) Mutation of the ß-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases ß-protein production. Nature 360: 672-674.
- Cleveland D.W. Hwo S-Y. & Kirschner M.W. (1977a) Purification of Tau, a microtubule-associated protein that induce assembly of microtubules from purified tubulin. J. Mol. Biol. 116: 207-225
- Cleveland D.W., Hwo S-Y. & Kirschner M.W. (1977b) Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. J. Mol. Biol. 116: 227-247
- Cohen-Mansfield J. & Billig N. (1986) Agitated behaviors in elderly. II Preliminary results in cognitively deteriorated. J. Am. Geriat. Soc. 34: 732-737.

- Cohen P. (1989) The structure regulation of protein phosphatases Annu. Rev. Biochem. 58, 453-508.
- Cohen P., Holmes C.F.B. & Tsukitani Y. (1990) Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. Trends Biochem. Sci. 15: 98-102.
- Corder E.H., Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D.E., Gaskell P.C., Small G.W., Haines J.L. & Pericak-Vance M.A. (1993) Gene dose of Apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. Science 261: 921-923.
- Crawford & Lane (1977) An immune complexe assay for SV40 T antigen. Biochem. Biophys. Res. Commun. 74: 323-328.
- Davies L., Wolska B., Hilbich C., Multhaup G., Martins R., Simms G., Beyreuther K. & Masters C. (1988) A4 amyloid protein deposition and the diagnosis of Alzheimer's disease. Prevalence in aged brains determined by immunocytochemistry compared with conventional neuropathologic techniques. Neurology 38: 1688-1693.
- De Boni U. & Crapper McLachlan M.R. (1985) Controlled induction of paired helical filaments of the Alzheimer type in cultured human neurons by glutamate and aspartate. J. Neurol. Sci. 68: 105-118
- Delaère P., He Y., Fayet G., Duyckaerts C. & Hauw J.J. (1993) BA4 deposits are constant in the brain of the oldest old: an immunocytochemical study of 20 french centenariens. Neurobiol. Aging 14: 191-194.
- Delacourte A. & Défossez A. (1986) Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. J. Neurol. Sci. 76: 173-186.
- Delacourte A., Flament S., Défossez A., Buée L., Hémon B., Parent M., Furby A., Leys D., Goudemand M., Destée A. & Petit H. (1989a) 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 J.L., Christen Y., Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 39-55.
- Delacourte A., Flament S. & Défossez A. (1989b) An in vitro model for the study of the neurofibrillary degeneration of the Alzheimer type. J. Neural Transm. 1: 46-47.

- Delacourte A., Flament S., Dibe E.M., Hublau P., Sablonnière B., Hemon 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.
- Delacourte A. (1990) General and dramatic glial reaction in Alzheimer brains. Neurology 40: 33-37.
- Delacourte A. (1993) Les bases physiopathologiques de la maladie d'Alzheimer. Thérapie 48: 177-183.
- Delaère P., Duyckaerts C., He Y., Piette F. & Hauw J.J. (1991) Subtypes and differential laminar distributions of BA4 deposits in Alzheimer's disease: Relationship with the intellectual status of 26 cases. Acta Neuropathol. 81: 328-335.
- Del Cerro S., Larson J., Oliver M.W. & Lynch G. (1990) Development of hippocampal long-term potentiation is reduced by recently introduced calpain inhibitor. Brain Res. 530: 91-95.
- Derouesné C. (1991) Etude clinique. In: Signoret J.L., Hauw J.J. (eds) Maladie d'Alzheimer et autres démences. Flammarion Paris, pp. 93-115.
- De Sauvage F. & Octave J.N. (1989) A novel mRNA of the A4 amyloid precursor gene coding for a possibly secreted protein. Science 245: 651-653.
- Drewes G., Lichtenberg-Kraag B., Döring F., Mandelkow E.M., Biernat J., Goris J., Dorée M. & Mandelkow E.M. (1992) Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms Tau Protein into an Alzheimer-like state. EMBO J. 11: 2131-2138.
- Drubin D.G & Kirschner M.W (1986) Tau protein function in living cells. J. Cell. Biol. 103: 2739-2746.
- Dyrks T., Dyrks E., Hartmann T., Masters C. & Beyreuther K. (1992) Amyloidogenicity of BA4 and BA4-bearing amyloid protein precursor fragments by metal-catalyzed oxidation. J. Biol. Chem. 267: 18210-18217.
- Embi N., Rylatt D.B. & Cohen P. (1980) Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP dependent protein kinase and phosphorylase kinase. Eur. J. Biochem. 107, 519 527.

- Fiore R.S., Bayer V.E., Pelech S.L., Posada J., Cooper J.A.& Baraban J.M. (1993) p42 mitogen-activated protein kinase in brain: prominent localization in neuronal cell bodies and dendrites. Neuroscience 55: 463-472.
- Flament S., Delacourte A., Hémon B. & Défossez A. (1989a) Démonstration d'une phosphorylation anormale des protéines microtubulaires Tau au cours de la maladie d'Alzheimer. C.R. Acad. Sci. Paris 308: 77-82.
- Flament S., Delacourte A., Hemon B. & Defossez A. (1989b) Characterization of 2 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.
- Flament S., Delacourte A., Verny M., Hauw J.J. & Javoy-Agid F. (1991) Abnormal Tau proteins in Progressive Supranuclear Palsy. Similarities and differences with the neurofibrilary degeneration of the Alzheimer type. Acta. Neuropathol. 81: 591-596.
- Folstein M.F. (1989) Heterogeneity in Alzheimer 's disease. Neurobiol. Aging 10: 435-436.
- Frautschy S.A., Baird A. & Cole G.M. (1991) Effects of injected Alzheimer β-amyloid cores in rat brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8362-8366.
- Fukuchi K.I., Deeb S.S., Kamino K., Ogburn C.E., Snow A.D., Sekiguchi R.T., Wight T.N., Piussan H. & Martin G. (1992) Increased expression of β-amyloid protein precursor and microtubule-associated protein Tau during the differentiation of murine embryonal carcinoma cells. J. Neurochem. 58: 1863-1873.
- Furiya Y., Sahara N. & Mori H. (1993) Okadaic acid enhances abnormal phosphorylation on tau proteins. Neurosci. Lett. 156: 67-69.
- Gallyas F. (1971) Silver staining of Alzheimer's neurofibrillary changes by means of physical development. Acta Morph. Acad. Sci. Hung. 19: 1-8.
- Games D., Khan K.M., Soriano F.G., Keim P.S., Davis D.L., Bryant K. & Lieberburg I. (1992) Lack of Alzheimer pathologie after β-amyloid protein injections in rat brain. Neurobiol. Aging 13: 569-576.

- 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.
- Gibson G.E. & Peterson C. (1987) Calcium and the aging nervous system. Neurobiol. Aging 8: 329-343.
- Glenner G.G. & Wong C.W. (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 M.C., Mullan M., Brown J., Crawford F., Fidani L., Giuffra L., Haynes A., Irving N., James L., Mant R., Newton P., Rooke K., Roques P., Talbot C., Pericak-Vance M., Roses A., Williamson R., Rossor M., Owen M. & Hardy J. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. Nature 349: 704-706.
- Goedert M., Wischik C.M., Crowther R.A., Walker J.E. & Klug A. (1988) Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer's disease: identification as the microtubule-associated protein Tau. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4051-4055.
- Goedert M., Spillantini M.G., Jakes R., Rutherford D. & Crowther R.A. (1989a) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. Neuron 3: 519-526.
- Goedert M., Spillantini M.G., Potier M.C., Ulrich J. & Crowther R.A. (1989b) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein Tau containing 4 tandem repeats - Differential expression of Tau protein messenger RNAs in human brain. EMBO J. 8: 393-399.
- Goedert M. & Jakes R. (1990) Expression of separate isoforms of human Tau-protein -Correlation with the Tau-pattern in brain and effects on tubulin polymerization. EMBO J. 9: 4225-4230.
- Goedert M., Spillantini M.G. & Jakes R. (1991) Localization of the Alz-50 epitope in recombinant human microtubule-associated protein Tau. Neurosci. Lett. 126: 149-154.

- Goedert M., Crowther R.A. & Garner C.C. (1991) Molecular characterization of microtubule-associated proteins-Tau and MAP2. Trends in Neurosci. 14: 193-199.
- Goedert M., Spillantini M.G., Cairns N.J. & Crowther R.A. (1992) Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. Neuron 8: 159-168.
- Goedert M., Jakes R., Crowther R.A., Six J., Lübke U., Vandermeeren M., Cras P., Trojanowski J.Q. & Lee V.M.Y. (1993) The abnormal phosphorylation of tau protein at Ser-202 in Alzheimer disease recapitulates phosphorylation during development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5066-5070.
- Gong C.X., Singh T.J., Grundke-Iqbal I. & Iqbal K. (1993) Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. J. Neurochem. 61: 921-927.
- Goto S., Yamamoto H., Fukunaga K., Iwasa T., Matsukado Y. & Miyamoto E. (1985) Dephosphorylation of microtubule - associated protein 2, tau factor, and tubulin by calcineurine. J. Neurochem. 45, 276-283.
- Gould J., Reeve H.L., Vaughan P.F.T. & Peers C. (1992) Nicotinic acethylcholine receptors in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells. Neurosci. Lett. 145: 201-204.
- Green J., Morris J.C., Sandson J., McKeel D.W. Jr. & Miller J.W. (1990) Progressive aphasia: a precursor of global dementia ? Neurology 40: 423-429.
- Greenamyre J.T. & Young A.B. (1989) Excitatory amino acids and Alzheimer's disease. Neurobiol. Aging 10: 593-602.
- Greenberg S.G. & Davies P. (1990) A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct Tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5827-5831.
- Greenberg S.G., (1993) Filament-associated Tau proteins in neurodégénérative diseases. Soc. Neurosci. Abstr. 82.7.
- Grunke-Iqbal I., Iqbal K., Quinlin M., Tung Y.C., Zaidi M.S. & Wisniewski H.M. (1986a) Microtubule-associated protein tau, a component of Alzheimer paired helical filaments. J. Biol. Chem. 261: 6084.

- Grunke-Iqbal I., Iqbal K., Tung Y.C., Quinlin M., Wisniewski H.M. & Binder L.I. (1986b) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein Tau in Alzheimer's cytosketal pathology. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4913-4917.
- Grunke-Iqbal I., Vorbrodt A.W., Iqbal K., Tung Y.C., Wang G.P. & Wisniewski H.M. (1988) Microtubule associated polypeptides Tau are altered in Alzheimer's paired helical filaments. Mol. Brain Res. 4: 43-52.
- Gustke N., Steiner B., Mandelkow E.M., Biernat J., Meyer H.E. & Goedert M. (1992) The Alzheimer-like phosphorylation of Tau-protein reduces microtubule binding and involves Ser-Pro and Thr-Pro motifs. FEBS Lett. 307: 199-205.
- Hall F.L., Braun R.K., Mihara K., Fung Y.K.T., Berndt N, Carbonaro-Hall D.A. & Vulliet P.R. (1991) Characterization of the cytoplasmic proline-directed protein kinase in proliferative cells and tissues as a heterodimer comprised of p34 cdc2 and p58 cyclin A. J. Biol. Chem. 266: 17430-17440.
- Hanger D.P., Hughes K., Woodgett J.R., Brion J.P., Anderton B.H. (1992) Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. Neurosci. Lett. 147: 58-62.
- Hardy J. & Allsop D. (1991) Amyloid deposition as the central event in the etiology of Alzheimer's disease. Trends Pharmacol. Sci. 12: 383-388.
- Harris K.A., Oyler G.A., Doolittle G.M., Vincent I., Lehman R.A.W., Kincaid R.L. & Billingsley M.L. (1993) Okadaic acid induces hyperphosphorylated forms of Tau protein in human brain slices. Ann. Neurol. 33: 77-87.
- Hasegawa M., Morishima-Kawashima M., Takio K., Suzuki M., Titani K. & Ihara Y. (1992) Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in the Alzheimer's disease brain. J. Biol. Chem. 267: 17047-17054.
- Hasegawa M., Watanabe A., Takio K., Suzuki M., Arai T., Titani K. & Ihara Y. (1993) Characterization of two distinct monoclonal antibodies to paired helical filaments: Further evidence for fetal-type phosphorylation of the Tau in paired helical filaments. J. Neurochem 60: 2068-2077.
- Hendriks L., Vanduijn C.M., Cras P., Cruts M., Vanhul W., Vanharskamp F., Martin J.J., Hoffman A. & Van Broeckhoven C. (1992) Presentile dementia and cerebral

haemorrhage linked to a mutation at codon-692 of the ß-amyloid precursor protein gene. Nature Genetics 1: 218-221.

- Hershko A. & Ciechanover A. (1982) Mechanisms of intracellular breakdown. Ann. Rev. Biochem. 51: 335-364.
- Heston L.L., Mastri A.R., Anderson E. & White J. (1981) Dementia of the Alzheimer type: clinical genetics, natural history, and associated conditions. Arch. Gen. Psychiatry 38: 1085-1090.
- Hilbich C., Kisters-Woike B., Reed J., Masters C.L. & Beyreuther K. (1991) Aggregation and secondary structure of synthetic amyloid $\beta A4$ peptides of Alzheimer's disease. J. Mol. Biol. 218: 149-163.
- Himmler A., Drechsel D., Kirschner M.W. & Martin D.W. (1989) Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable Nterminal domains. Mol. Cell. Biol. 9: 1381-1388.
- Hoshi M., Nishida E., Miyata Y., Sakai H., Miyoshi T., Ogawara H. & Akiyama T. (1987) Protein kinase C phosphorylates tau and induces its functinal alterations. FEBS Lett. 217: 237-241.
- Hughes K., Nikolakaki E., Plyte S.E., Totty N.F. & Woodgett J.R. (1993) Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. EMBO J. 12: 803-808.
- Hugon J., Sindou P. Couratier P., Yardin C. & Lesort M. (1993) Glutamate induces an increased phosphorylated Tau protein immunoreactivity in neuronal cuture. Soc. Neurosci. Abstr. 163.9.
- Ihara Y., Nukina N., Miura R. & Ogawara M. (1986) Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. J. Biochem. (Tokyo) 99: 1807-1810.
- Ingebristen T.S. & Cohen P. (1983) Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. Science 221: 331 338.
- Iqbal K., Grundke-Iqbal I., Zaidi T., Merz P.A., Wen G.Y., Shaikh S.S., Wisniewski H.M., Alafuzoff I. & Winblad B. (1986) Defective brain microtubule assembly in Alzheimer's disease. Lancet 2: 421-426.

- Iqbal K. & Grundke-Iqbal I. (1991) Ubiquitination and abnormal phosphorylation of paired helical filaments in Alzheimer's disease. Molecular Neurobiology 5: 399-410.
- Ishiguro K., Omori A., Takamatsu M., Sato K., Arioka M., Uchida T. & Imahori K. (1992a) Phosphorylation sites on Tau by Tau protein kinase-I, a bovine derived kinase generating an epitope of paired helical filaments. Neurosci. Lett. 148: 202-206.
- Ishiguro K., Takamatsu M., Tomizawa K., Omori A., Takahashi M., Arioka M., Uchida T. & Imahori K. (1992b) Tau protein Kinase I converts normal Tau protein into A68-like component of paired helical filaments. J. Biol. Chem. 267: 10897-10901.
- Ishiguro K., Shiratsuchi A., Sato S., Omori A., Arioka M. & Kobayashi, S. U. (1993) Glycogen synthase kinase 3ß is identical to tau protein kinase-I generating several epitopes of paired helical filaments. FEBS Lett. 325: 167-172.
- Itagaki S., Mcgeer P.L., Akiyama H., Zhu S. & Selkoe D. (1989) Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer's disease. J. Neuroimmunol. 24: 173-182.
- Jacobsen J.S., Muenkel H.A., Blume A.J. & Vitek M.P. (1991) A novel species-specific RNA related to alternatively spliced amyloid precursor protein mRNAs. Neurobiol. Aging 12: 575-583.
- Jagust W.J., Budinger T.F. & Reed B.R. (1987) The diagnosis of dementia with single photon emission tomography. Arch. Neurol. 44: 258-262.
- Jakes R., Novak M., Davison M. & Wischik C.M. (1991) Identification of 3-repeat and 4-repeat Tau-isoforms within the PHF in Alzheimer's disease. EMBO J. 10: 2725-2729.
- Joachim C.L., Morris J.H. & Selkoe D.J. (1989) Diffuse senile plaques occur commonly in the cerebellum in Alzheimer's disease. Am. J. Pathol. 135: 309-319.
- Joseph R. & Han E. (1992) Amyloid beta-Protein Fragment 25-35 Causes Activation of Cytoplasmic Calcium in Neurons. Biochem. Biophys. Res. Commun. 184: 1441-1447.

- Kanemaru K., Takio K., Miura R., Titani K. & Ihara Y. (1992) Fetal-type phosphorylation of the Tau in paired helical filaments. J. Neurochem. 58: 1667-1675.
- Kang J., Lemaire H.G., Unterbeck A., Salbaum J.M., Masters C.L., Grzeschik K.H., Multhaup G., Beyreuther K. & Müller-Hill B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. Nature 325: 733-736.
- Kidd M. (1963) Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. Nature 197: 192-193.
- Kirschner D.A., Inouye H., Duffy L.K., Sinclair A., Lind M. & Selkoe D. (1987) Synthetic peptide homologous to beta protein from Alzheimer's disease forms amyloid-like fibrils in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 6953-6957.
- Kitaguchi N., Takahashi Y., Tokushima Y., Shiojiri S. & Ito H. (1988) Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. Nature 331: 530-532.
- Ko L.W., Sheu K.F.R., Young O., Thaler H. & Blass J.P. (1990) Expression in cultured human neuroblastoma cells of epitopes associated with affected neurons in Alzheimer's disease. Am. J. Pathol. 136: 867-879.
- Koh J.Y., Yang L. & Cotman C.W. (1990) β-amyloid protein increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage. Brain Res. 533: 315-320.
- Kondo J., Honda T., Mori H., Hamada Y., Miura R., Ogawara M. & Ihara Y. (1988) The carboxyl third of Tau is tighly bound to paired helical filaments. Neuron 1: 827-834.
- Kosik K.S., Joachim C.L. & Selkoe D.J. (1986) Microtubule-associated protein tau is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4044-4048.
- Kosik K.S., Orecchio L.D., Binder L., Trojanowski J.Q., Lee V.M.Y. & Lee G (1988) Epitopes that span the tau molecule are shared with paired helical filaments. Neuron 1: 817-825.
- Kosik K.S., Orecchio L.D., Bakalis S. & Neve R.L. (1989) Developmentally regulated expression of specific Tau sequences. Neuron 2: 1389-1397.

- Kosik K.S. (1993) Dystrophics neurites and a novel role for Tau in delimitting sites of process emergence. Society for Neuroscience, november 7-12: 89.2.
- Kowall N.W., Beal M.F., Busciglio J., Duffy L.K. & Yankner B.A. (1991) An in vivo model for the neurodegenerative effects of β amyloid and protection by substance P. Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 7247-7251.
- Kowall N.W., McKee A.C., Yankner B.A. & Beal M.F. (1992) In vivo neurotoxicity of β-amyloid [β(1-40)] and the β(25-35) fragment. Neurobiol. Aging 13: 537-542.
- Ksiezak-Reding H., Binder L.I. & Hen S.H. (1990) Alzheimer disease proteins (A68) share epitopes with Tau but show distinct biochemical properties. J. Neurosci. Res. 25: 420-430.
- Ksiezak-Reding H., Liu W.K. & Yen S.H. (1992) Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. Brain Res. 597: 209-219.
- Kuljis R.O., Beech R.D., Ross S.R. & Yeung C.Y. (1993) Alzheimer like diffuse amyloid plaques can be induced in transgenic mice expressing human alpha 1 antichymotrypsin. Soc. Neurosci. Abstr. 421.11.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- Lambert D.G. & Nahorski S.R. (1992) Carbachol-Stimulated calcium entry in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. Journal of Physiology - Paris 86:77-82.
- Lang E., Szendrei G.I., Elekes I., Lee V.M.Y. & Otvos L.Jr. (1992a) Reversible ßpleated sheet formation of a phosphorylated synthetic Tau peptide. Biochem. Biophys. Res. Commun. 182: 63-69.
- Lang E., Szendrei G.I., Lee V.M.Y. & Otvos L.Jr. (1992b) Immunological and conformational characterization of a phosphorylated immunodominant epitope on the paired helical filaments found in Aalzheimer's disease. Biochem. Biophys. Res. Commun. 187: 783-790.
- Ledesma M.D., Correas I., Avila J. & Diaznido J. (1992) Implication of brain cdc 2 and MAP2 kinases in the phosphorylation of tau protein in Alzheimer's disease. FEBS Lett. 308: 218-224.

- Lee G., Cowan N., & Kirschner M. (1988) The primary structure and heterogeneity of Tau protein from mouse brain. Science 239: 285-288.
- Lee V.M.Y., Balin B.J., Otvos L.Jr. & Trojanowski J.Q. (1991) A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau. Science 251: 675-678.
- Leli U., Cataldo A., Shea T.B., Nixon R.A. & Hauser G (1992) Distinct mechanisms of differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells by protein kinase C activators and inhibitors. J. Neurochem. 58: 1191-1198.
- Leli U., Shea T.B., Cataldo A., Hauser G, Grynspan F., Beermann M.L. & Liepkains V.A. (1993) Differential expression and subcellular localization of protein Kinase-C alpha-Isoform, beta-Isoform, gamma-Isoform, delta-Isoform and epsilon-Isoform in SH-SY5Y neuroblastoma cells - modifications during differentiation. J. Neurochem. 60: 289-298.
- Leys D., Pruvo J.P., Petit H., Gaudet Y. & Clarisse J. (1989a) Maladie d'Alzheimer: analyse statistique des résultats du scanner X. Rev. Neurol. (Paris) 145: 134-139.
- Lichtenberg-Kraag B., Mandelkow E.M., Biernat J., Steiner B., Schröter C., Gustke N., Meyer H.E. & Mandelkow E. (1992) Phosphorylation-dependent epitopes of neurofilament antibodies on tau protein and relationship with Alzheimer tau. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5384-5388.
- Lindwall G. & Cole R.D. (1984) Phosphorylation affects the ability of Tau protein to promote microtubule assembly. J. Biol. Chem. 259: 5301-5305.
- Litersky J.M. & Johnson G.V.W. (1992) Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase inhibits the degradation of Tau by calpain. J. Biol. Chem. 267: 1563-1568.
- Liu W.K., Moore W.T., Williams R.T., Hall F.L. & Yen S.H. (1993) Application of synthetic phospho- and unphospho-peptides to identify phosphorylation sites in a subregion of the tau molecule, which is modified in Alzheimer's disease. J. Neurosci. Res. 34: 371-376.
- Lu Q., Soria J.P. & Wood J.G. (1993) p44mpk MAP kinase induces Alzheimer type alterations in Tau fonction and in primary hippocampal neurons. J. Neurosci. Res. 35: 439-444.

- Mandelkow E.M., Drewes G., Biernat J., Gutske N., Van Lint J., Vandenheede J.R. & Mandelkow E. (1992) Glycogen Synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. FEBS Lett. 314: 315-321.
- Mandelkow E.M. (1993) The Alzheimer like state of Tau protein: isoforms, epitopes phosphorylation and kinases. Society for Neuroscience, november 7-12: 89.3.
- Mandybur T.I. & Chuirazzi C.C. (1990) Astrocytes and the plaques of Alzheimer's disease. Neurology 40: 635-639.
- Mann D.M.A. & Esiri M.M. (1989) The pattern of acquisition of plaques and tangles in the brains of patients under 50 years of age with Down's syndrome. J. Neurol. Sci. 89: 169-179.
- Mann D.M.A., Jones D., Prinja D. & Purkiss M.S. (1990) The prevalence of amyloid (A4) protein deposits within the cerebral and cerebellar cortex in Down's syndrome and Alzheimer's disease. Acta Neuropathol. 80: 318-327.
- Maruyama K., Terakado K., Usami M. & Yoshikawa K. (1990) Formation of amyloidlike fibrils in COS cells overexpressing part of the Alzheimer amyloid protein precursor. Nature 347: 566-569.
- Masters C.L., Multhaup G., Simms G., Pottigiesser J., Martins R.N. & Beyreuther K. (1985) Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. EMBO J. 4: 2757-2763.
- Mattson M.P. (1990) Antigenic changes similar to those seen in neurofibrillary tangles are elicited by glutamate and Ca2+ influx in cultured hippocampal neurons. Neuron 4: 105-117.
- Mattson M.P., Engle M.G. & Rychlik B. (1991) Effects of elevated intracellular calcium levels on the cytoskeleton and Tau in cultured human cortical neurons. Mol. Chem. Neuropathol. 15: 117-142.
- Mattson M.P., Cheng B., Davis D., Bryant K., Lieberburg I. & Rydel, R.E. (1992) ßamyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. J. Neurosci. 12: 376-389.

- Mattson M.P., Barger S.W., Cheng B.,Lieberburg I., Smith-Swintosky V.L. & Rydel R.E. (1993) β-amyloid precursor protein metabolites and loss of neuronal Ca+ homeostasis in Alzheimer's disease. T.I.N.S. 16: 409-414.
- Mercken M., Vandermeeren M., Lübke U., Six J., Boons J., Van de Woorde A., Martin J.J. & Gheuens J. (1992) Monoclonal antibodies with selective specificity for Alzheimer Tau are directed against phosphatase-sensitive epitopes. Acta Neuropathol. 84: 265-272.
- Merz P.A., Wisniewski H.M., Somerville R.A., Bobin S.A., Masters C.L. & Iqbal K. (1983) Ultrastructural morphology of amyloid fibrils from neuritic and Acta. Neuropathol. 60: 113-124.
- Miller C.C.J., Brion J.P., Calvert R., Chin T.K., Eagles P.A.M., Downes M.J., Flament-Durand J., Haugh M., Kahn J., Probst A., Ulrich J. & Anderton B.H. (1986) Alzheimer's paired helical filaments share epitopes with neurofilament side arms. EMBO J. 5: 269-276.
- Montejo De Garcini E., Serrano L. & Avila J. (1986) Self assembly of microtubule associated protein Tau into filaments resembling those found in Alzheimer's disease. Biochem. Biophys. Res. Commun. 141: 790-796.
- Mori H., Kondo J. & Ihara Y. (1987) Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. Science 235: 1641-1644.
- Mori H., Hamada Y., Kawaguchi M., Honda T., Kondo J. & Ihara Y. (1989) A Distinct form of Tau is selectively incorporated into Alzheimer's paired helical filaments. Biochem. Biophys. Res. Commun. 159: 1221-1226.
- Mori H., Takio K., Ogawara M. & Selkoe D.J. (1992) Mass spectrometry of purified amyloid-beta protein in Alzheimer's disease. J. Biol. Chem. 267: 17082-17086.
- Mountjoy C.Q., Roth M., Evans N.J.R. & Evans H.M. (1983) Cortical neuronal counts in normal elderly controls and demented patients. Neurobiol. Aging 4: 1-11.
- Mullan M., Crawford F., Axelman K., Houlden H., Lilius L., Winblad B. & Lannfelt L. (1992a) A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of β-amyloid. Nature Genetics 1: 345-347.
- Mullan M., Houlden H., Windelspecht M., Fidani L., Lombardi C., Diaz P., Rosor M., Crook R., Hardy J., Duff K. & Crawford F. (1992b) A locus for familial early-onset

Alzheimer's disease on the long arm of chromosome 14, proximal to the alpha-1-Antichymotrypsin gene. Nature Genetics 2: 340-342.

- 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.
- Naarala J., Nykvist P., Tuomala M. & Savolainen K. (1993) Excitatory amino acidinduced slow biphasic responses of free intracellular calcium in human neuroblastoma cells. FEBS Lett. 330: 222-226.
- Naruse S., Igarashi S., Aoki K., Kaneko K., Iihara K., Miyatake T., Kobayashi H., Inuzuka T., Shimizu T., Kojima T. & Tsuji S. (1991) Mis-sense mutation Val->Ile in exon-17 of amyloid precursor protein gene in Japanese familial Alzheimer's disease. Lancet 337: 978-979.
- Nee L.E., Eldridge R., Sunderland T., Thomas C.B., Katz D., Thompson K.E., Weingartner H., Weiss H., Julian C. & Cohen R. (1987) Dementia of the Alzheimer type: clinical and family study of 22 twin pairs. Neurology 37: 359-363.
- Nelson P.T. & Saper C.B. (1993) Neurofibrillary tangles in the cerebral cortex of sheep. Soc. Neurosci. Abst. S81.9
- Neve R.L, Harris P., Kosik K.S., Kurnit D.M. & Donlon T.A. (1986) Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal location of genes for tau and microtubule-associated protein 2. Mol. Brain. Res. 1: 271-280.
- Nordberg A. (1992) Biological markers and the cholinergic hypothesis in Alzheimer's disease. Acta Neurol. Scand. 85: 54-58.
- Nukina N. & Ihara Y. (1986) One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein. J. Biochem. 99: 1541-1544.
- O'Farell P.H. (1975) High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250: 240-246.
- Ogane N., Giacobini E. & Struble R. (1992) Differential inhibition of acetylcholinesterase molecular forms in normal and Alzheimer disease brain. Brain Res. 589: 307-312.

- Pahlman S., Johansson I., Westermark B. & Nister M. (1992) Platelet-derived growth factor potentiates phorbol ester-induced neuronal differentiation of human neuroblastoma cells. Cell Growth and Differentiation 3: 783-790.
- Papasozomenos S.C. & Binder L.I. (1987) Phosphorylation determines two distinct species of Tau in the central nervous system. Cell Motil. Cytoskeleton 8: 210-226.
- Parent M., Delacourte A., Défossez A., Hemon B., Han K.K. & Petit H. (1988) Alzheimer's disease: study of the distribution of paired helical filaments Tau proteins in the human central nervous system. C. R. Acad. Sci 306: 391-397.
- Pelech S.L., Olwin B.B. & Krebs E.G. (1986) Fibroblast growth factor treatment of Swiss 3T3 cells activates a subunit S6 kinase that phosphorylates a synthetic peptide substrate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 5968-5972.
- Perlmutter L., Barrón E. & Chui H.C. (1990) Morphologic association between microglia and senile plaque amyloid in Alzheimer's disease. Neurosci. Lett. 119: 32-36.
- Perry G., Friedman R., Shaw G. & Chau V. (1987) Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer's disease brains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3033-3036.
- Perry G., Cras P., Siedlak S.L., Tabaton M. & Kawai M. (1992) Beta-protein immunoreactivity is found in the majority of neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. Am. J. Pathol., 140: 283-290.
- Persuy P., Défossez A., Delacourte A., Tramu G., Bouchez B. & Arnott G. (1985) Anti-PHF antibodies: an himmunohistochemical marquer of the lesion of the Alzheimer's disease. Vichows Arch. 407: 13-23.
- Pierre M. & Nunez J. (1983) Multisite phosphorylation of Tau proteins from rat brain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 301: 212-219.
- 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., Wallace W., Lieberburg I., Fuller F. & Cordell B. (1988) A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors. Nature, 331: 525-527.

- Pope W., Enam S.A., Bawa N., Miller B.E., Ghanbari H.A. & Klein W.L. (1993) Phosphorylated Tau epitope of Alzheimer's disease is coupled to axon development in the avian central nervous system. Exp. Neurol. 120: 106-113.
- Price D.L., Whitehouse P.J. & Struble R.G. (1986) Alzheimer's disease. Ann. Rev. Med. 36: 349-356.
- Price J.L., Davis P.B., Morris J.C. & White D.L. (1991) The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease. Neurobiol. Aging 12: 295-312.
- Quon D., Wang Y., Catalano R., Scardina J.M., Murakami K. & Cordell B. (1991) Formation of β-amyloid protein deposits in brains of transgenic mice. Nature 352: 239-241.
- Recio-Pinto E. & Ishii D. (1984) Effects of insulin, insulin-like growth factor-II and nerve growth factor on neurite out growth in cultured human neuroblastoma cells. Brain Res. 302: 323-334.
- Reuveny E. & Narahashi T. (1993) Two types of high voltage-activated calcium channels in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. Brain Res. 603: 64-73.
- Richard S.J., Waters J.J., Beyreuther K., Masters C.L., Wischik C.M., Sparkman D.R., White C.H., Abraham C.R. & Dunnett S.B. (1991) Transplants of mouse trisomy 16 hippocampus provide a model of Alzheimer's disease neuropathologie.
- Roder H.M., Eden P.A. & Ingram V.M. (1993) Brain protein kinase PK40erk converts TAU into a PHF-like form as found in Alzheimer's disease. Biochem. Biophys. Res. Commun. 193: 639-647.
- Rumble B.R., Retallack C., Hilbich G., Simms G., Multhaup R., Martins A. & HockeyP. M. (1989) Amyloid A4 protein and its precursor in Downs syndrome andAlzheimers disease. N. Engl. J. Med. 320: 1446-1452.
- Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D., St George-Hyslop P.H., Pericak-Vance M.A., Joo S.H., Rosi B.L., Gusella J.F., Crapper-McLachlan D.R., Alberts M.J., Hulette C., Crain B., Goldgaber D. & Roses A.D. (1993) Association of apolipoprotein E allele e4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. Neurology 43: 1467-1472.

Bibliographie

- Sautière P.E., Caillet-Boudin M.L., Wattez A., Buée-Scherrer V. & Delacourte A. (1993) Alzheimer-type Tau epitopes detection after okadaic acid treatment of neuroblastoma cells. C. R. Acad. Sci. Paris 316: 533-535.
- Sautière P.E., Sindou P., Couratier P., Hugon J., Wattez A. & Delacourte A. (1992) Tau-antigenic changes induced by glutamate in rat primary culture model - A biochemical approach. Neurosci. Lett. 140: 206-210.
- Schellenberg G.D., Bird T.D., Wijsman E.M., Orr H.T., Anderson L., Nemens E., White J.A., Bonnycastle L., Weber J.L., Alonso M.E., Potter H., Heston L.L. & Martin G.M. (1992) Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome-14. Science 258: 668-671.
- Scheltens P., Leys D., Barkhof F., Huglo D., Weinstein H., Vermersch P., Kuiper M., Steinling M.L., Wolters E.C. & 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 55: 967-972.
- Schmechel D.E., Saunders A.M., Strittmatter W.J., Crain B.J., Hulette C.M., Joo S.H., Pericak-Vance M.A., Goldgaber D. & Roses A.D. (1993) Increased amyloid βpeptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer's disease. Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 9649-9653.
- Scott C.W., Spreen R.C., Herman J.L., Chow F.P., Davison M.D. & Young J.C. (1993a) Phosphorylation of recombinant Tau by cAMP-Dependent protein kinase identification of phosphorylation sites and effect on microtubule assembly. J. Biol. Chem. 268: 1166-1173.
- Scott C.W., Vulliet P.R. & Caputo C.B. (1993b) Phosphorylation of Tau by prolinedirected protein kinase (p34(cdc2)/p58(cyclin-A)) decreases Tau-induced microtubule assembly and antibody SMI33 reactivity. Brain Res 611: 237-242.
- Selkoe D.J., Bell D.S., Podlisny M.B., Price D.L. & Cork L.C. (1987) Conservation of brain amyloid proteins in aged mammals and humans with Alzheimer's disease. Science 235: 873-877.
- Selkoe D.J. (1990) The molecular pathology of Alzheimer's disease. Neuron 6: 487-498.

- Selnes O.A., Carson K., Rovner B. & Gordon B. (1988) Language dysfunction in earlyand late-onset possible Alzheimer's disease. Neurology 38: 1053-1056.
- Sindou P., Couratier P., Barthe D. & Hugon J. (1992) A dose dependant increase of Tau immunostaining is pruduced by glutamate toxicity in primary neuronal culture. Brain Res. 572: 242-246.
- Siman R. & Noszek J.C. (1988) Excitatory aminoacids activate calpain I and induce structural protein breakdown in vivo. Neuron 1: 279-287.
- Steel M.C. & Buckley N.J. (1993) Differential regulation of muscarinic receptor messenger RNA levels in neuroblastoma cells by chronic agonist exposure - A comparative polymerase chain reaction study. Molecular Pharmacology 43: 694-701.
- Steiner B., Mandelkow E.M., Biernat J., Gustke N., Meyer H.E., Schmidt B., Mieskes G. & Soling H.D. (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.
- Sternberger L.A. & Sternberger N.H. (1983) Monoclonal antibodies distinguish phosphorylated and nonphosphorylated forms of neurofilaments in situ. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 6126-6130.
- Sternberger L.A., Sternberger N.H. & Ulrich J. (1985) Aberrant neurofilament phosphorylation in Alzheimer disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4774-4776.
- St Georges Hyslop P., Haines J., Rogaev E., Mortilla M., Vaula G., Pericak-Vance M. (1992) Genetic evidence for a novel familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. Nature Genetics 2: 330-334.
- Strittmatter W.J., Saunders A.M., Schmechel D., Pericak-Vance M., Enghild J., Salvesen G.S. & Roses A. (1993a) Apolipoprotein E: high-avidity binding to ßamyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1977-1981.
- Strittmatter W.J., Weisgraber K.H., Huang D.Y., Dong L.M., Salvesen G.S., Pericak-Vance M., Schmechel D., Saunders A.M., Goldgaber D. & Roses A.D. (1993b)
 Binding of human Apolipoprotein-E to synthetic amyloid β-peptide: isoform-

specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 8098-8102.

- Sumantran V.N. & Feldman E.L. (1993) Insulin-Like growth Factor-I regulates c-myc and GAP-43 messenger ribonucleic acid expression in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. Endocrinology 132: 2017-2023.
- Szendrei G.I., Lee V.M.Y. & Otvos L. Jr. (1993) Recognition of the minimal epitope of monoclonal antibody Tau-1 depends upon the presence of a phosphate group but not its location. J. Neurosci. Res. 34: 243-249.
- Tachibana K., Scheuer P.J., Tsukitani Y., Kikuchi H., Van Engen D., Clardy J., Gopichand Y. & Schmitz F.J. (1981) Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus Halichondria. J. Am. Chem. Soc. 103: 2469-2471.
- Tagliavini F., Giaccone G., Frangione B. & Bugiani O. (1988) Preamyloid deposits in the cerebral cortex of patients with AD and non demented individuals. Neurosci. Lett. 93: 191-196.
- Takashima A., Noguchi K., Sato K., Hoshino T. & Imahori K. (1993) Tau protein kinase-I is essential for amyloid β-protein-induced neurotoxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 7789-7793.
- Tanzi R.E., Gusella J.F., Watkins P.C., Bruns G.A.P., St Georges-Hyslop P., Van Keuren M.L., Patterson D., Pagan S., Kurnit D.M. & Neve R.L. (1987) Amyloid ß protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. Science 235: 880-884.
- Tanzy R.E., McClatchey A., Lamperti E.D., Villa-Komaroff L., Gusella J.F & Neve R.L. (1988) Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. Nature 331: 528-530.
- Tanzi R.E., Vaula G., Romano D.M., Mortilla M., Huang T.L., Tupler R.G. (1992) Assessment of amyloid β-protein precursor gene mutations in a large set of familial and sporadic Alzheimer disease cases. Am. J. Hum. Genet. 51: 273-282.
- Terry R.D., Peck A., DeTeresa R., Schechter R. & Horoupian D.S. (1981) Some morphometric aspects of the brain in senile dementia of the Alzheimer type. Ann.Neurol. 10: 184-192.

- Trojanowski J.Q., Mawal-Dewan M., Schmidt M.L., Martin J. & Lee V.M.Y. (1993) Localization of the mitogen activated protein kinase ERK2 in Alzheimer's disease neurofibrillary tangles and senile plaque neurites. Brain Res. 618: 333-337.
- 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. USA 76: 4350-4354.
- Vaitukaitis J., Robbins J.B., Nieschlag V. & Ross G.T. (1971) A method for producing antisera with small doses of immunogen. J. Clin. Endocrinol. Metab. 33: 988-991.
- Van Broeckhoven C., Backhovens H., Cruts M., De Winter G., Bruyland M., Cras P. & Martin J.J. (1992) Mapping of a gene predisposing to early-onset Alzheimer's disease to chromosome 14q24.3. Nature Genetics 2: 335-339.
- Vandenheede J.R., Yang S.-D., Goris J. & Merlevede W. (1980) ATP.Mg-dependent protein phosphatase from rabbit skeletal muscle. II purification of the activating factor and its characteriza J. Biol. Chem., 255, 11768 11774.
- Vandermeeren M., Lübke U., Six J. & Cras P. (1993) The phosphate inhibitor okadaic acid induces a phosphorylated paired helical filament tau epitope in human LA-N-5 neuroblastoma cells. Neurosci. Lett. 153: 57-60.
- Vanduijn C.M., Hendriks L., Cruts M., Hardy J.A., Hofman A. & Van Broeckhoven C. (1991) Amyloid precursor protein gene mutation in early-onset Alzheimer's disease. Lancet 337: 978.
- Vaughan P.F.T., Murphy M.G. & Ball S.G. (1993) Effect of inhibitors of eicosanoid metabolism on release of [H-3]noradrenaline from the human neuroblastoma, SH-SY5Y. J. Neurochem. 60: 1365-1371.
- Vermersch P., Frigard B. & Delacourte A. (1992a) Mapping of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease: evaluation of heterogeneity using the quantification of abnormal Tau proteins. Acta Neuropathol. 85: 48-54.
- Vermersch P., Frigard B., David J.P., Fallet-Bianco C. & Delacourte A. (1992b) Presence of abnormally phosphorylated Tau proteins in the entorhinal cortex of aged Non-Demented subjects. Neurosci. Lett. 144: 143-146.

- Vermersch P., Delacourte A., Javoy-Agid F., Hauw J.J. & Agid Y. (1993) Dementia in Parkinson's disease: biochemical evidence for cortical involvement using the immunodetection of abnormal Tau-proteins. Ann. Neurol. 33: 445-450.
- Vulliet R, Halloran S.M., Braun R.K., Smith A.J., Lee G. (1992) Proline-directed phosphorylation of human tau protein. J. Biol. Chem. 267: 22570-22574.
- Wang C., Li Y., Wible B., Angelides K.J. & Ishii D.N. (1992) Effects of insulin and insulin-like growth factor-II on neurofilament mRNA and tubulin mRNA content in human neuroblastoma cells. Mol. Brain Res. 13: 289-300.
- Wang S., Lees G.J., Rosegren L.E., Karlsson J.E., Stigbrand T., Hamberger A. & Haglid K.G. (1991) The effect of an N-methyl-D-aspartate lesion in the hippocampus on glial and neuronal marker proteins. Brain Res. 541: 334-341.
- Watanabe N., Takio K., Hasegawa M., Arai T., Titani K. & Ihara Y. (1992) Tau 2: a probe for Ser conformation in the amino terminus of Tau. J. Neurochem. 58: 960-966.
- Wischik C.M., Novak H.C., Thogersen H.C., Edwards P.C., Runswick M.J., Jakes R. & Walker J.E. (1988a) Isolation of a fragment of Tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4506-4510.
- Wischik C.M., Novak H.C., Edward P.C., Klug A., Tichelaar W. & Crowther R.A (1988b) Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4884-4888.
- Wisniewski K., Jervis G.A., Moretz R.C. & Wisniewski H.M. (1979) Alzheimer neurofibrillary tangles in diseases other than senile and presenile dementia. Ann. Neurol. 5: 288-294.
- Wisniewski H.M., Bancher C., Barcikowska M., Wen G.Y. & Currie J. (1989a) Spectrum of morphological appearance of amyloid deposits in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol. 78: 337-347.
- Wisniewski H.M., Wegiel J., Wang K.C., Kujawa M. & Lach B. (1989b) Ultrastructural studies of the cells forming amyloid fibers in classical plaques. Can. J. Neurol. Sci. 16: 535-542.

- Wisniewski H.M., Barcikowska M. & Kida E. (1991) Phagocytosis of $\beta/A4$ amyloid fibrils of the neuritic neocortical plaques. Acta Neuropathol. 81: 588-590.
- Wood J.G., Mirra S.S., Pollock N.J. & Binder L.I. (1986) Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubuleassociated protein tau. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4040-4043.
- Wood J.G., Lu Q., Reich C. & Zinsmeister P. (1993) Proline-directed kinase systems in Alzheimer's disease pathology. Neurosci. Lett. 156: 83-86.
- Yamaguchi H., Hirai S., Morimatsu M., Shoji M., Ihara Y. (1988) A variety of cerebral amyloid deposits in the brains of Alzheimer-type dementia demonstrated by ß protein immunostaining. Acta. Neuropathol. 76: 541-549.
- Yamamoto H., Fukunaga K., Tanaka E. & Miyamoto E.(1983) Ca++ and calmodulindependant phosphorylation of microtubule-associated protein 2 and Tau factor, and inhibition of microtubule assembly. J. Neurochem. 41: 1119-1125.
- Yamamoto H., Fukunaga K., Goto S., Tanaka E. & Miyamoto E. (1985) Ca2+, calmodulin-dependent regulation of microtubule formation via phosphorylation of microtubule-associated protein 2, tau factor, and tubulin, and comparison with the cyclic AMP-dependent phosphorylation. J. Neurochem. 44: 759-768.
- Yamamoto H., Saitoh Y., Fukunaga K., Nishimura H. & Miamoto E. (1988)
 Dephosphorylation of microtubule proteins by brain protein phosphatases 1 and 2A, and its effect on microtubule assembly. J. Neurochem. 50 : 1614-1623.
- Yang S.D., Song J.S., Yu J.S. & Shiah S.G. (1993) Protein kinase FA/GSK3 phosphorylate Tau on Ser235-Pro and Ser404-Pro that are abnormally phosphorylated in Alzheimer's disease brain. J. Neurochem. 61: 1742-1747.
- Yankner B.A., Dawes L.R., Fisher S., Villa-Komaroff L., Oster-Granite M.L. & Neve R.L. (1989) Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. Science 245: 417-420.
- Yankner B.A., Duffy L.K. & Kirschner D.A. (1990a) Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid β-protein Reversal by tachykinin neuropeptides. Science 250: 279-282.
- Yankner B.A., Caceres A. & Duffy L.K. (1990b) Nerve growth factor potentiates the neurotoxicity of ß amyloid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 9020-9023.

Zadina J.E., Chang S.L., Ge L.J. & Kastin A.J. (1993) Mu-Opiate receptor downregulation by morphine and up-regulation by naloxone in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 265: 254-262.

		Inhibition	Contrôles négatifs	
DAG		Indison P MA		
Ester de phorbol	PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)		4α-PMA (la position du goupement OH change l'arrangement du groupe cyclopentane	
	PDBu (phorbol 12, 13-dibutyrate)		4α-PDBu	
	PDD (phorbol 12, 13-didécanoate)		4α-PDD	
	PDA (phorbol 12, 13-diacetate)		4α-PDA	
	PDBz (phorbol 12, 13-dibenzoate)	1	4α-PDBz	
Indolactams	Lyngbyatoxin A			
	Téléocidine	4,6 nM		
	(-) Indolactame V synthétique	1,1 μM	(+) Indolactame V stéréoisomère	
	(-) 7 octylindolactame V synthétique	29 nM	(+) 7 octylindolactame V stéréoisomère	
Polyacetates	Aplysiatoxines			
	Oscillatoxines	1		
Bryostatin				
	Thyméléatoxine (activateur PKC du groupe A (α B1 γ) ED50 100 nM ou - % à PKC δ et ϵ pas actif à 1 μ M			
	dPPA (12 deoxyphorbol 13-phenylacetate 20- acetate) acivateur partiel spécifique de la PKC 81 avec une ED ₅₀ > 1000 fois par rapport aux 4 autres PKC activation de 60 % de celle obtenue par PMA			

ACTIVATEURS DE LA PROTÉINE KINASE C

ACTIVATEURS DE LA PKA

Forskoline dBu AMPc

INHIBITEURS DE PRTÉINES KINASES

Site d'action				Ki ou (Ic50) μΜ	
Domaine catalytique PKC	Staurosporine	Alkaloïde (Streptomyces)	PKC PKA CaM PK	0,0007 0,007 (0,02)	Pas d'effet sur la fixation PDBu Cytotoxique n'agit pas avec DNA
	UCN-01	Alkaloïde (Streptomyces)	РКС РКА	(0,0041) (0,042)	Pas d'effet sur la fixation PDBu Cytotoxique n'agit pas avec DNA
	Chélérythrine	Alkaloïde (tetracycline aromatique) de la classe des benzophenantridines	PKC PKA CaM PK	(0,66) (170) (>100)	Compétitif avec le substrat Pas d'effet sur la fixation ATP Pas d'effet sur la fixation PDBu Cytotoxique
	H-7	dérivé isoquinoline sulfonamide Synthétique	PKC PKA PKG	6,0 3,0 5,8	Compétitif avec site de liaison ATP Pas d'effet sur la fixation substrat (Spécificité pour PKC vérifié par contrôle négatif: IQDP ou HA-1004)
	Iso H-7	Synthétique	РКС	(50)	
	IQDP	Synthétique	PKC PKA PKG	75 1,8 7,7	
	HA-1004	Synthétique	PKC PKA PKG	40 2,3 1,3	
	H-8	Synthétique	pas spécific	1	Compétitif avec site de liaison ATP
	KN-62	Synthétique	PKC PKA CaM PK	>100 >100 0,9	se fixe dans le site de liaison de la calmoduline de la PK, n'agit pas sur les CaM PK déjà activée par autophosphorylation
	H-89	Synthétique	PKC PKA CaM PK	31,7 0,048 29,7	Compétitif avec site de liaison ATP
	H-85	Synthétique	PKC PKA CaM PK		peut servir de témoin négatif d'inhibition de la PKA
Domaine de régulation de la PKC					
Agissant sur site de liaison DAG/Ester de phorbol	Sphingosines		PKC CaM PK	[] + forte	Compétitif avec les ester de phorbol, prévient la formation de ces activateurs avec le complexe ternaire PKC-Phospholipide-calcium. Métabolisé rapidement par la sphingosine Kinase. Cytotoxique contrôle négatif : N acethylsphingosine et sphingosine à chaine courte (>C11)
	Calphostine	isolé de Cladosporium cladosporioides	РКС РКА	(0,05) (>50)	plus actif à la lumière Inhibe la liaison PDBu Cytotoxique n'agit pas avec le DNA

IC50		PP1	PP2A	PP2B calcineurine Ca++ et CaM dépendante	PP2C Mg ⁺⁺ dépendante
Acide okadaïque		10 nM	0,1 nM	5 μM	
Acanthifolicin		20 nM	1 nM		
Calyculine A	-	2 nM	1 nM		
Microcystine LR	heptapeptide cyclic ne passe pas les membranes	6 nM	40 pM		
Nodularine	ne passe pas les membranes	3 nM	1 nM		
Tautomycine	structure comme AO n'active pas PKC	32 nM	32 nM		

INHIBITEURS DE PHOSPHATASES

AO, Tautomycine et Mycrocystine LR agissent sur le même site sur la PP1 Calyculine A serait plus perméable que l'AO, plus efficace sur des cellules entières.





R₂

н

CH2)2CH3

CH2)8CH3



Fig. 1 Phorbol and Derivatives Fig. 2 4α-Phorbol and Derivatives



a. Teleocidin A-1 (Lyngbyatoxin A)



Fig. 1: (-)-Indolactam V



Fig. 2: (+)-Indolactam V



• Sphingosine



Fig. 2a: Thymeleatoxin, n = 1

- 145 -

Annexe



Staurosporine



k NCH₃ H

н

0:

Hm

∎OH

""′СН_э

осн3



- 146 -

•

.




OKADAIC ACID: R1 = H, R2 = H DINOPHYSISTOXIN: $R_1 = H$, $R_2 = CH_3$ ACANTHIFOLICIN: C9-C10 = C



Calyculin A