

50376  
1995  
103

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

UFR DE BIOLOGIE

Année: 1995

Numéro d'ordre:

Thèse de Sciences de la Vie et de la Santé

présentée à l'Université de Lille I  
pour l'obtention du grade de  
Docteur en Biochimie

par



Valérie BUÉE-SCHERRER

**LA PHOSPHORYLATION DES PROTÉINES MICROTUBULAIRES TAU  
DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER:**

**ETUDE IMMUNOCHEMIQUE D'UN ÉPITOPE PHOSPHORYLÉ.  
SIMILITUDES ET DIFFÉRENCES AU COURS DU DÉVELOPPEMENT ET  
D'AUTRES MALADIES NEURODÉGÉNÉRATIVES.**

présentée le 20 juin 1995 devant le jury composé de:

**Rapporteurs:** Monsieur le Professeur Michel Goedert  
Monsieur le Professeur Bernard Pau

**Examineurs:** Madame le Docteur Chantal Mourton-Gilles  
Monsieur le Docteur Jean-Claude Beauvillain  
Monsieur le Professeur André Verbert

**Directeur de thèse:** Monsieur le Docteur André Delacourte

A Luc

A ma mère

A ma grand-mère

A mon père, mon grand-père et Hervé

A ma famille

A mes amis

Ce travail a débuté dans l'Unité INSERM 156 (Directeur: Monsieur le Pr. Mazzuca) et s'est achevé dans l'Unité INSERM 422 (Directeur: Monsieur le Dr. Beauvillain), au sein du groupe "Vieillesse Cérébrale et Dégénérescence du Neurone" dirigé par Monsieur le Dr. Delacourte.

J'exprime tous mes remerciements à

Monsieur le Professeur Michel Goedert. Vos compétences scientifiques et votre notoriété dans le domaine de la biologie des protéines tau me rendent votre avis très précieux. Vos conseils et votre apport dans ce travail sont pour moi d'une valeur inestimable. Votre venue en tant que rapporteur m'honore au plus haut point.

Monsieur le Professeur Bernard Pau. Je suis particulièrement honorée de l'attention que vous me témoignez en jugeant cette thèse. Je vous prie d'accepter l'expression de ma profonde et respectueuse gratitude.

Madame le Docteur Chantal Gilles-Mourton. Notre collaboration a été pour moi très enrichissante, et nos rencontres toujours chaleureuses. Vos conseils m'ont été précieux. Je suis très heureuse de vous compter parmi mes juges.

Monsieur le Docteur Jean-Claude Beauvillain. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude pour m'avoir permis de réaliser ce travail au sein de votre unité. Je vous suis très reconnaissante de la gentillesse et de la disponibilité que vous m'avez toujours témoignées.

Monsieur le Docteur André Delacourte. Que cette thèse soit le témoignage de la confiance que vous m'avez accordée en m'accueillant dans votre laboratoire. Vous avez su me faire partager votre dynamisme pour la recherche scientifique, dans un domaine où la compétition est farouche. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et ma reconnaissance.

Monsieur le Professeur André Verbert. Dès le début de mes études, vous m'avez "mis l'eau à la bouche" pour la Biochimie, la Biologie et la Recherche. Vous m'avez toujours encouragée et soutenue tout au long de ces années. Aussi, c'est un très grand honneur pour moi de vous compter parmi mes juges. Je n'oublierai jamais que je vous dois beaucoup.



J'exprime également tous mes remerciements à

Monsieur le Docteur Patrick R. Hof, pour son aide, ses précieux conseils tout au long de cette thèse et son amitié.

Monsieur le Docteur Constantin Bouras, pour sa gentillesse, et ses discussions toujours enrichissantes.

Monsieur le Professeur André Défossez, pour son aide et ses encouragements.

Madame le Docteur Marie-Laure Caillet-Boudin, pour son soutien et ses conseils.

Messieurs les Professeurs Destée, Leys, Mazzuca, Morisson, Olanow, Perl, Petit, ainsi qu'à Mesdames et Messieurs les Docteurs Chartier, Condamines, Flament, Giannakopoulos, Leveugle, Vermersch et Vickers.

Monsieur le Docteur Vanmechelen (Innogenetics, Belgique), pour sa gentillesse et pour nous avoir fourni l'anticorps monoclonal AT8.

Je tiens à remercier

Pierre-Eric, pour ses conseils, son aide morale et son amitié de longue date, ainsi que sa disponibilité le jeudi midi.

Eric, Franck, Frédérique, Odile et Philippe pour leurs conseils précieux en anatomie et leurs grandes connaissances sur la psychologie et le maniement des rats.

Claude, pour son amitié et son humour.

Je voudrais également remercier Annick, Danielle, Marie-Joelle, Cathia, Fabienne, Laetitia, Valérie, Bruno, Didier, Jean-Charles, Jean-Philippe, Jordi, Nicolas, Serge, Thierry et tous les membres de l'unité INSERM U422, pour leur gentillesse, leur bonne humeur, leur aide et leur soutien "intra" et "extra" muros, pendant ces quatre années.

Une partie de ce travail a été récompensée par le Prix "Maladie d'Alzheimer et démences séniles" de la Fondation IPSEN, en 1994. Ce prix a permis la présentation de ce travail au Congrès sur "Le cytosquelette dans la maladie d'Alzheimer", qui a eu lieu à Rochester, NY, Etats Unis.

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

### LISTE DE PUBLICATIONS

#### Soumis

- 1- Buée-Scherrer V, Condamines O, *et al.* AD2, a phosphorylation-dependent monoclonal antibody directed against a robust epitope on tau proteins present during neurofibrillary degeneration. (en préparation).
- 2- Reig S, Buée-Scherrer V, Gilles-Mourton C, Défossez A, Delacourte A, Beauvillain J-C, Mazzuca M. Immunogold labelling of paired helical filaments and amyloid filaments by specific monoclonal and polyclonal antibodies. *Acta Neuropathol* (en révision favorable).

#### 1995

- 1- Buée-Scherrer V, Buée L, Hof PR, Leveugle B, Gilles C, Loerzel A, Perl DP, Delacourte A (1995) Neurofibrillary degeneration in amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia of Guam: immunochemical characterization of tau proteins. *Am. J. Pathol.* 146, 924-932.
- 2- Condamines O, Buée-Scherrer V, Boissier L, Watez A, Delacourte A, Pau B, Mourton-Gilles C. New immunoassay for the mapping of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease using two monoclonal antibodies against human PHF-tau proteins. *Neurosci Lett* (sous presse).

1994

- 1- Vickers JC, Riederer BM, Marugg MA, Buée-Scherrer V, Buée L, Delacourte A, Morrison JH (1994) Alterations in neurofilament protein immunoreactivity in human hippocampal neurons related to normal aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience* 62, 1-13.
- 2- Giannakopoulos P, Hof PR, Giannakopoulos A-S, Buée-Scherrer V, Surini M, Delacourte A, Bouras C (1994) Dementia in the oldest-old: quantitative analysis of 12 cases from a psychiatric hospital. *Dementia*, 5: 348-356.
- 3- Hof PR, Nimchinsky EA. Buée-Scherrer V, Buée L, Nasrallah J, Hottinger AF, Purohit DP, Loerzel AJ, Steele JC, Delacourte A, Morrison JH, Perl DP (1994) Amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia complex of Guam: quantitative neuropathology, immunohistochemical analysis of neuronal vulnerability, and comparison with related neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol.* 88, 397-404.

1993

- Sautière PE, Caillet-Boudin ML, Watzet A, Buée-Scherrer V, Delacourte A (1993) Détection d'épitopes pathologiques de type Alzheimer sur les protéines Tau de cellules de neuroblastome après traitement à l'acide okadaïque. *C. R. Acad. Sci. Paris* 316, 533-535.

1990

- Delacourte A, Flament S, Dibe EM, Hublau P, Sablonnière B, Hémon B, Scherrer V, Défossez A (1990) Pathological proteins Tau 64 and 69 are specifically expressed in the somatodendritic domain of the degenerating cortical neurons during Alzheimer's disease: demonstration with a panel of antibodies against tau proteins. *Acta Neuropathol.* 80, 111-117.

### Ouvrages:

- 1) Buée-Scherrer V, Vermersch P, Condamines O, Mourton-Gilles C, Pau B, Destée A, Leys D, Petit H, Caillet-Boudin ML, Delacourte A (1994) Diagnostic de la maladie d'Alzheimer à partir de biopsies de patients présentant une démence atypique: intérêt de l'approche biochimique. Actualités sur la maladie d'Alzheimer et les syndromes apparentés. Poncet M, Michel B, Nieoullon A (eds). Solal, Marseille, France, pp 105-110.
- 2) Buée-Scherrer V, Buée L, Hof PR, Leveugle B, Watzte A, Bouras C, Perl DP, Delacourte A (1995) Tau variants in aging and neurodegenerative disorders. Alzheimer's disease: lessons from cell biology. Research and Perspectives in Alzheimer's disease. Kosik, K., Selkoe, D., Christen, Y. (eds). Springer-Verlag, Berlin pp 132-149.

### LISTE DE COMMUNICATIONS

1995

- 1- Delacourte A, Vermersch P, Buée-Scherrer V, Buée L, David J-P, Sergeant N, Watzte A, Hof PR, Robitaille Y, Gauvreau D. De la molécule à la démence. La démence: Pourquoi? 8<sup>ème</sup> Congrès de la fondation nationale de gérontologie, Paris, France. 30 janvier 1995.
- 2- Condamines O, Buée-Scherrer V, Boissier L, Watzte A, Pau B, Delacourte A, Mourton-Gilles C. Immunodosage des protéines tau pathologiques à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques. Cartographie de la neurodégénérescence de type Alzheimer. 2<sup>ème</sup> Colloque de la Société des Neurosciences, Lyon, France. 12-18 Mai 1995.
- 3- Buée L, Pérez-Tur J, Buée-Scherrer V, Leveugle B, Loerzel AJ, Chartier MC, Perl DP, Hof PR, Delacourte A. Apolipoprotein E genotypes in Guamanian amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex: relationship to neuropathologic changes. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. Colloques Médecine et Recherche. Paris, France. 29 Mai 1995.

- 4- Delacourte A, Mourton-Gilles C, Buée-Scherrer V, Sergeant N, Bussi re T, Vermersch P, Robitaille Y, Gauvreau D. AD2, a mAb that differentiates by Western-blotting between normal aging, Alzheimer's disease, progressive supranuclear palsy, Pick disease and a subtype of frontal lobe degeneration. Soc. Neurosci. Abstr. San Diego, Californie, USA, Novembre 1995.

#### 1994

- 1- Bu e-Scherrer V, Bu e L, Hof PR, Vermersch P, Leveugle B, Steele JC, Perl DP, Delacourte A. Biochemical characterization of the electrophoretic tau profile in different dementing conditions. Alzheimer's disease: lessons from cell biology. Colloques médecine et recherche, Fondation IPSEN, Paris, France. 25 Avril 1994.
- 2- Bu e-Scherrer V, Bu e L, Hof PR, Vermersch P, Leveugle B, Steele JC, Perl DP, Delacourte A. Alzheimer's disease, progressive supranuclear palsy and amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia complex of Guam: a biochemical comparative study. The Cytoskeleton in Alzheimer's disease, Rochester, USA. 20-23 Mai 1994.
- 3- Bu e-Scherrer V, Bu e L, Vermersch P, Hof PR, Leveugle B, Perl DP, Delacourte A. Tau pathology in neurodegenerative disorders: biochemical analysis. Soc. Neurosci. Abstr. Miami Beach, Florida, USA. 13-18 Novembre 1994.
- 4- Vermersch P, Bu e-Scherrer V, Bu e L, Hof PR, Perl D, Gauvreau D, Destée A, Petit H, Delacourte A. Biochemical mapping of neurofibrillary pathology in progressive supranuclear palsy: evidence for a severe cortical involvement. Soc. Neurosci. Abstr. Miami Beach, Florida, USA. 13-18 Novembre 1994.
- 5- Bu e-Scherrer V, Bu e L, Vermersch P, Hof PR, Leveugle B, Perl DP, Delacourte A. A biochemical study of pathological tau proteins in several neurodegenerative disorders. Third Lille Neurosciences Workshop, Lille, France. 20-21 Octobre 1994.
- 6- Pérez-Tur J, Bu e L, Bu e-Scherrer V, Hof PR, Loerzel AG, Mufson EJ, Steele JC, Perl DP, Chartier-Harlin M-C, Delacourte A. Apolipoprotein E E4 allele in Guamanian amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia. Third Lille Neurosciences Workshop, Lille, France. 20-21 Octobre 1994.

1993

- 1- Buée-Scherrer V, Condamines O, Vermersch P, Mourton-Gilles C, Pau B, Destée A, Leys D, Petit H, Caillet-Boudin ML, Delacourte A. Accurate biochemical diagnosis of Alzheimer's disease in biopsies from patients with atypical dementia. Second Lille Neurological Workshop, Lille, France. 19-20 avril 1993.
- 2- Sautière PE, Caillet-Boudin ML, Watez A, Buée-Scherrer V, Delacourte A. A cellular model of Alzheimer-type Tau degeneration : induction of pathological Tau proteins in neuroblastoma cells. Second Lille Neurological Workshop, Lille, France. 19-20 avril 1993.
- 3- Sautière PE, Caillet-Boudin ML, Watez A, Buée-Scherrer V, Delacourte A. Phosphorylation anormale de type Alzheimer induite sur les protéines Tau de cellules de neuroblastome en culture. 75<sup>eme</sup> Congrès de l'Association des Anatomistes, Lille, France. 12-14 Mai 1993. Bulletin de l'association des anatomistes, 77: 53-54.
- 4- Buée-Scherrer V, Buée L, Vermersch P, Hof PR, Leveugle B, Loerzel A, Steele JC, Delacourte A, Perl D. Biochemical characterization of the Tau proteins in amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia complex (ALS/PDC) of Guam. Soc. Neurosci. Abstr. Washington DC, USA. 7-12 Novembre 1993.
- 5- Buée-Scherrer V, Vermersch P, Condamines O, Mourton-Gilles C, Pau B, Destée A, Leys D, Petit H, Caillet-Boudin ML, Delacourte A. Intérêt d'un diagnostic biochimique de la maladie d'Alzheimer à partir de biopsies de patients présentant une démence atypique: utilisation d'un anticorps monoclonal spécifique de la dégénérescence neurofibrillaire de type Alzheimer. II<sup>eme</sup> Réunion Francophone sur la Maladie d'Alzheimer et les Syndromes apparentés, Marseille, France. 26-27 Novembre 1993.

1992

Delacourte A, Défossez A, Vermersch P, Frigard B, Buée L, Sautière PE, Watez A, Scherrer V, Caillet ML, Granato P. Pathological Tau proteins: what do they tell us about Alzheimer's disease? Sixth Annual International Workshop of Psychogeriatry, American Association of Geriatric Psychiatry, Lille, France. 30-31 octobre 1992.

# **INTRODUCTION**



## GENERALITES

En 1906, Aloïs ALZHEIMER décrit pour la première fois, des altérations anatomiques dans le cerveau d'une patiente démente, âgée de 56 ans. A partir de 1911, le terme "Maladie d'Alzheimer" fut utilisé pour définir cette démence présénile (apparue avant 65 ans) confirmée à l'autopsie par la présence de lésions histologiques spécifiques. Les troubles psychiatriques de la sénilité étaient quant à eux regroupés dans le cadre de la démence sénile ou de la syphilis. Des études anatomopathologiques démontrèrent par la suite, que les lésions retrouvées dans le cerveau de patients atteints de démence sénile étaient les mêmes que dans la maladie d'Alzheimer. Vers les années 60, l'idée d'une unicité de la maladie a alors émergé, et de nos jours le terme de maladie d'Alzheimer est couramment employé pour désigner autant les formes préséniles (avant 65 ans) que séniles (après 65 ans).

La maladie d'Alzheimer, cause de démence la plus fréquente chez la personne âgée, touche 5% de la population au-delà de 65 ans et 15 à 20% après 80 ans. L'augmentation de l'espérance de vie et la baisse de la natalité font de cette maladie un véritable problème social et économique, et la plus grande cause de morbidité, d'invalidité et de mortalité, pour les années à venir.

Depuis une dizaine d'années, la recherche fondamentale a progressé de façon fulgurante, notamment dans la compréhension des mécanismes étiopathogéniques. L'accumulation extracellulaire d'un peptide, sous la forme de dépôts amyloïdes et l'agrégation de protéines modifiées du cytosquelette au sein des neurones en dégénérescence, sont les deux anomalies responsables de la démence de type Alzheimer. Bien que l'origine de la maladie soit encore inconnue, de nombreux facteurs favorisant

ont été mis en cause (l'âge, une prédisposition génétique dans les formes familiales, l'allèle  $\epsilon 4$  de l'apolipoprotéine E). L'hétérogénéité de la maladie suggère que d'autres facteurs favorisants soient impliqués.

Dans ce travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la dégénérescence des neurones et les constituants biochimiques qui la composent, ainsi que la caractérisation de sondes immunologiques spécifiques. Celles-ci représentent des outils indispensables pour l'étude de la dégénérescence de type Alzheimer, mais aussi d'autres pathologies où ce processus dégénératif est également rencontré.

Bien que travaillant sur un aspect fondamental de la maladie, il nous a semblé important de décrire dans un premier temps, les aspects cliniques de la maladie. Toutes les données bibliographiques sur la clinique proviennent de plusieurs ouvrages de revue générale sur la maladie d'Alzheimer (Fondation IPSEN, 1992; Signoret et Hauw, 1991; Guard et Michel, 1989). Aussi, les références originelles ne sont pas toujours citées. Dans un deuxième temps, nous décrivons les aspects neuropathologiques, puis biochimiques et génétiques caractéristiques de la maladie d'Alzheimer, et enfin nos résultats personnels.

## **I- DESCRIPTION CLINIQUE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER:**

La maladie d'Alzheimer (MA) est une démence. Les démences, en général, se définissent comme une altération progressive de la mémoire et de l'idéation, suffisamment marquée pour handicaper les activités de la vie de tous les jours. La démence doit être apparue depuis au moins 6 mois et se caractériser par le trouble d'au moins une des fonctions suivantes: langage, calcul, jugement, altération de la pensée abstraite, praxies, gnosies ou modification de la personnalité (Organisation Mondiale de la Santé, 1992).

La définition de la MA est anatomo-clinique, le diagnostic clinique reste donc difficile.

La sémiologie de la MA comporte des troubles cognitifs, des troubles du comportement et des signes neurologiques.

### **I- 1- Les signes cliniques:**

#### **I- 1- 1- Troubles cognitifs:**

##### *I- 1- 1- 1- La mémoire:*

Les troubles de la mémoire sont très fréquemment les premiers signes rencontrés. Leur apparition est insidieuse et souvent mise sur le compte de l'âge. Les troubles de mémoire les plus rencontrés touchent essentiellement la vie quotidienne: le patient répète plusieurs fois les mêmes questions, oublie des séquences entières du passé proche (coups de téléphone, rendez-vous...). Très rapidement, il oublie la date, le jour de la semaine, et parfois son chemin sur un itinéraire qui lui était pourtant familier. On comprend donc aisément que ces troubles retentissent rapidement sur les activités quotidiennes et constituent une source importante de réduction de l'autonomie.

La mémoire à court terme: Elle est caractérisée par une faible capacité à restituer une quantité d'information (d'environ  $7 \pm 2$  items) dans un temps court (quelques secondes à quelques minutes). Elle est évaluée en clinique par l'empan chiffré (restitution immédiate d'une série de chiffres dans l'ordre où ils ont été donnés) et par le paradigme de Brown-Peterson (restitution d'une liste de 3 mots après une brève tâche interférente (par exemple, compter à rebours de 7 en 7 à partir de 100)). La restitution des 3 mots après la tâche interférente est très précocement perturbée dans la MA, alors que l'empan chiffré l'est plus tardivement. Ce déficit de mémoire à court terme semble dû à une diminution globale des capacités de traitement de l'information, du fait de l'étendue des lésions corticales.

La mémoire à long terme: Elle est caractérisée par une capacité illimitée dans la durée et la quantité d'informations stockées. Ce système comprend la mémoire implicite (acquisition en dehors de la conscience du sujet: apprentissage de l'écriture, de gestes précis) et la mémoire explicite (mémoire épisodique: personnelle, correspondant à des faits individuels, biographiques; et la mémoire sémantique: didactique, acquisitions culturelles, connaissance du monde). L'ensemble semble être atteint pendant la MA, surtout la mémoire explicite.

### *I- 1- 1- 2- Troubles du langage :*

Ils sont considérés comme les troubles les plus fréquents après les troubles mnésiques. Ils sont retrouvés dans 40 à 100% des cas. Le langage écrit est souvent plus précocement altéré que le langage oral. Le manque du mot est souvent associé à une réduction des fluences verbales.

### *I- 1- 1- 3- Troubles praxiques:*

Les perturbations des réalisations gestuelles sont très fréquentes dans la MA (difficulté, voire impossibilité à se servir d'objets usuels, ou plus fréquemment à s'habiller, mais aussi incapacité de reproduire sur imitation, des gestes, des figures ou des dessins). Ces troubles réduisent de façon considérable, l'autonomie du sujet.

### *I- 1- 1- 4- Troubles gnosiques:*

Ils ont été beaucoup moins étudiés. Les troubles les plus fréquents sont les troubles visuels. Une agnosie visuelle serait présente dans 30% des cas. Elle se traduit par une difficulté à distinguer les objets ou à lire. Cette difficulté est souvent rapportée à une diminution de l'acuité visuelle. Avec l'évolution de la maladie, une difficulté à reconnaître des visages, même familiers peut être rencontrée (prosopagnosie).

## **I- 1- 2- Troubles du comportement:**

### *I- 1- 2- 1- Dépression:*

Elle a longtemps été considérée comme une réponse psychologique du malade à la diminution de ses capacités intellectuelles, mais elle pourrait être une complication spécifique en rapport avec les lésions de la MA. Cependant, au niveau de la clinique, il est très difficile de distinguer les troubles cognitifs et la dépression observée chez certains patients.

### *I- 1- 2- 2- Comportements psychopathologiques:*

On peut distinguer les comportements passifs (perte de l'initiative, retrait, émoussement affectif, anxiété...), les comportements d'agitation (irritabilité, activité sans but, comportement sexuel inapproprié) ou égocentriques (diminution du contrôle émotionnel, désaffection vis-à-vis des siens...). Beaucoup de ces manifestations paraissent en rapport direct avec les déficits cognitifs, d'autres peuvent correspondre à des états psychopathologiques (crise d'anxiété, confusion). Toutefois, ces troubles ne sont pas considérés par la majorité des auteurs, comme étant spécifiques de la MA.

### **I- 1- 3- Troubles neurologiques:**

Dans l'ensemble, la MA ne s'accompagne pas de signes neurologiques importants, contrairement aux démences d'origine vasculaire. Toutefois, quelques troubles peuvent être observés. Ainsi, une augmentation du tonus musculaire, des troubles de la marche, et parfois des myoclonies sont décrits au cours de la MA. Il faut noter que l'intensité des troubles neurologiques semble toujours être corrélée à la sévérité de la démence.

### **I- 2- Diagnostic :**

Devant un syndrome démentiel et avant de conclure à une démence neurodégénérative dans laquelle pourrait s'inscrire la MA, le praticien doit exclure un certain nombre d'autres étiologies. Le diagnostic est étayé par une série d'évaluation neuropsychologique.

### I- 2- 1- Les éléments du diagnostic:

Des tests psychométriques sont utilisés, en particulier l'échelle de Blessed (Blessed *et al.*, 1968), le *Mini Mental Test* (Folstein *et al.*, 1975: **Annexe I**), l'échelle de Reisberg (Reisberg *et al.*, 1982) et l'échelle d'intelligence de Wechsler pour adultes (WAIS-R) (Wechsler, 1989). Ils peuvent être employés seuls ou regroupés. Leur principe est quantitatif: tout résultat inférieur de deux déviations standard aux résultats obtenus chez les patients de même âge et de même niveau culturel est considéré comme suspect de révéler une altération du fonctionnement cérébral.

Des examens paracliniques sont également pratiqués, et ont pour but d'éliminer les affections non dégénératives. Des examens complémentaires peuvent donc être effectués, tels que le Scanner-X (élimine surtout les tumeurs cérébrales), l'image par résonance magnétique nucléaire, l'électroencéphalogramme (montre parfois des tracés caractéristiques de certaines pathologies), la tomographie par émission monophotonique ou de positrons (évaluation du taux d'utilisation de glucose, de consommation d'oxygène et du débit sanguin) et des examens biologiques (sang et liquide céphalo-rachidien; leur étude permet d'exclure certaines maladies inflammatoires ou une neurosyphilis).

### I- 2- 2- Les critères de diagnostic:

Le diagnostic repose sur des critères cliniques et paracliniques positifs et sur l'exclusion d'autres pathologies. Il est classé en trois catégories: MA probable, possible et confirmée (**Annexe II**). Le diagnostic de certitude repose sur la somme de critères de MA probable (Mc Khann *et al.*, 1984) et de critères histologiques (présence des plaques séniles et de la dégénérescence neurofibrillaire) (Mc Khann *et al.*, 1984; Khachaturian,

1985). De ce fait, ce diagnostic de certitude ne se fait qu'après la mort de l'individu (à l'autopsie) ou au cours d'une biopsie cérébrale.

### I- 2- 3- Les biopsies cérébrales:

Elles sont très rarement réalisées. La biopsie est tout d'abord un examen agressif (nécessite une intervention chirurgicale assez délicate), de bonne spécificité mais dont la sensibilité est faible (25 à 50% des biopsies ne permettent pas d'établir un diagnostic). L'absence de thérapeutique active sur l'évolution de la MA ne justifie pas de tels risques pour le patient. Leurs indications restent très limitées, et généralement, les biopsies sont effectuées lorsque le clinicien se trouve devant un cas de démence atypique chez un patient jeune, ou dans le cas de présomption de tumeurs.

### I- 2- 4- Nouveau test de dépistage:

Récemment, une équipe américaine a mis au point un test, basé sur la dilatation de la pupille en présence d'un antagoniste des récepteurs cholinergiques, le tropicamide (Scinto *et al.*, 1994). En effet, cette substance utilisée en ophtalmologie a la propriété de dilater la pupille pendant un certain temps, permettant un examen de fond d'œil. Scinto *et al.* ont montré qu'en utilisant du tropicamide peu concentré, 95% des patients atteints de MA probable (n=19) présentaient une augmentation du diamètre de la pupille, alors que chez 30 des 32 témoins, l'augmentation du diamètre était minimale (spécificité de 94%). Dans la MA, il existe un déficit cholinergique (détaillé au chapitre "altération des neurotransmetteurs") qui expliquerait l'incapacité pour les cas Alzheimer à revenir à un état normal d'ouverture de la pupille, dans un temps donné. Ces résultats préliminaires



suggèrent que ce test, objectivant une hypersensibilité des patients atteints de MA au collyre anticholinergique, permettrait l'identification de patients atteints à un stade précoce, à un moment où ils pourraient encore bénéficier d'une thérapeutique visant à ralentir l'évolution de la maladie. Ce test est par ailleurs simple, non agressif, sans effet secondaire et sensible. Cependant, d'autres données et notamment un élargissement de la population sont nécessaires pour valider ce test et définir la spécificité des résultats qui ne sont pas toujours confirmés (Science, 267 (1995) 1577-1581).

## **II- DESCRIPTION NEUROPATHOLOGIQUE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER:**

### **II- 1- L'atrophie cérébrale**

#### **II- 1- 1- Aspect macroscopique:**

L'atrophie corticale est diffuse dans la MA, et se traduit par un rétrécissement des circonvolutions et un élargissement des sillons. Elle provoque une diminution du poids du cerveau, significative à l'échelle d'une population, et non pour un individu donné. Le poids moyen d'un cerveau ayant augmenté au cours de ce siècle, il est impossible de comparer sans biais le poids du cerveau de personnes nées à quelques décennies d'intervalle (Miller et Corsellis, 1977). La diminution du poids du cerveau n'a donc pas de valeur diagnostique. Cette atrophie corticale s'associe à une dilatation des ventricules latéraux.

#### **II- 1- 2- Aspect microscopique:**

Bien que dans le vieillissement un "rabougrissement" des neurones soit observé, une véritable perte des grands neurones de l'ordre de 22 à 26%, a été décrite dans la MA (Terry *et al.*, 1981; Mountjoy *et al.*, 1983). Selon Duyckaerts *et al.* (1985), cette atrophie est consécutive à une perte de neurones en colonne réduisant ainsi la longueur du ruban cortical. Par contre, une autre étude a montré que la perte neuronale était plutôt laminaire, et affectait les neurones pyramidaux possédant de longues projections cortico-corticales dans le néocortex (Lewis *et al.*, 1987). En plus de la perte neuronale, une perte des

synapses et une dilatation des boutons présynaptiques ont été montrées grâce à des études immunohistochimiques et immunocytochimiques utilisant des sondes contre la synaptophysine (marqueur des terminaisons présynaptiques; Masliah *et al.*, 1991). Cette perte synaptique créerait alors des disconnexions entre les différentes aires néocorticales impliquées dans les processus cognitifs (Terry *et al.*, 1991).

## II- 2- Les lésions histologiques:

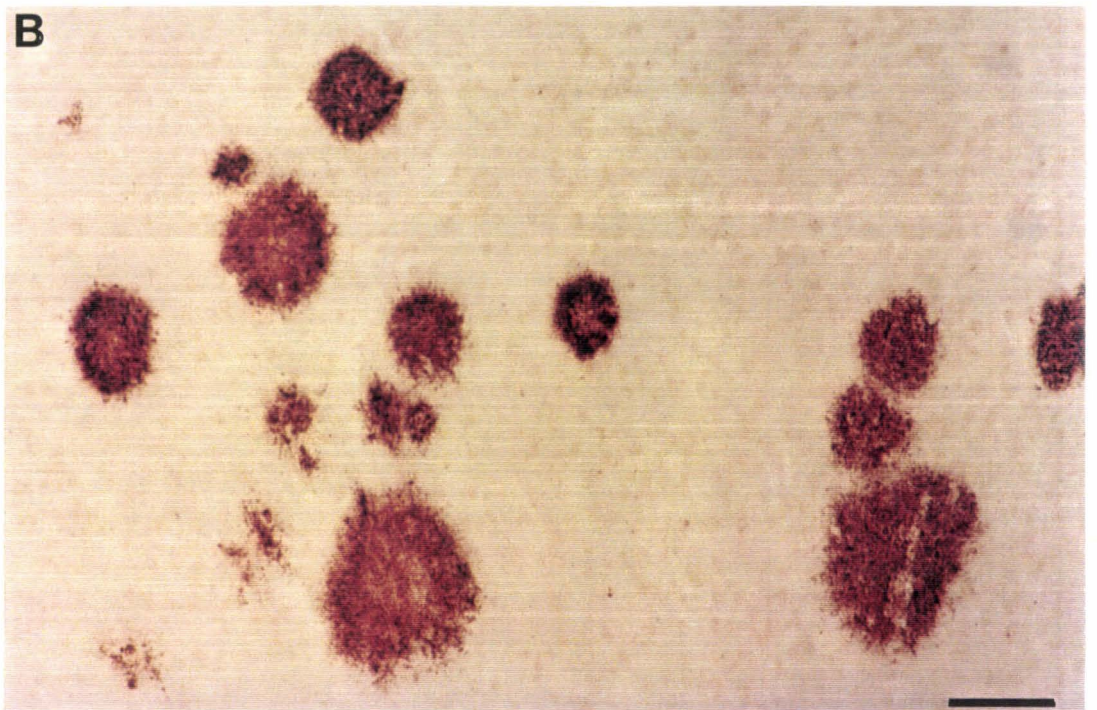
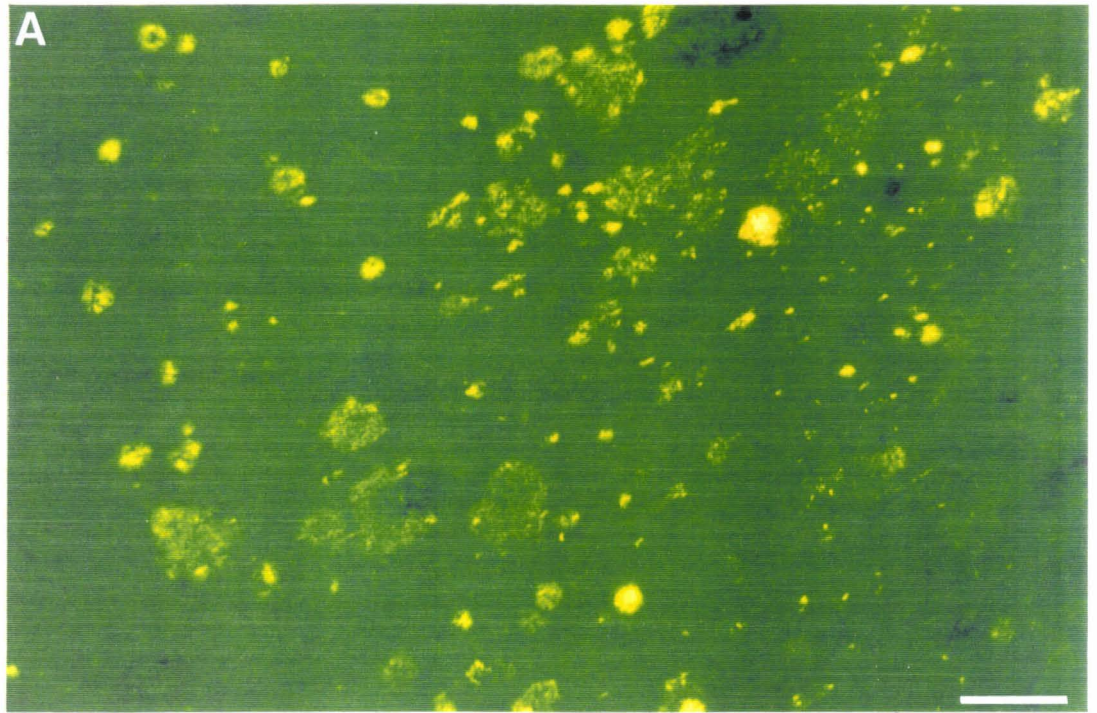
La MA est essentiellement caractérisée sur le plan histologique par deux types de lésions, les plaques séniles et la dégénérescence neurofibrillaire.

### II- 2- 1- Les plaques séniles:

#### *II- 2-1-1- Description:*

Les plaques séniles sont des dépôts de substance amyloïde, de forme arrondie et compacte, situées dans le domaine extracellulaire (**Figure 1**). Cette substance amyloïde peut également s'accumuler au sein des vaisseaux, on parle alors d'angiopathie amyloïde. La diffraction aux rayons X a permis de montrer que ces dépôts amyloïdes possédaient une structure en feuillets  $\beta$ -plissés (Glenner, 1980). Cette dernière leur confère certaines caractéristiques, notamment leur mise en évidence par certains colorants comme le rouge congo et la thioflavine S.

L'analyse ultrastructurale des dépôts amyloïdes a révélé qu'ils étaient constitués de filaments de 6 à 9 nm, irradiant depuis le centre de la lésion vers la périphérie (Merz *et al.*, 1983).



### *II- 2-1-2- Composition:*

En 1984, Glenner et Wong ont isolé biochimiquement le constituant principal de ces dépôts amyloïdes, il s'agit d'un peptide de 39 à 43 acides aminés appelé peptide A4 ou peptide A $\beta$  (Glenner et Wong, 1984). En utilisant un immunosérum dirigé contre le peptide A $\beta$ , il est alors possible de marquer les plaques séniles et l'angiopathie amyloïde.

Grâce à des études immunohistochimiques, d'autres constituants ont été détectés au sein des plaques séniles comme l' $\alpha_1$ -antichymotrypsine, les apolipoprotéines B et E, des protéines du complément, la fibronectine, des immunoglobulines, des laminines, des protéoglycannes, des thrombospondines... (Abraham *et al.*, 1988; Rogers *et al.*, 1988; Namba *et al.*, 1991, 1992; Perlmutter *et al.*, 1991; Buée *et al.*, 1992). Parmi ces constituants mineurs, certains sont appelés co-facteurs de l'amyloïdogénèse, car ils participeraient à la formation des dépôts amyloïdes. Il s'agit de l' $\alpha_1$ -antichymotrypsine, l'apolipoprotéine E et les protéoglycannes (Abraham *et al.*, 1988; Namba *et al.*, 1991; Buée *et al.*, 1993a,b).

### *II- 2-1-3- Distribution topographique:*

*Distribution régionale:* les dépôts amyloïdes affectent particulièrement les régions néocorticales. Ainsi, les régions temporales et occipitales sont les plus touchées, suivies des aires pariétales et frontales. Par contre, le cortex entorhinal, l'hippocampe et le noyau basal de Meynert sont moins atteints (Arnold *et al.*, 1991; Price *et al.*, 1991).

*Distribution laminaire:* Les premières études utilisant les colorations à l'argent ou à la thioflavine ont montré que les dépôts amyloïdes étaient préférentiellement localisés au niveau des couches III et V du néocortex (Rogers et Morrison, 1985; Lewis *et al.*, 1987). Des techniques immunohistochimiques utilisant des anticorps spécifiques du peptide A $\beta$ , ont révélé que les dépôts amyloïdes possédaient une distribution laminaire beaucoup

moins restreinte, et étaient retrouvés dans toutes les couches du cortex (Braak et Braak, 1991; Delaère *et al.*, 1991).

#### *II- 2- 1- 4- Evolution au cours du temps:*

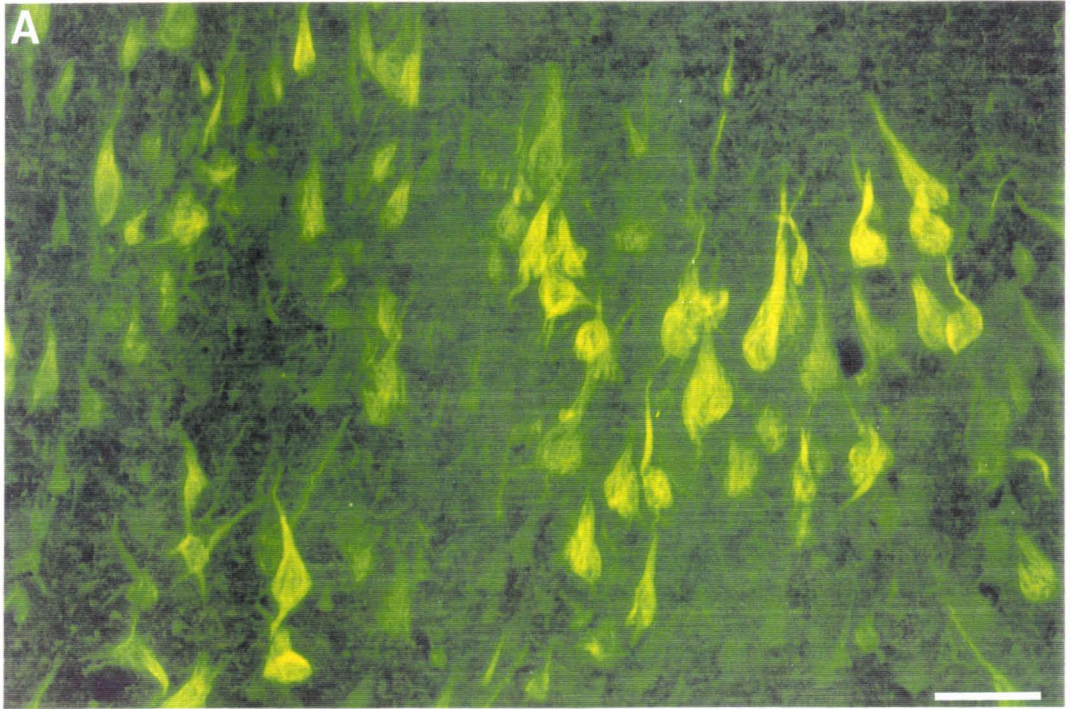
Comme le diagnostic final de MA se fait après autopsie, il semble difficile de se faire une idée précise de l'évolution des dépôts amyloïdes sur un cerveau donné. Des études comme celle de Braak et Braak, font une synthèse des données neuropathologiques pour un groupe de patients déments à différents stades de la maladie et de patients non déments. Ainsi, ils ont pu déterminer trois stades pour les dépôts amyloïdes, les stades A, B et C (Braak et Braak, 1991). Au stade A, les dépôts amyloïdes sont trouvés en faible quantité dans les régions basales du cortex frontal, temporal et occipital. La formation hippocampique est épargnée. Au stade B, les dépôts amyloïdes affectent les aires associatives de presque l'ensemble de l'isocortex, avec une densité modérée. La formation hippocampique est légèrement touchée. Au stade C, l'ensemble de l'isocortex (y compris les aires isocorticales primaires) est atteint. A ce stade, certains noyaux sous-corticaux peuvent être également envahis. La formation hippocampique reste modérément touchée.

#### **II- 2- 2- La dégénérescence neurofibrillaire:**

##### *II- 2-2-1- Description:*

La dégénérescence neurofibrillaire (DNF) est caractérisée par l'accumulation intracellulaire d'un matériel fibrillaire anormal. Les neurones en dégénérescence possèdent des propriétés argyrophiles, de telle sorte qu'ils sont facilement mis en évidence par des techniques d'imprégnation argentique (Gallyas, 1971; Campbell *et al.*, 1987). Par ces colorations, il est possible de distinguer les corps cellulaires des neurones, ainsi que





les neurites en dégénérescence. La DNF se présente sous l'aspect de flamme et les neurites sous la forme de "virgules", le tout étant dispersé dans le neuropile. (**Figure 2**). Il est également possible de colorer certains neurones et neurites en dégénérescence par des colorants utilisés pour la détection de la substance amyloïde, comme la thioflavine S. Ceci suggère donc que les neurones qui dégénèrent acquièrent au cours du temps, une structure en feuillets  $\beta$ -plissés (Défossez et Delacourte, 1987).

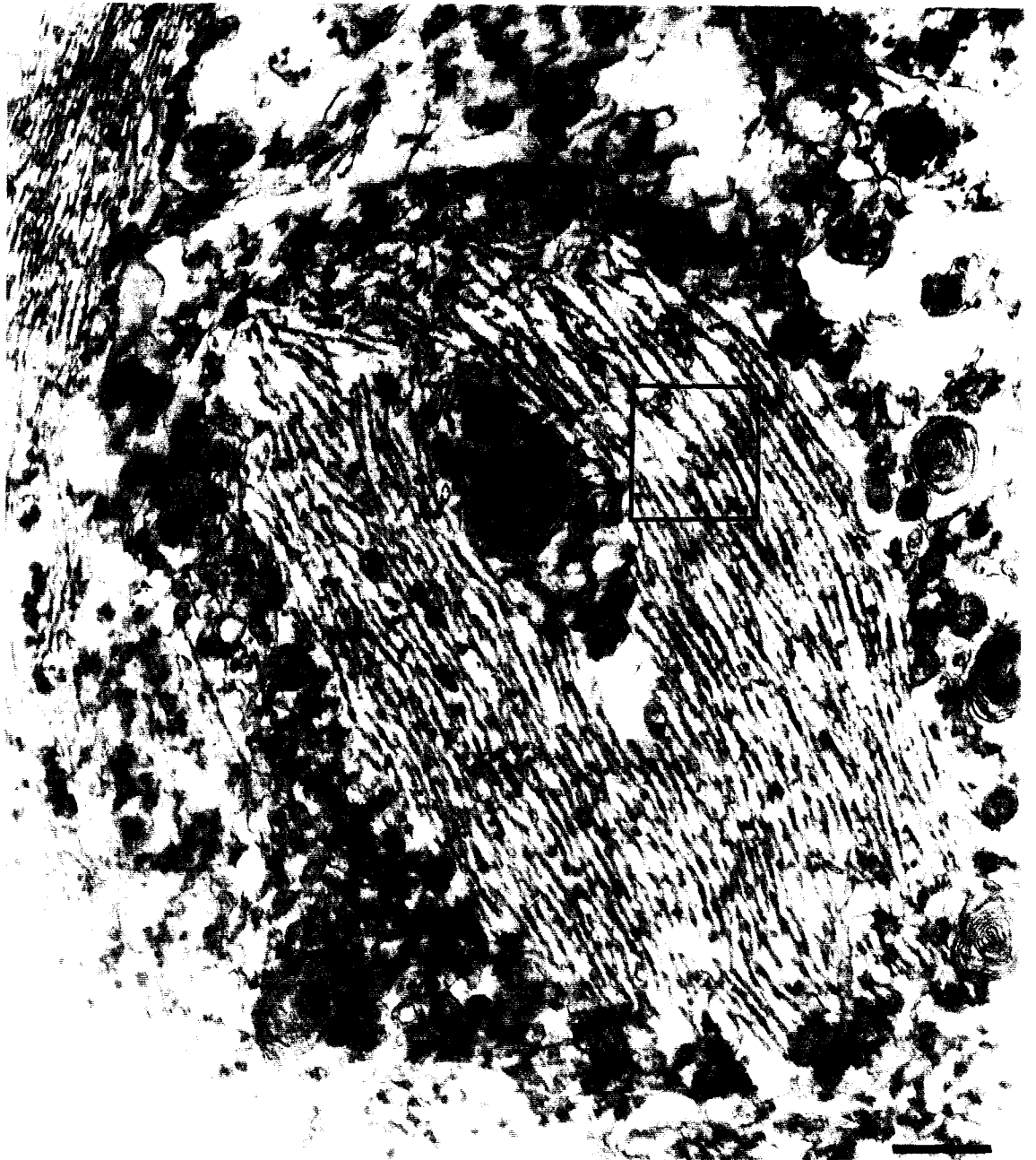
L'analyse ultrastructurale a révélé que ce matériel fibrillaire anormal était composé de paires de filaments appariées en hélice ou PHF (pour le terme anglais, *paired helical filaments*) (Kidd, 1963). Les filaments ont un diamètre de 20 nm, pourvus de constriction régulières tous les 80 nm. Kidd a suggéré que chaque filament était constitué de 2 brins de 10 nm s'enroulant l'un autour de l'autre de manière hélicoïdale (**Figure 3**).

Le nombre de DNF dans le cortex est en corrélation avec la sévérité de la démence (Wilcock et Esiri, 1982; Arriagada *et al.*, 1992).

#### *II- 2-2-2- Composition:*

En utilisant des sondes immunologiques contre les protéines tau et les techniques immunohistochimiques, de nombreuses équipes ont pu montrer que les constituants majeurs des PHF étaient les protéines tau, des protéines du cytosquelette associées aux microtubules (MAP pour *microtubule-associated proteins*) (Brion *et al.*, 1985; Delacourte et Défossez, 1986; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986a; Kosik *et al.*, 1986; Nukina et Ihara, 1986; Wood *et al.*, 1986). Inversement, en produisant des sondes immunologiques contre les PHF, il fut possible de détecter les protéines tau, notamment avec la technique des immunoempreintes. D'autres sondes immunologiques ont permis de détecter différents constituants, tels que l'ubiquitine, MAP2 et des neurofilaments.





*Ubiquitine:* Des anticorps anti-ubiquitine marquent les neurones en dégénérescence (Baner et al., 1991). Il semblerait que la présence d'ubiquitine soit une réponse de la cellule à l'accumulation anormale des protéines tau et servirait de signal pour l'élimination de telles structures insolubles.

*MAP2:* Les protéines tau et MAP2 sont des protéines associées aux microtubules et ont des homologies de séquence comme les domaines de liaison aux microtubules. Il est donc possible d'observer des réactions croisées entre protéines tau et MAP2 (Kosik et al., 1984; Hasegawa et al., 1990).

*Neurofilaments:* Les neurofilaments et les protéines tau possèdent des motifs communs au niveau de leur séquence. Il existe donc des réactions croisées entre protéines tau et neurofilaments (Nukina et al., 1987; Lee et al., 1988). Des études biochimiques ont en effet montré que des anticorps anti-neurofilaments reconnaissaient les protéines tau dans la MA (Lichtenberg-Kraag et al., 1992). D'autres auteurs ont également montré que la présence de neurofilaments permettait d'identifier certaines populations neuronales particulièrement vulnérables à la DNF (Hof et al., 1990a; b; Vickers et al., 1994).

### *II- 2-2-3- Distribution topographique:*

*Distribution régionale:* Les régions les plus fortement touchées par la DNF sont les régions hippocampique et para-hippocampique, incluant le cortex entorhinal, le subiculum et le CA1. La région de l'amygdale et en particulier, le noyau basal accessoire de l'amygdale sont également atteints par le processus de DNF (Arnold et al., 1991). Les aires temporales isocorticales contiennent également une forte concentration de neurones en dégénérescence. Les aires limbiques et le lobe temporal sont beaucoup plus touchés par la DNF que les lobes frontal, pariétal et occipital (Arnold et al., 1991).

*Distribution laminaire:* Les couches II, III, V, et VI du neocortex sont les plus touchées (Lewis *et al.*, 1987; Hof *et al.*, 1990a; Arnold *et al.*, 1991). Dans toutes les aires corticales associatives, les couches infragranulaires (V-VI) sont toujours plus atteintes que les couches supragranulaires (II-III) (Hof *et al.*, 1990a). Dans la région occipitale où la DNF est moins présente, la distribution laminaire est différente de celle observée dans les lobes temporal et frontal: la DNF affecte plus particulièrement les couches II et III des aires visuelles primaires et secondaires (Hof et Morrison, 1990b).

#### *II- 2- 2- 4- Evolution au cours du temps:*

Braak et Braak en 1991, ont effectué la cinétique d'apparition des lésions neurofibrillaires chez des patients déments et non déments, comme ils l'avaient fait pour les dépôts amyloïdes. Pour la DNF, l'évolution est divisée en six étapes: du stade I au stade VI. Le stade I correspond à l'atteinte moyenne du cortex transentorhinal, et en particulier de la couche II. Les neurones de cette couche sont en général les premières cellules nerveuses à développer une DNF. Le stade II représente une aggravation du stade I, c'est à dire une atteinte plus globale de la couche II, et un début d'atteinte du subiculum. Les stades I et II représentent donc les "stades transentorhinaux", avec une faible atteinte de l'hippocampe (CA1) et aucun changement dans l'isocortex.

Le stade III est principalement caractérisé par l'atteinte des cellules de la couche II, non seulement dans le cortex transentorhinal mais également dans le cortex entorhinal. De nombreux neurites en dégénérescence sont également visibles au niveau des dendrites des cellules de la couche II. A ce stade, il est possible d'observer des neurones en DNF dits fantômes (sans membrane) dans la couche II. Le CA1 est légèrement touché, par contre les régions du CA2 au CA4 sont épargnées. L'isocortex quant à lui, est très légèrement ou n'est pas du tout atteint par la dégénérescence. L'atteinte de la couche II est très sévère au stade IV, et la DNF est présente dans les couches plus profondes comme les couches III et

IV. Le CA1 est très touché, l'isocortex modérément. Quelques structures sous-corticales peuvent être légèrement atteintes. L'évènement le plus frappant des stades III et IV est donc l'atteinte des cortex entorhinal, transentorhinal, et de l'hippocampe sans réelle implication des aires isocorticales. Ils sont par conséquent, appelés "stades limbiques".

Au stade V, l'isocortex est sévèrement atteint, notamment les aires associatives. Au stade VI, l'atteinte de l'isocortex est dramatique, et les noyaux sous-corticaux sont également très touchés. Les stades V et VI, appelés "stades isocorticaux" reflètent donc l'atteinte globale des aires isocorticales (Braak et Braak, 1991).

## II- 2- 3- Conclusion:

Il est bien établi que la DNF est responsable de la démence, et non les dépôts amyloïdes (Wilcock et Esiri, 1982; Arriagada *et al.*, 1992). Dans les cas où la DNF est sévère, de nombreux dépôts amyloïdes sont alors retrouvés. Par contre, dans les cas où les dépôts amyloïdes sont très nombreux, on ne trouve pas forcément un grand nombre de neurones en dégénérescence. Mais, quelles sont les relations entre les dépôts amyloïdes et la DNF? En 1988, Mann suggérait que dans le cerveau de personnes atteintes du syndrome de Down (trisomie 21), des changements neuropathologiques semblables à ceux observés dans la MA, se produisaient. Les dépôts amyloïdes apparaissent vers 20 ans et la DNF vers 35 ans (Mann *et al.*, 1989a; Mann, 1989b). Ces auteurs suggéraient donc que le syndrome de Down pouvait servir de modèle de la MA, pour des études sur la formation et l'évolution des lésions pathologiques. Pour certains auteurs, la substance amyloïde apparaît donc avant la DNF (Hardy et Higgins, 1992; Selkoe, 1992). Pour d'autres, la pathologie neuronale précède les dépôts amyloïdes (Masliah *et al.*, 1990; Terry *et al.*, 1991; Perry *et al.*, 1992).

### **II- 3- La réaction gliale:**

Une gliose astrocytaire a été décrite dans la MA. Un nombre plus important d'astrocytes a été observé autour des dépôts amyloïdes (Frederickson, 1992). La réaction gliale se traduirait aussi par la présence de cellules microgliales autour des lésions histologiques, suggérant qu'elles jouent un rôle de phagocytose des constituants des lésions (Wisniewski *et al.*, 1991). Une augmentation de la concentration de la protéine gliofibrillaire acide ou GFAP, marqueur spécifique des astrocytes, a été également retrouvée (Delacourte et Buée, 1989; Frederickson, 1992). Il semblerait que la réaction gliale contribuerait à la fois au développement et à la progression de la pathologie rencontrée dans la MA (Frederickson, 1992).

### **II- 4- Anomalies vasculaires:**

Une altération vasculaire a été suggérée pour expliquer la formation des lésions neuropathologiques de la MA (Scheibel *et al.*, 1986). Ainsi, dans le vieillissement et la MA, une augmentation du diamètre des capillaires et une diminution de la densité vasculaire ont été décrites (Bell and Ball, 1981; Buée *et al.*, 1994). Pourtant, les résultats comparatifs entre patients atteints de la MA et témoins âgés diffèrent selon les auteurs. Certains n'observent pas de différence significative entre les deux populations quant au diamètre des capillaires et la densité vasculaire, même au niveau des régions présentant un grand nombre de lésions neuropathologiques de type Alzheimer (Bell and Ball, 1981). D'autres auteurs voient non seulement une diminution de la densité vasculaire mais aussi la présence d'anomalies vasculaires particulières (vaisseaux en boucle et/ou tortueux)

(Scheibel *et al.*, 1986; Buée *et al.*, 1994). Néanmoins, les données actuelles ne permettent de conclure sur le rôle de la vascularisation dans la MA (Buée *et al.*, 1994).

### III- DESCRIPTION BIOCHIMIQUE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER:

#### III- 1- Les dépôts amyloïdes:

##### III- 1- 1- La protéine amyloïde ou peptide A $\beta$ et son précurseur:

Le constituant majeur des dépôts amyloïdes est la protéine amyloïde ou peptide A $\beta$ . Ce dernier est insoluble et constitué de 39 à 43 acides aminés. Il dérive d'un précurseur beaucoup plus grand, appelé précurseur de la protéine amyloïde ou  $\beta$ PP ( *$\beta$  Precursor Protein* pour le terme anglais) dont le gène se situe sur le chromosome 21, dans la région 21q21 (Goldgaber *et al.*, 1987; Kang *et al.*, 1987; Robakis *et al.*, 1987a,b).

##### *III- 1- 1- 1- Le précurseur de la protéine amyloïde:*

###### \*Structure du $\beta$ PP:

Il existe plusieurs précurseurs du peptide A $\beta$ ,  $\beta$ PP<sub>695</sub>, 714, 751 et 770, dont la description a été faite à partir de leurs ARN messagers (**Figure 4**). Ces différents variants se différencient entre-eux par la présence ou l'absence de certains exons. Le premier précurseur découvert fut le  $\beta$ PP<sub>695</sub>. Il est codé par 16 exons et la protéine résultante a la structure d'un récepteur membranaire (Kang *et al.*, 1987; Lemaire *et al.*, 1989). Les



La distribution tissulaire des trois principales isoformes de  $\beta$ PP ( $\beta$ PP695,  $\beta$ PP751 et  $\beta$ PP770) a été réalisée. La forme majoritaire rencontrée dans le cerveau est l'isoforme  $\beta$ PP695; elle représente environ 67% des ARN messagers trouvés dans le cerveau (Tanaka *et al.*, 1991). Elle n'existe qu'en très faible proportion dans les tissus non-neuronaux. Les deux autres formes,  $\beta$ PP751 et  $\beta$ PP770, sont respectivement les formes prépondérantes de la rate et du cœur.

#### \*Rôles du $\beta$ PP:

Le  $\beta$ PP est une protéine ubiquitaire. Aucun rôle physiologique direct n'a pu lui être attribué dans le système nerveux central. Le  $\beta$ PP peut avoir un rôle trophique, il joue un rôle dans la régulation de la croissance cellulaire (Schubert *et al.*, 1989a). Comme le  $\beta$ PP interagit fortement avec les constituants de la matrice extracellulaire, on lui suggère un rôle dans l'adhésion cellulaire (Schubert *et al.*, 1989b). Au niveau périphérique, il semblerait avoir un rôle dans la cicatrisation, la coagulation des plaquettes, l'activation des lymphocytes et l'induction de la réponse immunitaire (Oltersdorf *et al.*, 1989; Van Nostrand *et al.*, 1989; Godfroid et Octave, 1990; Sinha *et al.*, 1991).

#### \*Métabolisme du $\beta$ PP:

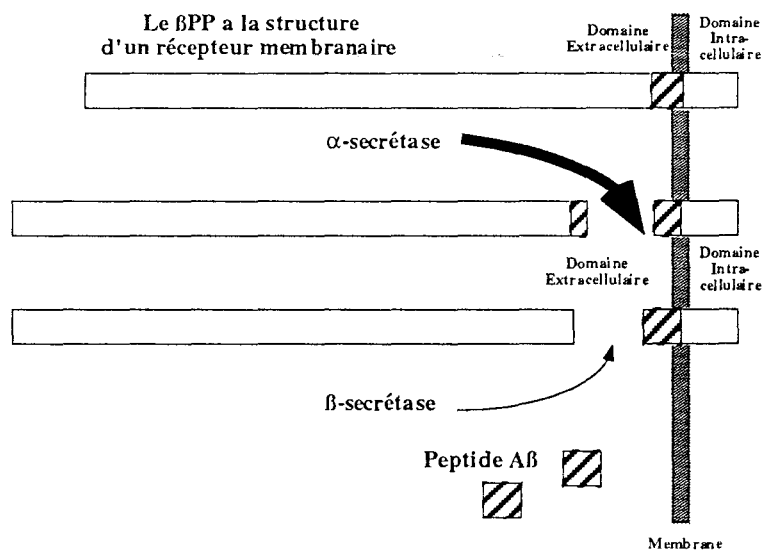
Le  $\beta$ PP suit le chemin classique de la synthèse protéique jusqu'aux vésicules de Golgi, et est ensuite dirigé vers la membrane plasmique. Il peut être clivé à l'intérieur du peptide A $\beta$  par une activité enzymatique appelée  $\alpha$ -secrétase (Sisodia *et al.*, 1990; Anderson *et al.*, 1991) (**Figure 5**). C'est la voie majeure du métabolisme du  $\beta$ PP, ne conduisant pas à la formation du peptide A $\beta$  (voie non amyloïdogénique).

Il existe une voie métabolique mineure où le  $\beta$ PP n'est pas clivé à l'intérieur du peptide A $\beta$ , mais en amont de celui-ci par une activité enzymatique appelée  $\beta$ -secrétase (**Figure 5**). Cette voie conduit à la formation du peptide A $\beta$ , il s'agit de la voie amyloïdogénique (Golde *et al.*, 1992; Estus *et al.*, 1992). La présence de fragments



amyloïdogéniques carboxy-terminaux, et du peptide Aβ a été mise en évidence dans le milieu extracellulaire (pour revues Selkoe, 1992; 1994). Si le peptide Aβ se trouve dans le milieu, il est probable qu'il interagisse avec d'autres constituants, en particulier ceux de la matrice extracellulaire.

FIGURE 5



### III- 1- 1- 2- Le peptide Aβ:

#### \*Structure du peptide Aβ:

Le peptide Aβ est codé en partie par les exons 16 et 17 (position des exons pour l'isoforme 770), suggérant qu'il ne résulte pas d'un épissage aberrant (Lemaire *et al.*, 1989) (**Figure 4**). Il est situé à la fois dans le domaine extracellulaire (Asp<sup>672</sup> à Lys<sup>699</sup>) et dans la membrane (de Gly<sup>700</sup> à Val<sup>710</sup> ou Thr<sup>714</sup>) (**Figure 5**). De récentes études

immunohistochimiques, utilisant des anticorps spécifiques ont montré que la forme contenant 42 acides aminés est préférentiellement retrouvée dans les dépôts amyloïdes compacts et diffus (Mak *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1994). Ces résultats suggèrent que la longueur du peptide A $\beta$  est un facteur important pour son agrégation en substance amyloïde (Burdick *et al.*, 1992).

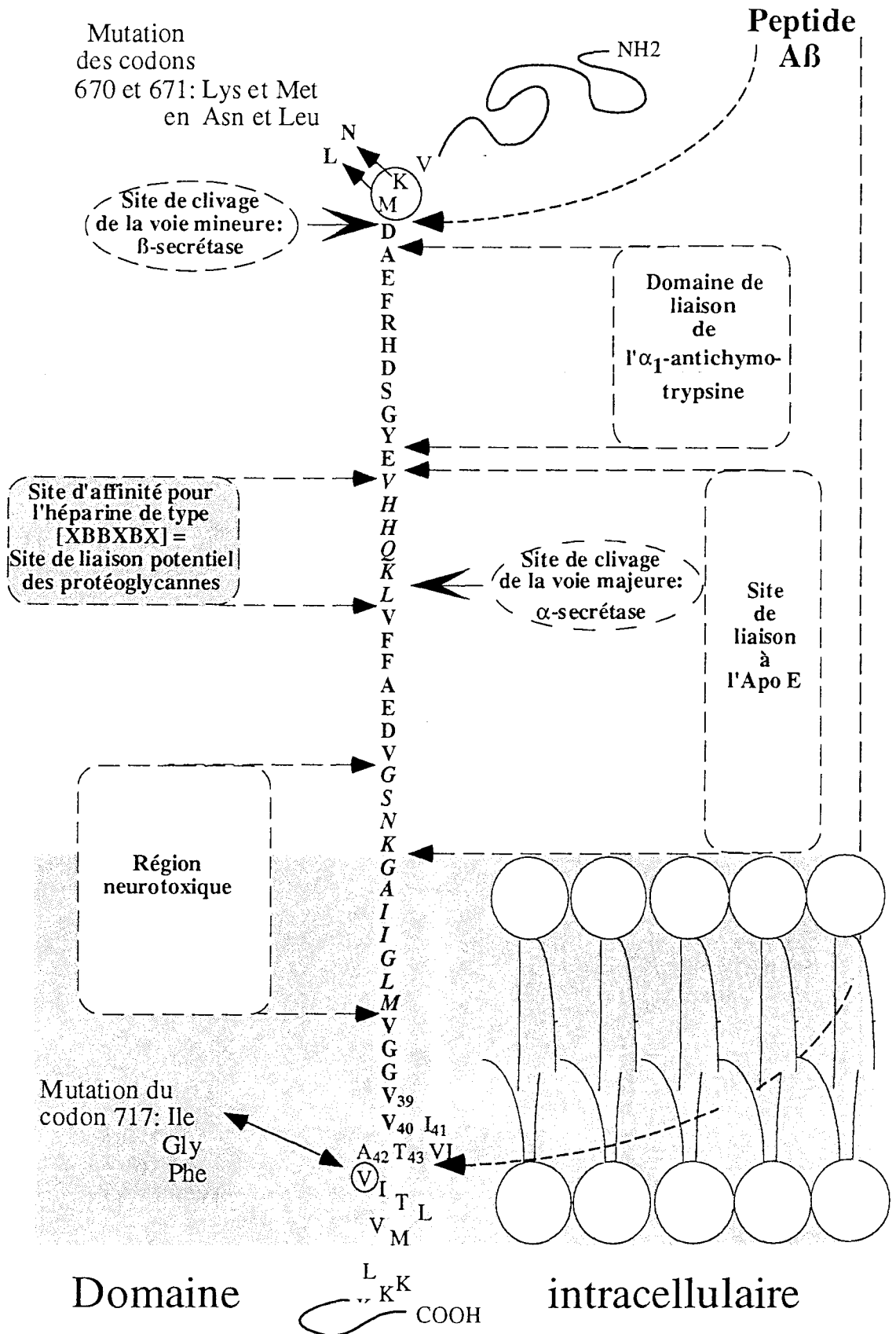
\*Propriétés biologiques:

En 1989, Yankner *et al.* ont montré la neurotoxicité d'un fragment du précurseur amyloïde. Par la suite, la région 25-35 du peptide A $\beta$  s'est révélée neurotoxique (Figure 6) pour des concentrations élevées de l'ordre de 10-100 nM, alors qu'à des concentrations plus faibles (10-100 pM), cette région aurait un rôle neurotrophique (Yankner *et al.*, 1990). La neurotoxicité du peptide A $\beta$  serait liée à sa conformation; les peptides A $\beta$  synthétiques possèdent une structure soit en pelote statistique, soit en hélice  $\alpha$  dans la partie amino-terminale. Seuls ceux qui posséderaient une hélice  $\alpha$  seraient neurotoxiques (Yankner et Busciglio, 1992). Dans la MA, le peptide A $\beta$  est agrégé sous la forme de dépôts amyloïdes. Il semblerait que la neurotoxicité du peptide A $\beta$  soit également liée à son état d'agrégation (Frautschy *et al.*, 1991; 1992). Néanmoins, les résultats sur la neurotoxicité du peptide A $\beta$  divergent, car un certain nombre de paramètres sont à prendre en compte: i) la concentration du peptide; ii) l'état d'agrégation du peptide; iii) le solvant utilisé pour la solubilisation du peptide; iiiii) la méthode utilisée pour tester la neurotoxicité du peptide.

D'autres auteurs ont également montré que la neurotoxicité du peptide A $\beta$  était médiée par l'ion Ca<sup>2+</sup>. Le peptide A $\beta$  augmenterait en particulier la vulnérabilité des neurones à l'excitabilité (Koh *et al.*, 1990; Mattson *et al.*, 1992).

Le peptide A $\beta$  possède des sites de fixation pour certaines molécules, comme l' $\alpha_1$ -antichymotrypsine, l'apolipoprotéine E, les protéoglycannes (Potter *et al.*, 1991; Strittmatter *et al.*, 1993a,b; Buée *et al.*, 1993a,b).

FIGURE 6



### III- 1- 2- Les co-facteurs de l'amyloïdogénèse:

Plusieurs molécules ont été retrouvées dans les dépôts amyloïdes, mais pour autant toutes ne sont pas des co-facteurs. La notion de co-facteurs est très floue. Pour être un réel co-facteur, il semblerait que la molécule doive répondre à plusieurs critères: être retrouvée dans les dépôts amyloïdes, avoir une forte affinité pour le peptide A $\beta$ , ou pour le BPP (par exemple, pour bloquer le site de clivage de l' $\alpha$ -secrétase), agréger le peptide A $\beta$  *in vitro*, et être associée à un ou des gènes candidats. Tous ces critères réunis en théorie montrent qu'à l'heure actuelle, il est difficile de trouver un véritable co-facteur de l'amyloïdogénèse.

#### \* $\alpha_1$ antichymotrypsine:

L' $\alpha_1$  antichymotrypsine, antiprotéase de type Serpine, est présente dans les dépôts amyloïdes (Abraham *et al.*, 1988). Elle est capable de former *in vitro* un complexe stable avec le peptide A $\beta$ , au niveau de la séquence Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr (Potter *et al.*, 1991) (**Figure 6**). Récemment, Ma *et al.* (1994) ont montré que le peptide A $\beta$  pouvait s'agréger sous la forme de structure filamenteuse en présence d' $\alpha_1$ -antichymotrypsine. Cet inhibiteur de protéases provoque une augmentation de l'agrégation de 10 à 20 fois supérieure à celle du peptide A $\beta$  seul. Le gène de l' $\alpha_1$  antichymotrypsine est situé sur le chromosome 14, dans une région proche de celle où il existe une association avec la MA.

#### \* Apolipoprotéine E:

L'apolipoprotéine E a d'abord été retrouvée dans les dépôts amyloïdes par Namba *et al.*, en 1991. Le gène de l'apolipoprotéine E est situé sur le chromosome 19 (région 19q13.2). L'apolipoprotéine E est une protéine polymorphique. Ce polymorphisme

correspond à des mutations dans la séquence nucléotidique du gène. Trois isomorphes ont été décrits E2, E3 et E4 correspondant respectivement aux allèles  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  et  $\epsilon 4$  (Zannis *et al.*, 1981). En 1993, Corder *et al.* démontraient que l'allèle 4 de l'apolipoprotéine E sur le chromosome 19 est un gène qui favorise l'apparition de la MA dans les familles à début tardif. D'autres études sont venues confirmer cette association entre l'allèle  $\epsilon 4$  et les formes tardives de la MA, qu'elles soient familiales ou sporadiques (Strittmatter *et al.*, 1993b; Chartier-Harlin *et al.*, 1994). Enfin, ces résultats furent étendues à certaines formes précoces (âge d'apparition de la maladie avant 65 ans) (Pérez-Tur *et al.*, 1995). Dès lors, l'allèle  $\epsilon 4$  fut considéré comme un facteur de risque de la MA. A l'inverse de l'allèle  $\epsilon 4$ , l'allèle  $\epsilon 2$  aurait un rôle protecteur vis à vis de la maladie (Chartier-Harlin *et al.*, 1994). Le mécanisme d'action de l'apolipoprotéine E reste cependant hypothétique.

Des études d'affinité *in vitro*, montrèrent que le variant E4 de l'apolipoprotéine E a une affinité plus importante pour le peptide A $\beta$  synthétique que le variant E3. Les acides aminés 12 à 28 du peptide A $\beta$  sont nécessaires pour la liaison du peptide A $\beta$  à l'isoforme E4 de l'apolipoprotéine E (Strittmatter *et al.*, 1993a,b) (**Figure 6**). Néanmoins, ces résultats ne font pas l'unanimité (Ladu *et al.*, 1994; Evans *et al.*, 1995).

#### \* Protéoglycannes:

Les protéoglycannes sont retrouvés dans toutes les amyloïdoses (Kisilevsky *et al.*, 1992). Dans la MA, les plaques séniles contiennent des héparane sulfate protéoglycannes (Snow *et al.*, 1988; Buée *et al.*, 1994). Ces derniers sont également présents les dépôts pré-amyloïdes, supposant que l'accumulation des protéoglycannes est un phénomène précoce (Snow *et al.*, 1990). Il existe une forte affinité entre les protéoglycannes et le  $\beta$ PP (Narindrasorasak *et al.*, 1991; Buée *et al.*, 1993a), ainsi qu'une interaction spécifique entre le peptide A $\beta$  et les protéoglycannes (Buée *et al.*, 1993a, b). Cette interaction se fait à la fois par le biais de la partie glycosaminoglycannique et celle de l'axe protéique (Buée *et al.*, 1993a, b). Des injections de peptide A $\beta$  et de protéoglycannes dans l'hippocampe

de rat conduisent au bout d'une semaine à la formation de structures amyloïdes au point d'injection. Elles sont visualisées à l'aide d'une sonde immunologique polyclonale contre le peptide A $\beta$  (1-40), et par la thioflavine S (Snow et Malouf, 1993). Il semble donc que les protéoglycannes jouent un rôle important dans le processus d'amyloïdogénèse.

### III- 2- La dégénérescence neurofibrillaire:

Les neurones qui dégèrent sont caractérisés par une accumulation au sein de leur cytoplasme, de filaments appelés paires de filaments en hélice ou PHF (pour le terme anglais, *paired helical filaments*) (Kidd, 1963). Les composants antigéniques majeurs des PHF sont des protéines du cytosquelette associées aux microtubules, les protéines tau (Delacourte et Défossez, 1986; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986a; Kosik *et al.*, 1986; Nukina et Ihara, 1986; Wood *et al.*, 1986). D'autres constituants sont également retrouvés comme l'ubiquitine, MAP2 et les neurofilaments (Kosik *et al.*, 1984; Nukina *et al.*, 1987; Bancher *et al.*, 1991).

#### III- 2- 1- Les neurofilaments:

Les neurofilaments (NF) sont représentés par trois isoformes appelées NF-H (*High*), NF-M (*Medium*) et NF-L (*Low*), de masse moléculaire respective 210, 160 et 70 kDa. Les formes H et M sont caractérisées par la présence de séquences (X-Lys-Ser-Pro-X) phosphorylées et répétées plusieurs fois (Lee *et al.*, 1988). Des anticorps dirigés contre les régions contenant ces sites multiples de phosphorylation marquent les neurones en dégénérescence, suggérant que les neurofilaments sont associés aux PHF (Haugh *et al.*,

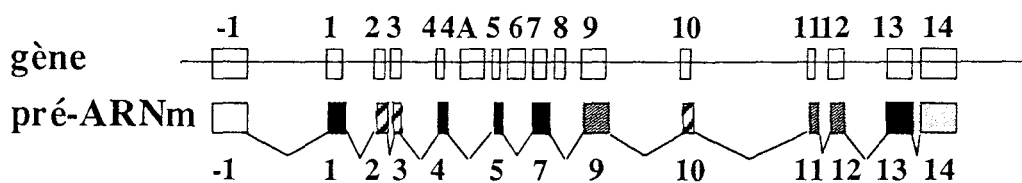
1986; Miller *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 1988). En fait, ce marquage peut également s'expliquer par l'existence de réactions croisées entre protéines tau et anticorps anti-neurofilaments, notamment au niveau des séquences KSP (Ksiezak-Reding *et al.*, 1987; Nukina *et al.*, 1987). Plus récemment, Lichtenberg-Kraag *et al.* en 1992, montraient que certains anticorps monoclonaux anti-neurofilaments (SMI 31, SMI 310, SMI 33 et SMI 34; Sternberger *et al.*, 1985) pouvaient se lier aux protéines tau, au niveau de sites dépendants de la phosphorylation. Finalement, Vickers *et al.* en 1994 ont suggéré que la présence des neurofilaments pouvait être corrélée à une certaine vulnérabilité neuronale à développer une DNF (notamment au niveau du CA1 de l'hippocampe).

### III- 2- 2- Structure des protéines tau:

#### III- 2- 2- 1- Aspect génétique:

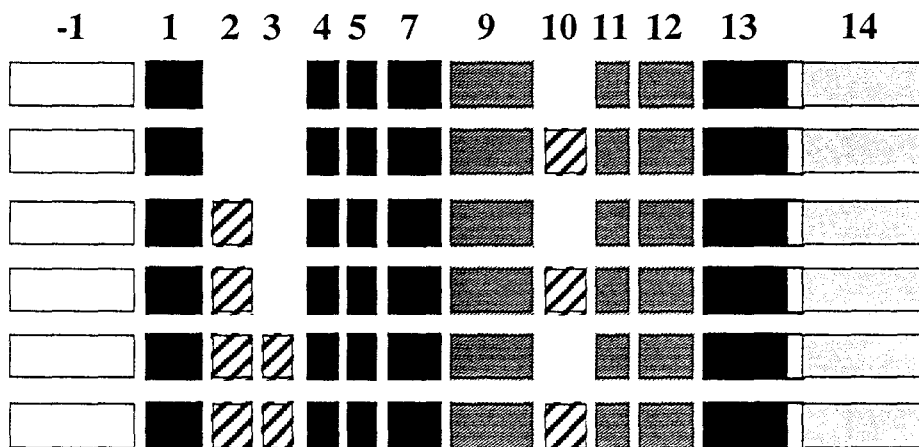
Chez l'homme, le gène des protéines tau se situe sur le bras long du chromosome 17, à la position 17q21 (Neve *et al.*, 1986), et s'étend sur 100kpb (Andreadis *et al.*, 1992). L'ADN est transcrit en un ARN immature appelé transcrit primaire qui comprend 16 exons, dont trois ne sont jamais transcrits dans le tissu cérébral humain (exons 4A, 6 et 8) (Figure 7).

FIGURE 7



Les exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 et 13 sont exprimés de manière constitutive. L'exon 14 est retrouvé dans les ARN messagers, mais n'est généralement pas traduit en protéine. Les exons 2, 3 et 10 sont épissés de manière alternative et sont spécifiques du tissu cérébral adulte (Andreadis *et al.*, 1992) (Figure 7). L'épissage alternatif de ces 3 exons produit 6 combinaisons possibles ( $2^{-}3^{-}10^{-}$ ;  $2^{+}3^{-}10^{-}$ ;  $2^{+}3^{+}10^{-}$ ;  $2^{-}3^{-}10^{+}$ ;  $2^{+}3^{-}10^{+}$ ;  $2^{+}3^{+}10^{+}$ ) (Goedert *et al.*, 1989 a,b; Kosik *et al.*, 1989). Le transcrit primaire donne alors naissance à 6 ARN messagers (Drubin et Kirschner, 1986; Drubin *et al.*, 1988; Himmler, 1989a) (Figure 8).

FIGURE 8



Enfin, ces ARN messagers sont traduits en autant de protéines différentes. Bien que l'exon -1 soit transcrit, il n'est jamais traduit. La traduction commence à l'exon 1 (Andreadis *et al.*, 1992).

Comme chez l'homme, le gène n'est présent qu'en une seule copie chez la souris, le rat et le bœuf (Drubin *et al.*, 1984; Himmler, 1989a). En 1988, Gloria Lee *et al.* montraient l'existence chez la souris, de deux formes de tau, une forme longue résultant de l'épissage de l'intron entre les exons 13 et 14 et une forme courte résultant de la



réretention de ce même intron. Chez le bœuf, il existe deux possibilités d'épissage donnant alors deux extrémités carboxy-terminales différentes (Himmler, 1989a). Bien qu'il existe une assez bonne conservation de la séquence des protéines tau entre les différentes espèces, aucune homologie avec la forme longue de la souris n'avait été retrouvée chez le rat et l'homme. Ce n'est qu'en 1994, que Sawa *et al.* trouvèrent ces deux mécanismes d'épissage.

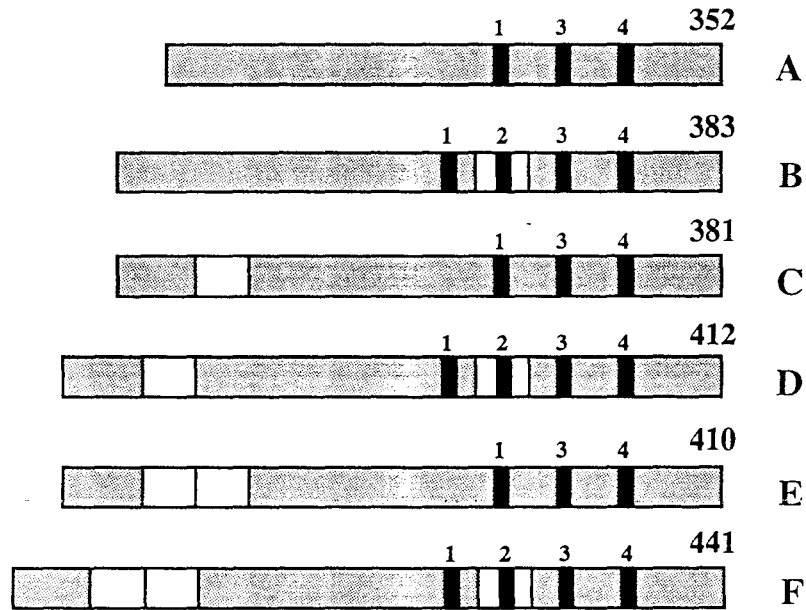
### *III- 2- 2- 2- Aspect biochimique:*

#### **III- 2- 2- 2- 1- Isoformes des protéines tau et leur expression:**

*Le système nerveux central:* Six isoformes des protéines tau sont retrouvées dans le cerveau adulte humain. La longueur de leurs séquences varie de 352 à 441 acides aminés. Ces 6 isoformes se différencient entre-elles par la présence ou l'absence de 29 ou 58 acides aminés dans la partie amino-terminale, et la présence de trois ou quatre séquences répétitives de 31 ou 32 acides aminés dans la partie carboxy-terminale (Goedert *et al.*, 1989a) (**Figure 9**). Sur électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, les protéines tau adultes donnent 6 bandes dont les masses moléculaires sont comprises entre 45 et 62 kDa.

Partie amino-terminale: Certaines isoformes contiennent 29 ou 58 acides aminés (**Figure 9 C, D, E, et F**). Ces séquences sont riches en proline et en acides aminés chargés. Elle représente le domaine de projection des protéines tau, c'est à dire qu'elle détermine l'espace entre des microtubules adjacents, espace qui est de l'ordre de 20 nm (pour revue, Goedert *et al.*, 1991).

FIGURE 9



Partie carboxy-terminale: La particularité de chaque séquence répétitive carboxy-terminale est de posséder un motif Pro-Gly-Gly-Gly. Ces régions répétitives (numérotées de 1 à 4) constituent le domaine de liaison aux microtubules (Goedert *et al.*, 1988; 1989b; Himmler *et al.*, 1989; Kosik *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1989; Andreadis *et al.*, 1992). Douze résidus sont identiques dans les quatre séquences, et six résidus sont retrouvés dans trois des quatre (Séquences ci-dessous). La séquence supplémentaire (n°2) est insérée après la première séquence répétitive (**Figure 9 B, D, et F**).

*Homologie des séquences en acides aminés (lettres en gras et soulignées) au-niveau des quatre régions répétitives:*

D L K N V K S K I G S T E N L K H Q P G G G K V Q I I N K K L  
D L S N V Q S K C G S K D N I K H V P G G G S V Q I V Y K P V  
D L S K V T S K C G S L G N I H H K P G G G Q V E V K S E K L  
D F K D R V Q S K I G S L D N I T H V P G G G N K K I E T H K L

L'expression des protéines tau est régulée au cours du développement. Ainsi, une seule isoforme est présente à la naissance et ne comporte pas d'insert, et de séquence répétitive supplémentaire: il s'agit de l'isoforme fœtale (Goedert *et al.*, 1989b; Kosik *et al.*, 1989) (**Figure 9A**). Après la naissance, les autres isoformes vont apparaître au cours du développement.

Il faut noter que certaines isoformes des protéines tau sont dites majeures (isoformes avec 3 ou 4 régions répétitives et sans insert, et isoformes avec 3 ou 4 régions répétitives avec un insert dans la partie amino-terminale (**Figure 9A, B, C, et D**). Par contre, les isoformes avec 3 ou 4 régions répétitives et 2 inserts dans la partie amino-terminale sont présentes mais en plus faible quantité (**Figure 9E et F**) (Goedert et Jakes, 1990; Hasegawa *et al.*, 1992).

La localisation des protéines tau humaines est principalement axonale, mais des formes phosphorylées peuvent être rencontrées au niveau du domaine somato-dendritique (Papasozomenos et Binder, 1987; Delacourte *et al.*, 1990).

Chez le rat, les protéines tau adultes représentent une famille de 4 à 6 polypeptides de masse moléculaire apparente comprise entre 52 et 68 kDa, alors que l'isoforme fœtale a une masse moléculaire apparente de 48 kDa sur électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (Takemura *et al.*, 1991). Il existe également une régulation de l'expression des protéines tau au cours du développement, pour passer d'un stade fœtal à un stade adulte (Drubin *et al.*, 1984).

*Le système nerveux périphérique:* Une autre isoforme de longueur supérieure est spécifiquement exprimée dans le système nerveux périphérique, surtout au niveau de la moelle épinière, des ganglions rachidiens (Goedert *et al.*, 1994a). Elle se distingue des

isoformes du système nerveux central par l'insertion d'une séquence dans la partie amino-terminale.

Chez le rat, ce variant contient 686 acides aminés (insert de 254 acides aminés) et chez la souris, il en contient 733 (insert de 237 acides aminés) (Couchie *et al.*, 1992; Goedert *et al.*, 1992a). Cette séquence est en fait codée par les exons 4A et/ou 6 (Couchie *et al.*, 1992; 1993).

Chez l'homme, une séquence de 253 acides aminés est retrouvée dans cette tau périphérique (Andreadis *et al.*, 1992).

### III- 2- 2- 2- 2- Modifications post-traductionnelles des protéines tau:

La phosphorylation est la principale modification post-traductionnelle des protéines tau (Cleveland *et al.*, 1977a, b). Elle a une grande importance, puisqu'elle régulerait la polymérisation des microtubules. En effet, les protéines tau phosphorylées seraient beaucoup moins affines pour la tubuline que les protéines non phosphorylées (Lindwall et Cole, 1984a; Drubin et Kirschner, 1986). Par analyse bidimensionnelle, environ vingt protéines sont détectées avec des points isoélectriques compris entre 6,5 et 8,5 (Cleveland *et al.*, 1977a, b).

Il existe de nombreux sites de phosphorylation sur les protéines tau, et il apparaît que l'action des phosphatases est très rapide (Garver *et al.*, 1994; Matsuo *et al.*, 1994). La démonstration de nombreux sites phosphorylés sur les protéines tau normales altère donc l'hypothèse selon laquelle les protéines tau réguleraient la polymérisation des microtubules en fonction de leur état de phosphorylation. Cependant, la caractérisation complète des sites phosphorylés sur les protéines tau normales n'a pas encore été réalisée. Beaucoup de questions restent donc en suspens.

Différentes kinases peuvent phosphoryler les protéines tau *in vitro*: la protéine kinase calcium-calmoduline dépendante (Steiner *et al.*, 1990), la protéine kinase C

(Correas *et al.*, 1992), la protéine kinase activée par des facteurs mitogènes ou MAP kinase (Drewes *et al.*, 1992; Goedert *et al.*, 1992b; Gustke *et al.*, 1992), la glycogène synthase protéine kinase-3 ou GSK-3 (Hanger *et al.*, 1992; Mandelkow *et al.*, 1992), et des protéines kinases dirigées contre des résidus proline ou PDPK (du terme anglais: *Proline Directed Protein Kinase*) (Vulliet *et al.*, 1992). De même, des protéines phosphatases peuvent déphosphoryler les protéines tau *in vitro*, telles que les phosphatases 1, 2A, et 2B (Yamamoto *et al.*, 1990; Goedert *et al.*, 1992b; Gong *et al.*, 1994a, b).

Il existe des modifications autres que la phosphorylation, comme la déamidation (Montejo de Garcini *et al.*, 1986), la  $\epsilon$ -N-méthylation des résidus de lysine (Wischik *et al.*, 1988b). Les protéines tau commencent toutes par un résidu alanine acétylé et non par une méthionine (Hasegawa *et al.*, 1992).

Récemment, une équipe américaine montrait l'existence d'une autre modification post-traductionnelle, une O-glycosylation, c'est à dire le branchement d'un résidu N-acétyl glucosamine sur une sérine et/ou sur une thréonine (Haltiwanger *et al.*, 1992; Arnold *et al.*, 1994). Cette glycosylation est également retrouvée sur d'autres molécules comme les neurofilaments (Dong *et al.*, 1993), et les sites de O-glycosylation ne sont pas discernables des sites de phosphorylation (Arnold *et al.*, 1994).

### III- 2- 3- Rôle des protéines tau:

Depuis leur découverte, les protéines tau sont connues pour être des promoteurs de la polymérisation de la tubuline (Weingarten *et al.*, 1975; Cleveland *et al.*, 1977a,b). Elles font donc partie des protéines associées aux microtubules ou MAPs, au même titre que MAP1, MAP2 et MAP4. Ces protéines se lient à la tubuline grâce à des régions dites

répétitives dans leur partie carboxy-terminale. Une forte homologie de séquence au niveau de ces régions répétitives est observée entre ces protéines (Lewis *et al.*, 1988).

Les protéines tau et MAP2 possèdent un domaine de liaison aux microtubules, et un domaine de projection dans leur partie amino-terminale. C'est ce domaine de projection qui permettra des pontages entre microtubules. Cet espace est différent selon s'il s'agit de tau ou de MAP2, 20 nm pour tau (au niveau de l'axone) et 100 nm pour MAP2 (au niveau des dendrites) (pour revues, Goedert *et al.*, 1991; Doering, 1993).

En injectant des protéines tau dans des fibroblastes, Drubin montra que les microtubules possédaient une résistance accrue aux agents dépolymérisants (Drubin *et al.*, 1986). Les protéines tau ont donc un rôle dans la stabilisation des microtubules, rôle non négligeable dans des phénomènes qui requièrent une certaine stabilité, comme le transport axonal (Drubin *et al.*, 1986; Goedert *et al.*, 1991). En fait, la liaison des protéines tau aux microtubules diminue l'instabilité des microtubules, conduisant à un cytosquelette plus stable. Les isoformes comprenant 4 régions répétitives se lient plus facilement aux microtubules que les isoformes n'en possédant que 3 (Goedert et Jakes, 1990; Butner et Kirschner, 1991). Les formes fœtales ne comportant que 3 régions répétitives se lient donc moins bien aux microtubules, montrant que pendant le développement, le cytosquelette ne peut pas être une structure stable, mais au contraire une structure dynamique. C'est la première séquence répétitive des protéines tau qui a la meilleure affinité pour la tubuline (Butner et Kirschner, 1991).

Pour montrer que les protéines tau sont impliquées dans la formation de l'axone, une équipe américaine utilisa sur des cultures de neurones cérébelleux non différenciés, des sondes oligonucléotidiques antisens de l'ARN messager des protéines tau afin de bloquer leur synthèse. En l'absence d'oligonucléotides antisens, les cellules émettent à partir d'un neurite un prolongement très long de type axonal. Suite à cette différenciation axonale, les autres neurites se différencient en dendrites. Lorsque les cellules non différenciées sont en contact avec les oligonucléotides antisens des tau, elles sont incapables d'émettre un long

prolongement de type axonal. Par contre, dans des cellules où l'axone est déjà différencié, si des oligonucléotides antisens sont ajoutés, l'axone se rétracte alors et les autres neurites se différencient en dendrites (Caceres et Kosik, 1990; Caceres *et al.*, 1991). Des expériences complémentaires à celles-ci ont également montré que les protéines tau interviennent dans le déterminisme axonal et le maintien de la stabilité des microtubules.

### III- 2- 4- Protéines tau et maladie d'Alzheimer:

Dans la MA, les protéines tau sont les constituants antigéniques majeurs des PHF dans les neurones en dégénérescence (Brion *et al.*, 1985; Delacourte et Défossez, 1986; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986a; Kosik *et al.*, 1986; Nukina et Ihara, 1986; Wood *et al.*, 1986). Ces protéines incorporées dans les PHF sont modifiées, nous les nommerons donc "tau-PHF", pour permettre de les distinguer des protéines tau dites "normales". Dès la découverte de l'implication des protéines tau dans la MA, les recherches se sont essentiellement axées sur les modifications qui pouvaient entraîner leur agrégation au sein des neurones. Pendant une période relativement longue (1986 à fin 1994), une phosphorylation anormale de certains sites des tau-PHF fut la principale explication de leur agrégation sous la forme de PHF. En octobre 94, une équipe américaine révéla que cette phosphorylation n'aurait rien d'anormale, puisque les sites dits anormalement phosphorylés sont retrouvés dans des biopsies de tissu cérébral normal adulte si le délai post-opératoire est très court.

Aussi, il nous semble nécessaire de situer les données de la littérature, au moment où nous débutons notre thèse et tout au long de celle-ci, pour expliquer les raisons qui nous ont poussées dans cette voie de recherche.

### III- 2- 4- 1- Hypothèse de la phosphorylation anormale:

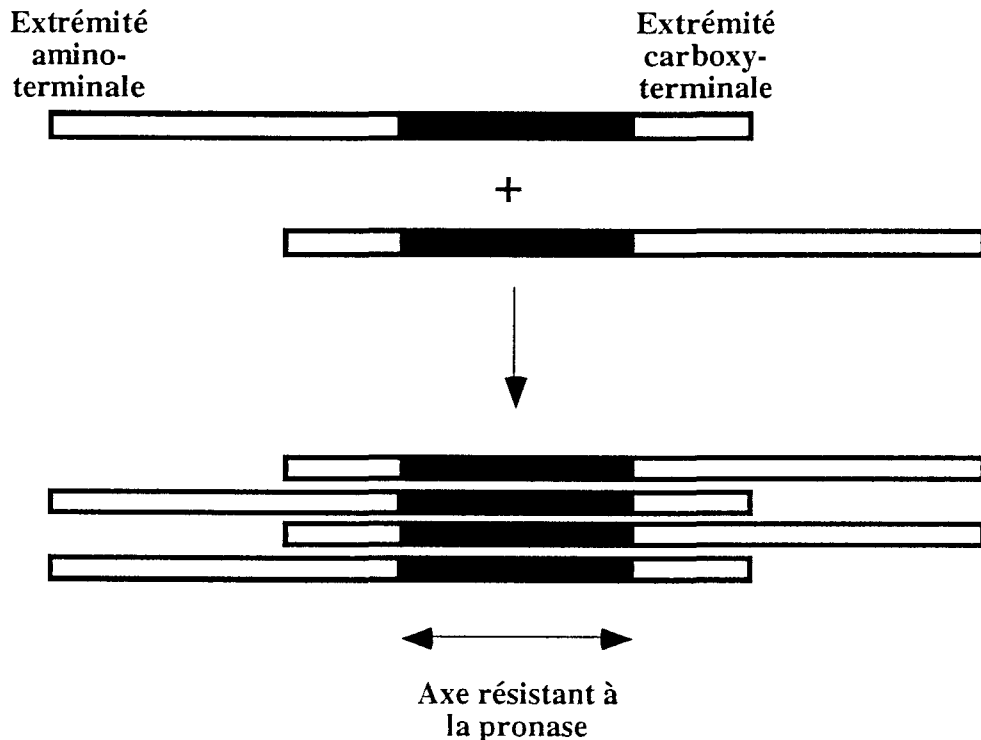
Les protéines tau de cerveau de patients atteints de la MA sont comparées à celles de sujets témoins. Chez les patients atteints de la MA, une fraction des protéines tau est particulièrement insoluble. Elle correspond aux protéines tau incorporées dans les PHF. De plus, la migration électrophorétique de ces tau-PHF sur gel de polyacrylamide en présence de SDS est ralentie, et leur point isoélectrique est plus acide (Flament *et al.*, 1989; Ksiezak-Reding *et al.*, 1992). Plusieurs équipes ont montré qu'une phosphorylation de ces protéines tau était responsable de ces modifications (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986b; Flament *et al.*, 1989; Delacourte *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1991; Goedert *et al.*, 1992c). Leur caractérisation biochimique par la technique des immunoempreintes, révéla la présence d'un triplet de protéines (tau 55, 64 et 69), également appelé A68 ou tau-PHF uniquement dans les cerveaux de patients atteints de la MA (Flament *et al.*, 1989; Flament et Delacourte, 1989; Delacourte *et al.*, 1990; Greenberg et Davies, 1990; Ksiezak-Reding *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1991; Greenberg *et al.*, 1992). Après déphosphorylation, les tau-PHF s'alignent avec les tau normales, ce qui suggère que les 6 isoformes des protéines tau sont anormalement phosphorylées (Goedert *et al.*, 1992c). Leur point isoélectrique plus acide est compris entre 5,5 et 6,5 (Flament *et al.*, 1989; Ksiezak-Reding *et al.*, 1992).

Par rapport aux protéines tau normales autopsiques, les tau-PHF seraient incapables de se lier aux microtubules (Iqbal et al, 1986), mais elles s'assembleraient pour former les PHF. Cette incapacité de liaison aux microtubules résulterait essentiellement de leur phosphorylation anormale. En effet, après déphosphorylation, les tau-PHF retrouveraient la capacité de se lier aux microtubules (Bramblett *et al.*, 1993). Dans le neurone, la déstabilisation des microtubules et l'accumulation des PHF perturberaient des fonctions vitales, comme le transport axonal. Ainsi, le neurone ne pouvant plus assurer sa survie, dégénérerait.



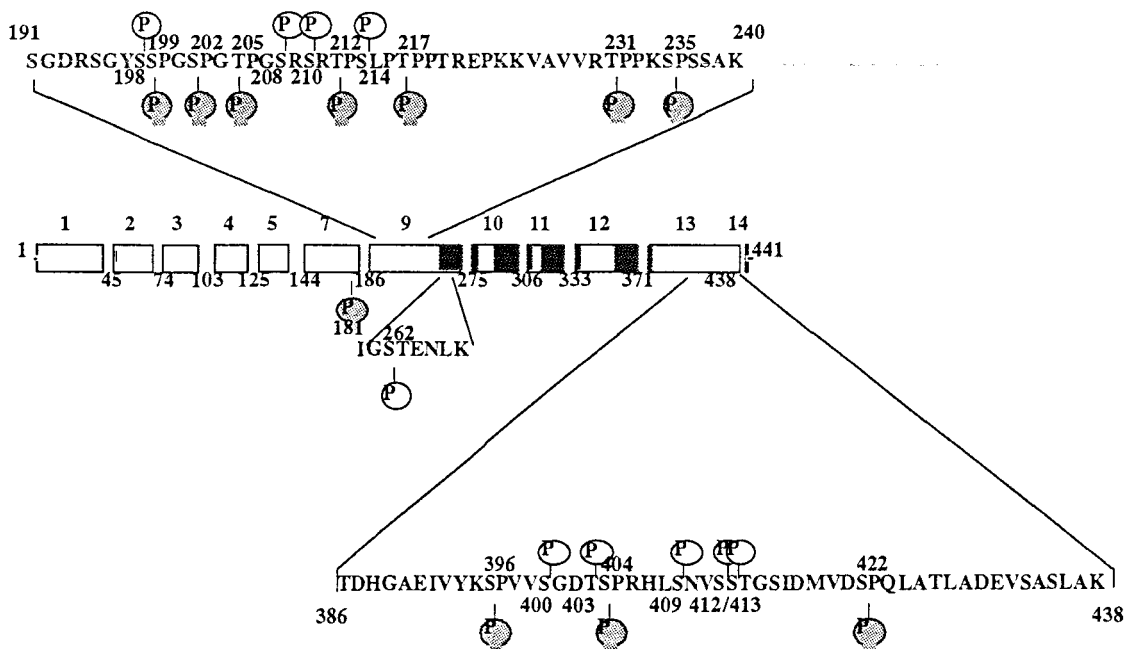
*Agencement des tau-PHF dans les PHF*: Selon certains auteurs, les protéines tau sont agencées de telle manière qu'elles forment un axe protéique résistant. Des digestions protéolytiques des PHF et l'utilisation de sondes immunologiques spécifiques aux différentes régions des tau, ont révélé que les parties amino- et carboxy-terminales se trouvaient à l'extérieur de l'axe des PHF formé par les séquences répétitives (Kondo *et al.*, 1988; Wischik *et al.*, 1988a, b; Ksiezak-Reding et Yen, 1991) (Figure 10). De ce fait, l'extrémité amino-terminale est plus accessible aux protéases que l'extrémité carboxy-terminale étroitement insérée dans l'axe (Jakes *et al.*, 1991).

FIGURE 10



*Recherche des sites de phosphorylation anormale:* Plusieurs sites de phosphorylation sur les tau-PHF furent déterminés *in vivo*, par la spectrométrie de masse (Hasegawa *et al.*, 1992; Morishima-Kawashima *et al.*, 1995) et l'utilisation de sondes immunologiques spécifiques des tau-PHF dépendants de la phosphorylation (Sternberger *et al.*, 1985; Lee *et al.*, 1991; Kanemaru *et al.*, 1992; Mercken *et al.*, 1992; Hasegawa *et al.*, 1993; Goedert *et al.*, 1994).

FIGURE 11



Légende de la figure 11: Les résidus Ser ou Thr phosphorylés sont indiqués par la lettre "P". Les sites Ser/Thr-Pro phosphorylés sont représentés par la lettre "P" dans un cercle ombré et les sites non Ser/Thr-Pro par la lettre "P" dans un cercle clair.

Les numéros d'acides aminés utilisés pour décrire les différents sites de phosphorylation correspondent à la numérotation de l'isoforme la plus longue des protéines tau humaines (Goedert *et al.*, 1989a). Ces sites de phosphorylation sont situés en dehors des régions de liaison aux microtubules, sauf la Ser 262 (Lee *et al.*, 1991;

*et al.*, 1992; Hasegawa *et al.*, 1992; Kanemaru *et al.*, 1992; Lang *et al.*, 1992; Lichtenberg-Kraag *et al.*, 1992; Bramblett *et al.*, 1993; Hasegawa *et al.*, 1993; Goedert *et al.*, 1994b; Morishima-Kawashima *et al.*, 1995). En 1992, plusieurs équipes montrèrent que les sites de phosphorylation étaient essentiellement de type Ser-Pro ou Thr-Pro (Gustke *et al.*, 1992; Hasegawa *et al.*, 1992). Plus récemment, Morishima-Kawashima *et al.* (1995) démontrèrent qu'il existait en plus, des sites non Ser/Thr-Pro phosphorylés. 21 sites de phosphorylation ont été décrits, dont 10 sont de type non Ser-Pro ou Thr-Pro (donnés ici, soulignés): il s'agit des Thr 181, Ser 198, 199, 202, 205, 208, 210, Thr 212, Ser 214, Thr 217, 231, Ser 235, 262, 396, 400, 403, 404, 409, 412, 413 et 422 (Morishima-Kawashima *et al.*, 1995) (Figure 11).

De nombreux anticorps monoclonaux ont permis d'identifier un certain nombre de sites présents sur les tau-PHF, tels que AT8, AT100, AT180, AT270, C5, M4, PHF-1, SMI31, SMI 310, SMI33, et SMI34 (Mercken *et al.*, 1992; Biernat *et al.*, 1992; Greenberg *et al.*, 1992; Lang *et al.*, 1992; Lichtenberg-Kraag *et al.*, 1992; Hasegawa *et al.*, 1993; Goedert *et al.*, 1994b; Matsuo *et al.*, 1994; Otvos Jr. *et al.*, 1994) (Tableau 1). Les anticorps que nous avons cités, sont des anticorps dont la fixation dépend de l'état de phosphorylation. Les sondes immunologiques comme AT8, AT100, AT180, AT270, C5, M4 et PHF-1 ont été produits contre des préparations de PHF, et sont spécifiques des tau-PHF. Les SMI31, 310 et 34 sont en fait des anticorps dirigés contre les neurofilaments de masses moléculaires les plus élevées (H et M). Ils marquent les tau-PHF, par réactions croisées. Ils sont également dépendants de la phosphorylation. Nous avons également inclus les anticorps, Alz-50, Tau-1, et Tau-2 qui furent parmi les premiers anticorps monoclonaux décrits. Tau-1 est dirigé contre la séquence 192-204, et sa liaison à l'épitope nécessite que les Ser 199 et 202 ne soient pas phosphorylées (Binder *et al.*, 1985; Liu *et al.*, 1993; Szendrei *et al.*, 1993). Les caractéristiques des anticorps Alz-50 et Tau-2 sont données dans le tableau 1.

**Tableau 1: Tableau récapitulatif d'anticorps monoclonaux**

Anticorps	Epitope	Phosphorylation	Références
Alz-50	2-10	indépendant	Kosik <i>et al.</i> , 1988
Tau-2	95-108	indépendant	Watanabe <i>et al.</i> , 1992
AT270	T 181	(+)	Goedert <i>et al.</i> , 1994
Tau-1	192-204	S 199-S 202(-)	Binder <i>et al.</i> , 1985
AT8	198-220	S 202-T 205(+)	Biernat <i>et al.</i> , 1992; Goedert <i>et al.</i> , 1995
AT180	T 231	(+)	Goedert <i>et al.</i> , 1994
M4	198-250	T 231(+)	Hasegawa <i>et al.</i> , 1993
SMI 33	S 235	(-)	Sternberger <i>et al.</i> , 1985; Lichtenberg-Kraag <i>et al.</i> , 1992
SMI 34	S 235-S 396	(+)	Sternberger <i>et al.</i> , 1985; Lichtenberg-Kraag <i>et al.</i> , 1992
C5	386-406	S 396(+)	Hasegawa <i>et al.</i> , 1993
PHF-1	389-411	S 396-S 404(+)	Greenberg <i>et al.</i> , 1992; Otvos <i>et al.</i> , 1994
SMI 31 SMI 310	S 396-S 404	(+)	Sternberger <i>et al.</i> , 1985; Lichtenberg-Kraag <i>et al.</i> , 1992
AT100	?	(+)	Mercken <i>et al.</i> , 1992; Matsuo <i>et al.</i> , 1994

Il existe d'autres anticorps monoclonaux et polyclonaux dirigés contre les tau-PHF, qui sont cependant moins utilisés, tels que T3P (Lee *et al.*, 1991), B 5-2 (Holzer *et al.*, 1994), RT97, 8D8 (Brion *et al.*, 1993), ptau 1, ptau 2 (Kanemaru *et al.*, 1992)...

*Comparaison entre phosphorylation des tau-PHF et phosphorylation fœtale:* Un certain nombre de sites anormalement phosphorylés sur les tau-PHF sont retrouvés chez le fœtus, et jamais dans le cerveau adulte (Kanemaru *et al.*, 1992; Morishima-Kawashima *et al.*, 1995). La découverte de sites communs de phosphorylation entre protéine tau fœtale et tau-PHF, renforça une hypothèse selon laquelle les neurones dans le cerveau d'un sujet atteint de la MA, tentaient de régénérer leurs extensions neuritiques pour survivre (Ihara, 1989). Il existe donc une différence entre les tau-PHF et le fœtus d'une part et les protéines tau adultes d'autre part. Plusieurs études s'engagèrent alors dans l'analyse de ces sites de phosphorylation fœtale (Watanabe *et al.*, 1993). Pope *et al.*, en 1993 montrèrent, à l'aide de PHF-1, que l'épitope était présent dans des cellules ganglionnaires de rétine de poulet du stade embryonnaire E10 jusqu'au stade post-natal P0 (c'est à dire le jour de la naissance). Cette immunoréactivité disparaît ensuite. D'autres études ont montré que les résidus Ser 202, Thr 231 et Ser 396 étaient phosphorylés chez le fœtus, et que cette phosphorylation entraînait une diminution de l'affinité aux microtubules (Bramblett *et al.*, 1993; Goedert *et al.*, 1993; Hasegawa *et al.*, 1993).

Cependant, les effets de la phosphorylation sur les protéines tau fœtales et les tau-PHF ne sont pas identiques. En effet, la phosphorylation de la seule forme fœtale n'entraîne pas son agrégation. Une première différence entre tau-PHF et tau fœtale repose sur la phosphorylation d'une seule forme chez le fœtus mais des six isoformes dans la MA. Une autre différence entre tau fœtale et tau-PHF réside dans le nombre de résidus phosphorylés. Il est de 21 pour les tau-PHF alors que la protéine tau fœtale n'en contient que 12 (Morishima-Kawashima *et al.*, 1995). De plus, la plupart des sites non Ser/Thr-Pro retrouvés dans les tau-PHF, ne sont pas phosphorylés dans la protéine tau fœtale, rendant ces sites spécifiques des tau-PHF (Watanabe *et al.*, 1993; Morishima-Kawashima *et al.*, 1995).

*Phosphorylation in vitro des protéines tau*: La découverte des sites de phosphorylation au niveau de motifs de type Ser-Pro et Thr-Pro indique que les kinases qui phosphorylent les tau-PHF sont des protéines kinases dirigées contre des motifs Ser-Pro ou Thr-Pro, incluant les MAP kinases, la GSK3, les protéines kinases dépendantes des cyclines ou cdk. Ces kinases phosphorylent effectivement les protéines tau *in vitro* (Biernat *et al.*, 1992; Drewes *et al.*, 1992; Hanger *et al.*, 1992; Mandelkow *et al.*, 1992; Vulliet *et al.*, 1992; Baumann *et al.*, 1993).

La phosphorylation *in vitro* de protéines tau recombinantes par des activités kinasiques présentes dans des homogénats de cerveau de porc, permet de proposer un modèle de phosphorylation anormale selon 3 critères (Gustke *et al.*, 1992):

- \* une migration en gel de polyacrylamide réduite;
- \* une détection par des sondes immunologiques spécifiques des tau-PHF (Biernat *et al.*, 1992; Lichtenberg-Kraag *et al.*, 1992);
- \* une diminution de l'affinité pour les microtubules.

La phosphorylation s'effectue en trois étapes. La première étape dure environ 3 heures, et déjà l'affinité pour les microtubules diminue d'un facteur trois (Gustke *et al.*, 1992). Les Ser 202, 235, 262 et 404 sont phosphorylées. La sérine 404 est responsable d'une augmentation de la masse moléculaire apparente. C'est à la deuxième étape, que la Ser 396 est phosphorylée, mais elle seule n'est pas responsable du ralentissement électrophorétique et de la diminution de l'affinité pour les microtubules. D'autres sites sont phosphorylés entraînant un changement conformationnel. Les sondes immunologiques reconnaissent alors les tau-PHF. Il faut compter 24 heures pour que la majorité des sites Ser-Pro soit phosphorylée, la troisième étape est alors atteinte. Les étapes sont bien distinctes, ce qui suggère un mécanisme de phosphorylation séquentiel (Lichtenberg-Kraag *et al.*, 1992).

Après avoir phosphorylé les protéines tau recombinantes avec un extrait de cerveau, l'étape suivante était d'utiliser des protéines kinases purifiées.

\* *Les kinases dépendantes des cyclines*: Ce sont des protéines kinases phosphorylant les motifs Ser/Thr-Pro. La cdc2 peut phosphoryler les protéines tau. Cette phosphorylation entraîne une diminution de leur capacité à promouvoir l'assemblage des microtubules (Drewes et al., 1992). La cdk5 est intéressante puisqu'elle est associée aux microtubules, et représente une bonne candidate pour la phosphorylation des protéines tau de type Alzheimer (Mandelkow et al., 1993). La TPKII (kinase de type cdc2 + sous-unité de 23kDa) peut phosphoryler les protéines tau bovines sans toutefois induire des épitopes de type Alzheimer (Ishiguro et al., 1992a; 1994).

\* *Les MAP kinases*: Elles sont également appelées ERK pour le terme anglais "*extracellular regulated kinases*". Elles phosphorylent les résidus Ser/Thr-Pro. La MAP kinase phosphoryle les protéines tau recombinantes avec une stœchiométrie de 14 moles de phosphates par mole de tau (Roder et al., 1993). Les protéines tau sont alors détectées par des anticorps spécifiques des sites phosphorylés (Drewes et al., 1992). La MAP kinase est activée par phosphorylation sur un résidu tyrosine par une MAP kinase-kinase (Lu et al., 1993). Elle est retrouvée dans le cerveau adulte humain et les neurones en dégénérescence (Ledesma et al., 1992; Trojanowski et al., 1993a). La MAP kinase est activée par une multitude de facteurs de croissance et de neurotransmetteurs via une cascade de kinases (Pelech et Sanghera, 1992).

\* *La GSK3 ou TPKI*: Elle peut être activée par phosphorylation de résidus tyrosine, et comporte 2 sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Ces 2 sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  peuvent phosphoryler les protéines tau recombinantes, au niveau de la Ser 396. De plus, l'immunoréactivité de Tau-1 diminue et la migration des protéines tau est ralentie (Hanger et al., 1992; Ishiguro et

*al.*, 1992a; b; 1993). Cette kinase est associée aux microtubules et aux PHF (Ishiguro *et al.*, 1992b). Elle semble plus spécifique des résidus Ser-Pro. La phosphorylation par la GSK3 ou TPKI ne paraît pas affecter la liaison des protéines tau aux microtubules (Mandelkow *et al.*, 1992).

Il est difficile de savoir quelles kinases sont impliquées dans la MA, car toutes les études sont réalisées *in vitro*. Est-ce que seules les kinases peuvent provoquer une hyperphosphorylation des protéines tau? Il est clair que la régulation de la phosphorylation des protéines tau se fait également par les protéines phosphatases. Il est facile d'imaginer qu'une diminution du taux des phosphatases entraîne une augmentation de l'état de phosphorylation des protéines tau, diminue l'affinité des protéines tau pour les microtubules et mène à l'apparition d'épitopes de type Alzheimer et à la formation de PHF.

\* *Les protéines phosphatases*: Il existe quatre types de protéines Ser/Thr phosphatases: les phosphatases 1, 2A, 2B et 2C (Ingebristen et Cohen, 1983). Elles sont toutes retrouvées dans le cerveau, à des taux plus ou moins élevés. Certaines études ont montré une diminution significative des activités phosphatasiques 1 et 2A dans les cerveaux de sujets atteints de MA (Gong *et al.*, 1993). Cependant, les phosphatases 2A et 2B peuvent déphosphoryler les tau-PHF *in vitro* (Gong *et al.*, 1994a; b). De même, la phosphatase 2A et la calcineurine sont capables de déphosphoryler des protéines tau recombinantes préalablement phosphorylées par la MAP kinase, ou GSK-3 (Goedert *et al.*, 1992b; Drewes *et al.*, 1993). Cette déphosphorylation *in vitro* ne reflète pas réellement la biologie, et les phosphatases actives *in vivo* n'ont pas encore été identifiées.



### III- 2- 4- 2- La phosphorylation anormale serait normale:

Récemment, Matsuo *et al.* montrèrent que la phosphorylation de certains sites sur les tau-PHF n'aurait rien d'anormale puisque ces sites sont retrouvés dans des biopsies de tissu cérébral de sujet sain (Matsuo *et al.*, 1994; Garver *et al.*, 1994).

L'étude de Matsuo *et al.* a été réalisée sur des biopsies avec un délai post-opératoire court voire nul, en utilisant des anticorps monoclonaux dépendants de la phosphorylation (AT8, PHF-1, AT180, AT270) (**Tableau 2**). Ces sondes immunologiques détectent dans les biopsies, un triplet de protéines tau hyperphosphorylées similaire à celui des tau-PHF. Ces résultats suggèrent que certains sites de phosphorylation Ser/Thr-Pro des tau-PHF sont normaux. Néanmoins, l'anticorps monoclonal AT100, dépendant de la phosphorylation ne détecte aucun triplet dans les biopsies. Il est donc spécifique des tau-PHF, et démontre qu'il existe une différence entre les tau-PHF et les protéines tau normalement phosphorylées (**Tableau 2**).

Une étude cinétique de déphosphorylation a également été entreprise sur le tissu biopsique, et montre qu'après 2 heures à température ambiante, les anticorps monoclonaux dépendants de la phosphorylation ne reconnaissent plus les protéines tau déphosphorylées. Si le délai post-opératoire ou post-mortem est donc supérieur à 2-3 heures, les phosphatases restées très actives, vont rapidement déphosphoryler les protéines tau. Des études similaires montrent que cette phosphorylation des protéines tau est également présente dans du tissu cérébral de rat âgé, et qu'elle disparaît très rapidement dès que le délai post-mortem augmente (Garver *et al.*, 1994, Mawal-Dewan *et al.*, 1994; Matsuo *et al.*, 1994). Ce phénomène de déphosphorylation n'avait jamais été observé jusqu'alors, puisque la plupart des études réalisées sur les protéines tau, se faisait sur du tissu autopsié ou sur du matériel purifié sans inhibiteur de phosphatases. Pour les autopsies, les délais post-mortem des échantillons varient énormément, mais ils sont toujours supérieurs à 2 heures. Dans le tissu cérébral normal obtenu à l'autopsie, l'analyse

des protéines tau montre qu'elles ne sont pas phosphorylées. Au contraire, dans la MA, le triplet de protéines tau hyperphosphorylées (tau-PHF) est constamment retrouvé, quelque soit le délai post-mortem.

Les tau-PHF sont beaucoup plus phosphorylées que les protéines tau purifiées des biopsies (Matsuo *et al.*, 1994). Le terme d'hyperphosphorylation des protéines tau dans la MA est toujours valable. Même si certains sites de phosphorylation sont retrouvés à la fois sur les tau-PHF et les protéines tau normales biopsiques, il doit exister des sites ou des conformations spécifiques aux tau-PHF. En effet, le marquage spécifique des tau-PHF obtenu avec AT100, montre que la phosphorylation peut toujours être impliquée (Tableau 2).

**Tableau 2**

Anticorps	Fœtus	Biopsie	Tau-PHF
AT270	+	+	+++
Tau-1	+/-	+	-
AT8	+	+	+++
AT180	+	+	+++
PHF-1	+	+	+++
AT100	-	-	+++

Des questions peuvent se poser: Pourquoi les tau-PHF restent-elles phosphorylées et s'agrègent-elles? Il semble qu'il y ait plusieurs possibilités: i) les phosphatases seraient inactives dans la MA; ii) les protéines tau emprisonnées dans les PHF seraient inaccessibles aux phosphatases; iii) il existerait une conformation spécifique des tau-PHF entraînant leur agrégation; iv) il y aurait une anomalie d'adressage cellulaire (somato-

dendritique ou axonal); v) il existerait d'autres modifications post-traductionnelles (N- ou O-glycosylation) qui seraient responsables de la formation des PHF. Ces réponses ne sont cependant que des hypothèses.

### *III- 2- 4- 3- Autres modifications des tau-PHF:*

Il existe en effet une autre modification des tau-PHF, qui est la glycation. Il s'agit d'une modification liée à l'âge, qui se produit entre des groupements aminés de résidus Lysine et des sucres, réaction encore appelée réaction de Maillard. Ce phénomène est caractérisé par la formation de produits intermédiaires ou produits d'Amadori, et de produits finaux comme des pyrrolines et pentosidines regroupés sous le terme anglais AGE (*Advanced Glycation End products*). En produisant des sondes immunologiques contre ces structures finales, Smith *et al.* (1994), montrèrent que ces formes étaient retrouvées dans les neurones en dégénérescence et les plaques séniles.

Une autre étude menée par Ledesma *et al.* en 1994, montre qu'une fraction des tau-PHF subit une glycation *in vivo*. Des analyses supplémentaires montrèrent que la glycation *in vitro* des protéines tau est possible. Cette glycation conduit à une diminution de leur affinité pour les microtubules (Ledesma *et al.*, 1994).

A l'heure actuelle, il est très difficile de savoir si la glycation est essentielle dans la formation des PHF ou si elle n'est que secondaire.

### **III- 3- Altération des neurotransmetteurs:**

La MA est caractérisée par la présence de lésions localisées dans certaines parties du cerveau. Ces lésions affectent préférentiellement certaines populations neuronales.

Afin de les déterminer, il faut trouver des marqueurs spécifiques de ces populations neuronales, comme les neurotransmetteurs. Au tout début, la MA était considérée comme un déficit de l'innervation cholinergique. Mais rapidement les recherches montrèrent que d'autres systèmes de neurotransmetteurs étaient également affectés.

Un déficit cholinergique est observé, notamment avec une baisse de l'activité de l'enzyme de synthèse de l'acétylcholine, la choline acétyltransférase. Les baisses les plus importantes sont observées dans le cortex temporal et l'hippocampe. Les neurones qui projettent leurs prolongements cholinergiques dans le cortex temporal et l'hippocampe, font partie du noyau basal de Meynert. Des dépôts amyloïdes et des neurones en dégénérescence y sont retrouvés, ce qui pourrait expliquer ce déficit.

Des déficits d'autres systèmes de neurotransmission sont observés:

\*systèmes noradrénergiques: le locus cœruleus est le siège d'une dépopulation neuronale de 50 à 70%, dans la MA. Une altération des projections noradrénergiques corticales a été mise en évidence.

\*systèmes dopaminergiques: le locus niger ne semble pas atteint. Les voies nigrostriées sont touchées mais de façon modérée.

\*systèmes sérotoninergiques: Le noyau du raphé est touché par une dépopulation neuronale, et les voies ascendantes venant du raphé sont lésées.

\*systèmes à acides aminés: Une diminution de l'activité des neurones glutamatergiques corticaux projetant sur le striatum est observée.

\*systèmes peptidergiques: Le taux de la somatostatine est constamment abaissé dans le cortex des sujets atteints de la MA. Cette diminution de la somatostatine cérébrale semble être en parfaite corrélation avec la gravité de la détérioration intellectuelle, et est l'une des anomalies importantes de la neurotransmission (Signoret et Hauw, 1991).

## **IV- ETIOLOGIE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER:**

### **IV- 1- Facteurs de risque:**

L'âge est un facteur de risque (facteur épidémiologique) incontestable de la MA. D'autres facteurs de risque comme le sexe, l'âge de la mère à la naissance du sujet, des antécédents de traumatisme crânien ont été décrits mais ils sont plus ou moins contestés. Des facteurs environnementaux (aluminium, agent excitotoxique...) pourraient également favoriser la maladie.

Dans le chapitre sur les co-facteurs, nous avons décrit l'apolipoprotéine E et ses différentes isoformes E2, E3 et E4. Des études ont montré que l'allèle  $\epsilon 4$  est un facteur de risque (facteur génétique) de la MA. En effet, sa fréquence est plus élevée dans des formes tardives et précoces de la MA, qu'elles soient familiales ou sporadiques. Le risque de développer une MA est augmenté de 3 à 6 fois pour les porteurs d'un allèle  $\epsilon 4$ , et de 6 à 12 fois pour les porteurs des deux allèles (pour revue, Chartier-Harlin et Pérez-Tur, 1995).

### **IV- 2- Facteurs génétiques:**

Bien que la majorité des cas de MA soit sporadique, plusieurs arguments favorisent une implication de facteurs génétiques dans les formes familiales. Nous avons déjà parlé de l'allèle  $\epsilon 4$  de l'apolipoprotéine E. De plus, chez des jumeaux monozygotes, si l'un des jumeaux est atteint de la MA, l'autre a un risque élevé (de l'ordre de 40%) de développer

la maladie (Nee *et al.*, 1987). La présence d'antécédents familiaux constitue un risque majeur de développer la maladie, et dans certaines familles, la maladie est transmise selon un mode autosomique dominant (Folstein, 1989).

#### IV- 2- 1- Le chromosome 21:

Des similitudes histologiques entre la trisomie 21 et la MA ont orienté les premières études génétiques sur le chromosome 21. Dans la trisomie 21, l'expression de l'ARN messager du  $\beta$ PP est augmentée.

Des mutations sur le codon 717 du gène du  $\beta$ PP ont été identifiées dans des formes familiales de MA à début précoce. Ces mutations transforment la valine en une isoleucine (Goate *et al.*, 1991), en une phénylalanine (Murrell *et al.*, 1991) ou en une glycine (Chartier-Harlin *et al.*, 1991). Elles ne sont jamais retrouvées dans la population normale. Il existe également des mutations aux codons 670/671 qui transforment la lysine et la méthionine respectivement en asparagine et leucine, dans certaines formes familiales à début précoce (Mullan *et al.*, 1992).

D'autres mutations au niveau des codons 692 et 693 ont été également retrouvées, mais elles ne sont pas spécifiques de la MA.

Les mutations trouvées sur le gène du  $\beta$ PP, spécifiques des formes familiales précoces de la MA, sont situées de part et d'autre de la séquence du peptide A $\beta$ . La mutation 717 modifierait le clivage situé dans la partie carboxy-terminale du peptide A $\beta$  conduisant à la formation d'un peptide plus long (42 à 43 acides aminés). L'ajout de ces acides aminés entraîne une augmentation de l'hydrophobie et l'insolubilité du peptide. Cela expliquerait l'agrégation du peptide A $\beta$  à faible concentration (Tamaoka *et al.*, 1994). Les mutations 670 et 671 favorisent le clivage  $\beta$ -secrétase et augmentent ainsi la

concentration de peptide amyloïde libéré facilitant son agrégation (Citron *et al.*, 1992). L'accumulation du peptide A $\beta$  induirait alors la DNF.

#### IV- 2- 2- Le chromosome 14:

Les mutations sur le chromosome 21 ont été retrouvées chez peu de formes familiales de MA à début précoce. Des études génomiques montrèrent qu'il existe une association génétique entre formes familiales précoces de MA et une région du chromosome 14 (Schellenberg *et al.*, 1992). Des gènes-candidats de la MA sont localisés dans cette région. Il s'agit des gènes de la protéine de choc thermique (HSP 70), de la protéine c-Fos et de l' $\alpha$ -1-antichymotrypsine. Toutefois, des mutations sur ces gènes n'ont pas été mises en évidence.

#### IV- 2- 3- Le chromosome 19:

Bien que la transmission de la MA puisse se faire selon un mode autosomal dominant dans certaines formes à début tardif, d'autres facteurs génétiques, et environnementaux peuvent conduire à la maladie. Des études génomiques ont montré qu'il existe une association génétique entre des formes tardives de MA et le chromosome 19 (Pericak-Vance *et al.*, 1991).

Parmi les gènes situés dans cette région, se trouve celui de l'apolipoprotéine E. A l'heure actuelle, l'allèle  $\epsilon$ 4 est considéré comme le facteur de risque génétique pour les formes tardives de MA.

#### IV- 2- 4- Conclusion:

Parmi les patients atteints de MA, le plus grand groupe est représenté par les cas sporadiques à début tardif (45%), suivi des formes familiales à début tardif (30%), puis des formes familiales à début précoce (15%) et enfin des formes sporadiques à début précoce (10%). La majorité des formes familiales à début précoce (70%) serait liée au chromosome 14 contre une faible proportion (5%) au chromosome 21. Des études d'associations génétiques ont montré que les chromosomes 14 et 21 n'étaient pas impliqués dans les formes familiales ou sporadiques à début tardif. Elles seraient plus liées au chromosome 19 (pour revue, Van Broeckhoven, 1995). Il est possible que d'autres liaisons génétiques existent, impliquant de nouveaux gènes candidats.

#### V- HÉTÉROGÉNÉITÉ DE LA MALADIE D'ALZHEIMER:

Il est clair qu'il existe une hétérogénéité génétique de la maladie. De plus, la quantité et la distribution des lésions neuropathologiques sont différentes. Cette hétérogénéité se retrouve dans d'autres aspects de la maladie (pour revue, Scheltens *et al.*, 1993).

*Hétérogénéité selon l'âge de début:* Des différences ont été trouvées entre les formes séniles et préséniles de la maladie sur le plan clinique, pathologique et biochimique. L'atrophie cérébrale et la perte neuronale sont beaucoup plus marquées dans les formes préséniles que séniles, et elles affectent très rapidement le cortex cérébral



entraînant des troubles du langage et des réalisations gestuelles. Par contre, les formes où les troubles de la mémoire sont prédominants et les formes peu évolutives sont observées chez les sujets âgés. Il faut également noter que les formes préséniles sont plus fréquentes dans les cas familiaux.

*Hétérogénéité des signes cliniques:* L'aphasie n'est pas toujours observée, et il semblerait que sa présence soit liée à la sévérité et la durée de la maladie. Toutefois, si l'aphasie traduit un processus dégénératif cortical déjà très sévère, sa présence peut cependant être révélatrice: elle peut exprimer une vulnérabilité de l'hémisphère gauche chez certains patients (Scheltens *et al.*, 1993). La présence de signes moteurs a été associée à une forme d'évolution particulièrement sévère.

*Hétérogénéité selon l'évolution de la maladie:* Elle est très variable d'un sujet à l'autre. Chez certains, l'évolution est très lente ou limitée à un secteur cognitif. Elle peut évoluer progressivement ou par paliers. Les formes à évolution lente sont observées chez les sujets âgés.

*Hétérogénéité selon le sexe:* La plus grande fréquence de la maladie chez la femme, a suggéré que le sexe pouvait être un facteur impliqué dans la pathogénie.

Il est difficile de savoir actuellement si la variabilité des signes cliniques et biologiques correspond à des variations liées à la sévérité de la maladie et/ou de la topographie des lésions, ou s'il existe réellement des sous-groupes traduisant l'influence de facteurs endogènes (génétique, sexe, processus différentiel du vieillissement...) et de facteurs exogènes (toxiques ou infectieux). Quoi qu'il en soit, ces différences sont à prendre en compte pour le diagnostic, et la mise au point de marqueurs biologiques comme pour les essais cliniques.

## **VI- APPROCHE THÉRAPEUTIQUE:**

### **VI- 1- Modèles animaux et cellulaires de la maladie d'Alzheimer:**

Il n'existe pas de bon modèle de la MA. Les systèmes *in vitro* sont trop simples et la plupart des animaux n'ont pas un cortex suffisamment développé pour être comparé à celui de l'homme.

#### **VI- 1- 1- Les modèles animaux:**

L'animal qui se rapproche le plus de l'homme est le singe. Chez le singe âgé, des troubles comportementaux pouvant évoquer un déficit de la mémoire et des lésions cérébrales de type plaques séniles ont été décrits (Price, 1986). Chez le mouton âgé, des neurones en dégénérescence peuvent être retrouvés dans le cortex cérébral (Nelson et Saper, 1994). Il paraît difficile d'obtenir un modèle présentant à la fois des lésions de type plaque sénile et neurones en dégénérescence. Il existe cependant un animal, le primate lémurien *Microcebus murinus* qui présente à la fois des lésions cérébrales de type plaque sénile et de DNF lorsqu'il est âgé (Bons *et al.*, 1994; Delacourte *et al.*, 1995). Ces études préliminaires nécessitent d'être confirmées.

Un grand nombre d'études sur des souris transgéniques fut entrepris pour mettre au point un modèle animal de la MA. Nous n'évoquerons que les plus récents.

Une équipe américaine a obtenu des souris transgéniques qui expriment des taux élevés de  $\beta$ PP humain muté sur le résidu 717 (Valine en Phénylalanine) (Games *et al.*,

1995). Cette mutation est associée à une forme familiale de MA (Murrell *et al.*, 1991). Ces souris transgéniques développent de nombreuses lésions neuropathologiques de type Alzheimer (dépôts amyloïdes colorés par la thioflavine S, des plaques neuritiques, une perte synaptique et une réaction gliale). Aucune dégénérescence neurofibrillaire n'était visible dans le cerveau des souris transgéniques. Malgré un faible échantillonnage, il semble que la densité des dépôts amyloïdes augmente avec l'âge, comme chez l'homme. Ces résultats montrent que les dépôts amyloïdes apparaissent les premiers. Ce modèle permettrait l'étude de molécules visant à diminuer la production de peptide A $\beta$  et/ou réduire sa neurotoxicité *in vitro*.

Une autre équipe a réalisé des souris transgéniques qui ont intégré dans leur génome, le gène codant pour l'isoforme longue des protéines tau (Götz *et al.*, 1995). Par la technique d'hybridation *in situ*, les auteurs ont localisé les ARN messagers des tau humaines au niveau des cerveaux des souris transgéniques. Les taux d'ARN messagers sont cependant variables d'une population neuronale à une autre. Au niveau protéique, l'isoforme tau humaine ne représente que 10% des isoformes tau murines. Des études immunohistochimiques montrèrent que, dans les souris transgéniques, la localisation des tau était axonale et somatodendritique. En utilisant des anticorps dépendants de la phosphorylation, PHF-1 et AT8, un certain nombre de neurones était marqué dans les souris transgéniques, et aucun marquage n'était visible chez les souris témoins. Les changements observés chez les souris transgéniques semblent intéressants et prometteurs.

## VI- 1- 2- Les modèles cellulaires:

### *VI- 1- 2- 1- Transfections cellulaires*

De nombreuses transfections ont été effectuées, et nous nous attarderons essentiellement sur un modèle récent de cotransfection isoformes de tau-protéines kinases. Des cellules COS ont été transfectées par les ADN complémentaires des isoformes de tau et de GSK-3. L'étude biochimique des protéines tau issues de ces cellules, montre que la migration électrophorétique des protéines tau est ralentie. Ces protéines de masse moléculaire apparente plus élevée sont détectées par des anticorps spécifiques des tau-PHF, mais pas par Tau-1 (Anderton *et al.*, 1994).

### *VI- 1- 2- 2- Action d'inhibiteurs de phosphatases sur des cultures cellulaires*

Un inhibiteur de phosphatases a récemment été très utilisé pour induire des épitopes tau-PHF dans des lignées cellulaires, il s'agit de l'acide okadaïque qui inhibe spécifiquement les protéines phosphatases 1 et 2A (Cohen, 1989). Dans des cellules de neuroblastomes (SKNSH-SY5Y) différenciées, les protéines tau présentent des épitopes de type tau-PHF. Un traitement à l'acide okadaïque permet de détecter des protéines tau hyperphosphorylées de plus haut poids moléculaire (Sautière *et al.*, 1994; Dupont-Wallois *et al.*, 1995). Des résultats similaires ont été retrouvés avec d'autres systèmes cellulaires (Vandermeeren *et al.*, 1993; Vincent *et al.*, 1994) et tissulaires (Harris *et al.*, 1993).

## VI- 2- Traitement:

Compte tenu des nombreuses anomalies de neurotransmission dans la MA, et du nombre de voies liées au processus de mémorisation, un certain nombre d'approches ont pu être envisagées. Ainsi, la majorité des essais proposés vise à suppléer une neurotransmission déficitaire, dans le but de corriger un symptôme, à savoir les troubles mnésiques. L'approche cholinergique a été envisagée, et des précurseurs de l'acétylcholine (choline et lécithine) ont été testés, mais sans effet. Des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase ont été utilisés, tels que la physostigmine et la tétrahydroacridine (THA) ainsi que des agonistes cholinergiques directs. D'autres approches ont également été entreprises, mais n'ont eu aucun effet sur la maladie, entre autres des approches aminergique, gabaergique et glutamatergique. Beaucoup d'autres perspectives ont été envisagées pour essayer de traiter la MA (intervention de neuropeptides, facteurs trophiques comme le NGF, œstrogènes...). A l'heure actuelle, la *Tacrine* (THA) a reçu une autorisation de mise sur le marché sous contrôle hospitalier. Les avis quant à son efficacité, restent cependant très partagés: son action n'est bénéfique que sur un sous-groupe de patients (au début de la maladie, dans les formes légères à modérées), et ses effets secondaires, incluant une hépatotoxicité, sont redoutables. Lorsque le patient répond au traitement, l'évolution de la maladie semble retardée.

Les traitements à venir visent à ralentir les deux grands processus pathologiques de la maladie: la formation des dépôts amyloïdes et la DNF. Des molécules qui empêcheraient l'agrégation des constituants des dépôts amyloïdes ou qui auraient un effet neuroprotecteur sont actuellement testées (Giacobini *et al.*, 1988; Kisilevski *et al.*, 1995).

## **RESULTATS-DISCUSSION**

En collaboration avec l'équipe du Professeur Pau (CNRS UMR 9921, Montpellier, France) nous avons entrepris la production de sondes immunologiques monoclonales. Notre but était d'obtenir des anticorps spécifiques de la dégénérescence neuronale de type Alzheimer, pour caractériser les protéines tau incorporées dans les PHF (tau-PHF). Nous avons préparé les immunogènes (préparations de tau-PHF), qui furent utilisés par l'équipe de Montpellier, pour immuniser les différentes souris. Ils ont obtenu des anticorps monoclonaux, à partir de deux fusions. La caractérisation des anticorps monoclonaux s'est effectuée de part et d'autre en utilisant des techniques complémentaires.

## **I- PURIFICATION DES PROTÉINES TAU-PHF POUR L'IMMUNISATION:**

La plupart des préparations de tau-PHF sont basées sur l'insolubilité des PHF et la thermostabilité des protéines tau. Certains auteurs ont cependant montré qu'une fraction des tau-PHF n'est pas "emprisonnée" dans les PHF. En effet, après une centrifugation à 27000g, ces protéines sont retrouvées dans le surnageant. La centrifugation de ce surnageant à 200000g, entraîne ces protéines dans le culot. Cette fraction est alors soluble dans des solutions contenant de l'urée 8M (Köpke *et al.*, 1993). Ces tau-PHF "solubles" sont phosphorylées de la même manière que les protéines tau incorporées dans les PHF. Il est possible que ces protéines soient en fait des protéines tau normales hyperphosphorylées, qui se sont retrouvées piégées dans les PHF et qui ont été libérées par l'action de certains tampons. D'autres auteurs ont montré une résistance des tau-PHF aux protéases comme la pronase (Wischik *et al.*, 1988a; b). L'action de la pronase sur les PHF ne laisse alors apparaître qu'un fragment de 14 kDa, qui représenterait l'unité de base des PHF. Ces résultats et d'autres montrent que les PHF sont donc formées de protéines

tau insolubles (Wischik *et al.*, 1988a; b; Greenberg et Davies, 1990; Köpke *et al.*, 1993). Ces dernières représentent donc un antigène de choix pour obtenir des anticorps contre la DNF de type Alzheimer caractérisée par la formation de PHF.

### **I- 1- Préparations de protéines tau-PHF:**

Nous avons utilisé plusieurs préparations de tau-PHF pour l'immunisation des souris, toutes faites à partir de cerveau de patients atteints de la MA.

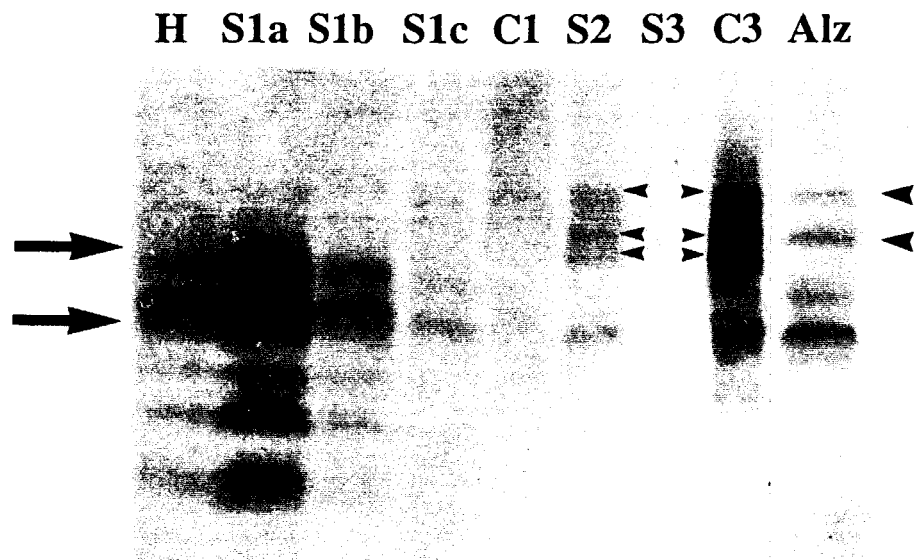
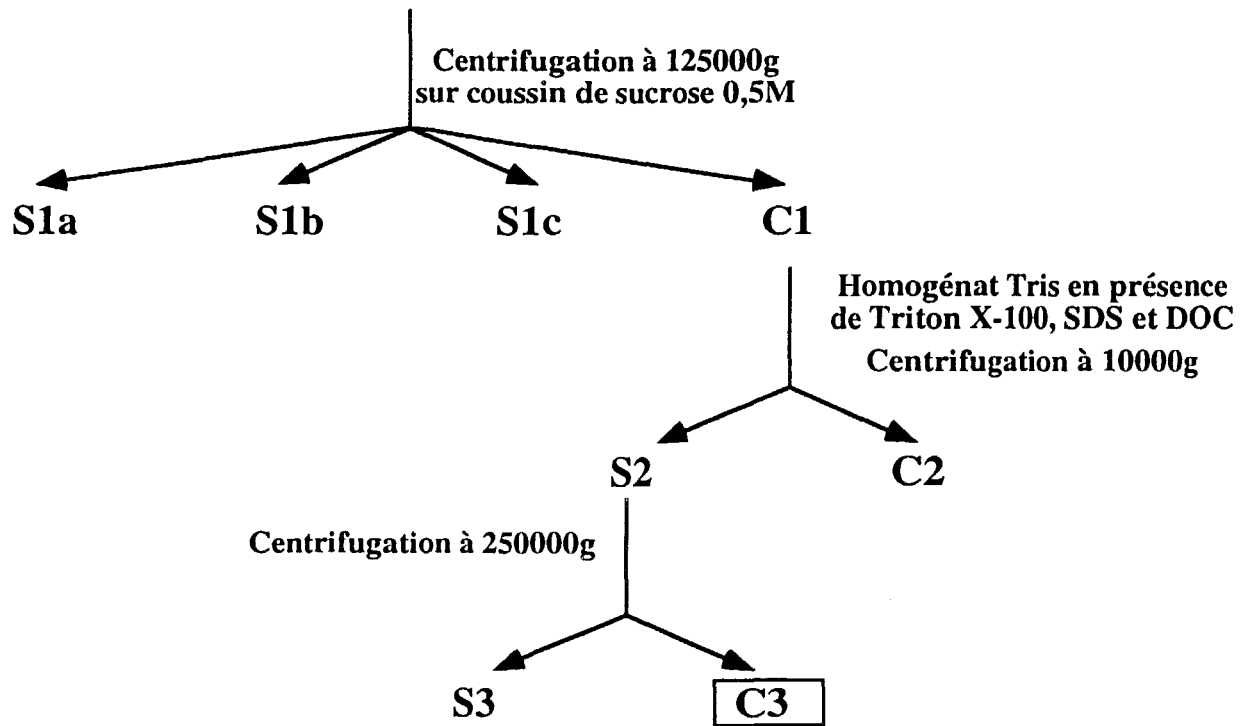
Pour la première fusion, l'immunogène utilisé a été une des préparations purifiées par chromatographie de gel filtration lors de notre D.E.A.. Brièvement, les protéines tau thermostables étaient séparées par chromatographie de tamisage moléculaire en présence de SDS (Matériels et Méthodes (M&M) p. 143).

Pour la deuxième fusion, nous avons réalisé une préparation selon un protocole modifié de Greenberg et Davies (1990). Ce protocole consiste à homogénéiser le tissu dans un tampon Tris 10 mM pH 7,4, et récupérer le surnageant après centrifugation (27000g) qui contient environ 50% de l'immunoréactivité des tau-PHF. Les protéines tau-PHF sont insolubles dans des solutions contenant des détergents zwitterioniques et du  $\beta$ -mercapto-éthanol. En utilisant de telles conditions, les tau-PHF sont retrouvées dans les culots après diverses centrifugations. Finalement, la dernière centrifugation consiste à déposer la fraction insoluble sur coussin de sucrose (50%) et à récupérer la fraction 35-50% qui contient majoritairement les tau-PHF (Greenberg et Davies, 1990).

Nous avons homogénéisé le tissu cérébral dans un tampon Tris 10 mM, pH 7,5. Cet homogénat est déposé sur un coussin de sucrose (tampon Tris contenant du sucrose 0,5 M). Les 3 phases du surnageant (S1a, S1b, S1c) sont éliminées et le culot (C1) récupéré après centrifugation. Ce culot (C1) contient essentiellement les PHF. Il est ensuite



**Homogénat Tris (H)  
de tissu cérébral  
d'un patient atteint  
de maladie d'Alzheimer**

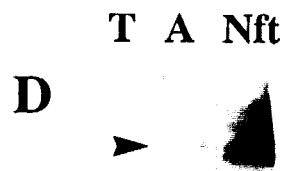
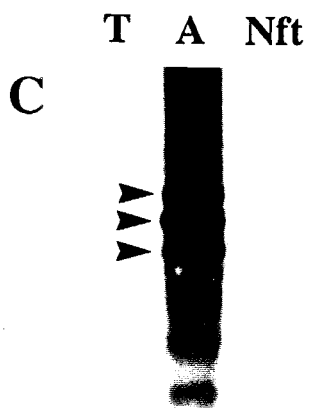
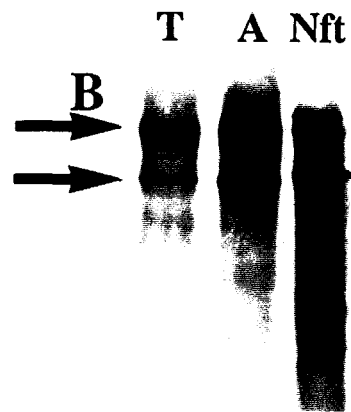
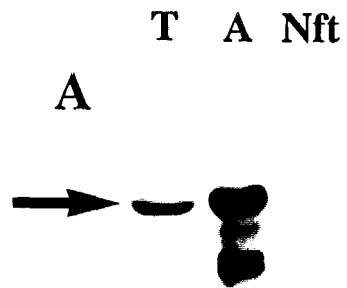


homogénéisé dans le tampon Tris 10 mM en présence de Triton X-100, d'acide déoxycholique et de SDS et chauffé à 100°C. Les tau-PHF étant thermostables, elles sont partiellement retrouvées dans le surnageant (S2) après centrifugation, et une bonne partie des autres protéines non thermostables se retrouve dans le culot (C2). Enfin, le surnageant (S2) est centrifugé à 45000 tours/min, pendant 2 heures à 4°C. Le culot contenant les tau-PHF (appelé C3) est finalement récupéré (Figure 12) (M&M, p. 144).

## I- 2- Immunisation et criblage:

Les préparations enrichies en tau-PHF sont utilisées pour l'immunisation des souris. Les lymphocytes contenus dans la rate sont fusionnés avec des cellules de myélome, selon la technique décrite par Piechaczyk en 1985. Les surnageants de culture des clones ainsi obtenus sont d'abord sélectionnés par ELISA. Les préparations de tau-PHF sont adsorbées sur plaques ELISA, les anticorps sécrétés qui sont dirigés contre cet immunogène sont ainsi facilement repérés. Cette étape a été réalisée par l'équipe de Montpellier.

Nous avons ensuite testé les clones positifs en ELISA par la technique des immunoempreintes, permettant ainsi un deuxième criblage. Ce dernier était nécessaire du fait de la présence dans la plupart des préparations de protéines contaminantes, en particulier la GFAP. En effet, comme nous l'avons décrit précédemment, il existe au cours de la MA, une gliose astrocytaire (Delacourte et Buée, 1989; Delacourte, 1990). Les filaments gliaux sont probablement co-purifiés avec les PHF et ceci explique l'obtention de nombreuses sondes dirigées contre la GFAP (Condamines *et al.*, 1995) qui est une molécule très immunoréactive (Lewis *et al.*, 1984). Nous avons également obtenu des anticorps anti-neurofilaments (Figure 13). Finalement, parmi toutes les sondes obtenues, deux anticorps sont intéressants car ils détectent les tau-PHF dans des homogénats totaux



deux anticorps sont intéressants car ils détectent les tau-PHF dans des homogénats totaux de cerveaux de patients atteints de MA. Après clonage, ces anticorps ont été dénommés AD1 et AD2 (**Figure 13**).

Ces anticorps sont alors produits par injection des hybridomes dans la cavité péritonéale de souris. Ces dernières développent une tumeur liquide appelée liquide d'ascite. Les anticorps sont ensuite purifiés à partir du liquide d'ascite soit par chromatographie d'affinité sur colonne de protéine A Sépharose CL-4B (AD2) ou par filtration sur gel (AD1) (Condamines *et al.*, 1995).

Une analyse plus fine de l'immunomarquage obtenu avec AD1 est réalisée par immunoempreinte. Nous déposons sur électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, une alternance d'homogénats totaux de régions cérébrales de patients atteints de MA et de cerveaux de sujets témoins. Les cerveaux de patients atteints de MA sont riches en lésions neurofibrillaires, alors que ceux des témoins en sont exempts. Les protéines séparées selon leur masse moléculaire sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose, avant d'être incubées avec l'anticorps. AD1 détecte le triplet de protéines tau dans tous les homogénats de cerveaux de patients atteints de MA (**Figure 14**). Cependant, l'intensité du marquage est relativement faible. De plus, AD1 détecte les neurofilaments H et M, le rendant de ce fait beaucoup moins spécifique du triplet de protéines tau-PHF (**Figure 14**). L'une des caractéristiques majeures des protéines tau-PHF est leur hyperphosphorylation. L'étape suivante est donc de savoir si cet anticorps est dépendant de la phosphorylation. Pour cela, nous avons déphosphorylé deux types d'échantillons: la préparation de tau-PHF ayant servi à l'immunisation des souris (C3), et un homogénat total de cerveau de patient atteint de MA. Nous faisons alors agir la phosphatase alcaline sur les échantillons. Si l'épitope d'AD1 implique des groupements phosphates, le traitement par la phosphatase devrait éliminer le marquage par AD1 du triplet. Pour les deux échantillons non déphosphorylés, AD1 détecte le triplet de protéines tau (**Figure 15**). Par contre, si les échantillons sont déphosphorylés (avant ou après



monoclonal AD1 laisse supposer qu'il est dirigé contre un site XSPVX phosphorylé présent à la fois dans les neurofilaments H et M et les protéines tau. Il existe au niveau de la séquence de la protéine tau deux régions communes avec les neurofilaments: les sites ESPV et KSPV. L'épitope pourrait donc être localisé aux alentours de ces deux sites. Il est également possible qu'AD1 reconnaisse un épitope plus conformationnel tel que ceux des anticorps SMI (Sternberger *et al.*, 1985). Cette hypothèse est très plausible du fait du manque de reproductibilité de marquage des protéines tau-PHF. Néanmoins, cette observation est insuffisante pour permettre une conclusion sans équivoque. En effet, AD1 est une immunoglobuline de classe M (Condamines *et al.*, 1995). Il est difficilement maniable et il faut prendre des précautions pour le manipuler. Il supporte très mal les cycles de congélation-décongélation. Son incubation doit se faire dans du tampon contenant 5% de lait délipidé, et malgré toutes les précautions, il arrive souvent qu'il y ait beaucoup de bruit de fond.

Nous avons donc choisi de consacrer la plupart de notre travail de thèse à la caractérisation de l'anticorps AD2. Ce dernier est une immunoglobuline de classe G, beaucoup plus stable (Condamines *et al.*, 1995). Toutefois, les résultats d'AD1 seront parfois donnés en comparaison.

## **II- CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DE L'ANTICORPS MONOCLONAL AD2:**

### **II-1- Spécificité de l'anticorps AD2:**

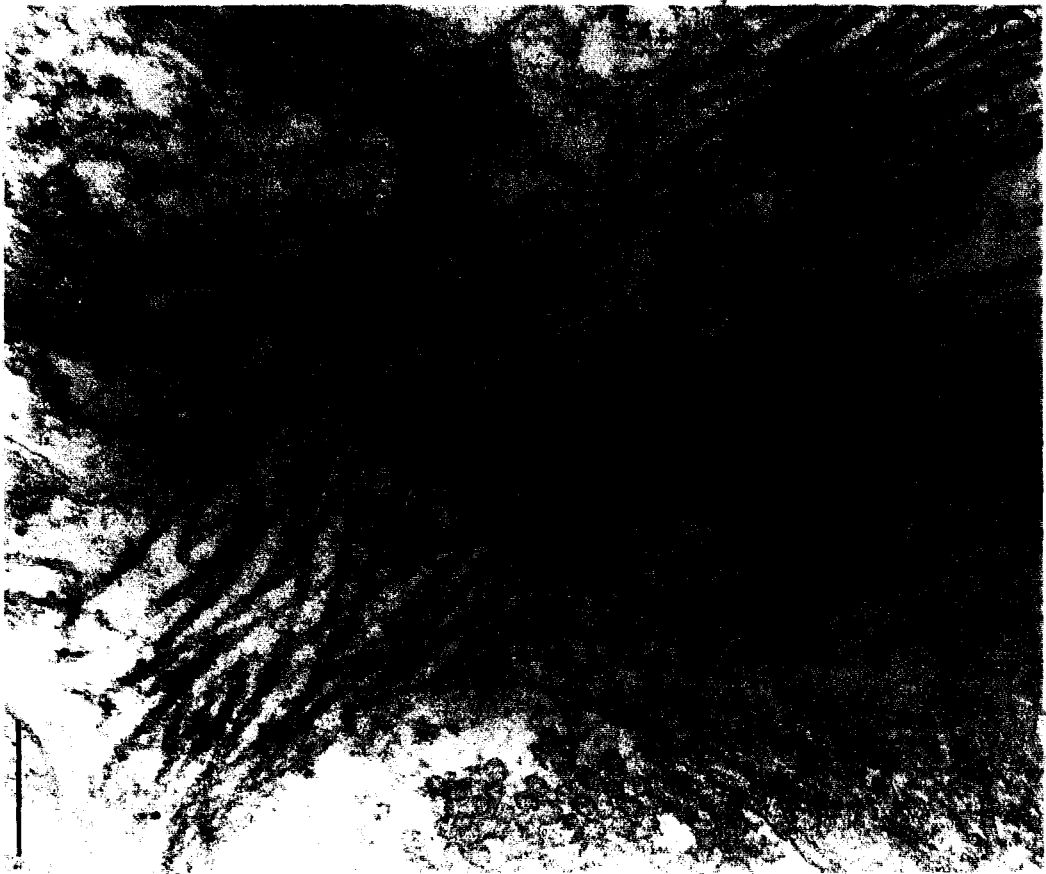
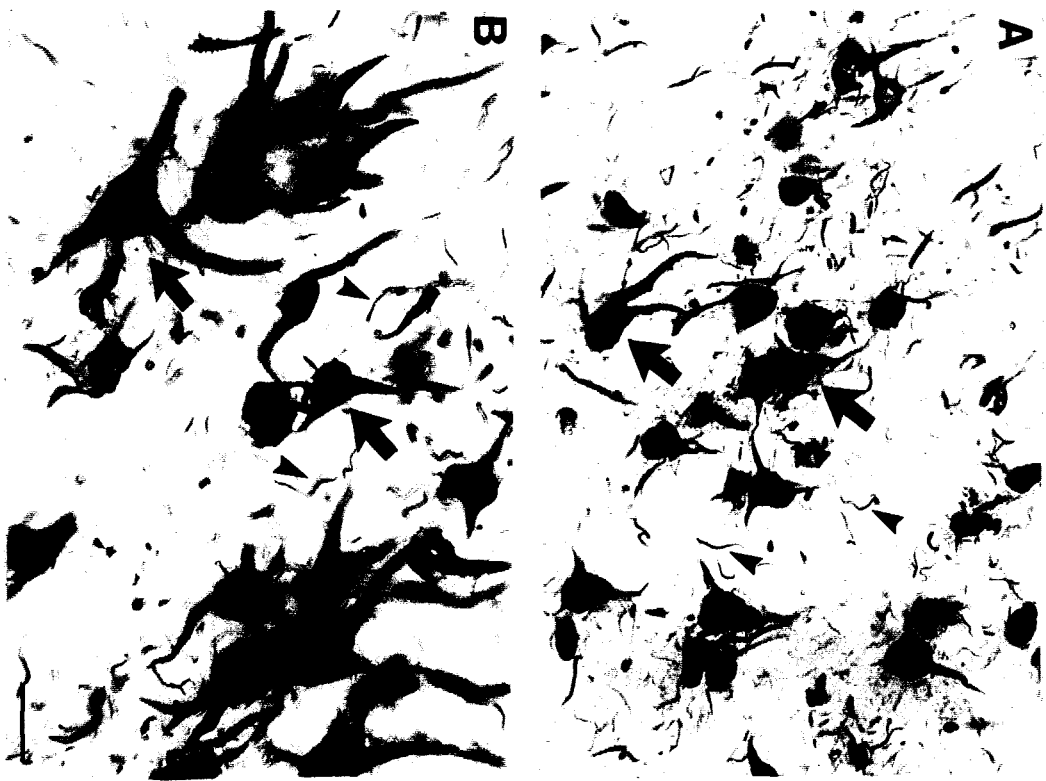
L'étape suivante était d'analyser la spécificité d'AD2 vis à vis des PHF et des protéines tau-PHF.

#### **II-1-1- Etude immunohistochimique:**

En collaboration avec A. Wattez (INSERM U422, Lille) et le Dr. Hof (Mount Sinai Medical Center de New-York, Etats-Unis), nous avons pu montrer que l'anticorps détecte les neurones en dégénérescence sur des coupes de cerveaux de patients atteints de MA (**Figure 16 A et B**). Cependant, aucun marquage n'est observé sur des coupes de cerveaux de sujets sains, rendant cet anticorps spécifique de la DNF de type Alzheimer. De plus, quelle que soit la technique utilisée pour la fixation du tissu et/ou son inclusion, AD2 détecte toujours les neurones en dégénérescence (M&M, p. 151).

#### **II- 1- 2- Etude ultrastructurale:**

Dans un premier temps, en collaboration avec le Dr. Reig et le Pr. Défossez (INSERM U422, Lille), nous avons réalisé une étude ultrastructurale. Il s'agit de déterminer si AD2 marque spécifiquement les PHF. Cette analyse a été effectuée sur du





tissu biopsique, fixé, inclus et coupé pour les études de microscopie électronique. Les grilles sont incubées avec l'anticorps AD2. Il est lui-même détecté par un anticorps marqué à l'or colloïdal. AD2 décore les PHF de façon spécifique, et notamment les extrémités des PHF (**Figure 16 C**). Cette étude est originale, car les analyses précédentes ont souvent été effectuées sur des préparations de tau-PHF. Le fait de travailler sur du matériel biopsique montre que l'anticorps est spécifique des PHF. De plus son épitope est résistant aux différents traitements (fixation, inclusion) nécessaires à la microscopie électronique. L'absence de marquage à certains endroits des PHF suggère que l'épitope d'AD2 n'est pas accessible à l'anticorps. Il est possible que l'épitope soit masqué par certaines modifications des PHF, comme l'ubiquitination (Banerjee *et al.*, 1991), ou la glycosylation (glycation) (Ledesma *et al.*, 1994) qui empêcheraient la fixation de l'anticorps (M&M, p. 154).

### II- 1- 3- Etude biochimique:

Pour déterminer la spécificité d'AD2 pour les tau-PHF, nous avons d'abord réalisé une expérience similaire à celle réalisée pour AD1. Pour cela, nous déposons sur électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, une alternance d'homogénats totaux de cerveaux de patients autopsiés atteints de MA et de sujets autopsiés témoins. Une fois, la séparation en fonction de la masse moléculaire terminée, les protéines contenues dans le gel sont électrotransférées sur membrane de nitrocellulose. L'immunodétection est réalisée avec l'anticorps AD2. Il est couramment utilisé à une dilution élevée (1/16000 pur), ce qui correspond à une concentration de 0,3 µg/ml d'anticorps produit en ascite et purifié. Nous avons également réalisé des dilutions d'homogénats totaux de cerveaux Alzheimer, afin de connaître la quantité minimale de

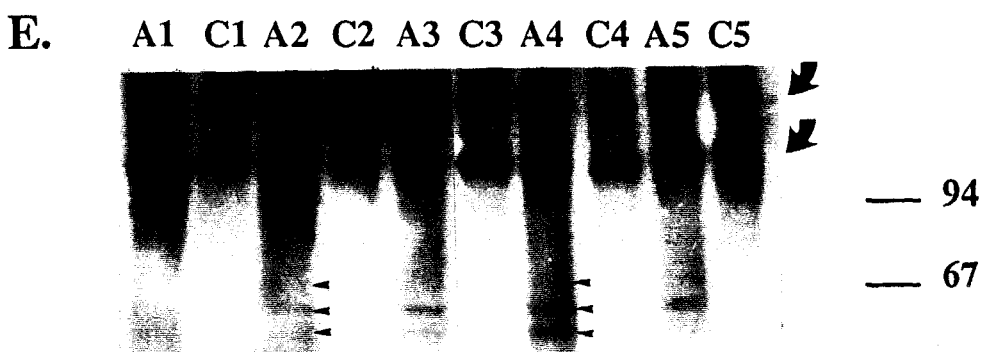
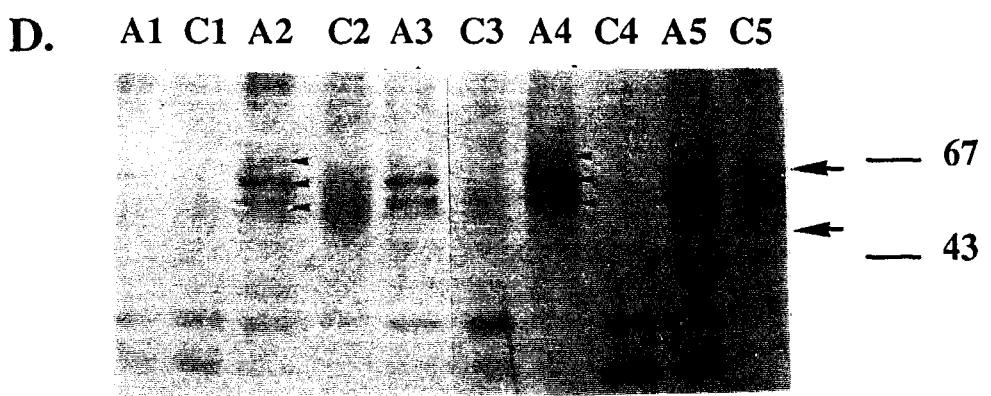
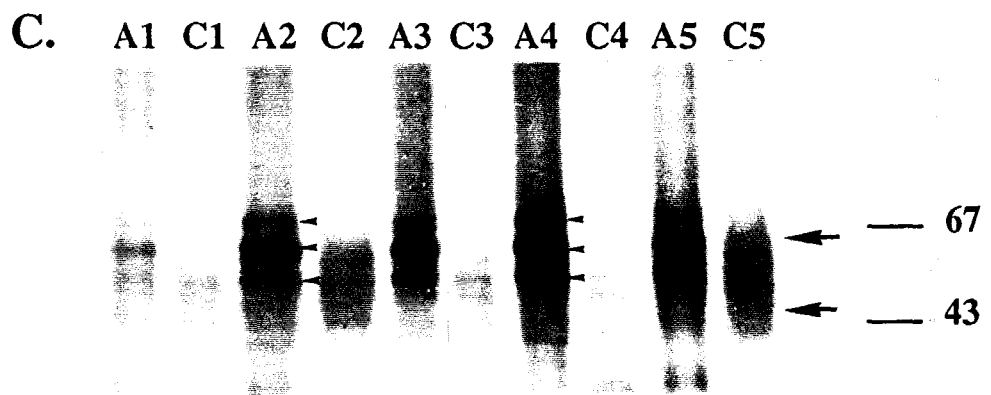
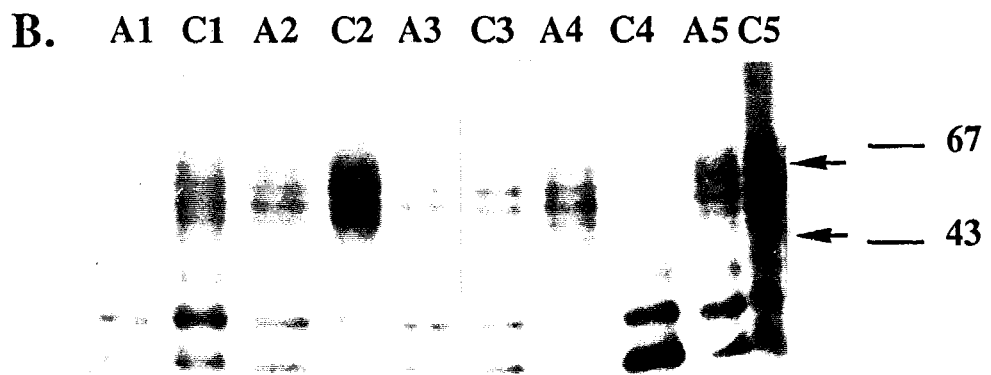
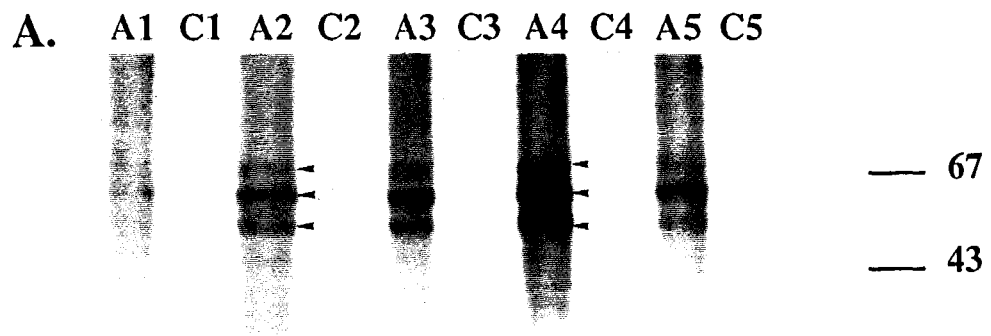
protéines tau détectée par AD2. Ce dernier détecte les tau-PHF lorsque moins de 10 µg de protéines totales sont déposées sur électrophorèse (M&M, p. 140).

AD2 détecte le triplet tau pathologique constitué des protéines tau 55, 64 et 69 dans les cas Alzheimer (Figure 17 A). De plus, AD2 détecte des traînées qui sont probablement des structures partiellement solubilisées dérivant des PHF. Ces traînées sont spécifiques du tissu pathologique, puisqu'elles ne sont pas rencontrées dans les homogénats de cerveau de sujets témoins. AD2 ne marque aucune autre protéine, comme les neurofilaments ou d'autres MAPs. Dans le tissu sain autopsié, aucune immunodétection n'est observée (Figure 17 A).

Pour confirmer la spécificité de cet anticorps, nous avons comparé son marquage à celui des sondes immunologiques monoclonales dépendantes de la phosphorylation (Tau-1 et SMI 34) et polyclonales dirigées contre les protéines tau (M19G et S28T). Les mêmes échantillons sont déposés sur électrophorèse, puis transférés sur membrane avant l'incubation avec les différents anticorps.

L'anticorps Tau-1, qui reconnaît la séquence 192-204 lorsque les sérines 199 et 202 sont déphosphorylées, ne marque que le groupe des protéines tau normales dans les échantillons Alzheimer et témoins (Figure 17 B). Il faut cependant noter que le marquage obtenu avec Tau-1 est plus intense dans les échantillons témoins que dans les échantillons Alzheimer. Ces résultats suggèrent qu'une partie des protéines tau normales dans le cerveau de patient atteint de MA est agrégée dans les PHF et est phosphorylée au site de Tau-1.

Les anticorps M19G et S28T sont des anticorps polyclonaux qui sont respectivement dirigés contre les séquences 1-19 et 400-427 de l'isoforme longue des protéines tau humaines (Giannakopoulos *et al.*, 1994b; Sautière *et al.*, 1994). Ils détectent le triplet pathologique et les protéines tau normales dans les homogénats de cerveaux de patients atteints de la MA, ainsi que le groupe des protéines tau normales dans les



échantillons témoins (**Figure 17 C et D**). Cette comparaison permet d'affirmer que l'anticorps AD2 est spécifique du triplet de protéines tau-PHF.

Le dernier anticorps utilisé est l'anticorps anti-neurofilament, SMI 34 . Il marque les neurofilaments H et M (Sternberger *et al.*, 1985). La recherche de son épitope sur les protéines tau a montré qu'il est conformationnel, et se situe entre les sérines 235 et 396. Sa fixation est dépendante de l'état de phosphorylation des protéines tau (Lichtenberg-Kraag *et al.*, 1992). Dans les homogénats totaux de cerveaux témoins, il détecte les neurofilaments. Pour les cas Alzheimer, il détecte en plus des neurofilaments, le triplet pathologique, avec une intensité relativement faible (**Figure 17 E**).

Les résultats obtenus avec les différentes sondes immunologiques montrent que AD2 est une sonde spécifique des tau-PHF, donc de la dégénérescence neuronale de type Alzheimer. Il ne détecte que le triplet de tau-PHF, et aucune autre protéine du cytosquelette. De plus, les caractéristiques de SMI34 (épitope phosphorylé) et Tau-1 (épitope déphosphorylé) laissent suggérer que l'épitope d'AD2 est dépendant de la phosphorylation.

Précédemment, nous avons décrit des sondes immunologiques qui ont servi à mettre en évidence des sites de phosphorylation, comme AT8, AT180, AT270 (Mercken *et al.*, 1992; Goedert *et al.*, 1994). Ces sondes marquent difficilement les tau-PHF dans des homogénats totaux de cerveaux de patients atteints de MA, puisqu'elles sont en faible quantité. Ils détectent mieux les tau-PHF purifiées, ou les protéines tau recombinantes phosphorylées *in vitro* (Biernat *et al.*, 1992; Lichtenberg-Kraag *et al.*, 1992; Goedert *et al.*, 1994; Otvos *et al.*, 1994). AD2 est donc une sonde plus sensible, puisqu'il détecte les tau-PHF dans des homogénats totaux. Ce type d'outil immunologique permet une analyse directe et rapide du cortex cérébral, sans faire de purification des protéines tau-PHF.

## II- 2- Anticorps dépendant de la phosphorylation:

Etant donnée la spécificité de l'anticorps AD2 pour les tau-PHF et le marquage obtenu avec Tau-1 et SMI 34, la liaison de la sonde immunologique AD2 semble dépendante de la phosphorylation de son épitope. Pour vérifier cela, nous avons analysé l'action de la phosphatase alcaline sur des homogénats totaux de cerveaux de patients atteints de MA et de sujets témoins autopsiés. Si le marquage de l'anticorps est lié à la phosphorylation de son épitope, alors l'action de la phosphatase alcaline devrait l'éliminer. De plus, si la déphosphorylation des échantillons a lieu avant l'électrophorèse, elle va induire une augmentation de la migration électrophorétique conduisant à une diminution de la masse moléculaire apparente des protéines tau.

Nous avons donc eu deux approches, quant à l'action de la phosphatase alcaline:

\* La déphosphorylation d'homogénats totaux de cerveau de patients atteints de MA, après électrophorèse et transfert sur membrane de nitrocellulose: différentes quantités de protéines totales d'un homogénat de cerveau Alzheimer (100, 50 et 20 µg) sont déposées sur électrophorèse. Après transfert sur membrane de nitrocellulose, les différents puits sont incubés ou non avec la phosphatase alcaline. Une fois la réaction terminée, la membrane de nitrocellulose rincée est incubée avec les différents anticorps.

\* Une déphosphorylation des homogénats totaux témoins et Alzheimer, avant dépôt sur électrophorèse: Les homogénats traités par la solution de Laemmli (Laemmli, 1970) sont dialysés contre un tampon Tris 50 mM toute une nuit, avant d'être incubés avec la phosphatase alcaline, à 37°C pendant 4 heures. La réaction est ensuite arrêtée, en ajoutant un volume égal de solution de Laemmli et en chauffant à 100°C. Les échantillons sont alors déposés sur électrophorèse et analysés par la technique des immunoempreintes.

## II- 2- 1- Déphosphorylation après électrophorèse et transfert sur membrane de nitrocellulose:

### *II- 2- 1- 1- Tau-1:*

Tau-1 ne marque pas le triplet de tau-PHF quand celui-ci est natif. Il ne détecte que le groupe des protéines tau normales, pour 100 et 50 µg de protéines totales déposées. Aucune détection des protéines tau normales n'est visible, pour 20 µg de protéines totales déposées (**Figure 18 A**). Lorsque les différentes quantités de l'homogénat de cerveau Alzheimer sont déphosphorylées, Tau-1 marque le triplet de tau-PHF déphosphorylé. Ce marquage est visible si 100 et 50 µg de protéines totales cérébrales sont déposées. Aucune détection du triplet déphosphorylé n'est visible pour 20 µg de protéines totales déposées (**Figure 18 A**) (M&M, p. 149).

### *II- 2- 1- 2- AD2:*

Lorsque la membrane de nitrocellulose n'est pas incubée avec la phosphatase alcaline, AD2 marque très nettement les tau-PHF pour les trois quantités de protéines totales déposées. Lorsque la membrane est incubée avec la phosphatase alcaline, le marquage obtenu avec AD2 est différent. En effet, le marquage est beaucoup plus faible pour les quantités 100 et 50 déphosphorylées, par rapport à celles non déphosphorylées. Par contre, l'immunodétection a totalement disparu lorsque 20 µg de protéine totales ont été déposées et déphosphorylées (**Figure 18 A**).

## II- 2- 2- Déphosphorylation avant électrophorèse:

### *II- 2- 2- 1- Tau-1:*

Nous avons déposé 20 µg de protéines totales d'homogénat de cerveau Alzheimer, non déphosphorylées. Pour cet homogénat, Tau-1 ne détecte pas les protéines tau normales (**Figure 18 B**). Ce résultat suggère qu'une partie des protéines tau normales est phosphorylée au site de Tau-1 et est agrégée dans les PHF. Lorsque l'échantillon est déphosphorylé, l'anticorps détecte un groupe de protéines tau dont la migration électrophorétique est augmentée. Cet ensemble de protéines déphosphorylées co-migrent avec les protéines tau normales (**Figure 18 B**). La déphosphorylation de l'échantillon s'est donc bien déroulée. La même expérience est réalisée sur du tissu sain. Lorsque l'échantillon n'est pas déphosphorylé, Tau-1 marque les protéines tau normales (**Figure 18 B**). Après déphosphorylation, l'immunoréactivité de Tau-1 est augmentée. L'anticorps détecte un groupe de protéines tau dont la masse moléculaire apparente est inférieure à celle des protéines tau normales, suggérant que les protéines tau normales autopsiées sont elles-même phosphorylées au site de Tau-1 (**Figure 18 B**) (M&M, p. 148).

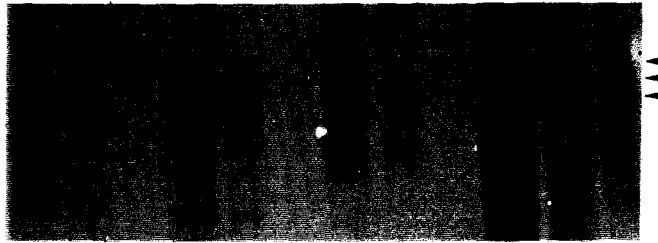
### *II- 2- 2- 2- AD2:*

Lorsque l'homogénat Alzheimer n'est pas déphosphorylé, AD2 détecte le triplet de tau-PHF, que l'échantillon soit déposé immédiatement après dialyse ou incubé 4 heures à 37°C, sans phosphatase alcaline (**Figure 18 B**). Ce résultat indique donc qu'il n'y a pas eu de protéolyse pendant l'incubation de 4 heures, à 37°C. Par contre, lorsque l'échantillon Alzheimer est déphosphorylé, AD2 ne détecte rien, à l'exception de traînées (**Figure 18 B**). Ces traînées représentent du matériel insoluble partiellement déphosphorylé.

**A.**

Protein amounts  
(in  $\mu\text{g}$ )  
Phosphatase

100 50 20 100 50 20 100 50 20 100 50 20  
- - - + + + + + + - - -



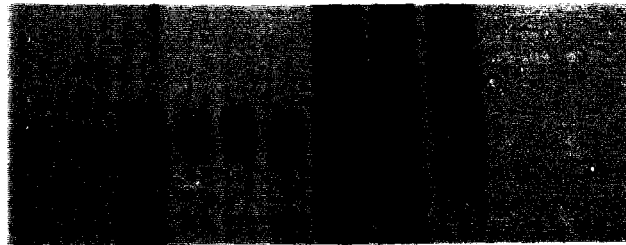
TAU-1

AD2

**B.**

Phosphatase

A A A C C C A A A C C C  
- + - + - + - + - +



TAU-1

AD2



La même expérience de déphosphorylation est effectuée sur un homogénat de tissu cérébral témoin. Dans ce cas, que l'échantillon soit déphosphorylé ou non ne change rien au marquage obtenu avec AD2, puisqu'il est négatif dans tous les cas (**Figure 18 B**).

### II- 2- 3- Conclusion:

Ces résultats montrent que la liaison de l'anticorps AD2 dépend de la phosphorylation de son épitope sur les tau-PHF. En effet, le marquage du triplet de tau-PHF obtenu avec AD2 est aboli après action de la phosphatase alcaline, quelque soit la méthode utilisée. Ces expériences de déphosphorylation vérifiées par l'anticorps Tau-1, montrent que AD2 ressemble à un certain nombre d'autres anticorps déjà décrits (AT8, AT100, AT180, AT270, PHF-1). Au même titre que les autres, AD2 va nous permettre de décrire un site d'hyperphosphorylation présent sur les tau-PHF.

### II- 3- Expression de l'épitope lors du développement chez le rat:

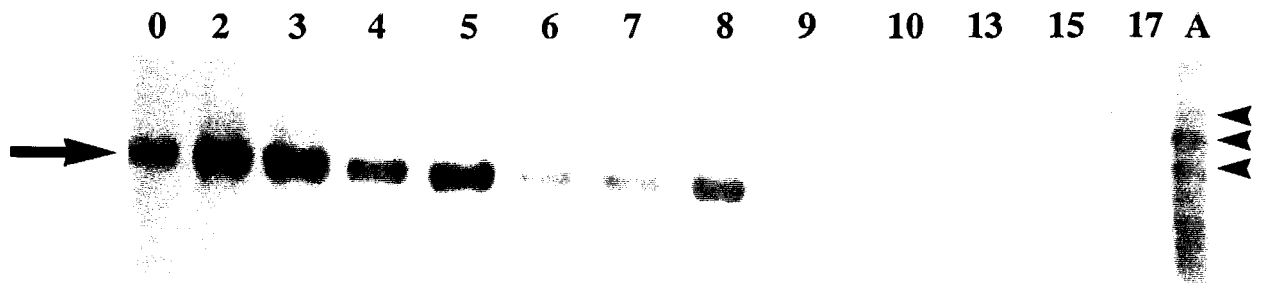
Etant donné que l'anticorps AD2 reconnaît spécifiquement les tau-PHF, nous voulons déterminer à présent si AD2 détecte les protéines tau dans d'autres espèces animales. Nous avons pu montrer qu'il marque les protéines tau du rat, du porc et du bœuf essentiellement. Chez le mouton, le marquage était très faible. Vus nos résultats sur les différentes espèces et pour des raisons de facilité, nous avons choisi de réaliser une étude sur l'expression de l'épitope d'AD2 chez le rat.

## II- 3- 1- Expression de l'épitope dans du tissu cérébral de rat avec délai post-mortem:

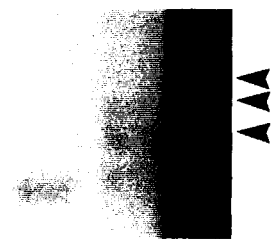
A cette période, de nombreuses études montrent que des anticorps monoclonaux spécifiques du triplet de protéines tau trouvé dans la MA, détectent les protéines tau dans d'autres espèces au cours du développement. Ainsi Pope *et al.* (1993) montrent que l'épitope de PHF-1 est présent dans les cellules de rétine de l'embryon de poulet (E6: embryon de 6 jours). A P0 (jour de l'éclosion), le signal est toujours présent, mais à P42 le signal est totalement aboli. Les auteurs montrent que l'épitope de PHF-1 est surtout exprimé au niveau de l'axone, de façon transitoire suggérant son rôle dans la formation précoce de l'axone. D'autres études révèlent que des résidus comme les Ser 202, Thr 231 et Ser 396 sont phosphorylés chez le fœtus. Cette phosphorylation est régulée pendant le développement et entraînerait une diminution de l'affinité aux microtubules (Bramblett *et al.*, 1993; Goedert *et al.*, 1993; Hasegawa *et al.*, 1993; Watanabe *et al.*, 1993).

Afin de savoir si la phosphorylation de l'épitope d'AD2 est également régulée lors du développement, nous avons entrepris une étude biochimique et immunohistochimique d'apparition et de disparition de l'épitope d'AD2 en fonction de l'âge chez le rat. Pour cela, nous avons réalisé un élevage de rats Wistar, sacrifiés aux jours voulus (toujours après leur naissance: de P0 à P730), par décapitation. Après avoir décapité un rat, un hémisphère est immédiatement plongé dans une solution contenant 4% de paraformaldéhyde pour l'étude immunohistochimique; l'autre hémisphère cérébral est conservé pour l'étude biochimique. A ce moment de la thèse, nous ne prenons pas garde à la durée du délai post-mortem. Ce temps est donc différent d'un hémisphère à un autre. La variation n'est certes pas énorme entre deux cerveaux mais, elle dépend néanmoins du nombre d'animaux sacrifiés par séance, notamment pour les rats adultes. Ainsi, la durée moyenne de l'extraction à l'homogénéisation avant l'analyse est d'environ 45 min.

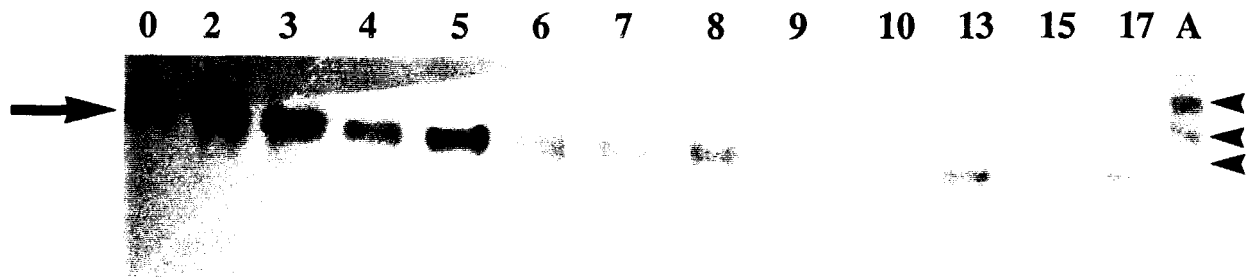
A



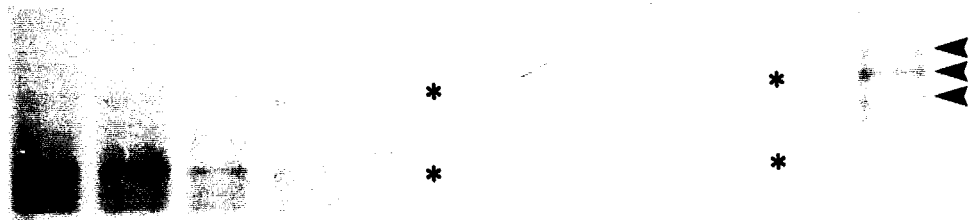
19 21 23 30 37 42 49 72 105 270 A



B



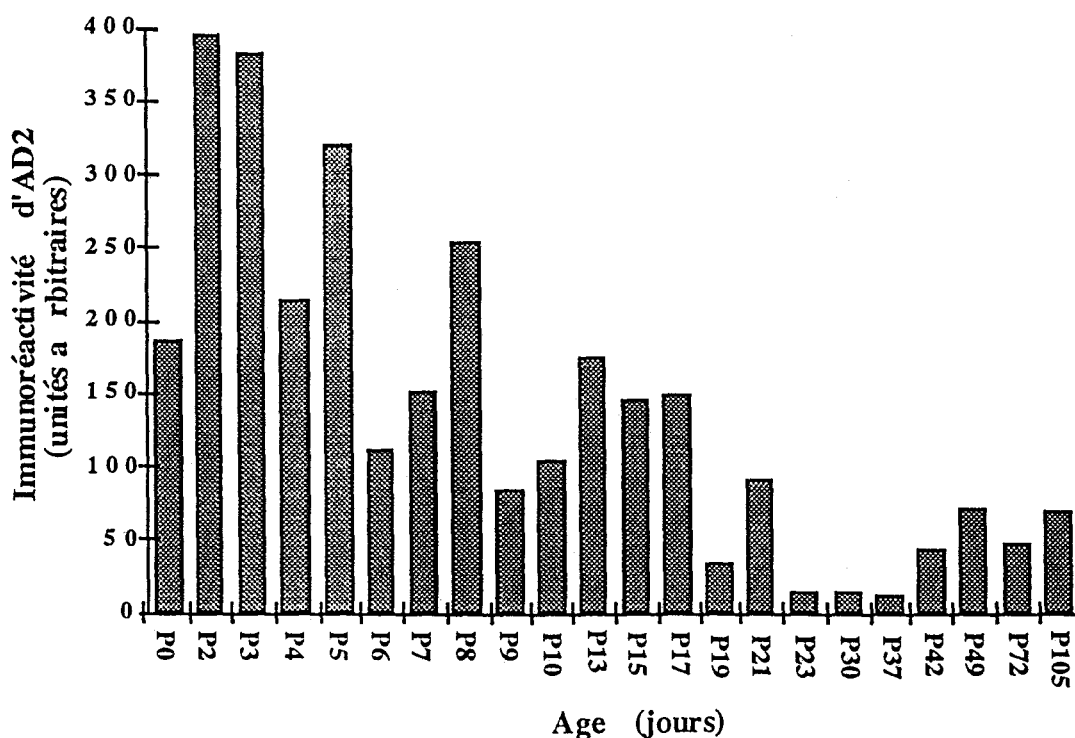
19 21 23 30 37 42 49 72 105 270 A



### II- 3- 1- 1- Etude biochimique:

Les cerveaux de rats sacrifiés au jour voulu sont homogénéisés dans la solution de Laemmli dans un rapport 1/10 (p/v), puis chauffés à 100°C pendant 10 min (Laemmli, 1970). Les différents échantillons sont ensuite déposés sur électrophorèse en gel de polyacrylamide 10-20%. Les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose, avant d'être incubées avec AD2. Les résultats obtenus montrent que l'anticorps AD2 marque une bande de façon très intense dès P0 (**Figure 19 A**). Elle correspond à l'isoforme "fœtale" des protéines tau qui se situe vers 50 kDa. Cette protéine présente la même immunoréactivité pour AD2 jusque P8. L'immunoréactivité diminue à P9 puis semble disparaître à P21. Pour les rats plus âgés, AD2 détecte un groupe de protéines, qui semble correspondre aux protéines tau normales adultes (**Figure 19 A**). L'intensité du marquage est cependant bien plus faible, suggérant que seule une fraction des protéines tau est phosphorylée (M&M, p. 149).

Graphe 1



JOURS

0 2 3 4 5 6 7 8 9 10 13 15 Alz



JOURS

17 19 21 23 30 37 42 49 73 105 270 Alz



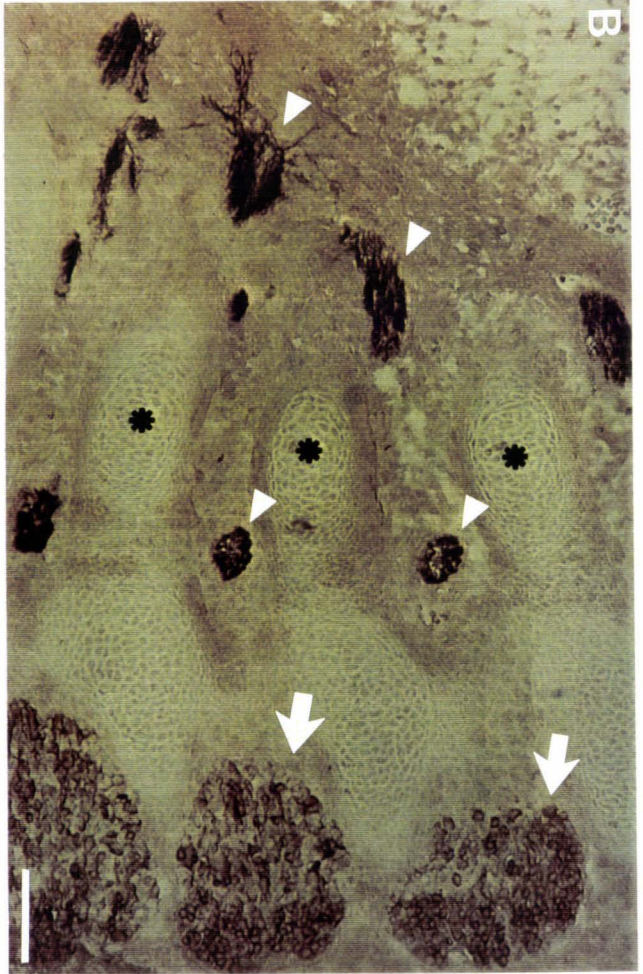
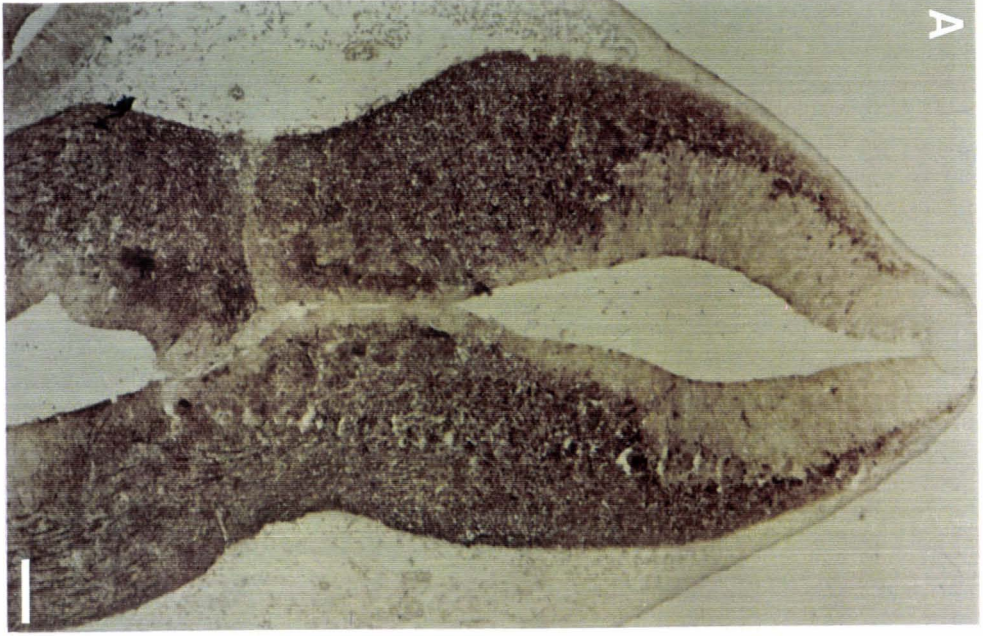
Nous avons réalisé une quantification de l'immunoréactivité des protéines tau pour AD2 en fonction de l'âge (Graphe 1). A l'exception de P0, l'histogramme indique que l'immunoréactivité pour AD2 diminue globalement en fonction de l'âge. Il existe parfois des variations d'intensité entre les âges, qui peuvent s'expliquer par une hétérogénéité du signal due à des différences inter-individus. Des variations de temps dans les extractions de cerveaux peuvent également expliquer les différences observées.

Un anticorps polyclonal anti-tau est également utilisé. Il détecte toutes les protéines tau. L'apparition des isoformes adultes de protéines tau au cours du développement, se traduit par un ralentissement de leur migration électrophorétique et une augmentation de leur masse moléculaire (**Figure 19 B**). Ce phénomène est très visible, si le marquage obtenu par l'anti-tau à P17 est comparé à celui obtenu à P270.

Nous avons également utilisé AD1 sur ces échantillons de cerveau de rats. Il marque une protéine tau à 50 kDa. Le marquage s'estompe très vite avec l'âge. Le marquage le plus intense est obtenu pour les neurofilaments H et M (**Figure 20**).

AD2 marque les protéines tau de rats lorsqu'ils sont très jeunes. Lorsque les rats sont sevrés, ce marquage disparaît. Une quantification de l'immunoréactivité montre également cette diminution du marquage. Ce résultat suggère donc que l'épitope de l'anticorps AD2 joue un rôle dans le développement. L'étude immunohistochimique nous permettra de connaître la localisation des protéines tau grâce au marquage obtenu par AD2. La disparition du marquage coïncide avec le sevrage, mais il réapparaît lorsque les rats sont plus âgés. A cette période de notre thèse, une étude sur les sites de phosphorylation des protéines tau avait été effectuée chez le rat (Watanabe *et al.*, 1993). Les auteurs avaient comparé l'état de phosphorylation entre les protéines tau "fœtales" et les protéines tau de cerveaux de rats adultes. Leurs résultats montraient qu'il existe une différence de phosphorylation. Les protéines tau "fœtales" seraient beaucoup plus





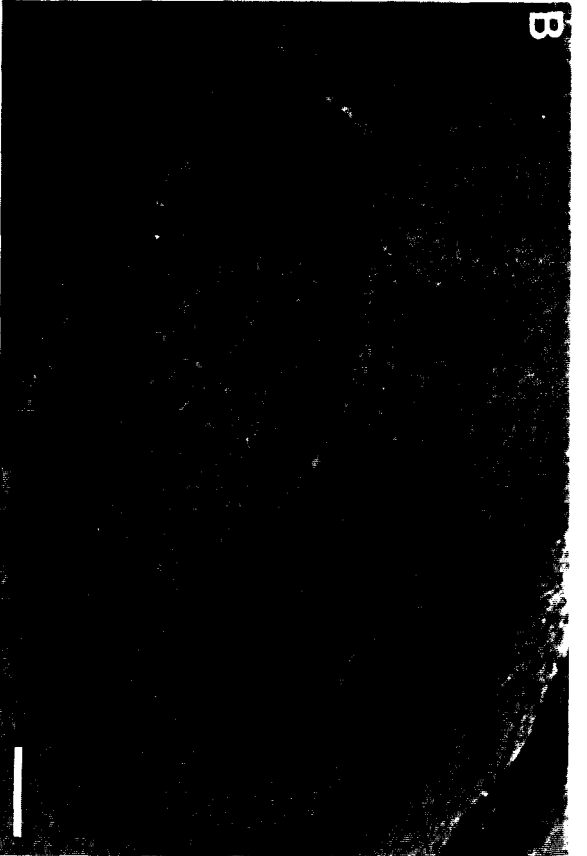
phosphorylées que les protéines tau adultes. Une autre étude a également suggéré que l'expression des protéines phosphatases est régulée au cours du développement. La protéine phosphatase étudiée, la calcineurine ne semble être exprimée qu'après P7 (Polli *et al.*, 1991). Si les phosphatases ne sont pas exprimées avant un certain temps, la déphosphorylation des protéines n'est pas possible. Les anticorps dépendants de la phosphorylation vont alors facilement détecter les protéines. La phosphorylation des protéines tau est cependant hétérogène, et certains sites restent phosphorylés chez l'adulte (notamment les Ser 396, 404) (Watanabe *et al.*, 1993). Néanmoins, seule une fraction des protéines tau adultes est phosphorylée. Si une fraction des protéines possède des sites phosphorylés, il n'est pas étonnant d'obtenir un marquage même très faible des protéines tau chez le rat adulte, avec AD2.

### *II- 3- 1- 2- Etude immunohistochimique:*

Nous avons eu la possibilité de travailler sur des coupes d'embryon de rat à 14-15 jours de gestation, fournies par le Dr. E. Maubert (Caen, France) (Maubert *et al.*, 1994). Le marquage obtenu par AD2 est très intense au niveau du système nerveux. Il se situe au niveau de la région du tube neural, et la plupart des structures qui composent le tube neural sont fortement marquées (**Figure 21 A**). Deux zones peuvent être distinguées: une zone centrale non marquée par AD2, qui correspond aux cellules qui n'ont pas encore migré et qui ne sont pas différenciées, et une zone plus périphérique détectée par AD2 qui représente les cellules nerveuses qui ont migré et qui sont différenciées. Ces résultats suggèrent donc un rôle de la phosphorylation de l'épitope dans la différenciation lors du développement. Les racines rachidiennes, les ganglions spinaux dorsaux et la chaîne paravertébrale sont également fortement marqués (**Figure 21 B et C**) (M&M, p. 152).

Des coupes histologiques de cerveaux de rats sacrifiés après la naissance, ont été également effectuées. En effet, après le sacrifice du rat, un hémisphère est immédiatement





plongé dans une solution à 4% de paraformaldéhyde pendant 24 heures. Le bloc est ensuite mis dans une solution de sucrose, puis inclus dans du Tissu-Tek avant d'être stocké à -80°C. Les coupes de cerveau sont réalisées sur cryostat et récupérées sur lames gélatinées. Elles sont ensuite incubées avec l'anticorps. En parallèle à l'étude immunohistochimique, des colorations au bleu de toluidine sont effectuées afin de visualiser l'évolution de la cytoarchitecture au cours du développement. Nous nous sommes alors focalisés sur l'hippocampe qui est une région assez caractéristique. Les études réalisées sur le tissu post-natal nous ont permis d'aborder les techniques d'immunofluorescence. Du cerveau de rat sacrifié au deuxième jour de la naissance (P2) au cerveau de rat sacrifié au cinquième jour après la naissance (P5), un marquage diffus et fibreux est retrouvé (**Figure 22 A et B**). Les corps cellulaires ne sont pas marqués, seules les fibres nerveuses le sont. Sur un cerveau de rat sacrifié au quinzième jour après la naissance, le marquage est nettement diminué, mais quelques fibres restent cependant marquées (**Figure 22 C**).

Comme pour les résultats biochimiques, l'étude immunohistochimique montre que l'anticorps AD2 marque le système nerveux chez le rat. Le marquage est très fort chez l'embryon et les rats jeunes. Chez l'embryon, l'anticorps détecte le tube neural et les structures qui le composent, les ganglions spinaux dorsaux et les fibres émergeant de ces ganglions. Après la naissance, le marquage est essentiellement neuritique. Il semble qu'aucun corps cellulaire ne soit marqué. Ces résultats sont en accord avec ceux de Fawcett *et al.* (1994). Les auteurs montraient en effet, que des anticorps anti-tau marquent le système nerveux dans des embryons de rat au quinzième jour de gestation. Ils détectent la région du tube neural, les ganglions rachidiens dorsaux, les racines rachidiennes. Ils marquent également la partie distale de nerfs périphériques au niveau de cônes de croissance axonale. Le marquage obtenu avec AD2 est similaire et montre que son épitope est phosphorylé au cours du développement chez le rat. La phosphorylation au

site d'AD2 semble donc jouer un rôle au cours du développement, et notamment dans la croissance neuritique.

## II- 3- 2- Etude de l'expression de l'épitope dans du tissu cérébral de rat sans délai post-mortem:

Matsuo *et al.* (1994) ont montré, que la phosphorylation des protéines tau-PHF pouvait être retrouvée dans des cerveaux sains humains. Ce genre d'étude (sans délai post-mortem) a été également réalisé chez le rat adulte, et les résultats montrent la présence de protéines tau hyperphosphorylées dans le tissu cérébral (Garver *et al.*, 1994; Mawal-Dewan *et al.*, 1994; Matsuo *et al.*, 1994).

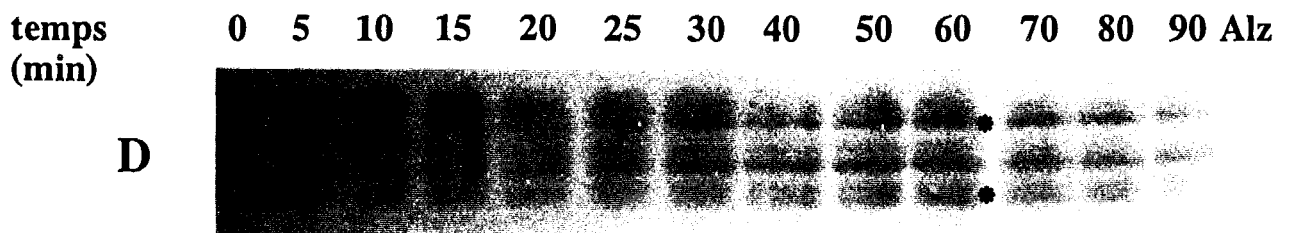
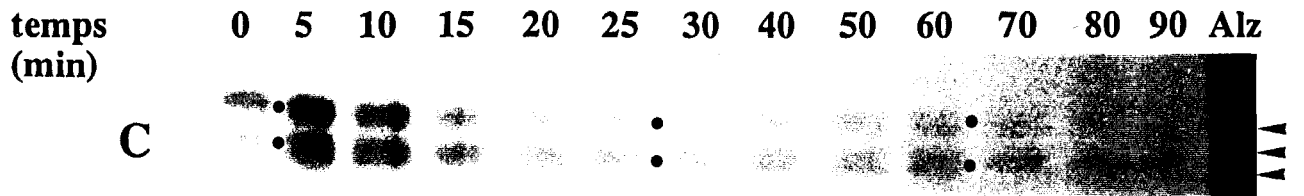
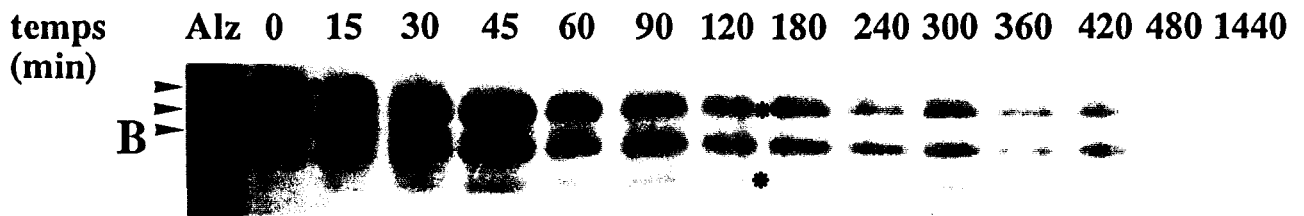
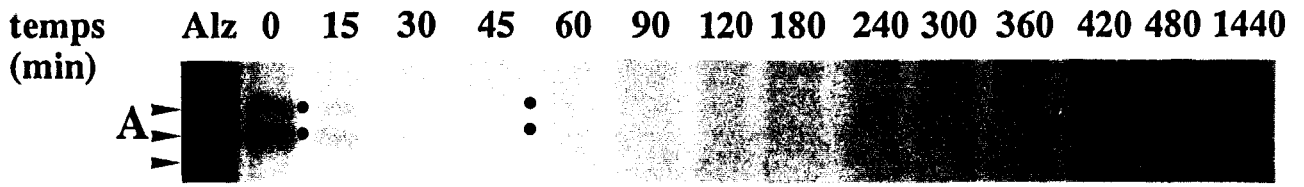
Nous avons donc entrepris une étude sur des cerveaux de rats adultes (11 mois et plus de 12 mois), pour voir si l'épitope d'AD2 est également retrouvé. Après avoir décapité le rat, son cerveau est extrait de la boîte crânienne en moins de 2 min et directement plongé dans l'azote liquide jusqu'à homogénéisation dans la solution de Laemmli. En parallèle à cette étude, nous réalisons une cinétique de déphosphorylation. Pour cela, des cerveaux placés dans l'azote liquide sont homogénéisés dans un tampon Tris contenant des inhibiteurs de protéases (1/5; p/v). L'homogénat est ensuite laissé à température ambiante pendant 24 heures. Des fractions sont prélevées à différents temps d'incubation (entre 0 et 24 heures) et mélangées à la solution de Laemmli (1/2; v/v), puis chauffées 10 min à 100°C avant d'être déposées sur électrophorèse en gel de polyacrylamide. Après transfert sur membrane de nitrocellulose, les protéines sont incubées avec les anticorps AD2, Tau-1 ou M19G.

Les résultats montrent que la déphosphorylation est très rapide, et qu'en moins de 2 heures, elle est complète. En effet, AD2 détecte un ensemble de protéines tau de masse moléculaire légèrement supérieure à celle des protéines tau 55, 64 et 69 du triplet

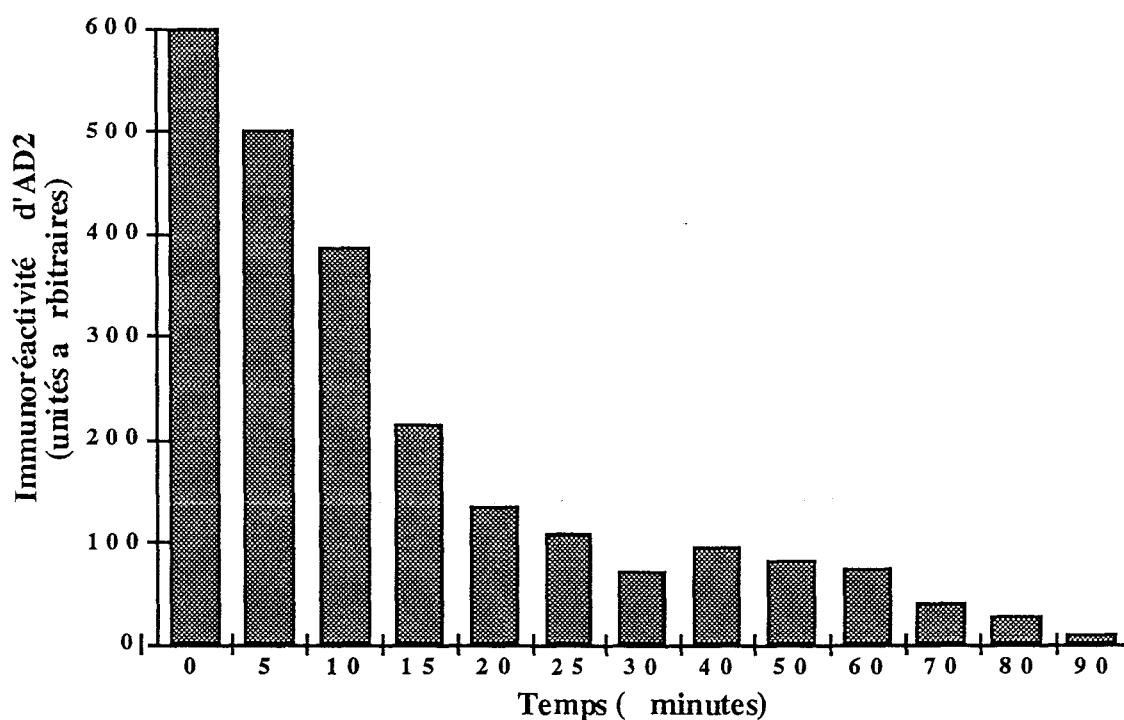
pathologique, pendant la première heure (**Figure 23 A**). Plus aucun marquage n'est observé pour des temps plus longs (jusque 24 heures) (**Figure 23 A**). Pour vérifier qu'il s'agit d'une déphosphorylation et non d'une protéolyse, nous avons incubé la même membrane de nitrocellulose avec l'anticorps polyclonal M19G. Cet anticorps indépendant de la phosphorylation détecte les protéines tau dans tous les couloirs (**Figure 23 B**). Le marquage obtenu par cet anticorps montre qu'il y a eu déphosphorylation, puisqu'un ralentissement de la migration électrophorétique peut être observé. Ce résultat suggère donc qu'une déphosphorylation des protéines tau par des phosphatases endogènes s'est effectivement déroulée, entraînant une diminution de la masse moléculaire apparente. Cependant, il faut également noter qu'après 4 heures d'incubation, une protéolyse du tissu apparaît (M&M, p. 150).

Aussi, nous avons réalisé une étude cinétique sur 90 min. La même technique est utilisée et les temps d'incubation varient entre 0 et 90 min. Les résultats obtenus avec AD2 montrent que l'anticorps détecte toujours le groupe de protéines tau au début de la cinétique. La bande la plus basse est beaucoup moins marquée par l'anticorps AD2. Cependant, l'immunoréactivité diminue au fur et à mesure de la cinétique (**Figure 23 C**).

Nous avons réalisé une quantification de l'immunoréactivité des protéines tau pour AD2. L'histogramme (**Graphe 2**) montre une diminution nette de l'immunoréactivité entre 0 et 90 min. Cette diminution est très rapide entre 0 et 30 min, puisque l'immunoréactivité chute d'un facteur 6. Ensuite, la diminution est beaucoup moins nette.



Graphe 2

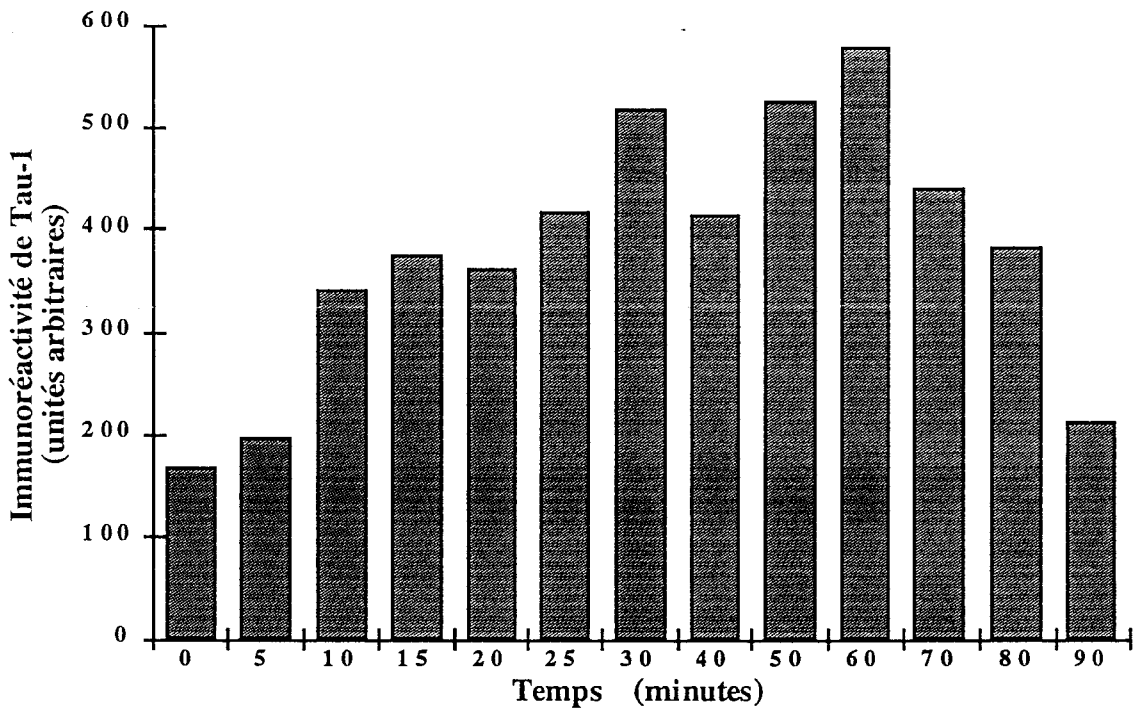


Pour montrer que la perte d'immunoréactivité est bien liée à une déphosphorylation, nous avons utilisé l'anticorps Tau-1 sur les mêmes échantillons. Tau-1 qui se fixe sur les protéines tau déphosphorylées au niveau des Ser 199 et 202, détecte un groupe de protéines tau plus important que l'anticorps AD2. Il marque en plus du groupe de protéines tau reconnues par AD2, une bande mineure de plus faible masse moléculaire, au cours de la cinétique. Le marquage obtenu avec cet anticorps montre également que la déphosphorylation des différents échantillons entraîne une augmentation de leur migration électrophorétique (**Figure 23 D**).

Nous avons également quantifié l'immunoréactivité des protéines pour Tau-1 (**Graphe 3**). A l'inverse de l'anticorps AD2, les résultats indiquent une augmentation globale de l'immunoréactivité, au cours du temps. Cependant, après 60 min d'incubation,

l'immunoréactivité diminue. Il semble qu'il y ait eu un début de protéolyse, entraînant une diminution de l'intensité du marquage de Tau-1.

Graphe 3



Ces résultats montrent donc qu'il existe une déphosphorylation très rapide menée par les protéines phosphatases endogènes du tissu cérébral. En moins de deux heures, les échantillons sont déphosphorylés. La quantification de l'immunoréactivité des protéines tau pour AD2 et Tau-1 montre que les protéines tau sont soumises à une déphosphorylation rapide au cours du délai post-mortem. Ces résultats confirment ceux obtenus par Matsuo *et al.* et Mawal-Dewan *et al.* en 1994. Ces expériences nous montrent que le délai post-mortem est très important dans l'étude de la phosphorylation des protéines tau normales. Il est cependant évident qu'il est difficile d'obtenir du tissu cérébral humain sain autopsié sans délai post-mortem, à l'exception de biopsies

cérébrales. De plus, la déphosphorylation qui se déroule dans un homogénat total de cerveau de rat ne reflète pas la réalité d'un délai post-mortem. En effet, les différents compartiments cellulaires sont mélangés entraînant des changements moléculaires très rapides (par exemple, déphosphorylation et protéolyse). Nous avons donc réalisé une expérience supplémentaire sur le rat.

Nous avons sélectionné des rats femelles et mâles adultes de même âge et leur avons injecté de l'hydrate de chloral à 600mg/kg en dose intrapéritoniale de 3 ml. Cette dose est létale pour le rat et provoque la mort en 5 min. Nous avons alors laissé les animaux sur le côté, pour mimer la réalité de l'autopsie chez l'homme. Nous avons alors réalisé une "cinétique d'autopsie", et les temps étaient compris entre 0 et 4 heures (0, 10, 20, 30, 45, 60 min, 2 et 4 heures). Pour chaque temps, un rat femelle et un rat mâle sont décapités et leurs cerveaux extraits en moins de 2 min, puis ils sont plongés dans l'azote liquide avant d'être homogénéisés dans la solution de Laemmli et analysés par la technique des immunoempreintes avec les anticorps AD2 et Tau-1. Sur les mêmes électrophorèses, nous avons déposé un homogénat total de cerveau de patient atteint de MA et un homogénat total de cerveau de rat à P5.

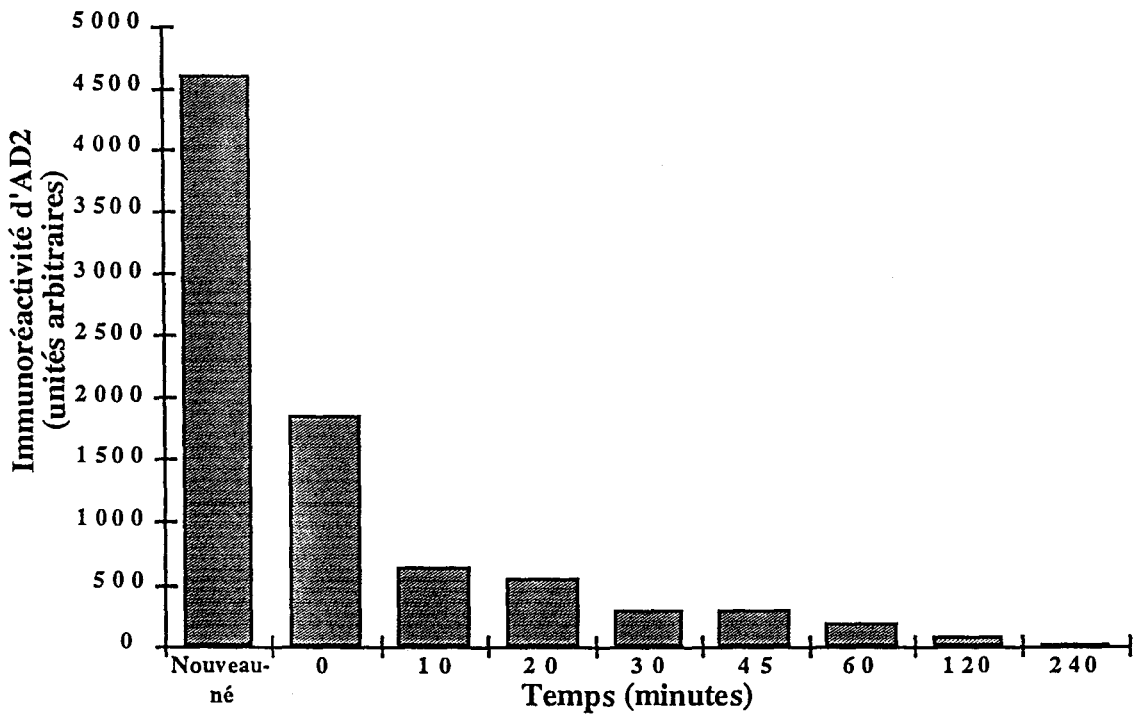
AD2 détecte très fortement l'isoforme de la protéine tau "fœtale" à P5, et les protéines tau hyperphosphorylées de rat adulte au temps 0 de la cinétique de déphosphorylation (**Figure 24 A**). Nous pouvons déjà remarquer que l'immunoréactivité de la protéine tau fœtale de rat P5 est nettement supérieure à celle du temps 0 de la cinétique de déphosphorylation. A 10 min, l'immunoréactivité est diminuée et ne cesse de l'être au cours de la cinétique. Il semble que le signal disparaisse entre 2 et 4 heures de cinétique. Cette expérience de déphosphorylation *in vivo* montre que la déphosphorylation est rapide, même lorsque le cerveau est laissé dans le corps de l'animal. Cette expérience reflète mieux la réalité du délai post-mortem rencontré lors



d'une autopsie. Il est clair que comparée à l'homogénat total, la déphosphorylation s'effectue plus lentement dans ces conditions post-mortem.

Nous avons quantifié l'immunoréactivité des protéines tau pour AD2 (**Grappe 4**). L'histogramme correspondant indique une diminution nette de l'immunoréactivité pour AD2, suggérant que la déphosphorylation est rapide au cours du délai post-mortem. Cette quantification montre également que la protéine tau fœtale à P5 (Nouveau-né) est nettement plus phosphorylée que la protéine tau adulte phosphorylée au temps 0 de la cinétique de déphosphorylation *in vivo*.

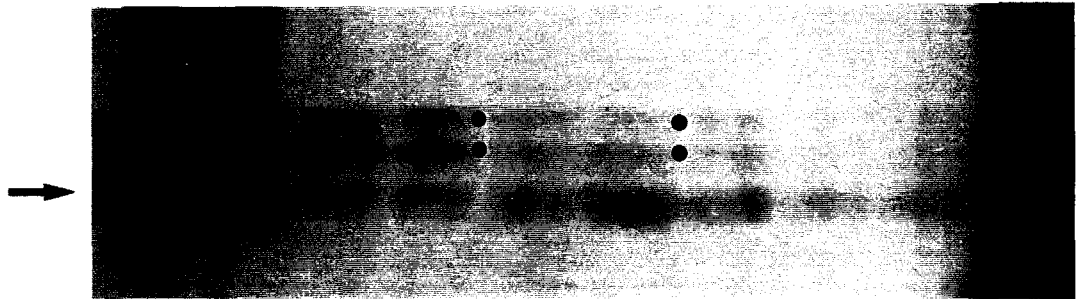
**Grappe 4**



# A

Temps (en min)

0 10 20 30 45 60 120 240 A



P5 P420

# B

Temps (en min)

0 10 20 30 45 60 120 240 A



P5 P420

L'anticorps Tau-1 a été également utilisé pour cette étude. Il permet de montrer que la déphosphorylation des protéines tau a eu lieu (**Figure 24 B**). L'anticorps détecte aussi la protéine tau fœtale de rat à P5, ainsi que l'ensemble des protéines tau adultes phosphorylées au temps 0 de la cinétique. A partir de 10 min de cinétique, l'immunoréactivité du groupe de protéines tau est intense, mais les protéines tau sont différentes de celles au temps 0 de la cinétique. En effet, il semble qu'une déphosphorylation ait déjà eu lieu, et ait entraîné une différence de mobilité électrophorétique des protéines tau. Au cours de la cinétique, cette mobilité augmente de plus en plus, elle est induite par la déphosphorylation des protéines tau.

Ces résultats montrent que le délai post-mortem joue un rôle très important sur la déphosphorylation des protéines tau. En effet, la déphosphorylation est très rapide; en moins de 4 heures, l'ensemble des protéines tau adultes phosphorylées est déphosphorylé. Cette déphosphorylation aboutit au groupe de protéines qualifiées de normales. Cette étude montre également que l'anticorps AD2 reste spécifique des protéines tau-PHF, puisque dès que la déphosphorylation est amorcée, son signal disparaît. Cette analyse représente également un moyen plus fiable pour l'étude de l'influence du délai post-mortem sur les protéines tau, puisqu'elle mime la réalité de l'autopsie. De plus, contrairement aux travaux de Matsuo *et al.* (1994) et Mawal-Dewan *et al.* (1994), ce travail a été réalisé sur des homogénats totaux de cerveau de rat, et non sur des préparations de protéines tau hyperphosphorylées. Il montre clairement qu'il existe des différences de phosphorylation au niveau des sites Ser/Thr-Pro pour les protéines tau hyperphosphorylées (à la fois AD2 et Tau-1 immunoréactives). Ces variations dans le degré de phosphorylation pourraient être liées à des rôles biologiques différents.

## II- 4- Caractérisation de l'épitope:

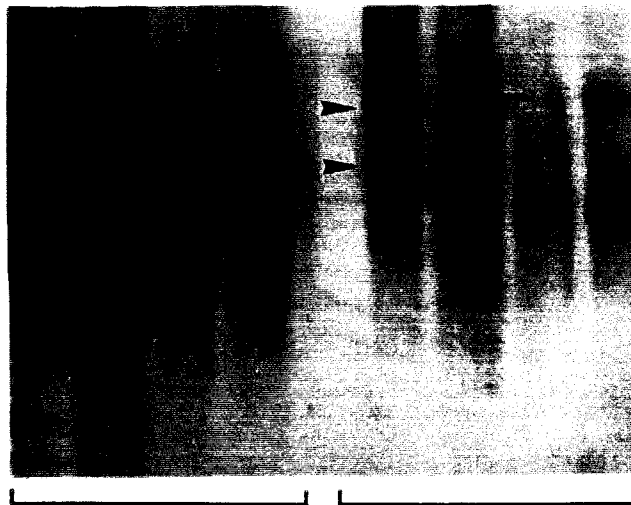
Jusqu'à présent nous avons décrit un anticorps qui est spécifique des tau-PHF rencontrées au cours de la MA. Il ne détecte pas les protéines tau normales de cerveaux adultes sains obtenus à l'autopsie. Cet anticorps est dépendant de la phosphorylation, sa fixation sur les tau-PHF nécessite que le motif reconnu soit phosphorylé. Il détecte les protéines tau dans différentes espèces animales, comme le rat, la souris, le bœuf, le porc et le mouton.

L'étape suivante est donc de déterminer la séquence de l'épitope d'AD2. Nous savons que la fixation de l'anticorps dépend de l'état de phosphorylation de son épitope. D'autre part, il existe différents types de phosphorylation (type neurofilament, type fœtal). Déterminer quel genre de phosphorylation est reconnu par AD2 peut nous aider dans la caractérisation de l'anticorps. C'est ce que nous développons dans les paragraphes suivants, pour arriver finalement à la caractérisation proprement dite de l'anticorps.

### II- 4- 1- Phosphorylation de type neurofilament:

Comme nous l'avons précédemment décrit, des anticorps anti-neurofilaments peuvent marquer les neurones en dégénérescence, suggérant que les neurofilaments sont associés aux PHF (Haugh *et al.*, 1986; Miller *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 1988). En fait, ce marquage pourrait être dû à l'existence de réactions croisées, car il existe des séquences communes entre protéines tau et neurofilaments (Ksiezak-Reding *et al.*, 1987; Nukina *et al.*, 1987). Ces séquences sont de type XKSPX ou XESPX. Une recherche d'homologie de séquence entre protéine tau et neurofilaments, montre que le motif XESPX est commun aux protéines tau et aux neurofilaments NF-L, alors que le motif XKSPX est commun aux protéines tau et aux neurofilaments NF-H et NF-M, où il est répété un grand

A2 A9 C9 C10      A2 A9 C9 C10



1/1000

1/5000

**SMI310**

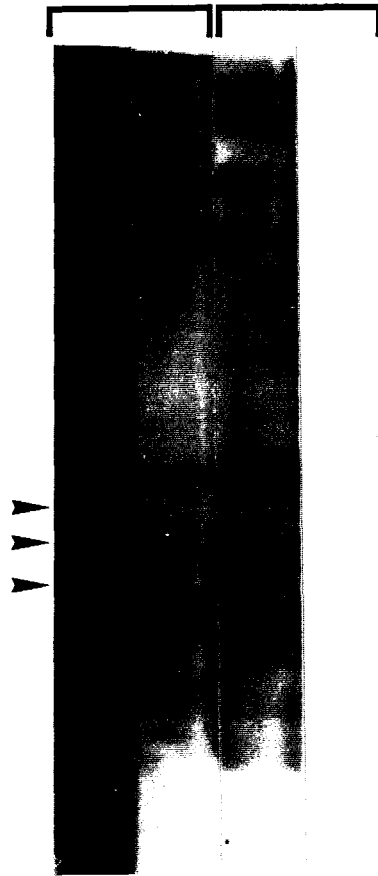
nombre de fois. A l'inverse des neurofilaments, les protéines tau ne renferment qu'un motif XESPX dans la partie amino-terminale, et un motif XKSPX dans la partie carboxy-terminale.

Certains anticorps monoclonaux anti-neurofilaments (SMI 31, SMI310, SMI 33 et SMI 34; Sternberger *et al.*, 1985) peuvent se lier aux protéines tau, au niveau de sites dépendants de la phosphorylation (Lichtenberg-Kraag *et al.*, 1992). D'autres anticorps comme l'anti-neurofilaments SMI 32 sont des anticorps indépendants de la phosphorylation (Lee *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 1989). En collaboration avec le Pr. Morrison et le Dr. Vickers, nous avons montré que les neurones de la région hippocampique chez les personnes âgées non démentes, étaient fortement marqués par des anticorps anti-neurofilaments (SMI 310 et 32), cette augmentation de marquage étant liée à l'âge. Ces résultats suggèrent que la région hippocampique est une région vulnérable à la DNF (Vickers *et al.*, 1994). Lors de cette étude, nous avons utilisé l'anticorps SMI310, qui est un anticorps monoclonal dépendant de la phosphorylation, dirigé contre les neurofilaments H et M. Il reconnaît également les protéines tau-PHF vraisemblablement au niveau du site KSPV (Lichtenberg-Kraag *et al.*, 1992). Nous avons pu montrer que le marquage des tau-PHF par cet anticorps dépend de sa dilution. Ainsi, à une dilution de 1:5000, seul le marquage des neurofilaments est observé, par contre pour une dilution de 1:1000, un marquage des neurofilaments et des tau-PHF peut être observé (**Figure 25**) (Vickers *et al.*, 1994).

Si des anticorps anti-neurofilaments peuvent marquer les neurones en dégénérescence, il est possible que des anticorps anti-tau puissent détecter les neurofilaments. Si l'anticorps détecte les neurofilaments, la localisation de son épitope sera plus aisée, étant donnée l'existence de séquences communes entre tau et neurofilaments. Il s'agit du raisonnement que nous avons eu avec AD1.

Alz

Nft



anti-  
Nft

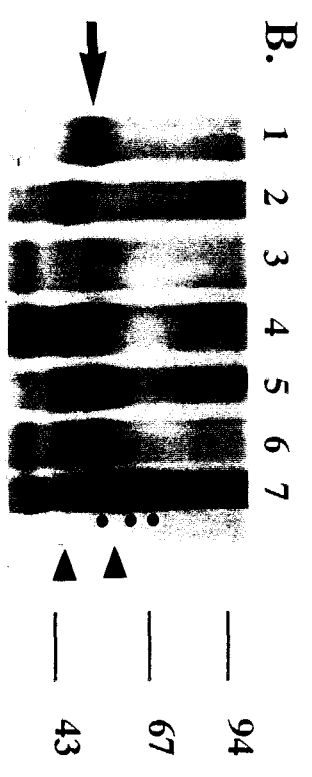
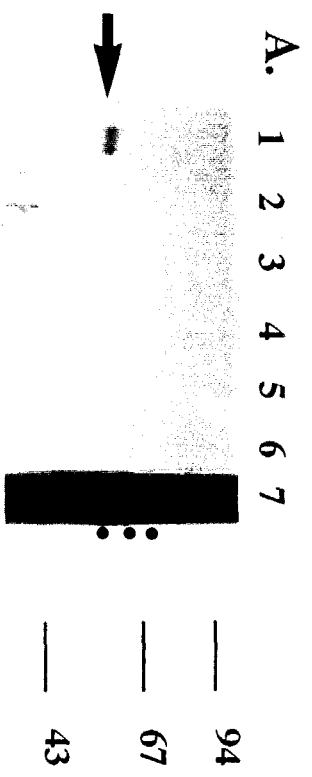
AD2

Sur des homogénats de cerveau de patients atteints de MA, AD2 ne détecte que le triplet de tau-PHF (**Figure 17 A**). Il ne détecte en aucun cas, les protéines tau normales de tissu cérébral sain obtenu à l'autopsie. Les différentes isoformes des neurofilaments ne sont pas marqués par AD2 ni dans les homogénats totaux de cerveaux de patients atteints de MA, ni dans le tissu cérébral sain obtenu à l'autopsie. Lorsqu'une préparation de neurofilaments de moelle épinière humaine est déposée sur électrophorèse et analysée par la technique des immunoempreintes, aucun marquage des différentes isoformes n'est obtenu avec AD2 (**Figure 26**). Ces résultats suggèrent que l'anticorps AD2 ne reconnaît pas les séquences communes aux protéines tau et aux neurofilaments. Contrairement à AD1, il est spécifique des protéines tau incorporées dans les PHF.

#### II- 4- 2- Phosphorylation de type fœtal:

En 1989, Ihara propose que les isoformes fœtales des protéines tau sont incorporées dans les PHF. En effet, cette expression de type fœtal permettrait aux neurones de survivre, en émettant de nouveaux prolongements. Cependant, Goedert *et al.* (1989b) montrent par des techniques de biologie moléculaire, la présence d'isoformes adultes au sein des neurones pyramidaux susceptibles de développer une DNF. Ces résultats suggèrent que ces isoformes (qui possèdent les quatre séquences répétitives dans leur partie carboxy-terminale) sont présentes au sein des PHF. En 1992, Kanemaru *et al.* montrent que la phosphorylation des tau-PHF au niveau de la Ser 404 est en fait de type fœtal. L'hypothèse de sites communs de phosphorylation entre tau-PHF et tau fœtale émerge alors. Nous savons déjà que l'anticorps AD2 reconnaît les protéines tau de rat très jeune. Nous avons alors vérifié que notre sonde immunologique reconnaît également un site de phosphorylation de type fœtal, chez l'homme.





Nous disposons au laboratoire d'une banque de tissu cérébral contenant quelques échantillons de tissu fœtal humain. Après dépôt sur électrophorèse et immunoempreintes, AD2 marque la protéine tau fœtale humaine vers 50 kDa, de façon assez intense dans des homogénats totaux de tissu cérébral fœtal humain (**Figure 27 A**). AD2 est donc dirigé contre un site de phosphorylation retrouvé chez le fœtus.

A ce moment de la thèse, sachant que l'anticorps ne détectait pas les protéines tau normales dans un tissu cérébral âgé sain obtenu à l'autopsie, nous voulions savoir si l'épitope persistait ou disparaissait rapidement avec l'âge. Nous disposons au laboratoire d'échantillons de cas témoins, avec des âges différents. Pour notre étude, nous avons choisi d'analyser le cortex frontal de différents cas autopsiés âgés de 2 mois à 65 ans. Après dépôt sur électrophorèse et immunoempreintes, nous avons pu comparer le marquage obtenu avec AD2 à celui observé dans le tissu fœtal humain et dans le cerveau d'un sujet atteint de MA. Dès l'âge de deux mois, le marquage disparaît et ne réapparaît pas chez l'adulte quelque soit l'âge (**Figure 27 A**). Le marquage par AD2 n'est visible que dans le fœtus et le malade Alzheimer. L'épitope reconnu par AD2 semble donc jouer dans le développement. Afin de vérifier l'existence des protéines tau normales au sein des échantillons étudiés, nous avons utilisé un anticorps polyclonal indépendant de la phosphorylation, M19G. Cet anticorps détecte les protéines tau normales dans tous les échantillons déposés (**Figure 27 B**).

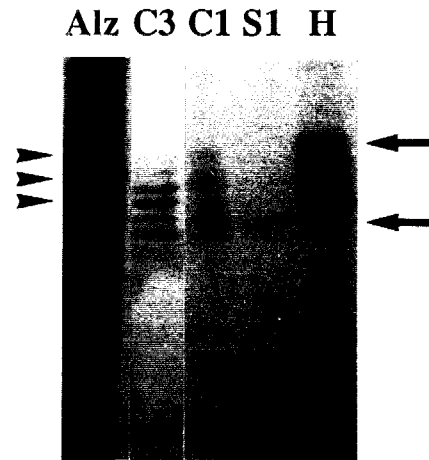
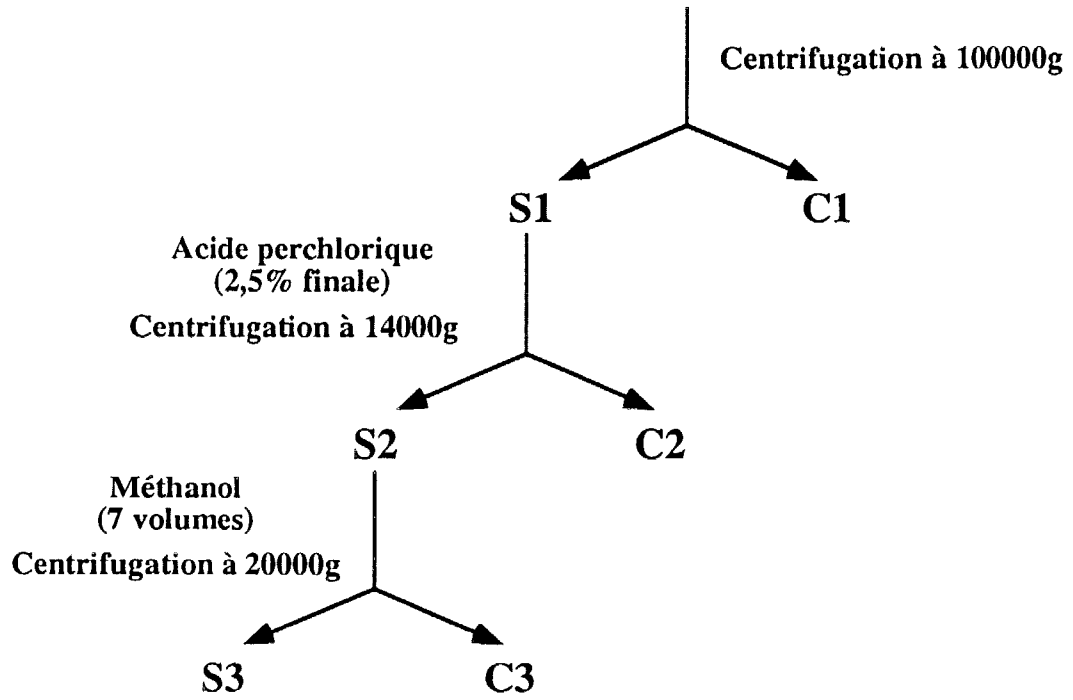
Il existe donc des sites communs de phosphorylation entre tau-PHF et protéines tau fœtales. Concernant AD2, la Ser 404 étant la première Ser décrite pour la phosphorylation de type fœtal, nos premières conclusions étaient donc de dire que AD2 reconnaissait la région de la Ser 404 (Kanemaru *et al.*, 1992). Ultérieurement, des études utilisant des anticorps monoclonaux dépendants de la phosphorylation, montrèrent que la plupart des sites Ser/Thr-Pro était retrouvée phosphorylés dans les protéines tau fœtales (Pope *et al.*, 1993; Bramblett *et al.*, 1993; Goedert *et al.*, 1993; Watanabe *et al.*, 1993; Morishima-

Kawashima *et al.*, 1995). AD2 est donc dirigé contre un site Ser/Thr-Pro phosphorylé, puisqu'il détecte les protéines tau fœtales et les tau-PHF.

#### II- 4- 3- Localisation de l'épitope:

L'étape suivante est donc de déterminer par cartographie peptidique, la localisation de l'épitope de AD2 sur les protéines tau. Mais déterminer le site de liaison à partir d'un homogénat total de cerveau de patient atteint de MA, n'est pas chose simple. En effet, nous savons que les protéines tau-PHF sont insolubles. Elles ne se solubilisent bien, que dans des tampons contenant au moins 5% de SDS. A de telles concentrations en détergent, des enzymes protéolytiques comme la trypsine ne peuvent pas agir. Aussi, il nous a semblé plus aisé de travailler sur du tissu fœtal. Cependant, l'obtention de tissu fœtal humain n'est pas facile, essentiellement pour des raisons éthiques. De plus, dans les deux cas (fœtus humain et Alzheimer) il s'agit de matériel rare, dans le sens où nous en avons peu. Sachant que l'anticorps AD2 reconnaît les protéines tau de cerveau de rat jeune, il nous semble plus facile de travailler sur un tel tissu. De plus, ce matériel est facile à obtenir par rapport au tissu humain. Finalement, travailler sur le cerveau de rat présente un autre avantage, celui d'une meilleure solubilité des protéines tau par rapport aux tau-PHF. Pour les expériences concernant la cartographie peptidique, nous avons toujours utilisé des cerveaux de rats dont l'âge n'excède jamais 15 jours, de façon à toujours avoir une immunoréactivité importante avec AD2 quelque soit le délai post-mortem.

**Homogénat MES (H)  
de tissu cérébral  
de rat nouveau-né**

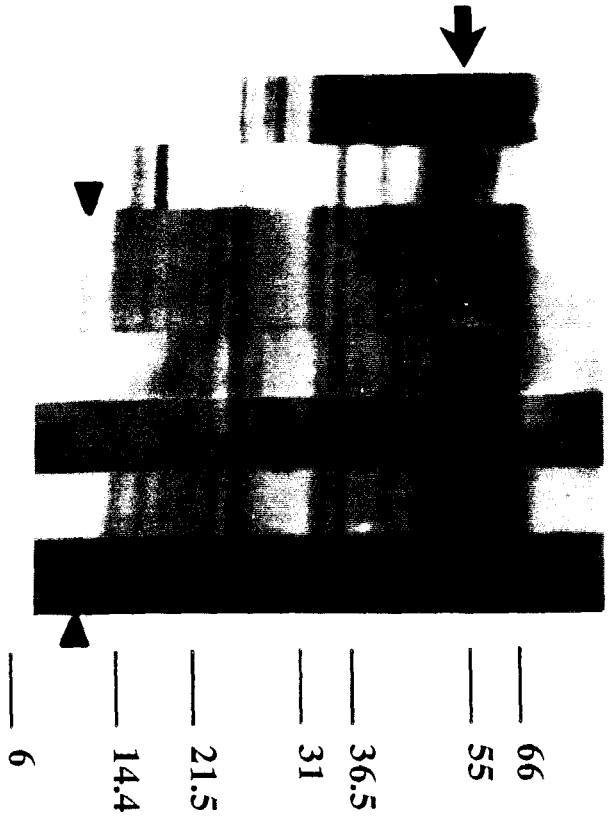


### II- 4- 3- 1- Cartographie peptidique:

Afin de déterminer le site de liaison de l'anticorps monoclonal AD2, nous avons purifié les protéines tau de cerveau de rat en mettant à profit leur solubilité dans l'acide perchlorique (Lindwall et Cole, 1984b). Ainsi, après homogénéisation du tissu cérébral dans un tampon MES, pH 6,5 contenant des ions  $Mg^{2+}$  et des inhibiteurs de protéases, l'homogénat (H) est centrifugé et le surnageant (S1) récupéré. L'acide perchlorique est ajouté au surnageant (S1) pour obtenir une concentration finale de 2,5% (v/v). A cette concentration, les protéines tau restent solubles alors que la majorité des autres protéines précipitent. Après une centrifugation basse vitesse, les protéines tau présentes dans le surnageant (S2) sont alors précipitées par 7 volumes de méthanol, permettant d'obtenir une préparation très enrichie en protéines tau (C3) (**Figure 28**). Nous avons déposé les différentes fractions obtenues pendant la préparation des protéines tau de rats relativement âgés, sur électrophorèse, que nous avons ensuite analysées par la technique des immunoempreintes. Pour toutes les fractions, nous avons déposé les mêmes volumes. Nous pouvons observer qu'après traitement par l'acide perchlorique, les protéines tau sont immunoréactives pour l'anticorps polyclonal anti-Tau (**Figure 28**). De plus, la coloration au rouge Ponceau révèle une très faible quantité de protéines cérébrales totales, indiquant que la préparation est fortement enrichie en protéines tau. Cette préparation a été réalisée selon une modification de la méthode décrite par Fellous *et al.* (1977). Ces auteurs utilisaient la propriété de thermostabilité des protéines tau, pour les purifier. Nous avons répété leur expérience, mais avons finalement opté pour une purification par l'acide perchlorique, car nous la trouvions plus efficace (M&M, p. 145).

Pour la cartographie peptidique, nous avons adapté cette préparation de protéines tau normales, aux protéines tau fœtales de rats jeunes. Au cours de la préparation enrichie en protéines tau fœtales de rat et malgré la présence d'inhibiteurs de protéases, une protéolyse est survenue générant de nombreux fragments peptidiques de masse

1 2 3 4 5 6 7 8



moléculaire s'étalant de 50 à 8 kDa. La préparation enrichie en protéines tau est alors déposée sur un gel d'électrophorèse spécialement conçu pour la séparation des petits fragments. Il s'agit d'un gel à 10-20% d'acrylamide, dont le tampon constitué de tricine permet une meilleure résolution dans les faibles poids moléculaires, par rapport aux tampons standards (Schägger et Von Jagow, 1987).

La préparation de protéines tau fœtales a été déposée en excès (500 µg de protéines), sur toute la largeur du gel. Après transfert sur membrane de nitrocellulose 0,2 µm adaptée aux fragments de faibles poids moléculaires, nous pouvons alors découper une série de bandelettes (1 cm de large), qui sont ensuite incubées avec des sondes immunologiques mono- ou polyclonales (M19G, K23S, 135, V17G, SMI31, S28T et 134) dirigées contre les différentes parties de la molécule de tau. Le but de cette expérience est donc de déterminer le plus petit fragment peptidique reconnu par AD2 et de situer sa position sur la protéine tau grâce aux autres anticorps.

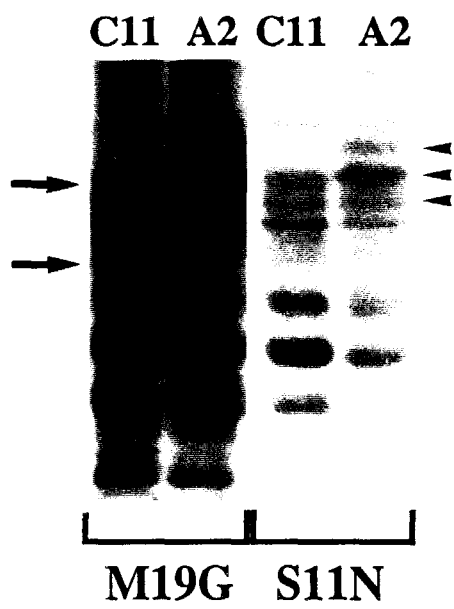
Tous les anticorps, y compris AD2, détectent la protéine tau native à 50 kDa (**Figure 29**). La protéine apparaît comme une bande large, car beaucoup de matériel a été déposé. 500 µg de la préparation ont été déposés, de façon à détecter le maximum de fragments de petite masse moléculaire. AD2 détecte plusieurs fragments de taille variable, et en particulier un peptide de 10kDa (**Figure 29**). Ce fragment est également détecté par d'autres sondes immunologiques comme les anticorps 135, V17G, SMI31, S28T et 134 (**Figure 29**). Ces anticorps sont dirigés contre des épitopes situés dans la région carboxy-terminale (de l'acide aminé 323 à l'acide aminé 441). Par contre, des anticorps dirigés contre la région amino-terminale (anticorps M19G et K23S), ne détectent pas ce fragment (**Figure 29**). Ces résultats indiquent que l'anticorps AD2 est dirigé contre une partie de la région carboxy-terminale. A cette période, trois sites de phosphorylation sont décrits dans cette région carboxy-terminale des tau-PHF: les résidus Ser 396, 404 et 422 (Lee *et al.*, 1991; Hasegawa *et al.*, 1992; Kanemaru *et al.*, 1992). Ces résultats, combinés aux précédents montrent que l'anticorps AD2 est dirigé contre un motif situé dans la partie

carboxy-terminale. AD2 ne reconnaissant pas les neurofilaments, nous n'avons pas retenu le motif KSPV comme site de liaison de l'anticorps. Comme la Ser 404 était la seule Ser phosphorylée identifiée dans le tissu fœtal, nos résultats nous ont amenés à penser que l'anticorps était peut-être dirigé contre la région de la Ser 404. A ce moment là, aucun article n'avait décrit l'existence d'anticorps monoclonaux contre ce site. Seul, un anticorps polyclonal anti-PHF (anti-ptau 2) produit à partir de PHF isolées par l'acide formique avait été décrit comme reconnaissant la Ser 404 phosphorylée (Kanemaru *et al.*, 1992). Pour vérifier l'hypothèse que nous avançons, il y a plusieurs possibilités: utiliser un peptide phosphorylé sur ce résidu Ser ou réaliser une phosphorylation *in vitro* des protéines tau recombinantes natives ou mutées.

#### *II- 4- 3- 2- Le peptide S11N:*

Nous avons alors fait synthétiser un peptide phosphorylé de 11 acides aminés appelé S11N, par la Société Neosystem, Strasbourg. Il correspond à la séquence de la Ser 400 à l'Asn 410 (Ser-Gly-Asp-Thr-Ser-Pro-Arg-His-Leu-Ser-Asn). Le résidu Ser souligné correspond à la Ser 404 qui est phosphorylée. Le but est de déterminer si ce peptide peut être reconnu par l'anticorps AD2. En parallèle à cette étude, nous avons réalisé des anticorps polyclonaux. Nous avons donc couplé le peptide S11N à l'ovalbumine par la glutaraldéhyde. Nous avons alors injecté le peptide couplé à deux lapins, en commençant par des injections sous cutanées, puis intraveineuses (le protocole est décrit dans le chapitre M&M, p. 136). Sur les deux lapins, un seul a produit des anticorps. Cet anticorps marque le triplet de protéines tau-PHF dans des homogénats totaux de cerveaux de patients atteints de MA. Le marquage n'est cependant pas très fort. L'anticorps S11N détecte également les traînées caractéristiques de structures insolubles pathologiques. Il détecte également les protéines tau normales dans les cerveaux Alzheimer et témoins





(Figure 30). Le peptide S11N qui contient la Ser 404 phosphorylée pourrait inclure l'épitope d'AD2.

Le peptide S11N est soluble dans un tampon phosphate 0,1 M et a été déposé par dot-blot sur membrane de nitrocellulose 0,2  $\mu\text{m}$  et Immobilon P (M&M, p. 139). Dans les deux cas, sa visualisation par une coloration réversible comme avec le Rouge Ponceau est très difficile, du fait de sa petite taille. Une immunodétection par AD2 montre qu'il ne détecte pas le peptide même si une quantité importante de peptide (1 à 20  $\mu\text{g}$ ) est déposée. Nous avons alors testé AD2 sur le peptide déposé sur électrophorèse en gel de polyacrylamide (15%) en présence de Tricine, et transféré sur nitrocellulose 0,2  $\mu\text{m}$  (M&M, p. 141). Le peptide n'est jamais détecté par l'anticorps, en utilisant cette technique. Ces résultats indiquent, que quelque soit la méthode utilisée, AD2 ne détecte pas le peptide phosphorylé à la Ser 404. Plusieurs hypothèses sont à envisager. Tout d'abord, AD2 ne reconnaît pas le peptide phosphorylé, parce que sa séquence contient trop peu d'acides aminés. En effet, nous avons vu au paragraphe précédant, que l'anticorps AD2 détecte un fragment dont la masse moléculaire apparente est de 10 kDa. Son épitope serait plus conformationnel que séquentiel. Le peptide synthétique phosphorylé ne posséderait pas une séquence assez longue pour être reconnu. Une autre possibilité est que la Ser 404 phosphorylée ne soit pas la seule responsable de la liaison de l'anticorps. Plusieurs anticorps dépendants de la phosphorylation ont été décrits dans la littérature, et certains (comme AT8 et PHF-1) sont dirigés contre des sites comportant au moins deux résidus phosphorylables (Biernat *et al.*, 1992; Otvos *et al.*, 1994). Il est possible que ces phosphorylations doubles laissent apparaître des conformations spécifiques aux tau-PHF. De même, Tau-1 est un anticorps dont la fixation nécessite que les Ser 199 et 202 soient déphosphorylées (Lang *et al.*, 1992). Nos résultats montrent que la phosphorylation de la Ser 404 seule ne joue pas un rôle prépondérant dans la fixation de l'anticorps sur son substrat.

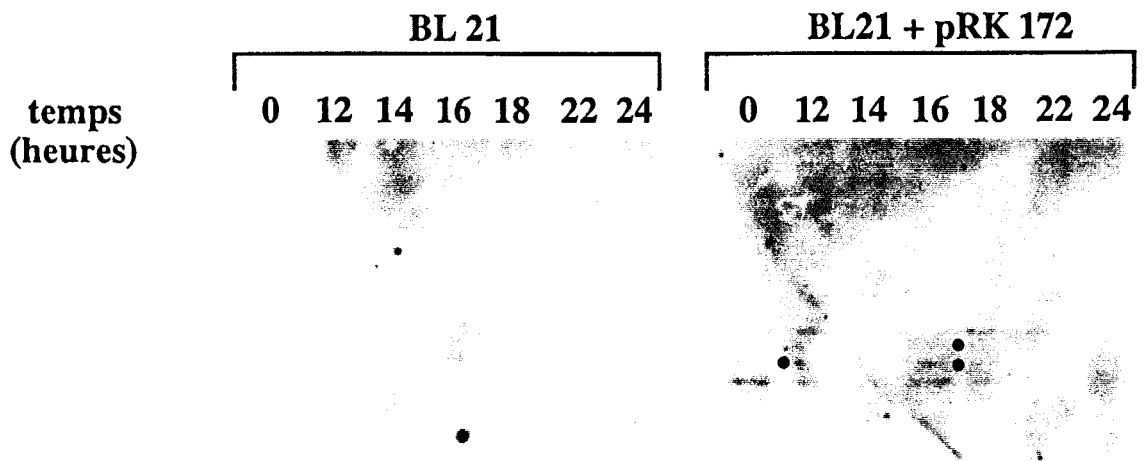
### *II- 4- 3- 3- Tau recombinantes et phosphorylations in vitro:*

Les résultats obtenus avec le peptide synthétique S11N phosphorylé ne nous permettant pas de préciser la localisation de l'épitope sur les protéines tau, il faut trouver une autre technique. Nous savons que dans la partie carboxy-terminale des tau-PHF où se trouve l'épitope d'AD2, il y a trois sites potentiels de phosphorylation. La majorité des sites qui sont trouvés sur les tau-PHF sont de nature Ser/Thr-Pro, et les kinases impliquées dans leur phosphorylation de type *Proline Directed Protein Kinase* (Lee *et al.*, 1991; Biernat *et al.*, 1992; Drewes *et al.*, 1992; Gustke *et al.*, 1992; Kanemaru *et al.*, 1992; Hanger *et al.*, 1992; Goedert *et al.*, 1992b). Des phosphorylations *in vitro* sur les protéines tau recombinantes peuvent être réalisées par des activités kinasiques isolées de cerveau de rat ou de porc, ou par les protéines kinases purifiées (MAP kinase, GSK-3, cdk-5) (Mandelkow *et al.*, 1992; Goedert *et al.*, 1993; 1994). Des anticorps dépendants de la phosphorylation et dirigés contre des motifs Ser/Thr-Pro, ont ainsi pu être caractérisés (Goedert *et al.*, 1994).

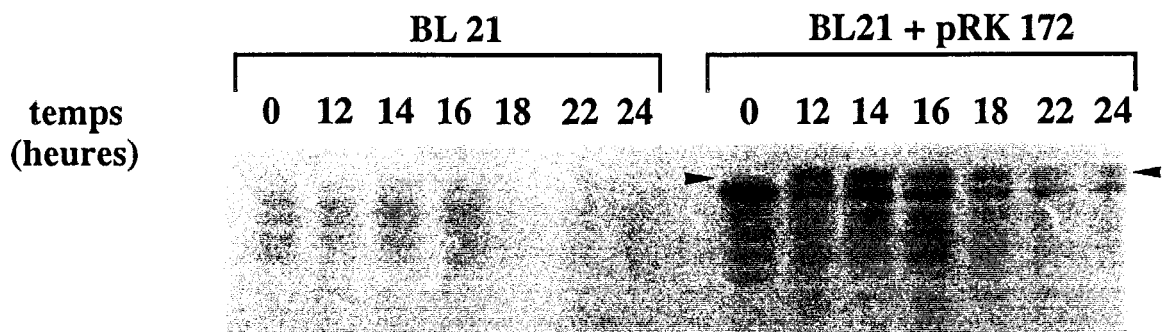
En 1988 et 1989, Goedert *et al.* isolent de certaines régions de cerveaux de sujets témoins décédés, les ARN messagers des protéines tau dont ils se servent pour obtenir les ADN complémentaires. Ces ADN complémentaires sont alors insérés dans des plasmides, qui vont permettre leur expression dans des bactéries. Ainsi, ils ont pu obtenir les 6 isoformes des protéines tau recombinantes, qui co-migrent avec les protéines tau normales humaines déphosphorylées (Goedert et Jakes, 1990).

L'isoforme la plus longue des protéines tau recombinantes (htau 40) a été fournie par le Dr. M. Goedert (MRC, Cambridge, Angleterre). Nous disposons en fait des bactéries (*E. Coli*) contenant le plasmide, appelé pRK 172 et qui permet l'expression donc l'isoforme tau (htau 40) sous le contrôle du promoteur de la polymérase T7. En parallèle, nous avons les bactéries qui ne contiennent pas le plasmide et servent donc de témoins.

**A**



**B**



Pour phosphoryler les protéines tau recombinantes, nous avons préparé une activité kinasique à partir de cerveau de porc. La technique de purification de la kinase est identique à celle décrite par Biernat *et al.* en 1992. Dans un premier temps, nous avons effectué une cinétique de phosphorylation sur 7 heures (0, 30 min, 1, 2, 4, et 7 heures). Ces premiers résultats montrent que l'anticorps AD2 détecte une protéine de masse moléculaire apparente plus élevée que celle de l'isoforme non phosphorylée. Cette bande apparaît après 4 heures d'incubation. Dans un deuxième temps, nous avons réalisé une cinétique plus longue sur 24 heures (0, 12, 14, 16, 18 et 24 heures). L'anticorps AD2 détecte également deux bandes de masse moléculaire apparente plus élevée que l'isoforme non phosphorylée (**Figure 31 A**). Elles sont très visibles entre 12 et 16 heures d'incubation. Sur cette immunoempreinte a également été déposé l'extrait bactérien ne contenant pas le plasmide, et incubé avec l'activité kinasique. Les deux bandes détectées par AD2 dans les extraits bactériens contenant le plasmide, ne le sont pas dans les bactéries sans le plasmide. Cette expérience montre donc que ces deux bandes sont spécifiques. Nous avons alors utilisé Tau-1, afin de déterminer si la phosphorylation de la protéine tau recombinante entraîne une modification de la migration électrophorétique, et si l'immunoréactivité de Tau-1 diminue au fur et à mesure de la phosphorylation. Au temps zéro de la cinétique, Tau-1 détecte une bande correspondant à la protéine tau non phosphorylée dans l'extrait bactérien contenant le plasmide (**Figure 31 B**). Après 12 heures d'incubation, Tau-1 détecte en plus de l'isoforme non phosphorylée, une deuxième bande de masse moléculaire plus élevée. Elle correspond en fait à la bande de masse moléculaire la plus petite détectée par AD2. Après 16 heures d'incubation, l'immunoréactivité de Tau-1 diminue. Le fait que cette immunoréactivité diminue et que l'anticorps AD2 ne détecte plus rien après 16 heures d'incubation, suggère que cette diminution est le résultat d'une protéolyse (M&M, p. 146-147).

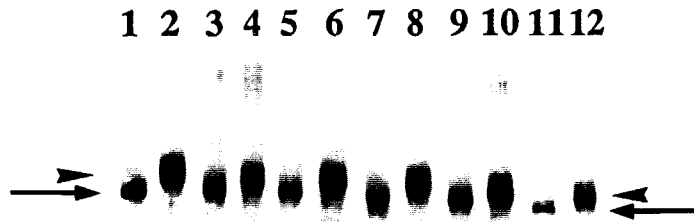
Il faut également noter que l'immunoréactivité de l'anticorps AD2 est relativement faible. Cette faible détection peut s'expliquer par le fait que l'isoforme tau ne soit pas

purifiée de l'extrait bactérien. La détection serait plus forte, si une quantité plus importante de matériel était déposée. Cependant l'activité kinasique préparée à partir de cerveau de porc, est contaminée par une fraction de protéines tau normales. Lorsque l'extrait bactérien ne contenant pas le plasmide est incubé avec l'activité kinasique et déposé sur électrophorèse, les protéines tau normales de cerveau de porc sont visibles, en utilisant Tau-1. Il est donc difficile de déposer plus de matériel phosphorylé, puisque cela implique d'incuber l'échantillon avec plus d'activité kinasique, donc plus de protéines tau de cerveau de porc, donc augmenter le risque de faire une erreur d'observation.

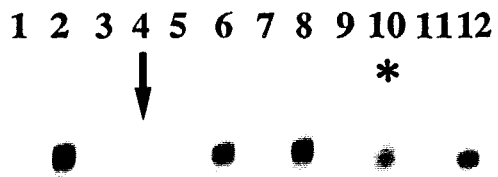
Ces expériences montrent donc que la phosphorylation *in vitro* de l'isoforme la plus longue des protéines tau entraîne l'apparition de l'épitope de l'anticorps AD2. Elle représente donc un moyen de déterminer la localisation précise de l'épitope, soit par protéolyse et cartographie peptidique, soit par mutagenèse dirigée sur htau 40. Cette dernière s'effectue en changeant les séquences nucléotidiques codant pour des Ser ou des Thr par des séquences codant pour des résidus Ala. De ce fait, en changeant un résidu Ser ou Thr en un résidu Ala, la phosphorylation ne peut plus se faire à ce site.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr. Goedert (MRC, Cambridge, Royaume Uni). Le but est donc de phosphoryler les isoformes natives ainsi que les isoformes mutées *in vitro*. Si l'anticorps est dépendant de la phosphorylation, il reconnaîtra alors l'isoforme phosphorylée. En changeant tel ou tel résidu, il est alors possible de connaître la localisation de l'épitope sur l'isoforme, par absence de détection par l'anticorps. Nous savons grâce à la cartographie peptidique, que l'épitope se situe dans la partie carboxy-terminale. La caractérisation précise de l'épitope a donc été réalisée en phosphorylant avec une activité kinasique de cerveau de rat, les protéines tau recombinantes natives et mutées individuellement sur les 5 sites Ser/Thr-Pro contenus dans la partie carboxy-terminale. Ces résidus sont les Ser 396, Ser 400, Thr 403, Ser 404 et Ser 422 (numérotation de l'isoforme la plus longue). Les protéines tau recombinantes ont été purifiées (Goedert and Jakes, 1990; Crowther *et al.*, 1994). Elles sont

**A**



**B**



phosphorylées par une activité kinasique extraite de cerveau de rat. La technique de purification de l'extrait kinasique est identique à celle que nous avons utilisée précédemment, mais elle est faite à partir de cerveau de rat adulte (Goedert *et al.*, 1993). La réaction commence lorsque l'extrait kinasique est ajouté, et dure 24 heures. Certains échantillons contenant des protéines tau recombinantes sont incubés de la même façon, mais sans l'extrait kinasique. Ils constituent donc les témoins négatifs de l'expérience de phosphorylation. Une fois que la réaction est terminée, les différents incubats sont déposés sur électrophorèse en gel de polyacrylamide. Après transfert sur membrane de nitrocellulose, les protéines sont incubées avec les anticorps AD2 et 134. Ce dernier est un anticorps polyclonal dirigé contre l'extrémité carboxy-terminale des protéines tau, il reconnaît à la fois les formes phosphorylées et non phosphorylées des protéines tau.

La phosphorylation des protéines tau recombinantes natives et mutées résulte en l'augmentation de leur masse moléculaire apparente lorsqu'elles sont phosphorylées. Cette augmentation de masse moléculaire est visible grâce à l'anticorps polyclonal 134 (**Figure 32 A**). Les couloirs 1 et 2 représentent respectivement la protéine tau native dans un état non phosphorylé et phosphorylé (**Figure 32 A, B**). L'anticorps AD2 détecte la forme phosphorylée dans le couloir 2, alors que rien n'est détecté dans le couloir 1 (**Figure 32 B**). Cette expérience de phosphorylation *in vitro* montre une fois de plus que l'anticorps AD2 est dirigé contre un site phosphorylé. Les autres couloirs sont représentés par les protéines tau dont certains résidus Ser ou Thr ont été mutés en Ala. Après incubation avec la kinase, dépôt sur électrophorèse et immunoempreinte, l'anticorps AD2 ne détecte plus la protéine tau lorsqu'elle contient un résidu Ala à la place d'un résidu Ser à la position 396 (**Figure 32 B**). L'absence de marquage de cette isoforme mutée indique clairement que la Ser 396 est impliquée dans la liaison de l'anticorps AD2. Les autres protéines tau mutées à différents endroits restent marquées par AD2, à l'exception de l'isoforme contenant un résidu Ala à la place de la Ser 404 phosphorylée. En effet, lorsqu'elle est transformée en Ala, le marquage de l'anticorps AD2 est beaucoup plus faible. Ce résultat



suggère que la Ser 404 joue également un rôle dans la liaison de l'anticorps AD2 (M&M, p. 147).

#### *II- 4- 3- 4- Conclusion:*

Ces expériences ont été entièrement effectuées dans le laboratoire du Dr Goedert, à Cambridge. Grâce aux expériences de phosphorylation *in vitro*, nous avons pu déterminer précisément la Ser reconnue par l'anticorps AD2. Il s'agit de la Ser 396 qui doit être phosphorylée. Il semblerait qu'il y ait également la participation d'un résidu Ser situé à proximité, la Ser 404. Elle n'aurait qu'un rôle secondaire, étant donné que le marquage de AD2 n'est pas totalement aboli, lorsque la Ser 404 est mutée en Ala. Ces résultats nous ont tout d'abord surpris car la Ser 396 fait partie du motif KSPV, motif qui est retrouvé plusieurs fois dans les neurofilaments. Or, AD2 ne détecte pas les neurofilaments. La seule explication est que l'épitope reconnu par AD2 est spécifique des protéines tau, ce qui implique la participation d'autres résidus autour de la Ser 396, telle que la Ser 404. Cette région est très immunogène, ce qui expliquerait pourquoi l'anticorps AD2 est si affine pour les protéines tau. Ces résidus sérine sont suivis de résidus proline. Ils sont donc la cible des protéines kinases dirigées contre des motifs Ser/Thr-Pro, comme les MAP kinases, la GSK3.

Il existe un autre anticorps monoclonal qui reconnaît les Ser 396 et 404 lorsqu'elles sont phosphorylées. Il s'agit de l'anticorps PHF-1. Il semble avoir les mêmes propriétés que l'anticorps AD2 (Otvos *et al.*, 1994).

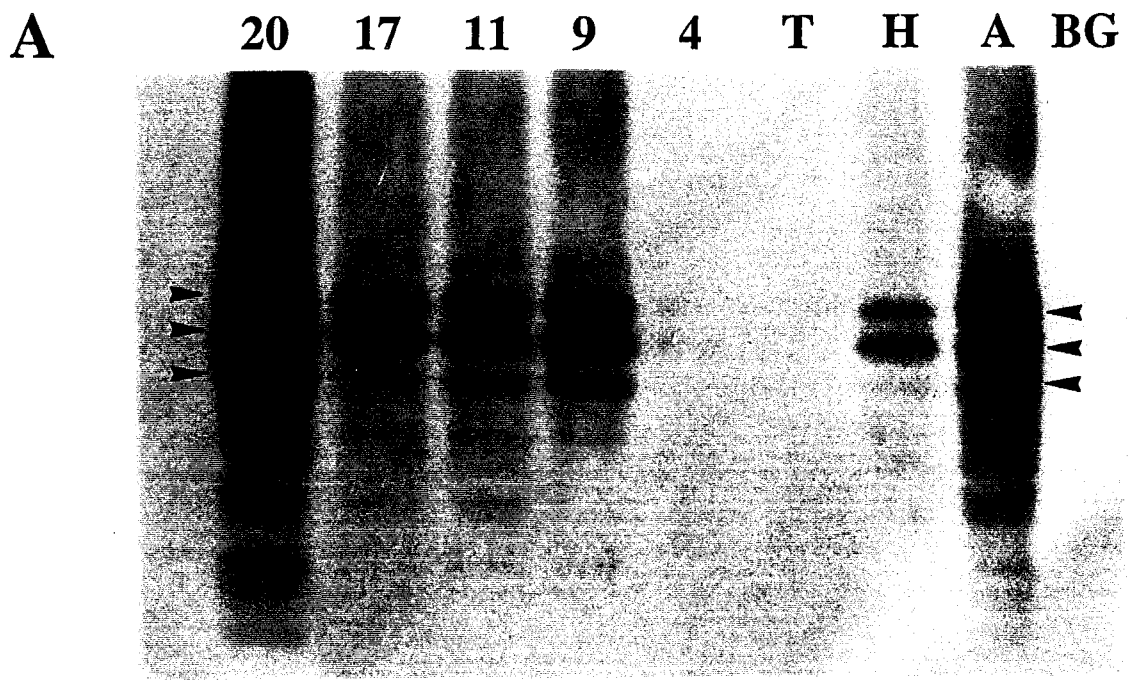
### III- EXPRESSION DE L'ÉPITOPE AU COURS DE DIFFÉRENTES MALADIES NEURODÉGÉNÉRATIVES:

L'anticorps monoclonal AD2 est spécifique des tau-PHF. Des études immunohistochimiques menées dans le laboratoire, sur des coupes de cerveaux de patients atteints de la MA (MA), ont montré que l'anticorps AD2 est spécifique de la DNF. Cette dernière est également observée dans d'autres maladies neurodégénératives, telles que la maladie de Steele-Richardson-Olszewski (PSP pour le terme anglais *progressive supranuclear palsy*), la dégénérescence corticobasale (CBD pour le terme anglais *corticobasal degeneration*), le syndrome de l'île de Guam (ALS/PDC pour *amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex*), et parfois dans la maladie de Pick (Hof *et al.*, 1991, 1992a, 1994a; Rewcastle, 1991). La DNF peut être observée chez les personnes âgées non démentes, où elle est essentiellement localisée dans la région hippocampique (Bouras *et al.*, 1994; Giannakopoulos *et al.*, 1994a, b). Les composants antigéniques majeurs des neurones qui dégènèrent dans la MA sont les protéines tau hyperphosphorylées (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986b; Delacourte *et al.*, 1990; Greenberg *et al.*, 1992). Dans la plupart des maladies neurodégénératives citées ci-dessus, une immunoréactivité pour les protéines tau a été observée (Pollock *et al.*, 1986; Tabaton *et al.*, 1988; Shankar *et al.*, 1989; Cammarata *et al.*, 1990; Trojanowski *et al.*, 1993b). Le but de notre étude est d'utiliser AD2 sur les différentes maladies neurodégénératives pour voir si le profil électrophorétique des protéines tau est similaire. Dans ce chapitre, nous décrivons les différents profils électrophorétiques des protéines tau rencontrés dans des maladies comme la MA, la PSP et la CBD, le syndrome de l'île de Guam, mais également dans le vieillissement cérébral normal.

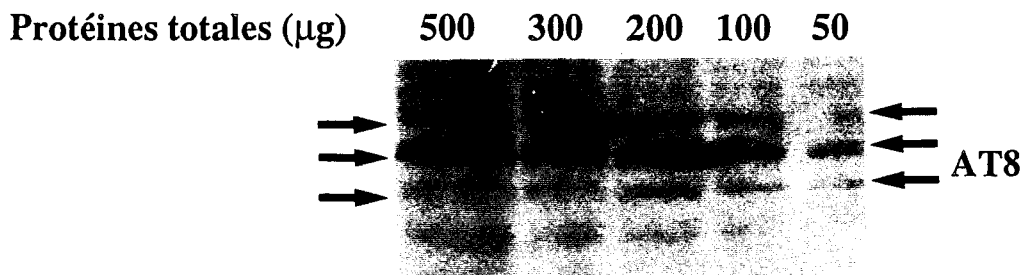
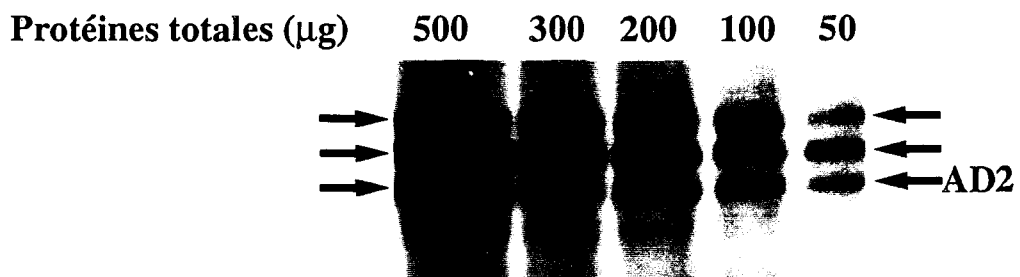
### III- 1- La maladie d'Alzheimer:

La dégénérescence neurofibrillaire (DNF) est une des lésions histopathologiques principales observées au cours de la MA. La microscopie optique a révélé la présence de la DNF dans les grandes cellules pyramidales des couches infragranulaires (V-VI) des aires corticales associatives. La DNF est très peu retrouvée dans les couches supragranulaires (II-III). Elle est très abondante dans les régions frontale, temporale, pariétale, dans le cortex entorhinal et l'hippocampe. Dans la région occipitale, la DNF est rarement observée. D'autres aires corticales et sous-corticales peuvent être touchées. C'est le cas du noyau basal de Meynert, de l'amygdale, du locus coeruleus et du raphe (Braak et Braak, 1985; 1991; Rewcastle, 1991).

Plusieurs aires corticales et sous-corticales d'un cerveau de patient atteint sont analysées par la technique des immunoempreintes en utilisant AD2. L'anticorps détecte le triplet surtout dans les aires corticales associatives (temporale et frontale), l'amygdale et l'hippocampe (**Figure 33**). Cependant, dans ce cas l'immunoréactivité est relativement faible dans l'hippocampe. Aucun marquage n'est observé dans l'aire motrice primaire et dans les structures sous-corticales (basal ganglia et thalamus). Il faut également noter le marquage du triplet dans la région occipitale (cortex visuel primaire). D'autres études ont montré que les régions les plus touchées par la DNF sont les aires néocorticales (surtout le cortex temporal) et la région limbique. La quantification de l'immunoréactivité montre que le cortex associatif est plus touché que le cortex primaire sensitif. Le cas présenté ici illustre bien l'hétérogénéité de la MA avec une distribution régionale de l'immunoréactivité des tau-PHF qui varie d'un patient à un autre (Vermersch *et al.*, 1992a). Nous avons eu l'occasion de tester l'anticorps monoclonal AT8 (Goedert *et al.*, 1995) sur des échantillons de cerveaux Alzheimer. Il détecte le triplet pathologique, plus



**B**



difficilement que l'anticorps AD2 (Figure 33). AT8 sera également utilisé pour l'analyse des autres maladies neurodégénératives développées dans ce chapitre (Annexe III).

Pour les prochaines études sur les différentes maladie neurodégénératives et le vieillissement, un homogénat total de cerveau de patient atteint de la MA est toujours déposé simultanément, afin de comparer les profils électrophorétiques (M&M, p. 133-4).

### III- 2- Le vieillissement normal:

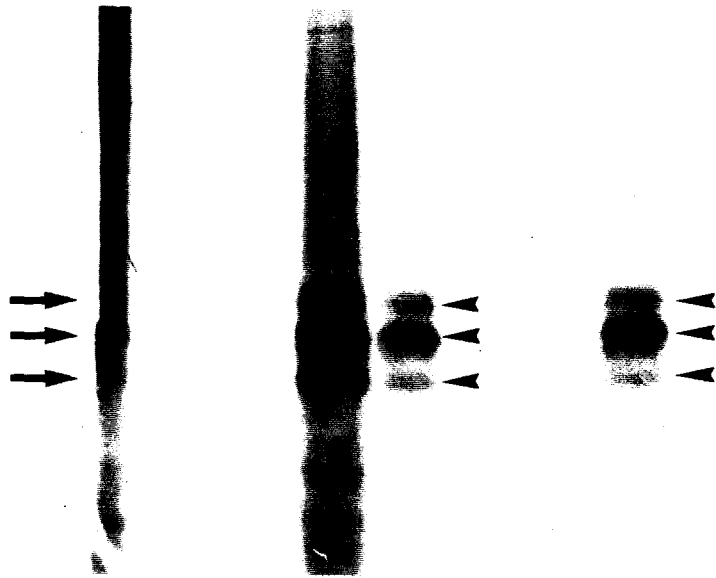
La DNF est également retrouvée dans le vieillissement cérébral normal. Cependant, sa localisation est restreinte à la formation hippocampique (Bouras *et al.*, 1994; Giannakopoulos *et al.*, 1994a). Parfois, la DNF peut toucher le cortex temporal inférieur (Hof *et al.*, 1992b). Les résultats biochimiques montrent que la présence du triplet de tau-PHF est toujours corrélée à la DNF. En effet, le triplet tau 55, 64 et 69 est retrouvé dans le cortex entorhinal et l'hippocampe (Vermersch *et al.*, 1992b).

En collaboration avec le Dr. Giannakopoulos et en utilisant l'anticorps polyclonal anti-tau S28T, nous avons pu vérifier que sur les 12 cas étudiés, la plupart présente des neurones en dégénérescence dans la formation hippocampique et dans le cortex temporal inférieur. Finalement, en collaboration avec le Dr. Vickers, nous avons utilisé des anticorps anti-neurofilament (SMI310 Sternberger *et al.*, 1985) et anti-tau (Delacourte *et al.*, 1990) pour étudier la DNF dans l'hippocampe. L'ensemble de ces résultats montre que la région hippocampique est vulnérable et rapidement atteinte par la DNF.

AD2 détecte le triplet de protéines tau dans le cortex entorhinal de plusieurs sujets âgés non déments (Figure 34). Cependant, le marquage est moins fort que dans la MA, suggérant que la quantité de protéines tau est moins importante.

A7

C12 C13 C14 C15 C16 C17



Dans le vieillissement normal, l'atteinte par la DNF se restreint donc à la formation hippocampique. Cette DNF est de type Alzheimer, puisque les études biochimiques montrent la présence du triplet de tau-PHF. Le triplet de protéines tau est présent dans la région hippocampique de tous les cas âgés de plus de 75 ans (Vermersch *et al.*, 1992b). Ces résultats biochimiques ne sont pas en accord avec de précédentes études immunohistochimiques (Braak et Braak, 1991; Dickson *et al.*, 1991). Seule une équipe avait montré la présence de DNF dans tous les cas non-déments étudiés (Bouras *et al.*, 1993; 1994). L'ensemble de ces résultats suggère que les sites de phosphorylation des protéines tau-PHF dans le vieillissement cérébral et la MA sont identiques.

### **III- 3- La maladie de Steele-Richardson-Olszewski et la dégénérescence corticobasale:**

#### **III- 3- 1- La maladie de Steele-Richardson-Olszewski ou PSP:**

La maladie de Steele-Richardson-Olszewski a été décrite par Steele *et al.* en 1964. Cette maladie neurodégénérative se caractérise sur le plan clinique, par une rigidité axiale, une instabilité posturale, une perte du contrôle volontaire des mouvements oculaires. A ces signes s'associent un sommeil perturbé, et souvent une démence. Sur le plan neuropathologique, la PSP se caractérise par une perte neuronale, une gliose et une DNF. La DNF a tout d'abord été décrite dans le *basal ganglia*, le tronc cérébral et le cervelet (Steele *et al.*, 1964). Cette localisation sous-corticale des lésions neuropathologiques lui valut d'être le modèle des démences sous-corticales (Albert *et al.*, 1974; Cummings et Benson, 1984). Plus récemment, plusieurs études montrèrent que la DNF peut affecter des régions corticales, tel que le cortex moteur primaire. Celui-ci est

d'ailleurs plus touché que les aires néocorticales associatives (Hauw *et al.*, 1990; Hof *et al.*, 1992a). Des études immunohistochimiques ont révélé que la distribution laminaire de la DNF est différente dans la PSP, par rapport à la MA. En effet, les neurones en dégénérescence sont plus nombreux dans les couches supragranulaires (II-III) que dans les couches infragranulaires (V-VI) (Hauw *et al.*, 1990; Hof *et al.*, 1992a). Des analyses ultrastructurales ont effectivement montré qu'il existe une différence entre PSP et MA, puisque ce sont des filaments droits et non des paires de filaments appariées en hélice qui sont retrouvés dans la PSP (Tellez-Nagel et Wisniewski, 1973; Tomonaga, 1977; Montpetit *et al.*, 1985).

Malgré des différences structurales, les filaments droits et les PHF possèdent des composants communs, comme les protéines tau (Pollock *et al.*, 1986; Tabaton *et al.*, 1988; Flament *et al.*, 1991). Des études biochimiques ont montré par la suite, qu'un doublet de protéines tau hyperphosphorylées (tau 64 et 69) est détecté dans les cerveaux de patients atteints de PSP et non un triplet (Flament *et al.*, 1991). De plus, une analyse biochimique a révélé que les caractéristiques isoélectriques du doublet sont différentes de celles du triplet. En effet, alors que la protéine tau 64 est le composé le plus acide dans la MA, la protéine tau 69 est la plus acide dans la PSP (Flament *et al.*, 1991). Récemment, une cartographie biochimique a été faite sur plusieurs aires corticales et sous-corticales d'un cerveau de patient atteint de PSP. Cette étude a révélé que le doublet de protéines tau 64 et 69 est retrouvé dans les régions sous-corticales, où la DNF est présente. De plus, certaines aires néocorticales sont touchées (Vermersch *et al.*, 1994). Ces données biochimiques sont donc en accord avec d'autres études immunohistochimiques, qui montrent une atteinte néocorticale (Hauw *et al.*, 1990; Hof *et al.*, 1992a). La présence de DNF dans les aires corticales est toujours corrélée à la démence.

En collaboration avec le Dr. Hof et le Pr. Olanow, nous avons eu l'opportunité d'analyser plusieurs aires corticales et sous-corticales d'un cerveau d'une jeune patiente atteinte de PSP non démente (âgée de 33 ans). En utilisant la technique des



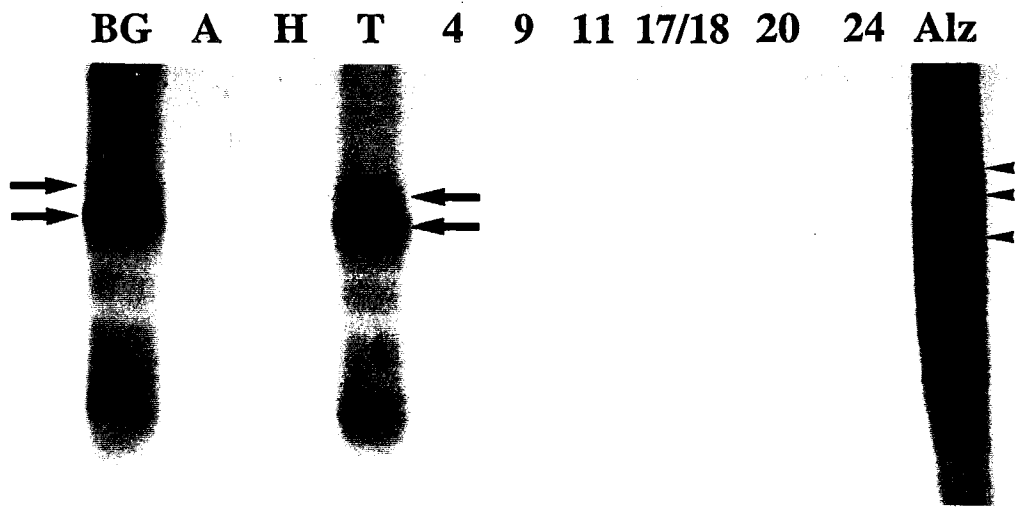
immunoempreintes et AD2, nous avons pu mettre en évidence un doublet de protéines tau 64 et 69, uniquement dans le *basal ganglia* et le thalamus (**Figure 35 A**). Aucune des autres aires étudiées ne présente le doublet, y compris l'amygdale, l'hippocampe et les aires de Brodmann 4, 9, 11, 17/18, 20 et 24. Par contre, d'autres patients atteints de PSP et déments présentent le doublet de protéines tau 64 et 69 dans le néocortex et surtout dans l'aire motrice primaire (aire de Brodmann 4) et dans les structures sous-corticales (Vermersch *et al.*, 1994). Ces résultats comparés à ceux de la littérature montrent que la démence observée chez certains patients atteints de PSP, est corrélée à la présence d'un doublet, donc de DNF dans les aires néocorticales. La PSP ne devrait donc plus être considérée comme le modèle de démence sous-corticale.

### III- 3- 2- La dégénérescence corticobasale ou CBD:

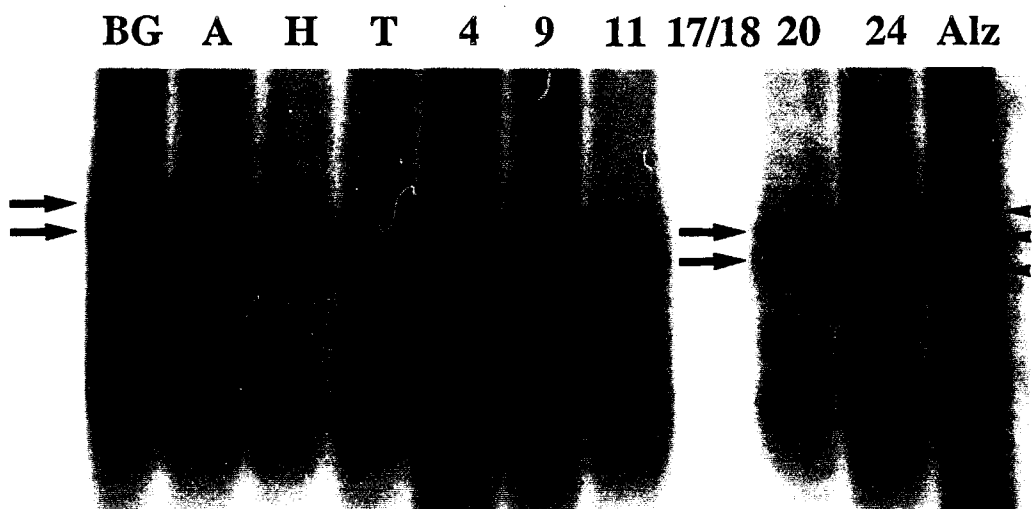
La CBD est une maladie neurodégénérative à évolution lente et à début tardif. Elle se caractérise sur le plan clinique, par l'apparition de signes de rigidité associés à des troubles cognitifs (apraxie et aphasie) et extrapyramidaux moteurs. Une démence légère peut être observée dans certains cas, dans les derniers stades de la maladie (Rebeiz *et al.*, 1968; Rinne *et al.*, 1994). L'examen neuropathologique montre la présence d'une gliose, d'une perte neuronale et d'une DNF (Rebeiz *et al.*, 1968; Ksiezak-Reding *et al.*, 1994). Récemment, Ksiezak-Reding *et al.* retrouvaient un doublet de protéines tau 64 et 69, similaire à celui rencontré dans la PSP (Ksiezak-Reding *et al.*, 1994).

En collaboration avec le Dr. Hof et le Pr. Olanow, nous avons analysé un cas de CBD. L'analyse neuropathologique montre la présence de DNF. Contrairement à la plupart des cas décrits dans la littérature, ce patient atteint de CBD présentait aussi énormément de dépôts amyloïdes. Sans le diagnostic clinique, un tel tableau neuropathologique serait suffisant pour suggérer une MA. Néanmoins, en utilisant la

**A**



**B**



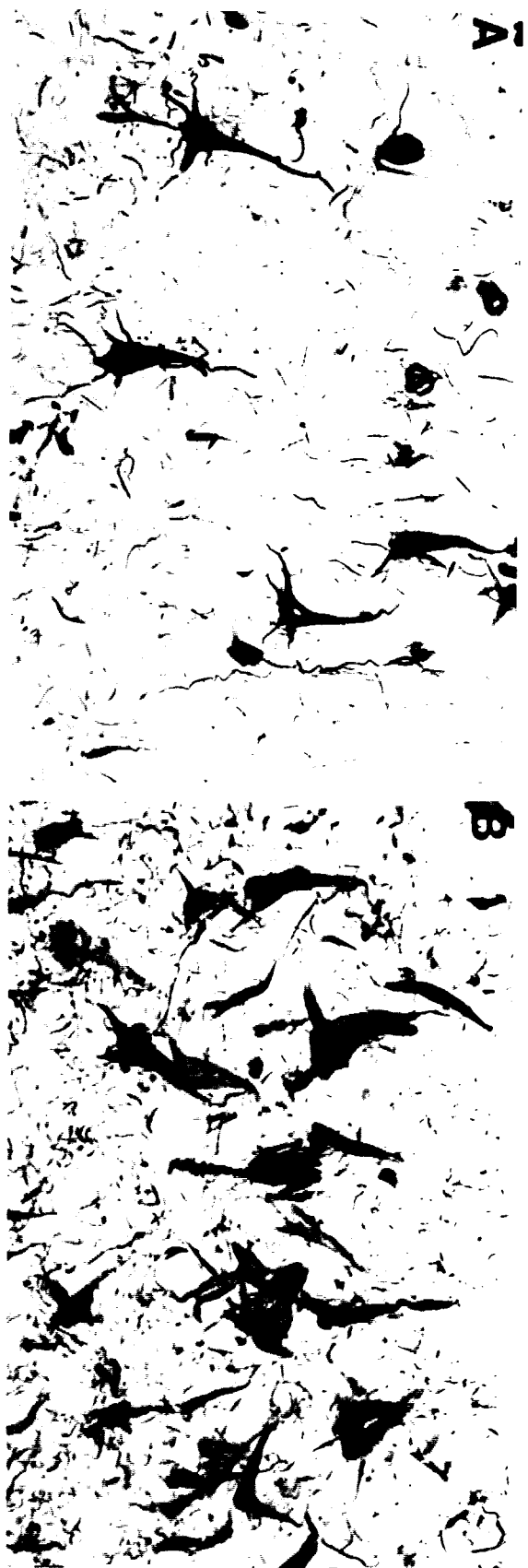
technique des immunoempreintes, AD2 détecte un doublet de protéines tau 64 et 69, dans toutes les aires à l'exception des aires visuelles primaire et secondaire (Figure 35 B). Ce doublet est comparable à celui retrouvé dans la PSP. La forte immunoréactivité de AD2 dans les aires 4 et 9 impliquées dans les fonctions motrices et intellectuelles perturbées chez ce patient et la présence du doublet confirme le diagnostic clinique alors que les résultats neuropathologiques suggéraient une MA.

### III- 3- 3- Conclusion:

Un doublet de protéines tau 64 et 69 est retrouvé dans la PSP et la CBD. Les résultats biochimiques sont toujours bien corrélés aux données neuropathologiques. Les protéines tau hyperphosphorylées sont toujours retrouvées dans les régions cérébrales touchées par le phénomène de dégénérescence neuronale. Les résultats obtenus montrent également que la démence est liée à une atteinte corticale.

### III- 4- Le syndrome de l'île de Guam:

Le syndrome de l'île de Guam (ALS/PDC) est une maladie neurodégénérative prévalente dans la population Chamorro de l'île de Guam, située dans l'Océan Pacifique (Hirano *et al.*, 1961; Brody *et al.*, 1975; Garruto *et al.*, 1986). L'étiopathogénie de la maladie reste encore inconnue, bien que des facteurs environnementaux comme l'aluminium ou des agents neurotoxiques, aient été mis en cause (Kurland, 1988). Sur le plan clinique, la sclérose latérale amyotrophique (ALS) de Guam n'est pas distincte des autres formes sporadiques d'ALS et se traduit par des troubles moteurs des membres



inférieurs et supérieurs. La démence de type syndrome Parkinsonien (PD) se traduit par un déclin intellectuel progressif et des signes extrapyramidaux (Hirano *et al.*, 1961; Chen et Chase, 1986). Les deux aspects de la maladie sont fréquemment associés, mais ils peuvent être observés séparément (Elizan *et al.*, 1966).

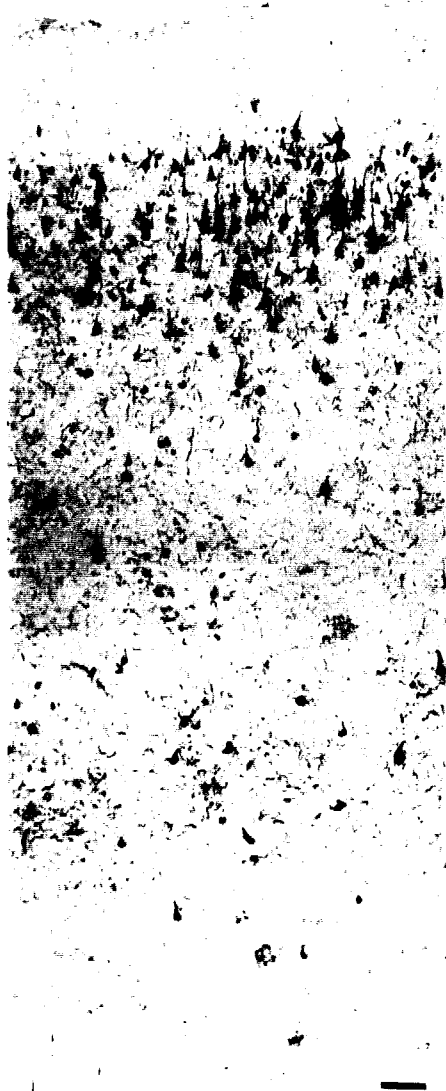
Sur le plan neuropathologique, le syndrome de l'île de Guam se caractérise par une atrophie corticale sévère et une perte neuronale. Les dépôts amyloïdes sont quasiment absents. La lésion histopathologique principale du syndrome de l'île de Guam est la DNF essentiellement présente dans le néocortex et la formation hippocampique (Hirano *et al.*, 1961; 1966; 1967; 1968). Bien que la MA et le syndrome de l'île de Guam soient caractérisés par un grand nombre de neurones en dégénérescence, la distribution laminaire des lésions est différente ainsi que leur densité dans le néocortex. Les neurones en dégénérescence sont préférentiellement retrouvés dans les couches supragranulaires (II et III) dans le syndrome de l'île de Guam, alors que dans la MA, ils sont essentiellement distribués au niveau des couches infragranulaires (V et VI) (Hof *et al.*, 1991; 1994b). Des études immunohistochimiques ont révélé que de nombreuses protéines du cytosquelette (neurofilaments, MAP2, tau et ubiquitine) sont présentes dans les neurones qui dégénèrent (Shankar *et al.*, 1989). L'analyse ultrastructurale de la DNF dans le syndrome de l'île de Guam, a montré l'existence de filaments droits et de PHF, similaires à ceux trouvés dans la MA (Hirano *et al.*, 1968; Rewcastle, 1991).

En collaboration avec le Dr. Hof et le Pr. Perl, nous avons réalisé une étude immunohistochimique puis biochimique de la DNF rencontrée au cours du syndrome de l'île de Guam. Afin de réaliser l'étude biochimique des protéines tau, nous avons analysé plusieurs aires corticales et sous-corticales de cerveau de 17 patients atteints du syndrome de l'île de Guam (G1-G17).

L'étude immunohistochimique a d'abord révélé que les différents cerveaux analysés étaient dépourvus de dépôts amyloïdes, à l'exception de trois cas ALS/PDC présentant principalement un syndrome Parkinsonien, et du cas Chamorro le plus âgé (101 ans). La

A

I  
II  
III  
IV  
V  
VI



B

I  
II  
III  
IV  
V  
VI

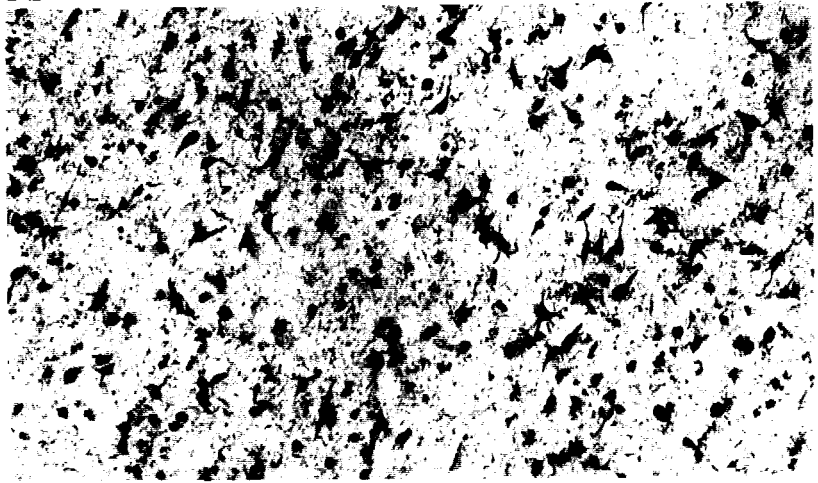


DNF est observée dans la plupart des régions corticales étudiées avec l'anticorps AD2 (Figure 36). Dans le néocortex, les régions temporales sont beaucoup plus touchées par le processus de dégénérescence, que les régions frontales, pariétales et occipitales. Dans ces aires néocorticales, la distribution laminaire est identique à celle déjà décrite (Figure 37) (Hof *et al.*, 1991; 1994b; c). L'intensité du marquage obtenu avec AD2 est identique dans le syndrome de l'île de Guam et la MA (Figure 36). Les structures sous-corticales comme l'amygdale, le *basal ganglia* et la substance noire sont constamment touchées par le phénomène de dégénérescence, chez tous les patients atteints du syndrome de l'île de Guam. Nous avons analysé dans ce cas précis, le noyau basolatéral de l'amygdale, le nucleus reuniens du thalamus et le noyau caudé. Ces structures sous-corticales présentent un très grand nombre de neurones en dégénérescence (Figure 38). Le marquage a été obtenu avec un anticorps polyclonal anti-PHF. Le marquage est le même, si nous utilisons AD2.

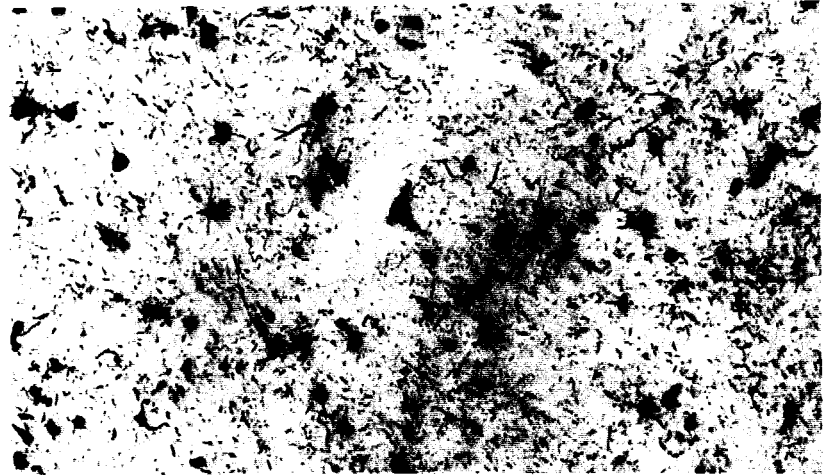
Pour l'étude biochimique, nous avons utilisé la technique des immunoempreintes et l'anticorps AD2. Nous avons eu l'opportunité de travailler sur 14 cas atteints du syndrome de l'île de Guam, 2 cas avec une atteinte prédominante de sclérose latérale amyotrophique et 2 cas témoins. Tous étaient originaires de l'île de Guam.

Dans un premier temps, nous avons déposé l'aire 9 (frontale) et le putamen (région sous-corticale) de quatre cas de Guam, d'un patient atteint de MA et d'un patient atteint de PSP. AD2 détecte un triplet de protéines tau dans tous les cas atteints du syndrome de l'île de Guam. Ce triplet est identique à celui observé dans la MA (Figure 39). Pour ces cas, le triplet est visible autant dans les aires sous-corticales que corticales. Un des cas témoins a été déposé également, et le triplet n'est visible ni dans l'aire corticale, ni sous-corticale (Figure 39). Pour le patient G17, avec une atteinte prédominante de sclérose latérale amyotrophique et non dément, le triplet de protéines tau n'était détecté par AD2, que dans la région sous-corticale (putamen) (Figure 39). Ce premier résultat montre une fois de

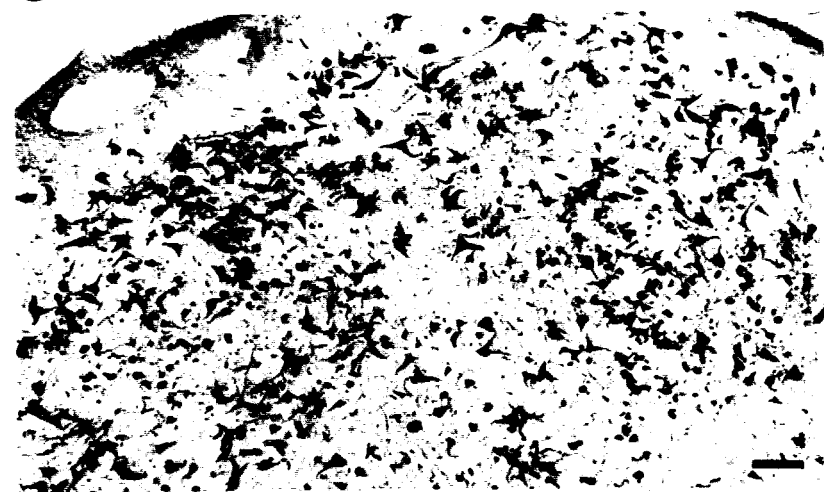
A



B



C





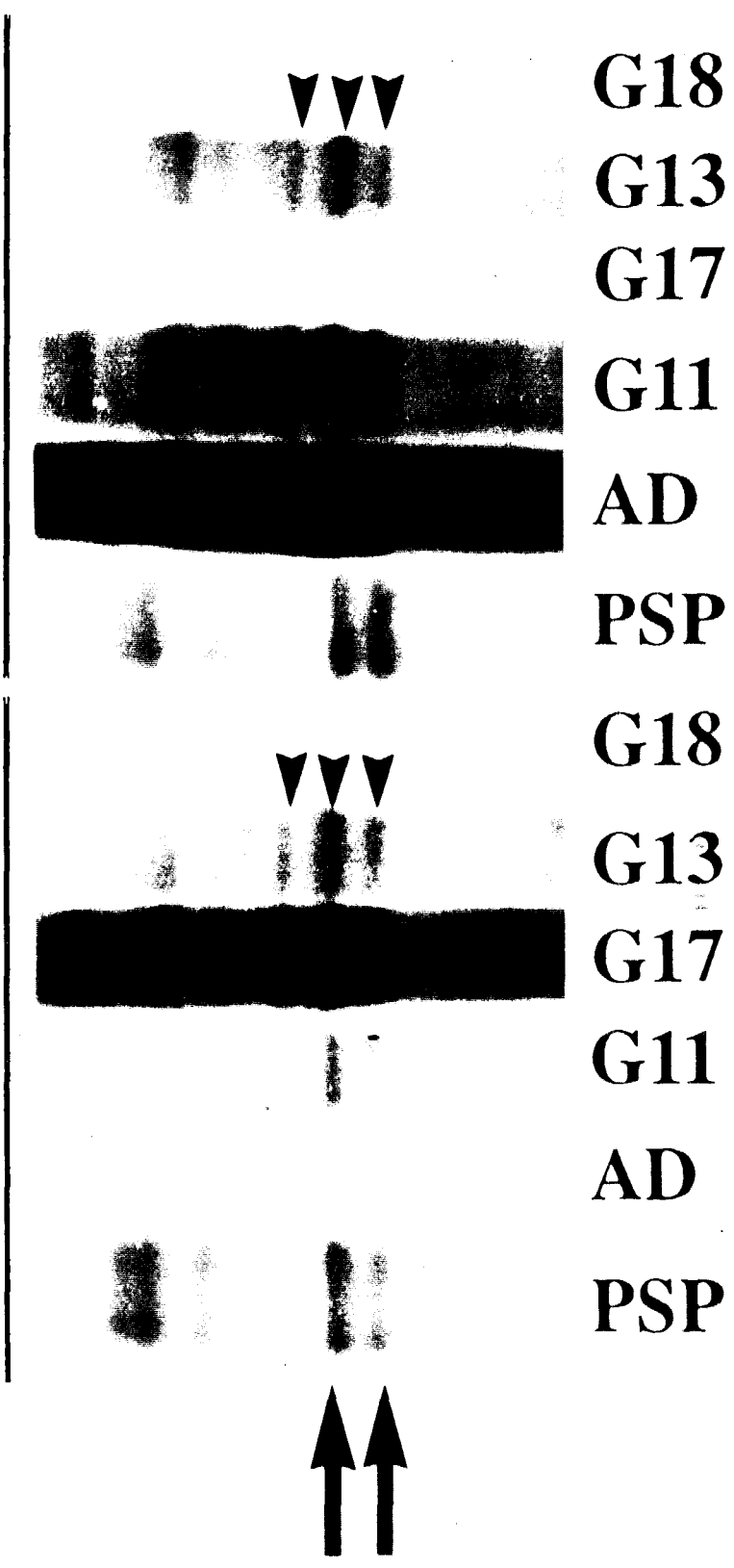
plus, que la démence est liée à l'atteinte corticale et non à une atteinte sous-corticale. Il faut noter que la présence du triplet est toujours corrélée à la présence de DNF.

Nous avons alors utilisé d'autres anticorps dépendants de la phosphorylation, afin de voir si une hyperphosphorylation sur d'autres sites des protéines tau avait lieu au cours du syndrome de l'île de Guam. Pour cela, nous avons déposé des homogénats totaux de régions cérébrales de patients atteints du syndrome de l'île de Guam sur toute la largeur d'une électrophorèse. Après transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose, nous avons découpé des bandelettes de 1 cm de large, que nous avons incubé avec les différents anticorps monoclonaux (AT8, Tau-1, SMI 34) et polyclonaux (M19G et S28T). AT8 et SMI34 détectent également le triplet de protéines tau (**Figure 40**). Par contre, Tau-1 ne marque pas le triplet pathologique, mais le groupe des protéines tau normales (**Figure 40**). M19G et S28T détectent à la fois les protéines tau normales et le triplet de protéines tau hyperphosphorylées (**Figure 40**). Puisque ces anticorps sont dirigés contre des sites de phosphorylation différents, nous pouvons suggérer que la phosphorylation des protéines tau aux sites Ser-Pro, est identique dans le syndrome de l'île de Guam et la MA.

Dans cinq cas (G1 à G5), nous avons pu réaliser une analyse biochimique plus approfondie, car plus de régions étaient disponibles. Pour les cas G1 et G2 (avec une démence sévère), AD2 détecte le triplet dans toutes les aires, sauf les aires visuelles primaire et secondaire (17/18) (**Figure 41 A**). Le marquage le plus intense se situe au niveau de l'hippocampe, l'amygdale et l'aire temporale 20. Les aires frontales (9 et 11), ainsi que l'aire motrice primaire (4) sont beaucoup moins touchées que l'aire 20, à en juger par un marquage du triplet plus faible (**Figure 41 A**). Des structures sous-corticales comme le *basal ganglia* et le thalamus sont également atteintes. La présence du triplet de tau-PHF dans la majorité des régions cérébrales étudiées, montre que les cerveaux de ces deux cas sont très touchés par le processus de dégénérescence. Les résultats biochimiques sont parfaitement corrélés aux données neuropathologiques, puisque ces deux cas

AREA 9

PUTAMEN



G18

G13

G17

G11

AD

PSP

G18

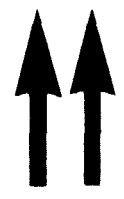
G13

G17

G11

AD

PSP



présentent une forte densité de neurones en dégénérescence dans la formation hippocampique, les aires néocorticales 9, 11 et 20 et les structures sous-corticales.

Le triplet de tau-PHF est très immunoréactif pour AD2, dans la formation hippocampique, l'amygdale et l'aire temporale 20 du cas G3 (**Figure 41 B**). Il est présent, mais en quantité moindre dans l'aire motrice primaire (aire 4), l'aire frontale (aire 9) et le *basal ganglia* (**Figure 41 B**). Par comparaison avec les cas G1 et G2, le triplet tau-PHF n'est détecté par AD2, ni dans l'aire 11, ni dans le thalamus (**Figure 41 B**). Ces résultats montrent que le cerveau de ce patient est différemment affecté par la DNF. Les données biochimiques sont corrélées à la neuropathologie, qui révèle une atteinte cérébrale beaucoup moins sévère, dans le cas G3 par rapport aux deux cas précédents.

Enfin, dans deux cas (G4 et G5), le triplet est présent dans la formation hippocampique et l'amygdale (**Figure 41 C**). Aucune autre région cérébrale étudiée ne présente le triplet de tau-PHF (**Figure 41 C**). L'immunoréactivité du triplet est plus forte dans la formation hippocampique que dans l'amygdale, pour le cas G4. Le diagnostic clinique montrait que le cas G4 commençait une démence de type syndrome Parkinsonien, et l'examen neuropathologique révélait la présence de quelques neurones en dégénérescence au niveau de l'hippocampe et l'amygdale. Nos résultats biochimiques sont donc en accord avec les données neuropathologiques. La distribution du triplet pour le cas G5 montre qu'elle est identique à celle observée chez les personnes âgées non démentes (Vermersch *et al.*, 1992b).

Les résultats de cette étude montrent que le triplet de tau-PHF est constamment retrouvé chez les patients atteints du syndrome de l'île de Guam. Le profil électrophorétique des protéines tau diffère quantitativement suggérant que cette maladie est plus hétérogène sur le plan biochimique, que la MA. En effet, sur cinq cas très étudiés, trois profils différents ont pu être trouvés. Ainsi, dans deux cas, toutes les aires étudiées étaient atteintes (corticales et sous-corticales). Dans la MA, le triplet est principalement

▼▼

↓ ↓

SMI 34

AT8

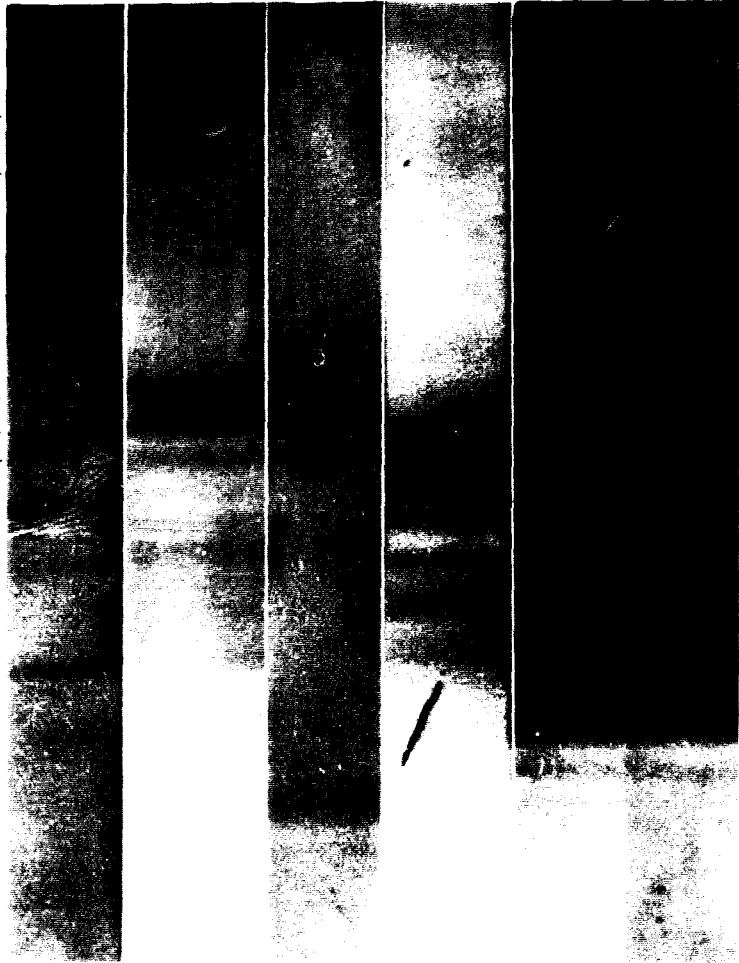
AD2

TAU-1

M19G

S28T

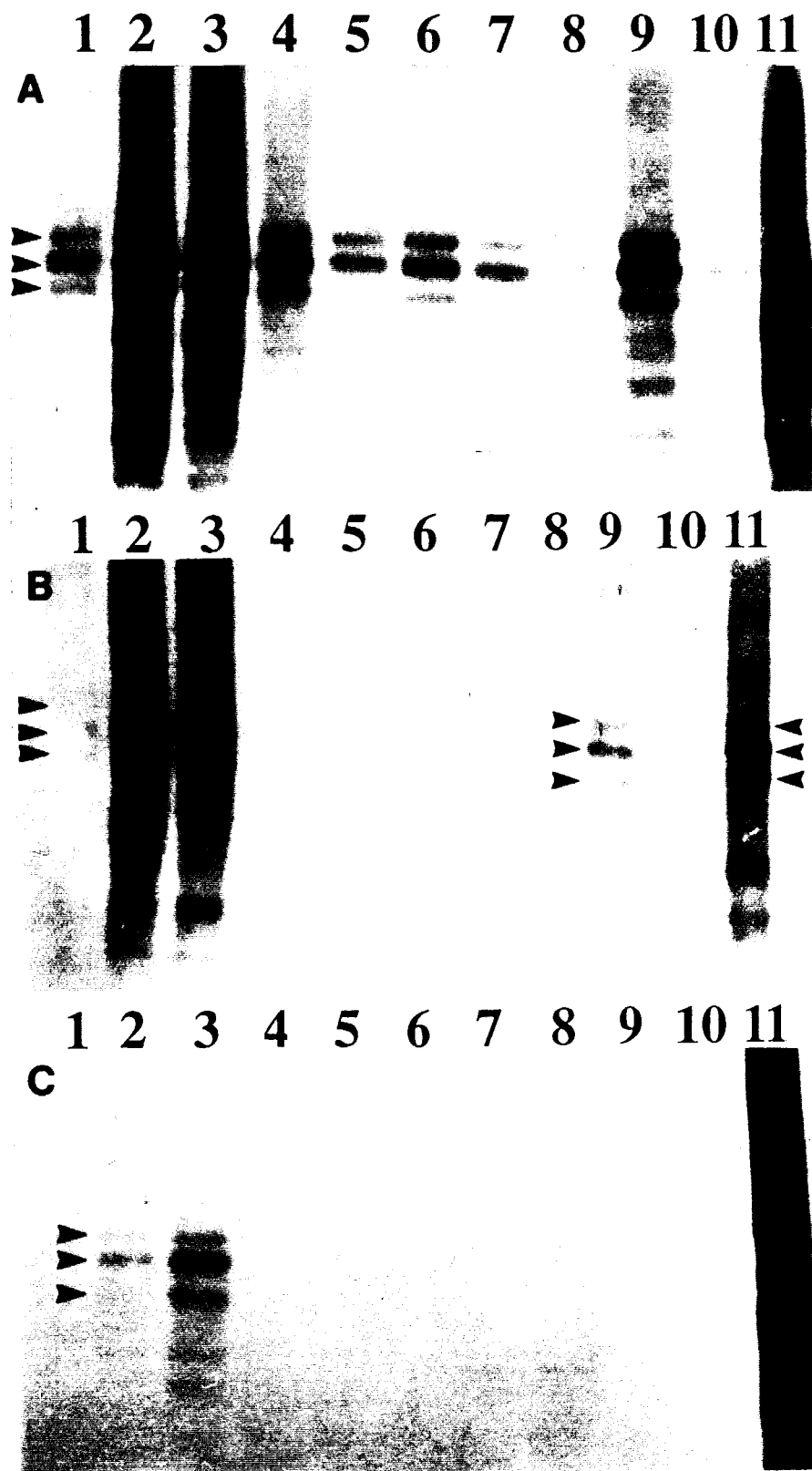
▲▲▲



retrouvé dans la formation hippocampique et les aires néocorticales associatives (Bramblett *et al.*, 1992; Lee et Trojanowski, 1992; Vermersch *et al.*, 1992a). Dans un cas où la maladie est foudroyante, la distribution du triplet est identique à celle de la MA. Enfin, un cas âgé non atteint par la maladie et un autre cas en début de maladie, montrent un profil semblable à celui rencontré chez les personnes âgées non démentes (Vermersch *et al.*, 1992b). D'un point de vue qualitatif, le triplet de type Alzheimer est détecté dans tous les cas, et par plusieurs anticorps dépendants de la phosphorylation comme AD2, AT8 et SMI34. Il semble donc avoir les mêmes caractéristiques immunochimiques que celui dans la MA. Des différences ultrastructurales ont également été retrouvées entre ces différentes maladies. Ainsi, dans la MA, des PHF sont retrouvées alors que dans la PSP, ce sont des filaments droits (Rewcastle, 1991). Dans le syndrome de l'île de Guam, les deux types de filaments sont retrouvés. La présence du doublet conduirait à la formation de filaments droits, et celle du triplet aux PHF (Greenberg, 1993). La distribution laminaire de la DNF est la même pour le syndrome de l'île de Guam et la PSP, alors qu'elle est différente dans la MA (Hof *et al.*, 1991; 1994b; c; d). Dans le syndrome de l'île de Guam, des structures sous-corticales sont atteintes, comme dans la PSP (Vermersch *et al.*, 1994).

### III- 5- Conclusion:

Les données biochimiques sur les différentes maladies neurodégénératives que nous avons pu étudier, montrent qu'il existe au moins deux types de profil électrophorétique: le triplet de type Alzheimer (tau 55, 64 et 69) et le doublet de type PSP (tau 64 et 69). Les différences de profils électrophorétiques des protéines tau pourraient être reliées au type de filaments (PHF ou filaments droits) trouvés dans les neurones en dégénérescence (Greenberg, 1993). Des différences concernant la distribution régionale et laminaire de la



DNF, ont été observées parmi les maladies neurodégénératives décrites dans ce chapitre. Cependant, la démence est toujours liée à la présence du triplet ou du doublet dans des régions corticales.

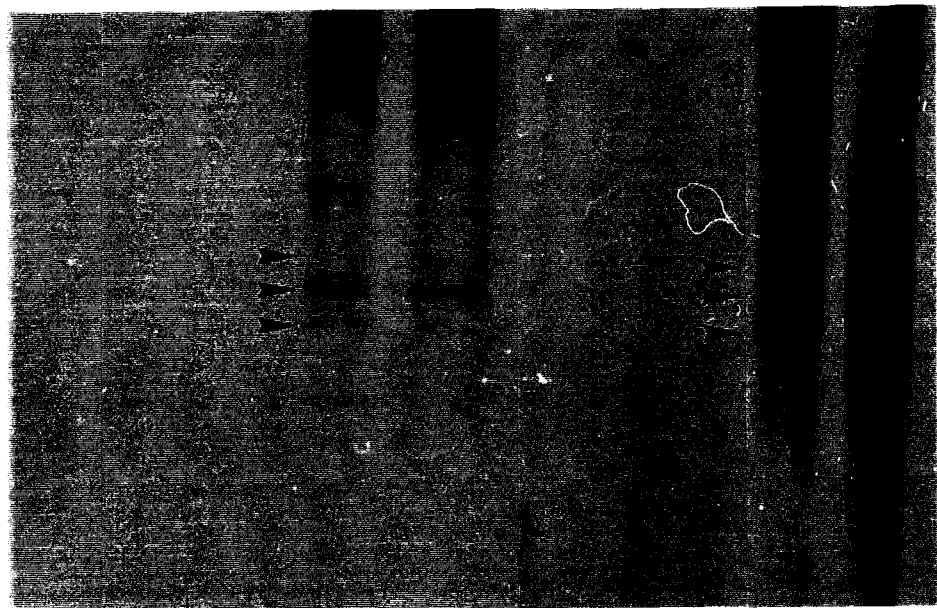
La présence du triplet ou du doublet pourrait être spécifique d'une sous population neuronale. Les différences observées parmi les maladies neurodégénératives étudiées pourraient refléter différents mécanismes étiopathogéniques, impliquant différentes enzymes (kinases, phosphatases, etc) ou différentes populations neuronales possédant ou non certaines isoformes de protéines tau.

Enfin, le triplet et le doublet sont toujours détectés, même si le délai post-mortem est long. Tous les échantillons que nous avons étudié, ont un délai post-mortem supérieur à 3 heures, pouvant même atteindre 45 heures. La présence du triplet ou du doublet de protéines tau-PHF suggère soit que ces protéines tau hyperphosphorylées sont emprisonnées dans des structures pathologiques non accessibles aux phosphatases, soit qu'il y a une diminution de l'activité des phosphatases.

#### **IV- APPLICATION AUX BIOPSIES CÉRÉBRALES:**

Devant un syndrome démentiel, le pronostic et l'approche thérapeutique varient selon l'étiologie. Dans des cas très rares de démence atypique, le clinicien ne peut poser un diagnostic et la réalisation d'une biopsie cérébrale peut s'avérer nécessaire. Le tissu est alors analysé par des méthodes immunohistochimiques. Dans cette étude, nous avons pu rechercher les marqueurs biochimiques de la DNF de type Alzheimer. Pour ce faire, nous

B9 B8 B7 B6 B5 B4 B3 B2 Alz





avons utilisé la technique des immunoempreintes et l'anticorps spécifique de la DNF, AD2.

Pour chaque biopsie, la bonne qualité du prélèvement permettait des analyses histologiques et biochimiques. Les délais post-opératoires pour les biopsies sont identiques aux délais post-mortem pour les autopsies. Les délais post-opératoires sont supérieurs à 3 heures. Selon Matsuo *et al.*, 1994 et nos études sur le rat, les protéines tau de cerveaux sont donc déphosphorylées par les phosphatases endogènes. Pour l'analyse biochimique, 8 biopsies de cortex frontal de patients présentant une démence atypique ont été étudiées par la technique des immunoempreintes. Les prélèvements biopsiques sont homogénéisés dans la solution de Laemmli (1970), et chauffés avant d'être déposés sur électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS. Les protéines séparées selon leur masse moléculaire sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose et incubées avec l'anticorps AD2 (M&M, p. 133).

L'anticorps monoclonal, détecte clairement le triplet de protéines tau accompagné de traînées de matériel insoluble dans trois cas sur huit (**FIGURE 42**). Pour les biopsies des patients avec un diagnostic neuropathologique de MA (**FIGURE 42**), les corrélations entre les données neuropathologiques (nombre de neurones présentant une DNF) et biochimiques (quantité de protéines tau-PHF) sont excellentes. Dans un cas, la sémiologie évoquait une démence de type frontal et l'analyse neuropathologique n'avait pas donné de preuves suffisantes pour établir un diagnostic précis. Seuls quelques rares neurites en dégénérescence avaient été détectés au cours de l'examen neuropathologique. L'approche biochimique permet de corriger le diagnostic clinique et histologique, grâce à la spécificité de la sonde immunologique qui montre la présence du triplet pathologique, indiquant qu'il s'agit d'une démence de type Alzheimer.

Ces résultats montrent que dans trois cas sur huit, AD2 peut détecter le triplet de protéines tau-PHF, alors que dans les cinq autres cas aucun triplet ou doublet n'est visible. Ils montrent également, que les délais post-opératoires sont suffisamment longs pour

avoir une déphosphorylation des protéines tau dans les cerveaux dépourvus de DNF. Nous pouvons donc conclure que, si les délais post-opératoires sont relativement longs, une faible proportion de patients présentant des démences atypiques peut recevoir un diagnostic biochimique de démence de type Alzheimer, à partir d'une biopsie cérébrale. La méthode biochimique est spécifique et sensible. En effet, l'anticorps monoclonal détecte le triplet de protéines tau dans une quantité de tissu cérébral de l'ordre du mg. Cette analyse peut être un complément utile à l'étude histologique et apporter une aide au diagnostic. Une nouvelle génération de sondes immunologiques devrait permettre de différencier les protéines tau biopsiques des protéines tau autopsiques, et classer la plupart des maladies neurodégénératives, en fonction du profil électrophorétique des protéines tau hyperphosphorylées.

# **CONCLUSION**

Dans le cadre d'un travail réalisé au sein de l'unité INSERM 422 à Lille et en collaboration avec l'unité CNRS UMR 9921 de Montpellier, nous avons produit des sondes immunologiques monoclonales spécifiques de la dégénérescence neurofibrillaire (DNF) de type Alzheimer. Cette DNF est caractérisée par l'accumulation intracellulaire de paires de filaments appariées en hélice ou PHF. Nous avons essentiellement caractérisé un anticorps nommé AD2, qui reconnaît spécifiquement les tau-PHF, constituant antigénique majeur des PHF. Cette sonde immunologique monoclonale marque non seulement les tau-PHF, mais aussi les neurones en DNF et les PHF. De ce fait, AD2 peut être utilisé autant pour les techniques biochimiques, qu'immunohistochimiques et immunocytochimiques. Son épitope est résistant aux traitements plus ou moins drastiques employés au cours de ces différentes analyses.

En électrophorèse sur gel de polyacrylamide, les protéines tau-PHF migrent sous la forme d'un triplet, qui est spécifiquement reconnu par AD2 dans des homogénats totaux de cerveaux de patients atteints de MA. Des dilutions d'homogénats totaux de ces cerveaux ont permis de montrer que l'anticorps peut détecter le triplet de tau-PHF, lorsque moins de 10 µg de protéines totales sont déposées sur électrophorèse. Beaucoup d'études, concernant d'autres anticorps monoclonaux spécifiques des tau-PHF, ont montré que la plupart d'entre-eux reconnaissait le triplet de protéines tau-PHF purifié ou les protéines tau recombinantes phosphorylées *in vitro* (Biernat *et al.*, 1992; Lichtenberg-Kraag *et al.*, 1992; Goedert *et al.*, 1994b; Matsuo *et al.*, 1994; Otvos Jr. *et al.*, 1994). Une sonde immunologique comme AD2, permet de réaliser des études biochimiques rapides, puisqu'une purification des protéines tau-PHF n'est pas nécessaire. De plus, cet anticorps est "sensible", dans le sens où il peut détecter le triplet dans une faible quantité d'homogénat total de cerveau Alzheimer. Nous ne pouvons pas réellement parler de sensibilité, puisque la constante d'affinité n'a pas été calculée. En fait, ne possédant pas de peptide synthétique reconnu par AD2, il est difficile de calculer cette constante sur une préparation de protéines tau-PHF, puisque ces protéines restent très insolubles.

Comme la plupart des anticorps monoclonaux déjà décrits dans la littérature, AD2 est un anticorps dont la fixation dépend de l'état de phosphorylation de son épitope (Biernat *et al.*, 1992; Greenberg *et al.*, 1992; Lang *et al.*, 1992; Lichtenberg-Kraag *et al.*, 1992; Mercken *et al.*, 1992; Goedert *et al.*, 1994b; Matsuo *et al.*, 1994; Otvos Jr. *et al.*, 1994). Nos résultats et ceux de la littérature montrent donc que la phosphorylation des protéines tau est une étape charnière dans la pathogénèse de la DNF.

L'anticorps AD2 détecte également l'isoforme fœtale des protéines tau, et ne marque jamais les protéines tau adultes normales dans les homogénats de cerveaux de sujets sains obtenus à l'autopsie. Il existe des sites communs de phosphorylation entre protéines tau fœtales et tau-PHF (Kanemaru *et al.*, 1992; Hasegawa *et al.*, 1992; Bramblett *et al.*, 1993; Goedert *et al.*, 1993; Pope *et al.*, 1993; Morishima-Kawashima *et al.*, 1995). Ce sont essentiellement des sites Ser/Thr-Pro phosphorylés. AD2 semble donc être dirigé contre un site de ce type.

La caractérisation biochimique de l'épitope d'AD2 a montré dans un premier temps, que l'anticorps est dirigé contre une séquence située dans la région carboxy-terminale des protéines tau. Dans un deuxième temps, une analyse plus fine réalisée par le Dr. Goedert, a montré que l'épitope contient la Ser 396 phosphorylée ainsi que la Ser 404 phosphorylée. La phosphorylation de cette Ser joue un rôle mais non primordial.

La notion de phosphorylation anormale était apparue suite à la découverte du triplet de variants tau hyperphosphorylés (A68, ou tau-PHF, ou tau 55, 64 et 69) dans les cerveaux des patients atteints de MA et jamais chez les témoins. Des expériences de déphosphorylation en fonction du délai post-opératoire ont été effectuées, et ont montré que la déphosphorylation des protéines tau normales était très rapide et se déroulait en moins de deux heures (Matsuo *et al.*, 1994). Les protéines tau-PHF par contre, restent phosphorylées quelque soit le délai post-opératoire ou post-mortem. Des études similaires sur le rat ont été réalisées, et ont montré que chez les rats adultes, cette phosphorylation des protéines tau était également retrouvée (Garver *et al.*, 1994; Mawal-Dewan *et al.*,

1994). Nous avons pu vérifier cette hypothèse de phosphorylation des protéines tau, en utilisant AD2. Nous avons également effectué une étude cinétique de déphosphorylation des protéines tau chez le rat et montré qu'elle était effectivement très rapide si le cerveau était sorti de la boîte crânienne (moins de 2 heures). Par contre, si le cerveau est laissé dans la boîte crânienne, de façon identique pour une autopsie chez l'homme, la déphosphorylation est moins rapide, mais en moins de 4 heures les protéines tau normales adultes phosphorylées sont déphosphorylées.

Au contraire si le délai post-mortem est plus long, l'anticorps AD2 reconnaît les protéines tau de rats très jeunes, puis le marquage disparaît lorsque les rats vieillissent. Nos résultats concordent avec ceux de la littérature, qui ont conclu que la phosphorylation des épitopes de type Ser/Thr-Pro est régulée au cours du développement (Bramblett *et al.*, 1993; Goedert *et al.*, 1993; Pope *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 1995). La plus forte immunoréactivité des protéines tau fœtales comparées à celle des protéines tau adultes phosphorylées le confirme. A la vue de nos résultats récents et ceux de Matsuo *et al.* (1994), il semble que la régulation de la balance kinases/phosphatases soit un facteur clé dans le développement.

La découverte de la phosphorylation des protéines tau normales a fait surgir d'autres hypothèses sur la formation des PHF. La phosphorylation n'est peut-être plus la seule modification post-traductionnelle entraînant l'agrégation des protéines tau sous la forme de PHF. Ainsi, la glycation pourrait avoir un rôle dans la formation des PHF. Cette modification liée à l'âge, entraîne la fixation d'un sucre sur un résidu Lys. Il existe alors des réarrangements chimiques donnant des produits intermédiaires, qui sont détectés au sein des neurones en dégénérescence (Smith *et al.*, 1994). Il semble également que des résidus Ser puissent être O-glycosylés, s'ils ne sont pas phosphorylés. Il est possible d'imaginer une "compétition" entre phosphorylation et O-glycosylation; l'une pouvant être plus exprimée que l'autre au cours de la MA. Finalement, la présence de D-Aspartate au

sein des protéines tau pourrait favoriser leur incorporation au sein des PHF (Kenessey *et al.*, 1995).

AD2 fait partie de la deuxième génération de sondes immunologiques monoclonales dépendantes de la phosphorylation. Beaucoup de ces anticorps ont permis de mettre en évidence un bon nombre de sites de phosphorylation sur les tau-PHF (Biernat *et al.*, 1992; Lang *et al.*, 1992; Lichtenberg-Kraag *et al.*, 1992; Goedert *et al.*, 1994). Tous ces anticorps sont spécifiques de la DNF de type Alzheimer, et permettront encore d'étudier la DNF. En effet, pour des raisons administratives et juridiques, les délais autopsiques sont généralement supérieurs à 2 heures. La déphosphorylation ayant eu lieu, de tels anticorps feront toujours la différence entre protéines tau normales et tau-PHF.

AD2 nous a permis d'étudier la DNF dans d'autres maladies neurodégénératives telles que le syndrome de l'île de Guam, où nous avons pu retrouver le triplet de type Alzheimer. Dans la maladie de Steele-Richardson-Olszewski et la dégénérescence corticobasale, la signature biochimique de la DNF était différente, puisqu'un doublet de protéines tau était retrouvé. La plupart des maladies que nous avons pu étudier, sont relativement hétérogènes sur le plan biochimique. La distribution régionale du triplet est souvent différente de celle de la MA. Des études immunohistochimiques ont également révélé certaines différences au niveau de la distribution laminaire. Ces différences entre les maladies neurodégénératives nous amènent à penser que les sous-populations neuronales affectées par la DNF ne sont pas les mêmes. L'autre application de cet anticorps a été l'étude de biopsies cérébrales présentant un délai post-mortem long. Cette analyse a révélé qu'un diagnostic biochimique de la MA était possible.

L'utilisation de l'anticorps AD2 dans les modèles cellulaires de la MA peut s'avérer utile. En effet, des études réalisées au laboratoire ont permis d'induire une phosphorylation des protéines tau par un inhibiteur de l'acide okadaïque, et d'obtenir un doublet de protéines tau identiques au doublet 55, 64 (Sautière *et al.*, 1993; 1994; Dupont-Wallois *et al.*, 1995).

# **PERSPECTIVES**



### **Quelles sont les perspectives de recherche après ce travail de thèse?**

Le domaine de recherche sur la phosphorylation des protéines tau dans la MA évolue depuis la découverte de Matsuo *et al.*, en 1994. En effet, ces auteurs ont montré que la phosphorylation anormale des protéines tau dans la MA serait similaire à celle retrouvée dans les cerveaux de sujets témoins lorsque le délai post-mortem est très court. Néanmoins, ces résultats sont à nuancer puisqu'il existe des différences entre protéines tau normales phosphorylées et protéines tau-PHF. Si la plupart des anticorps développés contre les tau-PHF y compris AD2, reconnaissent les protéines tau normales phosphorylées, il existe un anticorps spécifique des tau-PHF, il s'agit de l'anticorps AT100 (Matsuo *et al.*, 1994). Cependant, l'épitope de cet anticorps n'a pas encore été déterminé, et il semble que les méthodes de caractérisation comme la phosphorylation *in vitro* des protéines tau recombinantes ne permettent pas de localiser son épitope. De plus, des quantifications montrent que le taux de phosphorylation des protéines tau normales phosphorylées est bien plus faible que celui des tau-PHF. L'étude des sites de phosphorylation sur les protéines tau normales phosphorylées, a été faite grâce à des anticorps reconnaissant des sites Ser/Thr-Pro. Dans le laboratoire, nous avons déjà pu montrer que AD2 détecte les protéines tau normales phosphorylées. Des études complémentaires pour caractériser au mieux ces protéines comme l'électrophorèse bidimensionnelle, pourront être utilisées. Les données actuelles utilisant des anticorps tels que AD2 indiquent que les sites Ser/Thr-Pro phosphorylés sont retrouvés à la fois dans la MA, le fœtus et dans les cerveaux témoins obtenus sans délai post-mortem. Très récemment, Morishima-Kawashima *et al.*, en 1995, montraient que les protéines tau-PHF étaient phosphorylées à la fois sur des sites de type Ser/Thr-Pro, et sur des sites non Ser/Thr-Pro. L'absence de sondes immunologiques contre les sites non Ser/Thr-Pro nous empêche à l'heure actuelle, de déterminer si ces sites sont également retrouvés sur les protéines tau normales phosphorylées. Ces sites sont-ils également retrouvés dans les cerveaux adultes sains? L'étude de ces sites est donc d'importance.

A la vue de ces résultats, il est clair qu'il faut comprendre le rôle normal de la phosphorylation des protéines tau. Est-elle impliquée dans l'adressage cellulaire des protéines tau. Déjà en 1985, Binder montrait avec l'anticorps Tau-1 que la localisation des protéines tau était essentiellement axonale. Récemment, Rebhan *et al.* (1995) utilisaient deux types d'anticorps complémentaires AT8 et Tau-1 sur des cultures de cellules de moelle épinière d'embryon de poulet. Ils montrent ainsi que l'épitope d'AT8 est principalement localisé dans la partie axonale proche du corps cellulaire, et que l'immunoréactivité diminue au fur et à mesure que l'on s'éloigne du corps cellulaire. A l'inverse, l'épitope de Tau-1 est localisé dans le cône de croissance neuritique et la partie distale de l'axone. Des études similaires pourraient être effectuées avec l'anticorps AD2, afin de déterminer la localisation cellulaire de son épitope.

Les protéines tau sont connues pour être des promoteurs de la polymérisation de la tubuline (Weingarten *et al.*, 1975; Cleveland *et al.*, 1977a,b). Elles se lient à la tubuline grâce à des régions dites répétitives dans leur partie carboxy-terminale. La phosphorylation a une grande importance, puisqu'elle régulerait la polymérisation des microtubules. En effet, les protéines tau phosphorylées sont beaucoup moins affines pour la tubuline que les protéines non phosphorylées (Lindwall et Cole, 1984a; Drubin et Kirschner, 1986). La démonstration de nombreux sites phosphorylés sur les protéines tau normales soulève de nombreuses questions quant à l'hypothèse selon laquelle les protéines tau réguleraient la polymérisation des microtubules en fonction de leur état de phosphorylation (Matsuo *et al.*, 1994; Mawal-Dewan *et al.*, 1994). Cependant, la caractérisation complète des sites phosphorylés sur les protéines tau normales n'a pas encore été réalisée. Faut-il dépasser une quantité seuil de groupements phosphates sur les protéines tau pour avoir dépolymérisation des microtubules? La phosphorylation de certains sites entraîne-t-elle la dépolymérisation des microtubules (Drewes *et al.*, 1995)? L'analyse de cette phosphorylation par des anticorps monoclonaux tels que AD2 permettrait de répondre à certaines des interrogations.

Dans la MA, le triplet de protéines tau-PHF est représenté par les protéines tau 55, 64 et 69. Les immunomarquages montrent généralement que le variant 64 est beaucoup plus immunoréactif. Est-ce que cette forme est plus exprimée que les autres, dans les neurones qui dégènèrent dans la MA? Une analyse de la localisation cellulaire des isoformes de tau et donc de la distribution de leurs ARN messagers pourrait permettre de répondre à cette question. Pour cela, la technique d'hybridation *in situ* utilisant des sondes oligonucléotidiques dirigées contre les exons adultes pourrait être employée. Cette étude aurait une application directe pour les différentes maladies neurodégénératives. En effet, nous avons pu détecter au moins deux signatures biochimiques, un triplet de type Alzheimer et un doublet de type PSP, mais d'autres combinaisons sont retrouvées dans la maladie de Pick ou les démences de type frontal (Vermersch *et al.*, 1995; résultats non publiés du laboratoire). De plus, nous savons que la distribution laminaire des neurones en dégénérescence n'est pas la même entre les différentes maladies neurodégénératives. L'expression des 6 isoformes de protéines tau ne semble pas être la même d'une sous-population neuronale à une autre. Ces analyses nous permettraient de vérifier ces hypothèses. Nous pouvons également imaginer que ces sous-populations neuronales n'expriment pas les mêmes kinases et/ou phosphatases, entraînant des différences de phosphorylation des isoformes de tau.

Il est évident que la recherche de nouvelles sondes monoclonales va s'orienter vers des anticorps qui permettront de distinguer les protéines tau normales des protéines tau-PHF. Cette troisième génération de sondes immunologiques pourrait permettre la mise en évidence de potentielles autres modifications post-traductionnelles impliquées dans la formation des PHF. Ces modifications post-traductionnelles peuvent être la phosphorylation de sites spécifiques aux tau-PHF, une glycation, une glycosylation ou d'autres modifications des protéines tau encore inconnues. Leur élaboration et caractéristique devront permettre de répondre à un certain nombre de questions.

Ces nouvelles sondes immunologiques pourraient être spécifiques, non seulement des protéines tau-PHF dans la MA, mais aussi d'autres maladies neurodégénératives. Elles devraient permettre la mise au point d'un test diagnostique précoce de la MA, par une recherche de protéines tau ou de fragments de protéines tau dans le liquide céphalo-rachidien. Finalement, elles pourront être utilisées pour la mise au point de modèles animaux ou cellulaires de la maladie.

# **MATERIELS ET METHODES**

## **I- MATÉRIEL AUTOPSIQUE:**

### **I-1- Cerveaux de bœuf et porc:**

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

### **I- 2- Cerveaux de rats:**

Nous avons réalisé un élevage de rats Wistar dans l'animalerie de l'unité INSERM 422, Lille. Pour les études biochimiques et immunohistochimiques après la naissance, les rats sont sacrifiés aux jours voulus (toujours après leur naissance: de P0 à P730), par décapitation. Après avoir décapité un rat, un hémisphère cérébral est conservé pour l'étude immunohistochimique; l'autre hémisphère est analysé par des méthodes biochimiques. Pour la déphosphorylation *in vivo*, l'animal est décapité et son cerveau est immédiatement plongé dans l'azote liquide. Pour la déphosphorylation *in vivo* dans l'animal, les rats reçoivent une dose létale d'hydrate de chloral à 20%. Pour l'extraction du cerveau, les rats sont décapités.

### **I- 3- Cerveaux humains:**

Les origines du matériel autopsique sont diverses. Les cerveaux ont été obtenus du CH&U de Lille, France, du Service de Gériologie, Hôpital Emile Roux, Limeil-Brévannes, France, du Centre de Gériatrie de Wasquehal, France, de l'ADRC (Alzheimer's Disease Research Center) du Mount Sinai Hospital, New York, NY, et du Département de Psychiatrie, Faculté de Médecine, Université of Genève (IUPG), Suisse. Les cas du syndrome de l'île de Guam proviennent du Mount Sinai Hospital, et du Guam Memorial Hospital, Agana, Guam. Tous les cas présentés dans les figures sont répertoriés dans les **tableaux 3 et 4**.



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

**TABLEAU 3**

cas	age (années)	DPM (heures)	diagnostic
A1	55	12	MA
A2	70	6	MA
A3	81	12	MA
A4	60	?	MA
A5	69	12	MA
A6	78	?	MA
A7	79	6	MA
A8	90	?	MA
A9	87	3	MA
A10	65	6	MA
C1	34	16	Témoin
C2	77	15	Témoin
C3	65	12	Témoin
C4	61	?	Témoin
C5	79	6	Témoin
C6	fœtus	?	Témoin
C7	2 mois	72	Témoin
C8	12	48	Témoin
C9	45	5	Témoin
C10	88	17	Témoin
C11	43	?	Témoin
C12	77	4	Témoin
C13	83	4	Témoin
C14	83	72	Témoin
C15	32	96	Témoin
C16	85	48	Témoin
C17	88	23	Témoin
B1	58	2*	MA
B2	40	>2	AA
B3	35	>2	MA
B4	39	>2	?
B5	64	>2	MA
B6	?	>2	?
B7	40	>2	AA
B8	63	>2	leucoencéphalopathie
B9	13	>2	?

Légende du tableau:

DPM: délai post-mortem

A: Patients atteints de maladie d'Alzheimer (MA)

C: Sujets témoins

B: biopsies cérébrales

AA: angiopathie amyloïde



TABLEAU 3

cas	age (années)	DPM (heures)	diagnostic
PSP	33	<12	PSP
CBD	73	12	CBD
PSP	71	10	PSP
G1	75	4	ALS/PDC
G2	76	3	ALS/PDC
G3	76	4	ALS/PDC
G4	78	5	ALS/PDC
G5	101	5	Témoin
G6	72	7	ALS/PDC
G7	66	10	ALS/PDC
G8	60	45	ALS/PDC
G9	72	3	ALS/PDC
G10	68	19	ALS/PDC
G11	53	5	ALS/PDC
G12	52	4	ALS/PDC
G13	70	18	ALS/PDC
G14	66	?	ALS/PDC
G15	68	?	ALS/PDC
G16	52	3	ALS
G17	?	?	ALS
G18	43	16	Témoin

Légende du tableau:

DPM: délai post-mortem

CBD: Dégénérescence corticobasale

PSP: Patients atteints de maladie de Steele-Richardson-Olszewski

G: Patients de Guam

ALS/PDC: Syndrome de l'île de Guam

ALS: Sclérose latérale amyotrophique



## II- SONDES IMMUNOLOGIQUES:

Nous avons utilisé différents anticorps polyclonaux et monoclonaux pour nos études.

### II- 1- Anticorps polyclonaux:

#### *\*Anticorps anti-PHF:*

L'anticorps dirigé contre les PHF a été réalisé à partir d'une préparation de PHF (Persuy *et al.*, 1985). Il reconnaît les neurones en DNF en microscopie optique et les PHF en microscopie électronique. Par la technique des immunoempreintes, il marque les protéines tau normales (Delacourte et Défossez, 1986; Parent *et al.*, 1988) et pathologiques (Delacourte *et al.*, 1990).

#### *\*Anticorps anti-tau:*

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

Nous possédons également au laboratoire, des sondes immunologiques polyclonales anti-tau qui ont été produites à partir de peptides synthétiques. Certains peptides ont été synthétisés par la société Néosystem (Strasbourg), d'autres par le Pr. Hublau (Faculté de Pharmacie de Lille). Il s'agit des anticorps M19G (dirigé contre la séquence 1-19), K23S (dirigé contre la séquence 180-202), V17G (dirigé contre la



séquence 350-367) et S28T (dirigé contre la séquence 400-427). Ces anticorps ont déjà été décrits dans plusieurs articles (Delacourte *et al.*, 1990; Giannakopoulos *et al.*, 1994; Sautière *et al.*, 1994) (**voir Annexe III**).

Nous avons également produit l'anticorps polyclonal S11N. Il est dirigé contre un peptide synthétique correspondant à la séquence Ser 400-Asn 410 (Ser-Gly-Asp-Thr-Ser-Pro-Arg-His-Leu-Ser-Asn) des protéines tau. La sérine qui est soulignée est phosphorylée. Elle correspond à la sérine 404 de l'isoforme la plus longue des protéines tau humaines. Ce peptide a été couplé à l'ovalbumine par l'intermédiaire de la glutaraldéhyde et injecté aux lapins, selon le protocole suivant:

#### **Préparation de l'immunogène:**

Le peptide (8  $\mu$ M) et l'ovalbumine (0,2  $\mu$ M) sont dissous dans 2 ml de tampon phosphate PBS 0,1 M à pH 7,4. 667  $\mu$ l 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  $\mu$ l d'eau). La solution est alors concentrée par ultrafiltration sur Diaflo: on passe de 2,8 ml à 1,5 ml. Une chromatographie de tamisage moléculaire est alors effectuée sur gel Ultrogel AcA 202 (gel de polyacrylamide-agarose, dont la zone de fractionnement est comprise entre 1000 et 15000 Da) équilibré dans du PBS pour séparer le peptide couplé du peptide libre. Le débit est de 0,3 ml/min. Trente fractions sont récoltées à 4°C toutes les 2 min. Un dosage des protéines est ensuite effectué pour récupérer les fractions contenant le peptide couplé à l'ovalbumine. La concentration du peptide couplé est de l'ordre de 1 mg/ml. Le peptide couplé est alors réparti en doses de 200  $\mu$ l qui sont conservées à -20°C.



**Protocole d'immunisation:**

Le protocole d'immunisation utilisé est celui décrit par Vaitukaitis *et al.*, en 1971.

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

Trois 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.

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

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

Les différentes saignées sont ensuite caractérisées par la technique des immunoempreintes.

Nous avons également utilisé deux autres anticorps polyclonaux fournis par le Dr. Goedert (MRC, Cambridge, Royaume Uni) appelés 134 et 135. Ils sont respectivement dirigés contre les séquences 428-441 et 323-336 des protéines tau (**Annexe III**).

Tous ces anticorps polyclonaux reconnaissent à la fois les protéines tau normales et tau-PHF, lorsqu'elles sont analysées par la technique des immunoempreintes.



*\*Anticorps anti-neurofilament:*

Un anticorps polyclonal dirigé contre les 3 variants des neurofilaments a également été utilisé, pour les comparaisons AD2/anti-neurofilament.

## **II- 2- Anticorps monoclonaux:**

Plusieurs types d'anticorps monoclonaux ont été utilisés: des anticorps dépendants de la phosphorylation (anti-tau-PHF), un anticorps dépendant de la déphosphorylation (anti-tau normales).

*\*Anticorps dépendants de la phosphorylation:*

AT8 (Innogenetics, Gand, Belgique; Biernat *et al.*, 1992; Goedert *et al.*, 1993; 1995) est dirigé contre les résidus Ser 202 et 205 phosphorylés et les anticorps anti-neurofilaments SMI 31, 310 et 34 (Sternberger Monoclonals, Baltimore, Etats-Unis) reconnaissent des épitopes phosphorylés conformationnels présents sur les neurofilaments H et M et les protéines tau (Sternberger *et al.*, 1985; Lichtenberg-Kraag *et al.*, 1992).

*\*Anticorps dépendant de la déphosphorylation:*

Le seul anticorps monoclonal que nous ayons utilisé est l'anticorps Tau-1. Il est dirigé contre une région non phosphorylée des protéines tau (séquence 189-207). Les résidus Ser 199 et 202 doivent être déphosphorylés (Binder *et al.*, 1985).

Tous les anticorps cités ci-dessus ont été utilisés à une dilution de 1/2000. Seul l'anticorps anti-neurofilaments SMI 310 a été utilisé à des dilutions de 1/5000 et 1/1000,

pour montrer les différences de marquage à ces deux dilutions. L'anticorps AD1 a été utilisé à une dilution de 1/2000, AD2 par contre, à une dilution de 1/16000.

Les épitopes des anticorps sur la protéine tau sont représentés en **Annexe III**.

### **III- ANALYSES BIOCHIMIQUES:**

#### **III- 1- Techniques biochimiques:**

##### **III-.1- 1- Le dot-blot:**

L'appareil de dot-blot utilisé est le système de microfiltration de chez Biorad. La membrane (Nitrocellulose 0,2  $\mu\text{m}$  ou Immobilon P 0,45  $\mu\text{m}$ ) est installée dans l'appareil. Les échantillons de 50 à 500  $\mu\text{l}$  sont déposés dans chaque puits et s'adsorbent sur la membrane par diffusion passive sous l'effet de la gravité. Un rinçage par le tampon TBS est réalisé selon les mêmes principes afin de récupérer sur les parois des puits le restant de l'échantillon. Ensuite, un lavage sous vide est réalisé avec un excès de tampon et finalement, la membrane est récupérée pour être mise en contact avec une solution de saturation. L'incubation avec l'anticorps peut être ensuite réalisée. Cette technique a été utilisée pour la caractérisation biochimique de l'anticorps AD2 avec le peptide S11N.



### III- 1- 2- Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS:

Les échantillons sont solubilisés dans la solution de Laemmli (1970): 5% SDS (p/v); 50 mM Tris pH 6,8; 4mM EDTA; 3mM EGTA; 10% glycérol; bleu de bromophénol en présence de réducteur: 0,25% dithiothréitol (p/v). Ils sont ensuite chauffés à 100°C, pendant 10 min avant d'être déposés sur gel de polyacrylamide en vue d'une électrophorèse. Des dépôts de 15 µl sont généralement effectués.

Les électrophorèses sont réalisées sur des gels de polyacrylamide en gradient 10-20% et en présence de SDS (0,1%).

#### \* Gels de séparation:

<b>pH 8,8</b>	<u>Solution d'acrylamide à 10%</u>	<u>Solution d'acrylamide à 20%</u>
<i>Tris HCl</i>	0,3 M	0,3 M
<i>Acrylamide</i>	10%	20% (p/v)
<i>Bis acrylamide</i>	0,266%	0,532% (p/v)
<i>SDS</i>	0,1%	0,1% (p/v)
<i>Temed</i>	300 µl	300 µl
<i>Glycérol</i>		200 ml
<i>H<sub>2</sub>O</i>	qsp 1000 ml	qsp 1000 ml

#### \* Gels de concentration:

<b>pH 6,8</b>	<u>Solution d'acrylamide à 5%</u>
<i>Tris HCl</i>	0,1 M
<i>Acrylamide</i>	5% (p/v)
<i>Bis acrylamide</i>	0,08% (p/v)
<i>SDS</i>	0,1% (p/v)
<i>Temed</i>	500 µl
<i>H<sub>2</sub>O</i>	qsp 1000 ml

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

*\* Tampon d'électrophorèse:*

<i>Tris HCl</i>	25 mM	<b>pH 8,3</b>
<i>Glycine</i>	0,2 M	
<i>SDS</i>	0,1% (p/v)	
<i>H<sub>2</sub>O</i>	qsp 1000 ml	

La séparation des protéines est généralement réalisée toute la nuit à 70 V constants.

Nous avons également utilisé un autre tampon d'électrophorèse pour la séparation des petits poids moléculaires, il s'agit du tampon Tris-Tricine, dont la composition est la suivante:

	<u>Tampon cathode</u>	<u>Tampon anode</u>
<i>Tris HCl</i>	0,1 M	0,2 M
<i>SDS</i>	0,1%	
<i>Tricine</i>	0,1 M	
<i>H<sub>2</sub>O</i>	qsp 1000 ml	qsp 1000 ml
<i>pH</i>	8,25	8,9

La séparation des protéines est réalisée toute la nuit à 40 V constants.



### III- 1- 3- Technique des immunoempreintes:

Après électrophorèse, les protéines sont transférées sur des membranes de Nitrocellulose (0,45  $\mu\text{m}$  de Schleicher&Schuell) pendant 1 h 30 (courant: 0,8 mA par  $\text{cm}^2$ ) en milieu semi-liquide sur un LKB Multiphor II Nova Blot selon les instructions du fabricant (tampon "anode" (Tris 0,3 M pH 10,4; méthanol 20% (v/v)) et tampon "cathode" (acide 6-amino-n-hexanoïque 40 mM pH 7,6; méthanol 20% (v/v)). Pour les électrophorèses en milieu Tris-Tricine, les protéines sont transférées sur nitrocellulose 0,2  $\mu\text{m}$  (Schleicher&Schuell) pendant 1 h. Une coloration réversible des protéines au rouge ponceau (acide trichloroacétique 3% (p/v); rouge ponceau 0,2% (p/v);  $\text{H}_2\text{O}$ ) permet de contrôler l'efficacité du transfert.

La technique des immunoempreintes est réalisée selon une modification de la méthode de Towbin (Towbin *et al.*, 1979). La saturation est réalisée par du TNT(Tris-HCl 15 mM, pH 8; NaCl 0,3 M; Tween-20 0,05% (p/v)) contenant 5% (p/v) de lait délipidé, pendant 30 min.

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

Les anticorps secondaires sont des immunoglobulines anti-souris ou anti-lapin (selon l'anticorps primaire) faites chez la chèvre. Ces anticorps secondaires sont marqués à la peroxydase (Diagnostic-Pasteur). Ils sont également dilués dans le tampon TNT avec ou sans lait, à une dilution de 1/4000. L'incubation est réalisée pendant 1 heure à température ambiante.

La détection des complexes "antigène/anticorps primaire/anticorps secondaire marqué à la peroxydase" se fait avec le kit ECL (Enhanced chemiluminescence) commercialisé par la Société Amersham. Le principe de cette méthode est l'émission de



lumière libérée par une substance se trouvant dans un "état excité". Dans ce cas, il s'agit de l'oxydation du luminol (dérivé cyclique) en présence d'eau oxygénée et de peroxydase. Pour revenir à un état stable, le luminol émet une lumière dont l'intensité est fortement augmentée par des résidus phénoliques. Cette émission de lumière impressionne alors un film (Hyperfilm, Amersham). Le signal alors visualisé sur le film permet de localiser les protéines identifiées par l'anticorps.

### III- 1- 4- Dosage colorimétrique des protéines:

La méthode utilisée est le dosage à l'acide bicinchoninique (Smith *et al.*, 1985). Il s'agit d'une variante de la réaction du Biuret. Les protéines réagissent avec les ions cuivriques pour former des ions cuivreux. Ces derniers se complexent avec l'acide bicinchoninique. L'ensemble a une forte absorbance à 562 nm. Cette technique permet donc une quantification des protéines en solution aqueuse. Les protéines peuvent être solubilisées dans des solutions avec détergents (jusqu'à 0,1% de SDS) ou de force ionique importante (jusqu'à 1 N NaCl). La limite de détection de la méthode est de l'ordre de 50 µg/ml dans les meilleures conditions.

### III- 2- Purification des protéines tau-PHF:

**Première méthode:** Cette technique a fait l'objet de notre DEA, aussi nous la rappellerons assez brièvement. Le tissu cérébral de patients atteints de MA est homogénéisé dans un tampon Tris 0,1 M contenant 0,5 M NaCl; 3 mM EGTA; 3 mM



EDTA et 2 mM DTT. L'homogénat est déposé sur coussin de sucrose à 200000 g, pendant 2 heures à 4°C. Seul le culot est récupéré, et homogénéisé dans le tampon Tris cité ci-dessus contenant en plus 1% de SDS. L'homogénat est centrifugé à nouveau à 200000 g pendant 1 heure à 4°C. Le culot récupéré est homogénéisé dans la solution réductrice de Laemmli et chauffé à 100°C pendant 10 min (Laemmli, 1970). Les protéines tau sont thermostables, et après centrifugation à 200000 g, les protéines tau-PHF sont récupérées dans le surnageant. Ce dernier est alors déposé sur gel Ultrogel AcA 34 (IBF), en vue d'une chromatographie de tamisage moléculaire. Ce gel est un copolymère de polyacrylamide et d'agarose qui possède une zone de fractionnement comprise entre 20000 et 350000 Da. L'élution est faite avec le tampon Tris ci-dessus contenant 1% de SDS. Des fractions de 3 ml sont récupérées, et l'enregistrement des pics est réalisé après lecture à 206 nm des différents constituants séparés au cours de l'élution, selon leur masse moléculaire. Après analyse par la technique des immunoempreintes, les fractions contenant le triplet de tau-PHF sont regroupées et appelées GF.

**Deuxième méthode:** Cette purification est adaptée de la méthode décrite par Greenberg et Davies, en 1990. Le tissu cérébral de patients Alzheimer confirmé est homogénéisé dans un tampon Tris 10 mM à pH 7,5 contenant 150 mM NaCl; 1 mM EGTA; 1 mM EDTA et des inhibiteurs de protéases (1 mM PMSF; 200 µM TPCK; 100 µM TLCK) dans un rapport 1/10 (p/v). L'homogénat (H) est centrifugé sur coussin de sucrose 0,5 M, à 125000 g, pendant 2 heures à 10°C. Le surnageant (composé de trois phases S1a, S1b et S1c) est éliminé et le culot (C1) homogénéisé dans le tampon Tris cité ci-dessus, contenant en plus 1% de Triton X-100; 0,5% d'acide déoxycholique et 0,1% de SDS. L'homogénat est ensuite chauffé à 100°C pendant 2 min et centrifugé à 10000 g pendant 3 min à température ambiante. Le culot (C2) est éliminé et le surnageant (S2) contenant les tau-PHF thermostables est centrifugé à 250000 g pendant 2 heures à 4°C. Le culot (C3) récupéré est alors repris par 200 µl de tampon Tris salin (10 mM Tris; 150



mM NaCl à pH 7,5). Les différentes étapes de la purification des protéines tau-PHF sont analysées par la technique des immunoempreintes, en utilisant un anticorps anti-Tau (Figure 12).

Ces deux préparations enrichies en protéines tau-PHF ont servi à l'immunisation des souris pour l'obtention des anticorps monoclonaux AD1 et AD2, selon la méthode décrite par Piechaczyk *et al.* en 1985.

### III- 3- Préparation de protéines tau fœtales de rat:

Des préparations enrichies en protéine tau fœtale de rats Wistar (d'âge inférieur à 15 jours) ont été obtenues selon une méthode décrite par Fellous *et al.*, en 1977. Le tissu cérébral de rat est homogénéisé dans un tampon MES 0,1 M à pH 6,5 contenant 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM EGTA; 0,1 mM EDTA et des inhibiteurs de protéases (1 mM PMSF; 200 µM TPCK; 100 µM TLCK) dans un rapport 1/1 (p/v). L'homogénat (H) est centrifugé à 100000 g pendant 30 min à 4°C. Le culot (C1) est éliminé. L'acide perchlorique est ajouté au surnageant (S1) pour arriver à une concentration finale à 2,5% (Lindwall et Cole, 1984b). Après 30 min d'incubation à 4°C, la solution est centrifugée à 14000 g pendant 5 min à température ambiante. Les protéines tau présentes dans le surnageant (S2) sont précipitées par 7 volumes de méthanol pendant 4 heures à 4°C. Après centrifugation à 20000 g pendant 15 min à température ambiante, les protéines tau sont retrouvées dans le culot (C3) et reprises dans un tampon Tris 10 mM à pH 7,5 contenant 150 mM NaCl. Ces fractions sont alors conservées à -80°C, jusqu'à leur utilisation.

Les différentes étapes de la préparation sont analysées par la technique des immunoempreintes (**Figure 28**). Cette préparation est utilisée pour la localisation de l'épitope.

### III- 4- Préparation de l'activité kinasique:

#### III- 4- 1- Activité kinasique de porc:

Cette préparation est identique à celle décrite par Biernat *et al.*, en 1992. Elle consiste à homogénéiser le cerveau de porc dans un tampon Tris 10 mM à pH 7,2 contenant 2 mM DTT; 2 mM EGTA et des inhibiteurs de protéases (1 mM PMSF; 200  $\mu$ M TPCK; 100  $\mu$ M TLCK) et des inhibiteurs de phosphatases (1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), dans un rapport 1/1 (p/v). Après centrifugation à 200000 g pendant 30 min à 4°C, le surnageant est récupéré et précipité par 40% de sulfate d'ammonium, pendant 1 heure à température ambiante. L'activité kinasique est finalement retrouvée dans le culot après centrifugation à 50000 g pendant 30 min à 4°C.

#### III- 4- 2- Activité kinasique de rat:

Le tissu cérébral de rat est homogénéisé dans un tampon 10 mM Tris pH 7,4 contenant 5 mM EGTA; 2 mM DTT; 1  $\mu$ M acide okadaïque et des inhibiteurs de protéases (1 mM PMSF; leupeptine (20  $\mu$ g/ml); aprotinine (20  $\mu$ g/ml) et pepstatine (20  $\mu$ g/ml)) dans un rapport 1/2,5 (p/v). L'homogénat est ensuite centrifugé à 100000 g, pendant 1 heure à 4°C. Le surnageant récupéré est utilisé directement pour les



expériences de phosphorylation des protéines tau recombinantes (Goedert *et al.*, 1993; 1994b).

### III- 5- Phosphorylation *in vitro* :

#### III- 5- 1- Phosphorylation *in vitro* de l'isoforme htau 40:

Les extraits bactériens contenant ou non le plasmide ont été réalisés dans le laboratoire par L. Wallois-Dupont, selon la technique décrite par Goedert *et al.*, en 1994. Nous avons réalisé la phosphorylation en ajoutant à 40  $\mu$ l d'extrait bactérien contenant ou non le plasmide (concentration en protéines de l'ordre du mg/ml), 5  $\mu$ l d'activité kinasique à 37°C. Le tampon d'incubation contient également 2 mM ATP; 2 mM MgCl<sub>2</sub> et un inhibiteur de phosphatases, l'acide okadaïque 1  $\mu$ M et des inhibiteurs de protéases (1 mM PMSF; 200  $\mu$ M TPCK; 100  $\mu$ M TLCK). Nous avons effectué une cinétique de phosphorylation sur 7 heures (0, 30 min, 1, 2, 4 et 7 heures) et 24 heures (0, 12, 14, 16, 18 et 24 heures).

#### III- 5- 2- Phosphorylation *in vitro* des isoformes natives et mutées:

Les différentes isoformes utilisées pour ces expériences de phosphorylation *in vitro* sont natives, ou contiennent des résidus Ser ou Thr mutés en résidu Ala. Les incubations (50  $\mu$ l) sont réalisées à 37°C dans du tampon Hepes à pH 7,2, contenant 2 mM ATP; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 1  $\mu$ M de protéine tau; 1  $\mu$ l d'extrait kinasique; 5 mM EGTA; 2 mM DTT; 1  $\mu$ M acide okadaïque et des inhibiteurs de protéases (1 mM PMSF; leupeptine (20  $\mu$ g/ml);



aprotinine (20 µg/ml) et pepstatine (20 µg/ml)). Ces expériences ont été entièrement réalisées par le Dr. Goedert (MRC, Cambridge, Royaume Uni).

Lorsque les réactions de phosphorylation sont terminées, les différents incubats sont analysés par la technique des immunoempreintes.

### **III- 6- Déphosphorylation par la phosphatase alcaline:**

Nous avons réalisé deux types de déphosphorylation par la phosphatase alcaline: une déphosphorylation en milieu liquide, avant les dépôts sur électrophorèse et une déphosphorylation sur membrane de nitrocellulose après transfert des protéines.

#### **III- 6- 1- Déphosphorylation avant dépôt:**

Des homogénats totaux de cerveaux de patients atteints de MA et de sujets témoins qui sont traités par la solution de Laemmli, sont dialysés contre un tampon Tris 50 mM à pH 8,3 contenant 50 mM NaCl; 0,5% SDS; 0,2 mM DTT; 1 mM MgCl<sub>2</sub> et des inhibiteurs de protéases (1 mM PMSF; 200 µM TPCK; 100 µM TLCK). La dialyse s'effectue à 4°C toute la nuit (16 heures). Le dialysat est alors repris pour les expériences de déphosphorylation. Cette dernière est réalisée à 37°C, en utilisant la phosphatase alcaline de veau de grade II (Boehringer Mannheim, Allemagne) à une concentration de 50 UI/ml dans le tampon ci-dessus, pendant 4 heures. La réaction enzymatique est arrêtée par chauffage à 100°C, après avoir ajouté un volume égal de la solution de Laemmli à l'échantillon (Flament *et al.*, 1989).

### III- 6- 2- Déphosphorylation après transfert:

Après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS et transfert sur membrane de nitrocellulose, les différents échantillons sont incubés ou non avec la phosphatase alcaline. Pour cela, le tampon d'incubation est le même que celui cité ci-dessus et la concentration de la phosphatase alcaline aussi. Le temps d'incubation est plus long; en effet, la phosphatase est laissée toute la nuit à température ambiante. Après élimination de la solution enzymatique, la membrane de nitrocellulose est rincée plusieurs fois dans le tampon TNT; Tris 10 mM à pH 7,5 contenant 150 mM NaCl et 0,05% de Tween 20 (p/v).

### III- 7- Expression de l'épitope chez le rat

#### III- 7- 1- Etude du tissu cérébral de rat obtenu avec délai post-mortem:

Les cerveaux de rats sacrifiés au jour voulu sont homogénéisés dans la solution de Laemmli dans un rapport 1/10 (p/v), puis chauffés à 100°C pendant 10 min (Laemmli, 1970). Les différents échantillons sont ensuite déposés sur électrophorèse en gel de polyacrylamide 10-20%. Les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose, avant d'être incubées avec AD2, AD1 ou M19G.



### III- 7- 2- Etude du tissu cérébral de rat obtenu sans délai post-mortem:

Pour cette expérience, nous avons pris des rats âgés de 11 mois. Après avoir décapité le rat, son cerveau est extrait de la boîte crânienne en moins de 2 min et directement plongé dans l'azote liquide, avant d'être homogénéisé dans la solution réductrice de Laemmli (Laemmli, 1970). L'homogénat est ensuite soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, avant d'être analysé par la technique des immunoempreintes avec AD2.

Nous avons également réalisé une cinétique de déphosphorylation *in vivo*, par les phosphatases endogènes présentes dans le tissu cérébral. Pour cela, après avoir décapité le rat et plongé son cerveau dans l'azote liquide, le tissu cérébral est homogénéisé dans un tampon Tris 10 mM à pH 7,5 contenant 150 mM NaCl et des inhibiteurs de protéases (1 mM PMSF; 200  $\mu$ M TPCK; 100  $\mu$ M TLCK), dans un rapport 1/5 (p/v). L'homogénat est laissé à température ambiante pour la cinétique de déphosphorylation. Dans un premier temps, nous avons réalisé une cinétique de déphosphorylation *in vivo*, sur 24 heures. Des fractions sont prélevées à différents temps d'incubation et mélangées à la solution de Laemmli, dans un rapport 1/2 (v/v). Les échantillons sont déposés sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, puis analysés par la technique des immunoempreintes. Dans un deuxième temps, nous avons réalisé une cinétique sur 90 min. La méthode est identique à celle utilisée précédemment. Les anticorps utilisés sont AD2, Tau-1 et M19G.

Nous avons abordé la déphosphorylation *in vivo*, en laissant le cerveau dans la boîte crânienne et le corps, de façon à mimer le plus possible un délai post-mortem. Pour cela, nous avons sélectionné 14 rats de même âge (14 mois) mais de sexe opposé. Nous leur injectons une dose de 3ml d'hydrate de chloral 20% en intra-péritonéale. Dès que le rat est mort, il est laissé à température ambiante, jusqu'à ce qu'il soit décapité. Pour un temps donné, un mâle et une femelle sont utilisés. Le délai post-mortem est compris entre 0 et 4



heures (0, 10, 20, 30, 45 min, 1, 2 et 4 heures). Dès que le rat est décapité, son cerveau est extrait en moins de 2 min, et plongé dans l'azote liquide avant d'être homogénéisé dans la solution de Laemmli. L'analyse est réalisée par la technique des immunoempreintes en utilisant AD2, Tau-1.

#### **IV- ANALYSE HISTOLOGIQUE:**

##### **IV- 1- Coupes en congélation:**

###### **IV- 1- 1- Tissu cérébral humain:**

Dans les cas des patients atteints de MA, du syndrome de l'île de Guam et de témoins, le matériel est fixé par immersion dans un tampon phosphate pH 7,4 contenant 4% de paraformaldéhyde, pendant 12 heures. Les régions à étudier sont ensuite disséquées et post-fixées de 48 à 72 heures (Hof *et al.*, 1990). Les régions disséquées\* sont le cortex temporal inférieur (aire 20), le cortex frontal (aire 9 et 11), le cortex entorhinal et des structures sous-corticales comme l'amygdale, le thalamus et le noyau caudé.

Tous les échantillons ont été rincés dans une série de solutions de sucrose de concentration croissante (12%, 16% et 18%), puis congelés et finalement sectionnés à 40  $\mu\text{m}$  avec un cryostat.

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



#### IV- 1-2- Tissu cérébral de rat:

Après le sacrifice du rat, un hémisphère est plongé dans une solution à 4% de paraformaldéhyde pendant 24 heures. Le bloc est ensuite mis dans le tampon Coons (Veronal ou barbital sodique 0,2% (p/v); NaCl 0,85% (p/v); Triton X-100 0,1% (p/v) à pH 7,4) contenant 20% de sucrose, puis inclus dans du Tissu-Tek avant d'être stocké à -80°C. Les coupes de cerveau sont réalisées sur cryostat, et ont une épaisseur de 14 µm. Elles sont récupérées sur lames gélatinées et stockées à -40°C.

En parallèle à l'étude immunohistochimique, des colorations au bleu de toluidine (borate de sodium 1%; bleu de toluidine 0,5%; H<sub>2</sub>O) sont effectuées afin de visualiser l'évolution de la cytoarchitecture au cours du développement.

#### IV- 2- Coupes en paraffine:

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

### IV- 3- Immunohistochimie:

#### IV- 3- 1- Tissu cérébral humain:

*\* Elimination de la peroxydase endogène:*

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

*\* Kit avidine-biotine/DAB:*

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

#### IV- 3- 2- Tissu cérébral de rat:

Les coupes sont incubées avec l'anticorps AD2 à une dilution de 1/2000, toute la nuit à température ambiante. Après rinçage dans le tampon Coons, la lame est incubée avec l'anticorps secondaire. Il s'agit d'un anticorps anti-souris fait chez la chèvre (Jackson Immunoresearch, Etats-Unis). Il est marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine et est utilisé à une dilution de 1/100. Lorsque la réaction est terminée, les lames sont à nouveau rincées



dans le tampon Coons et montées avec un produit glycérolé (1 volume de tampon coons; 3 volumes de glycérol; 0,1 % de paraphénylène diamine). L'isothiocyanate de fluorescéine produit une fluorescence dans les verts. Le marquage obtenu est visualisée sous fluorescence, sur le microscope Axiophot (Zeiss) en utilisant le filtre approprié pour la fluorescéine (excitation à 450-490 nm et émission à 515-565 nm).

## V- ANALYSE IMMUNOCYTOCHIMIQUE:

Cette étude a été entièrement réalisée par le Pr. Défossez et le Dr. Reig. Nous ne rappellerons que brièvement les techniques utilisées.

Une biopsie cérébrale frontale a été effectuée sur un sujet de 58 ans (**Tableau 3; B1**). Ce patient avait été diagnostiqué sur le plan clinique comme Alzheimer probable, selon les critères décrits par Mc Khann *et al.* en 1984. La biopsie était fixée dans un tampon phosphate contenant 0,05% de glutaraldéhyde, 4% de paraformaldéhyde et 0,2% d'acide picrique. Puis, elle était post-fixé dans 1% de tétroxyde d'osmium. Après inclusion dans l'araldite, des coupes adjacentes semifines et ultrafines étaient coupées sur ultramicrotome.

L'immunohistochimie est faite sur les coupes adjacentes semifines, après élimination de l'araldite selon la technique décrite par Mayor *et al.* en 1961. Les coupes ultrafines sont utilisées, comme décrit dans Défossez *et al.* en 1988. Après un premier traitement par l'eau oxygénée, les grilles sont incubées avec AD2, toute la nuit à 4°C. Après rinçage, des immunoglobulines anti-souris marqués à l'or colloïdal (15 nm) sont ajoutées et incubées pendant 1 heure à température ambiante. Finalement, les coupes sont rincées et contre-colorées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb, et analysées sur un microscope électronique Zeiss 902.



## **VI- QUANTIFICATIONS:**

Les films ECL ont été digitalisés sur Macintosh Quadra avec un scanner ScanJet IIC (Hewlet Packard), avec une résolution de 100 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 du domaine public, Image 1.47 élaboré par W. Rasband (National Institute of Health, USA).

# **BIBLIOGRAPHIE**

- Abraham CR, Selkoe DJ, Potter H (1988) Immunochemical identification of the serine protease inhibitor, alpha-1-antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Cell* 52, 487-501.
- Albert ML, Feldman RG, Willis AL (1974) The "subcortical dementia" of progressive supranuclear palsy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 37, 121-130.
- Alzheimer A. (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Z. Psychiat.* 64, 146-148.
- Anderson JP, Esch FS, Keim PS, Sambamurti K, Leiberburg I, Robakis NK (1991) Exact cleavage site of Alzheimer amyloid precursor in neuronal PC-12 cells. *Neurosci. Lett.* 128, 126-128.
- Anderton BH, Brion JP, Couck AM, Davis DR, Gallo JM, Hanger DP, Latimer DA, Lovestone S, Miller CCJ, Reynolds CH, Smith C, Woodgett J (1994) Factors affecting tau hyperphosphorylation in cells. The cytoskeleton in Alzheimer's disease, Rochester, 21-23 Mai.
- Andreadis A, Brown WM, Kosik KS (1992) Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* 31, 10626-10633.
- Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, Van Hoesen GW (1991) The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cerebral Cortex* 1, 103-116.
- Arnold CS, Cole RN, Johnson GVW, Hart GW (1994) Tau is a glycoprotein. *Soc. Neurosci. Abstr.* 20, 1035.
- Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-White ET, Hyman BT (1992) Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42, 631-639.
- Bancher C, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Fried VA, Smith HT, Wisniewski HM (1991) Abnormal phosphorylation of tau precedes ubiquitination in neurofibrillary pathology of Alzheimer disease. *Brain Res.* 539, 11-18.
- Baumann K, Mandelkow EM, Biernat J, Piwnicka-Worms H, Mandelkow E (1993) Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. *FEBS Lett.* 336, 417-424.
- Bell MA, Ball MJ (1981) Morphometric comparison of hippocampal microvasculature in ageing and demented people: diameters and densities. *Acta Neuropathol.* 53, 299-318.

- Biernat J, Mandelkow EM, Schröter C, Lichtenberg-Kraag B, Steiner B, Berling B, Meyer H, Mercken M, Vandermeeren A, Goedert M, Mandelkow E (1992) The switch of tau protein to an Alzheimer-like state includes the phosphorylation of two serine-proline motifs upstream of the microtubule binding region. *EMBO J.* 11, 1593-1597.
- Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI (1985) The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J. Cell. Biol.* 101, 1371-1378.
- Blessed G, Tomlinson BE, Roth M (1968) The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral gray matter of elderly subjects. *Brit. J. Psychiat.* 114, 797-811.
- Bons N, Mestre N, Ritchie K, Petter A, Podlisny M, Selkoe D (1994) Identification of amyloid beta protein in the brain of the small short-lived lemurian primate *Microcebus murinus*. *Neurobiol. Aging* 15, 215-220.
- Bouras C, Hof PR, Morrison JH (1993) Neurofibrillary tangle densities in the hippocampal formation in a non-demented population define subgroups of patients with differential early pathologic changes. *Neurosci. Lett.* 153, 131-135.
- Bouras C, Hof PR, Giannakopoulos P, Michel J-P, Morrison JH (1994) Regional distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques in the cerebral cortex of elderly patients: a quantitative evaluation of a one-year autopsy population from a geriatric hospital. *Cerebral Cortex* 4, 138-150.
- Braak H, Braak E (1985) On areas of transition between entorhinal allocortex and temporal isocortex in the human brain. Normal morphology and lamina-specific pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 68, 325-332.
- Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82, 239-259.
- Bramblett GT, Trojanowski JQ, Lee VM-Y (1992) Regions with abundant neurofibrillary pathology in human brain exhibit a selective reduction in levels of binding-competent tau and the accumulation of abnormal tau isoforms (A68 proteins). *Lab. Invest.* 66, 212-222.
- Bramblett GT, Goedert M, Jakes R, Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee VMY (1993) Abnormal tau phosphorylation at Ser 396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron* 10, 1089-1099.
- Brion JP, Passareiro H, Nunez J, Flament-Durand J (1985) Immunological determinants of tau proteins are present in NFT of AD. *Arch. Biol. (Brux)* 95, 229-235.



- Brion JP, Couck AM, Robertson J, Loviny TLF, Anderton BH (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.
- Brody JA, Stanhope JM, Kurland LT (1975) Patterns of amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia on Guam. *Topics on tropical neurology, contemporary neurology series, Vol. 12.* Edited by Hornabrook RW. FA Davis, Philadelphia, pp 45-70.
- Buée L, Hof PR, Roberts DD, Delacourte A, Morrison JH, Fillit HM (1992) Immunohistochemical identification of Thrombospondin in normal human brain and Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 141, 783-788.
- Buée L, Ding W, Anderson JP, Narindrasorasak S, Kisilevsky R, Boyle NJ, Robakis NK, Delacourte A, Greenberg B, Fillit HM (1993a) Binding of vascular heparan sulfate proteoglycan to Alzheimer's amyloid precursor protein is mediated in part by the N-terminal region of A4 peptide. *Brain Res.* 627, 199-204.
- Buée L, Ding W, Delacourte A, Fillit H (1993b) Binding of secreted human neuroblastoma proteoglycans to the Alzheimer's amyloid A4 peptide. *Brain Res.* 601, 154-163.
- Buée L, Hof PR, Bouras C, Delacourte A, Perl DP, Morrison JH, Fillit HM (1994) Pathological alterations of the cerebral microvasculature in Alzheimer's disease and related dementing disorders. *Acta Neuropathol.* 87, 469-480.
- Burdick D, Soreghan B, Kwon M, Kosmoski J, Knauer M, Henschen A, Yates J, Cotman C, Glabe C (1992) Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/ $\beta$  amyloid peptide analogs. *J. Biol. Chem.* 267, 546-554.
- Butner KA, Kirschner MW (1991) Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *J. Cell. Biol.* 115, 717-730.
- Caceres A, Kosik KS (1990) Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* 343, 461-463.
- Caceres A, Potrebic S, Kosik KS (1991) The effect of tau antisense oligonucleotides on neurites formation of cultured cerebellar macroneurons. *J. Neurosci.* 11, 1515-1523.
- Cammarata S, Mancardi G, Tabaton M (1990) Formic acid treatment exposes hidden neurofilament and tau epitopes in abnormal cytoskeletal filaments from patients with progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 115, 351-355.
- Campbell SK, Switzer RC, Martin TL (1987) Alzheimer's plaques and tangles: a controlled and enhanced silver staining method. *Soc. Neurosci. Abstr.* 13, 678.

- Chartier-Harlin MC, 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  $\beta$ -amyloid precursor protein gene. *Nature* 353, 844-846.
- Chartier-Harlin MC, Parfitt M, Legrain S, Pérez-Tur J, Brousseau T, Evans A, Berr C, Vidal O, Roques P, Gourlet V, Fruchart JC, Delacourte A, Rossor M, Amouyel P (1994) Apolipoprotein E,  $\epsilon$ 4 allele as a major risk factor for sporadic early and late-onset forms of Alzheimer's disease: analysis of the 19q13.2 chromosomal region. *Hum. Molec. Genet.* 3, 569-574.
- Chartier-Harlin MC, Pérez-Tur J (1995) Apolipoprotéine E: une protéine aux multiples facettes. *Alzheimer Actualités, Fondation IPSEN*, 96, 6-11.
- Chen KM, Chase TN (1986) Parkinsonism-dementia. Extrapyrmidal disorders, *Handbook of clinical neurology*, Vol. 49. Edited by Vinken PJ, Bruyn GW and Klawans HL. Elsevier, Amsterdam, pp 167-183.
- Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ (1992) Mutation of the  $\beta$ -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases  $\beta$ -protein production. *Nature* 360, 672-674.
- Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW (1977a) Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J. Mol. Biol.* 116, 207-225.
- Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW (1977b) Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J. Mol. Biol.* 116, 227-247.
- Cohen P (1989) The structure regulation of protein phosphatases. *Ann. Rev. Biochem.* 58, 453-508.
- Condamines O, Buée-Scherrer V, Boissier L, Watzel A, Delacourte A, Pau B, Mourton-Gilles C. New immunoassay for the mapping of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease using two monoclonal antibodies against human PHF-tau proteins. (soumis).
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921-923.
- Correas I, Diaz-Nido J, Avila J (1992) Microtubule-associated protein tau is phosphorylated by protein kinase C on its tubulin binding domain. *J. Biol. Chem.* 267, 15721-15728.

- Couchie D, Mavilia C, Georgieff IS, Liem RKH, Shelanski ML, Nunez J (1992) Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4378-4381.
- Couchie D, Gache Y, Mavilia C, Guillemot J, Bridoux AM, Nivez MP, Nunez J (1993) Protéines tau de haut poids moléculaire et acquisition de la polarité neuronale dans le système nerveux périphérique. *C. R. Acad. Sci. Paris* 316, 404-409.
- Crowther RA, Olesen OF, Smith MJ, Jakes R, Goedert M (1994) Assembly of Alzheimer-like filaments from full-length tau protein. *FEBS Lett.* 337, 135-138.
- Cummings JL, Benson DF (1984) Subcortical dementia: review of an emerging concept. *Arch. Neurol.* 41, 874-879.
- Défossez A, Delacourte A (1987) Transformation of degenerating neurofibrils into amyloid substance in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* 81, 1-10.
- Défossez A, Beauvillain JC, Delacourte A, Mazzuca M (1988) Alzheimer's disease: a new evidence for common epitopes between microtubule associated protein tau and paired helical filaments (PHF): demonstration at the electron microscope by a double immunogold labeling. *Virchows Archiv.* 413, 141-145.
- Delacourte A, Défossez A (1986) Alzheimer's disease : Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major antigenic components of paired helical filaments. *J. Neurol. Sci.* 76, 173-186.
- Delacourte A, Buée L (1989) Maladie d'Alzheimer: la réaction gliale est générale et intense dans tous les territoires du système nerveux central. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 308, 359-365.
- Delacourte A (1990) General and dramatic glial reaction in Alzheimer brains. *Neurology* 40, 33-37.
- Delacourte A, Flament S, Dibe EM, Hublau P, Sablonnière B, Hémon B, Scherrer V, Défossez A (1990) Pathological tau proteins 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, Sautière PE, Watez A, Mourton-Gilles Ch, Petter A, Bons N (1994) Biochemical characterization of tau proteins during cerebral aging of the lemurian primate *Microcebus murinus*. *C. R. Acad. Sci. Paris* 318, 85-89.
- Delaère P, Duyckaerts C, He Y, Piette F, Hauw JJ (1991) Subtypes and differential laminar distributions of  $\beta$ A4 deposits in Alzheimer's disease: Relationship with the intellectual status of 26 cases. *Acta Neuropathol.* 81, 328-335.

- Dickson WD, Crystal HA, Mattiace LA, Masur DM, Blau AD, Davies P, Yen SH, Aronson MK (1991) Identification of normal and pathological aging in prospectively studied non-demented elderly humans. *Neurobiol. Aging* 13, 179-189.
- Doering LC (1993) Probing modifications of the neuronal cytoskeleton. *Mol. Neurobiol.* 7, 265-291.
- Dong DLY, Xu ZS, Chevrier MR, Cotter RJ, Cleveland DW, Hart GW (1993) Glycosylation of mammalian neurofilaments. Localization of multiple O-linked N-acetylglucosamine moieties on neurofilament polypeptides L and M. *J. Biol. Chem.* 268, 16679-16687.
- Drewes G, Lichtenberg-Kraag B, Döring F, Mandelkow EM, Biernat J, Goris J, Dorée M, Mandelkow E (1992) Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *EMBO J.* 11, 2131-2138.
- Drewes G, Trinczek B, Illenberger S, Biernat J, Schmittulms G, Meyer HE, Mandelkow EM, Mandelkow E (1995) Microtubule-associated protein microtubule affinity-regulating kinase (p110(mark))- A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262. *J. Biol. Chem.* 270, 7679-7688.
- Drubin DG, Caput D, Kirschner MW (1984) Studies on the expression of the microtubule-associated protein, tau, during mouse brain development, with newly isolated complementary DNA probes. *J. Cell. Biol.* 98, 1090-1097.
- Drubin DG, Kirschner MW (1986) Tau protein function in living cells. *J. Cell. Biol.* 103, 2739-2746.
- Drubin DG, Kobayashi S, Kellogg D, Kirschner MW (1988) Regulation of microtubule protein levels during cellular morphogenesis in nerve growth factor-treated PC12 cells. *J. Cell. Biol.* 106, 1583-1591.
- Dupont-Wallois L, Sautière PE, Cocquerelle C, Bailleul B, Delacourte A, Caillet-Boudin ML (1995) Shift from fetal-type to Alzheimer-type phosphorylated tau proteins in SKNSH-SY 5Y cells treated with okadaic acid. 357, 197-201.
- Duyckaerts C, Hauw JJ, Piètte F, Rainsard C, Poulain V, Buthaux P, Escourrolle R (1985) Cortical atrophy in senile dementia is mainly due to a decrease in cortical length. *Acta Neuropathol. (Berlin)* 66, 72-74.
- Elizan TS, Hirano A, Abrams BM, Need RL, Van Nuis C, Kurland LT (1966) Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of Guam - Neurological reevaluation. *Arch. Neurol.* 14, 356-368.

- Estus S, Golde TE, Kunishita T, Blades D, Lowery D, Eisen M, Usiak M, Qu X, Tabira T, Greenberg BD, Younkin SG (1992) Potentially amyloidogenic, carboxy-terminal derivatives of the amyloid protein precursor. *Science* 255, 726-728.
- Evans KC, Berger EP, Cho CG, Weisgraber KH, Lansbury PT (1995) Apolipoprotein E is a kinetic but not thermodynamic inhibitor of amyloid formation: implications for the pathogenesis and treatment of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 763-767.
- Fawcett JW, Mathews G, Housden E, Goedert M, Matus A (1994) Regenerating sciatic nerve axons contain the adult rather than the embryonic pattern of microtubule associated proteins. *Neuroscience* 61, 789-804.
- Fellous A, Francon J, Lennon AM, Nunez J (1977) Microtubule assembly in vitro. Purification of assembly-promoting factors. *Eur. J. Biochem.* 78, 167-174.
- Flament S, Delacourte A, Hémon B, Défossez A (1989) Characterization of two pathological tau protein variants in Alzheimer brain cortices. *J. Neurol. Sci.* 92, 133-141.
- Flament S, Delacourte A (1989) Abnormal tau species are produced during Alzheimer's disease neurodegenerating process. *FEBS Lett.* 247, 213-216.
- Flament S, Delacourte A, Verny M, Hauw JJ, Javoy-Agid F (1991) Abnormal tau proteins in progressive supranuclear palsy. Similarities and differences with the neurofibrillary degeneration of the Alzheimer type. *Acta Neuropathol.* 81, 591-596.
- Folstein MF, Folstein SE, Mc Hugh PR (1975) "Mini mental test". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J. Psychiat. Res.* 12, 189-198.
- Folstein MF (1989) Heterogeneity in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 10, 435-436.
- Fondation IPSEN (1992) *Maladie d'Alzheimer*. 5ème édition. Préface du Pr. JL Signoret. Edition Générale Graphique.
- Frautschy SA, Baird A, Cole GM (1991) Effects of injected Alzheimer  $\beta$ -amyloid cores in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8362-8366.
- Frautschy SA, Cole GM, Baird A (1992) Phagocytosis and deposition of vascular  $\beta$ -amyloid in rat brains injected with Alzheimer  $\beta$ -amyloid. *Am. J. Pathol.* 140, 1389-1399.
- Frederickson RCA (1992) Astroglia in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 13, 239-253.
- Gallyas F (1971) Silver staining of Alzheimer's neurofibrillary changes by mean of physical development. *Acta Morphol. Acad. Sci. Hung.* 19, 1-8.

- Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, Guido T, Hagopian S, Johnson-Wood K, Khan K, Lee M, Leibowitz P, Lieberburg I, Little S, Masliah E, McConlogue L, Montoya-Zavala M, Mucke L, Paganini L, Penniman E, Power M, Schenk D, Seubert P, Snyder B, Soriano F, Tan H, Vitale J, Wadsworth S, Wolozin B, Zhao J (1995) Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F  $\beta$ -amyloid precursor protein. *Nature* 373, 523-527.
- Garruto RM, Yase Y (1986) Neurodegenerative disorders of the Western Pacific: the search for mechanisms of pathogenesis. *Trends Neurosci.* 9, 368-371.
- Garver TD, Harris KA, Lehman RAW, Lee VMY, Trojanowski JQ, and Billingsley ML (1994) Tau phosphorylation in human, primate, and rat brain: evidence that a pool of tau is highly phosphorylated in vivo and is rapidly dephosphorylated in vitro. *J. Neurochem.* 63, 2279-2287.
- Giacobini E, Becker R, Mc Ihang M, Kumar V (1988) Intracerebroventricular administration of cholinergic drugs: preclinical trials and clinical experience in Alzheimer patients. In: Giacobini E, Becker R (Eds). *Current Research in Alzheimer Therapy*. Taylor and Francis, New-York, pp113-122.
- Giannakopoulos P, Hof PR, Mottier S, Michel JP, Bouras C (1994a) Neuropathological changes in the cerebral cortex of 1258 cases from a geriatric hospital: retrospective clinicopathological evaluation of a 10-year autopsy evaluation. *Acta Neuropathol.* 87, 456-468.
- Giannakopoulos P, Hof PR, Giannakopoulos A-S, Buée-Scherrer V, Surini M, Delacourte A, Bouras C (1994b) Dementia in the oldest-old: quantitative analysis of 12 cases from a psychiatric hospital. *Dementia* 5, 348-356.
- Glennner GG (1980) Amyloid deposits and amyloidosis: the  $\beta$ -fibrilloses. *New Eng. J. Med.* 302, 1283-1292; 1333-1343.
- Glennner GG, Wong CW (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebro-vascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 885-890.
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, 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.

- Godfroid E, Octave JN (1990) Glycosylation of the amyloid peptide precursor containing the Kunitz protein inhibitor domain improves the inhibition of trypsin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 171, 1015-1021.
- Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA (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 MG, Potier MC, Ulrich J, Crowther RA (1989b) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J.* 8, 393-399.
- 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, Crowther RA, Garner CC (1991) Molecular characterization of microtubule-associated proteins tau and MAP2. *Trends Neurosci.* 14, 193-199.
- Goedert M, Spillantini MG, Crowther RA (1992a) Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1983-1987.
- Goedert M, Cohen ES, Jakes R, Cohen P (1992b) p42 MAP kinase phosphorylation sites in microtubule-associated protein tau are dephosphorylated by protein phosphatase 2A<sub>1</sub>. Implications for Alzheimer's disease. *FEBS Lett.* 312, 95-99.
- Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA (1992c) Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 8, 159-168.
- Goedert M, Jakes R, Crowther RA, Six J, Lübke U, Vandermeeren M, Cras P, Trojanowski JQ, Lee VMY (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.
- Goedert M, Jakes R, Spillantini MG, Crowther RA (1994a) Tau protein and Alzheimer's disease. *Microtubules*, 183-200.
- Goedert M, Jakes R, Crowther RA, Cohen P, Vanmechelen E, Vandermeeren M, Cras P (1994b) Epitope mapping of monoclonal antibodies to the paired helical filaments of Alzheimer's disease: identification of phosphorylation sites in tau protein. *Biochem. J.* 301, 871-877.

- Goedert M, Jakes R, Vanmechelen E (1995) Monoclonal antibody AT8 recognises tau protein phosphorylated at both serine 202 and threonine 205. *Neurosci. Lett.* 189, 167-170.
- Golde TE, Estus S, Younkin LH, Selkoe DJ, Younkin SG (1992) Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science*, 255, 728-730.
- Goldgaber D, Lerman MI, McBride OW, Saffiotti U, Gadjusek DC (1987) Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* 235, 877-880.
- Gong CX, Singh TJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1993) Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *J. Neurochem.* 61, 921-927.
- Gong CX, Singh TJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1994a) Alzheimer's disease abnormally phosphorylated tau is dephosphorylated by protein phosphatase-2B (calcineurin). *J. Neurochem.* 62, 803-806.
- Gong CX, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1994b) Dephosphorylation of Alzheimer's disease abnormally phosphorylated tau by protein phosphatase-2A. *Neuroscience* 61, 765-772.
- Götz J, Probst A, Spillantini MG, Schäfer T, Jakes R, Bürki K, Goedert M (1995) Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform. *EMBO J.* sous presse.
- Greenberg SG, 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 SG, Davies P, Schein JD, Binder LI (1992) Hydrofluoric acid-treated tau-PHF proteins display the same biochemical properties as normal tau. *J. Biol. Chem.* 267, 564-569.
- Greenberg SG (1993) Filament-associated tau proteins in neurodegenerative diseases. *Soc. Neurosci. Abstr.* 19: 196.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K., Quinlan M., Tung Y.C., Zaidi M.S., and Wisniewski H.M. (1986a) Microtubule associated protein tau, a component of Alzheimer paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* 261, 60-84.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1986b) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4913-4917.
- Guard O et Michel B (1989) *La Maladie d'Alzheimer*. Medsi/McGraw-Hill édition. 57-167.



- Gustke N, Steiner B, Mandelkow EM, Biernat J, Meyer HE, Goedert M, Mandelkow E (1992) The Alzheimer-like phosphorylation of tau protein reduces microtubule binding and involves Ser-Pro and Thr-Pro motifs. *FEBS Lett.* 307, 199-205.
- Haltiwanger RS, Kelly WG, Roquemore EP, Blomberg MA, Dong DLY, Kreppel L, Chou TY, Hart GW (1992) Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins is ubiquitous and dynamic. *Biochem. Soc. Trans.* 20, 264-269.
- Hanger DP, Hughes K, Woodgett JR, Brion JP, and Anderton BH (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 JA, Higgins GA (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184-185.
- Harris KA, Oyler GA, Doolittle GM, Vincent I, Lehman RAW, Kincaid RL (1993) Okadaic acid induces hyperphosphorylated forms of tau protein in human brain slices. *Ann. Neurol.* 33, 77-87.
- Hasegawa M, Arai T, Ihara Y (1990) Immunochemical evidence that fragments of phosphorylated maps (MAPLB) are bound to neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neuron* 4, 909-918.
- 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.
- Haugh MC, Probst A, Ulrich J, Kahn J, Anderton BH (1986) Alzheimer neurofibrillary tangles contain phosphorylated and hidden neurofilament epitopes. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 49, 1213-1220.
- Hauw JJ, Verny M, Delaère P, Cervera P, He Y, Duyckaerts C (1990) Constant neurofibrillary changes in the neocortex in progressive supranuclear palsy. Basic differences with Alzheimer's disease and aging. *Neurosci. Lett.* 119, 182-186.
- Himmler A (1989a) Structure of the bovine tau gene: Alternatively spliced transcripts generate a protein family. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1389-1396.
- Hirano A, Kurland LT, Krooth RS, Lessel S (1961) Parkinsonism-dementia complex, and endemic disease on the island of Guam: I. Clinical features. *Brain* 84, 642-661.

- Hirano A, Malamud N, Elizan TS, Kurland LT (1966) Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex on Guam - Further pathological studies. *Arch. Neurol.* 15, 35-51.
- Hirano A, Arumugasamy N, Zimmerman HM (1967) Amyotrophic lateral sclerosis: a comparison of Guam and classical cases. *Arch. Neurol.* 16, 357-363.
- Hirano A, Dembitzer HM, Kurland LT, Zimmerman HM (1968) The fine structure of some intraganglionic alterations - Neurofibrillary tangles, granulovacuolar bodies and "rod-like" structures in Guam amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 27, 167-182.
- Hof PR, Cox K, Morrison JH (1990a) Quantitative analysis of a vulnerable subset of pyramidal neurons in Alzheimer's disease: I. Superior frontal and inferior temporal cortex. *J. Comp. Neurol.* 301, 44-54.
- Hof PR, Morrison JH (1990b) Quantitative analysis of a vulnerable subset of pyramidal neurons in Alzheimer's disease: II. Primary and secondary visual cortex. *J. Comp. Neurol.* 301, 55-64.
- Hof PR, Perl D, Loerzel AJ, Morrison JH (1991) Neurofibrillary tangle distribution in the cerebral cortex of parkinsonism-dementia cases from Guam: differences with Alzheimer's disease. *Brain Res.* 564: 306-313.
- Hof PR, Delacourte A, Bouras C (1992a) Distribution of cortical neurofibrillary tangles in progressive supranuclear palsy: a quantitative analysis of six cases. *Acta Neuropathol.* 84, 45-51.
- Hof PR, Bierer LM, Perl DP, Delacourte A, Buée L, Bouras C, Morrison JH (1992b) Evidence for early vulnerability of the medial and inferior temporal lobe in a 82-year-old patient with possible preclinical signs of dementia: regional and laminar distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques. *Arch. Neurol.* 49, 946-953.
- Hof PR, Charpiot A, Delacourte A, Buée L, Purohit D, Perl DP, Bouras C (1992c) Distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques in the cerebral cortex in postencephalitic parkinsonism. *Neurosci. Lett.* 139, 10-14.
- Hof PR, Bouras C, Perl DP, Morrison JH (1994a) Quantitative neuropathology analysis of Pick's disease cases: cortical distribution of Pick bodies and coexistence with Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 87, 115-124.
- Hof PR, Perl DP, Loerzel J, Steele JC, Morrison JH (1994b) Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia from Guam: differences in neurofibrillary tangles distribution and density in the hippocampal formation and neocortex. *Brain Res.* 650, 107-116.

- Hof PR, Nimchinsky EA, Buée-Scherrer V, Buée L, Nasrallah J, Hottinger AF, Purohit DP, Loerzel AJ, Steele JC, Delacourte A, Bouras C, Morrison JH, Perl DP (1994c) Amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex of Guam: quantitative neuropathology, immunohistochemical analysis of neuronal vulnerability, and comparison with related neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol.* 87, 397-404.
- Hof PR, Morrison JH (1994d) The cellular basis of cortical disconnection in Alzheimer's disease and related dementing conditions. *Alzheimer's disease*. Edited by Terry RD, R Katzman, KL Bick, Ravens Press, Ltd, New York, pp 197-229.
- Holzer M, Holzapfel HP, Zedlick D, Brückner MK, Arendt T (1994) Abnormally phosphorylated tau protein in Alzheimer's disease: heterogeneity of individual regional distribution and relationship to clinical severity. *Neuroscience* 63, 499-516.
- Ihara Y (1989) Massive somatodendritic sprouting of cortical neurons in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 459, 138-144.
- Ingebristen TS, Cohen P (1983) Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science* 221, 331-338.
- Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Zaidi T, Merz PA, Wen GY, Shaikh SS, Wisniewski HM, Alafuzoff I, Winblad B (1986) Defective brain microtubule assembly in Alzheimer's disease. *Lancet* 2, 421-426.
- 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 SU (1993) Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  is identical to tau protein kinase-I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS Lett.* 325, 167-172.
- Ishiguro K, Kobayashi S, Omori A, Takamatsu M, Yonekura S, Anzai K, Imahori K, Uchida T (1994) Identification of the 23 kDa subunit of tau protein kinase II as a putative activator of cdk5 in bovine brain. *FEBS Lett.* 342, 203-208.
- Jakes R, Novak M, Davison M, Wischik CM (1991) Identification of 3- and 4-repeat tau isoforms within the PHF in Alzheimer's disease. *EMBO J.* 10, 2725-2729.
- 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 JM, Masters CL, Grzeschik K-H, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733-736.
- Kenessey A, Yen SH, Liu WK, Yang XR, Dunlop DS (1995) Detection of D-aspartate in tau proteins associated with Alzheimer paired helical filaments. *Brain Res.* 675, 1-2.
- Khachaturian ZS (1985) Diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.* 42, 1097-1105.
- Kidd M. (1963) Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 197, 192-193.
- Kisilevsky R, Lyon AW, Young ID (1992) A critical analysis of postulated pathogenetic mechanisms in amyloidogenesis. *Crit. Rev. Lab. Serv.* 29, 59-82.
- Kisilevsky R, Lemieux LJ, Fraser PE, Kong X, Hultin PG, Szarek WA (1995) Arresting amyloidosis *in vivo* using small-molecule anionic or sulphates: implications for Alzheimer's disease. *Nature Med.* 1, 143-148.
- Koh JV, Yang LL, Cotman CW (1990) Beta-amyloid increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage. *Brain Res.* 533, 315-320.
- Kondo J, Honda T, Mori H, Hamada Y, Miura Y, Ogawara H, Ihara Y (1988) The carboxyl third of tau is tightly bound to paired helical filaments. *Neuron* 1, 827-834.
- König G, Mönning U, Czech C, Prior R, Banati RB, Schreiter-Gasser U, Bauer J, Masters CL, Beyreuther K (1992) Identification and differential expression of a novel alternative splice isoform of the  $\beta$ A4 amyloid precursor protein (APP) mRNA in leukocytes and brain microglial cells. *J. Biol. Chem.* 267, 10804-10809.
- Köpke E, Tung YC, Shaikh S, Alonso A, Iqbal K, Grundke-Iqbal I (1993) Microtubule-associated protein tau . Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 268, 24374-24384.
- Kosik KS, Duffy LK, Dowling MM, Abraham C, McCluskey A, Selkoe DJ (1984) Microtubule-associated protein 2: monoclonal antibodies demonstrate the selective incorporation of certain epitopes into Alzheimer neurofibrillary tangles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 7941-7945.
- Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ (1986) The microtubule-associated protein, tau, is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4044-4048.
- Kosik KS, Orecchio LD, Binder LI, Trojanowski JQ, Lee VMY, Lee G (1988) Epitopes that span the tau molecule are shared with paired helical filaments. *Neuron* 1, 817-825.
- Kosik KS, Orecchio LD, Bakalis S, Neve RL (1989) Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron* 2, 1389-1397.

- Ksiezak-Reding H, Dickson DW, Davies P, Yen SH (1987) Recognition of tau epitopes by anti-neurofilament antibodies that bind to Alzheimer neurofibrillary tangles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 3410-3414.
- Ksiezak-Reding H, Binder LI, Yen SH (1990) Alzheimer disease proteins (A68) share epitopes with tau but show distinct biochemical properties. *J. Neurosci. Res.* 25, 420-430.
- Ksiezak-Reding H, Yen SH (1991) Structural stability of paired helical filaments requires microtubule-binding domains of tau: a model for self-association. *Neuron* 6, 717-728.
- Ksiezak-Reding H, Liu WK, Yen SH (1992) Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. *Brain Res.* 597, 209-219.
- Ksiezak-Reding H, Morgan K, Mattiace LA, Davies P, Liu WK, Yen SH, Weidenheim K, Dickson DW (1994) Ultrastructure and biochemical composition of paired helical filaments in corticobasal degeneration. *Am. J. Pathol.* 145, 1496-1508.
- Kurland LT (1988) Amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease complex on Guam linked to an environmental toxin. *Trends Neurosci.* 11, 51-54.
- LaDu MJ, Falduto MT, Manelli AM, Reardon CA, Getz GS, Frail DE (1994) Isoform-specific binding of apolipoprotein E to  $\beta$ -amyloid. *J. Biol. Chem.* 269, 23403-23406.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during head assembly of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lang E, Szendrei GI, Lee VMY, Otvos L Jr. (1992) Immunological and conformational characterization of a phosphorylated immunodominant epitope on the paired helical filaments found in Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 187, 783-790.
- Ledesma MD, Correas I, Avila J, Diaznido J (1992) Implication of brain cdc2 and MAP2 kinases in the phosphorylation of tau protein in Alzheimer's disease. *FEBS Lett.* 308, 218-224.
- Ledesma MD, Bonay P, Colaço C, Avila J (1994) Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* 269, 21614-21619.
- Lee G, Cowan N, Kirschner M (1988) The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain. *Science* 239, 285-287.
- Lee G, Neve RL, Kosik KS (1989) The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron* 2, 1615-1624;.
- Lee VMY, Otvos L, Schmidt ML, Trojanowski JQ (1988) Alzheimer disease tangles share immunological similarities with multiphosphorylation repeats in the two large neurofilament proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7384-7388.
- Lee VM-Y, Balin BJ, Otvos Jr L, Trojanowski JQ (1991) A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal tau. *Science* 251, 675-678.

- Lee VM-Y, Trojanowski JQ (1992) The disordered neuronal cytoskeleton in Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2, 653-656.
- Lemaire HG, Salbaum JM, Multhaup G, Kang J, Bayney RM, Unterbeck A, Beyreuther K, Müller-Hill (1989) The preA4695 precursor protein of Alzheimer's disease A4 amyloid is encoded by 16 exons. *Nucleic Acids Res.* 17, 517-522.
- Lewis SA, Balcarek JA, Krek V, Shelanski M, Cowan NJ (1984) Sequence of a cDNA clone encoding mouse glial fibrillary acidic protein: structural conservation of intermediate filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 2743-2746.
- Lewis DA, Campbell MJ, Terry RD, Morrison JH (1987) Laminar and regional distributions of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in Alzheimer's disease: a quantitative study of visual and auditory cortices. *J. Neurosci.* 7, 1799-1808.
- Lewis SA, Wang D, Cowan NJ (1988) Microtubule-associated protein MAP2 shares a microtubule binding motif with tau protein. *Science* 242, 936-939.
- Lindwall G, Cole RD (1984a) Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J. Biol. Chem.* 259, 5301-5305.
- Lindwall G, Cole RD (1984b) The purification of tau protein and the occurrence of two phosphorylation sites of tau in brain. *J. Biol. Chem.* 259, 12241-12245.
- Lichtenberg-Kraag B, Mandelkow EM, Biernat J, Steiner B, Schröter C, Gustke N, Meyer HE, 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.
- Liu WK, Moore WT, Williams RT, Hall FL, Yen SH (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 JP, Wood JG (1993) p44mpk MAP kinase induces Alzheimer type alterations in tau function and in primary hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.* 35, 439-444.
- Ma J, Yee A, Brewer HB Jr, Das S, Potter H (1994) Amyloid-associated proteins  $\alpha$ 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer  $\beta$ -protein into filaments. *Nature* 372, 92-94.
- Mc Khann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan E (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of Department of Health and Human services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34, 939-944.

- Mak K, Yang F, Vinters HV, Frautschy SA, Cole GM (1994) Polyclonals to  $\beta$ -amyloid (1-42) identify most plaque and vascular deposits in Alzheimer cortex, but not striatum. *Brain Res.* 667, 138-142.
- Mandelkow EM, Drewes G, Biernat J, Gustke N, Van Lint J, Vandenhede JR, Mandelkow E (1992) Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. *FEBS Lett.* 314, 315-321.
- Mandelkow EM (1993) The Alzheimer like state of tau protein: isoforms, epitopes, phosphorylation and kinases. *Soc. Neurosci. Abstr.* 19, 215.
- Mann DMA (1988) The pathological association between Down's syndrome and Alzheimer's disease. *Mech. Ageing Dev.* 43, 99-136.
- Mann DMA, Prinja D, Davies CA, Ihara Y, Delacourte A, Défossez A, Mayer RJ, Landon M (1989a) Immunocytochemical profile of neurofibrillary tangles in Down's syndrome patients of different ages. *J. Neurol. Sci.* 92, 247-260.
- Mann DMA (1989b) Cerebral amyloidosis, ageing and Alzheimer's disease; a contribution from studies on Down's syndrome. *Neurobiol. Aging* 10, 397-399.
- Masliah E, Terry RD, Mallory M, Alford M, Hansen LA (1990) Diffuse plaques do not accentuate synapse loss in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 137, 1293-1297.
- Masliah E, Hansen L, Albright T, Mallory M, Terry RD (1991) Immunoelectron microscopic study of synaptic pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 81, 428-433.
- Matsuo ES, Shin RW, Billingsley ML, Van de Voorde A, O'Connor M, Trojanowski JQ, Lee VMY (1994) Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filaments tau. *Neuron* 13, 989-1002.
- Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE (1992) Beta amyloid peptide destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J. Neurosci.* 12, 376-389.
- Maubert E, Slama A, Ciofi P, Viollet C, Tramu G, Dupouy JP, Epelbaum J (1994) Developmental patterns of somatostatin-receptors and somatostatin-immunoreactivity during early neurogenesis in the rat. *Neuroscience* 62, 317-325.
- Mawal-Dewan M, Henley J, Van de Voorde A, Trojanowski JQ, Lee VMY (1994) The phosphorylation state of tau in the developing rat brain is regulated by phosphoprotein phosphatases. *J. Biol. Chem.* 269, 30981-30987.
- Mayor MD, Hampton JC, Rosario B (1961) A simple method for removing the resin from epoxy embedded tissue. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 909-910.

- Mercken M, Vandermeeren M, Lübke U, Six J, Boons J, Van de Voorde A, Martin JJ, Gheuens J (1992) Monoclonal antibodies with selective specificity for Alzheimer tau are directed against phosphatase-sensitive epitopes. *Acta Neuropathol.* 84, 265-272.
- Merz PA, Wisniewski HM, Somerville RA, Bobin SA, Masters CL, Iqbal K (1983) Ultrastructural morphology of amyloid fibrils from neuritic and amyloid plaques. *Acta Neuropathol.* 60, 113-124.
- Miller AKH et Corsellis JAN (1977) Evidence for a secular increase on human brain weight during the past century. *Ann. Human Biol.* 4, 253-257.
- Miller CCJ, Brion JP, Calvert R, Chin TK, Eagles PAM, Downes MJ, Flament-Durand J, Haugh M, Kahn J, Probst A, Ulrich J, Anderton BH (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.
- Montpetit V, Clapin DF, Guberman A (1985) Substructure of 20-nm filaments of progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol.* 68, 311-318.
- Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Yoshida H, Titani K, Ihara Y (1995) Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J. Biol. Chem.* 270, 823-829.
- Mountjoy CQ, Roth M, Evans NJR (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 (1992) A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of  $\beta$ -amyloid. *Nature Genetics* 1, 345-347.
- Murrell J, Farlow M, Ghetti B, Benson M (1991) A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science* 254, 97-99.
- Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, Otomo E, Ikeda K (1991) Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease, *Brain Res.* 541, 163-166.
- Namba Y, Tsuchiya H, Ikeda K (1992) Apolipoprotein B immunoreactivity in senile plaques and vascular amyloids and neurofibrillary tangles in the brains of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 134, 264-266.



- Narindrasorasak S, Lowery D, Gonzalez-DeWhitt P, Poorman RA, Greenberg B, Kisilevsky R (1991) High affinity interactions between the Alzheimer's  $\beta$ -amyloid precursor proteins and the basement membrane form of heparan sulfate proteoglycan. *J. Biol. Chem.* 266, 12878-12883.
- Nee LE, Eldridge R, Sunderland T, Thomas CB, Katz D, Thompson KE, 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 PT, Saper CB (1994) An animal model of neurofibrillary degeneration in the cerebral cortex of the sheep: comparison with neurofibrillary deposition in Alzheimer's disease. *The Cytoskeleton in Alzheimer's disease*, Rochester, 21-23 Mai 1994.
- Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA (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.
- Nukina N, Ihara Y (1986) One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein. *J. Biochem.* 99, 1541-1544.
- Nukina N, Kosik KS, Selkoe DJ (1987) Recognition of an anti-PHF by monoclonal neurofilament antibodies is due to crossreaction with Tau proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3415-3419.
- Oltersdorf T, Fritz LC, Schenk DB, Lieberburg I, Johnson-Wood KL, Beattie EC, Ward PJ, Blacher RW, Dovey HF, Sinha S (1989) The secreted form of the Alzheimer's amyloid precursor protein with the Kunitz domain is protease nexin-II. *Nature* 341, 144-147.
- Otvos Jr. L, Feiner L., Lang E., Szendrei GI, Goedert M, Lee VMY (1994) Monoclonal antibody PHF-1 recognizes tau protein phosphorylated at serine residues 396 and 404. *J. Neurosci. Res.* 39, 669-673.
- Papasozomenos SC, Binder LI (1987) Phosphorylation determines two distinct species of tau in the central nervous system. *Cell Motil. Cytoskel.* 8, 210-226.
- Parent M, Delacourte A, Défossez A, Hémon B, Han KK, 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 SL, Sanghera JS (1992) Mitogen-activated protein kinases: versatile transducers for cell signaling. *Trends Biochem. Sci.* 17, 233-238.

- Pérez-Tur J, Campion D, Martinez M, Brice A, Tardieu S, Hannequin D, Agid Y, Delacourte A, Clerget-Darpoux F, Chartier-Harlin and the French Alzheimer's disease collaborative study group (1995) Evidence for apolipoprotein E  $\epsilon$ 4 association in early-onset Alzheimer's patients with late-onset relatives. *Am. J. Med. Genet.* (sous presse).
- Pericak-Vance MA, Bebout JL, Gaskell Jr. PC, Yamaoka LH, Hung WY, Alberts MJ, Walker AP, Bartlett RJ, Haynes CA, Welsh KA, Earl NL, Heyman A, Clark CM, Roses AD (1991) Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage. *Am. J. Hum. Genet.* 48, 1034-1050.
- Perlmutter L, Barrón E, Saperia D, Chui HC (1991) Association between vascular basement membrane components and the lesions of Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* 30, 673-681.
- Perry G, Kawai M, Kalaria R, Tabaton M, Cras P (1992) Transformation of neurofibrillary tangles. *Neurobiol. Aging* 13, S37.
- Persuy P, Défossez A, Delacourte A, Tramu G, Bouchez B, Arnott G (1985) Anti-PHF antibodies: an immunohistochemical marker of the lesions of the Alzheimer's disease. *Virchows Archiv.* 407:13-23.
- Piechaczyk M, Chardes T, Cot MC, Pau B, Bastide JM (1985) Production and characterization of monoclonal antibodies against human thyroglobulin. *Hybridoma* 4, 361-367.
- Polli HK, Billingsley ML, Kincaid RL (1991) Expression of the calmodulin-dependent protein phosphatase, calcineurin, in rat brain: developmental patterns and the role of nigrostriatal innervation. *Dev. Brain Res.* 63, 105-119.
- Pollock NJ, Mirra SS, Binder LI, Hansen LA, Wood JG (1986) Filamentous aggregates in Pick's disease, progressive supranuclear palsy, and Alzheimer's disease show antigenic determinants with microtubule-associated protein tau. *Lancet* 2, 1211.
- Pope W, Enam SA, Bawa N, Miller BE, Ghanbari HA, Klein WL (1993) Phosphorylated tau epitope of Alzheimer's disease is coupled to axon development in the avian central nervous system. *Exp. Neurol.* 120, 106-113.
- Potter H, Abraham CR, Dressler D (1991) The Alzheimer amyloid components alpha-1-antichymotrypsin and  $\beta$ -protein form a stable complex in vitro. Iqbal K, McLachlan DRC, Winblad B, Wisniewski HM, eds. *Alzheimer's disease: basic mechanisms, diagnosis and therapeutic strategies.* Chichester: Wiley and sons, 275-279.
- Price DL, Whitehouse PJ, Struble RG (1986) Alzheimer's disease. *ANN. Rev. Med.* 36, 349-356.

- Price JL, Davis PB, Morris JC, White DL (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 JM, Murakami K, Cordell B (1991) Formation of  $\beta$ -amyloid protein deposits in brains of transgenic mice. *Nature* 352, 239-241.
- Rebeiz JJ, Kolodny EH, Richardson EP Jr. (1968) Corticodentatinigral degeneration with neuronal achromasia. *Arch. Neurol.* 18, 20-33.
- Rebhan M, Vacun G, Rösner H (1995) Complementary distribution of tau proteins in different phosphorylation states within growing axons. *Neuroreport* 6, 429-432.
- Reisberg B, Ferris SH, De Leon MJ (1982) The global deterioration scale for assessment of primary degenerative dementia. *Am. J. Psychiat.* 139, 1136-1139.
- Rewcastle NB (1991) Degenerative diseases of the central nervous system. Textbook of neuropathology, second edition. Edited by Davis RL and Robertson DM. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, USA, pp 903-961.
- Rinne JO, Lee MS, Thompson PD, Marsden CD (1994) Corticobasal degeneration: a clinical study of 36 cases. *Brain* 117, 1183-1196.
- Robakis NK, Ramakrishna N, Wolfe G, Wisniewski HM (1987a) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4190-4193.
- Robakis NK, Wisniewski HM, Jenkins EC, Devine-Gage EA, Houck GE, Yao XL, Ramakrishna N, Wolfe G, Silverman WP, Brown WT (1987b) Chromosome 21q21 sublocalisation of gene encoding  $\beta$  amyloid peptide in cerebral vessels and neuritic (senile) plaque of people with Alzheimer disease and Down syndrome. *Lancet* i, 384-385.
- Roder HM, Eden PA, Ingram VM (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.
- Rogers J, Morrison JH (1985) Quantitative morphology and regional and laminar distribution of senile plaques in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 5, 2801-2808.
- Rogers J, Lubner-Narod J, Styren S, Civin H (1988) Expression of immune system-associated antigens by cells of the human central nervous system: relationship to the pathology of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 9, 339-349.
- Sautière PE, Caillet-Boudin ML, Watzet A, Buée-Scherrer V, Delacourte A (1993) Alzheimer-type tau epitope detection after okadaic acid treatment of neuroblastoma cells. *C. R. Acad. Sci. Paris* 316, 533-536.

- Sautière PE, Caillet-Boudin ML, Watzel A, Delacourte A (1994) Detection of Alzheimer-type tau proteins in okadaic acid-treated SKNSH-SY 5Y neuroblastoma cells. *Neurodegeneration* 3, 53-60.
- Sawa A, Oyama F, Matsushita M, Ihara Y (1994) Molecular diversity at the carboxyl terminus of human and rat tau. *Mol. Brain Res.* 27, 111-117.
- Schägger H, Von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368-379.
- Scheibel AB, Duong T, Tomiyasu U. Microvascular changes in AD. In: Scheibel AB, Wechsler AF, Brazier MAB, eds. *The biological substrates of Alzheimer's disease.* UCLA Forum in Medical Sciences, Volume 27. Orlando: Academic Press, 1986:177-192.
- Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, White JA, Bonnycastle L, Weber JL, Alonso ME, Potter H, Heston LL, Martin GM (1992) Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* 258, 668-671.
- Scheltens P, Vermersch P, Leys D (1993) Hétérogénéité de la maladie d'Alzheimer. *Rev. Neurol.* 149, 14-25.
- Schubert D, Cole G, Saitoh T, Oltersdorf T (1989a) Amyloid  $\beta$  protein precursor is a mitogen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162, 83-88.
- Schubert D, Jin LW, Saitoh T, Cole G (1989b) The regulation of amyloid  $\beta$  protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion. *Neuron* 3, 689-694.
- Scinto LFM, Daffner KR, Dressler D, Ransil BI, Rentz D, Weintraub S, Mesulam M, Potter H (1994) A potential noninvasive neurobiological test for Alzheimer's disease. *Science* 266, 1051-1054.
- Scott CW, Vulliet PR, Caputo CB (1993) Phosphorylation of tau by proline-directed protein kinase (p34(cdc2)/p58(cyclin-A)) decreases tau-induced microtubule assembly and antibody SMI33 reactivity. *Brain Res.* 611, 237-242.
- Selkoe DJ (1992)  $\beta$ -amyloidosis: a seminal pathogenetic event in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 13, S74.
- Selkoe DJ (1994) Normal and abnormal biology of the  $\beta$ -amyloid precursor protein. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 489-517.
- Shankar S, Yanagihara R, Garruto RM, Grundke-Iqbal I, Kosik KS, Gajdusek DC (1989) Immunocytochemical characterization of neurofibrillary tangles in amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia on Guam. *Ann. Neurol.* 25, 146-151.

- Signoret JL, Hauw JJ (1991) *Maladie d'Alzheimer et autres démences*. Médecine-Sciences, Flammarion. 511 pages.
- Sinha S, Knops J, Esch F, Moyer ED, Oltersdorf T (1991) Conversion of the Alzheimer's  $\beta$ -amyloid precursor protein (APP) Kunitz domain into a potent human neutrophil elastase inhibitor. *J. Biol. Chem.* 266, 21011-21013.
- Sisodia SS, Koo EH, Beyreuther K, Unterbeck A, Price DL (1990) Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science* 248, 492-495.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using Bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
- Smith MA, Taneda S, Richey P, Miyata S, Yan SD, Stern D, Sayre LM, Monnier VM, Perry G (1994) Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5710-5714.
- Snow AD, Mar H, Nochlin D, Kimata K, Kato M, Suzuki S, Hassell J, Wight TN (1988) The presence of heparan sulfate proteoglycan in the neuritic plaques and congophilic angiopathy in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 133, 456-463.
- Snow AD, Mar H, Nochlin D, Sekiguchi RT, Kimata K, Koike Y, Wight TN (1990) Early accumulation of heparan sulfate in neurons and in the  $\beta$ -amyloid protein-containing lesions of Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Am. J. Pathol.* 137, 1253-1270.
- Snow A, Malouf AT (1993) *In vitro* and *in vivo* models to unravel the potential roles of  $\beta$ /A4 in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Hippocampus*. Eds, Nitsch R and Ohm TG. 3, 257-268.
- Steele JC, Richardson JC, Olszewski J (1964) Progressive supranuclear palsy. A heterogeneous degeneration involving brain stem, basal ganglia and cerebellum with vertical gaze and pseudobulbar palsy, nuchal dystonia and dementia. *Arch. Neurol.* 10, 333-359.
- Steiner B, Mandelkow EM, Biernat J, Gustke N, Meyer HE, Schmidt B, Mieskes G, Söling HD, Drechsel D, Kirschner MW, Goedert M, Mandelkow E (1990) Phosphorylation of microtubule-associated protein tau: Identification of the site for  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin dependent kinase and the relationship with tau phosphorylation in Alzheimer tangles. *EMBO J.* 9, 3539-3544.
- Sternberger N H, Sternberger L A, Ulrich J (1985) Aberrant neurofilament phosphorylation in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4274-4276.

- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD (1993a) Apolipoprotein E: high-avidity binding to  $\beta$ -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 1977-1981.
- Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong L-M, Salvesen GS, Pericak-Vance M, Schmechel D, Saunders AM, Goldgaber D, Roses AD (1993b) Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid  $\beta$  peptide: Isoform-specific effects and implication for late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 8098-8102.
- Szendrei GI, Lee VMY, Otvos Jr. L (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.
- Tabaton M, Whitehouse PJ, Perry G, Davies P, Autilio-Gambetti L, Gambetti P (1988) Alz-50 recognizes abnormal filaments in Alzheimer's disease and progressive supranuclear palsy. *Ann. Neurol.* 24, 407-413.
- Takahashi M, Tomizawa K, Ishiguro K, Takamatsu M, Fujita SC, Imahori K (1995) Involvement of tau protein kinase I in paired helical filament-like phosphorylation of the juvenile tau in rat brain. *J. Neurochem.* 64, 1759-1768.
- Takemura R, Kanai Y, Hirokawa N (1991) *In situ* localization of tau mRNA in developing rat brain. *Neuroscience* 44, 393-407.
- Tamaoka A, Odaka A, Ishibashi Y, Usami M, Sahara N, Suzuki N, Nukina N, Mizusawa H, Shoji S, Kanazawa I, Mori H (1994) APP717 missense mutation affects the ratio of amyloid  $\beta$  protein species ( $A\beta_{1-42/43}$  and  $A\beta_{1-40}$ ) in familial Alzheimer's disease brain. *J. Biol. Chem.* 269, 32721-32724.
- Tanaka S, Shiojiri S, Takahashi Y, Kitaguchi N, Kimura J, Nakamura S, Ueda K (1991) Differential expression of three types of amyloid  $\beta$ -protein precursor mRNA in the brain and nonneural tissues. In Iqbal K, McLachlan DRC, Winblad B, Wisniewski HM (eds). *Alzheimer's disease: Basic mechanisms, diagnosis and therapeutic strategies*. Chichester: Wiley & Sons, 313-319.
- Tellez-Nagel I, Wisniewski HM (1973) Ultrastructure of neurofibrillary tangles in Steele-Richardson-Olszewski syndrome. *Arch. Neurol.* 29, 324-327.
- Terry RD, Peck A, De Teresa R, Schechter R, Horoupian DS (1981) Some morphometric aspects of the brain in senile dementia of the Alzheimer type. *Ann. Neurol.* 10, 184-192.
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, De Teresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol.* 30, 572-580.

- Tomonaga M (1977) Ultrastructure of neurofibrillary tangles in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol.* 37, 177-181.
- 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.
- Trojanowski JQ, Mawal-Dewan M, Schmidt ML, Martin J, Lee VMY (1993a) Localization of the mitogen activated protein kinase ERK2 in Alzheimer's disease neurofibrillary tangles and senile plaque neurites. *Brain Res.* 618, 333-337.
- Trojanowski JQ, Schmidt ML, Shin R-W, Bramblett GT, Rao D, Lee VMY (1993b) Altered tau and neurofilament proteins in neurodegenerative diseases: diagnostic implications for Alzheimer's disease and Lewy body dementias. *Brain Pathol.* 3, 45-54.
- Vaitukaitis J, Robbins JB, Nieschlag V, Ross GT (1971) A method for producing antisera with small doses of immunogen. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 33, 988-991.
- Van Broeckhoven C (1995) Molecular genetics of Alzheimer disease: Identification of genes and gene mutations. *Eur. Neurol.* 35, 8-19.
- 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.
- Van Nostrand WE, Wagner SL, Suzuki M, Choi BH, Farrow JS, Geddes JW, Cotman CW, Cunningham DD (1989) Protease nexin II, a potent antichymotrypsin, shows identity to amyloid  $\beta$ -protein precursor. *Nature* 341, 546-549.
- 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 JP, 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, Robitaille Y, Berniez L, Watez A, Gauvreau D, Delacourte A (1994) Biochemical mapping of neurofibrillary degeneration in a case of progressive supranuclear palsy: evidence for general cortical involvement. *Acta Neuropathol.* 87, 572-577.
- Vermersch P, Bordet R, Ledoze F, Ruchoux MM, Chapon F, Thomas P, Destée A, Lechevallier B, Delacourte A (1995) Mise en évidence d'un profil électrophorétique particulier des protéines tau pathologiques dans les cas de démences fronto-temporales. *C. R. Acad. Sci. Paris* 318, 439-445.

- Vickers JC, Riederer BM, Marugg RA, Buée-Scherrer V, Buée L, Delacourte A, Morrison JH (1994) Alterations in neurofilament protein immunoreactivity in human hippocampal neurons related to normal aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience* 62, 1-13.
- Vincent I, Rosado M, Kim E, Davies P (1994) Increased production of paired helical filament epitopes in a cell culture system reduces the turnover of tau. *J. Neurochem.* 62, 715-723.
- Vulliet R, Mitchell Halloran S, Braun RK, Smith AJ, and Lee G (1992) Proline-directed phosphorylation of human tau protein. *J. Biol. Chem.* 267, 22570-22574.
- 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.
- Watanabe A, Hasegawa M, Suzuki M, Takio K, Morishima-Kawashima M, Titani K, Arai T, Kosik KS, Ihara Y (1993) In vivo phosphorylation sites in fetal and adult rat tau. *J. Biol. Chem.* 268, 25712-25717.
- Wechsler D (1989) Echelle d'intelligence de Wechsler pour adultes, forme révisée (WAISR). Paris, Centre de psychologie appliquée, 156 pages.
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SH, Kirschner MW (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 1858-1862.
- Wilcock GK, Esiri MM (1982) Plaques, tangles and dementia. A quantitative study. *J. Neurol. Sci.* 56, 343-356.
- Wischik CM, Novak HC, Thogersen HC, Edwards PC, Runswick MJ, Jakes R, Walker JE, Milstein C, Roth M, Klug A (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 CM, Novak HC, Edwards PC, Klug A, Tichelaar W, Crowther RA (1988b) Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4884-4888.
- Wisniewski HM, Barcikowska M, Kida E (1991) Phagocytosis of  $\beta$ /A4 amyloid fibrils of the neuritic neocortical plaques. *Acta Neuropathol.* 81, 588-590.
- Wood JG, Mirra SS, Pollock NJ, Binder LI (1986) Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4040-4043.
- Yamamoto H, Saitoh Y, Yasugawa S, Miyamoto E (1990) Dephosphorylation of tau factor by protein phosphatase 2A in synaptosomal fractions, and inhibition by aluminum. *J. Neurochem.* 55, 683-690.



- Yang F, Mak K, Vinters HV, Frautschy SA, Cole GM (1994) Monoclonal antibody to the C-terminus of  $\beta$ -amyloid. *NeuroReport* 5, 2117-2120.
- Yankner BA, Dawes LR, Fisher S, Villa-Komaroff L, Oster-Granite ML, Neve RL (1989) Neurotoxicity of a Fragment of the Amyloid Precursor Associated with Alzheimer's Disease. *Science* 245, 417-420.
- Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA (1990) Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid  $\beta$  protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 250, 279-282.
- Yankner BA, Busciglio J (1992) Is  $\beta$  amyloid neurotoxicity the cause of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 13, S82.
- Zannis VI, Breslow JL (1981) Human very low density lipoprotein apolipoprotein E isoprotein polymorphism is explained by genetic variation and posttranslational modification. *Biochemistry* 20, 1033-1041.
- Zhang H, Sternberger NH, Rubinstein LJ, Herman MM, Binder LI, Sternberger LA (1989) Abnormal processing of multiple proteins in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 8045-8049.

# **ABBREVIATIONS**

**AGE:** *Advanced Glycation End products*  
**Ala:** Alanine  
**ALS/PDC:** *Amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia complex of Guam*  
**Arg:** Arginine  
**Asn:** Asparagine  
**Asp:** Aspartate  
**ATP:** Adénosine tri-phosphate  
**βPP:** Précurseur du peptide Aβ  
**Ca<sup>2+</sup>:** Ion calcium  
**CA:** Corne d'Ammon  
**CBD:** Dégénérescence corticobasale  
**COS:** *african green monkey kidney cells*  
**Da:** Dalton  
**DNF:** Dégénérescence neurofibrillaire  
**DTT:** dithiothréitol  
**EDTA:** Acide éthylènediamine tétraacétique  
**EGTA:** Acide éthylène glycol- bis(β- aminoéthyl éther) N, N, N', N'- tétraacétique  
**ERK:** *Extracellular Regulated Kinase*  
**GFAP:** *Glial Fibrillary Acidic Protein*  
**Glu:** Glutamate  
**Gly:** Glycine  
**GSK-3:** *Glycogen Synthase Kinase-3*  
**His:** Histidine  
**Leu:** Leucine  
**Lys:** Lysine  
**MA:** Maladie d'Alzheimer  
**MAP:** *Microtubule Associated Proteins*  
**MAP kinase:** *Mitogen-Activated Protein kinase*  
**MgCl<sub>2</sub>:** Chlorure de Magnésium  
**M&M:** Matériels et Méthodes  
**Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>:** Orthovanadate de sodium  
**NGF:** *Nerve Growth Factor*  
**PDPK:** *Proline Directed Protein Kinase*  
**Phe:** Phénylalanine  
**PHF:** Paires de filaments appariés en hélice  
**PMSE:** *Phenylmethylsulfonyl fluoride*  
**Pro:** Proline  
**PSP:** Maladie de Steele-Richardson-Olszewski  
**SDS :** Sodium Dodécyl Sulfate  
**Ser:** Sérine  
**Thr:** Thréonine  
**Tyr:** Tyrosine  
**TLCK:** L- 1- chloro- 3- (4- tosylamido)- 7- amino- 2- heptanone  
**TPCK:** L- 1- chloro- 3- (4- tosylamido)- 4- phényl- 2- butanone  
**TPK:** *Tau Protein Kinase*

# ANNEXES

# ANNEXE I

## MINI MENTAL TEST

### INSTRUCTIONS POUR LE PASSAGE DU TEST

#### ORIENTATION

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

#### ENREGISTREMENT DES DONNÉES

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

#### ATTENTION ET CALCUL MENTAL

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

#### MÉMOIRE — RAPPEL

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

#### LANGAGE

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

#### ACTIVITÉ MOTRICE

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

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

\* MINI MENTAL TEST — Folstein et coll. (1975), traduit par L. Izard.  
\* M.F. Folstein, S.E. Folstein, P.H. Mc Hugh : « Mini-Mental Test ». A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician, J. Psychiat. Res., 12, 129-138.

## TEST (score de 30 à 0) :

#### ORIENTATION

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

#### ENREGISTREMENT DE DONNÉES

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

#### ATTENTION ET CALCUL MENTAL

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

#### MÉMOIRE

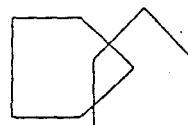
19. ....
20. Vous souvenez-vous des trois mots que vous avez répétés tout à l'heure ? .....
21. ....

#### LANGAGE

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

#### ACTIVITÉ MOTRICE

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



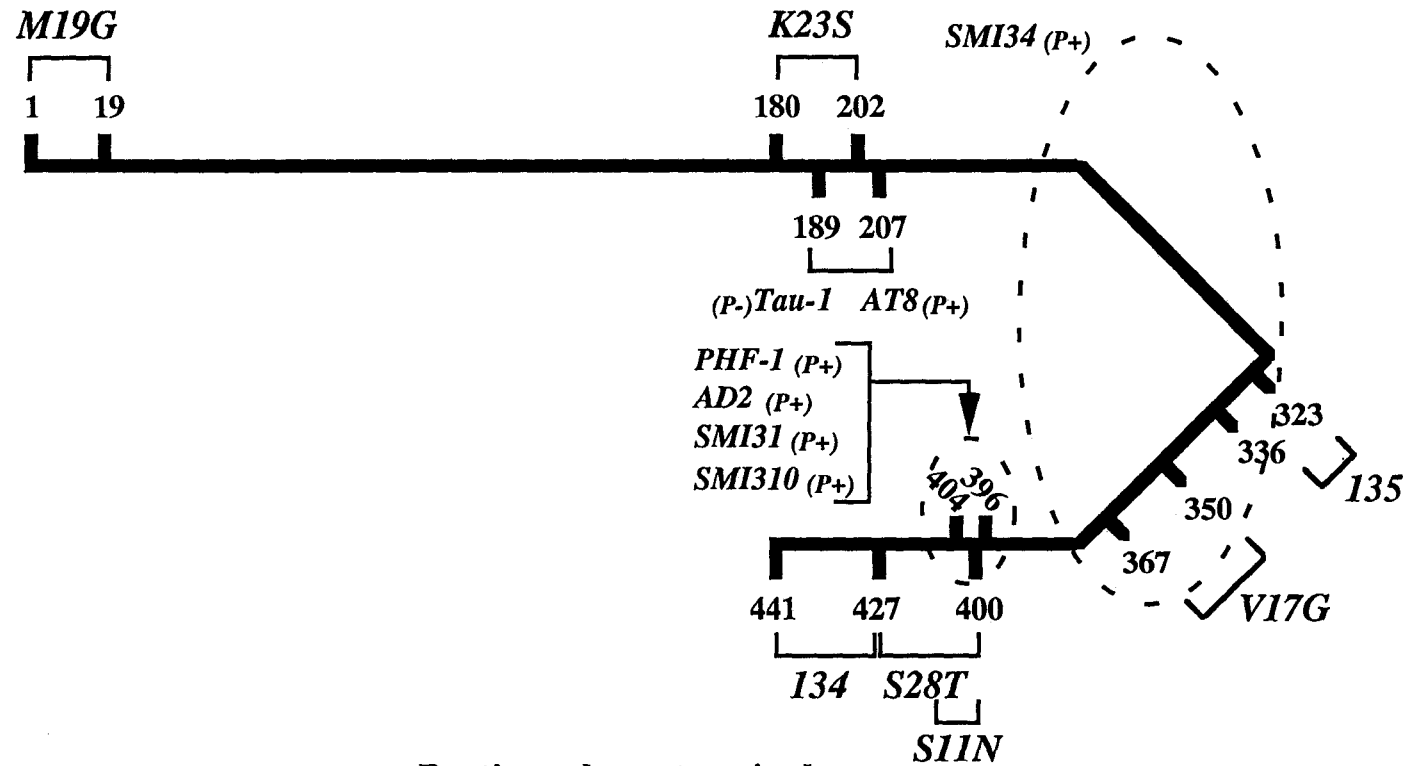
## ANNEXE II

### Critères du NINCDS-ADRDA

Selon MCKHANN et Coll. (1984)

- I. The criteria for the clinical diagnosis of PROBABLE Alzheimer's disease include:
- dementia established by clinical examination and documented by the Mini-Mental Test,<sup>1</sup> Blessed Dementia Scale,<sup>2</sup> or some similar examination, and confirmed by neuropsychological tests;
  - deficits in two or more areas of cognition:
    - progressive worsening of memory and other cognitive functions;
    - no disturbance of consciousness;
    - onset between ages 40 and 90, most often after age 65; and
    - absence of systemic disorders or other brain diseases that in and of themselves could account for the progressive deficits in memory and cognition.
- II. The diagnosis of PROBABLE Alzheimer's disease is supported by:
- progressive deterioration of specific cognitive functions such as language (aphasia), motor skills (apraxia), and perception (agnosia);
  - impaired activities of daily living and altered patterns of behavior;
  - family history of similar disorders, particularly if confirmed neuropathologically; and
  - laboratory results of:
    - normal lumbar puncture as evaluated by standard techniques,
    - normal pattern or nonspecific changes in EEG, such as increased slow-wave activity, and
    - evidence of cerebral atrophy on CT with progression documented by serial observation.
- III. Other clinical features consistent with the diagnosis of PROBABLE Alzheimer's disease, after exclusion of causes of dementia other than Alzheimer's disease, include:
- plateaus in the course of progression of the illness;
  - associated symptoms of depression, insomnia, incontinence, delusions, illusions, hallucinations, catastrophic verbal, emotional, or physical outbursts, sexual disorders, and weight loss;
  - other neurologic abnormalities in some patients, especially with more advanced disease and including motor signs such as increased muscle tone, myoclonus, or gait disorder;
  - seizures in advanced disease; and
  - CT normal for age.
- IV. Features that make the diagnosis of PROBABLE Alzheimer's disease uncertain or unlikely include:
- sudden, apoplectic onset;
  - focal neurologic findings such as hemiparesis, sensory loss, visual field deficits, and incoordination early in the course of the illness; and
  - seizures or gait disturbances at the onset or very early in the course of the illness.
- V. Clinical diagnosis of POSSIBLE Alzheimer's disease:
- may be made on the basis of the dementia syndrome, in the absence of other neurologic, psychiatric, or systemic disorders sufficient to cause dementia, and in the presence of variations in the onset, in the presentation, or in the clinical course;
  - may be made in the presence of a second systemic or brain disorder sufficient to produce dementia, which is not considered to be the cause of the dementia; and
  - should be used in research studies when a single, gradually progressive severe cognitive deficit is identified in the absence of other identifiable cause.
- VI. Criteria for diagnosis of DEFINITE Alzheimer's disease are:
- the clinical criteria for probable Alzheimer's disease and
  - histopathologic evidence obtained from a biopsy or autopsy.
- VII. Classification of Alzheimer's disease for research purposes should specify features that may differentiate subtypes of the disorder, such as:
- familial occurrence;
  - onset before age of 65;
  - presence of trisomy-21; and
  - coexistence of other relevant conditions such as Parkinson's disease.

Partie amino-terminale



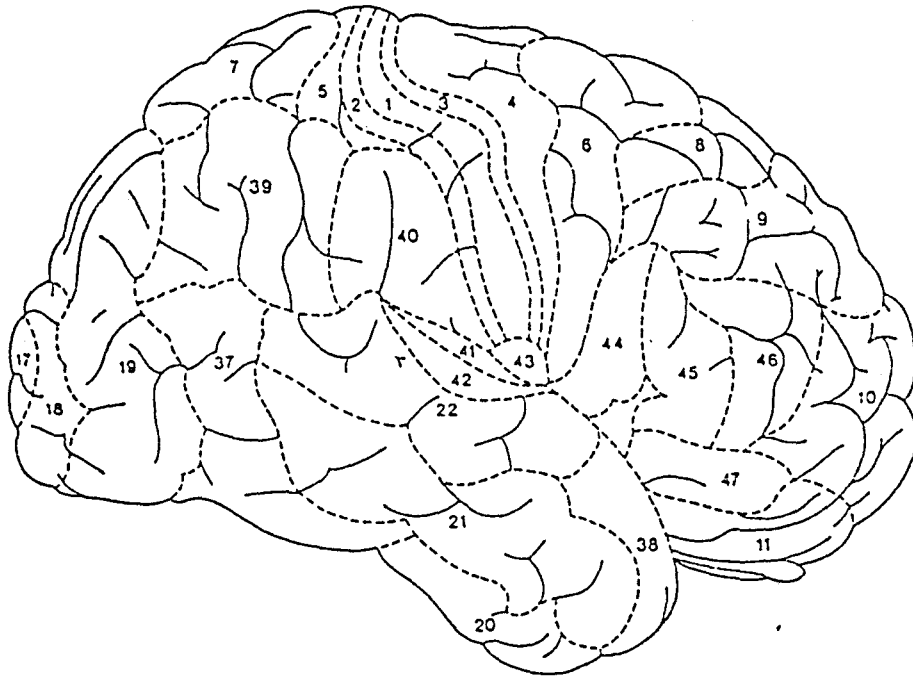
Partie carboxy-terminale

**Légende:** (P+): anticorps dépendants de la phosphorylation

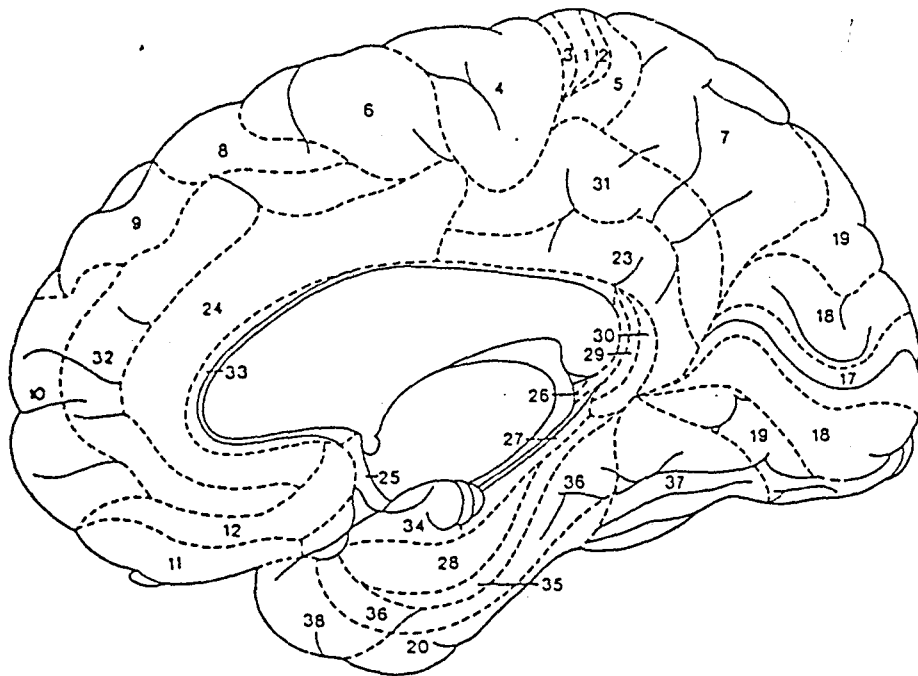
(P-): anticorps dont la fixation dépend de la déphosphorylation

# ANNEXE IV

## Aires de Brodmann



A



B



# **TABLE DES MATIERES**

GENERALITES .....	12
I- Description clinique de la maladie d'Alzheimer: .....	14
I- 1- Les signes cliniques: .....	14
I- 1- 1- Troubles cognitifs: .....	14
I- 1- 2- Troubles du comportement: .....	16
I- 1- 3- Troubles neurologiques: .....	17
I- 2- Diagnostic : .....	17
I- 2- 1- Les éléments du diagnostic: .....	18
I- 2- 2- Les critères de diagnostic: .....	18
I- 2- 3- Les biopsies cérébrales: .....	19
I- 2- 4- Nouveau test de dépistage: .....	19
II- Description neuropathologique de la maladie d'Alzheimer: .....	21
II- 1- L'atrophie cérébrale .....	21
II- 1- 1- Aspect macroscopique: .....	21
II- 1- 2- Aspect microscopique: .....	21
II- 2- Les lésions histologiques: .....	22
II- 2- 1- Les plaques séniles: .....	22
II- 2- 2- La dégénérescence neurofibrillaire: .....	24
II- 2- 3- Conclusion: .....	28
II- 3- La réaction gliale: .....	29
II- 4- Anomalies vasculaires: .....	29
III- Description biochimique de la maladie d'Alzheimer: .....	30
III- 1- Les dépôts amyloïdes: .....	30
III- 1- 1- La protéine amyloïde ou peptide A $\beta$ et son précurseur: .....	30
III- 1- 2- Les co-facteurs de l'amyloïdogénèse: .....	36
III- 2- La dégénérescence neurofibrillaire: .....	38
III- 2- 1- Les neurofilaments: .....	38
III- 2- 2- Structure des protéines tau: .....	39
III- 2- 3- Rôle des protéines tau: .....	45
III- 2- 4- Protéines tau et maladie d'Alzheimer: .....	47
III- 3- Altération des neurotransmetteurs: .....	59
IV- Etiologie de la maladie d'Alzheimer: .....	61
IV- 1- Facteurs de risque: .....	61

IV- 2- Facteurs génétiques: .....	61
IV- 2- 1- Le chromosome 21: .....	62
IV- 2- 2- Le chromosome 14: .....	63
IV- 2- 3- Le chromosome 19: .....	63
IV- 2- 4- Conclusion: .....	64
V- Hétérogénéité de la maladie d'Alzheimer: .....	64
VI- Approche Thérapeutique: .....	66
VI- 1- Modèles animaux et cellulaires de la maladie d'Alzheimer:.....	66
VI- 1- 1- Les modèles animaux: .....	66
VI- 1- 2- Les modèles cellulaires: .....	68
VI- 2- Traitement: .....	69
RESULTATS-DISCUSSION .....	70
I- Purification des protéines tau-PHF pour l'immunisation: .....	70
I- 1- Préparations de protéines tau-PHF: .....	71
I- 2- Immunisation et criblage: .....	72
II- Caractérisation biochimique de l'anticorps monoclonal AD2: .....	75
II-1- Spécificité de l'anticorps AD2: .....	75
II-1-1- Etude immunohistochimique:.....	75
II- 1- 2- Etude ultrastructurale: .....	75
II- 1- 3- Etude biochimique:.....	76
II- 2- Anticorps dépendant de la phosphorylation: .....	79
II- 2- 1- Déphosphorylation après électrophorèse et transfert sur membrane de nitrocellulose: .....	80
II- 2- 2- Déphosphorylation avant électrophorèse: .....	81
II- 2- 3- Conclusion: .....	82
II- 3- Expression de l'épitope lors du développement chez le rat: .....	82
II- 3- 1- Expression de l'épitope dans du tissu cérébral de rat avec délai post-mortem: .....	83
II- 3- 2- Etude de l'expression de l'épitope dans du tissu cérébral de rat sans délai post-mortem:.....	88
II- 4- Caractérisation de l'épitope: .....	95
II- 4- 1- Phosphorylation de type neurofilament:.....	95
II- 4- 2- Phosphorylation de type fœtal: .....	97
II- 4- 3- Localisation de l'épitope: .....	99

III- Expression de l'épitope au cours de différentes maladies neurodégénératives: .....	109
III- 1- La maladie d'Alzheimer: .....	110
III- 2- Le vieillissement normal: .....	111
III- 3- La maladie de Steele-Richardson-Olszewski et la dégénérescence corticobasale: .....	112
III- 3- 1- La maladie de Steele-Richardson-Olszewski ou PSP: .....	112
III- 3- 2- La dégénérescence corticobasale ou CBD: .....	114
III- 3- 3- Conclusion: .....	115
III- 4- Le syndrome de l'île de Guam: .....	115
III- 5- Conclusion: .....	120
IV- Application aux biopsies cérébrales: .....	121
CONCLUSION .....	124
PERSPECTIVES .....	128
MATERIELS ET METHODES .....	132
I- Matériel autopsique: .....	132
I-1- Cerveaux de bœuf et porc: .....	132
I- 2- Cerveaux de rats: .....	132
I- 3- Cerveaux humains: .....	132
II- Sondes immunologiques: .....	135
II- 1- Anticorps polyclonaux: .....	135
II- 2- Anticorps monoclonaux: .....	138
III- Analyses biochimiques: .....	139
III- 1- Techniques biochimiques: .....	139
III-1- 1- Le dot-blot: .....	139
III- 1- 2- Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS: .....	140
III- 1- 3- Technique des immunoempreintes: .....	142
III- 1- 4- Dosage colorimétrique des protéines: .....	143
III- 2- Purification des protéines tau-PHF: .....	143
III- 3- Préparation de protéines tau fœtales de rat: .....	145
III- 4- Préparation de l'activité kinasique: .....	146
III- 4- 1- Activité kinasique de porc: .....	146
III- 4- 2- Activité kinasique de rat: .....	146

III- 5- Phosphorylation in vitro: .....	147
III- 5- 1- Phosphorylation in vitro de l'isoforme htau 40: .....	147
III- 5- 2- Phosphorylation in vitro des isoformes natives et mutées: .....	147
III- 6- Déphosphorylation par la phosphatase alcaline: .....	148
III- 6- 1- Déphosphorylation avant dépôt: .....	148
III- 6- 2- Déphosphorylation après transfert: .....	149
III- 7- Expression de l'épitope chez le rat .....	149
III- 7- 1- Etude du tissu cérébral de rat obtenu avec délai post- mortem: .....	149
III- 7- 2- Etude du tissu cérébral de rat obtenu sans délai post- mortem: .....	150
IV- Analyse Histologique: .....	151
IV- 1- Coupes en congélation: .....	151
IV- 1- 1- Tissu cérébral humain: .....	151
IV- 1-2- Tissu cérébral de rat: .....	152
IV- 2- Coupes en paraffine: .....	152
IV- 3- Immunohistochimie: .....	153
IV- 3- 1- Tissu cérébral humain: .....	153
IV- 3- 2- Tissu cérébral de rat: .....	153
V- Analyse immunocytochimique: .....	154
VI- Quantifications: .....	155
BIBLIOGRAPHIE .....	156
ABREVIATIONS .....	183
ANNEXES .....	184
TABLE DES MATIERES.....	188

