

**UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE
UFR DE BIOLOGIE**

Année: 1996

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

Bruno PERMANNE-HAMMOUYA

**AMYLOÏDOSE CÉRÉBRALE: QUANTIFICATION IMMUNOCHEMIQUE DU
PEPTIDE A β ET DE L'APOLIPOPROTÉINE E AU COURS DU VIEILLISSEMENT
CÉRÉBRAL NORMAL ET DE LA MALADIE D'ALZHEIMER**

présentée le 27 juin 1996 devant le jury composé de:

Président de Jury: Monsieur le Professeur André Verbert
Rapporteurs: Monsieur le Docteur Frédéric Checler
Monsieur le Professeur Jean-Pierre Brion
Examineurs: Monsieur le Docteur Jean Claude Beauvillain
Monsieur le Docteur Luc Buée
Directeur de thèse: Monsieur le Docteur André Delacourte



Bruno PERMANNE-HAMMOUYA

AMYLOIDOSE CEREBRALE:
QUANTIFICATION IMMUNOCHIMIQUE DU PEPTIDE A β ET DE
L'APOLIPOPROTEINE E AU COURS DU VIEILLISSEMENT CEREBRAL
NORMAL ET DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

ERRATUM

-PAGE 31, la dernière phrase du paragraphe consacré aux isoformes APP 365 et APP 563. A la place de “les deux isoformes APP₅₆₃ et APP₇₅₁ ne contiennent pas le peptide A β et ne sont donc pas amyloïdogéniques”, il faut lire “les deux isoformes APP₅₆₃ et APP₃₆₅ ne contiennent pas le peptide A β et ne sont donc pas amyloïdogéniques”.

-PAGE 37, une erreur s'est glissée dans le paragraphe consacré aux enzymes β -sécrétases candidates puisque l'APP n'a pas été démontrée comme une β -sécrétase (dernière ligne) et l'article de Papastoitsis et al., 1994 fait référence à l'action β sécrétase de l'endopeptidase 3.4.24.15 dans différentes conditions.

-PAGE 113, dans les perspectives de ce travail de thèse (ligne 20): le Dr F. Checler (UFR, Sophia Antipolis) ne dispose pas de sondes monoclonales mais polyclonales capables de reconnaître spécifiquement les formes se terminant aux acides aminés 40 et 42 du peptide A β .

A ma mère

A mon frère

A ma famille

A mes amis

J'exprime tous mes remerciements à,

Monsieur le Professeur André Verbert. C'est un grand honneur pour moi que vous puissiez juger mon travail en tant que président de Jury. Vous m'avez communiqué votre passion pour la biochimie grâce à votre enseignement de qualité et toujours très clair. Je tiens à vous assurer de mon plus profond respect et de ma grande admiration.

Monsieur le Professeur Jean-Pierre Brion. Vos compétences scientifiques me rendent votre avis très précieux. Votre venue en tant que rapporteur m'honore tout particulièrement.

Monsieur le Docteur Frédéric Checler. Je suis très heureux que vous ayez accepté d'être rapporteur de cette thèse. Votre jugement est pour moi extrêmement important. Votre présence m'honore au plus haut point.

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 reconnaissant de la gentillesse et de la disponibilité que vous m'avez toujours témoignées.

Monsieur le Docteur André Delacourte. La confiance que vous m'avez accordée en m'accueillant dans votre laboratoire est pour moi un grand honneur. Vous avez su, en me dirigeant, me faire partager votre dynamisme dans un domaine où la compétition internationale est farouche. Que cette thèse soit le témoignage de ma reconnaissance et de ma gratitude.

Monsieur le Docteur Luc Buée. Je vous suis extrêmement reconnaissant pour m'avoir conseillé, soutenu, encouragé et supporté durant ces trois années de thèse. Dans une

ambiance de travail toujours stimulante et agréable, j'ai appris énormément en travaillant à vos côtés.

J'exprime également tous mes remerciements à,

Monsieur François Hyafil, Directeur de recherche des Laboratoires Glaxo-France, pour l'indispensable soutien financier dont j'ai bénéficié tout au long de ce travail.

Monsieur le Professeur Claude Di Menza, dont la collaboration a permis la réalisation de ces travaux de thèse.

Monsieur le Docteur Jean-Philippe David, pour son aide et ses précieux conseils tout au long de cette thèse.

Messieurs les Professeurs André Défossez et Patrick Vermersch, pour leur aide, leurs encouragements et leurs précieux conseils.

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

Messieurs les Professeurs Petit, Destée, Leys, Mazzuca ainsi qu'à Mesdames et Messieurs les Docteurs Marie-Christine Chartier-Harlin, Jordi Pérez-Tur et Pierre-Eric Sautière.

Madame le Docteur Valérie Buée-Scherrer, pour son amitié de longue date et son soutien moral durant toutes ces années.

Je voudrais également remercier Annick, Marie-Joelle, Cathia, Fabienne, Laetitia, Valérie, Didier, Jean-Charles, Nicolas, Serge, Thierry et tous les membres de l'Unité INSERM U422, pour leur soutien et la gentillesse qu'ils m'ont toujours témoigné.

Ce travail de thèse a donné lieu aux publications et communications suivantes

PUBLICATIONS

Permanne B., Buée L, Hof PR, Morrison JH, Fillit H, Delacourte A. Les co-facteurs de l'amyloïdose dans la maladie d'Alzheimer. *Maladie d'Alzheimer et Syndromes apparentés*. Editions Solal. pp 115-118.

Permanne B., Buée L, David J-Ph, Fallet-Bianco C, Di Menza C, Delacourte A. Quantitation of Alzheimer's amyloid peptide and identification of related amyloid proteins by dot-blot immunoassay. *Brain Research* 685, (1995) 154-162.

Buée L., Permanne B., Pérez-Tur J., Chartier-Harlin M.C., Delacourte A. Alzheimer's disease: A β or Apo E amyloidosis? *The Lancet* 346, (1995) 59.

Buée L., Permanne B., David J-Ph., Delacourte A. Combien de mg de peptide amyloïde dans l'Alzheimer ? *Alzheimer Actualités* 102, (1995) 5.

COMMUNICATIONS ORALES

Permanne B., Buée L, Hof PR, Morrison JH, Fillit H, Delacourte A. Les co-facteurs de l'amyloïdogenèse dans la maladie d'Alzheimer: apolipoprotéines, protéoglycannes et thrombospondines. II^{ème} réunion francophone sur la maladie d'Alzheimer et Syndromes apparentés. Marseille, le 27 Novembre 1993

Permanne B., Buée L, David J-Ph, Fallet-Bianco C, Vermersch P, Di Menza C, Delacourte A. Detection and quantification of amyloid β A4 peptide and β A4-binding proteins by dot-blot immunoassay. Third Lille Neurosciences Workshop. Lille, le 20 Octobre 1994 .

Permanne B., Buée L, David J-Ph, Fallet-Bianco C, Di Menza C, Delacourte A. Quantification du peptide amyloïde et identification d'autres constituants associés aux dépôts amyloïdes par dot-blot immunoassay. Congrès de la société de biologie du vieillissement. Paris, le 9 juin 1995.

COMMUNICATIONS AFFICHÉES

Permanne B., Buée L, David J-Ph, Fallet-Bianco C, Vermersch P, Di Menza C, Delacourte A. Dot-blot immunoassay of the Alzheimer amyloid peptide: an alternative way to neuropathological examination. Third Lille Neurosciences Workshop. Lille, les 20 et 21 Octobre 1994.

Buée L, Pérez-Tur J, Permanne B., David J-Ph, Fallet-Bianco C, Vermersch P, Di Menza C, Delacourte A, M-C Chartier-Harlin. Neuropathological lesions in Aging and Alzheimer's disease: relationships to apolipoprotein E alleles. Third Lille Neurosciences Workshop. Lille, les 20 et 21 Octobre 1994.

Permanne B., Buée L, David J-Ph, Fallet-Bianco C, Vermersch P, Di Menza C, Delacourte A. Quantitation of amyloid deposition by dot-blot immunoassay: application to Alzheimer's disease. Society for Neuroscience. Miami Beach FL, U.S.A, 13-18 Novembre 1994 .

Buée L, Pérez-Tur J, Permanne B., David J-Ph, Fallet-Bianco C, Vermersch P, Di Menza C, Delacourte A, M-C Chartier-Harlin. Apolipoprotein E alleles, amyloid deposits and neurofibrillary tangles. Society for Neuroscience. Miami Beach FL, U.S.A, 13-18 Novembre 1994 .

Permanne B., Buée L, David J-Ph, Di Menza C, Delacourte A. Biochemical quantitation of A β peptide and apolipoprotein E aggregated in amyloid substance. Colloque Médecine et recherche de la Fondation IPSEN. Neuilly sur seine, le 29 mai 1995.

Pérez-Tur J., David J.P., Permanne B., Buée L., Di Menza C., Vermersch P., Chartier-Harlin M-C., Delacourte A. Apolipoprotein E frequencies in a serie of autopsy-confirmed Alzheimer's disease cases. Colloque Médecine et recherche de la Fondation IPSEN. Neuilly sur seine, le 29 mai 1995.

Buée L., Permanne B., Pérez-Tur J., Lambert J-Ch., David J-Ph., Vermersch P., Ghozali F., Pasquier F., Lebert F., Petit H., Di Menza C., Chartier-Harlin M.C., Delacourte A. Biochemical quantitation of Alzheimer A β peptide and apolipoprotein E aggregated into amyloid fibrils. Society for Neuroscience. San Diego, U.S.A, 11-16 Novembre 1995 .

Permanne B., Buée L., David J-Ph., Di Menza C., Ghozali F., Delacourte A.
Quantification du peptide A β insoluble au sein des dépôts amyloïdes durant la maladie
d'Alzheimer. III^{ème} réunion francophone sur la maladie d'Alzheimer et Syndromes
apparentés. Lille, 13 et 14 Octobre 1995.

INTRODUCTION

GÉNÉRALITÉS

En 1906, Aloïs Alzheimer, neuropathologiste allemand donna la description clinique et anatomopathologique d'une de ses patientes décédée à 56 ans. A l'autopsie, le cerveau de celle-ci était très atrophié et l'examen microscopique montrait l'existence au sein du cortex cérébral de lésions actuellement connues sous le terme de dégénérescence neurofibrillaire et de dépôts amyloïdes. D'autres observations de ce type furent ensuite confirmées. En 1911, le nom de "maladie d'Alzheimer" fut donné à cette affection pour désigner la démence présénile (apparue avant 65 ans) dont les troubles se distinguaient de ceux rencontrés chez les individus atteints de démence sénile ou syphilitique. Depuis les années 60, le terme de maladie d'Alzheimer est couramment employé pour désigner aussi bien les formes préséniles (avant 65 ans) que les formes séniles (après 65 ans).

La maladie d'Alzheimer est la cause de démence la plus fréquente chez les personnes âgées. Elle touche 5% de la population au delà de 65 ans et jusqu'à 20% après 80 ans. Dans les pays industrialisés, elle est la première cause de morbidité et d'invalidité et l'une des premières causes de mortalité. De plus, avec la baisse de la natalité et le vieillissement de la population, elle représente un problème socio-économique majeur.

Depuis une dizaine d'années, d'importantes découvertes sur le plan biochimique et génétique ont permis de progresser dans la compréhension des mécanismes impliqués durant la maladie d'Alzheimer. L'accumulation extracellulaire d'un peptide sous la forme de dépôts amyloïdes et la présence intraneuronale de protéines modifiées du cytosquelette sont les 2 anomalies caractéristiques de la démence de type Alzheimer. L'étiologie de la maladie d'Alzheimer est inconnue mais certains facteurs (âge, facteurs génétiques) semblent prédisposer à cette pathologie. Récemment, deux nouveaux gènes impliqués dans des formes familiales de maladie d'Alzheimer ont été découverts. Ceci confirme que de nombreux facteurs doivent être impliqués dans cette maladie hétérogène sur le plan clinique, génétique et biochimique.

Dans ce travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressé à la mise au point d'une méthode de quantification de la substance amyloïde. Cette méthode biochimique est complémentaire à l'analyse neuropathologique et permet également d'identifier d'autres constituants qui pourraient être impliqués dans la formation des dépôts amyloïdes.

Dans un premier temps, nous décrivons les aspects cliniques, neuropathologiques, biochimiques et génétiques de la maladie d'Alzheimer avant d'aborder nos résultats personnels.

I-DESCRIPTION CLINIQUE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

I-1-La démence de type Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est une démence dégénérative qui se manifeste par une détérioration progressive des fonctions intellectuelles. La symptomatologie clinique associe des troubles de la mémoire, du langage, du jugement, du comportement, de la personnalité, et des difficultés à effectuer des tâches routinières. A un stade avancé, les fonctions élémentaires sont touchées et le patient décède après 5 à 10 ans en moyenne.

I-2-Les troubles cognitifs

I-2-1-Les troubles de la mémoire

Les troubles de la mémoire sont constants et représentent en règle la première manifestation clinique de la maladie. Les patients se plaignent d'oublier les informations de tous les jours comme les consignes ou les noms. Ces plaintes peuvent être discrètes et isolées et posent alors le problème du diagnostic différentiel avec l'oubli bénin lié à l'âge. Toutefois, ces troubles finissent par s'accroître et se caractérisent par un oubli progressif des faits récents. Il est préférable de distinguer plusieurs mémoires afin d'analyser au mieux les troubles mnésiques rencontrés durant la maladie d'Alzheimer.

I-2-1-1-Les troubles de la mémoire primaire

La mémoire primaire ou mémoire à court terme, qui permet le stockage temporaire d'une information, est souvent perturbée durant la maladie d'Alzheimer. L'une des méthodologies classiques étudiant cette mémoire est issue du paradigme de Brown-Peterson. Cet examen clinique consiste à restituer un ensemble d'informations

après une tâche interférente. Les patients atteints de la maladie d'Alzheimer éprouvent de nombreuses difficultés à répondre à ce genre de test.

I-2-1-2-Les troubles de la mémoire secondaire

La mémoire secondaire ou mémoire à long terme permet le stockage d'une information transformée, codée. Elle intervient lorsque l'information à mémoriser excède la capacité de la mémoire primaire et que le sujet doit maintenir en mémoire, manipuler et transformer le matériel avant de le restituer. La mémoire secondaire se subdivise en mémoire procédurale ou implicite et mémoire déclarative ou explicite.

-La mémoire implicite: La mémoire implicite est inconsciente. Elle est explorée par le degré avec lequel la présentation préalable d'un stimulus facilite son apprentissage. Cette mémoire serait préservée durant la maladie d'Alzheimer.

-la mémoire explicite: La mémoire explicite est directement accessible à la conscience et est très diminuée durant la maladie d'Alzheimer. La composante épisodique de cette mémoire concerne les événements précis du vécu du sujet telle que la mémoire autobiographique. La composante sémantique se réfère à la connaissance générale et est également touchée du fait d'une diminution des capacités de traitement des informations sémantiques et visuelles.

I-2-2-Les troubles du langage (aphasie)

Ce sont les troubles cognitifs les plus fréquemment constatés après les troubles mnésiques. L'intensité de ces troubles est corrélée à la sévérité de la démence. La première étape est caractérisée par de fréquents manques du mot, accompagnés de circonlocutions, de digressions et de paraphasies verbales. Ces troubles finissent par s'accroître et les troubles de la compréhension apparaissent. En fin d'évolution, toutes les modalités sont touchées évoquant une aphasie globale avec réduction massive du langage et perturbations importantes de la compréhension.

I-2-3-Les troubles praxiques

Ces troubles qui concernent les réalisations gestuelles peuvent, dans certains cas, réduire l'autonomie de façon importante. Ils se manifestent de façons variées, comme par des troubles lors de l'habillage (apraxie de l'habillage), ou par des difficultés à effectuer des gestes de la vie courante qui nécessitent l'utilisation d'objets (apraxie idéatoire). L'apraxie réflexive (impossibilité à reproduire des gestes bimanuels sans signification) et l'apraxie constructive (impossibilité à reproduire des dessins géométriques) constituent deux signes neurologiques observés très précocément durant la maladie d'Alzheimer.

I-2-4-Les troubles gnosiques

Ce sont les troubles cognitifs les moins étudiés. Néanmoins, une agnosie visuelle a été constatée dans environ 30% des cas. Cela se traduit par des difficultés pour voir les objets, pour la lecture, ainsi que pour reconnaître des visages même familiers (prosopagnosie).

I-2-5-Les troubles intellectuels

Les troubles intellectuels ne sont pas indispensables au diagnostic de maladie d'Alzheimer. Ils se traduisent par des troubles du jugement ou des difficultés à résoudre les problèmes de la vie quotidienne. Ils sont évalués par des tests psychométriques telle que l'échelle d'intelligence pour adulte de Wechsler (WAIS) dont les résultats sont exprimés en quotient intellectuel.

I-3-Les troubles du comportement

Les troubles du comportement sont rencontrés très fréquemment durant la maladie d'Alzheimer bien qu'ils soient d'importance et de nature très diverses selon les patients. Ils peuvent être la conséquence des troubles cognitifs, témoigner de la réaction du malade à ses difficultés ou être le résultat de la pathologie au niveau de certaines régions cérébrales impliquées dans l'activité émotionnelle.

I-3-1-Dépression

Parmi les troubles du comportement, la dépression est celui qui a donné lieu au plus grand nombre d'études. D'abord considérée comme une simple réaction psychologique du patient face à ses déficits, il semblerait qu'elle soit la conséquence des lésions de la maladie d'Alzheimer. Du fait d'une sémiologie semblable sur certains points, il est parfois difficile de distinguer les patients souffrant de dépression "primaire" des patients déments. Il semble de plus que la dépression puisse retarder le diagnostic de la maladie d'Alzheimer et aggraver les troubles cognitifs et/ou comportementaux.

I-3-2-Comportements psychopathologiques

De nombreux comportements psychopathologiques sont observés durant la maladie d'Alzheimer: comportements passifs (perte de l'initiative, anxiété), comportements d'agitation (irritabilité), comportements égocentriques. D'autres manifestations psychotiques (hallucinations, délires) probablement en rapport avec les déficits cognitifs sont rencontrées lorsque la maladie est déjà évoluée. Cependant, ces troubles ne sont pas spécifiques de la maladie d'Alzheimer et peuvent être observés dans des cas de démence vasculaire.

I-4-Les troubles neurologiques

Un certain nombre de manifestations neurologiques sont rencontrées au cours de la maladie d'Alzheimer. Il s'agit essentiellement de signes extrapyramidaux et de troubles de la marche. Les signes extrapyramidaux se manifestent par une augmentation du tonus musculaire et peuvent être constatés dans 40 à 90% des cas de démence sévère. Les troubles de la marche se caractérisent par des anomalies discrètes mais significatives de la marche et de l'équilibre.

I-5-Le diagnostic

I-5-1-Les éléments du diagnostic

Des examens tels que le "Mini Mental Test (Annexe I): MMS" (Folstein *et al.*, 1975), l'échelle d'intelligence pour adultes de Wechsler (Wechsler *et al.*, 1956) ou des tests psychométriques comme les échelles d'évaluation de Blessed (Blessed *et al.*, 1968) ont pour but de quantifier une altération du fonctionnement cérébral.

Des examens paracliniques sont également utilisés afin d'éliminer les affections non dégénératives qui pourraient provoquer des troubles correspondant à une démence: le scanner-X élimine les affections d'origine tumorale; l'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM), la tomographie par émission de positron (débit de flux sanguin, métabolisme du glucose) et les examens biologiques (sang, liquide céphalo-rachidien) écartent un dysfonctionnement cérébral d'origine inflammatoire ou métabolique.

I-5-2-Les critères du diagnostic

Du vivant du patient, il n'existe pas de marqueur absolu de la maladie d'Alzheimer. Le diagnostic de la maladie d'Alzheimer repose donc sur des critères cliniques et paracliniques et sur l'exclusion de toute autre forme de pathologie. Les critères de diagnostic clinique établis par le *National Institute of Neurological Disorders and Stroke* (NINCDS) et l' *Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (ADRDA) se répartissent en trois catégories (**Annexe II**): maladie d'Alzheimer probable, possible et confirmé (Mc Khann *et al.*, 1984). Le diagnostic de certitude repose sur la somme de critères cliniques et neuropathologiques (critères du CERAD) qui se basent sur un examen histologique du cerveau montrant la présence de neurones en dégénérescence neurofibrillaire et de dépôts de substance amyloïde (Mc Khann *et al.*, 1984, Khachaturian, 1985; Mirra *et al.*, 1991).

II-ASPECTS NEUROPATHOLOGIQUES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

II-1-Aspects macroscopiques

Le cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer présente une atrophie corticale diffuse, très prononcée au niveau des lobes temporaux et pariétaux. Ceci se traduit par un élargissement des sillons et un rétrécissement des circonvolutions. Une dilatation des ventricules latéraux et du III^{ème} ventricule, plus ou moins marquée selon la sévérité des cas, est également constatée.

II-2-Aspects microscopiques

II-2-1-La perte neuronale

La mort neuronale ne provoque pas un vide dans le parenchyme nerveux car ce dernier se resserre en masquant la place laissée vacante par le neurone. Il en résulte une atrophie corticale qui permet d'estimer une réduction du nombre de cellules de l'ordre de 22 à 26% (Terry *et al.*, 1981; Mountjoy *et al.*, 1983). Pour certains auteurs, la mort neuronale serait la cause principale des signes cliniques de la maladie d'Alzheimer (Mann, 1988). Une perte synaptique, démontrée par des études immunohistochimiques grâce à des sondes dirigées contre la synaptophysine, a également été constatée (Masliah *et al.*, 1991).

II-2-2-La réaction gliale

Une gliose astrocytaire dans l'ensemble des régions cérébrales est constatée durant la maladie d'Alzheimer (Mandybur et Chuirazzi, 1990). En effet, une hypertrophie astrocytaire est mise en évidence par un marquage fortement augmenté avec un anticorps dirigé contre la GFAP ou *Glial Fibrillary Acidic Protein* (Delacourte, 1990), une protéine du cytosquelette des cellules astrocytaires. Il faut noter que ce processus est constaté également durant le vieillissement normal mais qu'il se limite alors à la région hippocampique et parahippocampique (David *et al.*, 1994).

II-2-3-Les lésions neuropathologiques

Les neurones en dégénérescence neurofibrillaire et les dépôts extracellulaires de substance amyloïde constituent les deux lésions neuropathologiques principales permettant d'établir de façon définitive le diagnostic de la maladie d'Alzheimer.

II-2-3-1-La dégénérescence neurofibrillaire (DNF)

A) Microscopie optique

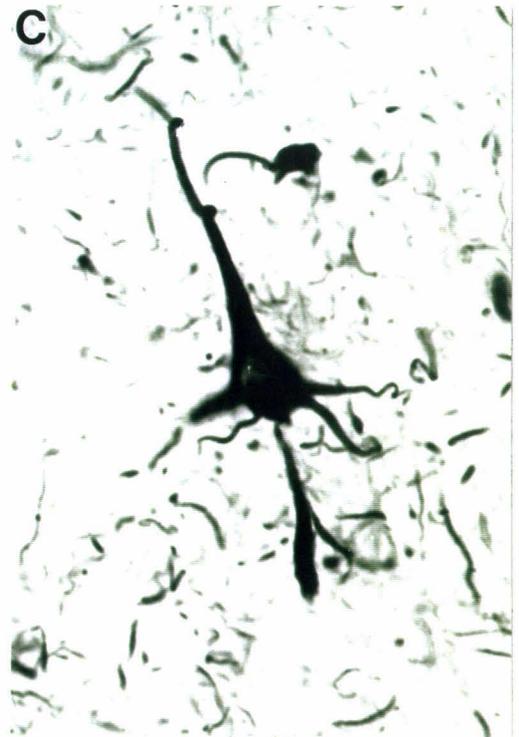
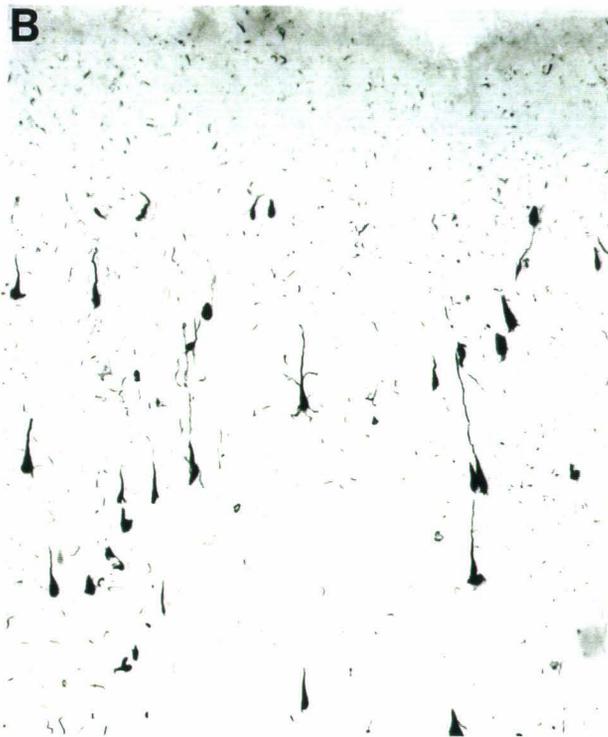
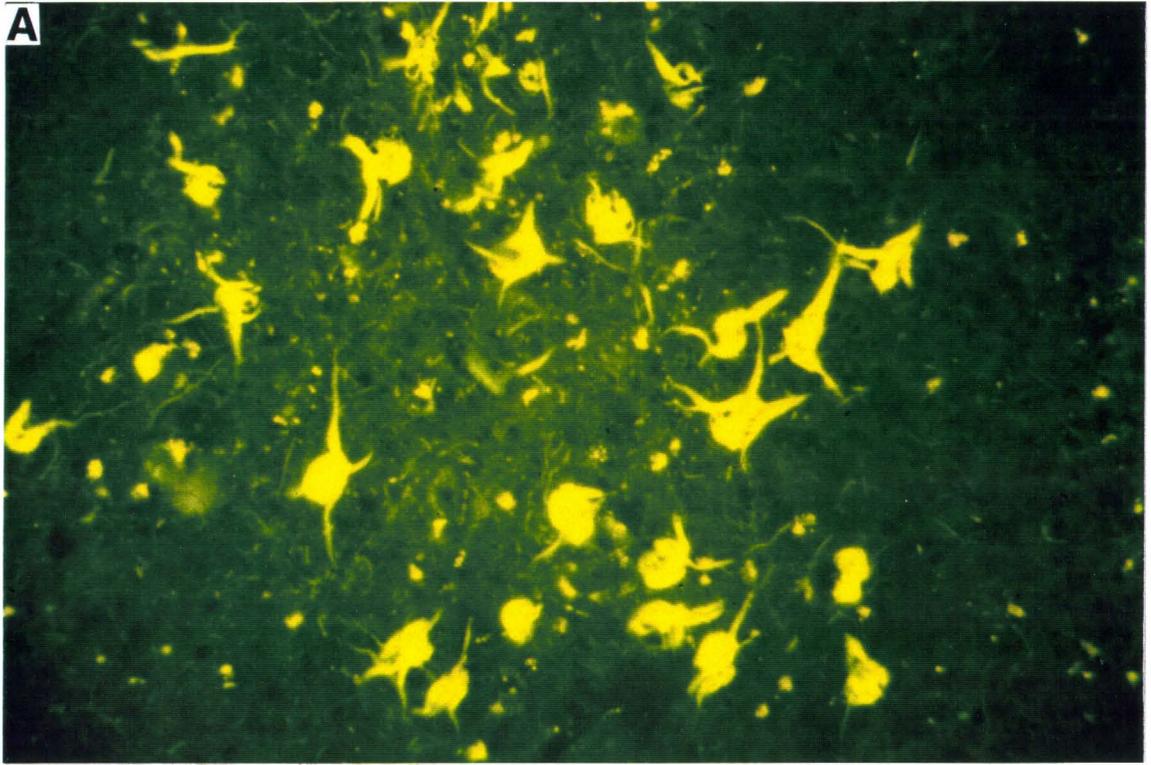
Les neurones en dégénérescence neurofibrillaire possèdent des propriétés argyrophiles et sont ainsi mis en évidence par de nombreuses imprégnations argentiques (Gallyas, 1971; Campbell *et al.*, 1987). Les lésions neurofibrillaires sont également visualisées par des molécules qui ont la particularité de mettre en évidence des structures en feuillets β plissés telle que la thioflavine S (**Figure 1A**). Ces techniques permettent non seulement de mettre en évidence les neurones en dégénérescence, mais aussi les neurites dystrophiques (Delacourte *et al.*, 1987; Lenders *et al.*, 1989).

B) Microscopie électronique

La dégénérescence neurofibrillaire à l'échelle ultrastructurale été décrite initialement par Kidd (Kidd, 1963). Elle est caractérisée par l'accumulation intraneuronale de paires de filaments appariées en hélice ou PHF (*Paired Helical Filaments*) (Kidd, 1963). L'hélice des PHF possède un diamètre de 20 nm pour un pas de 80 nm.

C) Composition

Des techniques immunohistochimiques ont permis de montrer que les protéines tau (protéines du cytosquelette associées aux microtubules) constituent le composant antigénique majeur des PHF (Brion *et al.*, 1985; Delacourte et Défossez, 1986; Grundke- Iqbal *et al.*, 1986a) (**Figure 1B et C**). D'autres constituants ont également été retrouvés au sein des neurones en dégénérescence tels que l'ubiquitine (Baner *et al.*, 1991), des protéines du cytosquelette, MAP2 (en anglais, *Microtubule Associated*



Protein) (Kosik *et al.*, 1984), les neurofilaments (Vickers *et al.*, 1994) et l'apolipoprotéine E (Namba *et al.*, 1991).

D) Distribution topographique

-Distribution régionale:

Les régions hippocampiques et parahippocampiques, essentiellement le cortex entorhinal, le subiculum et le champ CA1 de l'hippocampe sont les régions principalement touchées par la DNF (Arnold *et al.*, 1991). Le noyau basal accessoire de l'amygdale est également atteint. Enfin, les aires néocorticales du lobe temporal contiennent également une quantité très importante de DNF. Les lobes frontaux, pariétaux et occipitaux sont moins atteints par le processus comparativement aux lobes limbiques et temporaux (Arnold *et al.*, 1991).

-Distribution laminaire:

Les neurones pyramidaux des couches II, III et IV du cortex entorhinal sont essentiellement touchés par la DNF (Arnold *et al.*, 1991) ainsi que la couche pyramidale du CA1 (Hof *et al.*, 1990a; Price *et al.*, 1991, Arnold *et al.*, 1991). Au niveau des aires associatives néocorticales, les grands neurones pyramidaux des couches (II-III) et (V-VI) sont atteints par la dégénérescence neurofibrillaire. Toutefois, les couches infragranulaires (V-VI) sont toujours plus affectées que les couches supragranulaires (II-III) (Lewis *et al.*, 1987; Hof *et al.*, 1990a).

-Évolution:

La dégénérescence neurofibrillaire suit un schéma évolutif selon Braak et Braak, 1991, et se répartit en 6 stades différents. Durant les premiers stades (stades I et II), la DNF est localisée tout d'abord au niveau de la région transentorhinale, ce qui constitue les "stades transentorhinaux". La formation hippocampique est ensuite touchée (stades III et IV). Ces stades sont communément définis comme les "stades limbiques". Enfin,

aux "stades isocorticaux" (stades V et VI), les aires associatives sont envahies par le processus neurodégénératif.

Durant le "vieillissement normal" on observe également de la dégénérescence neurofibrillaire se limitant essentiellement aux régions entorhinales et hippocampiques (Price *et al.*, 1991, Bouras *et al.* 1993).

II-2-3-2-Les dépôts de substance amyloïde

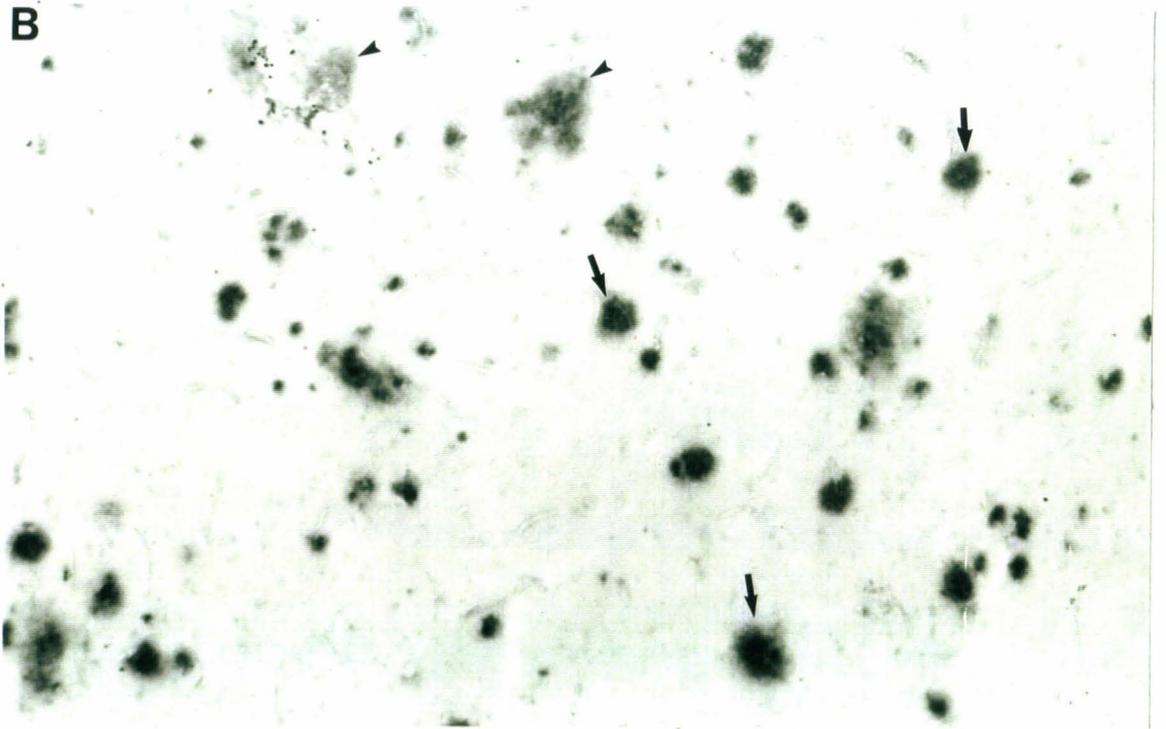
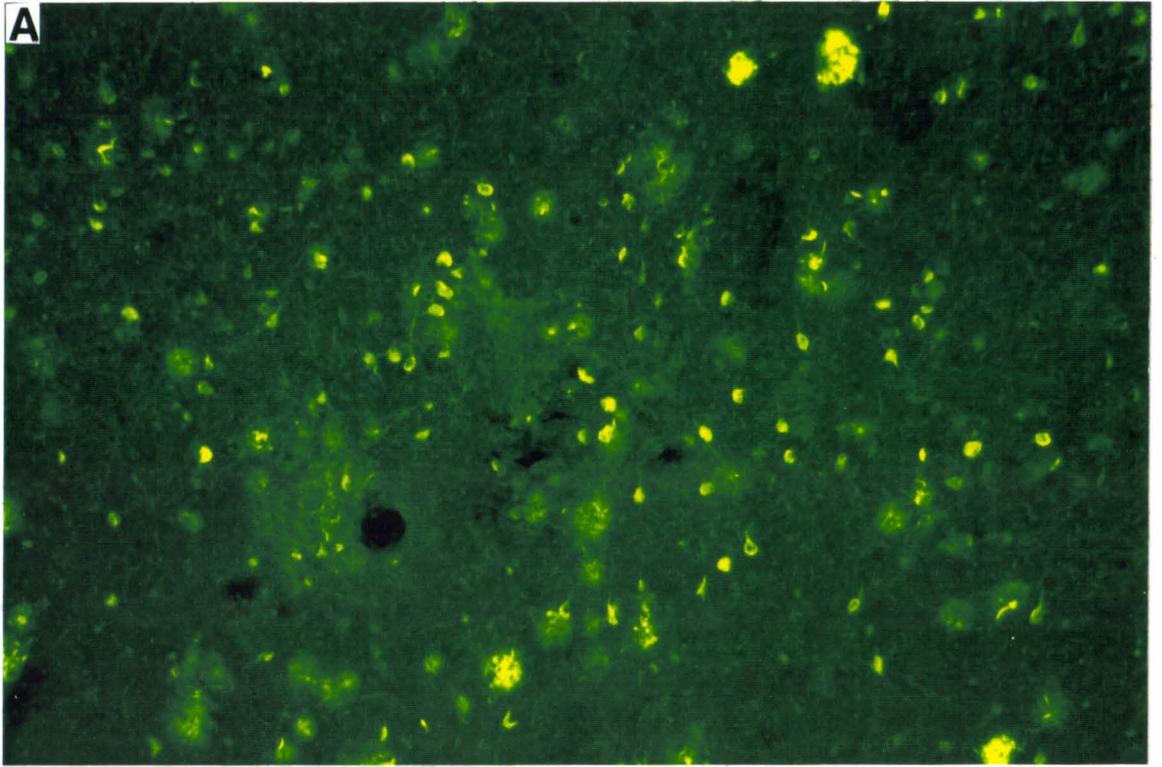
A) Microscopie optique

-Techniques histochimiques

Les dépôts de substance amyloïde ont des propriétés argyrophiles de part leur structure filamenteuse. Ils sont donc visualisables par de nombreuses techniques d'imprégnations argentiques (Bielskowsky, 1904; Globus, 1927, Gallyas, 1971; Campbell *et al.*, 1987). Leur structure en feuillets β plissés permet de les visualiser par la méthode de diffraction des rayons X ou par certains colorants électifs comme le rouge Congo ou la thioflavine S (**Figure 2A**). La structure secondaire des dépôts de substance amyloïde procure une biréfringence verte en lumière polarisée après coloration par le rouge Congo (Tomlinson et Corsellis, 1984).

-Techniques immunohistochimiques

Le constituant principal des dépôts amyloïdes a été purifié et séquencé. Il s'agit d'un peptide de 39 à 43 acides aminés nommé peptide amyloïde ou peptide A β (Glennner et Wong, 1984 a, b; Masters *et al.*, 1985). L'utilisation d'anticorps dirigés contre ce peptide a permis de révéler les dépôts amyloïdes. L'immunohistochimie est considérée comme la méthode de révélation la plus sensible et la plus spécifique puisqu'elle permet également de révéler les dépôts préamyloïdes diffus non visualisables par les méthodes histochimiques classiques (Tagliavini *et al.*, 1988; Bugiani *et al.*, 1989, Behrouz *et al.*, 1991) (**Figure 2B**).



De nombreux autres constituants, détectés également par immunohistochimie, colocalisent avec le peptide A β au sein des plaques séniles: l'apolipoprotéine E (Apo E), l'Apo B, les protéoglycannes, les protéines du complément (C1q, C3d, et C4d), des immunoglobulines, des protéines de la matrice extracellulaire, le composé P amyloïde, l' α_1 -antichymotrypsine...(pour revue voir Fraser *et al.*, 1993a).

B) Microscopie électronique

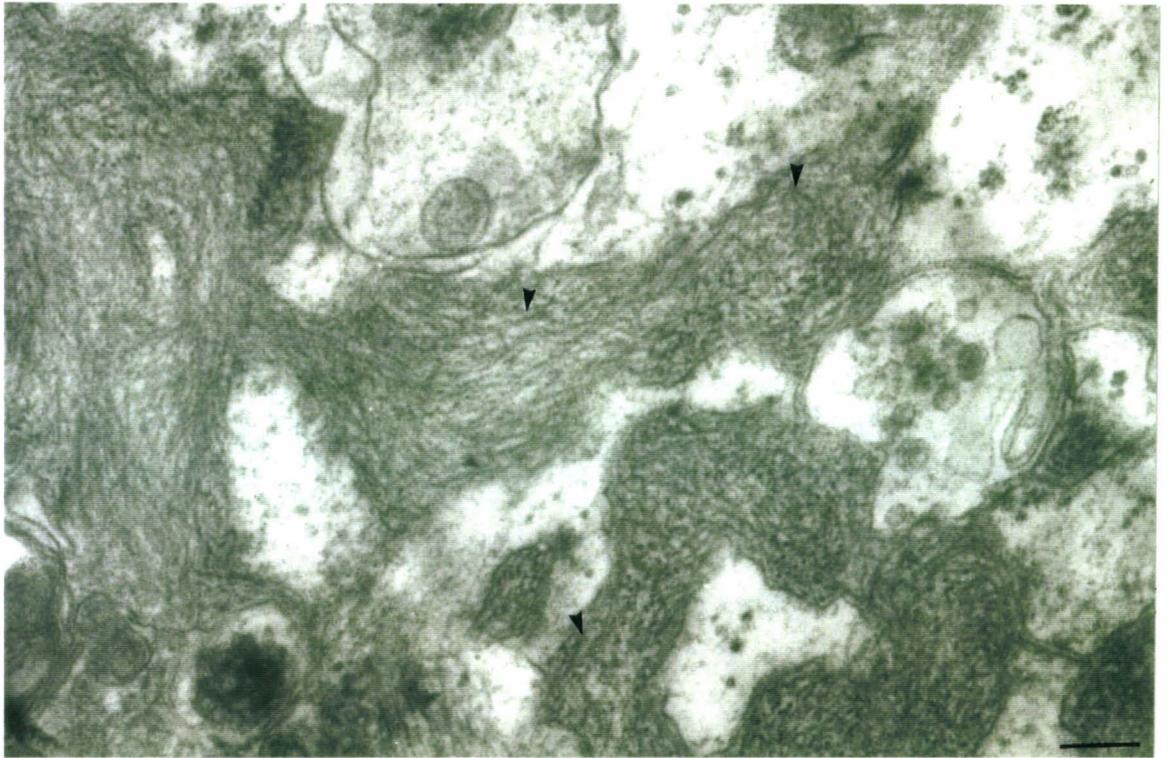
L'étude des filaments amyloïdes à l'échelle ultrastructurale montre des filaments droits en feuillets β plissés possédant un diamètre compris entre 4 et 8 nm (Merz *et al.*, 1983) (**Figure 3**).

C) La classification des dépôts amyloïdes

Deux principaux types de dépôts amyloïdes se distinguent selon leur situation dans le cortex cérébral. On distingue les dépôts amyloïdes situés dans la paroi des vaisseaux de ceux situés dans le parenchyme cérébral. Les dépôts amyloïdes exclusivement situés dans le parenchyme cérébral se différencient en quatre types selon la classification de Ikeda et coll. (1989):

-Les lésions de type 1 sont représentées par les plaques séniles "matures" ou "classiques". Elles sont constituées d'un cœur dense de nature fibrillaire entouré d'un halo sphérique de neurites dystrophiques (**Figure 4A**). Les dépôts uniquement constitués du cœur dense sans halo rentrent également dans cette catégorie. Ils sont communément appelées "burn-out plaques" selon la classification de Wisniewski et Terry (1973).

-Les lésions de type 2 concernent les dépôts sphériques sans cœur dense, encore appelées "plaques primitives" selon la classification de Wisniewski et Terry (1973).



-Les lésions de type 3 se présentent sous la forme de dépôts amyloïdes granulaires et définissent les dépôts diffus préamyloïdes détectables essentiellement par les techniques immunohistochimiques (Figure 4 A).

-Les lésions de type 4 sont représentées par des amas de granules immunoréactives.

L'accumulation de substance amyloïde dans la paroi des vaisseaux constitue l'angiopathie. L'angiopathie congophile se limite à la paroi des gros vaisseaux perforants (Figure 4 B). L'angiopathie dyshorique s'étend au parenchyme situé à proximité du vaisseau cérébral.

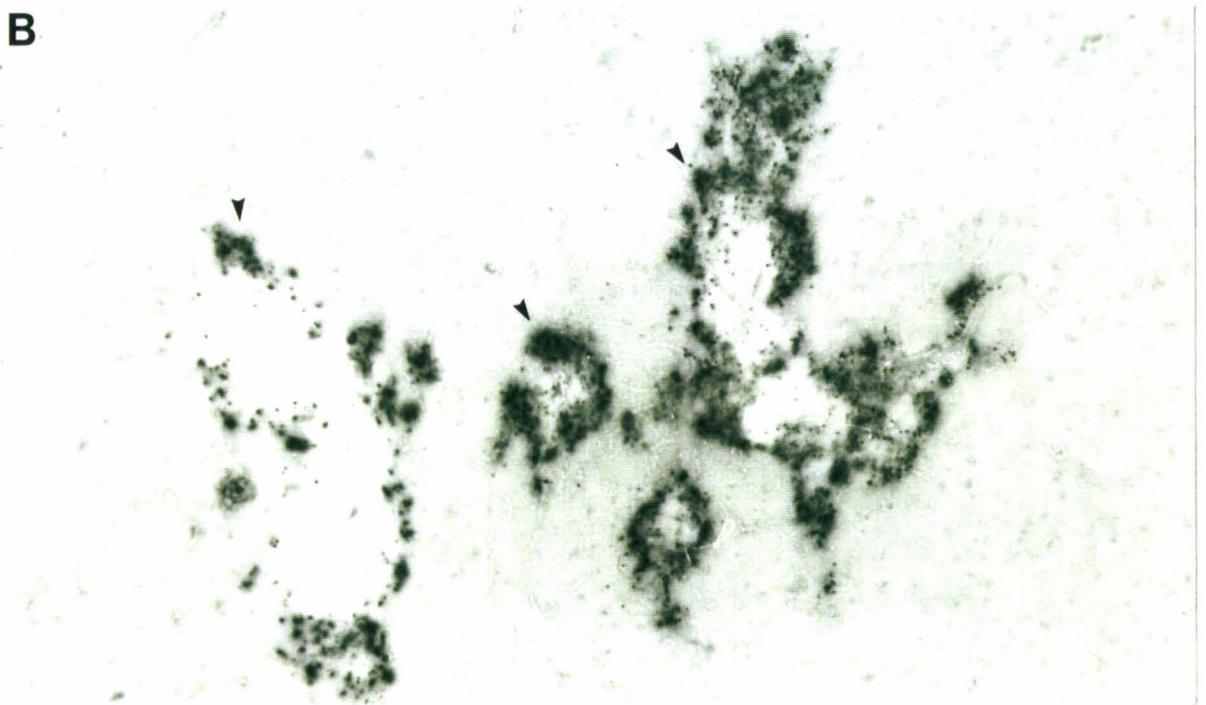
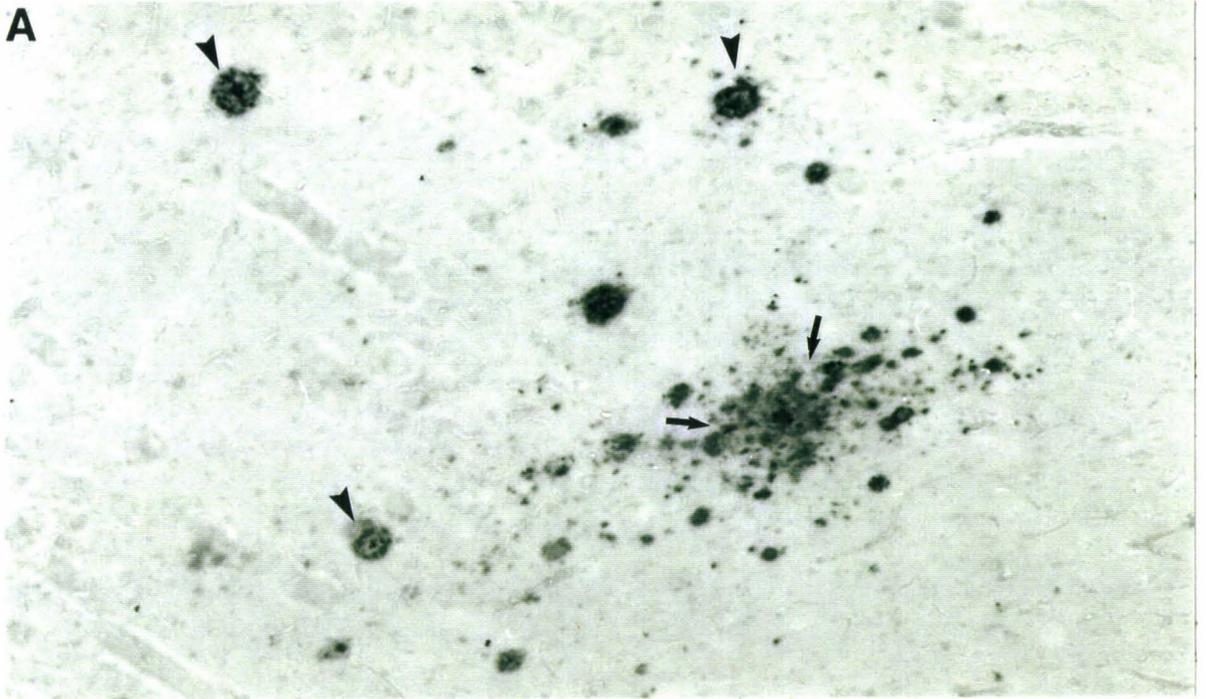
D) Distribution topographique

-Régionale:

Contrairement aux lésions de type neurofibrillaire, les dépôts de substance amyloïde sont retrouvés préférentiellement dans les aires associatives du néocortex (lobes frontaux, temporaux, occipitaux et pariétaux), et plus rarement au niveau des régions hippocampiques et parahippocampiques (Arnold *et al.*, 1991; Braak et Braak, 1991). Les lobes temporaux, et occipitaux semblent plus touchés que les régions frontales et pariétales (Arnold *et al.*, 1991).

-Laminaire:

Dans un premier temps, les techniques histochemiques ont montré que les dépôts amyloïdes se situaient préférentiellement au niveau des couches II et III du néocortex (Hof *et al.*, 1992; Lewis *et al.*, 1987). Toutefois, la distribution des dépôts amyloïdes révélés par des techniques immunohistochimiques se généralise à l'ensemble des couches du néocortex ainsi qu'à la limite 'substance grise-substance blanche' (Braak et Braak, 1991).



-Évolution et distribution topographique:

La distribution de l'amyloïde dans l'ensemble du cerveau est très variable selon les individus. Ce qui laisse penser que la progression de l'amyloïde dans le cerveau ne suit pas un schéma évolutif précis. Néanmoins, 3 stades (A, B et C) ont été définis selon Braak et Braak (1991). **Au stade A**, quelques dépôts amyloïdes sont retrouvés au niveau des aires isocorticales et plus spécialement au niveau des parties basales des lobes frontaux, temporaux et occipitaux. La formation hippocampique est dépourvue d'amyloïde. Quelques rares dépôts sont détectés au niveau de la couche parvocellulaire du présubiculum et des couches pré- β et pré- γ du cortex entorhinal. **Au stade B**, les couches pyramidales du subiculum et du CA1 sont touchées par l'amyloïde. Les couches moléculaires du subiculum et du gyrus dentatus sont également atteintes. Des dépôts amyloïdes diffus sont également retrouvés au niveau de la couche parvocellulaire du présubiculum et au niveau du cortex entorhinal. l'ensemble des aires isocorticales sont envahies. Seules les aires sensitives et motrices primaires sont épargnées. **Au stade C**, la substance amyloïde a envahi l'ensemble des aires isocorticales (ainsi que les aires motrices primaires). La formation hippocampique n'est pas plus touchée qu'au stade B. Les noyaux gris sous-corticaux (striatum, thalamus, hypothalamus) peuvent être atteints. Enfin, la couche moléculaire du cervelet peut présenter de nombreux dépôts diffus d'amyloïde.

Le cerveau de patients atteints du syndrome de Down (trisomie 21) est très rapidement envahi par de nombreux dépôts amyloïdes. Leur distribution est similaire à celle constatée durant la maladie d'Alzheimer. Il semble néanmoins que l'amygdale, l'hippocampe et le cortex entorhinal soient plus précocement touchés (Mann et Esiri, 1989). On note également la présence de dépôts diffus dans le cervelet (Mann *et al.*, 1990).

-Évolution et formation des dépôts amyloïdes:

Les différents types de dépôts amyloïdes observés dans le cortex cérébral ne seraient pas des structures figées mais évolueraient dans le temps. Il est généralement admis que durant la formation de l'amyloïde, les stades précoces sont représentés par les dépôts diffus ou dépôts préamyloïdes non fibrillaires (lésions de type 3) tandis que les plaques séniles "classiques" (lésions de type 1), associées à de la DNF et à une réaction gliale intense définissent les stades ultérieurs plus matures (Tagliavini *et al.*, 1988; Wisniewski *et al.*, 1989; Davies et Mann, 1993).

II-2-3-3-Relation entre les dépôts amyloïdes et la dégénérescence neurofibrillaire

Selon de nombreux auteurs, la démence serait plus corrélée au nombre de neurones en dégénérescence qu'à celui des dépôts amyloïdes (Wilcock et Esiri, 1982; Duyckaerts *et al.*, 1987; Katzman *et al.*, 1988; Delaère *et al.*, 1989, 1990; Arriagada *et al.*, 1992). Dans le cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer, ces deux lésions coexistent toujours mais dans des proportions variables. La question qui consiste à savoir si la substance amyloïde précède ou non l'apparition de la DNF reste posée. Pour certains auteurs, la mort neuronale précède la formation des dépôts amyloïdes (Masliah *et al.*, 1990; Terry *et al.*, 1991; Perry *et al.*, 1992). Pour d'autres, c'est l'amyloïde qui serait observée en premier lieu (Hardy et Higgins, 1992). Les études menées sur des patients atteints de trisomie 21 favoriseraient plutôt la seconde hypothèse. En effet, ces sujets présentent, de façon très précoce, les lésions neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer et constituent donc un modèle d'étude de la formation et de l'évolution de ces deux types de lésions. Durant cette pathologie, les dépôts amyloïdes observés dès l'âge de 20 ans, précèdent environ de 10 à 15 ans l'apparition de la dégénérescence neurofibrillaire (Giaccone *et al.*, 1989; Mann et Esiri., 1989). Il existe d'autres arguments en faveur de l'amyloïde dans l'étiopathogénie des lésions de la maladie d'Alzheimer. Ainsi, de nombreuses études *in vitro* ont montré que le peptide A β agrégé

était neurotoxique (Yankner *et al.*, 1990; Mattson *et al.*, 1992). Enfin, il faut noter l'existence de formes familiales de maladie d'Alzheimer liées à la présence de mutations sur le gène du précurseur du peptide amyloïde (Goate *et al.*, 1991; Murrell *et al.*, 1991. Chartier-Harlin *et al.*, 1991; Mullan *et al.*, 1992).

III-ASPECTS BIOCHIMIQUES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

III-1-La dégénérescence neurofibrillaire

Les neurones qui dégèrent sont caractérisés par une accumulation intraneuronale de PHF dont les composants antigéniques majeurs sont les protéines du cytosquelette associées aux microtubules, les protéines tau (Brion *et al.*, 1985; Delacourte et Défossez, 1986; Grundke- Iqbal *et al.*, 1986a).

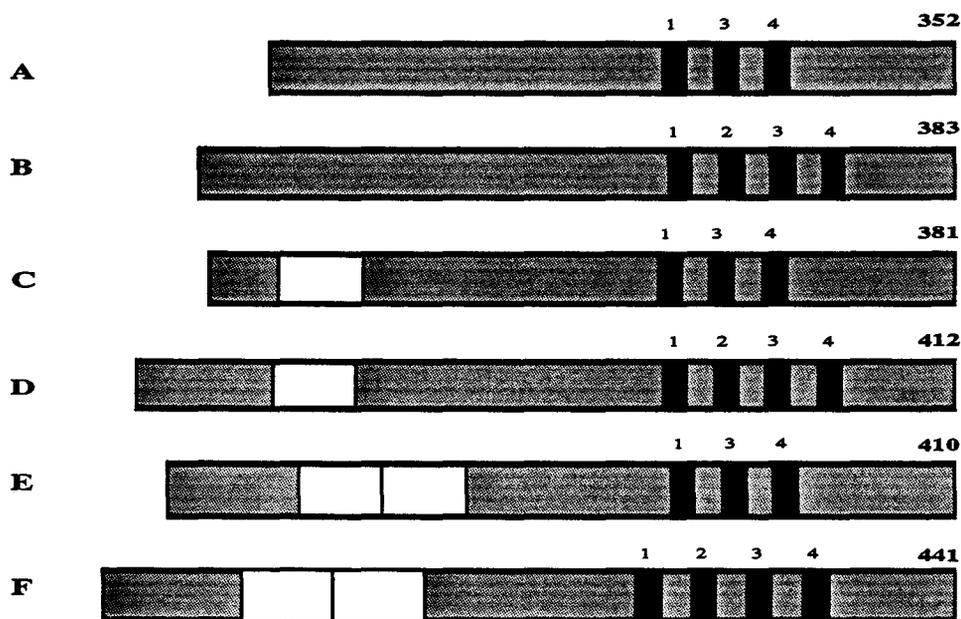
III-1-1-Les protéines tau

III-1-1-1-Structure

Le gène des protéines tau est situé sur le chromosome 17 (Neve *et al.*, 1986). Dans le système nerveux central, 6 ARN messagers différents sont générés par épissage alternatif d'un transcrit primaire constitué de 16 exons. Ces 6 ARN messagers sont traduits en six isoformes de protéines tau (**Figure 5**) qui diffèrent par la présence du coté amino-terminal (N-terminal), d'un ou deux inserts de 29 ou 58 acides aminés et, du coté carboxy-terminal (C-terminal), d'une séquence répétitive de 31 ou 32 acides aminés contenant le motif (Pro-Gly-Gly-Gly) et se répétant trois ou quatre fois (Goedert *et al.*, 1989a). La présence ou non des inserts en position N-terminale, et de la séquence répétitive en position C-terminale confère aux 6 variants tau une masse moléculaire

apparente (déterminée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS) comprise entre 45 et 62 kDa.

FIGURE 5



Les 6 isoformes sont retrouvées dans le cerveau adulte humain. L'expression des protéines tau est régulée au cours du développement. En effet, une seule isoforme est retrouvée à la naissance, l'isoforme fœtale. Cette isoforme ne contient ni d'insert N-terminal, ni de séquence répétitive supplémentaire (Goedert *et al.*, 1989b) et correspond à l'isoforme A dans la Figure 5.

III-1-1-2-Localisation

Dans le cerveau humain, les protéines tau sont essentiellement localisées au niveau des neurones. Ceci a été démontré par immunohistochimie (Kowall et Kosik, 1987) et par hybridation in situ (Kosik *et al.*, 1989). Au niveau cellulaire, la localisation des protéines tau serait plutôt axonale (Binder *et al.*, 1985; Kowall et Kosik, 1987; Brion *et al.*, 1988), mais elles ont également été détectées au niveau somato-dendritique

(Papasozomenos et Binder, 1987). Leur localisation intracellulaire dépendrait de leur degré de phosphorylation.

III-1-1-3-Rôle

Les protéines tau font partie des protéines associées aux microtubules ou MAPs. Elles induisent la polymérisation des molécules de tubuline, constituant majeur des microtubules (Cleveland *et al.*, 1977a,b) auxquelles elles se lient par l'intermédiaire des séquences répétitives (Pro-Gly-Gly-Gly) (Lee *et al.*, 1989; Himmler *et al.*, 1989; Butner et Kirschner, 1991). Elles stabilisent les microtubules et ont donc un rôle dans le transport axonal (Drubin et Kirschner, 1986). Enfin, sur des cultures de neurones cérébelleux de rats embryonnaires, un rôle des protéines tau a été démontré dans la différenciation axonale des neurites (Caceres et Kosik, 1990).

III-1-1-4-La phosphorylation des protéines tau

Si l'hétérogénéité des protéines tau est due à l'existence de différentes isoformes, elle est accentuée par les modifications post-traductionnelles (phosphorylation). Par analyse bidimensionnelle, environ vingt protéines sont détectées avec des points isoélectriques (pI) compris entre 6,5 et 8,5 (Cleveland *et al.*, 1977a,b). L'état de phosphorylation régulerait la liaison des protéines tau aux microtubules (Cleveland *et al.*, 1977a,b). Ainsi, le site de la Ser₂₆₂ (selon la numérotation de l'isoforme contenant 441 acides aminés) serait particulièrement impliqué dans cette liaison (Biernat *et al.*, 1993). Les protéines tau déphosphorylées favorisent la polymérisation des microtubules (Lindwall et Cole, 1984; Drubin et Kirschner, 1986, Yamamoto *et al.*, 1988).

III-1-2-Les protéines tau durant la maladie d'Alzheimer

III-1-2-1-Description

De nombreuses équipes ont démontré par des techniques immunocytochimiques (Brion *et al.* 1985; Nukina et Ihara, 1986; Delacourte et Défossez, 1986; Kosik *et al.*, 1986; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986a), et biochimiques (Wischik *et al.*, 1988 a,b; Kondo *et al.*, 1988) que les protéines tau sont les constituants majeurs des PHF. L'analyse sur gel de polyacrylamide permet de constater qu'elles ont une mobilité électrophorétique ralentie comparativement aux protéines tau normales. Un triplet de protéines tau pathologiques a été mis en évidence dans des homogénats de tissu cérébral autopsique de patients atteints de maladie d'Alzheimer (Delacourte *et al.*, 1989; 1990; Flament *et al.*, 1989; Ksiezak-Reding *et al.*, 1990; Greenberg et Davies, 1990). Il s'agit des protéines tau 55, tau 64 et tau 69 (en référence à leur masse moléculaire respective). De plus, l'analyse bidimensionnelle permet de constater que les protéines tau pathologiques sont plus acides que les protéines tau normales avec des points isoélectriques variant entre 5,5 et 6,5 (Ksiezak-Reding *et al.*, 1992). Les protéines tau pathologiques sont incapables de se lier aux microtubules (Iqbal *et al.*, 1986), sont particulièrement insolubles et s'agrègent pour former les PHF.

III-1-2-2-Hypothèse de la phosphorylation anormale

Depuis 1986, une phosphorylation anormale des protéines tau est suggérée durant la maladie d'Alzheimer (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986b; Ihara *et al.*, 1986, Flament *et al.*, 1989). L'augmentation de la masse moléculaire, ainsi que l'acidité accrue du point isoélectrique des protéines tau pathologiques, seraient dues à une hyperphosphorylation (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986b; Flament *et al.*, 1989; Delacourte *et al.*, 1990; Goedert *et al.*, 1992a). L'origine du triplet de protéines tau pathologiques résulterait ainsi de la phosphorylation de l'ensemble des 6 variants tau (Goedert *et al.*,

1992a). De nombreux sites de phosphorylation "anormale" ont été découverts sur les protéines tau pathologiques par spectrométrie de masse (Hasegawa *et al.*, 1992; Morishima-Kawashima *et al.*, 1995) ou grâce à l'utilisation d'anticorps dépendants de la phosphorylation (Mercken *et al.*, 1992; Goedert *et al.* 1994). Ces sites de phosphorylation "anormale" sont pour la plupart situés de part et d'autre des régions de liaison aux microtubules. Vingt et un sites de phosphorylation ont ainsi été décrits dont 11 sont de type Ser/Thr-Pro et 10 de type non Ser/Thr-Pro (Morishima-Kawashima *et al.*, 1995). Connaissant les sites de phosphorylation, les kinases impliquées ont pu être soupçonnées par des études de phosphorylation *in vitro*. Il s'agit de kinases dirigées contre des motifs Ser-Pro ou Thr-Pro, incluant les MAP kinases (Drewes *et al.*, 1992), la "glycogen synthase kinase-3" ou GSK3 (Hanger *et al.*, 1992), ou les kinases dépendantes des cyclines (Ledesma *al.*, 1992). La protéine kinase responsable de la phosphorylation anormale des protéines tau pathologiques n'a pas encore été identifiée. Toutefois, la phosphorylation des protéines tau dépend également de l'activité des phosphatases (Goedert *et al.*, 1992b; Gong *et al.*, 1993) et résulterait alors de la balance des activités kinasiques et phosphatasiques.

III-1-2-3-Hypothèse de la phosphorylation normale

Récemment, Matsuo et coll. démontrèrent que certains sites de phosphorylation "anormale" des protéines tau pathologiques étaient retrouvés sur les protéines tau provenant de biopsies de sujets sains, après un délai *post-mortem* court voire nul (Matsuo *et al.*, 1994). L'étude immunochimique réalisée avec des anticorps monoclonaux dépendants de la phosphorylation révèle ainsi la présence d'un triplet de protéines tau hyperphosphorylées, similaire à celui des protéines tau pathologiques. Ceci remettrait-il en cause l'hyperphosphorylation des protéines tau pathologiques?

III-1-2-4-Différences entre protéines tau pathologiques et tau biopsiques

Une étude cinétique a démontré que l'hyperphosphorylation des protéines tau biopsiques de sujets sains disparaît très rapidement lors de délais *post-mortem* supérieurs à 2 heures. Cette déphosphorylation des protéines tau, constatée également chez le rat, est provoquée par les phosphatases endogènes restées très actives (Mawal-Dewan et al., 1994; Buée-Scherrer et al., 1996). Le tissu cérébral autopsique obtenu après des délais post-opératoires bien souvent supérieurs à 2 heures ne permettait donc pas de constater cette phosphorylation des protéines tau chez les sujets sains. Toutefois la phosphorylation des protéines tau normales biopsiques n'est pas identique à celle des protéines tau pathologiques: i) l'analyse par électrophorèse bidimensionnelle montre que les protéines tau pathologiques sont plus acides, résultant probablement d'une phosphorylation plus importante (Sergeant *et al.*, 1995); ii) un anticorps monoclonal dépendant de la phosphorylation (AT100) ne détecte aucun triplet dans les biopsies. Ceci indique que certains sites de phosphorylation sont donc spécifiques des protéines tau pathologiques (Matsuo *et al.*, 1994).

Pourquoi les protéines tau pathologiques restent-elles phosphorylées? Plusieurs hypothèses sont avancées: une inactivité phosphatasique, une inaccessibilité des PHF aux phosphatases, une conformation spécifique des protéines tau pathologiques pourraient expliquer la protection des PHF vis à vis des phosphatases.

III-2-La substance amyloïde

III-2-1-Le peptide amyloïde ou peptide A β

Le peptide A β est un peptide de 39 à 43 acides aminés. Il est le constituant principal de tous les dépôts de substance amyloïde (Glennner et Wong, 1984 a,b; Masters *et al.*, 1985). Sa séquence primaire est la suivante:

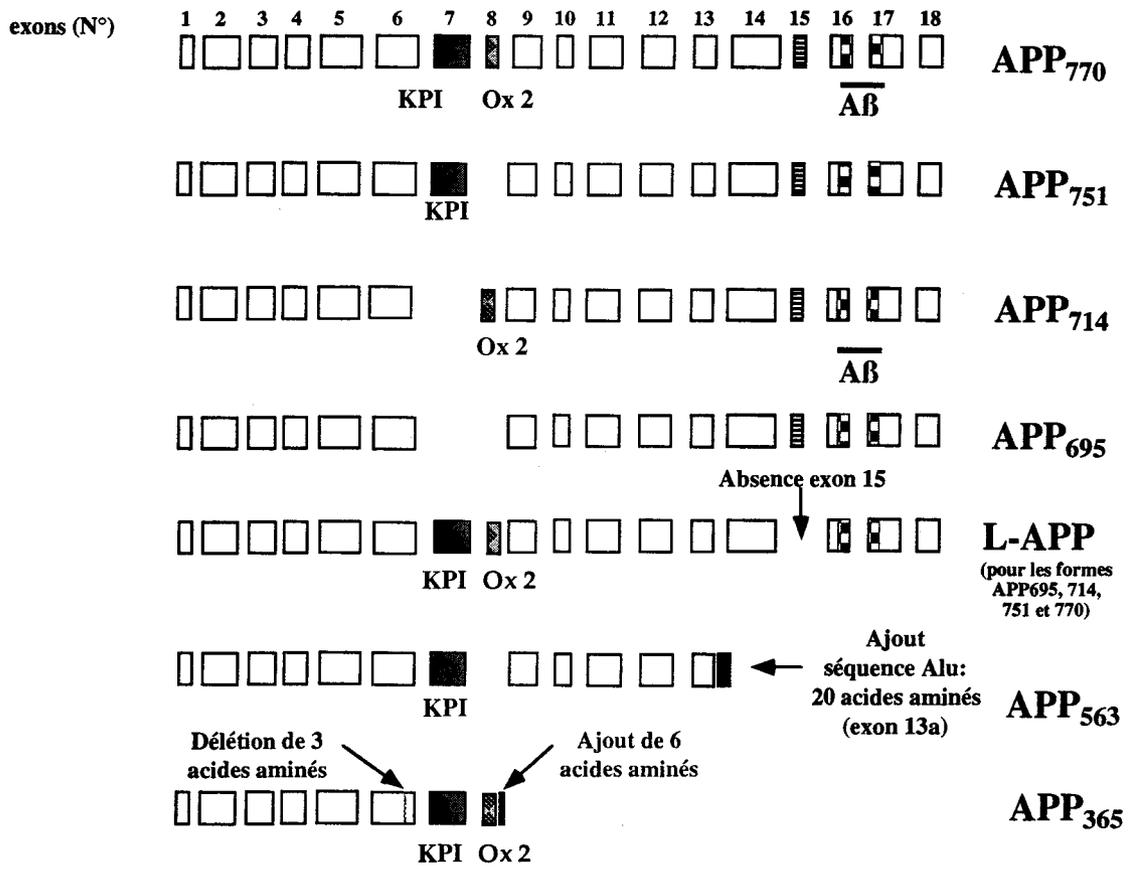
ASP₁-ALA-GLU-PHE-ARG-HIS-ASP-SER-GLY-TYR-GLU-VAL-HIS-HIS-GLN-LYS₁₆-LEU₁₇-
VAL-PHE-PHE-ALA-GLU-ASP-VAL-GLY-SER-ASN-LYS₂₈-GLY-ALA-ILE-ILE-GLY-LEU-
MET-VAL-GLY-GLY-VAL-VAL-ILE-ALA-THR₄₃.

Le peptide A β fait partie d'un précurseur de taille beaucoup plus importante nommé APP pour *amyloid precursor protein* (Kang *et al.*, 1987).

III-2-1-1-Le précurseur du peptide amyloïde (APP)

La connaissance de la séquence du peptide A β a permis, par des techniques de biologie moléculaire, de localiser le gène de l'APP sur le chromosome 21, à la limite de la région 21q21.3 et 21q22.1 (Kang *et al.*, 1987; Tanzi *et al.*, 1987, Goldgaber *et al.*, 1987; Robakis *et al.*, 1987). Le gène APP comporte 19 exons (Lemaire *et al.*, 1989) et a une taille de 400 kpb. Six ARNm différents sont générés par épissage alternatif. Ils donnent naissance après traduction, aux APP₃₆₅, 563, 695, 714, 751, 770. Un autre mode d'épissage décrit essentiellement dans les leucocytes et les cellules microgliales conduit aux L-APP qui se distinguent respectivement des ARNm des APP₆₉₅, 714, 751 et 770 par une délétion de l'exon 15 (König *et al.*, 1992) (**Figure 6**).

FIGURE 6



A) Les différentes isoformes de l'APP

-APP 695

L'APP₆₉₅ est l'isoforme majoritaire du système nerveux central (Tanaka *et al.*, 1988; Mita *et al.*, 1989; Golde *et al.*, 1990; Kang et Müller-Hill, 1990). L'ARNm de l'APP₆₉₅ comprend 16 exons (**Figure 6**). Le domaine extracellulaire possède une région riche en cystéine, un domaine anionique (riche en acides aminés acides: Glu, Asp) et deux sites de N-glycosylation (Kang *et al.*, 1987). Le peptide Aβ est codé en partie par les codons 16 et 17 (Lemaire *et al.*, 1989). Il est à la fois extracellulaire (pour les 28 premiers acides aminés) et transmembranaire (pour les 15 derniers).

-APP 714, 751 et 770

Ces isoformes possèdent les mêmes régions que l'APP₆₉₅. Toutefois, ils se distinguent dans la partie extracellulaire, par la présence de certains domaines codés par des exons supplémentaires. Ainsi, les isoformes APP₇₁₄ et APP₇₇₀ possèdent un domaine long de 19 acides aminés, analogue à un antigène lymphocytaire OX-2 (Kitaguchi *et al.*, 1988; Golde *et al.*, 1990). Une région spécifique (KPI) comprenant 56 acides aminés est retrouvée chez les isoformes APP₇₅₁ et APP₇₇₀ (Ponte *et al.*, 1988; Tanzi *et al.*, 1988; Kitaguchi *et al.*, 1988) (**Figure 6**). Ce domaine est homologue aux inhibiteurs de protéases à sérine de type Kunitz (ITI, UTI).

-APP 365 et 563

Ces isoformes ne possèdent pas la région transmembranaire (comprenant le peptide Aβ). L'APP₃₆₅ correspond à la forme sécrétée de l'APP₇₇₀ avec, dans sa partie extracellulaire la présence des domaines KPI et OX-2 (Jacobsen *et al.*, 1991). L'APP₅₆₃ correspond à l'APP₇₅₁ dont la partie C-terminale et la région transmembranaire ont été remplacées par une insertion d'une vingtaine d'acides aminés homologues à la famille Alu repeat (De Sauvage et Octave, 1989). Les deux isoformes APP₅₆₃ et APP₇₅₁ ne contiennent pas le peptide Aβ et ne sont donc pas amyloïdogéniques.

-APLP1 et APLP2

L'APP appartient à une importante famille de protéines incluant les *amyloid precursor-like protein 1 et 2* ou APLP1 (Wasco *et al.*, 1992) et APLP2 (Wasco *et al.*, 1993; Slunt *et al.*, 1994). Les APLP1 et 2 sont les produits de gènes situés respectivement sur les chromosomes 19 et 11. Ils possèdent une très forte homologie de séquence avec l'APP au niveau des régions N-terminales et intracytoplasmiques. Par contre, ils ne sont pas amyloïdogéniques puisqu'ils se différencient de l'APP dans la région du peptide A β (Wasco *et al.*, 1992, 1993).

B) Distribution tissulaire

Des études en Northern-blot ont montré l'existence d'ARNm de l'APP dans le cerveau, mais aussi dans de nombreux tissus périphériques (rein, cœur, rate, pancréas, muscle, langue, thymus, intestin, foie) (Tanzi *et al.*, 1987; Goldgaber *et al.*, 1987; Robakis *et al.*, 1987). L'APP₆₉₅ est retrouvé de façon majoritaire dans le système nerveux central (Golde *et al.*, 1990; Tanaka *et al.*, 1991). Par contre, les isoformes APP₇₅₁ et APP₇₇₀ sont préférentiellement exprimées au sein des tissus périphériques (Neve *et al.*, 1988, Golde *et al.*, 1990). Des études d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie ont montré que la principale source d'APP dans le système nerveux central provient des neurones (Card *et al.*, 1988; Neve *et al.*, 1988). Toutefois, l'APP est également exprimé par les astrocytes (Mita *et al.*, 1989; Siman *et al.*, 1989) et est retrouvé également au niveau de la membrane basale des vaisseaux cérébraux (Haass *et al.*, 1994a).

C) Structure de l'APP

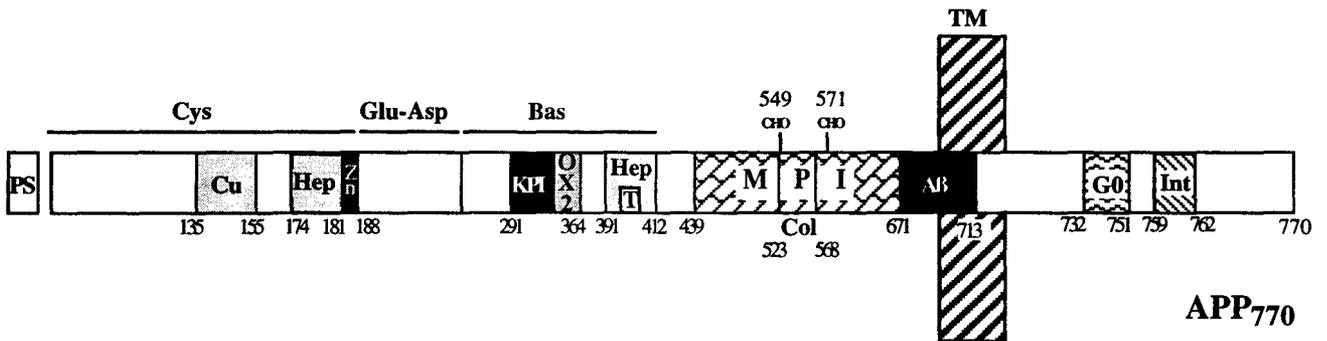
La structure de l'APP évoque celle d'une glycoprotéine membranaire d'environ 110-135 kDa (Selkoe *et al.*, 1988), présentant de part et d'autre d'un segment transmembranaire, une région extracellulaire et un cours domaine intracytoplasmique (Kang *et al.*, 1987; Younkin, 1991) (**Figure 7**).

Outre le peptide signal (séquence de 18 acides aminés), la partie extracellulaire contient une région riche en cystéine pouvant fixer le cuivre (Hesse *et al.*, 1994) [séquence 135-155] (selon la numérotation de l'APP₇₇₀), et le zinc [181-188] (Bush *et al.*, 1993). Après une séquence anionique riche en acides aminés acides (Glu-Asp), on trouve une région basique contenant les régions KPI et OX-2. Dans cette région figure également une séquence qui serait impliquée dans l'activité trophique de l'APP [403-407] (Ninomiya *et al.*, 1993). Une région homologue aux inhibiteurs de métalloprotéases [439-671] a également été identifiée (Miyazaki *et al.*, 1993). Deux sites de fixation à l'héparine ([174-185] et [391-412]) et 1 site de fixation du collagène [523-540] sont présents dans la partie extracellulaire (Small *et al.*, 1994; Multhaup, 1994; Behr *et al.*, 1996). Enfin, Il faut noter la présence de deux sites de N-glycosylation (CHO) [Asn₅₄₂ et Asn₅₇₁] (Kang *et al.*, 1987) (**Figure 7**).

La partie intracytoplasmique comporte la séquence [N₇₅₉ P T Y₇₆₂] permettant à l'APP d'être internalisé via les puits de clathrine (Haass *et al.*, 1992a; Kosik, 1992). Enfin, la séquence [732-751] permettrait l'interaction de l'APP avec les protéines G₀ fixant le GTP (Nishimoto *et al.*, 1993).

Le peptide A β se situe à la fois dans la partie extracellulaire et intramembranaire [671-713]. Il possède la séquence RHDS dans sa partie N-terminale [5-8], homologue à la séquence RGDS des protéines d'adhésion cellulaire (Ghiso *et al.*, 1992). Les autres régions seront plus spécifiquement développées dans le chapitre consacré au peptide A β .

FIGURE 7



APP770

- Cys: riche en résidus cystéine
- Glu-Asp: riche en acides aminés acides
- Bas: riche en acides aminés basiques
- Cu: Fixation du cuivre [135-155]
- Hep: Fixation de l'héparine ([174-185] et [391-412])
- Zn: Fixation du zinc [181-188]
- KPI: région homologue aux inhibiteurs de type Kunitz [291-346]
- OX2: région homologue à l'antigène lymphocytaire OX2 [346-364]
- T: région impliquée dans l'activité trophique de l'APP [403-407]
- MPI: région homologue aux inhibiteurs de métalloprotéases [439-671]
- CHO: 2 sites de N-glycosylation
- TM: région transmembranaire
- G0: interaction avec les protéines G0 [732-751]
- Int: Internalisation via la séquence [N₇₅₉PTY₇₆₂]
- PS: peptide signal

D) Modifications post-traductionnelles

L'APP est sulfaté au niveau de certains résidus de tyrosine (Schubert *et al.*, 1989). C'est en outre une protéine sialylée, N- et O-glycosylée (Dyrks *et al.*, 1988; Weideman *et al.*, 1989). En effet, ce pourrait être un protéoglycane de type héparane sulfate (Schubert *et al.*, 1988) ou chondroïtine sulfate (Shioi *et al.*, 1992). Les isoformes APP qui présentent une délétion de l'exon 15 (L-APPs), possèdent un site de O-glycosylation de type chondroïtine sulfate. Ce site de O-glycosylation [ExSG], situé à 16 acides aminés en amont du peptide A β , constitue une séquence "signal" qui apparaît à la suite de la fusion des exons 14 et 16 (Pangalos *et al.*, 1995).

En outre, des sites potentiels de phosphorylation *in vitro* ont été déterminés au niveau des résidus Ser₆₅₅, Thr₆₅₄ et Thr₆₆₈ (selon la numérotation de l'APP₆₉₅) (Gandy *et al.*, 1988, Buxbaum *et al.*, 1990; Caporaso *et al.*, 1992, Suzuki *et al.*, 1992, Cruz E Silva *et al.*, 1993). Récemment, d'autres sites de phosphorylation *in vivo* ont été déterminés aux niveau des résidus de sérine situés dans la région extracytoplasmique [195-375] de l'APP (Hung et Selkoe, 1994).

E) Métabolisme

La longueur totale du peptide A β comprend 43 acides aminés. Néanmoins, de nombreux fragments de peptide A β tronqués du côté N- et C-terminal ont été décrits au sein des dépôts amyloïdes (**Figure 8**). A l'heure actuelle, nous ne connaissons pas le mécanisme qui mène à la formation de tels fragments. Néanmoins, durant le métabolisme de l'APP, 3 sites de clivage ont été démontrés au voisinage ou à l'intérieur du peptide A β (**1, 2, 3 Figure 8**) (pour revue voir Checler, 1995).

FIGURE 8

Les sites de coupure du peptide A β



1: site de clivage de la β sécrétase

2: site de clivage de l' α sécrétase

3: sites de clivage de la γ sécrétase

-petites flèches: autres sites de coupure déterminés (Miller *et al.*, 1993)

Deux voies métaboliques ont ainsi été décrites:

-Selon la voie amyloïdogénique, le peptide A β entier est retrouvé dans le milieu extérieur et est donc susceptible de s'accumuler au sein des dépôts amyloïdes.

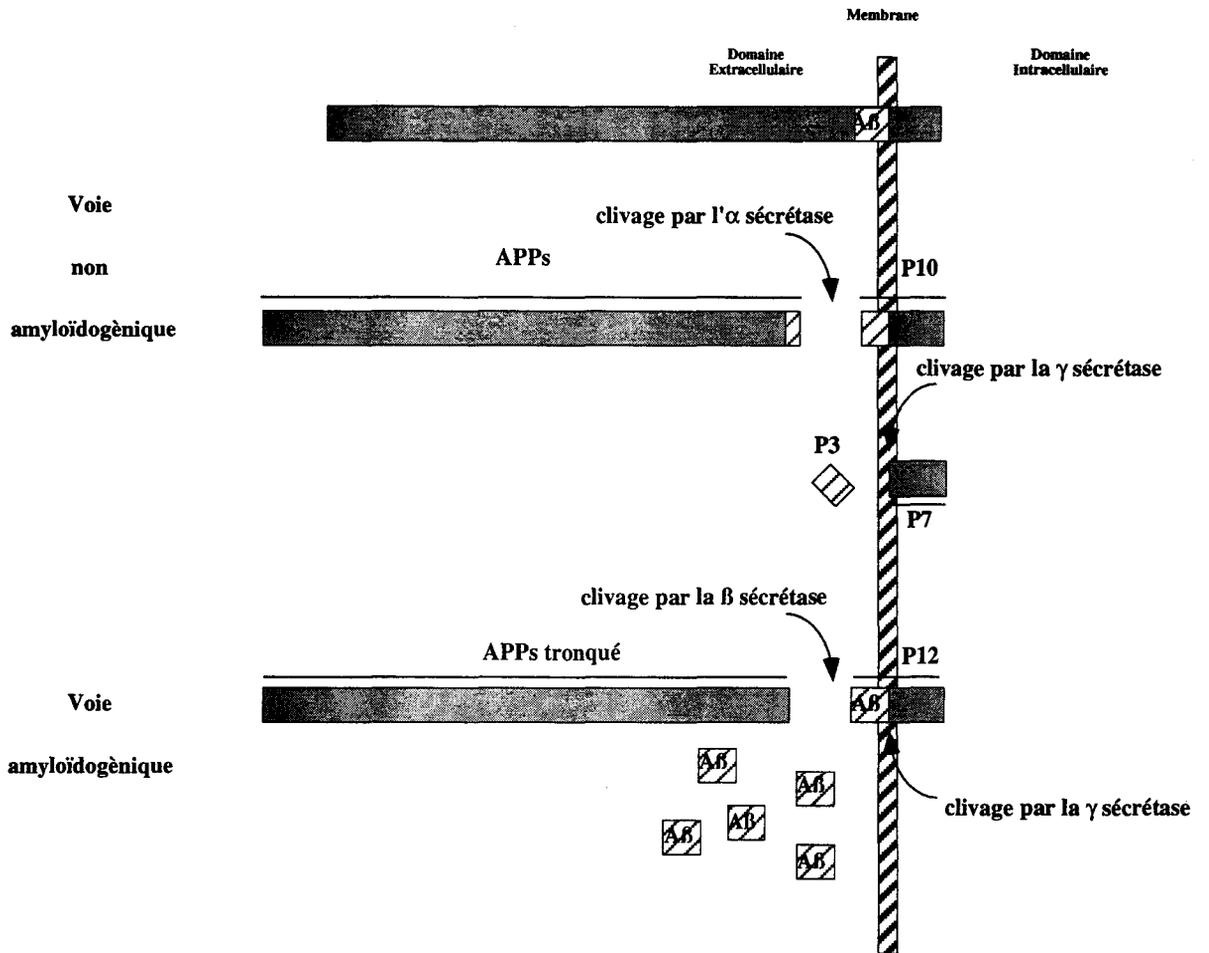
-Selon la voie non amyloïdogénique, le clivage de l'APP se situe cette fois-ci à l'intérieur du peptide A β et son accumulation sous sa forme entière devient dès lors impossible.

1-Le clivage par l' α sécrétase

Le site de clivage de l' α sécrétase se situe au niveau de la liaison 'Lys₁₆-Leu₁₇' du peptide A β (Esch *et al.*, 1990). L'APP génère alors un fragment N-terminal soluble de l'APP (APPs) et un fragment C-terminal membranaire de 10-11 kDa (P10) (**Figure 9**).

Ce clivage se produirait dans un compartiment acide non lysosomal tel que le réseau Trans golgien (TGN pour *trans golgi network*) ou dans un autre compartiment tardif du golgi (Sambamurti *et al.*, 1992; De Strooper *et al.*, 1993). Toutefois, ce clivage pourrait également s'effectuer au niveau de la membrane plasmique. En effet, des

FIGURE 9



fragments APPs ont été détectés dans le milieu de cellules dont les protéines membranaires avaient été préalablement marquées à l'iode ou à la biotine (Nordstedt *et al.*, 1993; Sahasrabudhe *et al.*, 1992; Haass *et al.*, 1992a). Une étude a démontré dans un système de cellules COS-1 transfectées, qu'un APP sans domaine d'inclusion membranaire ne peut-être clivé par l' α -sécrétase (Sisodia, 1992). Un autre schéma propose que l'APP entier atteigne la surface cellulaire, soit réinternalisé puis emprunte la voie endosome-lysosome pour être dégradé par des cystéines-protéases lysosomiales.

-Les enzymes α -sécrétases candidates

Plusieurs enzymes à activité α -sécrétase-like sont proposées: la cathepsine B (Tagawa *et al.*, 1991), une métalloprotéase de 105-120 kDa (Mc Dermott et Gibson, 1991) ou un complexe multicatalytique (Kojima et Omori, 1992). Des α -sécrétases "membranaires", extraites de lignées cellulaires, de cerveau humain ou de rat ont également été décrites. Il s'agit d'une métalloprotéinase dépendante du calcium (Allsop *et al.*, 1991), de l'endopeptidase 3.4.24.11 (Marks *et al.*, 1994), d'une protéase à activité acétylcholinestérasique (Small *et al.*, 1991) et enfin d'une métallopeptidase membranaire (Roberts *et al.*, 1994).

2-Le clivage par la β -sécrétase

Durant la voie amyloïdogénique, le clivage de l'APP par la β -sécrétase, se produit en amont du peptide A β , au niveau de la liaison Met₆₇₁-Asp₆₇₂ (Mori *et al.*, 1992; Haass *et al.*, 1992b, Seubert *et al.*, 1992). Le clivage provoque donc la formation d'un fragment de 12-13 kDa (P 12) contenant le peptide A β en entier (Figure 9).

Deux hypothèses sont formulées sur la localisation cellulaire du clivage de l'APP par la β -sécrétase. Ce clivage pourrait se produire dans un compartiment acide tardif du golgi (Shoji *et al.*, 1992; Busciglio *et al.*, 1993a; Haass *et al.*, 1993) ou dans un autre compartiment subcellulaire après réinternalisation. Le fragment amyloïdogénique serait alors libéré par exocytose (Koo et Squazzo, 1994).

-Les enzymes β -sécrétases candidates:

De nombreuses protéases ayant une activité " β -sécrétase-like" ont été désignées: la cathepsine G (Sahasrabudhe *et al.*, 1993), la cathepsine D (Dreyer *et al.*, 1994, Chevallier *et al.*, 1995), la clipsine qui a une activité "chymotrypsine like" (Nelson et Siman, 1990), l'endopeptidase 3.4.24.15 (Mc Dermott *et al.*, 1992), des protéases dépendantes du calcium (Abraham *et al.*, 1991; Razzaboni *et al.*, 1992), des métalloprotéases (Schönlein *et al.*, 1994), un complexe multicatalytique (Ishiura *et al.*, 1989) ainsi que l'APP lui même (Papastoitsis *et al.*, 1994).

3-Le clivage par la γ -sécrétase

Le site de clivage de la γ -sécrétase se situe niveau de la région [Val₃₉-Ala₄₂(Thr₄₃)] du peptide A β (Figure 9). Durant la voie amyloïdogénique, la γ -sécrétase coupe le fragment de 12-13 kDa (généralisé par la β -sécrétase) pour libérer le peptide A β . Cependant une activité de type γ sécrétase est également constatée durant la voie non amyloïdogénique de l'APP. Ainsi, le fragment P10 (provenant du clivage par l' α sécrétase) donnera les fragments P3 (séquence 17-42(43) du peptide A β ou A β ₁₇₋₄₂) et P7 (Figure 9). Le site de clivage de la γ sécrétase varie beaucoup et des peptides A β de longueur variant entre 39 et 42 (43) acides aminés pourront ainsi être générés.

La localisation subcellulaire de la γ -sécrétase se situerait dans un compartiment proche de la membrane plasmique (Haas *et al.*, 1993).

Peu de données sont parues sur l'identité possible de la γ -sécrétase mis à part une proline endopeptidase qui aurait une activité γ -sécrétase like (Ishiura *et al.*, 1990).

F) Régulation

La protéine kinase C (PKC) régule le métabolisme de l'APP selon la voie non amyloïdogénique (Caporaso *et al.*, 1992; Hung *et al.*, 1993, Dyrks *et al.*, 1994; Buxbaum *et al.*, 1994). L'activation de la PKC par des esters de phorbol (PDBu ou PMA) dans de nombreux modèles cellulaires provoque une augmentation significative de la libération du fragment APPs (Caporaso *et al.*, 1992; Slack *et al.*, 1993; Dyrks *et al.*, 1994). La PKC interviendrait sur le trafic intracellulaire de l'APP ou sur l'activation de sécrétases phospho-dépendantes impliquées dans son métabolisme (Hung et Selkoe, 1994). Le métabolisme de l'APP est régulé également par la phospholipase C (PLC), couplée par l'intermédiaire des protéines G, aux récepteurs muscariniques de type M1 et M3. En effet, la stimulation des récepteurs muscariniques par des agonistes cholinergiques (Acétylcholine, Carbachol) favorise la voie non amyloïdogénique de l'APP (Nitsch *et al.*, 1992; Buxbaum *et al.*, 1994).

L'acide okadaïque, inhibiteur des phosphatases 1 et 2A, induit une augmentation de la sécrétion de l'APPs. Ceci suggère que le métabolisme de l'APP est dépendant des équilibres de la phospho-déphosphorylation (Caporaso *et al.*, 1992).

Enfin, la voie non amyloïdogénique est également favorisée par l'administration de drogues qui agissent sur la concentration intracellulaire de calcium $[Ca^{2+}]_i$ (Buxbaum *et al.*, 1994), d'agents telles que les interleukines (IL-1; IL-1 β) ou les œstrogènes (17 β -œstradiol) (Vasilakos *et al.*, 1994; Buxbaum *et al.*, 1992; Jaffe *et al.*, 1994).

Il a été démontré que le taux d'expression de l'APP augmente après un stress cellulaire (choc thermique) ou une ischémie (Abe *et al.*, 1991a, b), et qu'un inhibiteur de l'acétylcholinestérase, la tacrine, favoriserait plutôt la formation de fragments amyloïdogéniques (Lahiri *et al.*, 1994).

G) Rôles de l'APP

Le rôle exact de l'APP n'est actuellement pas connu. Cependant, l'existence de certains domaines suggère un rôle de l'APP dans la coagulation, la croissance cellulaire ainsi que dans les interactions cellule-cellule.

1-Régulation de la coagulation et Inhibiteur de protéases

La forme soluble (APPs) des isoformes contenant le domaine KPI (APP₇₅₁ et APP₇₇₀) est identifiée comme la protéase nexine II (PNII) (Oltersdorf *et al.*, 1989; Van Nostrand, 1989). Elle présente des homologies avec l'inhibiteur du facteur de coagulation XIa (Smith *et al.*, 1990) et pourrait donc intervenir dans la régulation de la coagulation ou dans l'agrégation des plaquettes (Smith *et al.*, 1990, Bush *et al.*, 1990). De plus, la fixation du Zinc (Zn²⁺) au niveau du domaine [181-188] potentialise l'effet inhibiteur sur le facteur de coagulation XIa (Bush *et al.*, 1993).

Des études *in vitro* ont montré que la séquence [439-671] de l'APPs est inhibitrice de métalloprotéases. L'APP pourrait donc avoir un rôle dans la régulation de la protéolyse au niveau de la matrice extracellulaire (Miyazaki *et al.*, 1993).

2-Neuroprotection et croissance cellulaire

L'APPs des isoformes APP₆₉₅ et APP₇₅₁ aurait un rôle neuroprotecteur vis à vis de l'excitotoxicité du glutamate. Ceci a été démontré sur des cultures de neurones d'hippocampe de rat et de cortex humain. En outre, elle limiterait également l'augmentation du calcium intracellulaire suite à un choc hypoglycémique (Mattson *et al.*, 1993 a,b) et posséderait une séquence impliquée dans la croissance cellulaire (Saitoh *et al.*, 1989, Ninomiya *et al.*, 1993).

3-Interaction cellulaire, croissance neuritique...

L'APP membranaire présenterait également des fonctions bien précises. Ainsi, la séquence RHDS du peptide A β pourrait conférer à l'APP un rôle dans les processus

d'interactions cellulaires (Ghiso *et al.*, 1992). De plus, Il a été démontré que l'APP pouvait favoriser la croissance neuritique (Qiu *et al.*, 1995). Enfin, la détection de l'APP au niveau de la membrane plasmique des synapses (Shimegatsu *et al.*, 1992; Shimokawa *et al.*, 1993) pourrait rendre compte d'un rôle au niveau des fonctions synaptiques.

III-2-1-2-Le peptide amyloïde (A β)

A) Propriétés physicochimiques

Le peptide amyloïde ou peptide A β est le constituant principal des dépôts de substance amyloïde (Glennner et Wong, 1984a,b; Masters *et al.*, 1985). L'analyse biochimique du peptide A β est particulièrement difficile du fait de son insolubilité vis à vis des détergents classiques (Glennner et Wong, 1984a,b; Masters *et al.*, 1985). Il peut être partiellement solubilisé par le phénol et par des agents dénaturants (chlorhydrate de guanidine ou thiocyanate de guanidinium) à forte concentration (6M). Néanmoins, sa solubilisation complète ne peut être obtenue que par l'utilisation d'acide formique à 70% ou 100% (Masters *et al.*, 1985).

B) Structure

L'analyse de la substance amyloïde par la méthode de diffraction des rayons X montre que le peptide A β agrégé adopte une conformation en feuillets β plissés antiparallèles (Kirschner *et al.*, 1986; Halverson *et al.*, 1990). La séquence hydrophile N-terminale [1-28] révèle, par RMN et dichroïsme circulaire, une structure monomérique α -hélicoïdale aux pH acides (pH < 4) et basiques (pH > 7). Aux pH physiologiques, le peptide A β ₁₋₂₈ s'agrège et adopte une structure oligomérique en feuillets β (Barrow et Zagorski, 1991). Par contre, la partie C-terminale [29-42],

constituée d'acides aminés très hydrophobes, s'agrège indépendamment des conditions de solvant, de pH et de température (Barrow et Zagorski, 1991).

C) Agrégation du peptide A β

Le peptide A β ₁₋₄₂ est très insoluble et s'agrège spontanément à 37 °C en solution aqueuse (Burdick *et al.*, 1992). Il a été démontré que l'agrégation du peptide A β provient d'interactions hydrophobes inter- et intramoléculaires (Hilbich *et al.*, 1991). La partie C-terminale hydrophobe [34-42] ainsi que certains résidus d'acides aminés (His¹³, His¹⁴ et Asp²³) ont un rôle prépondérant pour l'agrégation du peptide A β (Halverson *et al.*, 1990; Fraser *et al.*, 1995; Tomiyama *et al.*, 1994).

La solubilité du peptide A β dépend du pH, de la température et de la concentration peptidique (Halverson *et al.*, 1990; Burdick *et al.*, 1992; Snyder *et al.*, 1994) et elle est défavorisée en présence de fortes concentrations salines (Hilbich *et al.*, 1991).

Enfin, de nombreuses équipes ont montré que le peptide A β sous sa forme agrégée est neurotoxique (Pike *et al.*, 1991; Busciglio *et al.*, 1992; Mattson *et al.*, 1993c; Ueda *et al.*, 1994a)

D) Propriétés biologiques du peptide A β

1- Caractère neurotoxique-neurotrophique

Kowall et coll. ont provoqué *in vivo* la formation de lésions neurofibrillaires chez des rats et des vieux primates après injection de peptide A β (Kowall *et al.*, 1991, 1992). Frautschy et coll. ont obtenu des résultats similaires chez le rat à partir de substance amyloïde purifiée (Frautschy *et al.*, 1991). De tels résultats n'ont pas toujours été confirmés (Games *et al.*, 1992; Podlisny *et al.*, 1992). La plupart des données

concernant la neurotoxicité du peptide A β ont été obtenues *in vitro* à partir de cultures primaires de neurones ou de lignées cellulaires.

-Caractère neurotrophique

Aux faibles concentrations (entre 1nM et 10 μ M), le peptide A β a un effet neurotrophique, caractérisé par une augmentation de la survie neuronale et de la croissance neuritique (Whitson *et al.*, 1989, 1990; Pike *et al.*, 1991). L'activité neurotrophique du peptide A β a été démontrée sur des cultures primaires d'hippocampe de rat, incubée en présence d'A β ₁₋₂₈ (Whitson *et al.*, 1989) ou de fragments A β ₁₋₄₀ et A β ₁₋₃₈ (Yankner *et al.*, 1990).

-Caractère neurotoxique

A des concentrations plus importantes (10-100 μ M), Le peptide A β agrégé a démontré des effets neurotoxiques sur des cultures de neuroblastomes humains ou de pheochromocytomes de rats (PC12) (Zhang *et al.*, 1994; Behl *et al.*, 1994a; Shearman *et al.*, 1994). La séquence [25-35] a été définie comme la séquence neurotoxique (Yankner *et al.*, 1990). Il a été démontré que le peptide A β potentialise l'effet excitotoxique du glutamate (Mattson *et al.*, 1992) ou celui consécutif à une privation en glucose (Copani *et al.*, 1991).

-Site d'action et mécanisme de neurotoxicité

Si la neurotoxicité du peptide A β agrégé est une propriété établie, des questions subsistent toujours sur le(s) mécanisme(s) mis en jeu. Un processus d'endocytose (Knauer *et al.*, 1992) ou une action au niveau de récepteurs spécifiques tels que les récepteurs NK-1 (Yankner *et al.*, 1990; Cheung *et al.*, 1993) ou récepteurs de type SEC (serpin enzyme complex) (Joslin *et al.*, 1991) ont été incriminés dans le mécanisme de neurotoxicité du peptide A β . Une hypothèse plus récente suggère que le peptide A β pourrait s'intégrer dans la membrane et constituer un canal cationique peu sélectif (Arispe *et al.*, 1993a,b; Mirzabekov *et al.*, 1994).

Des expériences réalisées *in vitro* ont montré que le peptide A β augmente la conductance membranaire (Simmons *et al.*, 1993, Carette *et al.*, 1993), la concentration intraneuronale de calcium (Busciglio *et al.*, 1993b; Mattson *et al.*, 1992) et qu'il pourrait également engendrer la production de radicaux libres (Behl *et al.*, 1994b; Goodman *et al.*, 1994).

L'administration de peptide A β agrégé a provoqué, à partir de neurones d'hippocampe de rat embryonnaire et corticaux humains, une hyperphosphorylation des protéines tau (Takashima *et al.*, 1993; Busciglio *et al.*, 1995).

Des sites de liaison en rapport avec d'autres propriétés biologiques ont été caractérisés le long de la séquence primaire du peptide A β .

2-Liaison à l' α -1 antichymotrypsine (ACT)

Le peptide A β peut se lier *in vitro* à l'ACT. La région impliquée est une région homologue aux sérine-protéases de type serpine (trypsine, chymotrypsine): Ala -Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr (Potter *et al.*, 1991) (**Figure 10**).

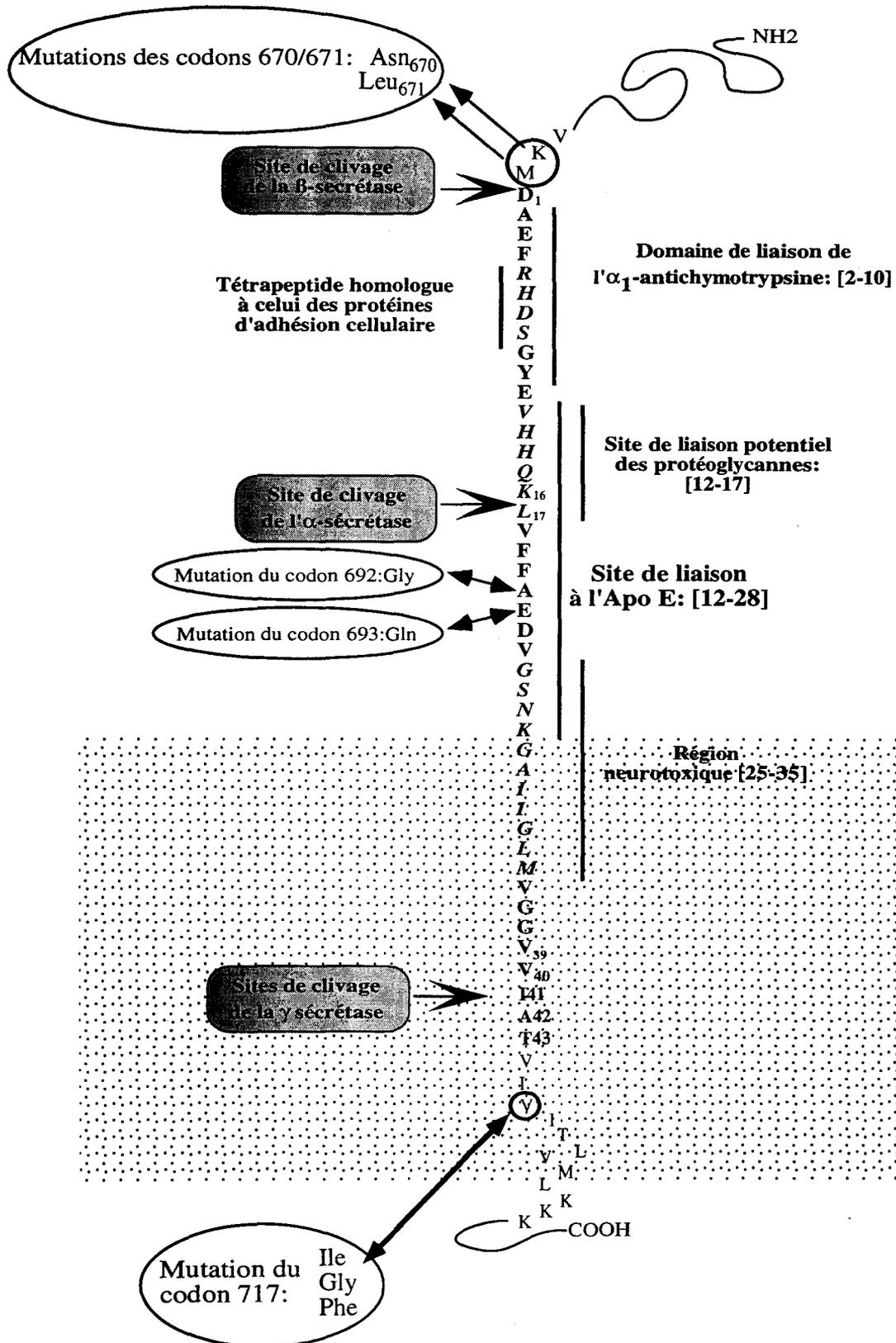
3-Activation de la cascade du complément

Le peptide A β peut interagir avec la protéine C1q et pourrait ainsi activer la cascade du complément selon la voie classique (Rogers *et al.*, 1992). Il semblerait que là encore, l'activation de ce processus soit dépendant de l'état d'agrégation du peptide A β (Jiang *et al.*, 1994).

4-Adhésion cellulaire et liaison à l'héparine

Deux sites laissent envisager un rôle possible du peptide A β dans l'adhésion cellulaire. D'une part, l'existence de la séquence térapeptidique [RHDS] homologue au peptide [RGDS] des protéines d'adhésion cellulaire, pourrait permettre l'interaction du

FIGURE 10



peptide A β avec un récepteur de type intégrine β 1 (Ghiso *et al.*, 1992) (Figure 10). D'autre part, la séquence [VHHQKL] peut se lier à l'héparine qui elle même aurait un rôle dans l'adhésion cellulaire (Cardin et Weintraub, 1989) (Figure 10). Le peptide A β pourrait également interagir avec les constituants de la matrice extracellulaire (la laminine et la fibronectine) pour favoriser la croissance neuritique (Koo *et al.*, 1993)

E) Hétérogénéité du peptide A β

La longueur totale du peptide A β comprend 42 à 43 acides aminés (Mori *et al.*, 1992; Roher *et al.*, 1993 a,b,c; Miller *et al.*, 1993). Toutefois de nombreux fragments A β tronqués au niveau des parties N- et C-terminale, ou présentant d'autres modifications ont été identifiés au sein des dépôts amyloïdes.

1-Modifications de la région carboxy-terminale

Des peptides correspondant aux résidus 1-39, 1-40 et 1-42 du peptide A β ont été décrits dans les dépôts amyloïdes (Masters *et al.*, 1985, Prelli *et al.*, 1988; Joachim *et al.*, 1988; Roher *et al.*, 1993 a,b,c, Miller *et al.*, 1993). Des anticorps monoclonaux et polyclonaux ont permis de distinguer les peptides intacts du coté C-terminal (A β ₄₂) de ceux tronqués (A β ₄₀) (Mak *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1994; Iwatsubo *et al.*, 1994; Yamaguchi *et al.*, 1995). Le peptide A β ₄₂ est retrouvé dans l'ensemble des dépôts amyloïdes et notamment dans les dépôts diffus (Yang *et al.*, 1994, Fukumoto *et al.*, 1996). Par contre, le peptide A β ₄₀ serait essentiellement retrouvé dans les dépôts amyloïdes des vaisseaux (Yamaguchi *et al.*, 1995, Suzuki *et al.*, 1994b) et au sein des plaques neuritiques plus matures (Iwatsubo *et al.*, 1994).

2-Modifications de la région Amino-terminale

Une hétérogénéité de la région N-terminale du peptide A β est également constatée (Roher *et al.*, 1993a; Miller *et al.*, 1993). Des peptides commençant par chacun des onze premiers acides aminés du peptide A β ont été identifiés au sein des dépôts amyloïdes (Masters *et al.*, 1985, Miller *et al.*, 1993). Le fragment p3 du peptide amyloïde (A β ₁₇₋₄₂) constituerait la forme majoritaire des dépôts diffus (Gowing *et al.*, 1994). Plus récemment, des fragments A β présentant un pyroglutamate à la place de l'acide glutamique en 3^{ème} position (A β _{N3} (pE)) ont également été identifiés (Saido *et al.*, 1995).

3-Autres modifications:

Certaines modifications du peptide A β favoriseraient son accumulation au sein des dépôts amyloïdes. Des études *in vitro* ont démontré que ces modifications provoquent la formation de fibres amyloïdes (Fabian *et al.*, 1994, Vitek *et al.*, 1994). Les résidus Asp¹ et Asp⁷ peuvent subir des racémisations et isomérisations en L-isoaspartyl (Roher *et al.*, 1993a). Par ailleurs, des fragments A β modifiés par des réactions de Maillard ou glycation (AGEs pour *advanced glycation end products*) ont été détectés au sein des dépôts amyloïdes (Vitek *et al.*, 1994).

De part la présence des résidus Gln¹⁵, Lys¹⁶ et Lys²⁸, le peptide A β pourrait être le substrat de la transglutaminase dépendante du calcium qui catalyserait la formation de liaisons covalentes ϵ -(γ -glutamyl) lysine (Rasmussen *et al.*, 1994).

F) Fragments A β et formation de l'amyloïde

A l'heure actuelle, nous ne savons pas si l'existence de fragments A β modifiés a une signification dans la formation des dépôts amyloïdes. Cependant, il semblerait que le peptide A β ₄₂ soit retrouvé dans les dépôts diffus, aux premiers stades de la formation

de l'amyloïde, tandis que le peptide A β ₄₀ s'agrègerait plus tardivement au sein des plaques séniles neuritiques "matures" (Mak *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1994; Fukumoto *et al.*, 1996). Ceci s'observe non seulement chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, mais également durant le syndrome de Down (Iwatsubo *et al.*, 1994; Murphy *et al.*, 1994) et le vieillissement normal (Fukumoto *et al.*, 1996, Teller *et al.*, 1996).

Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer l'incorporation tardive du peptide A β ₄₀ au sein des plaques séniles matures. Ainsi, le peptide A β ₄₂ plus insoluble, s'agrègerait tout d'abord et constituerait un "noyau" où viendrait ensuite s'accumuler l'A β ₄₀ plus soluble (Jarrett *et al.*, 1993). Une autre hypothèse impliquerait l'action des cellules microgliales associées aux plaques neuritiques. En effet, elles seraient soit responsables de la synthèse du peptide A β ₄₀, soit à l'origine d'une activité de type carboxy-peptidase qui provoquerait le clivage du peptide A β ₄₂ en peptide A β ₄₀ (Mann *et al.*, 1995; Fukumoto *et al.*, 1996).

III-2-2-Les autres constituants des dépôts amyloïdes

La proportion de peptide A β au sein des dépôts de substance amyloïde a été évaluée à 70% des protéines totales (Miller *et al.*, 1993). Si de nombreuses études *in vitro* ont montré que le peptide A β pouvait former spontanément des filaments amyloïdes, certaines protéines présentes au sein des plaques séniles ont pour effet d'accélérer le processus d'agrégation du peptide A β . Certaines d'entre-elles comme l'apolipoprotéine E, les protéoglycannes ou l' α 1-antichymotrypsine sont considérées comme des cofacteurs de l'amyloïdogenèse.

III-2-2-1-L'apolipoprotéine E (Apo E)

a) Données biochimiques

L'Apo E est une protéine ubiquitaire de 299 acides aminés, synthétisée principalement dans le foie où elle est impliquée dans le transport du cholestérol (Mahley, 1988). Dans le cerveau, l'ApoE est essentiellement synthétisée par les cellules gliales et a un rôle dans la croissance et la régénération neuronale (Ignatius *et al.*, 1986). Le gène de l'Apo E (APOE) est situé sur le bras long du chromosome 19 (19q13.2). Ce gène possède trois allèles ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$) dont les produits donneront respectivement les trois variants Apo E2, Apo E3 et Apo E4. La séquence peptidique de ces trois isoformes se différencie selon la présence de résidus cystéine et arginine aux positions 112 et 158. L'Apo E2 possède deux cystéines (Cys¹¹² et Cys¹⁵⁸), l'Apo E3 n'en possède qu'une seule (Cys¹¹² et Arg¹⁵⁸) et l'Apo E4 n'en a aucune (Arg¹¹² et Arg¹⁵⁸). Si l'Apo E4 existe exclusivement sous la forme de monomères, l'Apo E2 et E3 peuvent se polymériser par le biais de ponts disulfures (Strittmatter *et al.*, 1993b).

b) Apo E et amyloïde

L'Apo E a été détectée dans l'ensemble des dépôts amyloïdes extracellulaires (dépôts préamyloïdes, plaques séniles, angiopathie amyloïde) (Namba *et al.*, 1991; Wisniewski et Frangione, 1992). Une augmentation significative du nombre de dépôts amyloïdes a été constatée chez des sujets présentant au moins un allèle $\epsilon 4$ (Schmechel *et al.*, 1993; Berr *et al.*, 1994). Une liaison de forte avidité a été démontrée *in vitro* entre la région [244-272] de l'Apo E et la séquence [12-28] du peptide A β (Strittmatter *et al.*, 1993 a, b; Wisniewski *et al.*, 1993) (**Figure 10**). Mais cette interaction varierait en fonction de l'allèle de l'Apo E. Il existe à l'heure actuelle 2 écoles suivant lesquelles le peptide A β se lierait à l'Apo E3 ou Apo E4. De là, découlent 2 hypothèses à propos du rôle de l'Apo E durant l'amyloïdogénèse.

-L'Apo E est un cofacteur de l'amyloïdogénèse

L'Apo E4 se lierait plus rapidement à l'A β que l'Apo E3, selon un processus sensible à l'oxydation et aux variations de pH (Strittmatter *et al.*, 1993b). Des études cinétiques avec observation en microscopie électronique ont montré que les structures monofibrillaires d'Apo E et d'A β (A β ₁₋₂₈, A β ₁₋₄₀ ou A β ₁₋₄₂) étaient observées plus rapidement en présence d'Apo E4 que d'Apo E3 (Sanan *et al.*, 1994 ; Ma *et al.*, 1994; Castano *et al.*, 1995). En effet, l'Apo E est capable d'induire la fibrillogénèse du peptide A β et ainsi la formation des plaques séniles durant la maladie d'Alzheimer. Ces résultats semblent donc indiquer que l'Apo E est une molécule "pathologique chaperonne" (Wisniewski et Frangione, 1992).

-L'Apo E intervient dans la clairance du peptide A β

D'autres équipes ont obtenu des résultats qui ne soutiennent pas cette hypothèse. Ainsi, l'Apo E3 exprimée dans des cellules HEK-296 se complexe plus rapidement à l'A β ₁₋₄₀ que l'Apo E4 (LaDu *et al.*, 1994). L'Apo E3 aurait alors un rôle neuroprotecteur en séquestrant l'A β pour l'empêcher de s'accumuler (LaDu *et al.*, 1994; 1995). D'autres études en turbidimétrie ont montré que l'Apo E3 pouvait inhiber la formation de fibres d'A β ₁₋₄₀ (Evans *et al.*, 1995). Enfin, des études à partir de cultures cellulaires de neurones d'hippocampe de rat ont montré que l'Apo E atténuait l'effet neurotoxique de l'A β ₁₋₄₀ (Whitson *et al.*, 1994).

III-2-2-2-Apolipoprotéine J , Transthyrétine

L'Apo J, encore appelée Clustérine ou SP_{40,40} est retrouvée dans l'ensemble des dépôts amyloïdes (Choi-Miura *et al.*, 1992; Kida *et al.*, 1995). Elle interagit *in vitro* avec l'A β ₁₋₄₀ présente dans le LCR (Ghiso *et al.*, 1993; Matsubara *et al.*, 1995) et inhibe l'agrégation du peptide A β (Oda *et al.*, 1995). La transthyrétine, une protéine impliquée dans le transport de la thyroxine et de la vitamine A, séquestre l'A β de façon plus efficace que l'Apo E et l'Apo J (Schwarzman *et al.*, 1994).

Ainsi, l'Apo J et la transthyréline toutes deux présentes en excès dans le LCR, sont probablement impliquées dans la clairance du peptide A β (Golabek *et al.*, 1995).

III-2-2-3-Les protéoglycannes

Les protéoglycannes (PGs) sont des macromolécules ubiquitaires constituées de chaînes glycaniques sulfatées, liées de façon covalente à un axe protéique. Les PGs principalement décrits dans les dépôts amyloïdes sont de type héparane sulfate (HSPGs), dermatane sulfate (Snow *et al.*, 1990, 1992) et chondoïtine sulfate (DeWitt *et al.*, 1994). Les HSPGs sont retrouvés dans tous les dépôts amyloïdes (diffus et compacts) du parenchyme et des vaisseaux cérébraux (Snow *et al.*, 1988; Perlmutter *et al.*, 1990). Outre la maladie d'Alzheimer, les PGs sont impliqués dans l'ensemble des amyloïdoses systémiques et cérébrales incluant la maladie de Creutzfeldt-Jacob, le Kuru et le syndrome de Gertsmann-Straüssler-Scheinker (Snow *et al.*, 1989). On les retrouve aux premiers stades de la formation de l'amyloïde et sont jugés indispensables à la formation des fibres insolubles d'A β (Snow *et al.*, 1994 a, b). Au même titre que l'Apo E, ils sont considérés comme des cofacteurs de l'amyloïdogénèse.

Enfin, les PGs pourraient intervenir sur la sécrétion de fragments amyloïdogéniques en se liant à l'APP. En effet, la séquence primaire de l'APP contient 3 régions consensus capables de se lier à l'héparine (Small *et al.*, 1994; Multhaup *et al.*, 1994; Buée *et al.*, 1993 a,b). L'une d'entre-elles, située dans la partie N-terminale du peptide A β [V₁₂HHQKL₁₇], englobe le site de clivage de l' α -sécrétase (Buée *et al.*, 1993a,b) (**Figure 10**).

III-2-2-4-Les constituants de la matrice extracellulaire

Les protéines de la matrice extracellulaire telles que la laminine, la fibronectine, l'entactine ou le collagène (type IV) sont des constituants de la substance amyloïde qui

interagissent avec l'APP. Ils pourraient donc également favoriser la formation des dépôts amyloïdes (Narindrasorasak *et al.*, 1992, 1994; Kisilevsky *et al.*, 1992).

III-2-2-5-Les protéines de la phase aiguë (*acute-phase proteins*)

De nombreuses protéines, sécrétées en réponse à une atteinte physiologique (inflammatoire ou autre) ont été détectées dans les dépôts amyloïdes. Certaines ont probablement un rôle dans l'amyloïdogenèse.

-L' α_1 -antichymotrypsine (ACT), la protéase nexine I (PNI)

L' α_1 -antichymotrypsine et la protéase nexine I sont des inhibiteurs de protéases à sérine que l'on retrouve dans les dépôts amyloïdes (Abraham *et al.*, 1988 ; Rosenblatt *et al.*, 1989). Contrairement aux autres constituants des dépôts amyloïdes, l'ACT est spécifique de la maladie d'Alzheimer (Abraham *et al.*, 1990). Un site de liaison de l'ACT, a été identifié au niveau du peptide A β (Potter *et al.*, 1991) (**Figure 10**). Des études indépendantes ont montré que l'ACT inhibe la formation de fibres amyloïdes d'A β_{1-28} et d'A β_{1-40} (Fraser *et al.*, 1993b) et qu'au contraire, favorise l'agrégation du peptide A β_{1-42} (Ma *et al.*, 1994).

Enfin, il faut noter la présence au sein des dépôts amyloïdes d'autres inhibiteurs de protéases tel que l' α_1 -antitrypsine (Smith *et al.*, 1993) et l' α_2 -macroglobuline (Bauer *et al.*, 1991).

-Le composé P amyloïde (SAP)

Le composé P amyloïde est une volumineuse protéine de 250 kDa que l'on retrouve dans toutes les amyloïdoses (Emsley *et al.*, 1994). Récemment, une interaction dépendante du calcium (Ca²⁺) entre la SAP et l'A β a été démontrée *in vitro* (Hamazaki, 1995). Il semble que la SAP contribue à la persistance des fibres amyloïdes insolubles ainsi qu'à leur résistance vis à vis des mécanismes de dégradation (Hamazaki, 1995; Tennent *et al.*, 1995).

III-2-2-6-Les protéines de l'inflammation

-Protéines du complément. immunoglobulines

Une réaction inflammatoire est constatée durant la maladie d'Alzheimer. Ceci se confirme par la présence d'immunoglobulines et de nombreuses protéines du complément au sein des dépôts amyloïdes (Eikelenboom et Stam, 1984; Kalaria et Perry, 1993; Mc Geer et Mc Geer, 1995). De plus, il a été démontré que le peptide A β peut interagir avec la protéine C1q et activer la cascade du complément selon la voie classique (Rogers *et al.*, 1992).

-Facteurs de croissance

La présence d'interleukine-1 β (IL-1 β) et de bFGF a également été démontrée au sein des dépôts amyloïdes (Araujo *et al.*, 1992). IL-1 β et bFGF favoriseraient ainsi la synthèse de nombreux constituants de l'amyloïde dont l'APP (Golgaber *et al.*, 1989).

III-2-2-7-Les métaux

Certains métaux présents au sein des plaques séniles ont probablement un rôle dans la formation de l'amyloïde. Des études *in vitro* ont ainsi montré que l'A β ₁₋₄₀ s'agrège en présence de Fer (Fe²⁺), d'Aluminium (Al³⁺), et de Zinc (Zn²⁺) (Mantyh *et al.*, 1993; Bush *et al.*, 1994a). La région [6-28] du peptide A β est considérée comme un domaine potentiel de liaison au Zinc (Bush *et al.*, 1994b) (**Figure 10**).

III-2-2-8-Un nouveau constituant

Récemment, le NAC (NAC pour *non amyloid component*) a été isolé d'une préparation de substance amyloïde de patient atteint de la maladie d'Alzheimer. Ce constituant est un peptide hydrophobe de 35 acides aminés dont le précurseur, l' α synucléine, est une protéine neuronale au rôle inconnu (Ueda *et al.*, 1993, 1994b). Le

NAC présente de fortes homologies de séquence avec l'A β . Il peut également s'agréger et former *in vitro* des filaments de type amyloïde (Han *et al.*, 1995).

III-3-Altération des neurotransmetteurs

Les lésions de la maladie d'Alzheimer affectent certaines régions spécifiques du cerveau. Les neurotransmetteurs constituent des marqueurs dont l'analyse peut apporter de précieux renseignements sur la nature des populations neuronales touchées. Il existe de multiples altérations des neurotransmetteurs durant la maladie d'Alzheimer:

~~..Les systèmes cholinergiques:~~ *Les systèmes cholinergiques: Une dépopulation des neurones cholinergiques du noyau basal de Meynert est observée. Cette perte neuronale est en bonne corrélation avec le nombre de dépôts amyloïdes dans les zones de projections corticales (cortex temporal, hippocampe). Enfin, une baisse d'activité de l'enzyme de synthèse de l'acétylcholine, la choline acétyltransférase, est constatée dans le noyau basal de Meynert, l'hippocampe et le cortex temporal.

~~..Les systèmes noradrénergiques:~~ *Les systèmes noradrénergiques: Le locus coeruleus est le siège d'une perte neuronale de l'ordre de 50 à 70 % durant la maladie d'Alzheimer. Une altération des projections noradrénergiques corticales a été mise en évidence avec une baisse de la concentration en noradrénaline.

~~..Les systèmes dopaminergiques:~~ *Les systèmes dopaminergiques: Le locus niger ne semble pas être le siège d'une perte neuronale lors de la maladie d'Alzheimer. Toutefois, il existe une atteinte modérée des voies nigrostriées.

~~..Les systèmes sérotoninergiques:~~ *Les systèmes sérotoninergiques: Les noyaux du raphé médian sont touchés par une dépopulation neuronale. Les projections sérotoninergiques corticales venant du raphé sont lésées.

~~..Les systèmes à acides aminés:~~ *Les systèmes à acides aminés: Une diminution de l'activité des neurones glutamatergiques qui se projettent sur le striatum est observée.

~~..Les systèmes peptidergiques:~~ *Les systèmes peptidergiques: Le taux de somatostatine est abaissé dans le cortex de patients atteints de maladie d'Alzheimer. Cette diminution est en corrélation

avec la gravité de la détérioration intellectuelle et la densité des lésions neuropathologiques.

IV-ETIOLOGIE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

IV-1-Facteur de risque

L'âge est un facteur de risque (facteur épidémiologique) incontestable de la maladie d'Alzheimer. D'autres facteurs de risque comme le sexe, des antécédents de traumatismes crâniens ont été avancés mais ils sont plus ou moins contestés. Des facteurs environnementaux (aluminium, agents excitotoxiques...) pourraient également favoriser la maladie.

Des études génétiques ont permis la mise en évidence d'autres facteurs de risque. En effet, la fréquence de l'allèle $\epsilon 4$ du gène de l'ApoE augmente de façon très significative dans les populations de patients atteints de maladie d'Alzheimer familiales et sporadiques à début tardif (après 65 ans) (Saunders *et al.*, 1993; Corder *et al.*, 1993) et précoces (avant 65 ans) (Pérez-Tur *et al.*, 1995). Le risque de développer la maladie d'Alzheimer 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, voir Chartier-Harlin et Pérez-Tur, 1995). Par contre, une baisse de la fréquence de l'allèle $\epsilon 2$ est observée chez les malades, ce qui suggère que l'allèle $\epsilon 2$ jouerait un rôle neuroprotecteur (Corder *et al.*, 1994). Enfin, il faut noter que l'association de l'Apo E4 à d'autres facteurs (variants ACT) augmente le risque de développer la maladie (Kamboh *et al.*, 1995).

IV-2-Facteurs génétiques

La majorité des cas de maladie d'Alzheimer sont des formes sporadiques. Toutefois, l'existence d'antécédents familiaux augmente le risque de développer une maladie d'Alzheimer (Folstein, 1989). Ceci a conduit différentes équipes à rechercher des mutations responsables de la pathologie. Le gène de l'APP situé sur le chromosome 21 ainsi que 2 nouveaux gènes récemment découverts sur les chromosomes 14 et 1 sont à l'origine de formes familiales de la maladie d'Alzheimer.

IV-2-1-Le chromosome 21 (les mutations de l'APP)

La similitude sur le plan neuropathologique entre le syndrome de Down (trisomie 21) et la maladie d'Alzheimer a orienté les recherches sur un facteur génétique situé sur le chromosome 21 et plus particulièrement sur l'APP puisque l'expression de son ARN messager serait augmenté durant la trisomie 21 (Rumble *et al.*, 1989). Des mutations de l'APP, ont effectivement été décrites de part et d'autre du peptide A β . Il s'agit des mutations du codon 717 et de la double mutation des codons 670 et 671. Ces mutations, transmises sur le mode autosomal dominant, donnent naissance à des formes familiales de maladie d'Alzheimer à début précoce. Elles ne sont jamais retrouvées chez les individus normaux. Il faut cependant noter que seulement 5% des formes familiales à début précoce seraient liées au chromosome 21. D'autres mutations ont été mises en évidence au sein du peptide A β , au niveau des codons 692 et 693 de l'APP. Ces mutations sont à l'origine de pathologies différentes de la maladie d'Alzheimer. La mutation du codon 692 est liée à une angiopathie amyloïde cérébrale associée à une démence (CAA) tandis que la mutation du codon 693 est liée et à des hémorragies cérébrales héréditaires avec angiopathie amyloïde (HCHWA-D) (Figure 10).

1-Les formes familiales de maladie d'Alzheimer (FAD)

.-Les mutations du codon 717.

Les mutations situées sur le codon 717 (près de la région C-terminale du peptide A β), sont au nombre de trois: Le résidu de Val₇₁₇ (selon la numérotation de l'APP₇₇₀) est remplacé par une Ile, une Phe ou un résidu de Gly (Goate *et al.*, 1991; Murrell *et al.*, 1991; Chartier-Harlin *et al.*, 1991) (**Figure 10**). Ces mutations semblent avoir une incidence directe sur la formation des dépôts amyloïdes. En effet, une augmentation du ratio A β ₁₋₄₂₍₄₃₎/A β ₁₋₄₀ a été constatée dans le cerveau de patients présentant une maladie d'Alzheimer familiale avec la mutation Val₇₁₇Ile (Liepnieks *et al.*, 1993, Iwatsubo *et al.*, 1994; Tamaoka *et al.*, 1994). De plus, des études de transfection montrent que les mutations Val₇₁₇Ile et Val₇₁₇Phe augmentent le pourcentage d'A β ₁₋₄₂ sécrété au dépend de l'A β ₁₋₄₀ (Suzuki *et al.*, 1994a).

.-La double mutation suédoise (KM670-NL671).

Une double mutation située juste en amont du site de clivage de la β -sécrétase (Lys₆₇₀- Met₆₇₁) a été découverte chez des familles d'origine suédoise (Mullan *et al.*, 1992). Ces deux acides aminés sont remplacés respectivement par une Asn₆₇₀ et une Leu₆₇₁ (selon la numérotation de l'APP₇₇₀). Cette double mutation semble intervenir également sur le métabolisme de l'APP puisqu'une augmentation de la sécrétion du peptide A β (de l'ordre de 6 à 8 fois) est obtenue à partir de neuroblastomes humains transfectés avec un APP présentant la double mutation suédoise (Citron *et al.*, 1992; Cai *et al.*, 1993; Felsenstein *et al.*, 1994).

2-Les mutations de l'APP liées aux amyloïdoses de type angiopathie

-Hémorragies cérébrales héréditaires avec angiopathie de type hollandais (HCHWA-D)

Une mutation (codon 693) se situe au niveau de l'exon 17 de l'APP (dans la partie codant pour le peptide A β) chez des patients d'une famille hollandaise souffrant d'hémorragies cérébrales avec angiopathie amyloïde (Levy *et al.*, 1990). L'acide glutamique (Glu₂₂) du peptide A β , est remplacé par un résidu de Gln. Des études de cinétique à partir de peptides A β synthétiques, montrent qu'un tel remplacement provoque une accélération de l'agrégation du peptide A β (Wisniewski *et al.*, 1991; Clements *et al.*, 1993).

-Démence présénile avec angiopathie amyloïde cérébrale (CAA)

Une mutation liée à une démence présénile associée à une angiopathie amyloïde cérébrale (CAA) remplace l'Ala₂₁ du peptide A β par un résidu de Gly (Hendricks *et al.*, 1992). Cette mutation (codon 692) provoque une augmentation de la sécrétion du peptide A β et une diminution parallèle du fragment non amyloïdogénique P3 de l'APP (Haass *et al.*, 1994b).

IV-2-2-Le chromosome 14

Les mutations situées sur le gène de l'APP ne concernent qu'un nombre restreint de famille. Sans connaître le gène responsable, une liaison génétique entre une région du chromosome 14 et d'autres formes familiales à début précoce était mise en évidence (Schellenberg *et al.*, 1992). Récemment, un gène a été identifié. Il code pour la préséniline 1 (PS 1 ou S 182), une protéine dont le rôle est inconnu et qui présente 7 domaines transmembranaires (Sherrington *et al.*, 1995). A l'heure actuelle, 24 mutations différentes ont été trouvées sur ce gène. Un lien existerait entre PS1 et APP. En effet, une observation qui demande à être confirmée, suggère que les fibroblastes de patients

porteurs d'une mutation de PS1 secrètent préférentiellement les dérivés plus longs de peptides AB (Scheuner, 1995).

IV-2-3-Le chromosome 1

Le chromosome 1 est lui aussi impliqué dans des formes familiales de maladie d'Alzheimer à début précoce. Le gène muté code pour la préséniline 2 (PS 2) qui présente 67% d'homologie avec PS1. Deux mutations sur ce gène ont été trouvées chez 7 familles d'origine germanique et une famille d'origine italienne (Levy-Lahad *et al.*, 1995; Sorbi *et al.*, 1995).

IV-2-4-Conclusion

On estime que les formes à début tardif, sporadiques et familiales, représentent respectivement 45% et 30% des patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Les formes familiales et sporadiques à début précoce représentent environ 15% et 10% respectivement (pour revue voir Van Broeckhoven, 1995).

La découverte des mutations sur le gène PS1 est extrêmement importante puisque 70% des formes familiales à début précoce seraient liées au chromosome 14. Enfin ces résultats confirment que la maladie d'Alzheimer est une maladie hétérogène impliquant différents gènes dont tous ne sont pas encore identifiés.

V-HÉTÉROGÉNÉITÉ DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

La maladie d'Alzheimer n'est pas seulement une maladie hétérogène sur le plan génétique, mais également sur le plan clinique, neuropathologique et biochimique (Scheltens *et al.*, 1993; Ikeda *et al.*, 1989; Van Broeckhoven, 1995).

Hétérogénéité sur le plan clinique: Sur le plan clinique, l'hétérogénéité de la maladie d'Alzheimer est une évidence. Selon l'âge de début, deux sous-groupes se distinguent telles que les formes préséniles (débutant avant 65 ans) et les formes séniles (débutant après 65 ans). Les troubles du langage qui se développent chez tous les patients dont le processus dégénératif cortical est très avancé, peuvent également constituer les premiers symptômes cliniques. La durée d'évolution de la maladie d'Alzheimer est également très variable. Enfin, la maladie d'Alzheimer serait observée plus fréquemment chez les femmes même en tenant compte de leur durée de vie plus importante.

Hétérogénéité sur le plan neuropathologique: La distribution des 2 lésions neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer est également hétérogène. Ainsi, des variations sur le plan clinique pourraient être liées à une distribution spécifique des NFT, en relation à des circuits neuronaux précis (Hof *et al.*, 1990b). Les dépôts amyloïdes envahissent généralement l'ensemble du cerveau sans suivre un schéma défini. Sur le plan morphologique, les dépôts de substance amyloïde se différencient également (Ikeda *et al.*, 1989).

Hétérogénéité sur le plan biochimique: Il a été démontré par une méthode biochimique de quantification de la DNF dans l'ensemble des aires iso-corticales, que des variations inter-individuelles étaient surtout rencontrées selon un axe rostro-caudal (Vermersch *et al.*, 1992). Cette hétérogénéité sur le plan biochimique se vérifie également par l'existence de nombreux fragments de peptide A β au sein des dépôts amyloïdes (Masters *et al.*, 1985; Miller *et al.*, 1993).

L'hétérogénéité de la maladie d'Alzheimer sur le plan génétique, clinique, neuropathologique, et biochimique pourrait être le résultat de la sévérité de la démence et /ou de la topographie des lésions. Elle pourrait également refléter l'existence de sous-groupes de la maladie qui se distinguent par l'influence de différents facteurs

(épidémiologiques, génétiques, environnementaux). Ces différences sont donc à considérer pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer, ainsi que pour la mise au point d'essais thérapeutiques.

VI-APPROCHE THÉRAPEUTIQUE ET AMYLOÏDE

VI-1-Traitements

Il n'existe pas de traitement de la maladie d'Alzheimer. Cette maladie touche de nombreux systèmes de neurotransmission pouvant être reliés aux processus de la mémorisation. Différentes approches visant à suppléer un système de neurotransmission déficitaire ont été réalisées dans l'espoir de corriger essentiellement les troubles mnésiques. Le traitement des voies à acétylcholine a été largement abordé. L'utilisation de précurseurs de l'acétylcholine (choline et lécithine) ou d'agonistes cholinergiques directs n'a donné que des résultats décevants et d'importants effets secondaires. Des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase ont également été testés tels que la physostigmine ou le tétrahydroaminoacridine (THA). Le THA (encore appelée tacrine) a obtenu une autorisation de mise sur le marché sous contrôle hospitalier. Son efficacité est très contestée puisqu'elle ne corrigerait les troubles mnésiques que dans un sous-groupe de patients atteints de façon modérée et traités au début de la maladie. Les approches aminergiques, gabaergiques et glutamatergiques ont été abordées mais n'ont donné aucun résultat. D'autres perspectives ont été envisagées (intervention des neuropeptides, œstrogènes, radicaux libres...) sans toutefois déboucher sur des résultats concluants.

D'autres stratégies thérapeutiques ciblées sur la formation de l'amyloïde sont envisagées à l'avenir. Cette approche inclut l'utilisation de molécules qui inhiberaient la sécrétion d'A β par les cellules neuronales, qui préviendraient l'agrégation et/ou empêcheraient les effets neurotoxiques du peptide A β (Kisilevsky *et al.*, 1995). Afin de

tester de telles molécules, la mise au point d'un modèle fiable de la maladie d'Alzheimer s'avère nécessaire.

VI-2-Modèles de la maladie d'Alzheimer

Des dépôts de substance amyloïde ont été observés dans le cerveau de différents mammifères tels que le singe âgé, l'ours polaire, le cheval et le chien (Selkoe *et al.*, 1987). Toutefois, ces animaux ne présentent pas de dégénérescence neurofibrillaire et ne peuvent être considérés comme de bons modèles de la maladie d'Alzheimer.

VI-2-1-Les modèles animaux

Le singe âgé représente un modèle de la maladie d'Alzheimer qui montre des déficits de la mémoire, et qui développe des lésions amyloïdes (Price *et al.*, 1986). Plus récemment, un modèle très prometteur a été développé. Il s'agit d'un primate lémurien (*Microcebus murinus*) qui avec l'âge développe à la fois des neurones en dégénérescence neurofibrillaire et des plaques séniles (Bons *et al.*, 1994; Delacourte *et al.* 1995).

De très gros efforts ont été entrepris pour obtenir un modèle animal transgénique de la maladie d'Alzheimer. Les premiers résultats intéressants ont été obtenus à partir de souris transgéniques plus ou moins âgées (2-15 mois), exprimant l'APP₇₅₁ humaine, sous le contrôle du promoteur de l'énolase neuronale spécifique de rat (Quon *et al.*, 1991). De nombreux dépôts amyloïdes ont ainsi été observés au niveau du cortex et de l'hippocampe, comparativement aux souris non transfectées. Récemment, des souris transgéniques exprimant l'APP humain muté en 717 (valine en phénylalanine) dans des quantités 10 fois plus importantes que l'APP endogène ont été décrites (Games *et al.*, 1995). Ces animaux présentent des dépôts amyloïdes colorables à la thioflavine S, des plaques neuritiques, une perte synaptique ainsi qu'une réaction gliale. Aucune dégénérescence neurofibrillaire n'était visible dans leur cerveau. Ces résultats

supportent l'hypothèse que les lésions de type amyloïde arrivent en premier lieu durant la maladie d'Alzheimer. De plus, ce type de souris pourrait constituer un modèle préclinique de la maladie d'Alzheimer afin de tester différents agents réduisant la production du peptide A β ou diminuant sa neurotoxicité *in vitro*.

VI-2-2-Les modèles cellulaires

Des études de transfection ont montré que le peptide A β pouvait être normalement sécrété sous une forme soluble par de nombreux types cellulaires (Shoji *et al.*, 1992; Haass *et al.*, 1992a).

VI-2-3-Modèles et formation de l'amyloïde

La mise en évidence de dépôts extracellulaires de substance amyloïde à partir de simples cultures cellulaires est probablement impossible puisque trop de mécanismes sont en jeu. Néanmoins, nous avons vu dans le chapitre consacré aux facteurs de risque génétiques, que de nombreux systèmes de cellules transfectées avec des APP mutés (codons 670/671, codon 717) ont été développés (Citron *et al.*, 1992; Cai *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1994a). Ils constituent donc de bons modèles de maladie d'Alzheimer familiale.

Il faut également noter qu'une équipe japonaise a mis en évidence une accumulation intracellulaire de filaments amyloïdes *in vitro* dans la région périnucléaire de cellules COS-1 exprimant la partie C-terminale amyloïdogénique de l'APP (Maruyama *et al.*, 1990).

VII-AMYLOÏDOSES CÉRÉBRALES

La formation de l'amyloïde n'est pas uniquement rencontrée durant la maladie d'Alzheimer. Une amyloïdose est également observée durant le vieillissement cérébral ainsi que dans d'autres maladies neurodégénératives.

VII-1-Les maladies à prions

La maladie de Creutzfeldt-Jacob, Le Kuru et le syndrome de Gertsmann-Straüssler-Scheinker (GSS) sont des encéphalopathies spongiformes transmissibles humaines. Le prion est l'agent infectieux de nature protéique, et constitue une forme aberrante d'une protéine hôte (PrP: prion protein). La maladie de Creutzfeldt-Jacob se manifeste par une démence. Elle a été observée dans toutes les régions du monde. Il s'agit en général d'une affection sporadique mais il existe des formes familiales qui représentent 10 à 15 % des cas. La maladie du Kuru, décrite dans une population isolée de Nouvelle Guinée, est caractérisée par une ataxie cérébelleuse. Le GSS est non seulement une maladie infectieuse mais également une maladie génétique autosomale dominante (Prusiner, 1990; Gadjusek *et al.*, 1991). Cette maladie se manifeste par un état démentiel faisant suite à une dysarthrie et un syndrome cérébelleux.

Une amyloïdose plus ou moins diffuse dans le cortex cérébral et le cervelet caractérise ces pathologies. Contrairement à la maladie d'Alzheimer, le constituant principal de ces dépôts amyloïdes est la protéine du prion. Cependant, durant le GSS, une colocalisation du peptide A β et de la protéine du prion a été démontrée (Miyazono *et al.*, 1992; Ikeda *et al.*, 1994). L'Apo E est également un constituant de ces dépôts amyloïdes. Une augmentation de la fréquence de l'allèle ϵ 4 a été mise en évidence dans une population de patients atteints de la maladie de Creutzfeldt-Jacob (Amouyel *et al.*, 1994). Mais, contrairement à la maladie d'Alzheimer, aucun lien n'a été observé entre la fréquence de cet allèle et la quantité de dépôts amyloïdes (Dranovsky *et al.*, 1995).

VII-2-La démence à corps de Lewy

Durant cette démence, on constate une importante atrophie cérébrale accompagnée d'inclusions intracytoplasmiques dans les neurones corticaux et sous-corticaux et que l'on nomme corps de Lewy. La dégénérescence neurofibrillaire est constatée pour seulement 1/3 des cas (Dickson *et al.*, 1989). Une amyloïdose importante touchant les régions hippocampiques et néocorticales est constatée. Elle se présente essentiellement sous la forme de dépôts diffus mais également de plaques neuritiques (Dickson *et al.*, 1992; Lippa *et al.*, 1994). Le nombre des dépôts amyloïdes immunoréactifs pour l'Apo E a été estimé à environ 25% (Dickson *et al.*, 1995).

VII-3-La démence pugilistique

La démence pugilistique, provoquée par les nombreux traumatismes cérébraux que supportent les boxers professionnels se manifeste par des signes cérébelleux, pyramidaux et extrapyramidaux. Sur le plan neuropathologique, on observe des neurones en dégénérescence neurofibrillaire ainsi que des dépôts de substance amyloïde constitués de peptide A β , dans le parenchyme et dans la paroi des vaisseaux (Roberts *et al.*, 1990; Tokuda *et al.*, 1991)

VII-4-Le vieillissement cérébral "normal"

La présence de dépôts amyloïdes diffus de peptide A β est souvent observée dans le néocortex de personnes âgées non démentes de plus de 75 ans (Davies *et al.*, 1988; Ikeda *et al.*, 1989; Delaère *et al.*, 1990). Des plaques neuritiques accompagnées ou non de quelques neurones en dégénérescence neurofibrillaire peuvent également être observées (Dickson *et al.*, 1991). Cependant, le vieillissement cérébral normal se distingue de la maladie d'Alzheimer par une densité moins importante et une distribution plus restreinte des lésions neuropathologiques. La présence de ces lésions

chez les individus âgés non déments pourraient correspondre soit à un stade préclinique de la maladie d'Alzheimer soit à un processus tout à fait distinct du au vieillissement cérébral.

RÉSULTATS-DISCUSSION

RESULTATS-DISCUSSION

Si de nombreuses études ont montré que la présence de neurones en dégénérescence neurofibrillaire (Mc Kee *et al.*, 1991) et la perte synaptique (Terry *et al.*, 1991; Masliah *et al.*, 1989) est corrélée à la démence, il semblerait qu'une corrélation entre la démence et la quantité d'amyloïde puisse également être observée en ne considérant que les plaques neuritiques (He *et al.*, 1993) ou en faisant appel à des analyses très sophistiquées pour traiter les images (Cummings *et al.*, 1995).

Les dépôts de substance amyloïde sont observés dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Ils sont également présents, quoique de façon moins sévère, chez les individus âgés non déments. De ce fait, une approche quantitative permettrait de séparer le vieillissement cérébral normal de la maladie d'Alzheimer. Les critères du CERAD apportent un indice semi-quantitatif de la densité de dépôts amyloïdes (ajusté à l'âge du sujet) nécessaire pour poser le diagnostic de la maladie d'Alzheimer (Mirra *et al.*, 1993). Selon ces critères, il est recommandé de fixer le tissu cérébral en formaldéhyde et de l'inclure dans de la paraffine. Ces critères ne sont basés que sur deux méthodes histologiques: l'imprégnation argentique et la coloration à la thioflavine S. Or, actuellement les laboratoires utilisent de nombreuses méthodes de révélation des dépôts amyloïdes (histochimiques, immunohistochimiques) dont les sensibilités ne sont pas équivalentes. De plus, la difficulté de quantifier les dépôts amyloïdes réside dans le fait qu'ils se présentent sous différentes formes (dépôts diffus, plaques séniles, angiopathie amyloïde).

L'objectif de notre thèse était de purifier et mettre au point une méthode biochimique permettant de quantifier rapidement le peptide A β agrégé au sein de la substance amyloïde. Notre but était multiple. Nous voulions non seulement contourner les aléas des examens neuropathologiques mais également analyser plus finement les diverses molécules associées au peptide A β au sein des dépôts amyloïdes. Si la purification de la substance amyloïde devait logiquement conduire à la caractérisation

du peptide A β , elle nous a également permis de quantifier la présence de l'apolipoprotéine E, considérée comme un co-facteur de l'amyloïdogénèse.

I-PURIFICATION DE LA SUBSTANCE AMYLOÏDE ET MISE EN EVIDENCE DU PEPTIDE A β

La substance amyloïde présente dans le cerveau, est constituée de fibres insolubles de peptide A β arrangées en feuillets β -plissés. L'angiopathie amyloïde peut être analysée biochimiquement par l'utilisation d'étapes enzymatiques (collagénase), de solubilisation par des agents chaotropiques à 6 M (thiocyanate de guanidine, chlorure de guanidine) et de centrifugations à haute vitesse (100 000g) (Glenner et Wong, 1984a, b; Joaquim *et al.*, 1988). La substance amyloïde présente dans le parenchyme ne peut être solubilisée de cette façon du fait d'un état d'agrégation probablement supérieur. Son analyse biochimique nécessite alors l'utilisation de nombreuses étapes de présolubilisation dans des tampons SDS (5-10%), des centrifugations à haute vitesse (de 100 000 à 300 000g) et enfin une solubilisation du peptide A β en acide formique (de 70 à 100%) (Masters *et al.*, 1985; Mori *et al.*, 1992). Nous avons adapté la méthode de purification de la substance amyloïde de Mori et coll. (1992) afin de pouvoir travailler sur une faible quantité de tissu et un grand nombre d'échantillons. En effet, nous possédons dans le laboratoire une très importante banque de cerveaux de sujets âgés déments ou non (stockés à -80°C). Pour analyser les protéines insolubles du système nerveux central, les échantillons de cortex cérébral sont homogénéisés en solution de Laemmli 5% de SDS. Une ultracentrifugation à 100 000g permet ensuite d'isoler les constituants solubilisés en SDS 5%.

Dans un premier temps, nous avons voulu savoir si les protéines dites insolubles, provenant d'un cerveau de patient 'Alzheimer', étaient solubilisées dans la solution de Laemmli 5% de SDS.

I-1-Analyse des protéines solubles dans le surnageant S_{100 000g}

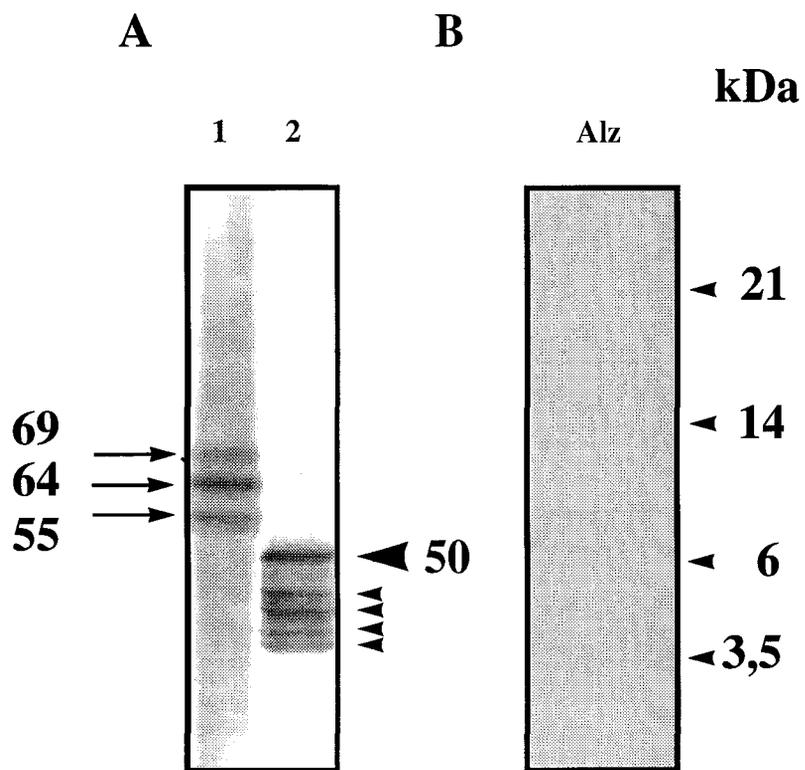
Les protéines présentes dans le surnageant S_{100 000g} "Laemmli" peuvent être facilement séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (gradient 10-20 %), en présence de SDS. L'analyse par immunoempreintes d'un homogénat total de cerveau permet donc de les visualiser.

I-1-1-Analyse des protéines tau solubilisées en SDS

Les protéines tau provenant d'un cerveau de patient 'Alzheimer' sont hyperphosphorylées. Par immunoempreintes, elles peuvent être détectées par AD2 qui est un anticorps dépendant de la phosphorylation, spécifique des protéines tau pathologiques (Buée-Scherrer *et al.*, 1996). Elles sont visualisées sous la forme d'un triplet de protéines situées à 55, 64 et 69 kDa (Delacourte *et al.*, 1990) (Figure 11). Par ailleurs, une bonne corrélation a été démontrée entre la présence des protéines tau pathologiques et le nombre de neurones en dégénérescence neurofibrillaire (Flament *et al.* 1989; Vermersch *et al.*, 1993).

I-1-2-Détection de la GFAP

Un autre type de molécule particulièrement insoluble est le constituant principal des filaments gliaux, la GFAP ou *glial fibrillary acidic protein*. En utilisant un anticorps spécifique de la GFAP (Delacourte, 1990; David *et al.*, 1994), nous avons pu montrer sa présence dans le surnageant S_{100 000g} "Laemmli" provenant d'homogénat total de cortex cérébral de patients 'Alzheimer'. La GFAP est visualisée sous la forme d'une bande majeure située à 50 kDa et de bandes mineures qui résultent de produits de catabolisme (Figure 11). Ces résultats suggèrent donc qu'une grande partie de la GFAP est solubilisée dans la solution de Laemmli 5% de SDS.



I-1-3-Détection du peptide A β

L'analyse par immunoempreintes du surnageant S_{100 000g} ne permet pas de détecter le peptide A β . Aucune trainée n'est observée, ce qui indique qu'une solubilisation même partielle des filaments amyloïdes n'est pas obtenue en solution de Laemmli 5% SDS (**Figure 11**).

En conclusion, l'homogénéisation du cortex cérébral de patient 'Alzheimer' en solution de Laemmli 5% SDS permet la solubilisation en grande partie des protéines insolubles du système nerveux central. Toutefois, l'existence de trainées immunomarquées indique qu'une faible quantité de protéines tau pathologiques ne sont solubilisées que partiellement (**Figure 11**). De même d'autres protéines comme les constituants de la matrice extracellulaire ou ceux de la paroi des vaisseaux cérébraux sont également très insolubles et sont probablement retrouvés dans le culot (C1). Le peptide A β agrégé est quand à lui totalement insoluble en SDS et n'est donc pas détectable par immunoempreintes dans le surnageant S_{100 000g}. Il convient donc de trouver une méthode pour solubiliser les protéines du culot (C1) afin d'en analyser le contenu.

I-2-Extraction des protéines du culot C1

I-2-1-Solubilisation du peptide A β dans le culot C1

Les protéines insolubles en SDS, contenues dans un homogénat total de cortex cérébral de patient atteint de la maladie d'Alzheimer, sont retrouvées dans le culot (C1). Elles devraient représenter en grande partie les constituants de la substance amyloïde.

Pour vérifier la présence du peptide A β , le culot (C1) est repris dans un volume d'acide formique 100% équivalent à 80% (p/v) de la quantité de tissu. Il est ensuite

homogénéisé et laissé sous agitation pendant 3 heures à température ambiante. L'homogénat "acide formique" est centrifugé à haute vitesse (200 000g) pendant 1 heure. Le surnageant S_{200 000g} est évaporé sous courant d'azote (N₂) puis est repris par une solution de Laemmli 5% SDS. Du fait des propriétés physicochimiques du peptide A β , l'addition d'urée 6 M dans la solution de Laemmli est nécessaire pour le solubiliser.

I-2-2-Mise en évidence du peptide A β

La mise en évidence du peptide A β s'effectue par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, en tampon Tris-Tricine qui présente l'avantage de séparer les petits poids moléculaires (Schaëgger et Von Jagow, 1987).

Le surnageant S_{200 000g} est déposé sur un gel de polyacrylamide (15%), et l'analyse par immunoempreintes, en utilisant un anticorps monoclonal anti-A β (anti-A β ₈₋₁₇ (Dako)) révèle la présence d'une bande située à 4 kDa (**Figure 12**). Une traînée immunomarquée dans la région des hauts poids moléculaires témoigne de la présence de peptide A β réagrégé.

I-2-3-Conclusion

Nous sommes en mesure de purifier la substance amyloïde provenant d'un homogénat total de cortex cérébral de patient atteint de la maladie d'Alzheimer. Le peptide A β est solubilisé dans l'acide formique 100% puis est extrait par une centrifugation haute vitesse (200 000g) (voir schéma ci-dessous).

S_{200 000g}

kDa

21 →

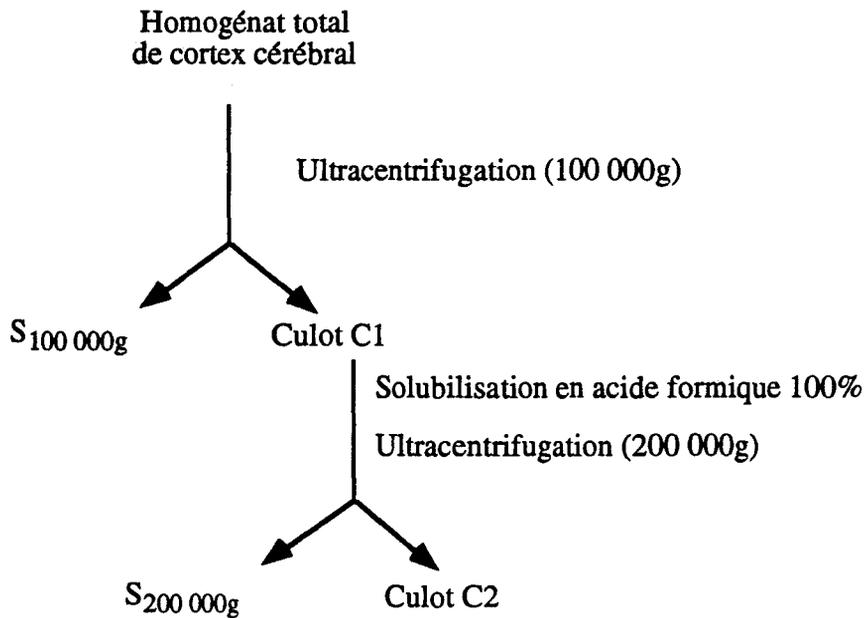
14 →

6 →

3,5 →



← AB



L'analyse du surnageant S200 000g par l'anticorps monoclonal AD2 ne révèle pas la présence de triplet de protéines tau pathologiques (tau 55, tau 64, tau 69). Ces résultats suggèrent donc que la majorité des protéines tau pathologiques est solubilisée dans la solution de Laemmli 5% de SDS.

Nous avons réalisé plusieurs lavages du culot (C2) par divers agents (acide formique 100%, chlorhydrate de guanidine, acide trifluoroacétique) suivis d'ultracentrifugations. Après analyse des surnageants par immunoempreintes, nous n'avons détecté aucun signal de peptide A β . Ceci indique que la quasi totalité du peptide A β est solubilisé dans le S200 000g. Nous pouvons donc envisager de quantifier le peptide A β par dot-blot à partir d'homogénat totaux de cortex cérébral de patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

II-MISE AU POINT DE LA QUANTIFICATION DU PEPTIDE A β PAR DOT-BLOT

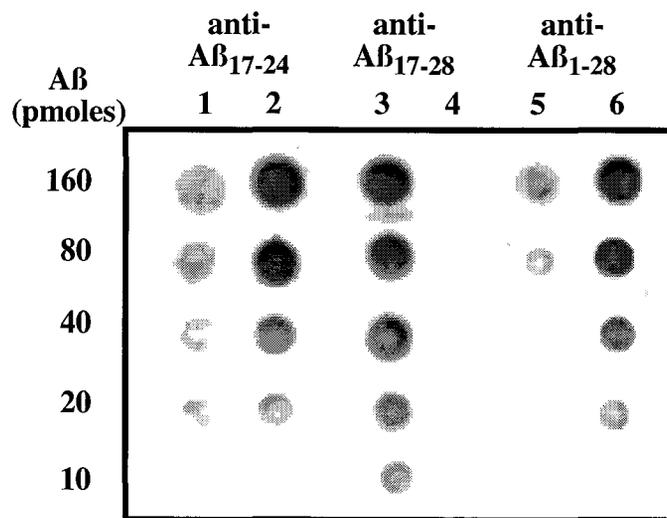
La technique biochimique envisagée afin de quantifier le peptide A β est la technique de dot-blot. Le principe est donc de purifier la substance amyloïde à partir d'homogénats totaux de cortex cérébral de sujets sains ou malades, de la déposer en dot-blot et d'incuber la membrane en présence d'un anticorps anti-A β . Ensuite, la quantité de peptide A β présente dans chaque échantillon est évaluée grâce à l'utilisation d'une gamme étalon standard de peptide A β synthétique. La technique de dot-blot doit s'adapter aux conditions d'extraction particulièrement drastiques (acide formique). Notre choix se porte donc sur la membrane de PVDF (Immobilon P) qui est particulièrement résistante vis à vis de solvants organiques ou d'acides concentrés. La première étape consiste dans un premier temps à trouver un anticorps capable de reconnaître spécifiquement le peptide A β_{1-42} dilué en acide formique concentré (100%). Ensuite, il s'agira de mettre au point la gamme étalon de peptide synthétique pour pouvoir évaluer la quantité de peptide A β (pmoles). Enfin, le but recherché est de pouvoir standardiser car une ultracentrifugation à 200 000 g ne permet pas de traiter un grand nombre d'échantillons. De plus, la présence d'acide formique 100% présente des problèmes de corrosion des joints, des tubes d'ultracentrifugeuse ainsi que des problèmes de sécurité. Il serait donc intéressant de vérifier si une concentration d'acide formique 100% est réellement nécessaire pour solubiliser la totalité du peptide A β . Nous nous proposons donc d'essayer quelques modifications (vitesse de centrifugation, concentration en acide formique) tout en vérifiant qu'elles ne provoquent pas une baisse de la quantité de peptide A β déterminée par dot-blot.

II-1-Choix de l'anticorps

Nous possédons au laboratoire différents anticorps anti-A β de natures et de sources différentes. Des sérums polyclonaux dirigés contre les séquences [1-28] et [1-10] du peptide A β avaient été préparés au laboratoire. Nous disposons également d'un anticorps anti-A β ₈₋₁₇ (Dako) et de l'anticorps 4G8 (anti-A β ₁₇₋₂₄). Afin de pouvoir développer nos recherches, un anticorps polyclonal dirigé contre la séquence [17-28] du peptide A β a également été réalisé. Tous ces anticorps ont donc été testés par dot-blot sur les peptides A β ₁₋₄₂ et A β ₁₋₂₈ (Bachem) déposés en acide formique (100%). L'anticorps polyclonal anti-A β ₁₋₁₀ n'a donné aucun marquage des peptides A β ₁₋₂₈ et A β ₁₋₄₂ en dot-blot. Les conditions particulières en acide formique 100% expliquent peut-être ce résultat négatif mais néanmoins, des résultats intéressants ont été obtenus avec les autres anticorps polyclonaux.

II-1-1-Characterisation de l'anticorps polyclonal anti-A β ₁₇₋₂₈ et du monoclonal anti-A β ₁₇₋₂₄ (4G8)

Il existe de nombreux fragments au sein des dépôts amyloïdes. Pour cette raison, il nous a paru important de réaliser un anticorps anti-A β qui puisse détecter à la fois le peptide A β et le fragment P3 (A β ₁₇₋₄₂) retrouvé majoritairement dans les dépôts diffus (Gowing *et al.*, 1993). Un peptide synthétique correspondant à la séquence [17-28] du peptide A β a donc été couplé à l'ovalbumine par l'intermédiaire de la glutaraldéhyde. Après injection de l'immunogène à un lapin, les sérums ont été récupérés et ont été testés par dot-blot. Différentes dilutions ont été réalisées afin d'obtenir un minimum de bruit de fond. La dilution de 1/800 s'est révélée être la dilution optimale. De façon surprenante, nous avons constaté que l'anticorps polyclonal anti-A β ₁₇₋₂₈ donnait des résultats différents selon la nature du peptide A β synthétique déposé sur la membrane de dot-blot. Ainsi, un marquage très intense est observé à partir du peptide A β ₁₋₂₈ tandis qu'une absence de signal est constaté avec le peptide A β ₁₋₄₂ (**Figure 13**).



Il est intéressant de comparer le sérum polyclonal anti-A β ₁₇₋₂₈ à l'anticorps monoclonal anti-A β ₁₇₋₂₄ (4G8) puisque les séquences reconnues sont presque identiques. Contrairement à l'anti-A β ₁₇₋₂₈ polyclonal, l'anti-A β ₁₇₋₂₄ monoclonal (4G8), utilisé au 1/10 000, marque intensément le peptide A β ₁₋₄₂. En outre, un marquage plus faible est constaté avec le peptide A β ₁₋₂₈ (**Figure 13**).

II-1-2-Caractérisation de l'anti-A β ₁₋₂₈ polyclonal

L'anti-A β ₁₋₂₈ est un sérum polyclonal préparé chez le lapin, dirigé contre la séquence [1-28] du peptide A β . En immunohistochimie, cet anticorps révèle les dépôts de substance amyloïde (dépôts diffus, plaques neuritiques, angiopathie amyloïde) sur des coupes de cortex de patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

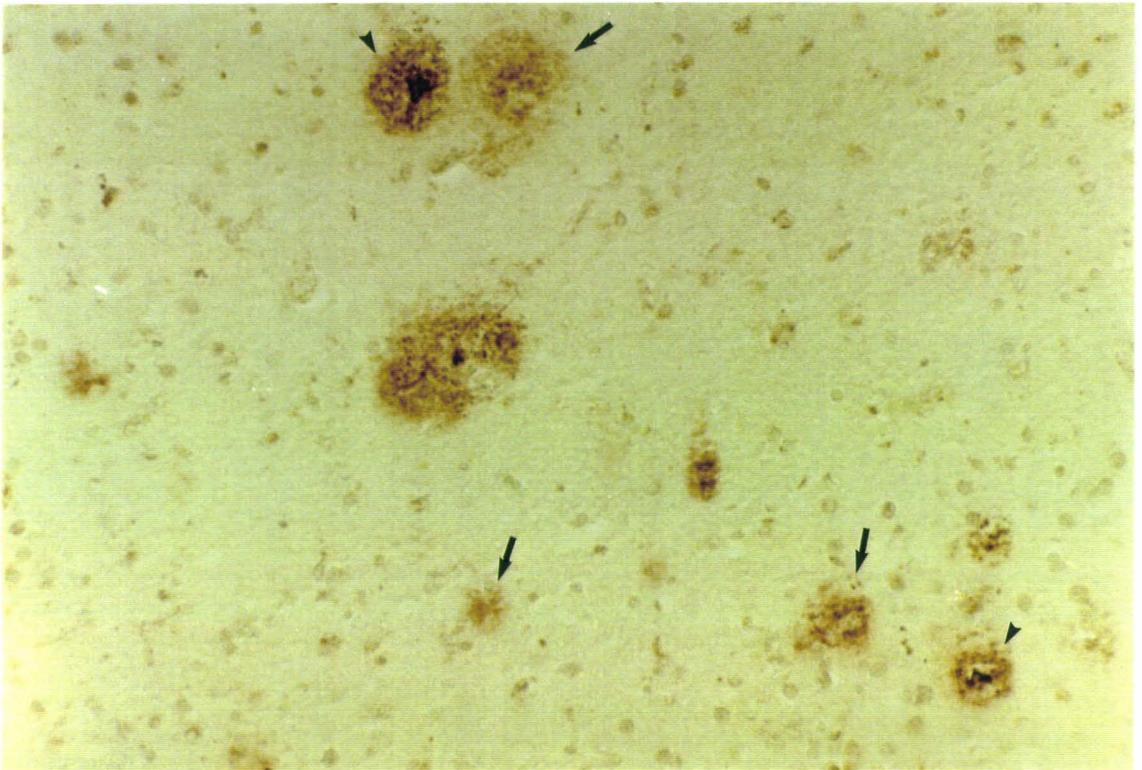
Par la technique de dot-blot, l'anticorps anti-A β ₁₋₂₈ est utilisé également au 1/800 et marque le peptide A β ₁₋₄₂ tandis qu'un marquage nettement plus faible est obtenu contre le peptide A β ₁₋₂₈ (**Figure 13**).

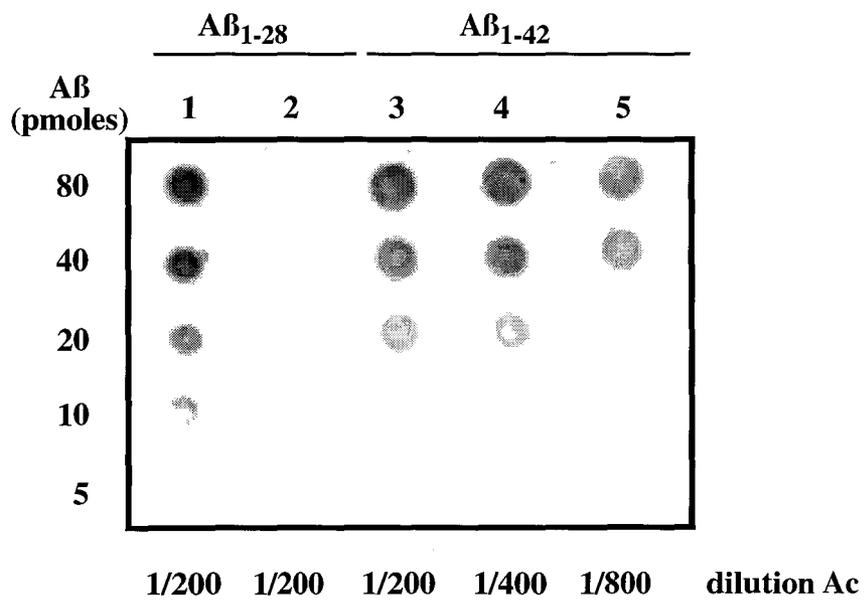
II-1-3-Caractérisation de l'anticorps anti-A β ₈₋₁₇ monoclonal

Nous ne possédions qu'une très faible quantité d'anticorps monoclonal anti-A β ₁₇₋₂₄ (4G8), ce qui ne nous permettait pas d'envisager une analyse à grande échelle du peptide A β par dot-blot. En outre, la présence de signaux recouverts de bruit de fond est parfois observée en utilisant les anticorps polyclonaux anti-A β . Il a donc été nécessaire de se procurer un autre anticorps monoclonal anti-peptide amyloïde.

L'anticorps monoclonal anti-A β ₈₋₁₇ (Dako) reconnaît spécifiquement la séquence [8-17] du peptide A β , située en amont et au niveau du site de clivage de l'APP par l' α sécrétase. En outre, il marque les dépôts de substance amyloïde sur une coupe de cortex cérébral de patient atteint de la maladie d'Alzheimer (**Figure 14**).

En dot-blot, l'anticorps monoclonal anti-A β ₈₋₁₇ (Dako) utilisé à la dilution de 1/200 marque intensément le peptide A β ₁₋₄₂ synthétique (**Figure 15**). Outre le peptide





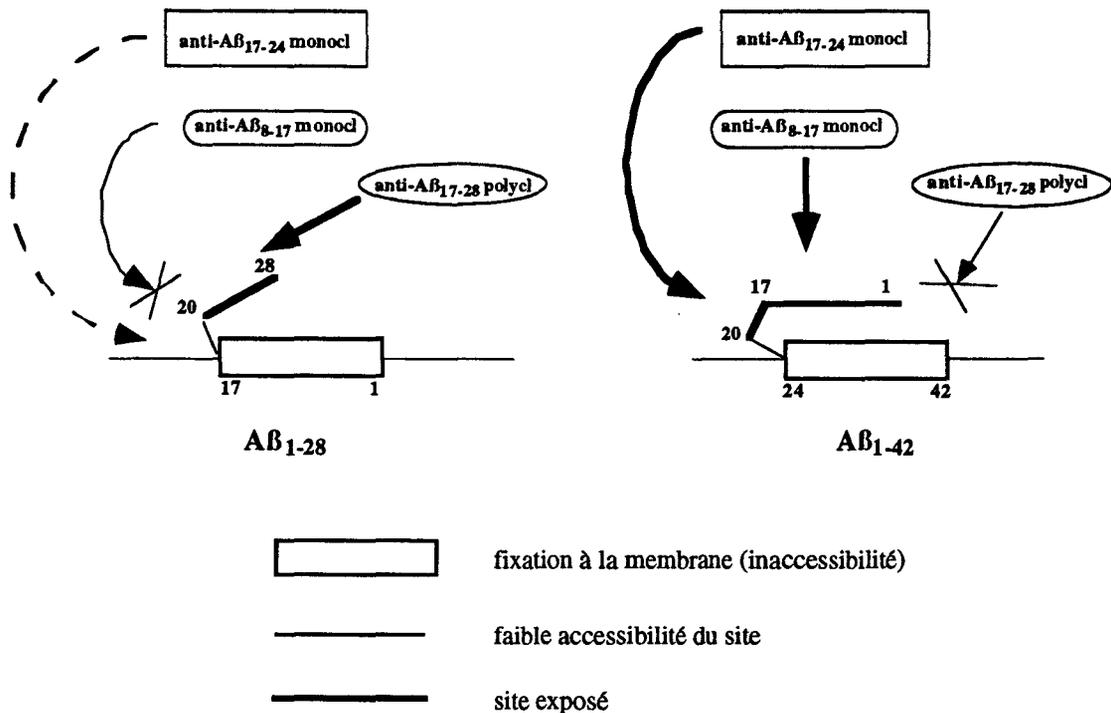
A β ₁₋₂₈ (Bachem), cet anticorps a également été testé contre le peptide A β ₁₋₂₈ (Neosystem). On constate que dans les mêmes conditions, l'anticorps anti-A β ₈₋₁₇ détecte le peptide A β ₁₋₂₈ (Neosystem) mais ne donne aucun signal contre le peptide A β ₁₋₂₈ (Bachem) (**Figure 15**). Cette différence de marquage résulte donc probablement d'une différence de conformation entre les deux peptides en milieu acide concentré. En effet, l'épitope reconnu par l'anticorps anti-A β ₈₋₁₇ (Dako) est probablement masqué sur le peptide A β ₁₋₂₈ (Bachem). Ceci pourrait s'expliquer par un protocole de synthèse différent pour les deux laboratoires.

II-1-4-Conclusion

L'immunomarquage du peptide A β ne dépend pas uniquement de la présence de la séquence peptidique reconnue par l'anticorps. Il dépend aussi de l'accessibilité de l'épitope à l'anticorps et donc de la conformation adoptée par le peptide sur la membrane de dot-blot. Les résultats obtenus avec les anticorps monoclonaux anti-A β ₈₋₁₇ (Dako), anti-A β ₁₇₋₂₄ (4G8) et le sérum polyclonal anti-A β ₁₇₋₂₈ sont très singuliers. Ces 3 anticorps, dirigés contre la partie N-terminale du peptide A β , donnent des résultats différents vis à vis des peptides synthétiques A β ₁₋₄₂ et A β ₁₋₂₈. Il a été démontré que la partie C-terminale du peptide A β ₁₋₄₂ intervient d'une façon prépondérante sur la conformation de la molécule (Barrow et Zagorski, 1991; Burdick *et al.*, 1992). Il est difficile de comparer un anticorps monoclonal à un sérum polyclonal selon le marquage obtenu. Toutefois ces résultats suggèrent que les épitopes situés sur le peptide A β ₁₋₄₂, et reconnus par les anticorps monoclonaux anti-A β ₈₋₁₇ et anti-A β ₁₇₋₂₄ (4G8) doivent être partiellement masqués sur le peptide A β ₁₋₂₈. A l'inverse, la séquence reconnue par l'anti-A β ₁₇₋₂₈ polyclonal sur le peptide A β ₁₋₂₈ ne doit pas être accessible sur le peptide A β ₁₋₄₂. Ces résultats sont cohérents si l'on admet une fixation différente des 2 peptides A β ₁₋₄₂ et A β ₁₋₂₈ sur la membrane (**Figure 16**). Selon cette hypothèse, le peptide A β ₁₋₂₈ doit se fixer à la membrane via la séquence [1-17], laissant plus ou moins accessible la partie [17-28]. Inversement, le peptide A β ₁₋₄₂ se fixerait via

la portion [24-42], ce qui permet l'intervention des anticorps monoclonaux anti-A β ₈₋₁₇ et anti-A β ₁₇₋₂₄ (4G8) (voir le **tableau 9 page 121**, récapitulant le marquage de ces différents anticorps).

FIGURE 16



Au total, nous possédons au laboratoire toute une catégorie d'anticorps anti-A β dirigés contre la partie N-terminale [1-28] du peptide A β et qui se différencient par leur marquage en dot-blot. La méthode doit nous permettre de quantifier si ce n'est la totalité, au moins la grande majorité du peptide A β agrégé dans les dépôts amyloïdes. Le choix de l'anticorps doit donc se justifier de part le peptide A β qui est reconnu. Si de nombreux fragments sont retrouvés dans les dépôts amyloïdes, le peptide A β ₁₋₄₂ constitue la forme A β agrégée la plus représentative. Il est donc préférable, pour la quantification biochimique, d'opter pour un anticorps qui révèle le peptide A β ₁₋₄₂. L'anticorps anti-A β ₈₋₁₇ (Dako) qui marque intensément et de manière spécifique le peptide A β ₁₋₄₂ représente donc l'outil immunologique idéal pour la quantification biochimique du peptide A β . Néanmoins, l'anticorps anti-A β ₁₇₋₂₄ monoclonal (4G8) et

l'anti-A β ₁₇₋₂₈ polyclonal sont susceptibles de reconnaître le fragment P3 (A β ₁₇₋₄₂) et l'on pourrait donc envisager également leur utilisation pour la détection de ce type de fragment dans la substance amyloïde.

II-2-Définition de la gamme étalon de peptide A β ₁₋₄₂ synthétique

Une solution de peptide A β ₁₋₄₂ synthétique (Bachem) est préparée en acide formique 100% à la concentration de 80 nmole/ml. Cet échantillon est dilué et des quantités de 160, 80, 40, 20, 10 et 5 pmoles de peptide A β ₁₋₄₂ sont déposées sur la membrane. Nous constatons que l'anticorps anti-A β ₈₋₁₇ est très sensible puisqu'il détecte la présence de 10 pmoles d'A β ₁₋₄₂ synthétique déposées sur la membrane de dot-blot (**Figure 17A**). L'analyse par densitométrie montre que la zone de proportionalité entre l'intensité du signal et la concentration du peptide A β ₁₋₄₂ se situe dans les plus faibles concentrations de peptide A β (entre 10 et 40 pmoles) (**Figure 17B**). Cette zone de proportionalité doit donc toujours être prise en compte pour évaluer la quantité de peptide A β présent dans un échantillon.

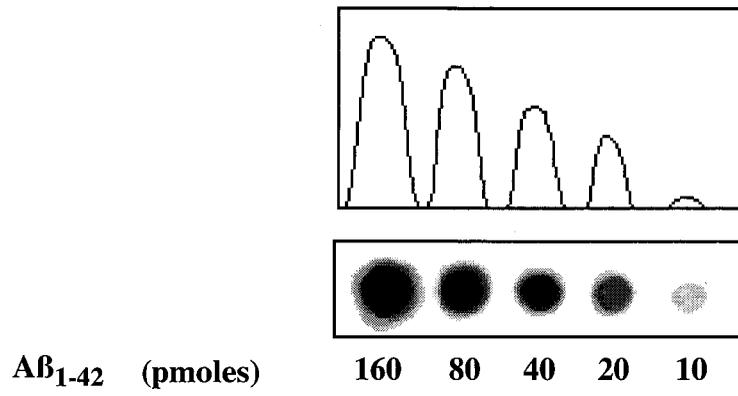
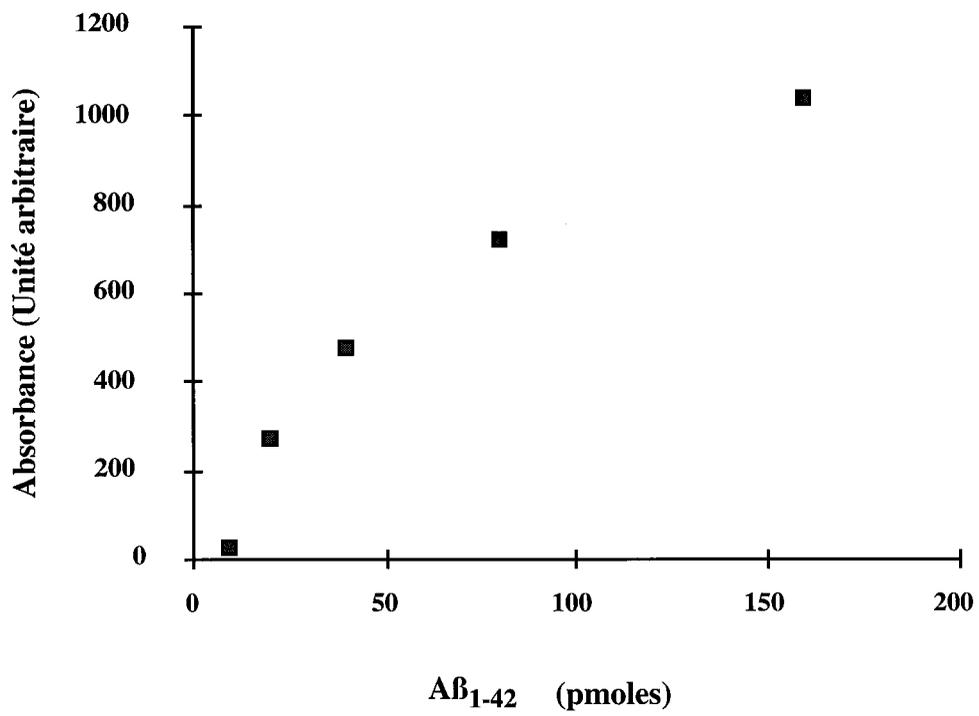
II-3-Standardisation de la méthode

Dans le but de simplifier la méthode quantitative et de permettre son utilisation de façon routinière, des modifications sont envisagées tout en vérifiant qu'elles n'entraînent pas une baisse de la quantité de peptide A β estimée en dot-blot.

II-3-1-Modification de la concentration en acide formique

Une étude est réalisée afin d'évaluer la concentration optimale en acide formique nécessaire pour obtenir la solubilité totale du peptide A β .

Un homogénat total de cortex cérébral de patient atteint de la maladie d'Alzheimer est centrifugé à 100 000g. Le culot C1 est solubilisé en acide formique

A**B**

100%. L'homogénat "acide formique" est réparti en 4 aliquots qui sont ensuite centrifugés à 200 000g puis évaporés sous courant d'azote (N₂). Le matériel lyophilisé est repris dans 4 solutions d'acide formique plus ou moins concentrées (60; 70; 80; 100%) (**Figure 18A**) qui sont ensuite recentrifugées à 200 000g.

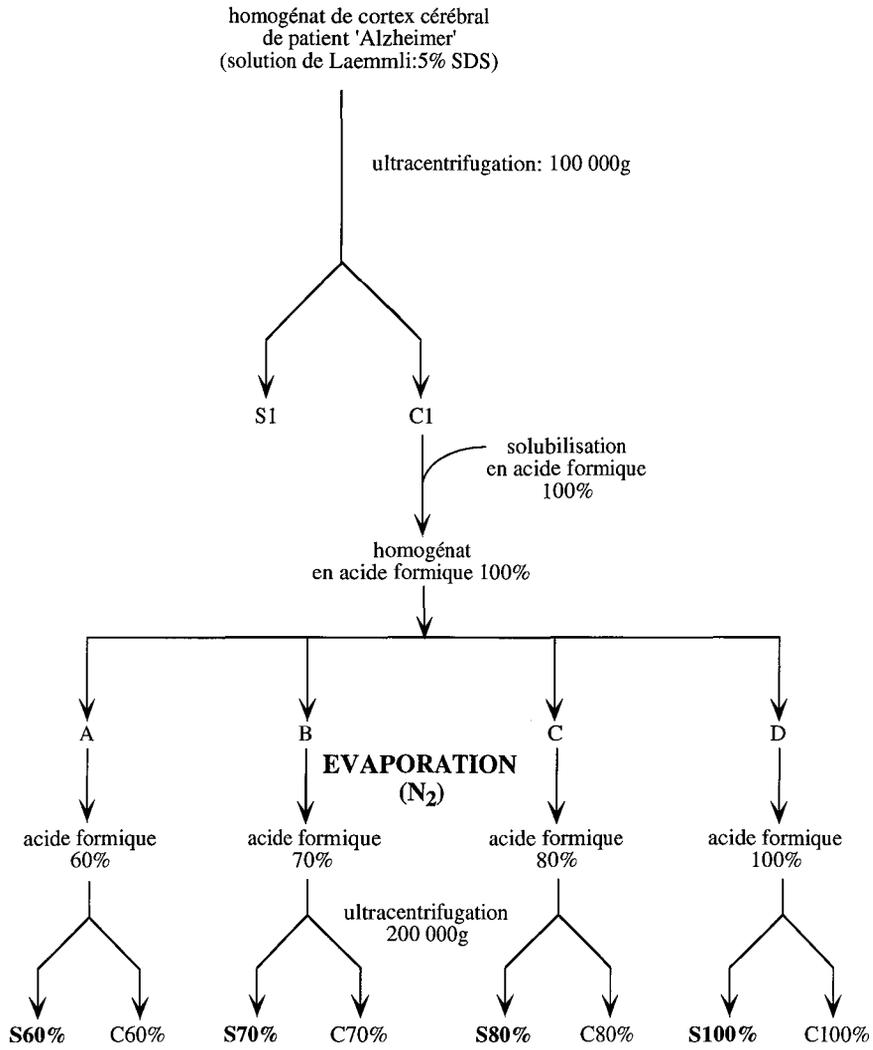
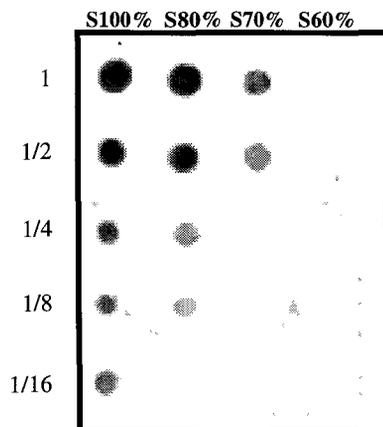
-analyse par dot-blot:

Deux µl de chaque surnageant sont déposés sur une membrane d'Immobilon P (**Figure 18B**). Avec l'anticorps monoclonal anti-Aβ₈₋₁₇, un signal est observé dans les surnageants à 100, 80 et 70% d'acide formique. Aucun signal n'est observé dans le surnageant à 60 % d'acide formique. Ceci indique que la solubilisation du peptide Aβ demande au minimum une solution d'acide formique à 70%. De plus, le signal le plus intense est constaté dans le surnageant en acide formique 100%. Les conditions optimales requises pour la solubilisation et la quantification du peptide Aβ implique donc l'utilisation d'acide formique concentré à 100% (**Figure 18B**).

II-3-2-Extraction du peptide Aβ par centrifugation basse vitesse
(14 000g)

Durant le protocole de purification, le peptide Aβ se trouve dans le surnageant S_{200 000g}. D'un point de vue pratique, cette ultracentrifugation complique une analyse de la quantité de peptide Aβ sur une série importante de cerveaux et interdit une éventuelle standardisation à des laboratoires d'analyses. Nous avons donc vérifié si une centrifugation basse vitesse pouvait remplacer une ultracentrifugation (200 000g).

Un homogénat total de cortex cérébral de patient atteint de la maladie d'Alzheimer est centrifugé à 100 000g. Le culot C1 est repris en acide formique 100%, homogénéisé et séparé en deux fractions identiques dont l'une est centrifugée à haute vitesse (200 000g), et l'autre à basse vitesse (14 000g) pendant 1 heure (**Figure 19A**).

A**B**

Les surnageants S_{200 000g} et S_{14 000g} sont analysés par immunoempreintes et en dot-blot.

-Analyse en électrophorèse (Tris-Tricine)

Les surnageants S_{200 000g} et S_{14 000g} sont évaporés sous courant d'azote (N₂). Le matériel lyophilisé est repris par une quantité équivalente de solution de Laemmli (urée 6 M). Avec l'anticorps monoclonal anti-A β ₈₋₁₇, l'analyse par immunoempreintes révèle une bande située à 4 kDa dans les deux surnageants S_{200 000g} et S_{14 000g}. De plus, la "trainée" immunomarquée dans la région des hauts poids moléculaires est retrouvée dans les deux surnageants. Ceci montre que le peptide A β est présent dans les deux surnageants S_{200 000g} et S_{14 000g} (**Figure 19B**).

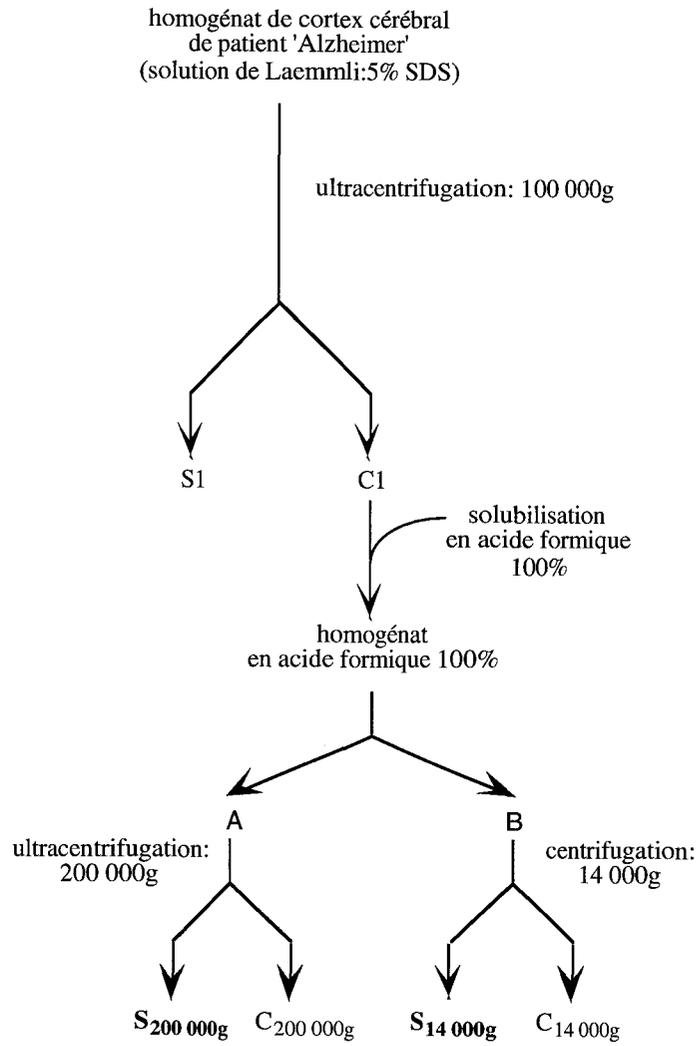
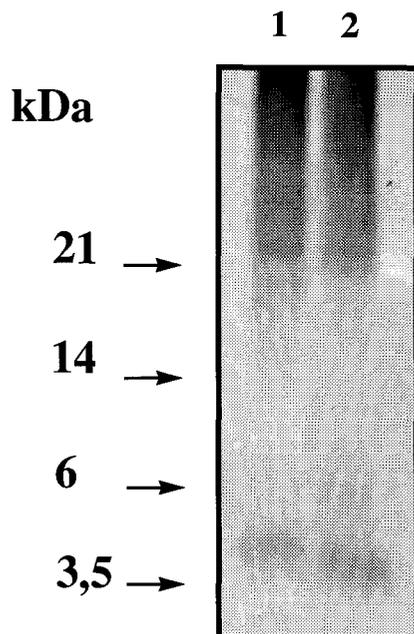
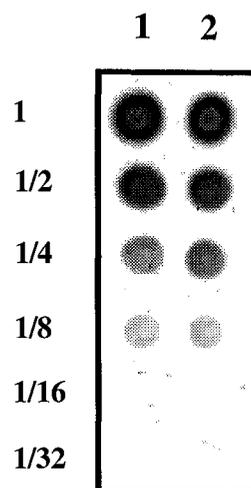
-Analyse en dot-blot

Avec l'anticorps monoclonal anti-A β ₈₋₁₇ (Dako), nous constatons la présence du peptide A β dans les deux surnageants S_{200 000g} et S_{14 000g}. La sensibilité de détection est la même dans les deux cas, ce qui indique qu'il n'y a pas de perte de peptide A β lors de la centrifugation basse vitesse (14 000g) (**Figure 19C**).

II-3-3-Conclusion

Nous sommes en mesure d'extraire la substance amyloïde présente dans un homogénat total de cortex cérébral de patient atteint de la maladie d'Alzheimer. La solubilisation maximale du peptide A β exige l'utilisation d'acide formique 100%. Par contre, la centrifugation basse vitesse (14 000g) est suffisante pour séparer le peptide A β des autres éléments particuliers tels que le collagène ou les constituants de la lame basale des vaisseaux.

Si nous appliquons ce protocole de purification à un homogénat de cortex cérébral de sujet témoin exempt d'amyloïde, nous obtenons également un culot (C1) ne contenant uniquement que du matériel particulaire insoluble (collagène, vaisseaux).

A**B****C**

En conclusion, le protocole de purification du peptide A β retenu pour une quantification en dot-blot est la suivante: La reprise du culot (C1) se fera par de l'acide formique 100%. Le matériel encore insoluble dans ces conditions sera précipité par une centrifugation basse vitesse (14 000g). La présence du peptide dans les surnageants S_{14 000g} sera analysée quantitativement avec l'anticorps monoclonal anti-A β ₈₋₁₇ (Dako), par comparaison à la gamme étalon de peptide A β ₁₋₄₂ précédemment décrite. Une fois ce protocole établi, nous sommes en mesure d'analyser le contenu de peptide A β agrégé dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et d'individus âgés. Il faut cependant noter qu'il existe de nombreuses espèces de peptide A β (A β ₁₋₃₉, A β ₁₋₄₀, A β ₄₋₄₀, ...) dans la substance amyloïde qui sont susceptibles d'être détectés par l'anti-A β ₈₋₁₇ (Dako). Par conséquent, si la quantité de peptide A β déterminée en dot-blot est exprimée en équivalent de peptide A β ₁₋₄₂, elle représente en fait l'ensemble des espèces A β détectées par dot-blot.

III-RECHERCHE D'UNE RÉGION CÉRÉBRALE ENVAHIE PAR LA SUBSTANCE AMYLOÏDE

Nous savons que les régions du néocortex sont préférentiellement envahies par les dépôts de substance amyloïde durant la maladie d'Alzheimer. Notre étude sera donc ciblée sur ces régions. Durant la quantification des dépôts amyloïdes, des variations peuvent être observées en fonction des difficultés rencontrées lors de la dissection. Certaines aires du néocortex plus petites ou moins bien délimitées que les autres ne seront disséquées efficacement que par une personne expérimentée. Dans cette étude préliminaire, il s'agit donc non seulement de tester la technique quantitative de dot-blot, mais également de déterminer une région du néocortex suffisamment définie pour ne pas biaiser notre analyse biochimique du peptide A β .

III-1-Présentation d'une population de 17 individus âgés

Une étude est menée à partir d'une population de 17 individus âgés ($88,05 \pm 6,84$ ans) qui se compose de 4 patients atteints de la maladie d'Alzheimer (A6-A9), 2 individus considérés comme des cas précliniques de la maladie d'Alzheimer (A1-A2), 2 sujets témoins avec des troubles cognitifs (T8-T9), 7 personnes âgées non démentes (T1-T7), 1 personne souffrant de démence mixte (Alzheimer+vasculaire) (M1) et 1 personne atteinte de démence de type Alzheimer associée à des troubles parkinsoniens (P1).

A l'autopsie, l'hémisphère droit est congelé à -80°C pour l'étude biochimique, tandis que l'hémisphère gauche est fixé dans une solution contenant 10% de formol pour permettre les analyses neuropathologiques. Les aires de Brodmann 9, 22, 39 et 44 sont plus spécifiquement analysées.

III-2-Données neuropathologiques

Les cerveaux de 4 patients atteints de la maladie d'Alzheimer sont les plus sérieusement touchés par les lésions de type neurofibrillaire et les dépôts de substance amyloïde (**Tableau 1**). En effet, l'examen neuropathologique montre des dépôts diffus, de très nombreuses plaques séniles ainsi que de l'angiopathie amyloïde. Seul le patient A9 ne démontre pas la présence d'angiopathie amyloïde dans le cerveau.

Les 2 individus considérés comme des cas pré-cliniques de la maladie d'Alzheimer (A1-A2) montrent non seulement des dépôts amyloïdes dans le néocortex (**Tableau 1**) mais en plus de la DNF dans l'hippocampe, le gyrus para-hippocampique et le cortex temporal inférieur (aire 20).

On constate que chez certains individus âgés, ne souffrant d'aucune démence (T5-T6), des dépôts amyloïdes peuvent être observés en abondance dans le néocortex et ce, en absence de NFTs (**Tableau 1**).

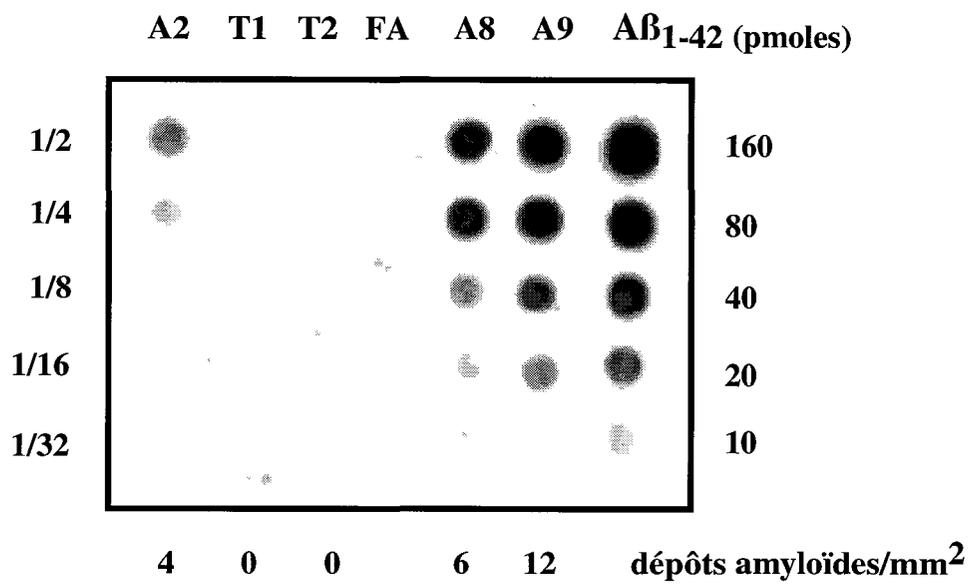
Une analyse biochimique de la substance amyloïde est effectuée dans les 4 aires données (aire 9, 22, 39, 44). Ce premier test permettra de confronter nos données avec les données neuropathologiques.

III-3-Quantification du peptide A β par dot-blot

III-3-1-Analyse dans l'aire de Brodmann 22

Une analyse par dot-blot des surnageants S_{14 000g} "acide formique 100%" est effectuée. Une forte immunoréactivité pour le peptide A β est observée dans l'aire de Brodmann 22 chez les patients 'Alzheimer' (A8-A9: **Figure 20**). Par contre, les sujets témoins qui ne présentent pas de dépôts amyloïdes à l'examen neuropathologique, ne donnent aucun signal par dot-blot (T1-T2: **Figure 20**). Nous constatons qu'aucun bruit de fond n'est obtenu en présence d'acide formique 100% déposé directement sur la membrane (**Figure 20**). Une faible immunoréactivité est observée chez l'individu dont le cerveau ne présente dans l'aire 22 que quelques dépôts amyloïdes (A2: **Figure 20**). D'après ces premiers résultats, une corrélation semble exister entre les données neuropathologiques et biochimiques.

L'étude est poursuivie à l'ensemble des 16 cas (l'aire de Brodmann 22 du patient T4 n'étant pas disponible). La quantification biochimique du peptide A β présent dans chacune des fractions est évaluée en pmoles de peptide A β ₁₋₄₂/mg de cortex. Puisque l'étude comporte un faible nombre de sujets (16 cas), le test statistique non paramétrique de Spearman est choisi pour comparer les données neuropathologiques et biochimiques. Une corrélation nette est observée dans l'aire 22 entre les 2 types de données (**Figure 21**). La quantité la plus importante de peptide A β est retrouvée chez le patient atteint de démence mixte (Alzheimer+ vasculaire). L'examen neuropathologique de ce patient montrait un cerveau complètement envahi par les dépôts amyloïdes (dépôts diffus, angiopathie amyloïde, plaques séniles). Ensuite, ce sont les patients 'Alzheimer' qui sont les plus sérieusement touchés (**Figure 21**). Les 2 individus situés



aux stades pré-cliniques de la maladie d'Alzheimer démontrent une plus faible quantité de peptide A β ₁₋₄₂/mg de cortex (**Figure 21**).

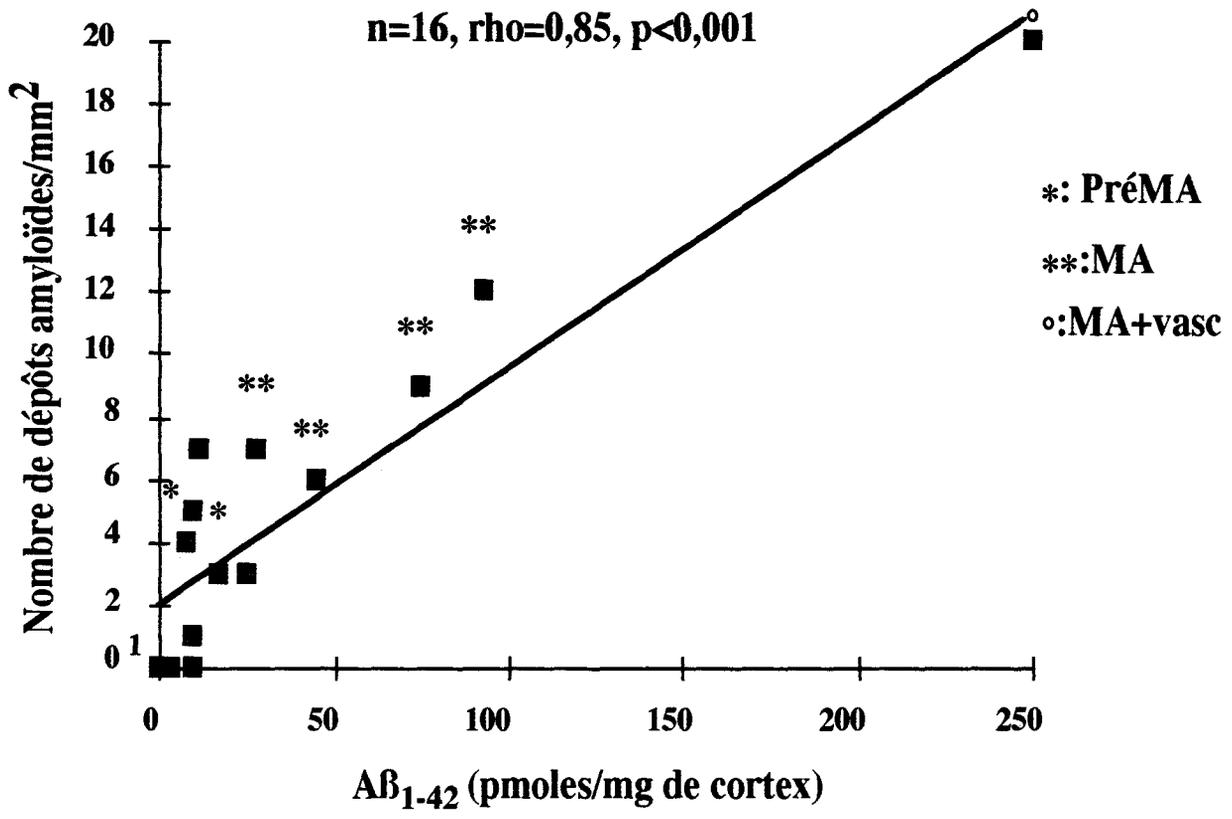
III-3-2-Analyse dans les aires de Brodmann 9, 39 et 44

L'étude est poursuivie sur les 3 autres aires néocorticales dans le but de confirmer l'existence d'une corrélation entre les deux différentes techniques. La quantification biochimique est corrélée avec le nombre de dépôts amyloïdes déterminés par examen neuropathologique dans les aires 22, mais aussi 9, 39 (**Tableau 2**). Des variations parfois importantes sont observées dans l'aire de Brodmann 44 (**Tableau 2**).

Tableau 2:

Aire analysée	n	rho	p
9	17	0,85	0,001
22	16	0,85	0,001
39	17	0,78	0,002
44	17	0,70	0,005

L'aire 44 étant très petite, il est difficile de la prélever lors de la dissection. Les échantillons pourraient dès lors être contaminés par de la substance blanche. Une quantité importante de constituants lipidiques se retrouvent dans le culot (C1) et sont partiellement solubilisés en acide formique 100%. En dot-blot, une diminution importante de l'immunoréactivité est ainsi constatée, ce qui engendre des difficultés lors de la quantification biochimique du peptide A β . L'extraction de ces lipides par des solvants organiques a été volontairement évitée car cela aurait eu pour effet d'éliminer une quantité importante de peptide A β . Une méthode alternative est d'utiliser une homogénéisation du tissu avec une solution de Laemmli à 10% .



III-3-3-Conclusion

Nous disposons d'une méthode fiable pour la quantification du peptide A β agrégé puisqu'une bonne corrélation a été observée dans 3 des 4 aires analysées (aire 22, 9, 39). L'aire 9 occupe une surface importante dans la région frontale du cerveau et ne pose pas de difficultés majeures lors de la dissection. De part sa situation topographique, son analyse permet de quantifier la substance amyloïde présente très fréquemment dans le pôle frontal. L'aire de Brodmann 39 est également une aire facilement repérable lors de la dissection. De plus, elle est située dans une région "carrefour" entre les lobes temporaux et occipitaux. L'analyse de ces deux aires permet donc d'évaluer la quantité de substance amyloïde présente dans le néocortex. Ces deux aires sont donc désormais retenues pour analyser biochimiquement la substance amyloïde dans le cerveau.

III-4-Quantification biochimique du peptide A β et présence des différents types de dépôts amyloïdes

La substance amyloïde qui s'accumule dans le cerveau se présente sous la forme de dépôts diffus, de plaques séniles compactes et de dépôts situés dans la paroi des vaisseaux (angiopathie amyloïde). Nous voudrions vérifier si la méthode de dot-blot permet de quantifier le peptide A β présent dans les dépôts diffus ou dans l'angiopathie amyloïde.

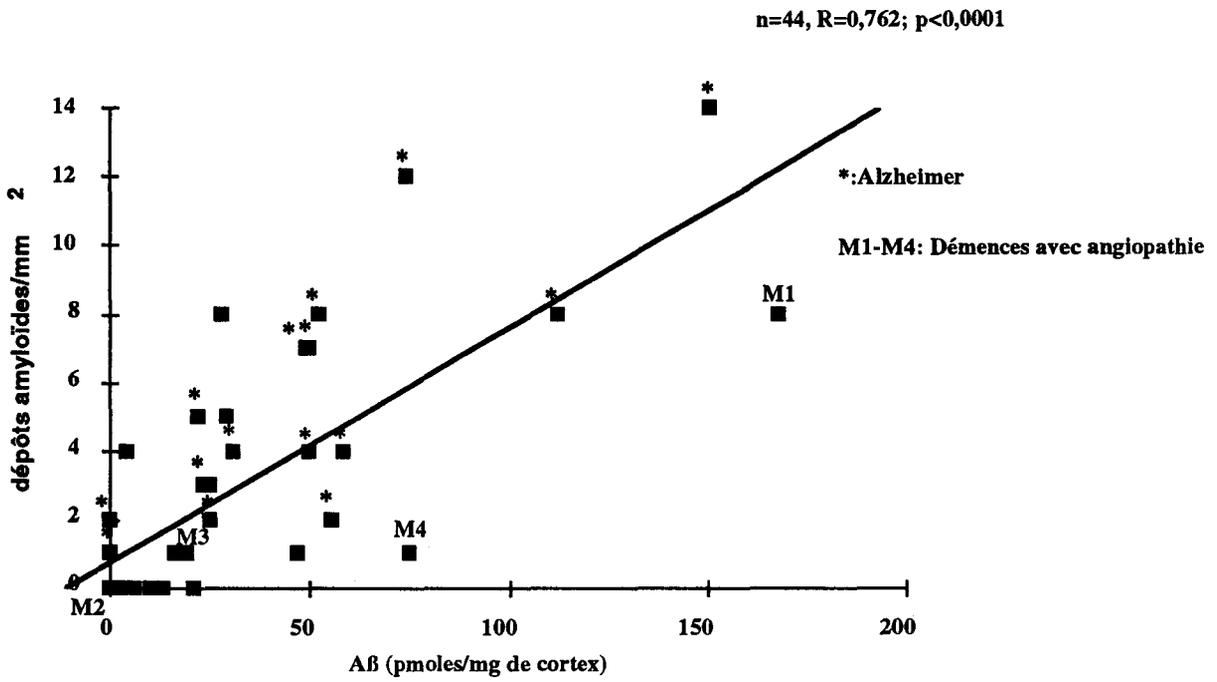
Nous disposons d'une population totale de 79 individus (**Tableau 8, matériels et méthodes**). Toutefois, les données neuropathologiques des aires 9 et 39 ne sont disponibles que pour 44 d'entre-eux. C'est donc à partir de cette sous-population de 44 individus que les études de corrélation neuropatho-biochimiques peuvent être réalisées.

III-4-1-Analyses biochimiques et neuropathologiques

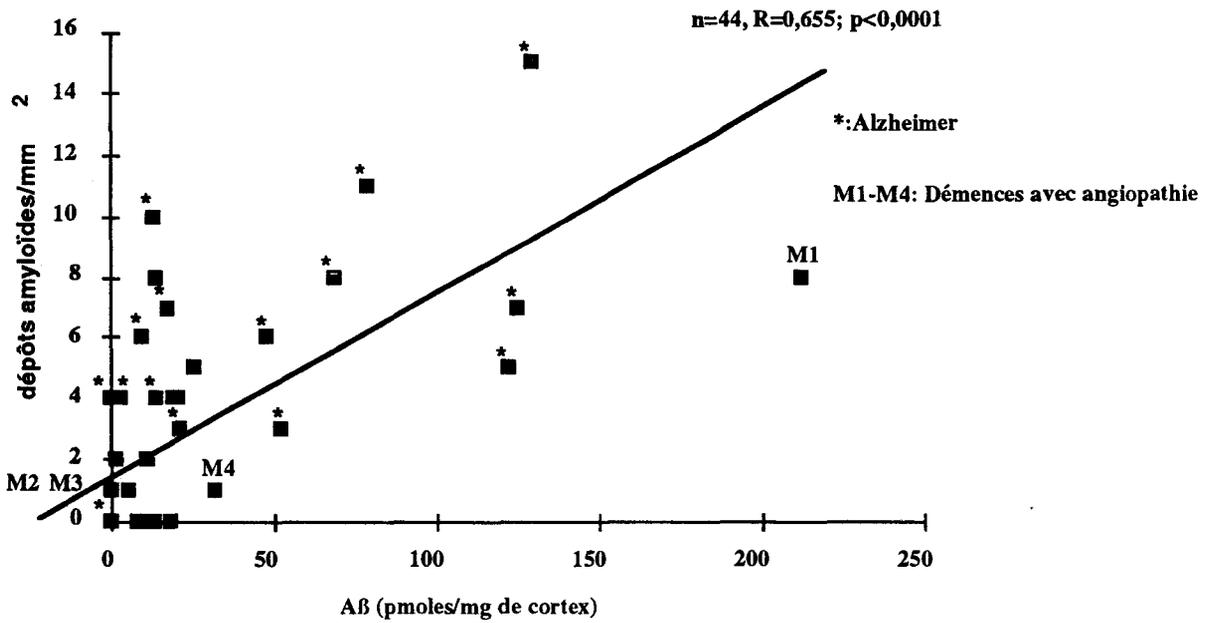
Ce groupe est composé de 10 patients 'Alzheimer' (A6-A15), 5 individus situés aux stades précliniques de la maladie d'Alzheimer (A1-A5), 25 sujets témoins ne souffrant d'aucune démence (T1-T25) et 4 individus atteints de démence mixte (Alzheimer + vasculaire) ou vasculaire avec présence dans le cerveau de quantité importante d'angiopathie amyloïde (M1-M4) (**Tableau 8, matériels et méthodes**).

Les résultats obtenus précédemment sont confirmés puisqu'une corrélation est observée dans les aires de Brodmann 9 ($R= 0,762$; $p=0,0001$) et 39 ($R= 0,655$; $p= 0,0001$) entre les données biochimiques et neuropathologiques (**Figure 22**). Toutefois, nous constatons que certains sujets (ex:M1 et M4) montrent une quantité de peptide A β anormalement élevée par dot-blot (**Figure 22**). L'examen neuropathologique de ces individus ne nous donne qu'un indice semi-quantitatif des dépôts diffus et de l'angiopathie amyloïde dans le cerveau. Ainsi, pour vérifier une corrélation entre les deux méthodes de mesure, nous ne pouvons considérer que la quantité de dépôts amyloïdes sphériques/mm² qui sont beaucoup plus facilement individualisables. Il est donc possible qu'une quantité importante de dépôts diffus ou d'angiopathie amyloïde dans le cortex cérébral puisse provoquer une augmentation de la quantité de peptide A β déterminée par dot-blot. Nous nous proposons donc de vérifier si le peptide A β présent au sein des dépôts diffus ou des dépôts de la paroi des vaisseaux (angiopathie amyloïde) est détectée par dot-blot.

Aire de Brodmann 9



Aire de Brodmann 39



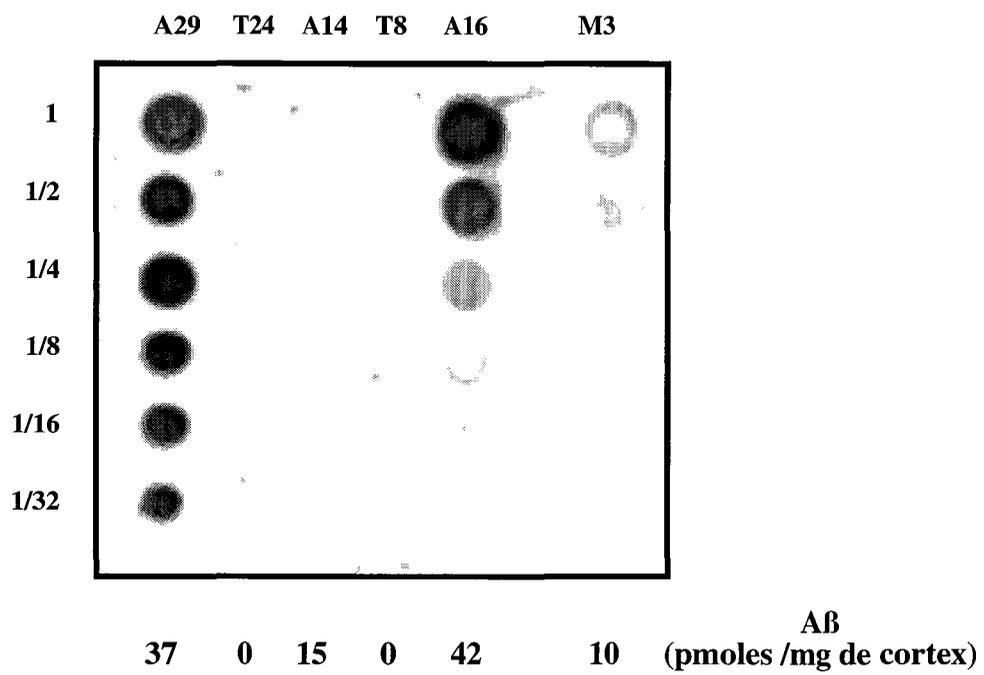
III-4-2-Détection du peptide A β dans l'ensemble des dépôts amyloïdes

III-4-2-1- Détection du peptide A β dans les dépôts diffus

La présence de dépôts diffus dans le cerveau influe-t-elle sur la quantification biochimique du peptide A β ? Les dépôts diffus amorphes sont retrouvés en quantité importante dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer mais ils ne sont pas colorables au rouge Congo puisqu'ils ne présentent pas une structure en feuillets β -plissés. Bien que la région de prédilection de la substance amyloïde soit le néocortex, durant la maladie d'Alzheimer des dépôts exclusivement diffus peuvent être observés dans le cervelet. Une analyse biochimique du cervelet de patients 'Alzheimer' et de sujets témoins va donc permettre de déterminer si le peptide A β des dépôts diffus est effectivement dosable par notre test biochimique.

Cette étude est menée à partir d'une douzaine d'individus comprenant 6 patients 'Alzheimer' (A1, A9, A14, A15, A16, A29), 5 sujets témoins (T3, T8, T19, T20, T21) et 1 sujet atteint de démence vasculaire (M3).

Aucune immunoréactivité pour le peptide A β n'est détectée dans le cervelet des sujets témoins (T8 et T24, **Figure 23**). Par contre, un signal intense est obtenu avec l'anti-A β ₈₋₁₇ dans le cervelet des deux patients 'Alzheimer' (A16 et A29) les plus sérieusement atteints (**Figure 23**). En effet, la quantité moyenne de peptide A β déterminée dans le néocortex (aire 9-aire 39) de ces deux individus a été estimée respectivement à 47 et 32 pmoles /mg de cortex. Un signal positif pour le peptide A β est obtenu également dans le cervelet des autres patients 'Alzheimer', excepté pour le patient (A14) moins sévèrement atteint (15 pmoles de peptide A β /mg de cortex dans le néocortex) (**Figure 23**). Enfin, nous constatons que les patients atteints de démence vasculaire peuvent également présenter de la substance amyloïde dans le cervelet (M3, **Figure 23**).



En conclusion, la présence de substance amyloïde dans le cervelet semble être constatée chez les patients 'Alzheimer' les plus sévèrement touchés par l'amyloïdose. Toutefois, la maladie d'Alzheimer est hétérogène et il n'est pas exclu que cette observation ne soit valable que pour un sous-groupe de patients 'Alzheimer'. Ces résultats indiquent qu'il est possible de quantifier par dot-blot le peptide A β des dépôts diffus, non agrégé sous la forme de filaments amyloïdes. Ce type de dépôts pourrait donc être à l'origine de différences observées entre données neuropathologiques et biochimiques.

Puisque le fragment P3 a été déterminé comme la forme A β majoritaire des dépôts diffus, nous avons également testé l'anticorps polyclonal anti-A β ₁₇₋₂₈ sur les préparations de cervelet. Le marquage obtenu avec cet anticorps n'a montré aucune différence avec celui de l'anti-A β ₈₋₁₇ (Dako) puisqu'un signal positif a été obtenu chez les mêmes individus. Le marquage obtenu avec l'anti-A β ₈₋₁₇ indique donc que les dépôts diffus du cervelet ne sont pas uniquement constitués que de fragments P3 (A β ₁₇₋₄₂).

III-4-2-2-Détection du peptide A β dans les dépôts amyloïdes des vaisseaux cérébraux.

Quatre des individus étudiés sont atteints soit de démence mixte, soit de démence vasculaire (M1-M4: Tableau 8, matériels et méthodes). L'examen neuropathologique montre chez deux de ces patients une quantité importante d'angiopathie amyloïde dans le cerveau (M1 et M4). On constate que la quantité de peptide A β déterminée par dot-blot chez ces individus est anormalement élevée (figure 22). La présence d'angiopathie amyloïde chez ces individus semble donc modifier le dosage biochimique du peptide A β . De plus, une meilleure corrélation entre les tests biochimiques et neuropathologiques est obtenue si l'on soustrait ces individus de l'étude puisque les coefficients de corrélation (R), correspondant aux aires 9 et 39, s'élèvent respectivement à 0,821 et 0,699.

En conclusion, le peptide A β agrégé dans la paroi des vaisseaux (angiopathie amyloïde) est également détecté par dot-blot. Ceci peut donc expliquer que, chez certaines personnes dont le cerveau présente une quantité importante d'angiopathie amyloïde, des variations peuvent être observées entre données neuropathologiques et quantification biochimique.

III-4-2-3-Conclusion

La quantification biochimique reflète la quantité globale de peptide A β agrégé au sein des plaques séniles compactes, des dépôts situés dans la paroi des vaisseaux (angiopathie amyloïde) et des dépôts diffus préamyloïdes. Malgré cela, une corrélation nette existe entre les données biochimiques et neuropathologiques (nombre de dépôts amyloïdes/mm²). S'il est important de distinguer la quantité de peptide A β présente dans les plaques séniles de celle présente dans les vaisseaux, ce test ne pourra cependant pas s'appliquer aux démences vasculaires et aux démences mixtes.

IV-ANALYSE QUANTITATIVE DU PEPTIDE A β

L'hypothèse d'un rôle prépondérant de l'amyloïde est souvent avancé durant la maladie d'Alzheimer. Les mutations du gène de l'APP ne sont associées qu'aux formes familiales de la maladie d'Alzheimer puisqu'elles ne sont jamais observées dans la population normale. De plus, la neurotoxicité du peptide A β agrégé est un argument supplémentaire en faveur d'un rôle important de l'amyloïde dans l'étiopathogénèse des lésions de la maladie d'Alzheimer. Toutefois, les études menées *in vitro* montrent que la neurotoxicité du peptide A β dépend en grande partie de sa concentration. Or, les techniques neuropathologiques ne permettent pas d'estimer la quantité totale de peptide A β présent dans le cerveau d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer. Les résultats sont donnés en nombre de dépôts amyloïdes/mm² ou, si les techniques d'analyse sont

plus sophistiquées (analyse d'image couplée à un ordinateur) en pourcentage d'aire corticale envahie par la substance amyloïde. Ainsi, les difficultés à établir un bon modèle *in vivo* de la maladie d'Alzheimer proviennent peut-être d'une méconnaissance de la quantité de peptide A β susceptible de provoquer une neurodégénérescence.

IV-1-Analyse comparative du contenu en peptide A β entre patients 'Alzheimer' et sujets témoins

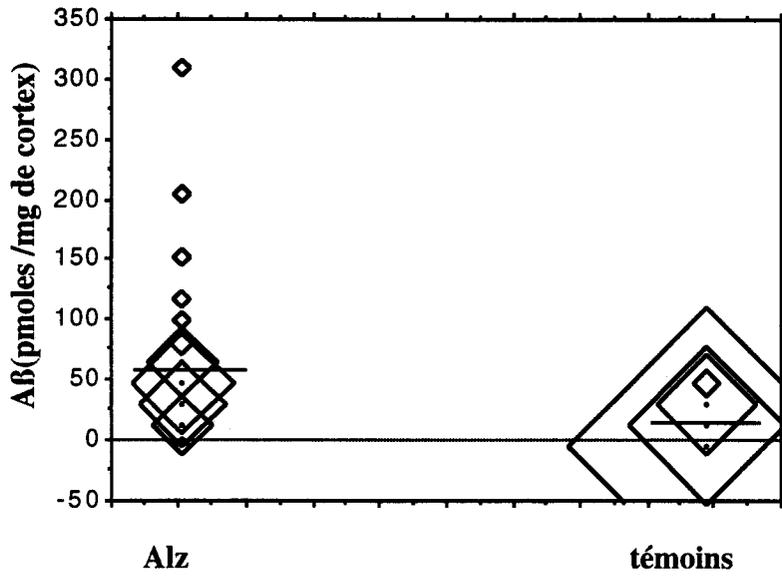
La population étudiée se compose de 39 sujets témoins (82,02 \pm 10,46 ans) et de 30 patients atteints de la maladie d'Alzheimer (81,13 \pm 11,72 ans). Les sujets atteints de démence mixte ou vasculaire ainsi que ceux considérés comme stades précliniques de la maladie d'Alzheimer ont été volontairement évités. Les aires de Brodmann 9 et 39 sont analysées. La quantité moyenne de peptide A β par milligramme de cortex, dans les aires 9 et 39 de chaque sous-population (Alzheimer et témoins) est figurée dans le tableau 3.

Tableau 3: Quantité moyenne de peptide A β /mg de cortex chez les patients 'Alzheimer' et les individus témoins

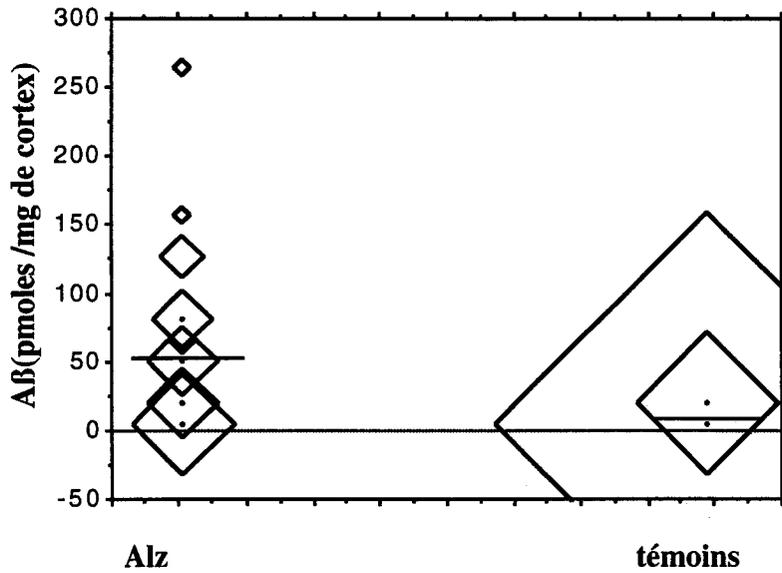
Quantité d'A β pmoles /mg de cortex	AIRE 9	AIRE 39
'Alzheimer' (n=30)	61,53 \pm 64,41	55,56 \pm 57,56
Témoins (n=39)	9,07 \pm 13,39	4,97 \pm 7,44

Nous constatons qu'il existe d'importantes variabilités inter-individuelles dans chaque sous-population qui se vérifie par l'existence d'écart-types particulièrement importants (Tableau 3). Cependant, une augmentation significative de la quantité de peptide A β est observée dans les aires 9 et 39 du cerveau des patients 'Alzheimer' (p=0,0001) (Figure 24). Le groupe des patients 'Alzheimer' se distingue donc de celui

AIRE 9



AIRE 39



des sujets non déments présentant de la substance amyloïde dans le cerveau. Les données de la littérature qui se basent sur les méthodes neuropathologiques, indiquent qu'il n'existe pas de corrélation entre la démence et la quantité de substance amyloïde dans le cerveau. Nos résultats ne nous permettent pas de poser le diagnostic de la maladie d'Alzheimer mais ils montrent que la formation de la substance amyloïde est un processus majeur durant le développement de la maladie.

IV-2-Détermination de la quantité de peptide A β dans un cerveau 'Alzheimer'

Durant nos travaux de recherche, de nombreuses régions corticales du cerveau ont été analysées, regroupant les pôles frontaux, pariétaux, temporaux et occipitaux. Nous avons ainsi pu constater que la distribution de la substance amyloïde dans le cerveau d'un patient 'Alzheimer' était relativement homogène. Nous pouvons donc évaluer la quantité globale de peptide A β agrégé dans un cerveau total de patient atteint de la maladie d'Alzheimer. Le volume de la substance grise a été estimé entre 230 et 561 cm³ (1cm³ équivaut à 1 g de substance grise) en fonction de l'atrophie corticale plus ou moins sévère durant la maladie d'Alzheimer (Blinkov et Glezer, 1968). Ainsi, si l'on se base sur les données indiquées dans le **tableau 3**, la quantité de peptide A β agrégé dans le cerveau d'un patient 'Alzheimer' varierait de 13 μ moles (50 mg) à 34 μ moles (155 mg).

La quantification biochimique du peptide A β à partir d'homogénats de cortex cérébral a été réalisée par différentes équipes en utilisant des techniques diverses telles que le sandwich ELISA, le dot-blot ou le Western-blot (Frucht et Koo, 1993; Gravina *et al.*, 1995; Saido *et al.*, 1995). Récemment, une estimation de la quantité de peptide A β dans un cerveau de patient 'Alzheimer' a été proposée (Gravina *et al.*, 1995). Selon cette procédure, le surnageant d'un homogénat de cortex cérébral en acide formique 70% est analysé par Sandwich ELISA avec des anticorps spécifiques des fragments A β ₄₀ et A β ₄₂. Chez les patients 'Alzheimer', les quantités maximales de peptide A β ₄₀ et A β ₄₂

(observées chez les patients présentant beaucoup d'angiopathie congophile) ont été évaluées respectivement à 14 et 5 pmoles/mg de cortex. Il semble donc que l'homogénéisation directe du cortex cérébral dans de l'acide formique ne permet pas de solubiliser efficacement la totalité du peptide A β agrégé. De plus, nous avons montré que la solubilisation du peptide A β en acide formique 70% n'est que partielle et que la quantification nécessite alors l'utilisation d'acide formique 100%. Enfin les anticorps utilisés sont dirigés contre les peptides A β ₄₀ et A β ₄₂. Or ces peptides ne sont pas les seuls fragments A β présents au sein des dépôts amyloïdes (Miller *et al.*, 1993). La méthode développée au laboratoire permet probablement de solubiliser la majorité du peptide A β agrégé et donc d'estimer le plus fidèlement possible la quantité de peptide A β présent au sein des dépôts amyloïdes.

IV-3-Quantité de peptide A β en fonction des facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer

La méthode biochimique de dot-blot permet d'estimer la quantité globale de peptide A β présent dans un cerveau total de patient atteint de la maladie d'Alzheimer. Toutefois, des variations parfois importantes de la quantité de peptide A β peuvent être constatées puisque nous avons estimé ces quantités dans un cerveau total entre 50 et 155 mg de peptide A β . Nous recherchons donc les facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer susceptibles d'influer sur la quantité de peptide A β .

IV-3-1-Influence de l'âge et du sexe sur la quantité de peptide A β

L'âge est le facteur de risque le plus clairement établi de la maladie d'Alzheimer. Selon certains auteurs, le sexe serait également un autre facteur de risque puisque la maladie d'Alzheimer serait plus fréquente chez les femmes même en tenant compte de leur durée de vie plus importante. Différents tests statistiques sont effectués à partir des données biochimiques (quantité de peptide A β /mg de cortex) obtenues dans

les aires de Brodmann 9 et 39 de la population de 69 individus (30 patients 'Alzheimer et 39 sujets témoins).

-Un test de simple régression linéaire est réalisé afin d'étudier l'influence de l'âge sur la quantité de peptide A β .

-La population totale comprend 46 personnes du sexe féminin et 23 personnes du sexe masculin. L'influence éventuelle du sexe de l'individu est étudiée par le test de Mann-Whitney.

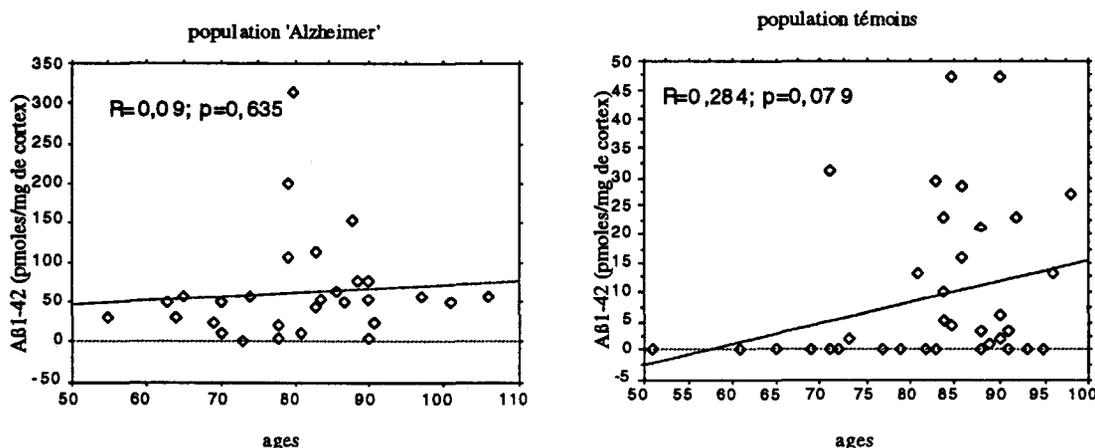
Nous n'observons pas d'augmentation significative de la quantité de peptide A β en fonction du sexe de l'individu (**Tableau 4**). En effet, les risques (p) indiqués dans le **tableau 4** sont très élevés pour chaque sous-population, et ce dans les aires 9 et 39. De même, aucune influence de l'âge sur la présence de peptide A β dans le cerveau n'a été constatée chez les patients 'Alzheimer' (**Tableau 4 et Figure 25**). Par contre, malgré des résultats non significatifs (p=0,079 et p= 0,141), une légère tendance à l'augmentation serait observée dans l'aire 9, chez les individus témoins en fonction de l'âge (**Tableau 4 et Figure 25**).

Tableau 4: Les facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer

POPULATION ÉTUDIÉE	AGE	SEXE	AIRE ANALYSÉE
Population totale (n=69)	p=0,558	p=0,528	AIRE 9
'Alzheimer' (n=30)	p=0,635	p=0,791	
Témoins (n=39)	p=0,079	p=0,461	
Population totale (n=69)	p=0,819	p=0,645	AIRE 39
'Alzheimer' (n=30)	p=0,785	p=0,403	
Témoins (n=39)	p=0,141	p=0,893	

FIGURE 25

Influence de l'âge sur la quantité de peptide AB détectée dans l'aire 9



IV-3-2-L'influence du génotype de l'Apo E sur la quantité d'AB

L'allèle $\epsilon 4$ de l'Apo E, un autre facteur de risque de la maladie d'Alzheimer, pourrait également avoir une influence sur l'accumulation de peptide AB dans le cerveau. En effet, il a été démontré que la fréquence de l'allèle $\epsilon 4$ augmente de façon très significative chez les patients atteints de maladies d'Alzheimer familiales et sporadiques à début tardif mais aussi précoces (pour revue voir Chartier-Harlin et Pérez-Tur, 1995). Il semblerait qu'une augmentation du nombre de dépôts amyloïdes soit observée chez les patients 'Alzheimer' et les sujets témoins porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ (Schmechel *et al.*, 1993; Berr *et al.*, 1994). Une augmentation significative de la quantité de peptide AB a été retrouvée dans le cerveau des patients 'Alzheimer' ($p=0,0001$) (Figure 24). Il est donc intéressant de vérifier si un lien existe entre cette augmentation et la fréquence de l'allèle $\epsilon 4$ dans la population 'Alzheimer'.

-.Distribution allélique de la population

Le génotype de l'Apo E a été déterminé à partir des homogénats totaux de cortex cérébral des 69 individus de la population. Les fréquences alléliques et l'âge moyen des sous populations 'Alzheimer' et témoins sont indiquées dans le **tableau 5**:

Tableau 5:

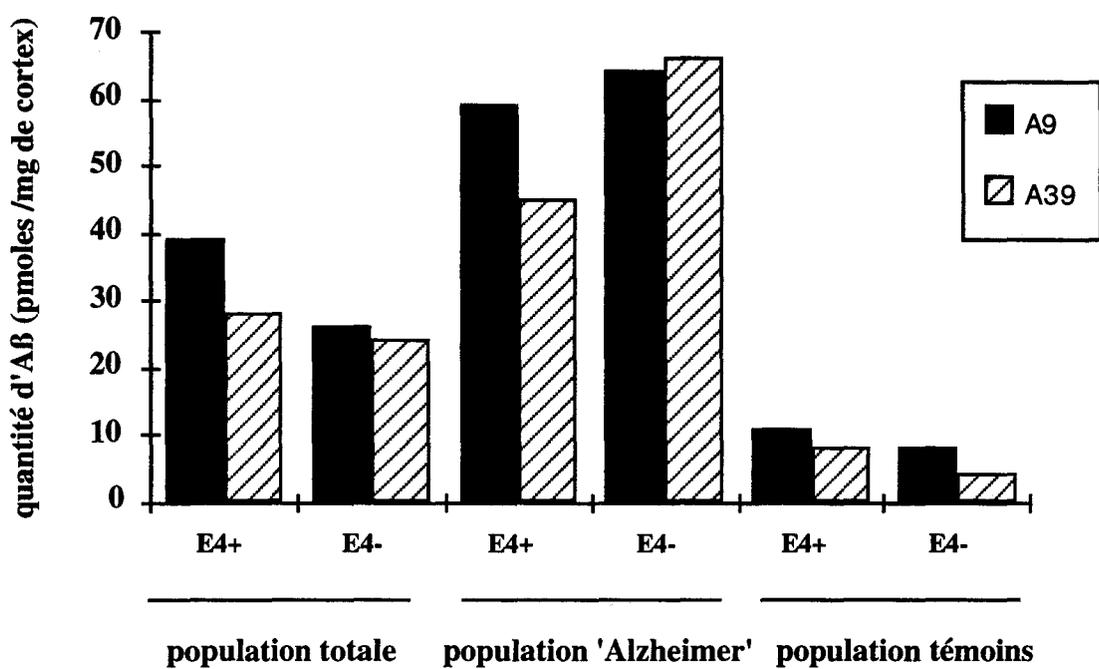
Populations	Fréquence Allélique	Âge moyen
Alzheimer (n=30)	$\epsilon 2$: 6,7%; $\epsilon 3$: 66,7%; $\epsilon 4$: 26,7%	81,13 \pm 11,72 ans
témoins (n=39)	$\epsilon 2$: 6,4%; $\epsilon 3$: 79,5%; $\epsilon 4$: 14,1%	82,02 \pm 10,46 ans

Le pourcentage élevé d'allèle $\epsilon 4$ (26,7%) est caractéristique d'une population de sujets atteints de maladie d'Alzheimer à début tardif. Par contre, la fréquence de l'allèle $\epsilon 2$ dans cette population est anormalement élevée (6,7%) en comparaison avec les données de la littérature. Il faut noter cependant que parmi les 4 patients 'Alzheimer' qui présentent un allèle $\epsilon 2$, trois d'entre-eux sont génotypés $\epsilon 2\epsilon 4$.

-.Influence du génotype de l'Apo E sur la quantité de peptide A β

Dans la population 'Alzheimer', aucune différence significative de la quantité de peptide A β n'est observée entre patients porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ (E4+) et ceux non porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ (E4-) (**Figure 26**). Pourtant, si l'on considère la population totale (population 'Alzheimer' + population témoins), une augmentation significative de la quantité de peptide A β déterminée dans l'aire 9 est constatée chez les individus E4+ ($p=0,04$) (**Figure 26**). Ceci résulte cependant du nombre important de sujets témoins non porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ (E4-) dont le cerveau ne présente pas d'amyloïde.

Génotype de l'Apo E et Quantité de peptide A β



IV-3-3-Conclusion

Si une accumulation de peptide A β agrégé est observée dans le cerveau de personnes âgées non démentes, elle n'est pas comparable à l'amyloïdose cérébrale constatée durant la maladie d'Alzheimer. En effet, une quantité de peptide A β significativement plus élevée a été démontrée chez les patients 'Alzheimer' comparativement aux sujets témoins. Cependant, l'amyloïdose observée chez les patients 'Alzheimer' n'est ni liée au génotype de l'Apo E, ni à l'âge ou au sexe de l'individu. Une analyse qualitative de la substance amyloïde pourrait peut-être permettre l'identification d'un ou plusieurs constituants susceptibles de favoriser l'accumulation du peptide A β durant la maladie d'Alzheimer.

V-ANALYSE QUALITATIVE DE LA SUBSTANCE AMYLOÏDE

Des fragments du peptide A β , tronqués du côté N et/ou C-terminal sont retrouvés au sein des dépôts amyloïdes (Roher *et al.*, 1993 a,b,c; Miller *et al.*, 1993; Mak *et al.*, 1994). Le clivage de l'APP au niveau des sites de l' α , de la β et de la γ sécrétase est vraisemblablement à l'origine de certains de ces fragments. Les mutations des codons 670/671 (situées près du site de la β sécrétase) interviennent sur la sécrétion du peptide A β (Citron *et al.*, 1992; Cai *et al.*, 1993), tandis que la mutation du codon 717 favoriserait la formation de peptide A β ₁₋₄₂ au dépend de l'A β ₁₋₄₀ (Suzuki *et al.*, 1994a; Liepnieks *et al.*, 1993, Iwatsubo *et al.*, 1994; Tamaoka *et al.*, 1994). Le clivage par la β sécrétase provoque la formation du fragment P3 (A β ₁₇₋₄₂) qui serait la forme majoritaire des dépôts diffus (Gowing *et al.*, 1994).

Par ailleurs, certains constituants des dépôts amyloïdes tels que l'Apo E, l' α ₁-antichymotrypsine, et les protéoglycannes pourraient favoriser l'accumulation du peptide A β au sein des dépôts amyloïdes.

Une analyse qualitative de la substance amyloïde est donc entreprise non seulement pour identifier les cofacteurs de l'amyloïdogénèse, mais également afin de rechercher par dot-blot l'existence de fragments A β modifiés.

V-1-Etude des fragments du peptide A β

La quantification du peptide A β par dot-blot est réalisée avec l'anticorps monoclonal anti-A β ₈₋₁₇ (Dako). Cet anticorps réagit contre le peptide A β ₁₋₄₂ (Bachem) mais ne donne aucun signal contre le peptide A β ₁₋₂₈ (Bachem) (**Figure 15**). Une étude est donc réalisée avec l'anticorps polyclonal anti-A β ₁₇₋₂₈ développé au laboratoire qui détecte en dot-blot le peptide A β ₁₋₂₈ (Bachem).

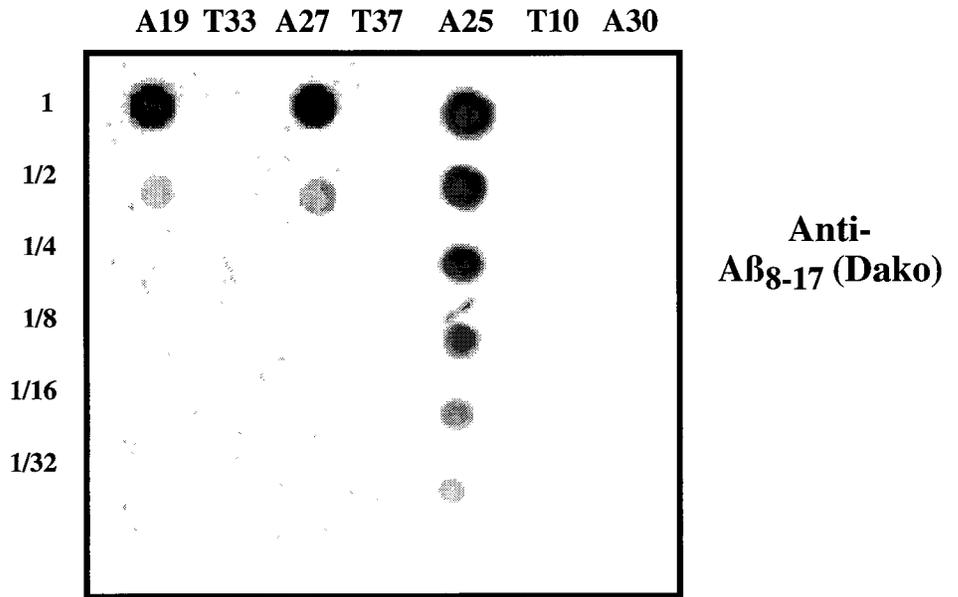
V-1-1-Analyse par dot-blot

Des préparations de substance amyloïde provenant de patients 'Alzheimer' et de sujets témoins sont déposées en dot-blot. Les membranes sont incubées en présence de l'anticorps monoclonal anti-A β ₈₋₁₇ (Dako) ou du polyclonal anti-A β ₁₇₋₂₈. Chez les patients 'Alzheimer', le signal le plus intense est généralement observé avec l'anticorps monoclonal anti-A β ₈₋₁₇ (Dako) (**A25 et A27, Figure 27A**). Toutefois, chez certains patients, la présence du peptide A β est plutôt détectée avec l'anticorps polyclonal anti-A β ₁₇₋₂₈ (**A19 et A30, Figure 27B**). Afin de mieux caractériser l'anticorps polyclonal anti-A β ₁₇₋₂₈, une analyse par électrophorèse (Tris-Tricine) est réalisée.

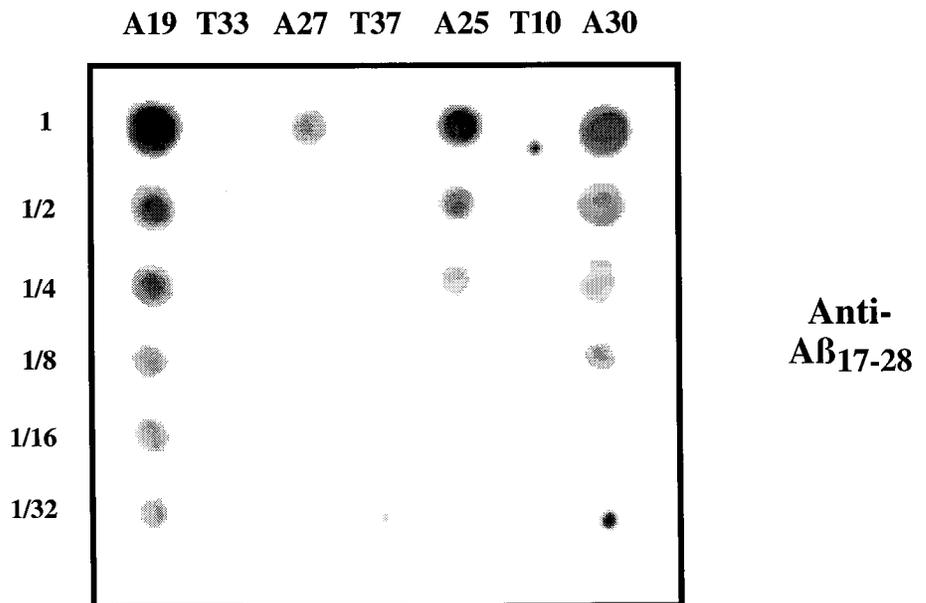
V-1-2-Analyse par immunoempreintes

Une préparation de substance amyloïde de patient 'Alzheimer' en solution de Laemmli (urée 6M) est déposée sur un gel de polyacrylamide. Après transfert, une partie de la membrane est incubée en présence de l'anticorps polyclonal anti-A β ₁₇₋₂₈ ou de l'anticorps monoclonal anti-A β ₈₋₁₇. Généralement, l'analyse par immunoempreintes

A



B

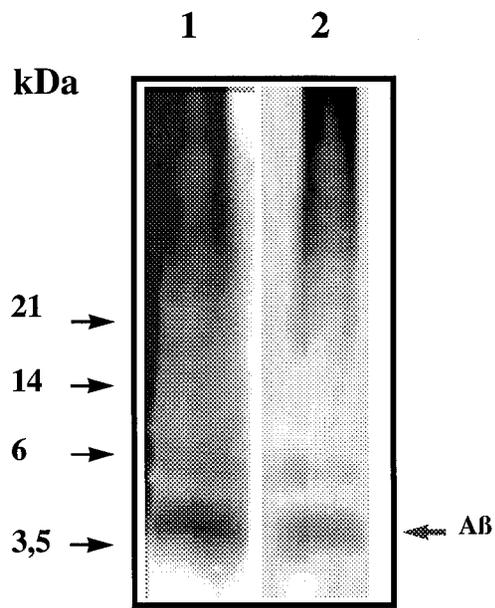


de préparations de substance amyloïde de patient 'Alzheimer', avec l'anticorps monoclonal anti-A β ₈₋₁₇ (Dako), montre l'existence d'une bande unique située à 4 kDa (**Figure 19B**). Toutefois, dans certaines préparations, deux bandes situées à 4 kDa et 6-6,5 kDa sont parfois observées (**Figure 28**). Nous constatons dans ce cas que le marquage obtenu avec les anticorps anti-A β ₈₋₁₇ et anti-A β ₁₇₋₂₈ est identique. En effet, des constituants insolubles identifiés par une "trainée" dans les hauts poids moléculaires sont immunomarqués par les deux anticorps. Dans la région des bas poids moléculaires, la bande située à 4 kDa correspond au peptide A β entier. La bande située aux alentours de 6-6,5 kDa pourrait correspondre à un complexe de différents fragments de peptide A β ou à un fragment amyloïdogénique co-purifié avec le peptide A β au sein de la substance amyloïde.

V-1-3-Conclusion

Nous n'avons pas réussi à distinguer les anticorps anti-A β ₈₋₁₇ et anti-A β ₁₇₋₂₈ par immunoempreintes. En dot-blot, la différence de marquage observée chez certains patients 'Alzheimer' entre ces 2 anticorps, résulterait plutôt d'une question de conformation du peptide A β et de présentation d'épitope sur la membrane de dot-blot.

Il semblerait que les dépôts diffus contiennent préférentiellement du peptide A β ₄₂ tandis que le peptide A β ₄₀ serait plutôt retrouvé dans les dépôts de la paroi des vaisseaux (angiopathie amyloïde) (Mak *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1994). Ainsi, l'utilisation d'anticorps spécifiques de ces peptides nous permettrait peut-être d'identifier les patients dont le cerveau est envahi par les dépôts diffus ou par l'angiopathie amyloïde.



V-2-Les constituants de la substance amyloïde

Certains constituants des dépôts amyloïdes (l' α_1 -antichymotrypsine, l'apolipoprotéine E, les protéoglycannes), participeraient directement à la formation des fibres insolubles de peptide A β (Wisniewski et Frangione, 1992; Ma *et al.*, 1994; Snow *et al.*, 1994 a, b). Si tel est le cas, ils devraient être copurifiés avec le peptide A β dans la préparation de substance amyloïde.

V-2-1-Outils immunologiques

Différents anticorps dirigés contre des constituants des dépôts amyloïdes comme les protéoglycannes, l'apolipoprotéine E, l' α_1 -antichymotrypsine et le composé P amyloïde ont été testés.

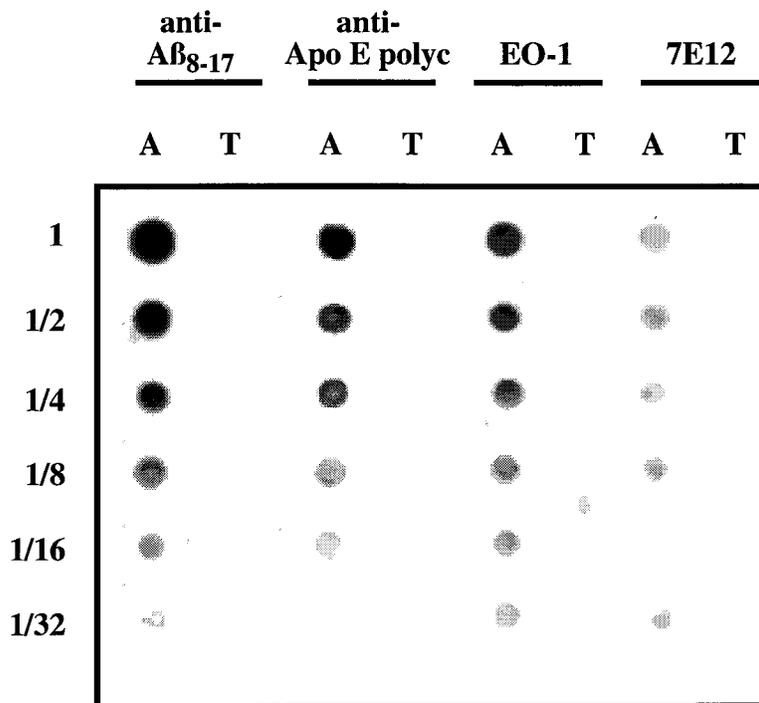
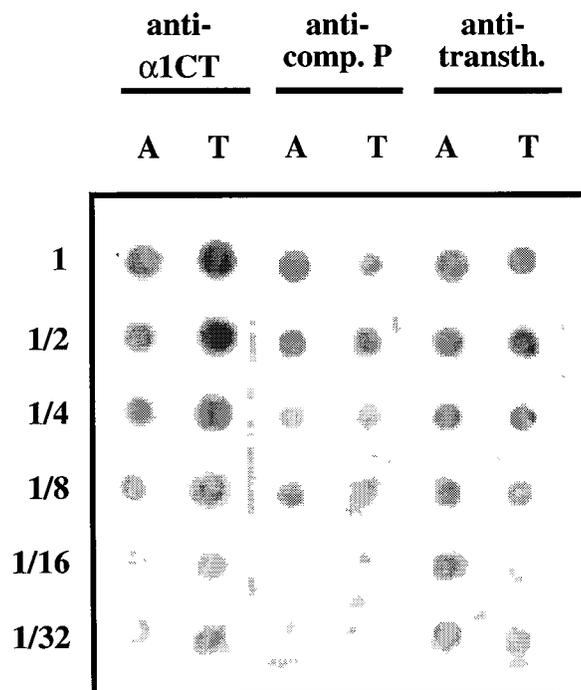
Deux anticorps anti-Apo E sont utilisés pour cette étude. Un anticorps monoclonal anti-Apo E (EO-1), utilisé à la dilution de 1/1000, dirigé contre la partie globulaire amino-terminale de l'Apo E et un sérum polyclonal anti-Apo E, utilisé à la dilution de 1/2000 et qui est dirigé contre l'ensemble de la molécule. Ces anticorps détectent indifféremment les isoformes E2, E3 et E4 de l'Apo E. L'anticorps anti-protéoglycannes (7E12), utilisé au 1/10, est dirigé contre la partie protéique des protéoglycannes de type héparane sulfate (HSPG). Les anticorps anti α_1 -antichymotrypsine (α_1 CT), composé P amyloïde, et transthyréline sont des anticorps polyclonaux utilisés au 1/200. L'anticorps anti-A β_{8-17} est utilisé comme témoin positif.

V-2-2-Recherche des constituants de la substance amyloïde

Nous décidons dans un premier temps de tester ces anticorps sur deux préparations de substance amyloïde provenant de l'aire 9 du cerveau d'un patient 'Alzheimer' (A29) et d'un sujet témoin de 45 ans exempt de substance amyloïde. Ces deux préparations sont déposées en alternance sur une membrane d'immobilon P.

Outre la présence du peptide A β , on observe chez le patient 'Alzheimer' la présence d'Apo E et de protéoglycannes (Figure 29 A). Une forte immunoréactivité pour l'Apo E est constatée avec l'anticorps monoclonal EO-1 et le sérum polyclonal anti-Apo E. Un signal nettement plus faible est constaté avec l'anticorps anti-protéoglycannes (7E12). L'immunoréactivité pour ces 2 constituants est spécifique puisqu'elle n'est pas observée chez le sujet témoin (Figure 29 A). Par contre un marquage avec les anticorps dirigés contre l' α 1CT, le composé P amyloïde et la transthyréline est observé indifféremment chez le patient 'Alzheimer' et le sujet témoin (Figure 29 B). Nous ne pouvons donc conclure sur la présence de ces derniers éléments dans la préparation de substance amyloïde. Ce résultat négatif pourrait tout d'abord s'expliquer par une sensibilité des anticorps vis à vis des conditions particulières de dot-blot. Par ailleurs, le traitement en acide formique 100% provoquerait une formylation des résidus Ser₈ et Ser₂₆ du peptide A β (Klunk *et al.*, 1994). Il est probable que le peptide A β ne soit pas le seul élément à subir une telle modification qui pourrait donc intervenir sur la conformation de ces constituants et expliquer l'absence de signal significatif obtenu en dot-blot avec les anticorps anti- α 1CT, composé P amyloïde ou transthyréline. Une solubilisation de ces derniers éléments en tampon de Laemmli (SDS 5%) pourrait également expliquer leur absence dans le culot (C1). Enfin, si la transthyréline possède une très forte affinité pour le peptide A β (Scharzman *et al.*, 1994), l'absence de signal significatif n'est pas étonnante puisque cette protéine serait plutôt impliquée dans l'élimination du peptide A β et non dans son accumulation (Golabek *et al.*, 1995).

L'immunoréactivité obtenue avec l'anticorps EO-1 et le sérum polyclonal anti-Apo E suggère l'existence d'une interaction entre l'Apo E et le peptide A β . Nous décidons donc de réaliser une analyse de l'Apo E dans la substance amyloïde à partir de la population que nous disposons.

A**B**

V-3-Etude de l'Apo E sur une population plus importante

De nombreux éléments indiquent que l'Apo E et le peptide A β sont étroitement liés au sein des dépôts amyloïdes. Une analyse par immunohistochimie est réalisée dans le but de vérifier si le peptide A β et l'Apo E sont colocalisés au sein des mêmes dépôts amyloïdes.

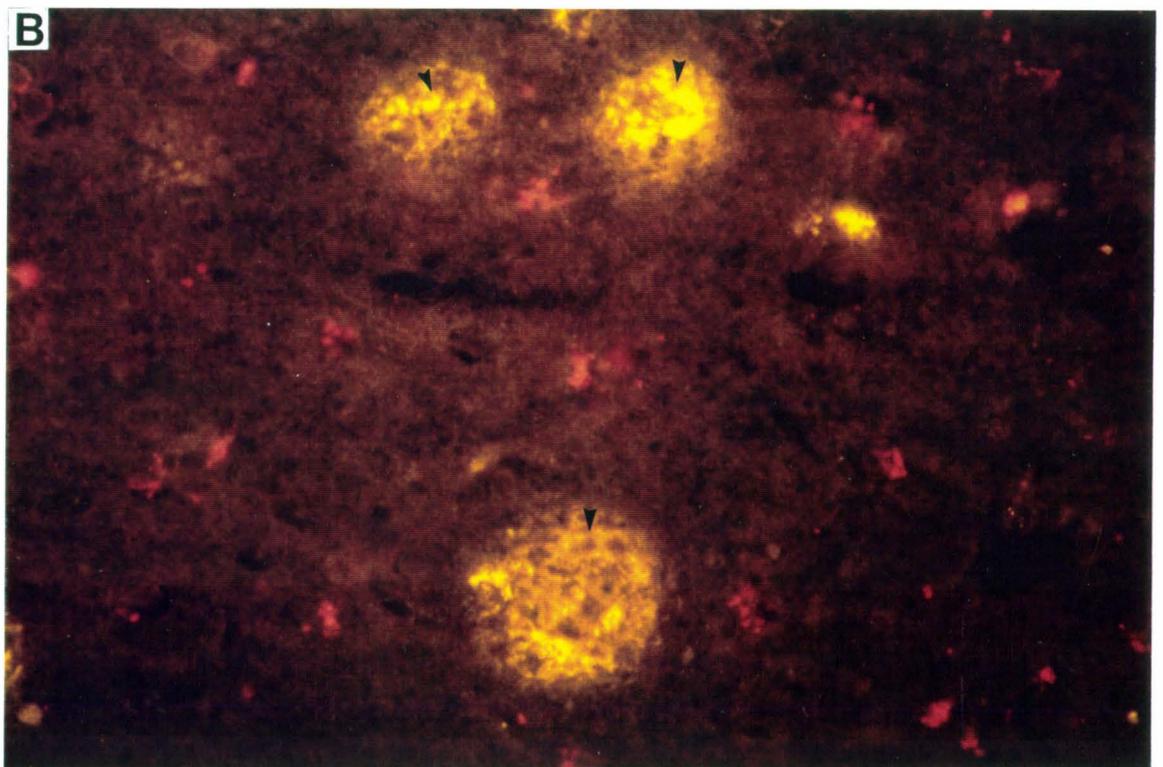
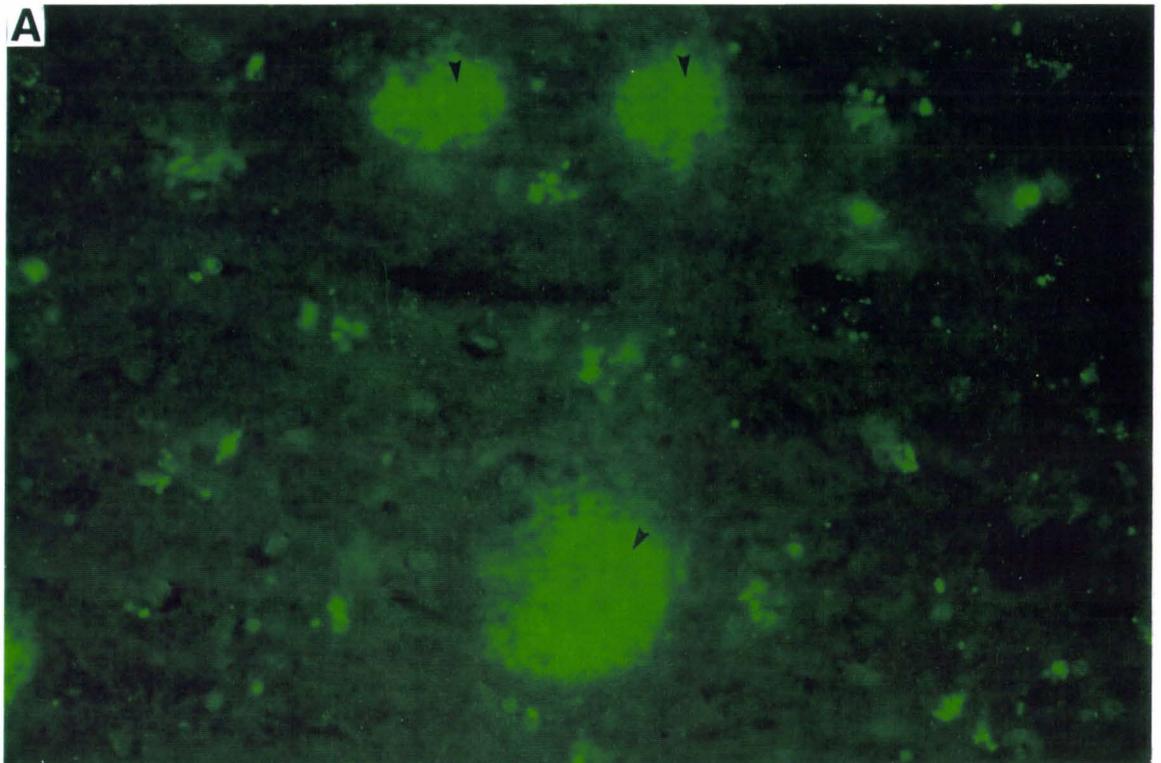
V-3-1-Détection de l'apolipoprotéine E par immunohistochimie

Sur une coupe de cortex de patient atteint de la maladie d'Alzheimer, les dépôts de substance amyloïde sont détectés en utilisant l'anticorps monoclonal EO-1 ainsi que le sérum polyclonal anti-Apo E. Un double marquage des dépôts amyloïdes est réalisé en combinant l'action de l'anticorps monoclonal anti-A β ₈₋₁₇ et de l'anticorps polyclonal anti-Apo E (**Figure 30**). On constate que l'anticorps anti-A β ₈₋₁₇ et le sérum polyclonal anti-Apo E révèlent les mêmes dépôts amyloïdes. Toutefois, un marquage légèrement différent entre les deux anticorps semble indiquer que la colocalisation de l'Apo E et du peptide A β n'est pas totale au sein de ces dépôts.

Une étude par dot-blot nous permettrait peut-être de confirmer qu'il existe bel et bien une association entre le peptide A β et l'Apo E au sein de la substance amyloïde.

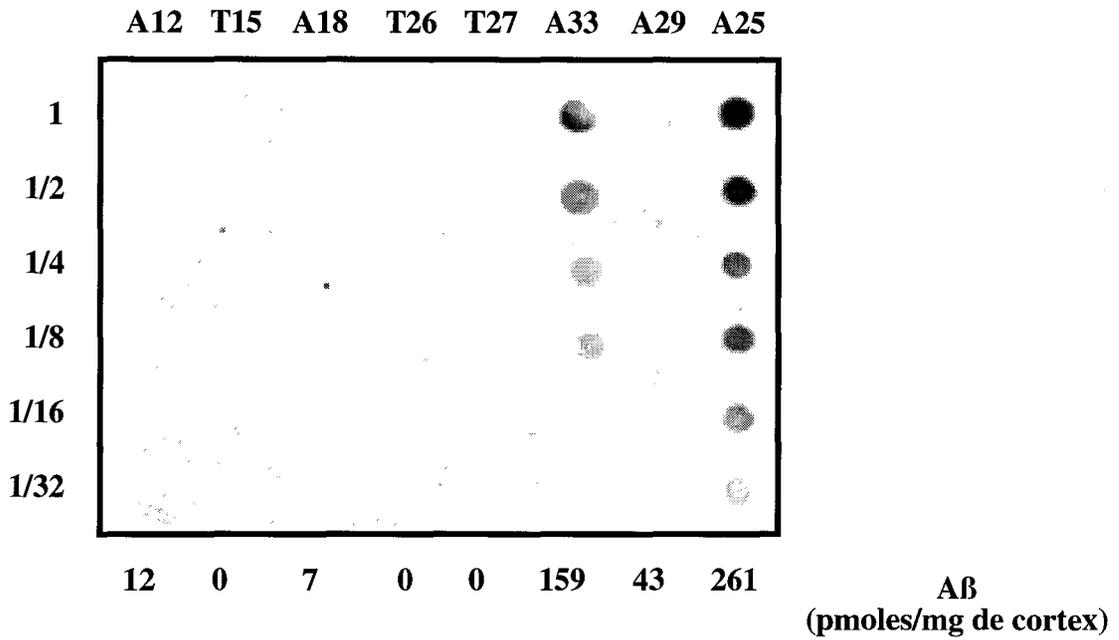
V-3-2-Etude de l'apolipoprotéine E par dot-blot

L'analyse de l'Apo E est réalisée à partir d'une population de 23 patients 'Alzheimer' et de 28 sujets témoins. Les préparations de substance amyloïde (aire 39) sont déposées en dot-blot et les membranes sont incubées en présence de l'anticorps monoclonal (EO-1) ou du polyclonal anti-Apo E. La présence de l'Apo E est détectée essentiellement chez les patients 'Alzheimer' atteints d'une amyloïdose sévère (**A25 et A33, Figure 31 A**). Aucun signal n'est observé (avec les deux anticorps anti-Apo E) chez les sujets témoins et les patients 'Alzheimer' les moins sérieusement touchés



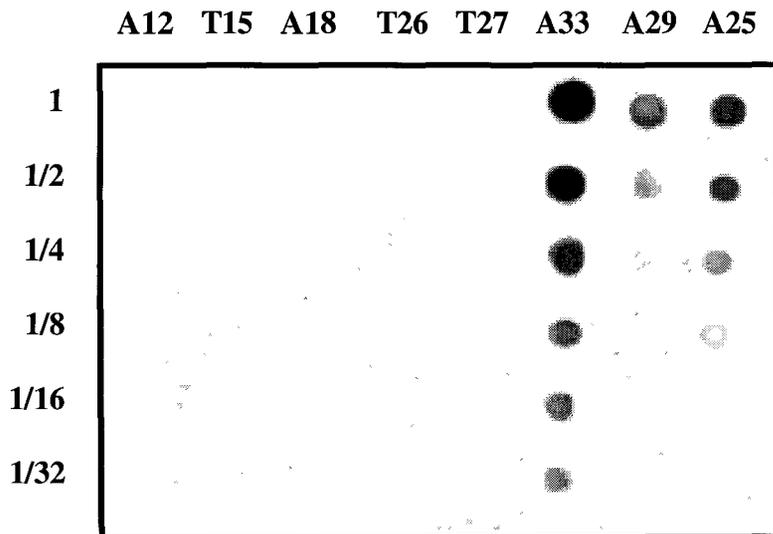
A

**anti-Apo E monoclonal
(EO-1)**



B

anti-Apo E polyclonal



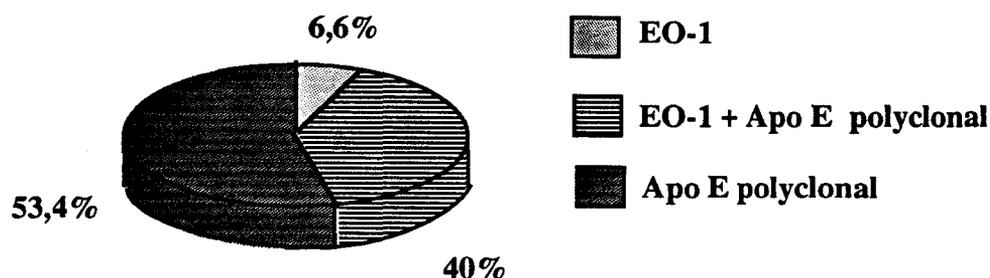
(A12, A18, T15, T26 et T27, Figure 31 A). Cependant, certains patients 'Alzheimer' se distinguent puisqu'une immunoréactivité pour l'Apo E n'est observée uniquement qu'avec l'anticorps polyclonal anti-Apo E (A29, Figure 31 B).

L'Apo E n'est jamais retrouvée dans la préparation (C1) de sujets témoins. Il ne s'agit donc pas d'une "contamination" ou d'un marquage non spécifique. De plus, les conditions de purification de la substance amyloïde sont particulièrement drastiques. Ainsi, la détection de l'Apo E par la méthode de dot-blot laisse suggérer qu'une association existe entre l'Apo E et le peptide A β au sein des dépôts amyloïdes.

Nous constatons que sur la population de 23 patients 'Alzheimer', 15 seulement présentent une immunoréactivité pour l'Apo E. Ceci suggère donc que le rôle de l'Apo E dans l'amyloïdogenèse ne se constate pas chez tous les patients 'Alzheimer'. Dans la sous-population de patients (Apo E⁺), 93,4% donnent un signal positif avec l'anti-Apo E polyclonal (14/15), pour seulement 46,6% (7/15) avec l'anticorps monoclonal EO-1 (Figure 32).

FIGURE 32

Répartition des 15 patients 'Alzheimer' qui présentent un signal "Apo E positif" dans l'aire 39, en fonction de l'anticorps utilisé.



Un signal Apo E est enregistré avec l'anticorps anti-Apo E polyclonal (dirigé contre l'ensemble de la molécule) (Figure 31 B) et avec l'anticorps monoclonal (dirigé

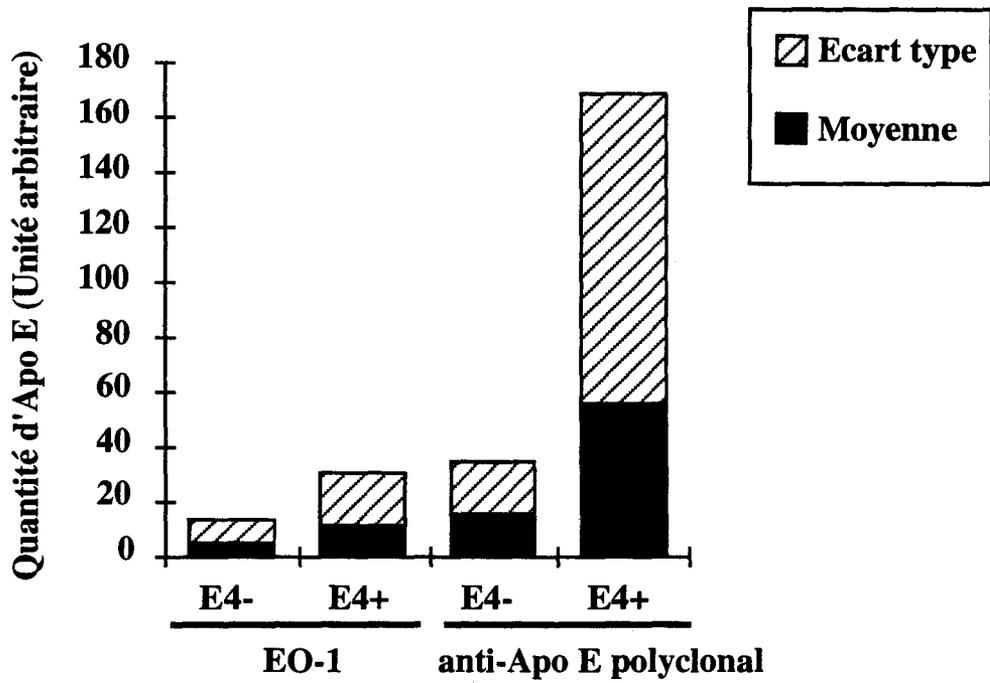
contre la région N-terminale de l'Apo E). Or selon certains auteurs, un fragment C-terminal de l'Apo E [216-299] serait essentiellement retrouvé dans les dépôts amyloïdes (Wisniewski *et al.*, 1995). Nos résultats montrent qu'un signal positif avec un anticorps dirigé contre la partie N-terminale de l'Apo E (EO-1) peut être obtenu chez 46,6% des cas (7/15). Dans 53,4% des cas (8/15), seule l'utilisation de l'anticorps polyclonal permet de révéler la présence de l'Apo E. Ceci suggère donc l'existence de fragments d'Apo E de natures différentes au sein des dépôts amyloïdes. Ainsi, un anticorps dirigé contre la partie C-terminale de l'Apo E s'avèrerait très utile pour mettre en évidence la présence de nouveaux types de fragments Apo E au sein de la substance amyloïde.

V-3-3-Influence du génotype sur la quantité d'Apo E

D'une part, une forte immunoréactivité pour l'Apo E est détectée chez 2 patients 'Alzheimer' génotypés $\epsilon 3\epsilon 4$ et $\epsilon 4\epsilon 4$ (A25 et A33, Figure 31 B). D'autre part, le signal le plus intense est observé chez le patient génotypé $\epsilon 4\epsilon 4$ (A25, Figure 31 B). Ces 2 événements suggèrent l'existence d'une corrélation entre l'allèle $\epsilon 4$ et la présence de l'isoforme E4 de l'Apo E au sein des dépôts amyloïdes. Il semble donc intéressant de vérifier dans notre population si une augmentation significative de la quantité d'Apo E est observée chez les individus porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ (E4+).

L'Apo E est quantifiée dans chaque échantillon selon la procédure décrite pour la quantification du peptide A β . Une préparation de substance amyloïde de patient 'Alzheimer' est utilisée comme standard de quantité d'Apo E (Unité Arbitraire). La détection de l'Apo E n'est observée de manière significative que dans la population 'Alzheimer' (n=23). Nous recherchons donc dans cette population l'influence du génotype sur la quantité d'Apo E déterminée par dot-blot dans l'aire 39. Une comparaison de la quantité d'Apo E est effectuée entre les patients E4⁺ (n=12) et les patients E4⁻ (n=11). Pour la quantification de l'Apo E, l'anticorps monoclonal (EO-1) et le polyclonal sont utilisés. En général, un signal plus intense chez les patients E4⁺ et E4⁻ est constaté avec l'anticorps polyclonal anti-Apo E (Figure 33). Une augmentation

**Quantification de l'Apo E
dans une population de patients 'Alzheimer' (E4+/E4-)**



de la quantité d'Apo E semble être observée chez les patients E4⁺ (**Figure 33**). Nous avons donc établi le rapport "Quantité d'Apo E/Quantité de peptide Aβ" pour chacun des 23 patients 'Alzheimer'. Ces rapports tiennent compte de la quantité d'Apo E estimée avec l'anticorps monoclonal EO-1 mais également avec le sérum polyclonal anti-Apo E (**Figure 34**). Une augmentation très nette de ce rapport est observée chez les patients 'Alzheimer' E4⁺ (**Figure 34**). Cependant, 4 patients 'Alzheimer' porteurs de l'allèle ε4 (E4⁺), ne montrent pas de signal "Apo E positif" par dot-blot (**Figure 34**). L'augmentation du rapport "Apo E/ Aβ" que nous observons chez les patients (E4⁺) n'est donc pas significative sur le plan statistique. La population étudiée dénombre 3 individus génotypés ε2ε4 (**2, 3, et 12, Figure 34**). Nous constatons que le rapport "quantité d'Apo E/ quantité de peptide Aβ" peut être soit très faible (**2 et 3, Figure 34**) soit très élevé (**12, Figure 34**) chez ces individus. Ceci pourrait s'expliquer par les influences soit neuroprotectrices de l'allèle ε2 soit néfastes de l'allèle ε4 qui prédominent selon les personnes génotypées ε2ε4. Il en résulte que la présence de ces sujets dans la population (E4⁺) pourrait produire un biais non négligeable dans l'étude. Par ailleurs, certains patients 'Alzheimer' génotypés ε3ε4 (**A27, A30, A31, A32 Tableau 8, matériels et méthodes**) ne présentent qu'une faible quantité de substance amyloïde déterminée par dot-blot. Par conséquent, l'absence d'Apo E chez ces individus n'est pas étonnante.

En conclusion, il semblerait donc qu'une hausse de la quantité d'Apo E dans la substance amyloïde puissent être observée chez les patients 'Alzheimer' E4⁺. Si une liaison existe entre l'Apo E et le peptide Aβ dans notre population, une corrélation entre la quantité d'Apo E et celle du peptide Aβ doit être mise en évidence.

V-3-4-Corrélation entre quantité d'Apo E et de peptide Aβ

Une comparaison est effectuée entre les quantités de peptide Aβ et d'Apo E (déterminée avec l'anticorps monoclonal EO-1 et le polyclonal anti-Apo E) présentes dans le cerveau des 23 patients 'Alzheimer' (aire 39) (**Tableau 6**).



patients 'Alzheimer' E4+



patients 'Alzheimer' E4-

Tableau 6: corrélation entre les quantités de peptide A β et d'Apo E

Populations	ANTICORPS ANTI-APO E	
	E0-1	Polyclonal
'Alzheimer' (n=23)	p=0,012	p=0,035
'Alzheimer' E4 ⁺ (n=12)	p=0,25	p=0,0083
'Alzheimer' E4 ⁻ (n=11)	p=0,0002	p=0,0009

Une corrélation entre les quantités de peptide A β et d'Apo E déterminée par l'anticorps polyclonal anti-Apo E, est obtenue chez les patients 'Alzheimer' E4⁺ et E4⁻ (Tableau 6). De façon surprenante, nous constatons que les meilleurs indices de corrélation entre quantité d'Apo E et de peptide A β sont obtenus chez les patients (E4⁻) avec des valeurs de (p) égales à 0,0002 et 0,0009, respectivement pour les anticorps EO-1 et anti-Apo E polyclonal (Tableau 6).

V-3-5-Conclusion

Des études ont démontré que la liaison entre l'Apo E et le peptide A β était isoforme-spécifique et qu'elle se produisait plus facilement avec l'isoforme E4 de l'Apo E (Strittmatter *et al.*, 1993b; Sanan *et al.*, 1994 ; Ma *et al.*, 1994; Castano *et al.*, 1995). Cependant, des études plus récentes indiqueraient que l'Apo E3 se lierait plus facilement au peptide A β que l'Apo E4, et que cette isoforme interviendrait non pas dans l'agrégation mais dans l'élimination du peptide amyloïde (Ladu *et al.*, 1994; 1995).

Nos résultats suggèrent un rôle de l'Apo E dans la formation des dépôts amyloïdes. L'analyse en immunohistochimie indique une colocalisation de l'Apo E et du peptide A β au sein des mêmes types de dépôts. Une augmentation significative de la quantité de peptide A β corrélée à celle de l'Apo E est mise en évidence dans la population 'Alzheimer'. De plus une augmentation significative de l'allèle ϵ 4 est rencontrée dans cette population. Cependant, aucune augmentation significative de la quantité de peptide A β et d'Apo E n'est observée chez les patients 'Alzheimer' porteurs de l'allèle ϵ 4 (E4⁺). Il conviendrait donc d'essayer d'autres anticorps dirigés contre des régions différentes afin de détecter l'ensemble des fragments N- et C-terminaux de l'Apo E susceptibles de se retrouver dans les dépôts amyloïdes.

L'Apo E n'est peut-être qu'un facteur de risque pour une sous-population donnée de patients 'Alzheimer'. Les récentes découvertes des mutations sur les gènes PS1 et PS2 confirment l'hétérogénéité de la maladie d'Alzheimer. Ainsi, la formation des dépôts amyloïdes ne résulterait pas de l'action d'un, mais de plusieurs co-facteurs dont certains restent encore à découvrir.

VI-ANALYSE DE LA SUBSTANCE AMYLOÏDE DURANT LE SYNDROME DE DOWN

VI-1-Introduction

La méthode de dot-blot développée au laboratoire permet de quantifier le peptide A β agrégé dans les plaques séniles compactes, les dépôts diffus, et l'angiopathie amyloïde. La trisomie 21 (Syndrome de Down) a été proposée comme un modèle de la maladie d'Alzheimer (Mann et Esiri, 1989). En effet, dès l'âge de 20 ans, les individus trisomiques montrent dans le cerveau de la substance amyloïde sous la forme de dépôts diffus. Avec l'âge, ces individus développent de plus en plus de dépôts sous la forme de plaques neuritiques matures. Ainsi, l'ensemble des dépôts amyloïdes

est représenté dans le cerveau des individus trisomiques. Durant la trisomie 21, la nature biochimique du peptide A β qui s'accumule dans les dépôts amyloïdes est également connue. Le peptide A β ₄₂ s'accumulerait en majorité dans les dépôts diffus tandis que le peptide A β ₄₀ serait observé dans les stades plus tardifs avec une accumulation dans les plaques neuritiques et dans les dépôts amyloïdes des vaisseaux cérébraux. Une corrélation a donc été démontrée entre la quantité de dépôts amyloïdes (A β ₄₀⁺) et l'âge de l'individu (Mann *et al.*, 1995). Pour notre part, une étude de la quantité de peptide A β dans le cerveau de patients trisomiques de différents âges a été réalisée.

VI-2-Etude sur une série de 9 cas de trisomie 21

VI-2-1-Description de la population

Par le biais d'une collaboration avec le Docteur David Mann de l'université de Manchester, nous avons bénéficié de prélèvements de cortex cérébral (aire 9) de 9 cas de trisomiques ($56,61 \pm 9,82$ ans). Les données neuropathologiques de ces individus ont également été fournies: la présence de substance amyloïde (% d'aire corticale) dans le pôle frontal a été quantifiée par immunohistochimie avec les anticorps BA27 et BC05 (anti-A β ₄₂) (Tableau 7). L'anticorps monoclonal BA27 reconnaît spécifiquement le peptide A β ₄₀, tandis que l'anticorps monoclonal BC05 reconnaît spécifiquement le peptide A β ₄₂. Une quantification du peptide A β par dot-blot, avec l'anticorps anti-A β ₈₋₁₇ (Dako), est réalisée toujours selon la même procédure. Les différentes données sont indiquées dans le **tableau 7** ci-dessous.

Tableau 7:

N°	AGES	SEXE	BIOCHIMIE	NEUROPATHOLOGIE	
			A β (pmoles/mg de cortex)	(% aire totale)	
				A β 40	A β 42
1	37	F	21	0,4	9,2
2	50	M	10	0,5	5,4
3	56	M	64	4,7	9,3
4	58	M	44	1,7	7,8
5	58	M	21	1,1	7,8
6	61	F	42	1,4	7,0
7	61	F	33	1,1	7,1
8	65	M	30	2,3	5,0
9	71	M	51	1,9	7,2

Nous constatons que le peptide A β ₄₂ est retrouvé en majorité dans le cortex cérébral puisque la surface occupée par les dépôts amyloïdes marqués par l'anticorps BC05 (A β ₄₂⁺) est nettement plus importante que celle occupée par les dépôts amyloïdes (A β ₄₀⁺) (Tableau 7). Aucune corrélation n'est observée entre l'âge de l'individu et la quantité de peptide A β déterminée par dot-blot (Tableau 7). Une étude comparative de la quantité de peptide A β et des données neuropathologiques nous permettrait de caractériser notre méthode de dot-blot sur le plan qualitatif.

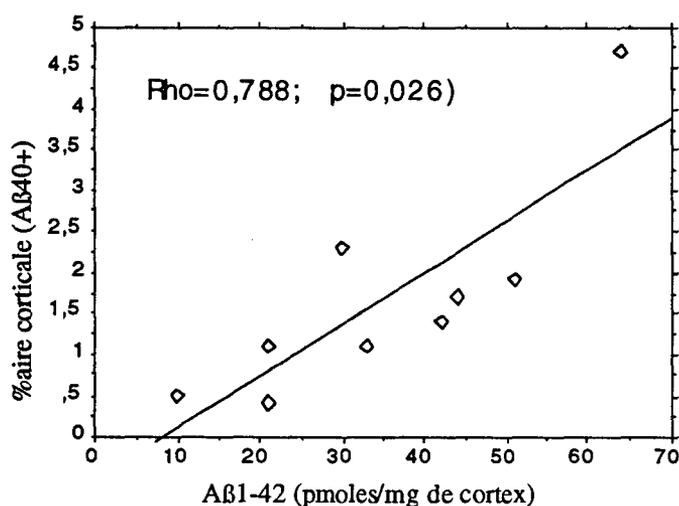
VI-2-2-Corrélation entre quantité de peptide A β et de dépôts amyloïdes A β ₄₀⁺

Aucune corrélation n'est constatée entre les données biochimiques (A β ₁₋₄₂ pmoles/mg de cortex) et le nombre de dépôts amyloïdes (% aire corticale) détecté par

l'anticorps BC05 ($A\beta_{42}^+$). La quantification biochimique du peptide $A\beta$ par dot-blot semble plutôt refléter le nombre de dépôts amyloïdes ($A\beta_{40}^+$). Une corrélation est en effet observée entre ces 2 types de données (Figure 35).

FIGURE 35

Corrélation entre la quantité de peptide $A\beta$ (pmoles /mg de cortex) et le % d'aire corticale envahie par les dépôts amyloïdes ($A\beta_{40}^+$)



Ces résultats constituent cependant des données préliminaires et une étude sur un plus grand nombre de cas s'avèrerait indispensable pour les confirmer. Nous ne pouvons pas comparer ces deux données puisque les sondes monoclonales utilisées sont différentes dans les 2 cas. Il conviendrait donc plutôt de tester des anticorps spécifiques des peptides $A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$ par dot-blot, ce qui de plus nous permettrait de connaître la quantité respective de ces 2 espèces dans la préparation de substance amyloïde.

CONCLUSION

CONCLUSION

L'accumulation dans le cortex cérébral de peptide A β agrégé sous la forme de dépôts amyloïdes est une des caractéristiques neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer. Cependant, ces dépôts amyloïdes sont observés également, quoique de façon moins sévère, durant le vieillissement cérébral "normal". L'analyse biochimique du peptide A β est difficile du fait de son insolubilité vis à vis des détergents classiques. Nous avons donc mis au point une technique biochimique permettant d'extraire de façon quantitative le peptide A β agrégé à partir d'homogénats de cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et de sujets non déments.

Ce protocole volontairement simplifié (pour limiter au maximum les pertes de matériel) nous a donc permis d'envisager la quantification biochimique par dot-blot du peptide A β solubilisé en acide formique 100%. Le choix de l'anticorps s'est avéré prépondérant. En effet, nous avons été confrontés à des problèmes de conformation de peptide sur la membrane de dot-blot. Ceci nous a amené à choisir l'anticorps monoclonal anti-A β ₈₋₁₇ (Dako) qui détecte par dot-blot une quantité de 10 pmoles de peptide A β ₁₋₄₂ synthétique dilué en acide formique 100%. Par ailleurs, un anticorps polyclonal anti-A β ₁₇₋₂₈ a également été élaboré pour nous permettre de détecter des fragments A β tronqués du côté N-terminal tel que le fragment P3.

Par le biais d'une collaboration avec le Dr David et le Pr Di Menza de l'hôpital de Limeil Brévannes, nous avons pu disposer d'une série de 44 cerveaux de sujets âgés définis sur le plan neuropathologique (nombre de dépôts amyloïdes/ mm², angiopathie amyloïde, dépôts diffus). Une quantification du peptide A β par dot-blot a donc été réalisée dans les pôles frontaux et pariétaux (aires de Brodmann 9 et 39) des cerveaux de ces individus. Nous avons obtenu une bonne corrélation entre les données neuropathologiques (nombre de dépôts amyloïdes/ mm²) et la quantité de peptide A β déterminée par dot-blot (pmoles de peptide A β ₁₋₄₂/mg de cortex). Nous avons par ailleurs constaté que la quantification biochimique du peptide A β permettait non

seulement d'estimer la quantité de peptide A β agrégé dans les dépôts amyloïdes compacts, mais également dans les dépôts diffus du cervelet. Il semblerait que l'angiopathie amyloïde soit également quantifiée par cette méthode. La quantification biochimique du peptide A β constitue donc une méthode complémentaire à l'examen neuropathologique puisqu'à défaut de distinguer la quantité de peptide A β présente dans chaque type de dépôt, elle permet d'évaluer sa quantité globale dans le cerveau d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer ou d'un sujet non dément.

Est-il possible de distinguer un patient atteint de la maladie d'Alzheimer et un sujet témoin non dément par la quantité d'amyloïde présente dans le cerveau? Le diagnostic de certitude de la maladie d'Alzheimer repose sur l'existence de dépôts de substance amyloïde et des neurones en dégénérescence neurofibrillaire. L'étude que nous avons réalisé sur une population de 69 individus (30 patients 'Alzheimer' et 39 sujets témoins) a montré une augmentation significative de la quantité de peptide A β dans le cerveau des patients 'Alzheimer'. De grandes variations inter-individuelles entre les deux groupes ont cependant été observées.

Nous n'avons pas seulement quantifié le peptide A β par dot-blot mais également détecté des constituants tels que l'Apo E ou les protéoglycannes qui sont considérés comme des co-facteurs de l'amyloïdogenèse (Wisniewski et Frangione, 1992; Snow *et al.*, 1994 a,b; Sanan *et al.*, 1994; Ma *et al.*, 1994). La présence de l'Apo E a ainsi été confirmée chez les patients 'Alzheimer' les plus sérieusement atteints, par 2 anticorps anti-Apo E différents (l'anti-Apo E monoclonal (EO-1) et un anticorps polyclonal). Quel rôle peut donc jouer l'Apo E dans la formation des dépôts amyloïdes durant la maladie d'Alzheimer? Notre étude, menée sur la population totale de 69 individus, a confirmé les données indiquant que l'Apo E4 serait un facteur de risque de la maladie d'Alzheimer (Saunders *et al.*, 1993; Corder *et al.*, 1993; Pérez-Tur *et al.*, 1995). Si l'Apo E semble être impliquée dans la pathologie, nous ne savons pas encore à quel niveau cela se situe. Il semblerait que l'existence de l'allèle ϵ 4 favorise la formation des dépôts amyloïdes (Schmechel *et al.*, 1993; Berr *et al.*, 1994). Dans notre étude, les patients 'Alzheimer' porteurs de l'allèle ϵ 4 (E4+) ne montrent pas plus de substance

amyloïde dans le cerveau que les patients (E4-). Cependant, il semblerait que la substance amyloïde de leur cerveau renferme une quantité plus importante d'Apo E. Une relation existerait donc entre le génotype et la quantité d'Apo E accumulée dans le cerveau.

A l'heure actuelle, la nature biochimique de l'Apo E présente au sein des dépôts amyloïdes n'est pas connue. Selon certains auteurs, un fragment C-terminal [216-299] y serait essentiellement retrouvé (Wisniewski *et al.*, 1995). Nous n'avons pas confirmé ces résultats puisque l'Apo E a été révélée chez près de la moitié des patients 'Alzheimer' par un anticorps dirigé contre la partie globulaire (N-terminale) de l'Apo E. Différents fragments de l'Apo E ou l'Apo E complète seraient donc retrouvés au sein des dépôts amyloïdes.

Chez certains patients 'Alzheimer' porteurs de l'allèle $\epsilon 4$, nous n'avons pas montré la présence de l'Apo E dans notre préparation de substance amyloïde. D'autres constituants tels que les protéoglycannes ou l' $\alpha 1$ -antichymotrypsine sont, au même titre que l'Apo E, considérés comme des co-facteurs de l'amyloïdogenèse (Snow *et al.*, 1990; 1992; Ma *et al.*, 1994). La présence de protéoglycannes de type héparane sulfate a été mise en évidence par dot-blot chez certains patients 'Alzheimer'. La formation de l'amyloïde durant la maladie d'Alzheimer résulterait donc probablement de la somme de différents cofacteurs tels que l'Apo E, les protéoglycannes ou l' $\alpha 1$ -antichymotrypsine qui interviendraient à des degrés divers.

Cette méthode ne permet pas seulement de quantifier la substance amyloïde agrégée dans le cerveau de patients 'Alzheimer' ou de sujets témoins. Nous avons également appliqué cette technique à l'étude quantitative du peptide A β agrégé dans le cerveau de sujets trisomiques décédés à différents âges.

En conclusion, la quantification biochimique du peptide A β par dot-blot permet non seulement d'estimer la quantité globale de peptide A β agrégé par milligramme de tissu cérébral, mais également de détecter d'autres constituants impliqués dans la formation des dépôts amyloïdes durant la maladie d'Alzheimer. Ces travaux originaux donnent une estimation de la quantité totale de peptide A β agrégé dans le cerveau,

durant la maladie d'Alzheimer. Ces résultats pourraient donc déboucher sur l'élaboration de ligands du peptide A β qui seraient utilisés comme outils thérapeutiques ou pour élaborer des modèles de la maladie d'Alzheimer plus proches de la pathologie observée.

PERSPECTIVES

PERSPECTIVES

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

La quantification biochimique du peptide A β par dot-blot est une méthode complémentaire à l'examen neuropathologique. Néanmoins, certains laboratoires ne peuvent bénéficier d'une infrastructure où pourrait être réalisé un examen neuropathologique des pièces autopsiques. Dans ce cas, la méthode biochimique que nous avons développée au laboratoire, constituerait un palliatif aux examens neuropathologiques, afin d'estimer la quantité de peptide A β agrégé dans le cerveau. Cependant, ce travail débouchera également sur d'autres aspects visant à caractériser plus précisément les différentes espèces de peptide A β dans la substance amyloïde. Un programme d'anticorps monoclonaux sera également lancé pour nous permettre d'obtenir des sondes contre les constituants connus ou inconnus de la substance amyloïde. Nous envisagerons également de quantifier la substance amyloïde dans d'autres régions cérébrales, ou d'analyser la quantité de substance amyloïde qui s'accumule progressivement dans le cerveau d'individus présentant une amyloïdose cérébrale (Trisomie 21, démence à corps de Lewy etc...).

Quantification de la substance amyloïde dans d'autres régions cérébrales

Nous avons essentiellement développé notre méthode quantitative du peptide A β dans les régions néocorticales du cerveau. Une première étude a montré que nous pouvions quantifier le peptide A β dans le cervelet des patients 'Alzheimer' les plus sérieusement touchés. Puisque notre méthode de quantification est très sensible, il serait intéressant de quantifier la substance amyloïde dans d'autres régions du cerveau tels que les noyaux gris sous-corticaux (striatum, thalamus).

Analyse de la nature du peptide A β présent dans les dépôts amyloïdes

la nature du peptide A β présent dans les différents types de dépôts amyloïdes reste à déterminer, en particulier le début et la fin de la séquence du peptide A β pourraient être différents. Nous savons que la longueur du peptide A β est un facteur clé dans l'amyloïdogénèse puisque certains patients atteints de maladie d'Alzheimer familiale précoce présentent des mutations pathogéniques qui favorisent la formation d'un peptide A β plus long (A β ₄₂).

Récemment, Il a été démontré que l'utilisation de tampons Tris contenant 10% de SDS pouvait solubiliser une grande partie des espèces de peptide A β dont le peptide A β ₄₂ (Harigaya *et al.*, 1995). Nous envisageons donc d'apporter des modifications au protocole d'extraction du peptide A β en jouant notamment sur la concentration de SDS, afin de solubiliser certaines formes de peptides A β . On complètera alors l'analyse en réalisant une séparation par HPLC (chromatographie de phase reverse sur colonne C18).

Une autre approche serait d'élaborer de nouvelles sondes spécifiques de certaines régions du peptide A β . Nous disposons de sondes dirigées contre la région N-terminale et contre la partie médiane du peptide A β . Des anticorps polyclonaux dirigés contre la partie C-terminale sont actuellement en cours d'élaboration. Par ailleurs, nous avons débuté une collaboration avec le Dr F. Checler (UPR, Sophia Antipolis) qui dispose de sondes monoclonales capables de reconnaître spécifiquement les formes se terminant aux acides aminés 40 et 42.

Utilisation des sondes anti-A β ₄₀ et anti-A β ₄₂ pour la quantification de la substance amyloïde dans la trisomie 21

Les trisomiques 21 de plus de 40 ans présentent des lésions neuropathologiques similaires à celles des patients atteints de la maladie d'Alzheimer. La séquence d'apparition des lésions neuropathologiques est également identique. Une première étude a été menée à partir de 9 cas de trisomie 21. Cette étude sera poursuivie sur un plus grand nombre de trisomiques d'âges différents, ce qui d'une part, devrait nous

permettre de montrer une accumulation croissante du peptide A β en fonction de l'âge, et d'autre part d'identifier par dot-blot la nature des différentes espèces de peptides A β observées dans le cerveau d'individus trisomiques.

Elaboration de sondes monoclonales à partir de la substance amyloïde purifiée

Un programme d'anticorps monoclonaux obtenus à partir de substance amyloïde purifiée sera envisagé. Cette étude devrait nous permettre d'identifier de nouveaux constituants de la substance amyloïde mais aussi d'obtenir des sondes efficaces contre différentes régions du peptide A β ou des constituants connus ou inconnus des dépôts amyloïdes.

Etude de l'interaction entre l'apolipoprotéine E et le peptide A β

Nos résultats suggèrent que l'Apo E et le peptide A β interagissent fortement au sein des dépôts amyloïdes. Une liaison de très forte affinité a été démontrée entre l'Apo E et le peptide A β (Strittmatter *et al.*, 1993 a,b; Wisniewski *et al.*, 1993; Shuvaev et Siest, 1996). Récemment, un fragment C-terminal [216-299] de l'Apo E a été identifié dans les dépôts amyloïdes (Wisniewski *et al.*, 1995). Nous pourrions analyser la nature des fragments de l'Apo E que l'on retrouve dans la substance amyloïde et étudier les interactions entre ces fragments et le peptide A β .

Les différentes perspectives qui viennent d'être décrites devraient à plus ou moins long terme déboucher sur le développement de sondes immunologiques, potentiels outils diagnostiques de la maladie d'Alzheimer. L'analyse plus précise des fragments de peptides A β , ainsi que l'identification d'un des co-facteurs de l'amyloïdogenèse de type Alzheimer devrait nous permettre de mieux comprendre ce phénomène.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

MATERIELS ET METHODES

I-MATÉRIEL

I-1-Matériau autopsique

* Description de la population totale

Les différentes études ont été réalisées à partir des cerveaux d'une population totale de 79 individus âgés ($82,50 \pm 10,55$ ans). Le tableau clinique de ces sujets a été obtenu par le biais d'un entretien avec un neurologue et/ou un gériatre. Cette population se compose de:

-30 patients atteints de la maladie d'Alzheimer (A6-A35) selon les critères du NINCDS-ADRDA (Mc Khann *et al.*, 1984).

-5 sujets considérés comme des cas pré-cliniques de la maladie d'Alzheimer (A1-A5) présentant des troubles cognitifs à l'examen clinique.

-39 individus témoins ne souffrant d'aucune démence (T1-T39).

-4 personnes atteintes de démence mixte ou vasculaire avec présence dans le cerveau d'angiopathie amyloïde (M1-M4).

-1 personne associant une démence de type Alzheimer et un syndrome parkinsonien (P1) (**Tableau 8**).

Remarques:

La nature des différentes études menées à partir de cette population est figurée dans la colonne 'Remarques':

-Les individus notés (++) dans cette colonne sont au nombre de 17. Les analyses biochimiques et neuropathologiques ont été réalisées à partir des aires 9, 22, 39, et 44 des cerveaux de ces sujets.

Tableau 8

N°	Nom	Age	SEXE	Path	APOE	Rem
T1	GEU 83	83	F	témoin	E2E3	++
T2	DUR 95	95	F	témoin	E3E3	++
T3	DEV 96	96	F	témoin	E2E3	++
T4	BAU 88	88	F	témoin	E3E3	++
T5	SUI 92	92	F	témoin	E3E4	++
T6	FOU 83	83	F	témoin	E3E3	++
T7	TRI 85	85	M	témoin	E3E4	++
T8	BOI 84	84	F	témoin	E3E3	++
T9	PAN 73	73	M	témoin	E3E3	++
T10	ROU 79	79	M	témoin	E2E3	+/*
T11	ASS 85	85	M	témoin	E3E3	+/*
T12	FON 82	82	F	témoin	E3E3	+/*
T13	LEC 90	90	F	témoin	E3E3	+/*
T14	LEE 91	91	F	témoin	E3E3	+/*
T15	MIL 88	88	F	témoin	E3E3	+/*
T16	MOI 88	88	M	témoin	E3E3	+/*
T17	PEL 90	90	F	témoin	E3E3	+/*
T18	RIS 93	93	F	témoin	E3E3	+/*
T19	TCH 91	91	F	témoin	E3E3	+/*
T20	THI 77	77	F	témoin	E3E3	+/*
T21	VAN 86	86	M	témoin	E3E3	+/*
T22	PET 83	83	F	témoin	E3E4	+/*
T23	REN 90	90	F	témoin	E3E4	+/*
T24	THI 86	86	M	témoin	E3E4	+/*
T25	BEZ 71	71	F	témoin	E2E3	+/*
T26	CEU 81	81	M	témoin	E3E3	*
T27	CRO 72	72	F	témoin	E3E3	*
T28	DEL 98	98	F	témoin	E3E3	*
T29	DES 51	51	M	témoin	E3E3	*
T30	DRO 61	61	F	témoin	E3E3	*
T31	FIS 71	71	M	témoin	E3E3	*
T32	MAU 88	88	F	témoin	E3E3	*
T33	DEL 65	65	M	témoin	E3E4	*
T34	DEL 72	72	M	témoin	E3E4	*
T35	TIS 65	65	M	témoin	E3E4	*
T36	VAR 84	84	F	témoin	E3E4	*
T37	LHE 69	69	F	témoin	E3E4	*
T38	DIE 84	84	F	témoin	E3E4	
T39	BEN 89	89	F	témoin	E2E3	
M1	LAM 83	83	F	MA+Va	E3E3	++
M2	BOU 90	90	F	D.Vasc	E3E3	+
M3	DUR 88	88	M	D.Vasc	E3E4	+
M4	TAR 84	84	M	D.Vasc	E3E3	+
P1	CIN 90	90	F	MA+Pa	E3E3	++

-Les individus notés soit (+) ou (++) dans cette colonne sont au nombre de 44. La validation de la quantification biochimique a été réalisée à partir de l'aire 9 et 39 des cerveaux de cette sous-population.

-Les 54 individus notés avec une étoile (*) font partie de l'étude concernant l'influence du génotype de l'Apo E sur la quantité de peptide A β .

L'aire 9 du cerveau d'un patient 'Alzheimer' de 64 ans (A29) a également été utilisée comme témoin de quantité standard lors de la quantification de l'Apo E.

* Analyses neuropathologiques

Les cerveaux de 44 individus (notés + ou ++) proviennent d'une collaboration avec le Dr David et le Pr Di Menza de l'hôpital de Limeil-Brevannes. A l'autopsie, l'hémisphère gauche a été fixé dans une solution contenant 10% de formol pour les études neuropathologiques, tandis que l'hémisphère droit a été congelé à -80°C pour les études biochimiques. L'analyse neuropathologique (perte neuronale, gliose, dégénérescence neurofibrillaire, dépôts amyloïdes) a été réalisée à partir du cortex frontal supérieur (aire de Brodmann 9), inférieur (aire de Brodmann 44), temporal supérieur (aire de Brodmann 22) et pariétal inférieur (aire de Brodmann 39) du cerveau de ces individus.

Le nombre de neurones en dégénérescence neurofibrillaire (NFT/mm²) a été quantifié par immunohistochimie en utilisant l'anticorps AD2 dirigé contre un épitope phosphorylé des protéines tau pathologiques (Buée-Scherrer *et al.*, 1996).

Les analyses neuropathologiques des dépôts amyloïdes ont été réalisées par histochimie (thioflavine S) et immunohistochimie avec l'anticorps monoclonal anti-A β ₈₋₁₇ (Dako).

-Le nombre de plaques séniles a été déterminé par millimètre carré de cortex cérébral (dépôts amyloïdes /mm²).

-Le nombre de dépôts diffus a été semi-quantifié par immunohistochimie et classé selon un mode sévère (+++), modéré (++) , moyen (+) ou nul (-). L'angiopathie

amyloïde a été référencée selon la présence (+) ou l'absence de marquage (-) (Tableau 1).

* Analyses génétiques

Le génotype de l'Apo E de chacun de ces individus a été déterminé à partir des homogénats totaux de cortex cérébral. La méthode qui a été utilisée est basée sur l'extraction de l'ADN par un mélange phénol/chloroforme (Sambrook *et al.*, 1989). Un fragment d'ADN long de 244 paires de base et contenant la région polymorphique de l'Apo E a été amplifié par PCR. Les produits d'amplification ont été digérés par l'enzyme *Hha* I, analysés par électrophorèse sur un gel non dénaturant à 10% d'acrylamide puis colorés par le bromure d'éthidium (Hixson et Vernier, 1990).

I-2-Peptides synthétiques

Des peptides synthétiques ont été utilisés pour la mise au point de la technique de dot-blot en acide formique 100% et pour la validation de l'anticorps monoclonal anti-A β ₈₋₁₇ (Dako). Il s'agit des peptides A β ₁₋₄₂ et A β ₁₋₂₈ (Bachem-Bale Biochimie France) et du peptide A β ₁₋₂₈ (Neosystem-Strasbourg). Le peptide A β ₁₋₄₂ (Bachem) a également été utilisé comme étalon standard pour la quantification du peptide A β par dot-blot. Il a été reçu sous forme lyophilisée (96% de pureté), a été dissout à 2 mg/ml en eau milliQ+ NH₃, et stocké à -80°C.

II-SONDES IMMUNOLOGIQUES

II-1-Anticorps polyclonaux

*Anticorps anti-A β ₁₇₋₂₈

Un sérum polyclonal a été préparé chez le lapin à partir d'un peptide synthétique correspondant à la séquence [17-28] du peptide A β . Ce peptide a été synthétisé et purifié par Néosystem (Strasbourg): Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys. La séquence de ce peptide (avec la présence de deux résidus de Lysine du coté N et C-terminal) nous a permis d'envisager un couplage à l'ovalbumine par l'intermédiaire de la glutaraldéhyde.

-Préparation de l'immunogène:

A J0: Le peptide (3mM) est dissout dans 6 ml d'eau milliQ et laissé sous agitation à 4°C.

-A J +1 et J +2: On prélève 1 ml de cette solution de peptide auquel on ajoute 100 μ l de tampon PBS 1M pH 7,4.

-A J + 3: Les 2 X 1 ml de solution de peptide en tampon PBS 0,1 M pH 7,4 sont mélangés aux 4 ml de la solution de peptide restante afin d'obtenir 6 ml d'une solution de peptide A β ₁₇₋₂₈ plus ou moins agrégé.

On ajoute alors de l'ovalbumine (75 μ M) à cette solution de peptide A β ₁₇₋₂₈ (3mM), et 1,5 ml d'une solution de glutaraldéhyde à 6% est ajoutée goutte à goutte au mélange réactionnel. Le couplage s'effectue sous agitation à température ambiante pendant 1 heure. Ensuite, la réaction est arrêtée par addition de borohydrure de sodium (7,5 mg dans 300 μ l d'eau milliQ). La solution est concentrée (3X) sur Diaflo. Un volume final de 2 ml est obtenu. Une chromatographie de tamisage moléculaire à 4°C, sur gel Ultrogel AcA 202 (polyacrylamide-agarose, dont la zone de fractionnement est comprise entre 1000 et 15 000) équilibré en tampon PBS est effectuée dans le but

d'éliminer le peptide libre. Avec un débit de 0,3 ml/mn, 30 fractions sont récupérées toutes les 2 min. Un dosage des protéines est réalisé afin de repérer les fractions qui contiennent le peptide couplé à l'ovalbumine. La concentration du peptide couplé est de 0,75 mg/ml. Le peptide couplé est réparti en doses contenant 150 µg d'immunogènes qui sont ensuite stockées à -20°C.

Protocole d'immunisation:

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

Le lapin, préalablement saigné 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. Il reçoit également par injections intradermiques multiples, la première dose d'immunogène émulsionnée dans de l'adjuvant de Freund complet. Trois rappels intradermaux sont effectués à 3 semaines d'intervalle avec une dose d'immunogène émulsionnée en adjuvant de Freund incomplet.

Trois semaines après le dernier rappel, une dose d'immunogène (sans adjuvant de Freund) est injectée dans la veine marginale du lapin. Huit jours après l'injection intraveineuse, le lapin est saigné à l'oreille et 40 à 50 ml de sang sont prélevés. Tous les mois, les lapins reçoivent un rappel intraveineux suivi d'une saignée une semaine après. Les immunosérums sont additionnés d'un volume égal de glycérol avant d'être stockés à -20 °C.

Les différentes saignées (utilisées au 1/400) sont caractérisées par dot-blot et par immunoempreintes, à partir d'une préparation de substance amyloïde de patient atteint de la maladie d'Alzheimer.

*** Anticorps anti Aβ₁₋₂₈**

L'anticorps polyclonal anti-Aβ₁₋₂₈ a été préparé à partir d'un peptide synthétique correspondant à la séquence [1-28] du peptide Aβ. Ce peptide a été synthétisé par la société Néosystem (Strasbourg). La méthode de préparation de cet anticorps est identique à celle décrite pour l'anticorps polyclonal anti-Aβ₁₇₋₂₈. En

immunohistochimie, cet anticorps (utilisé à la dilution de 1/200) révèle les dépôts amyloïdes sur coupe de cortex cérébral de patient atteint de la maladie d'Alzheimer. En dot-blot, il est utilisé à la dilution de 1/800.

* Sérum polyclonal anti-Apo E

Le sérum polyclonal anti-Apo E nous a été fourni par l'équipe du Pr Fruchart (Institut Pasteur de Lille). Ce sérum, préparé à partir d'Apo E humaine plasmatique est dirigé contre l'ensemble de l'Apo E. Il est utilisé à la dilution de 1/1000 en immunohistochimie et en dot-blot.

Nous avons également utilisé différents anticorps dirigés contre des constituants des dépôts amyloïdes. Il s'agit des anticorps polyclonaux anti- α_1 antichymotrypsine, anti-transthyretine (préalbumine) et anti-composé P amyloïde commercialisés chez Dako à Trappes (France). Il ont été utilisés en dot-blot à la dilution de 1/200.

II-2-Anticorps monoclonaux

* Anticorps anti-A β ₈₋₁₇ (Dako)

L'anticorps monoclonal anti-A β ₈₋₁₇ ou 6F/3D (Dako) a été utilisé pour quantifier le peptide AB par dot-blot. Il peut être utilisé en immunohistochimie à la dilution de 1/50 au 1/100. Sur une coupe de cortex cérébral de patient atteint de la maladie d'Alzheimer, il détecte le peptide AB présent au sein des dépôts amyloïdes sphériques (plaques séniles) ou des dépôts diffus. En dot-blot et par immunoempreintes (électrophorèse en tampon Tris-Tricine) il est utilisé à la dilution de 1/200.

* Anticorps anti-A β ₁₇₋₂₄ (4G8)

Nous avons également utilisé l'anticorps monoclonal anti-A β ₁₇₋₂₄ (4G8). Cet anticorps, fourni par le Pr Wisniewski a été caractérisé par Kim *et al.*, 1988. En dot-blot, cet anticorps a été utilisé à la dilution de 1/10 000.

*** Anticorps anti-Apo E (EO-1)**

L'anticorps monoclonal EO-1, fourni par l'équipe du Pr Fruchart (Institut Pasteur de Lille), a été préparé à partir d'apolipoprotéine E purifiée de plasma humain. Il est dirigé contre la partie globulaire de l'Apo E (Leroy *et al.*, 1988). En dot-blot et en immunohistochimie, il est utilisé à la dilution de 1/1000.

*** Anticorps anti-protéoglycannes (7E12)**

Cet anticorps monoclonal nous a été fourni par le Pr Fillit du Mount Sinai Hospital Center à New-York. Il a été préparé à partir d'héparane sulfate protéoglycane vasculaire (HSPG) purifié de glomérule de rein de boeuf. Cet anticorps se présente sous la forme de surnageant d'hybridome utilisé au 1/10. Il marque les dépôts de substance amyloïde sur une coupe de cortex cérébral de patient 'Alzheimer' (Buée *et al.*, 1994).

Tableau 9: Récapitulatif des différents anticorps utilisés

Anticorps	Origine	Épitope	Immunomarquage en dot-blot			
			Aβ ₁₋₄₂	Aβ ₁₋₂₈	Apo E	PGs
anti-Aβ ₁₇₋₂₈	polyclonal	[17-28] de l'Aβ	-	++	-	-
anti-Aβ ₁₋₂₈	polyclonal	[1-28] de l'Aβ	+	+/-	-	-
4G8	monoclonal	[17-24] de l'Aβ	++	+	-	-
anti-Aβ ₈₋₁₇	monoclonal	[8-17] de l'Aβ	++	-	-	-
anti-Apo E	polyclonal	Apo E totale	-	-	+	-
EO-1	monoclonal	séq N-ter de l'Apo E	-	-	+	-
7E12	monoclonal	axe protéique HSPGs	-	-	-	+

III-ANALYSES BIOCHIMIQUES

III-1-Purification de la substance amyloïde

III-1-1-Homogénéisation du tissu cérébral

La substance grise corticale est disséquée et le tissu est homogénéisé par pottérisation dans une solution de Laemmli (Laemmli, 1970) dans des rapports de 10% (p/v). Les échantillons sont ensuite chauffés à 100°C pendant 10 min.

La solution de Laemmli contient:

Tris-HCl	50mM	pH 6,8
SDS	5% (p/v)	
EDTA	4mM	
EGTA	3mM	
Glycérol	10%	

Cette solution est stockée à -20°C. On ajoute extemporanément:

dithiothréitol	0,25 % de (p/v).
bleu de bromophénol	traces

III-1-2-Purification de la substance amyloïde

La purification de la substance amyloïde est réalisée selon une modification de la technique de Mori et coll. (1992). L'homogénat total de cortex cérébral (400 mg de tissu) est centrifugé à 100 000g (36 000 r.p.m.) dans une centrifugeuse CENTRIKON T-2055, dans un rotor Kontron TST 60, pendant 1 heure. Le culot (C1) est récupéré puis homogénéisé dans de l'acide formique 100%. L'homogénat 'acide formique' est laissé sous agitation à température ambiante pendant 3 heures. Nous réalisons ensuite une seconde centrifugation basse vitesse (14 000g) pendant 1 heure. Les surnageants

S₁₄ 000g sont analysés directement par dot-blot. L'analyse par immunoempreintes nécessite une évaporation préalable de l'acide formique. Le matériel lyophilisé est repris dans une solution de Laemmli 5% SDS (urée 6M).

III-2-Techniques biochimiques

III-2-1-Le Dot-blot

La quantification du peptide A β a été réalisée par la technique de dot-blot. Afin de pouvoir quantifier le peptide A β en acide formique 100%, nous avons choisi la membrane d'Immobilon P. La membrane sèche d'immobilon P résiste à de nombreux types de solvants organiques (acétonitrile) ainsi qu'à des acides concentrés comme l'acide formique 100%. De plus, elle est très efficace pour adsorber les peptides hydrophobes comme le peptide A β .

***Les dépôts**

Une gamme de dilution de chaque échantillon (1; 1/2; 1/4; 1/8; 1/16; 1/32) est déposée en acide formique 100% sur une membrane d'immobilon P (Millipore). La membrane est ensuite traitée au méthanol 95%, rincée à plusieurs reprises en eau distillée. Elle est ensuite saturée en tampon TNT (Tris-HCl 15 mM, pH 8; NaCl 0,3 M; Tween 20 0,05% (p/v)), contenant 5% (p/v) de lait délipidé pendant 30 min.

***Incubation**

Les anticorps primaires sont dilués dans le tampon TNT. Selon l'anticorps primaire, l'addition de lait (5% (p/v)) est parfois nécessaire pour limiter le bruit de fond. L'incubation dure entre 1 heure et 1 heure 30 (selon le type d'anticorps) à température ambiante ou toute la nuit à 4 °C. Les anticorps secondaires sont des immunoglobulines anti-souris ou anti-lapins (selon la nature de l'anticorps primaire) préparés chez la chèvre. Ce sont des anticorps conjugués à la peroxydase (Sanofi Diagnostics-Pasteur),

dilués dans le tampon TNT au 1/8000. L'incubation dure de 45 min à 1 heure à température ambiante.

**La révélation*

L'étape suivante est la révélation des complexes "antigène /anticorps primaire /anticorps secondaire couplé à la peroxydase". Nous utilisons le kit ECL (enhanced chemiluminescence, Amersham). Le principe est l'action de la peroxydase sur un dérivé cyclique (luminol) en présence d'eau oxygénée. Le luminol oxydé par l'action de la peroxydase atteint un "état excité". Son retour à un état stable est accompagné d'une émission de lumière dont l'intensité est fortement augmentée par des résidus phénoliques. Cette lumière impressionne un film (Hyperfilm-ECL, Amersham), et procure alors un signal dont la visualisation permet de localiser les protéines identifiées par l'anticorps primaire. Plusieurs temps d'exposition sont pratiqués (5 min, 15 min, 30 min). Ceci nous permet d'éviter une saturation du signal lumineux et de nous situer dans la zone de linéarité de la gamme de dilution.

**Les standards*

Des dilutions de peptide A β ₁₋₄₂ (Bachem) (80; 40; 20; 10; 5; 2,5 pmoles) sont utilisées comme standard pour la quantification du peptide A β par dot-blot. Pour la quantification de l'apolipoprotéine E, une préparation de substance amyloïde d'un patient 'Alzheimer' de 64 ans (A29) est utilisée comme standard de quantité d'Apo E. Une gamme de dilution (1; 1/2; 1/4; 1/8; 1/16; 1/32) d'une préparation à 10 mg de substance amyloïde lyophilisée/ml est ainsi déposée sur la membrane de dot-blot.

III-2-2-Electrophorèses en gel de polyacrylamide en présence de SDS

Les préparations de substance amyloïde sont en solution de Laemmli 5% SDS (urée 6M). Elles sont analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS en tampon Tris-Tricine, selon la méthode décrite par Schägger et Von Jagow (1987).

**Electrophorèses en tampon Tris-Tricine*

Un mélange de 2 solutions d'acrylamide de 10% et 20% (0.1% SDS) est réalisé afin d'obtenir un gel de polyacrylamide à 15%.

*Gels de séparation:

pH 8,8	<u>solution d'acrylamide à 10 %</u>	<u>solution d'acrylamide à 20 %</u>
<i>Tris Hcl</i>	0,3M	0,3M
<i>Acrylamide</i>	10%	20% (p/v)
<i>Bis acrylamide</i>	0,266%	0,532%
<i>SDS</i>	0,1%	0,1%
<i>Temed</i>	300 µl	300 µl
<i>Glycérol</i>		200 ml
<i>H₂O</i>	qsp 1000 ml	qsp 1000 ml

***Gels de concentration:**

pH 6, 8	<u>solution d'acrylamide à 5 %</u>
<i>Tris Hcl</i>	0, 1M
<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>H₂O</i>	qsp 1000 ml

La polymérisation des gels d'acrylamide est obtenu par addition de 200 µl de persulfate d'ammonium (100 mg/ml) dans 27 ml de gel. La dimension des plaques est de 140 x 140 x 1,5 mm.

***Tampons d'électrophorèse**

La composition des tampons "anode" et "cathode" est la suivante:

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

La séparation des protéines est réalisée à 40 V constants pendant 18 heures.

**Electrophorèses en tampon Tris-glycine*

Les homogénats totaux de cortex cérébral (S₁₀₀ 000g) sont en solution de Laemmli 5% SDS. Ils sont séparés sur gel de polyacrylamide (gradient 10-20 %), en présence de SDS. Les solutions d'acrylamide sont identiques à celles utilisées pour l'électrophorèse en tampon Tris-Tricine. Le tampon d'électrophorèse est un tampon Tris-Gly dont la composition est la suivante:

Tris Hcl	25 mM	pH 8,3
Glycine	0,2 M	
SDS	0,1 % (p/v)	
H2O	qsp 1000 ml	

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

III-2-3-Technique des immunoempreintes

Après électrophorèse, les protéines de la préparation de substance amyloïde sont transférées sur des membranes de nitrocellulose (0,2 µm de Schleicher & Schuell) pendant 1 h (courant: 0,8 mA par cm²) en milieu semi-liquide sur un LKB Multiphor II Nova Blot (LKB). Les protéines solubles en SDS provenant d'un homogénat total de cortex cérébral sont transférées sur des membranes de nitrocellulose 0,45 µm (Schleicher & Schuell) pendant 1 h 30. La composition des tampons de transfert est la suivante (selon les instructions du fabricant):

-Tampon "anode": Tris 0,3 M pH 10,4; méthanol 20 % (v/v).

-Tampon "cathode": acide 6-amino-n-hexanoïque 40mM pH 7,6; méthanol 20 % (v/v).

Après transfert, la membrane est colorée au rouge ponceau (acide trichloroacétique 3% (p/v); rouge ponceau 0,2% (p/v); H₂O) afin de contrôler l'efficacité du transfert.

La technique des immunoempreintes est réalisée selon une modification de la méthode de Townbin (Townbin *et al.*, 1979). Après transfert, les membranes sont saturées en présence de tampon TNT contenant 5% (p/v) de lait délipidé pendant 30 min. Les étapes d'incubation en anticorps et de révélation sont identiques à celles décrites pour la technique de dot-blot. Toutefois, les temps d'incubation en anticorps sont plus longs et durent de 1 heure 30 à 2 heures pour l'anticorps primaire et 1 heure pour l'anticorps secondaire.

III-2-4-Dosage colorimétrique des protéines

La méthode utilisée est le dosage à l'acide bicinchoninique (Smith *et al.*, 1985). C'est une variante de la réaction de Biuret. Les protéines réagissent avec des ions cuivriques pour former des ions cuivreux qui se complexent à l'acide bicinchoninique. La réaction est mise en évidence par une lecture à 562 nm.

IV-QUANTIFICATION PAR DENSITOMÉTRIE

Les films ECL ont été digitalisés sur Compact Prolinea 4/33, avec un scanner Sharp JX-325 (résolution de 127 X 127 pixels) et sauvés en format TIFF. Les images numérisées ont ensuite été analysées grâce au logiciel Image Master (IM1D) de chez Pharmacia Biotech.

V-IMMUNOHISTOCHEMIE

L'analyse de la colocalisation de l'Apo E et du peptide A β au sein des dépôts amyloïdes a été réalisée par immunohistochimie. Le tissu a été plongé dans une solution à 4% de paraformaldéhyde pendant 24 heures. Le bloc a ensuite été mis dans le tampon Coons (Veronal ou Barbitol 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. Il a été inclus dans du Tissu-Tek avant d'être stocké à -80°C. Les coupes de cerveau, réalisées grâce à un cryostat, ont été réalisées avec une épaisseur de 12 μ m.

La détection des dépôts amyloïdes a été réalisée par double marquage grâce à l'utilisation des anticorps polyclonaux anti-Apo E et anti-A β ₁₋₂₈ et monoclonaux anti-Apo E (EO-1) et anti-A β ₈₋₁₇ (Dako). Les lames ont été incubées en présence d'un mélange "anticorps monoclonal (Apo E ou A β)-anticorps polyclonal (Apo E ou A β)" durant toute la nuit à température ambiante. Les anticorps monoclonaux et polyclonaux anti-Apo E ont été utilisés à la dilution de 1/1000. L'anticorps monoclonal anti-A β ₈₋₁₇ (Dako) et le polyclonal anti-A β ₁₋₂₈ ont été utilisés à la dilution respectivement de 1/50 et de 1/200. Les lames ont ensuite été incubées pendant 2 heures à température ambiante, en présence d'un mélange d'anticorps "anti-lapin (marqué à la rhodamine)-anti-souris (marqué à la fluorescéine)" à la dilution de 1/1000.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abe K, St Georges-Hyslop PH, Tanzi RE, Kogure K (1991a) Induction of amyloid precursor protein mRNA after heat shock in cultured human lymphoblastoid cells. *Neurosci. Lett.* 125: 169-171.
- Abe K, Tanzi RE, Kogure K (1991b) Selective induction of Kunitz-type protease inhibitor domain-containing amyloid precursor protein mRNA after persistent focal ischemia in rat cerebral cortex. *Neurosci. Lett.* 125: 172-174.
- Abraham CR, Selkoe DJ, Potter H (1988) Immunohistochemical identification of the serine protease inhibitor alpha-1 Antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Cell* 52: 487-501.
- Abraham CR, Shirahama T, Potter H (1990) alpha-1-antichymotrypsin is associated solely with amyloid deposits containing the beta-protein: amyloid and cell localization of alpha-1-antichymotrypsin. *Neurobiol. Aging* 11: 123-129.
- Abraham CR, Driscoll J, Potter H, Van Nostrand WE, Tempst P. (1991) A calcium-activated protease from Alzheimer's disease brain cleaves at the N-terminus of the amyloid β -protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174: 790-796.
- Allsop D, Yamamoto T, Kametani F, Miyazaki N, Ishii T (1991) Alzheimer Amyloid beta/A4 Peptide Binding Sites and a Possible APP-Secretase Activity Associated with Rat Brain Cortical Membranes. *Brain Res.* 551: 1-9.
- Amouyel P, Vidal O, Launay JM, Laplanche JL (1994) The apolipoprotein E alleles as major susceptibility factors for Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 344: 1315-1318.
- Araujo DM, Cotman CW (1992) Beta-amyloid stimulates glial cells in vitro to produce growth factors that accumulate in senile plaques in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 569: 141-145.
- Arispe N, Rojas E, Pollard HB (1993a) Alzheimer disease amyloid beta-Protein forms calcium channels in bilayer membranes :blockade by tromethamine and aluminum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 567-571.
- Arispe N, Pollard HB, Rojas E (1993b) Giant multilevel cation channels formed by alzheimer disease amyloid beta-Protein [A beta p-(1-40)] in bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10573-10577.
- 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.
- Arriagada PV, Growdon JH, Hedleywhyte 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's disease. *Brain Res.* 539: 11-18.
- Barrow CJ et Zagorski MG (1991) Solution structures of β peptide and its constituent fragments: relation to amyloid deposition. *Science* 253: 179-182.
- Bauer J, Strauss S, Schreiter-gasser U, Ganter U, Schlegel P, Witt I, Volk B, Berger M (1991) Interleukin-6 and alpha-2-Macroglobulin Indicate an Acute-Phase State in Alzheimer's Disease Cortices. *Febs Lett.* 285: 111-114.
- Behr D, Hesse L, Masters CL, Multhaup G (1996) Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I. *J. Biol. Chem.* 271: 1613-1620.
- Behl C, Davis JB, Klier FG, Schubert D (1994a) Amyloid beta peptide induces necrosis rather than apoptosis. *Brain Res.* 645: 253-264.
- Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D (1994b) Hydrogen peroxide mediates amyloid B protein toxicity. *Cell* 77: 817-827.
- Behrouz N, Defossez A, Delacourte A, Mazzuca M (1991) The Immunohistochemical Evidence of Amyloid Diffuse Deposits as a Pathological Hallmark in Alzheimer's Disease. *J. of Gerontol.* 46: B209-B212.
- Berr C, Hauw JJ, Delaere P, Duyckaerts C, Amouyel P (1994) Apolipoprotein E allele epsilon 4 is linked to increased deposition of the amyloid beta-peptide (A-beta) in cases with or without Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 178: 221-224.
- Bielskowsky M. (1904) Die Silberimprägnation der neurofibrillen. *J. Psychol. Neurol.* 3:169-188.
- Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow EM, Mandelkow E (1993) Phosphorylation of ser(262) strongly reduces binding of Tau-Protein to microtubules: distinction between PHF-Like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron.* 11: 153-163.
- 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 senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Brit. J. Psychiat.* 114: 797-811.
- Blinkov SM et Glezer II (1968) *The human brain in numbers and tables.* Plenum Press, NY.
- 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 marinus*. *Neurobiol. Aging.* 15/2: 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
- Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82: 239-259.
- Brion JP, Passareiro H, Nunez J, Flament-Durand J (1985) Immunological detection of tau protein in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Arch. Biol.* 95: 229-235.
- Brion JP, Guilleminot J, Couchie D, Flament-Durand J, Nunez J (1988) Both adult and juvenile tau microtubule-associated proteins are axon specific in the developing and adult rat cerebellum. *Neuroscience* 25:139-146.
- Buée L, Ding W, Delacourte A, Fillit H (1993a) Binding of secreted human neuroblastoma proteoglycans to the alzheimer's amyloid A4 peptide. *Brain Res.* 601: 154-163.
- Buée L, Ding WH, Anderson JP, Narindrasorasak S, Kisilevsky R, Boyle NJ, Robakis NA, Delacourte A, Greenberg B, Fillit H (1993b) 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, Hof PR, Bouras C, Delacourte A, Perl DP, Morrison JH, Fillit HM (1994) Pathological Alterations of the Cerebral Microvasculature in Alzheimers Disease and Related Dementing Disorders. *Acta Neuropathol.* 87: 469-480.
- Buée-Scherrer V, Condamines O, Mourton-Gilles C, Jakes R, Goedert M, Pau B, Delacourte A (1996) AD2, a phosphorylation-dependent monoclonal antibody directed against Tau proteins found in Alzheimer's disease. *Mol Brain Res.* in press: .0.
- Bugiani O, Giaccone G, Frangione B, Ghetti B, Tagliavini F (1989) Alzheimer Patients: Preamyloid Deposits Are More Widely Distributed Than Senile Plaques Throughout the Central Nervous System. *Neurosci. Lett.* 103: 263-268.
- 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.
- Busciglio J, Lorenzo A, Yankner BA (1992) Methodological variables in the assessment of Beta-Amyloid neurotoxicity. *Neurobiol. Aging* 13: 609-612.
- Busciglio J, Gabuzda DH, Matsudaira P, Yankner BA (1993a) Generation of beta-Amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* . 90: 2092-2096.
- Busciglio J, Yeh J, Yankner BA (1993b) beta-Amyloid neurotoxicity in human cortical culture is not mediated by excitotoxins. *J. Neurochem.* 61: 1565-1568.
- Busciglio J, Lorenzo A, Yeh J, Yankner BA (1995) beta-Amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* 14: 879-888.

- Bush AI, Martins RN, Rumble B, Moir R, Fuller S, Milward E, Currie J, Ames D, Weidemann A, Fischer P, Multhaup G, Beyreuther K, Masters CL (1990) The Amyloid Precursor Protein of Alzheimers Disease Is Released by Human Platelets. *J. Biol. Chem.* 265: 15977-15983.
- Bush AI, Multhaup G, Moir RD, Williamson TG, Small DH, Rumble B, Pollwein P, Beyreuther K, Masters CL (1993) A novel Zinc (II) binding site modulates the function of the β A4 amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 268: 16109-16112.
- Bush AI, Pettingell WH, Paradis MD, Tanzi RE (1994a) Modulation of a beta adhesiveness and secretase site cleavage by zinc. *J. Biol. Chem.* 269: 12152-12158.
- Bush AI, Pettingell WH, Multhaup G, Paradis MD, Vonsattel JP, Gusella JF, Beyreuther K, Masters CL, Tanzi RE (1994b) Rapid induction of Alzheimer A beta amyloid formation by zinc. *Science* 265: 1464-1467.
- Butner KA, Kirschner MW (1991) Tau proteins bind to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *J. Cell. Biol.* 115: 717-730.
- Buxbaum JD, Gandy SE, Cicchetti P, Ehrlich ME, Czernik AJ, Fracasso RP, Ramabhadran TV, Unterbeck AJ, Greengard P (1990) Processing of Alzheimer beta-A4 amyloid precursor protein: modulation by agents that regulate protein phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 6003-6006.
- Buxbaum JD, Oishi M, Chen HI, Pinkas-Kramarski R, Jaffe EA, Gandy SE, Greengard P (1992) Cholinergic agonist and interleukin 1 regulate processing and secretion of the Alzheimer β /A4 amyloid protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10075-10078.
- Buxbaum JD, Ruefli AA, Parker CA, Cypess AM, Greengard P (1994) Calcium regulates processing of the Alzheimer amyloid protein precursor in a protein kinase C-independent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 4489-4493.
- Caceres A et Kosik KS (1990) Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* 343: 461-463.
- Cai XD, Golde TE, Younkin SG (1993) Release of excess amyloid beta-Protein from a mutant amyloid beta-Protein precursor. *Science* 259: 514-516.
- Campbell SK, Switzer RC, Martin TL (1987) Alzheimer's plaques and tangles: a controlled and enhanced silver staining method. *Soc. Neurosci. Abstr.* 13: 678.
- Caporaso GL, Gandy SE, Buxbaum JD, Ramabhadran TV, Greengard P (1992) Protein Phosphorylation Regulates Secretion of Alzheimer-beta/A4 Amyloid Precursor Protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3055-3059.
- Card JP, Meade RP, Davis LG (1988) Immunocytochemical localization of the precursor protein for β -amyloid in the rat central nervous system. *Neuron* 1: 835-846.
- Cardin AD, Weintraub HJR (1989) Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis* 9: 21-32.

- Carette B, Poulain P, Delacourte A (1993) Electrophysiological effects of 25-35 Amyloid-beta-Protein on Guinea-Pig lateral septal neurons. *Neurosci. Lett.* 151: 111-114.
- Castano EM, Prelli F, Wisniewski T, Golabek A, Kumar RA, Soto C, Frangione B (1995) Fibrillogenesis in Alzheimer's disease of amyloid beta peptides and apolipoprotein E. *Biochem. J.* 306: 599-604.
- Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L *et al.* (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, Pérez-Tur J (1995) Apolipoprotéine E: une protéine aux multiples facettes. *Alzheimer Actualités, Fondation IPSEN* 96: 6-11.
- Checler F (1995) Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 65: 1431-1444.
- Cheung NS, Small DH, Livett BG (1993) An amyloid peptide, beta-A4 25-35, mimics the function of Substance-P on modulation of Nicotine-Evoked secretion and desensitization in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem.* 60: 1163-1166.
- Chevallier N, Marambaud P, Vizzavona J, Baur CP, Spillantini MG, Martinez J, Goedert M, Checler F (1995) La cathepsine D présente une spécificité de type B-sécrétase. 3ème réunion francophone sur la maladie d'Alzheimer & les syndromes apparentés (résumé) p.93.
- Choi Miura NH, Ihara Y, Fukuchi K, Takeda M, Nakano Y, Tobe T, Tomita M (1992) SP-40,40 is a Constituent of Alzheimer's Amyloid. *Acta Neuropathol.* 83: 260-264.
- Citron M, Oltersdorf T, Haass C, Mc Conlogue L, Hung AY Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ (1992) Mutation of the beta-Amyloid precursor protein in familial alzheimers disease increases beta-Protein production. *Nature* 360: 672-674.
- Clements A, Walsh DM, Williams CH, Allsop D (1993) Effects of the mutations Glu22 to Gln and Ala21 to Gly on the aggregation of a synthetic fragment of the Alzheimer's amyloid β /A4 peptide. *Neurosci. Lett.* 161: 17-20.
- Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW (1977a) Purification of tau, a microtubule-associated protein that induce 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.
- Copani A, Koh JY, Cotman CW (1991) beta-Amyloid Increases Neuronal Susceptibility to Injury by Glucose Deprivation. *Neuroreport* 2: 763-765.

- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC (1993) Gene dose of Apolipoprotein-E type-4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261: 921-923.
- Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Rimmler JB, Locke PA, Conneally PM, Schmechel KE, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1994) Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nature Genetics* 7: 180-184.
- Cruz E Silva OAB, Iverfeldt K, Oltersdorf T, Sinha S, Lieberburg I, Ramabhadran TV, Suzuki T, Sisodia SS, Gandy S, Greengard P (1993) Regulated cleavage of Alzheimer β -amyloid precursor protein in the absence of the cytoplasmic tail. *Neuroscience* 57: 873-877.
- Cummings BJ, Cotman CW (1995) Image analysis of beta-amyloid load in Alzheimer's disease and relation to dementia severity. *Lancet* 346: 1524-1528.
- David JP, Fallet-Bianco C, Vermersch P, Frigard B, Di Menza C, Delacourte A (1994) Normal cerebral aging: Study of the glial reaction. *C. R. Acad. Sci.* 317: 749-753.
- Davies L, Wolska B, Hilbich C, Multhaup G, Martins R, Simms G, Beyreuther K, Masters CL (1988) A4 amyloid protein deposition and the diagnosis of Alzheimer's disease: Prevalence in aged brains determined by immunocytochemistry compared with conventional neuropathologic techniques. *Neurology* 38: 1688-1693.
- Davies CA et Mann DMA (1993) Is the 'preamyloid' of diffuse plaques in Alzheimer's disease really non fibrillar ? *Am J. Pathol.* 143:1594-1605.
- De Sauvage F et Octave J (1989) A novel mRNA of the A4 amyloid precursor gene coding for a possibly secreted protein. *Science* 245: 651-653.
- De Strooper B, Umans L, Van Leuven F, Vandenberghe H (1993) Study of the synthesis and secretion of normal and artificial mutants of murine amyloid precursor protein (APP) - cleavage of APP occurs in a late compartment of the default secretion pathway. *J. Cell Biol.* 121: 295-304.
- Delacourte A et Défossez A (1986) Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J Neurol. Sci.* 76: 173-186.
- Delacourte A, Défossez A, Persuy P, Peers MC (1987) Observation of morphological relationships between angiopathic blood vessels and neurites in Alzheimer's disease. *Virchows Archiv A*, 411: 199-204.
- Delacourte A, Flament S, Défossez A, Buée L, Hémon B, Parent M, Furby A, Leys D, Goudemand M, Destée A, Petit H (1989) Tau 64 and tau 69: Two early biochemical markers of neurofibrillary degeneration in " Biological Markers of Alzheimer's disease. "Eds: Boller F, Katzmann R, Rascol A, Signoret JL, Christen Y. Springer-verlag Berlin Heidelberg, 39-55.

- Delacourte A (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 proteins Tau 64 and 69 are specifically expressed in 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, Sautiere PE, Watzet A, Mourton-Gilles C, Petter A, Bons N (1995) Biochemical characterization of Tau proteins during cerebral aging of the lemurian primate *Microcebus murinus*. *C. R. Acad. Sci. Paris.* 318: 85-89.
- Delaere P, Duyckaerts C, Brion JP, Poulain V, Hauw JJ (1989) Tau, paired helical filaments and amyloid in the neocortex: a morphometric study of 15 cases with graded intellectual status in aging and senile dementia of Alzheimer's type. *Acta Neuropathol.* 77: 645-653.
- Delaere P, Duyckaerts C, Masters C, Beyreuther K, Piette F, Hauw JJ (1990) Large Amounts of Neocortical Beta-A4 Deposits Without Neuritic Plaques Nor Tangles in a Psychometrically Assessed, Non-Demented Person. *Neurosci. Lett.* 116: 87-93.
- Dewitt DA, Richey PL, Praprotnik D, Silver J, Perry G (1994) Chondroitin sulfate proteoglycans are a common component of neuronal inclusions and astrocytic reaction in neurodegenerative diseases. *Brain Res.* 656: 205-209.
- Dickson DW, Crystal H, Mattiace LA, Kress Y, Schwagerl A, Ksiezak-Reding H, Davies P, Yen SHC (1989) Diffuse Lewy body disease: light and electron microscopic immunocytochemistry of senile plaques. *Acta Neuropathol.* 78: 572-584.
- Dickson DW, Crystal HA, Mattiace LA, Masur DM, Blau AD, Davies P, Yen SH, Aronson MK (1991) Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiol. Aging* 13: 179-189.
- Dickson DW, Ruan D, Crystal H, Mark MH, Davies P, Kress Y, Yen SHC (1992) Hippocampal degeneration differentiates diffuse lewy body disease (DLBD) from Alzheimer's disease: light and electron microscopic immunocytochemistry of CA2-3 neurites specific to DLDB. *Neurology* 41: 1402-1409.
- Dickson DW, Ivanushkin I, Heitner J, Yen SH, Davies P (1995) Apolipoproteine E: Immunoreactivity is increased in amyloid deposits of Alzheimer's disease, but not pathological aging or diffuse Lewy body Disease. *Research advances in Alzheimer's disease and related disorders*; edited by Iqbal K, Mortimer JA, Winblad B, and Wisniewski HM, John Wiley & sons Ltd pp 371-383.
- Dranovsky A, Goldfarb L, Gajdusek DC, Goldgaber D (1995) Apolipoprotein E epsilon 4 allele does not correlate with amyloid plaques in transmissible spongiform encephalopathies. *Amyloid: Int. J. of Exp. Clin. Invest.* 2: 36-38.

- 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.
- Dreyer RN, Bausch K, Fracasso P, Hammond LJ, Wunderlich D *et al.* (1994) Processing of the pre beta-amyloid protein by cathepsin D enhanced by a Alzheimer's disease mutation. *J. Biochem.* 224: 265-271.
- Drubin DG, Kirschner MW (1986) Tau protein function in living cells. *J. Cell. Biol.* 103: 2739-2746.
- Duyckaerts C, Brion JP, Hauw JJ, Flament-Durand J (1987) Quantitative assessment of the density of neurofibrillary tangles and senile plaques in senile dementia of the Alzheimer type. Comparison of immunocytochemistry with a specific antibody and bodian's protargol method. *Acta Neuropathol.* 73: 167-170.
- Dyrks T, Weidemann A, Multhaup G, Salbaum JM, Lemaire HG, Kang J, Muller-Hill B, Masters CL; Beyreuther K (1988) Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. *EMBO J.* 7: 949-957.
- Dyrks T, Monning U, Beyreuther K, Turner J (1994) Amyloid precursor protein secretion and beta A4 amyloid generation are not mutually exclusive. *FEBS Lett.* 349: 210-214.
- Eikelenboom P, Stam FC (1984) Immunoglobulins and complement factors in senile plaques: an immunoperoxidase study. *Acta Neuropathol.* 57: 239-242.
- Emsley J, White HE, O'hara BP, Oliva G, Srinivasan N, Tickle IJ, Blundell TL, Pepys MB, Wood SP (1994) Structure of pentameric human serum amyloid P component. *Nature.* 367: 338-345.
- Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwel AR, Oltersdorf T, Mc Clure D, Ward PJ (1990) Cleavage of amyloid β peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248: 1122-1128.
- Evans KC, Berger EP, Cho CG, Weisgraber KH, Lansbury PT (1995) Apolipoprotein E is a kinetic but not a thermodynamic inhibitor of amyloid formation: Implications for the pathogenesis and treatment of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 763-767.
- Fabian H, Szendrei GI, Mantsch HH, Greenberg BD, Otvos L (1994) Synthetic post-translationally modified human A beta peptide exhibits a markedly increased tendency to form beta-pleated sheets in vitro. *Eur. J. Biochem.* 221: 959-964.
- Felsenstein KM, Hunihan LW, Roberts SB (1994) Altered cleavage and secretion of a recombinant beta-App bearing the swedish familial alzheimers disease mutation. *Nature Genetics* 6: 251-256.
- 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.

- Folstein MF, Folstein SE, Mc Hugh PR (1975). "Mini Mental State": a practical method for grading the cognitive state of patients for clinician. *J. Psychiat. Res.* 12: 189-198.
- Folstein MF (1989) Heterogeneity in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 10, 435-436.
- Fraser PE, Levesque L, McLachlan DR (1993a) Biochemistry of Alzheimer's disease amyloid plaques. *Clin. Biochem.* 26: 339-349.
- Fraser PE, Nguyen JT, McLachlan DR, Abraham CR, Kirschner DA (1993b) alpha-1-Antichymotrypsin binding to alzheimer a-beta peptides is sequence specific and induces fibril disaggregation in vitro. *J. Neurochem.* 61: 298-305.
- Fraser PE, McLachlan DR, Surewicz WK, Mizzen CA, Snow AD, Nguyen JT, Kirschner DA (1995) Conformation and fibrillogenesis of Alzheimer beta-amyloid peptides with selected substitution of charged residues. *Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders*. Eds: Iqbal, K. Mortimer, J.A. Winblad, B. Wisniewski, H.M. John Wiley & Sons Ltd pp: 577-584.
- 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.
- Frucht SJ, Koo EH (1993) beta-Amyloid protein is higher in alzheimer's disease brains: description of a quantitative biochemical assay. *J. Neuropath Exp Neur.* 52: 640-647.
- Fukumoto H, Odaka AA, Suzuki N, Shimada H, Ihara Y, Iwatsubo T (1996) Amyloid β protein deposition in normal aging has the same characteristics as that in Alzheimer's disease; *Am. J. of Pathol.* 148: 259-265.
- Gadjusek DC, Beyreuther K, Brown P, *et al.* (1991) Regulation and genetic control of brain amyloid. *Brain Res. Rev.* 16: 83-114.
- 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, Khan KM, Soriano FG, Keim PS, Davis DL, Bryant K, Lieberburg I (1992) Lack of alzheimer pathology after beta-Amyloid protein injections in rat brain. *Neurobiol. Aging.* 13: 569-576.
- Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, Guido T, Hagopian S, Johnsonwood K, Khan K, Lee M, Leibowitz P, Lieberburg I, Little S, Masliah E, Mcconlogue L, Montoyazavala 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.
- Gandy S, Czernik AJ, Greengard P (1988) Phosphorylation of Alzheimer disease amyloid precursor peptide by protein kinase C and Ca⁺⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6218-6221.

- Ghiso J, Rostagno A, Gardella JE, Liem L, Gorevic PD, Frangione B (1992) A 109-Amino-Acid C-Terminal fragment of Alzheimer's-Disease amyloid precursor protein contains a sequence, -RHDS-, that promotes cell adhesion. *Biochem. J.* 288: 1053-1059.
- Ghiso J, Matsubara E, Koudinov A, Choi-Miura NH, Tomita M, Wisniewski T, Frangione B (1993) The Cerebrospinal-Fluid soluble form of alzheimer's Amyloid-Beta is complexed to SP-40,40 (Apolipoprotein-J), an inhibitor of the complement Membrane-Attack complex. *Biochem. J.* 293: 27-30.
- Giaccone G, Tagliavini F, Linoli G, Bouras C, Frigerio L, Frangione B, Bugiani O (1989) Down patients: extracellular preamyloid deposits precede neuritic degeneration and senile plaques. *Neurosci. Lett.* 97: 232-238.
- Glenner GG et Wong CW (1984a) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120: 885-890.
- Glenner GG et Wong CW (1984b) Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122:1131-1135.
- Globus JH (1927) The Cajal and ortega glia staining methods. *Arch. Neurol. Psychiatry* 8: 263-271
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, Hardy J (1991) Segregation of a Missense Mutation in the Amyloid Precursor Protein Gene with Familial Alzheimer's Disease. *Nature* 349: 704-706.
- Goedert M, 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, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA (1992a) Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 8: 159-168.
- Goedert M, Cohen ES, Jakes R, Cohen P (1992b) p42 MAP kinase phosphorylation sites in microtubule-associated protein tau are dephosphorylated by protein phosphatase 2A₁. Implication for Alzheimer's disease. *FEBS Lett.* 312: 95-99.
- Goedert M, Jakes R, Crowther RA, Cohen P, Vanmechelen E, Vandermeeren M, Cras P (1994) 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.
- Golabek A, Marques MA, Lalowski M, Wisniewski T (1995) Amyloid beta binding proteins in vitro and in normal human cerebrospinal fluid. *Neurosci. Lett.* 191: 79-82.
- Golde TE, Estus S, Usiak M, Younkin LH, Younkin SG (1990) Expression of β amyloid protein precursor mRNAs: recognition of a novel alternatively spliced form and quantitation in Alzheimer's disease using PCR. *Neuron.* 4: 253-267.
- Goldgaber D, Lerman MI, McBride OW, Saffiotti U, Gajdusek DC (1987) Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* 235: 877-880.
- Goldgaber D, Harris HW, Hla T, Maciag T, Donnelly RJ, Jacobsen JS, Vitek MP, Gajdusek CD (1989) Interleukin 1 regulates synthesis of amyloid Beta-protein precursor mRNA in human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 7606-7610.
- Gong CX, Singh TJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1993) Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *J. Neurochem.* 61:921-927.
- Goodman Y, Steiner MR, Steiner SM, Mattson MP (1994) Nordihydroguaiaretic acid protects hippocampal neurons against amyloid beta-peptide toxicity, and attenuates free radical and calcium accumulation. *Brain Res.* 654: 171-176.
- Gowing E, Roher AE, Woods AS, Cotter RJ, Chaney M, Little SP, Ball MJ (1994) Chemical characterization of A β -17-42 peptide, a component of diffuse amyloid deposits of alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 269:10987-10990.
- Gravina SA, Ho LB, Eckman CB, Long KE, Otvos L, Younkin LH, Suzuki N, Younkin SG (1995) Amyloid beta protein (A beta) in Alzheimer's disease brain: Biochemical and immunocytochemical analysis with antibodies specific for forms ending at A beta 40 or A beta 42(43). *J. Biol. Chem.* 270: 7013-7016.
- Greenberg SB, Davies PA (1990) Preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau-proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5827-5831.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlin M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM (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, Quinlin 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.
- Haass C, Koo EH, Mellon A, Hung AY, Selkoe DJ (1992a) Targeting of Cell-Surface beta-Amyloid Precursor Protein to Lysosomes - Alternative Processing into Amyloid-Bearing Fragments. *Nature* 357: 500-503.

- Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, Selkoe DJ (1992b) Amyloid beta-Peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359: 322-325.
- Haass C, Hung AY, Schlossmacher MG, Teplow DB, Selkoe DJ (1993) beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J. Biol. Chem.* 268: 3021-3024.
- Haass C, Koo EH, Teplow DB, Selkoe DJ (1994a) Polarized secretion of β -amyloid precursor protein and amyloid β -peptide in MDCK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1564-1568.
- Haass C, Hung AY, Selkoe DJ, Teplow DB (1994b) Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid beta-protein precursor. *J. Biol. Chem.* 269: 17741-17748.
- Halverson K, Fraser PE, Kirschner DA, Lansbury Jr PT (1990) Molecular determinants of amyloid deposition in Alzheimer's disease: conformational studies of synthetic β -protein fragments. *Biochemistry* 29: 2639-2644 .
- Hamazaki, H. (1995) Ca²⁺-dependent binding of human serum amyloid P component to Alzheimer's beta-amyloid peptide. *J. Biol. Chem.* 270: 10392-10394.
- Han HY, Weinreb PH, Lansbury PT (1995) The core Alzheimer's peptide NAC forms amyloid fibrils which seed and are seeded by beta-amyloid: Is NAC a common trigger or target in neurodegenerative disease? *Chem. & Biol.* 2: 163-169.
- Hanger DP, Hughes K, Woodgett JR, Brion JP, 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.
- Hariagaya Y, Shoji M, Kawarabayashi T, Kanai M, Nakamura T, Iizuka T, Igeta Y, Saido TC, Sahara N, Mori H, Hirai S (1995) Modified amyloid beta protein ending at 42 or 40 with different solubility accumulates in the brain of Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211: 1015-1022.
- Hasegawa M, Morishima-Kawashima M, Takio K, Suzuki M, Arai T, 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.
- He Y, Delaere P, Duyckaerts C, Wasowicz M, Piette F, Hauw JJ (1993) 2 distinct ubiquitin immunoreactive senile plaques in alzheimer's disease: relationship with the intellectual status in 29 cases. *Acta Neuropathol.* 86: 109-116.
- Hendriks L, Vanduijn CM, Cras P, Cruts M, Vanhul W, Van Harskamp F, Martin JJ, Hofman A, Van Broeckhoven C (1992) Presenile Dementia and Cerebral

- Haemorrhage Linked to a Mutation at Codon-692 of the beta-Amyloid Precursor Protein Gene. *Nature Genetics*. 1: 218-221.
- Hesse L, Beher D, Masters CL, Multhaup G (1994) The beta A4 amyloid precursor protein binding to copper. *FEBS Lett*. 349: 109-116.
- Hilbich C, Kisterswoike B, Reed J, Masters CL, Beyreuther K (1991) Aggregation and Secondary Structure of Synthetic Amyloid betaA4 Peptides of Alzheimer's Disease. *J. Mol. Biol*. 218: 149-163.
- Himmler A, Dreschsel D, Kirschner MW, Martin DW (1989) Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol. Cell. Biol*. 9: 1381-1388.
- Hixson JE, Vernier DT (1990) Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with *Hha* I. *J. Lipid. Res*. 31:545-548.
- 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, Bouras C, Constantinidis J, Morrison JH (1990b) Selective Disconnection of Specific Visual Association Pathways in Cases of Alzheimers Disease Presenting with Balints Syndrome. *J. of Neuropathol. Exp*. 49: 168-184.
- Hof PR, Bierer LM, Perl DP, Delacourte A, Buée L, Bouras C, Morrison JH (1992) Evidence for early vulnerability of the medial and inferior aspects of the temporal lobe in a 82-year old patient with preclinical signs of dementia. Regional and laminar distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques. *Arch. Neurol*. 16: 111-121.
- Hung AY, Haass C, Nitsch RM, Qiu WQ, Citron M, Wurtman RJ, Growdon JH, Selkoe DJ (1993) Activation of protein Kinase-C inhibits cellular production of the amyloid beta-Protein. *J. Biol. Chem*. 268: 22959-22962.
- Hung AY, Selkoe DJ (1994) Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of beta-amyloid precursor protein. *EMBO J*. 13: 534-542.
- Ignatius MJ, Gebicke-Härter PJ, Skene HP, Schilling JW, Weisgraber KH, Mahley RW, Shooter EM (1986) Expression of Apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 1125-1129.
- Ihara Y, Nukina N, Miura R, Ogawara M (1986) Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J. Biochem. (Tokyo)* 99: 1807-1810.
- Ikeda SI, Allsop D, Glenner GG (1989) Morphology and distribution of plaque and related deposits in the brains of Alzheimer's disease and controls cases: An Immunohistochemical Study Using Amyloid Beta-Protein Antibody. *Lab. Invest*. 60: 113-122.

- Ikeda S, Yanagisawa N, Allsop D, Glenner GG (1994) Gerstmann-Straussler-Scheinker disease showing beta-protein type cerebellar and cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol.* 88: 262-266.
- 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.
- Ishiura S, Tsukahara T, Tabira T, Sugita H (1989) Putative N-Terminal Splitting Enzyme of Amyloid A4 Peptides Is the Multicatalytic Proteinase, Ingensin, Which Is Widely Distributed in Mammalian Cells. *FEBS Lett.* 257: 388-392.
- Ishiura S, Tsukahara T, Tabira T, Shimizu T, Arahata K, Sugita H. (1990) Identification of a putative amyloid A4-generating enzyme as a prolyl endopeptidase. *FEBS Lett.* 260: 131-134.
- Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y(1994) Visualization of A β 42(43)-positive and A β 40-positive senile plaques with end-specific A β monoclonal antibodies: evidence that an initially deposited species is A β 1-42(43). *Neuron* 13: 45-53.
- Jacobsen JS, Muenkel HA, Blume AJ, Vitek MP (1991) A novel species-specific RNA related to alternatively spliced amyloid protein precursor mRNAs. *Neurobiol. Aging* 12: 575-583.
- Jaffe AB, Toran-Allerand CD, Greengard P, Gandy SE (1994) Estrogen regulates metabolism of Alzheimer amyloid β precursor protein. *J. Biol. Chem.* 269: 13065-13068.
- Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT (1993) The carboxy terminus of the beta-Amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of alzheimer's disease. *Biochemistry* 32: 4693-4697.
- Jiang HX, Burdick D, Glabe CG, Cotman CW, Tenner AJ (1994) beta-Amyloid Activates Complement by Binding to a Specific Region of the Collagen-Like Domain of the C1q α Chain. *J. of Immunol.* 152: 5050-5059.
- Joachim CL, Duffy LK , Morris JH, Selkoe DJ (1988) Protein Chemical and Immunocytochemical Studies of Meningovascular Beta-Amyloid Protein in Alzheimers Disease and Normal Aging. *Brain Res.* 474: 100-111.
- Joslin G, Krause JE, Hershey AD, Adams SP, Fallon RJ, Perlmutter DH (1991) Amyloid-beta Peptide, Substance-P, and Bombesin Bind to the Serpin-Enzyme Complex Receptor. *J. Biol. Chem.* 266: 21897-21902.
- Kalaria RN, Perry G. (1993) Amyloid p component and other Acute-Phase proteins associated with cerebellar a beta-deposits in alzheimers disease. *Brain Res.* 631: 151-155.

- Kamboh MI, Sanghera DK, Ferrell RE, Dekosky ST (1995) APOE*4-associated Alzheimer's disease risk is modified by alpha 1-antichymotrypsin polymorphism. *Nature Genetics* 10: 486-488.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B (1987) The precursor of Alzheimer's amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature (London)* 325: 733-736.
- Kang J et Müller-Hill B (1990) Differential splicing of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor RNA in rat tissues: pre A4₆₉₅ mRNA is predominantly produced in rat and human brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166: 1192-1200.
- Katzman R, Terry R, DeTeresa R, Brown T, Davies P, Fuld P, Renbing X, Peck A (1988) Clinical, pathological and neurochemical changes in dementia : a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. *Ann. Neurol.* 23: 138-144.
- Khachaturian ZS (1985) Diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.* 42: 1097-1105.
- Kida E, Choi-Miura NH, Wisniewski KE (1995) Deposition of apolipoproteins E and J in senile plaques is topographically determined in both Alzheimer's disease and Down's syndrome brain. *Brain Res.* 685: 211-216.
- Kidd M (1963) Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 197: 192-193.
- Kim KS, Miller DL, Sapienza VJ, Chen CM, Bai C, Grundke-Iqbal I, Currie JR, Wisniewski HM (1988) Production and characterization of monoclonal antibodies reactive to synthetic cerebrovascular amyloid peptide. *Neurosci. Res. Commun.* 2: 121-130.
- Kirschner DA, Abraham C, Selkoe DJ (1986) X-ray diffraction from intraneuronal paired helical filaments and extraneuronal amyloid fibers in Alzheimer disease indicates cross- β conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:503-507.
- Kisilevsky R, Narindrasorasak S, Altman RA, Fairbanks MB, Gonzalez-DeWhitt P, Greenberg BD (1992) Characterization of fibronectin binding to Alzheimer's beta amyloid protein precursors. *Neurobiol. Aging* 13: S81
- Kisilevsky R, Lemieux LJ, Fraser PE, Kong XQ, Hultin PG, Szarek WA (1995) Arresting amyloidosis in vivo using small-molecule anionic sulphonates or sulphates: Implications for Alzheimer's disease. *Nature Medicine* 1: 143-148.
- Kitaguchi N, Takahashi Y, Tokushima Y, Shiojiri S, Itoh H (1988) Novel precursor of Alzheimer's disease protein shows protease inhibitory activity. *Nature* 311: 530-532.
- Klunk WE, Xu CJ, Pettegrew JW (1994) NMR identification of the formic Acid-Modified residue in alzheimers amyloid protein. *J. Neurochem.* 62: 349-354.

- Knauer MF, Soreghan B, Burdick D, Kosmoski J, Glabe CG (1992) Intracellular accumulation and resistance to degradation of the Alzheimer amyloid A4/beta-Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7437-7441.
- Kojima SI, Omori M (1992) Two-way cleavage of Beta-amyloid protein precursor by multicatalytic proteinase. *FEBS Lett.* 304: 57-60.
- Kondo J, Honda T, Mori H, Hamada Y, Miura R, Ogawara M, Ihara Y (1988) The carboxyl third of tau is tightly bound to paired helical filaments. *Neuron* 1: 827-834.
- König G, Monning U, Czech C, Prior R, Banati R, Schreitergasser UB (1992) Identification and Differential Expression of a Novel Alternative Splice Isoform of the betaA4 Amyloid Precursor Protein (APP) Messenger RNA in Leukocytes and Brain Microglial Cells. *J. Biol. Chem.* 267: 10804-10809.
- Koo EH, Park L, Selkoe DJ (1993) Amyloid β -protein as a substrate interacts with extracellular matrix to promote neurites outgrowth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4748-4752.
- Koo EH, Squazzo SL (1994) Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 269: 17386-17389.
- 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. USA* 81: 7941-7945.
- Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ (1986) 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, Crandall JE, Mufson E, Neve RL (1989) Tau in situ hybridization in normal and Alzheimer brain: localization in the somatodendritic compartment. *Ann. Neurol.* 26:352-361
- Kosik KS (1992) Alzheimer's Disease: A Cell Biological Perspective. *Science* 256: 780-783.
- Kowall NW et Kosik KS (1987) Axonal disruption and aberrant localization of Tau protein characterize the neuropil pathology of Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 22:639-643.
- Kowall NW, Beal MF, Busciglio J, Duffy LK, Yankner BA (1991) An In vivo Model for the Neurodegenerative Effects of beta-Amyloid and Protection by Substance-P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7247-7251.
- Kowall NW, Mckee AC, Yankner BA, Beal MF (1992) In vivo neurotoxicity of Beta-Amyloid $\beta(1-40)$ and the beta(25-35) fragment. *Neurobiol. Aging.* 13: 537-542.
- Ksiezak-Reding H, Binder LI, Yen SH (1990) Alzheimer's disease proteins (A68) share epitopes with tau but show distinct biochemical properties. *J. Neurosci. Res.* 25: 420-430.

- 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.
- 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.
- Ladu MJ, Pederson TM, Frail DE, Reardon CA, Getz GS, Falduto MT (1995) Purification of apolipoprotein E attenuates isoform-specific binding to beta-amyloid. *J. Biol. Chem.* 270: 9039-9042.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lahiri DK, Lewis S, Farlow MR (1994) Tacrine alters the secretion of the beta-amyloid precursor protein in cell lines. *J. Neurosci. Res.* 37: 777-787.
- Ledesma MD, Correas I, Avila J, Diasnido J (1992) Implication of brain cdc2 and MAP2 kinases in the phosphorylation of tau protein in Alzheimer's disease. *FEBS Lett.* 308: 218-224.
- Lee G, Neve RL, Kosik KS (1989) The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron* 2: 1615-1624.
- Lemaire H, Salbaum JM, Multhaup G, Kang J, Bayney RM, Unterbeck A, Beyreuther K, Müller-Hill B (1989) The pre A4 695 precursor protein of Alzheimer's disease A4 amyloid is encoded by 16 exons. *Nucleic Acids Res.* 17: 517-522.
- Lenders MB, Peers MP, Tramu G, Delacourte A, Défossez A, Petit H, Mazzuca M (1989) Dystrophic peptidergic neurites in senile plaques of Alzheimer's disease hippocampus precedes formation of paired helical filaments. *Brain Res.* 481: 344-349.
- Leroy A, Vu-Dac N, Koffigan M, Clavey V, Fruchart JC (1988) Characterization of a monoclonal antibody that binds to apolipoprotein E and to lipoprotein of human plasma containing apolipoprotein E. Application to ELISA quantification of plasma apolipoprotein E. *J. Immunol.* 9: 309-334.
- Levy E, Carman MD, Fernandez-Madrid IJ, Power MD, Lieberburg I, Van Duinen SG, Bots BThAM, Luyendijk W, Frangione B (1990) Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science* 248: 1124-1126.
- Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu C, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, Crowley AC, Fu YH, Guenette SY, Galas D, Nemens E, Wijsman EM, Bird TD, Schellenberg GD, Tanzi RE (1995) Candidate Gene for the Chromosome I Familial Alzheimer's Disease Locus. *Scienc* 269: 973-977.

- 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.
- Liepnieks JJ, Ghetti B, Farlow M, Roses AD, Benson MD (1993) Characterization of amyloid familial beta-Peptide in familial alzheimers disease with APP717 mutations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197: 386-392.
- Lindwall G, Cole RD (1984) Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J. Biol. Chem.* 259: 5301-5305.
- Lippa CF, Smith TW, Swearer JM (1994) Alzheimers disease and lewy body disease - a comparative clinicopathological study (Vol. 35, pg 81, 1994). *Ann. Neurol.* 35: 380.
- Ma J, Yee A, Brewer, B, Das S, Potter H (1994) Amyloid-associated proteins al antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer beta-protein into filaments. *Nature.* 372: 92-94.
- Mahley RW (1988) Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240: 622-630.
- Mak K, Yang F, Vinters HV, Frautschy SA, Cole GM (1994) Polyclonals to β -amyloid (1-42) idetify most plaque and vascular deposits in Alzheimer cortex, but not striatum. *Brain Res.* 667: 138-142.
- Mandybur TI, Chuirazzi CC (1990) Astrocytes and the plaques of Alzheimer' s disease. *Neurology* 40: 635-639.
- Mann DMA (1988) Neuropathological and neurochemical aspects of Alzheimer's disease. In: *Handbook of psychopharmacology.* Vol. 20, publi  par LL Iversen, SD Iversen et SH Snyder. Plenum Press, New York.
- Mann DMA et Esiri MM (1989) The pattern of acquisition of plaques and tangles in the brains of patients under 50 years of age with Down's syndrome. *J. Neurol. Sci.* 89: 169-179.
- Mann DMA, Jones D, Prinja D, Purkiss MS (1990) The prevalence of amyloid (A4) protein deposits within the cerebral and cerebellar cortex in Down's syndrome and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 80: 318-327.
- Mann DMA, Iwatsubo T, Fukumoto H, Ihara Y, Odaka A, Suzuki N (1995) Microglial cells and amyloid β protein (A β) deposition: association with A β 40-containing plaques. *Acta Neuropathol.* 90: 472-477.
- Mantyh PW, Ghilardi JR, Rogers S, Demaster E, Allen CJ, Stimson E (1993) Aluminum, iron, and zinc ions promote aggregation of physiological concentrations of beta-Amyloid peptide. *J. Neurochem.* 61: 1171-1174.
- Marks N, Berg MJ, Chi LM, Choi J, Durrie R, Swistok J, Makofske RC, Danho W, Sapirstein VS (1994) Hydrolysis of amyloid precursor Protein-Derived peptides by cysteine proteinases and extracts of rat brain Clathrin-Coated vesicles. *Peptides* 15: 175-182.

- Maruyama K, Terakado K, Usami M, Yoshikawa K (1990) Formation of Amyloid-Like Fibrils in COS Cells Overexpressing Part of the Alzheimer Amyloid Protein Precursor. *Nature*. 347: 566-569.
- Masliah E, Terry RD, Deteresa RM, Hansen LA (1989) Immunohistochemical Quantification of the Synapse-Related Protein Synaptophysin in Alzheimer Disease. *Neurosci. Lett*. 103: 234-239.
- 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.
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multaup G, Mc Donald BL, Beyreuther K (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4245-4249.
- Matsubara E, Frangione B, Ghiso J (1995) Characterization of apolipoprotein J-Alzheimer's A beta interaction. *J. Biol. Chem*. 270: 7563-7567.
- 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 Peptides Destabilize Calcium Homeostasis and Render Human Cortical Neurons Vulnerable to Excitotoxicity. *J. Neurosci*. 12: 376-389.
- Mattson, MP, Cheng B, Culwell AR, Esch FS, Lieberburg I, Rydel RE (1993a) Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron*. 10: 243-254.
- Mattson MP, Barger SW, Cheng B, Lieberburg I, Smith-Swintosky VL, Rydel RE (1993b) β -Amyloid precursor protein metabolites and loss of neuronal Ca⁺ homeostasis in Alzheimer's disease. *T.I.N.S.* 16: 409-414.
- Mattson MP, Tomaselli KJ, Rydel RE (1993c) Calcium-Destabilizing and neurodegenerative effects of aggregated beta-Amyloid peptide are attenuated by basic FGF. *Brain Res*. 621: 35-49.
- Mawal-Dewan M, Henley J, Vandevoorde 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.
- Mc Dermott JR, Gibson AM (1991) The processing of Alzheimer A4/ β amyloid protein precursor: identification of a human brain metallopeptidase which cleaves -Lys-Leu- in a model peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 185: 746-752.

- Mc Dermott JR, Biggins JA, Gibson AM (1992) Human Brain Peptidase Activity with the Specificity to Generate the N-Terminus of the Alzheimer beta-Amyloid Protein from Its Precursor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185: 746-752.
- Mc Geer PL, Mc Geer EG (1995) The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative disease. *Brain Res. Rev.* 21: 195-218.
- 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 Service Task Force of Alzheimer's disease. *Neurology* 34: 939-944.
- Mckee AC, Kosik KS, Kowall NW (1991) Neuritic Pathology and Dementia in Alzheimer's Disease. *Ann. Neurol.* 30: 156-165.
- 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 against phosphatase-sensitive epitopes. *Acta Neuropathol.* 84: 265-272.
- Merz PA, Wisniewski HM, Sommerville RA, Bobin SA, Masters CL, Iqbal K (1983) Ultrastructural morphology of amyloid fibrils from neuritic and amyloid plaques. *Acta neuropathol.* 60:113-125.
- Miller DL, Papayannopoulos IA, Styles J, Bobin SA, Lin YY, Biemann K, Iqbal K (1993) Peptide compositions of the cerebrovascular and senile plaque core amyloid deposits of alzheimer's disease. *Arch. Biochem. Biophys.* 301: 41-52.
- Mirra SS, Heyman A, Mckeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, *et al.* (1991) The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD), II: Standardization of the Neuropathological Assessment of Alzheimer's Disease. *Neurology* 41: 479-486.
- Mirra SS, Hart MN, Terry RD (1993) Making the Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 117: 132-144.
- Mirzabekov T, Lin MC, Yuan WL, Marshall PJ, Carman M, Tomaselli K, Lieberburg I Kagan, B.L. (1994) Channel formation in planar lipid bilayers by a neurotoxic fragment of the beta amyloid peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202: 1142-1148.
- Mita S, Schon EA, Herbert J (1989) Widespread expression of amyloid beta-protein precursor gene in rat brain. *Am. J. Pathol.* 134: 1253-1261.
- Miyazaki K, Hasegawa M, Funahashi K, Umeda M (1993) A metalloproteinase inhibitor domain in alzheimer amyloid protein precursor. *Nature* 362: 839-841.
- Miyazono M, Kitamoto T, Iwaki T, Tateishi J (1992) Colocalization of Prion Protein and beta-Protein in the Same Amyloid Plaques in Patients with Gerstmann-Straussler Syndrome. *Acta Neuropathol.* 83: 333-339.

- Mori H, Takio K, Ogawara M, Selkoe D (1992) Mass spectrometry of purified amyloid-beta protein in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 267: 17082-17086.
- 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, *et al.* (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.
- Multhaup G (1994) Identification and regulation of the high affinity binding site of the Alzheimer's disease amyloid protein precursor (APP) to glycosaminoglycans. *Biochimie* 76: 304-311.
- Murphy, G.M. Forno, L.S. Higgins, L. Scardina JM, Eng LF, Cordell B Development of a monoclonal antibody specific for the COOH-terminal of beta-amyloid 1-42 and its immunohistochemical reactivity in Alzheimer's disease and related disorders. *Am. J. Pathol.* (1994) 144:1082-1088.
- Murrell J, Farlow M, Ghetti B, Benson MD (1991) A Mutation in the Amyloid Precursor Protein Associated with Hereditary Alzheimer's Disease. *Science* 253: 97-98.
- 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.
- Narindrasorasak S, Lowery DE, Altman RA, Gonzalez DeWhitt PA, Greenberg BD, Kisilevsky R (1992) Characterization of high affinity binding between laminin and Alzheimer's disease amyloid precursor proteins. *Lab. Invest.* 67: 643-652.
- Narindrasorasak S, Altman RA, Gonzalez-DeWhitt P, Greenberg BD, Kisilevsky R (1994) Influence of entactin on the binding of other basement membrane proteins to the Alzheimer amyloid precursor proteins; In: Kisilevsky R, Benson MD, Frangione B, Gaudie J, Muckle TJ, Young ID, editors. *Amyloid and amyloidosis 1993*. New York; Parthenon Publishing: 344-6.
- Nelson RB, Siman R (1990) Clipsin, a chymotrypsin-like protease in rat brain which is irreversibly inhibited by α -1 antichymotrypsin. *J. Biol. Chem.* 265: 3836-3843.
- Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon DA (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.
- Neve RL, Finch EA, Dawes LR (1988) Expression of the Alzheimer amyloid precursor gene transcripts in the human brain. *Neuron* 1: 669-677.

- Ninomiya H, Roch JM, Sundsmo MP *et al.* (1993) Amino acid sequence RERMS represents the active domain of amyloid β /A4 protein precursor that promotes fibroblast growth. *J. Cell Biol.* 121: 879-886.
- Nishimoto I, Okamoto T, Matsuura Y, Takahashi S, Okamoto T, Murayama Y, Ogata E (1993) Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-Binding Protein-G0. *Nature* 362: 75-79.
- Nitsch RM, Slack BE, Wurtman RJ, Growdon JH (1992) Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* 258: 304-307.
- Nordstedt C, Caporaso GL, Thyberg J, Gandy SE, Greengard P (1993) Identification of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein in Clathrin-Coated vesicles purified from PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 268: 608-612.
- Nukina N, Ihara Y (1986) One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein. *J. Biochem.* 99: 1541-1544.
- Oda T, Wals P, Osterburg HH, Johnson SA, Pasinetti GM, Morgan TE, Rozovsky I, Stine WB, Snyder SW, Holzman TF, Krafft GA, Finch CE (1995) Clusterin (apoJ) alters the aggregation of amyloid beta-peptide (A beta(1-42)) and forms slowly sedimenting A beta complexes that cause oxidative stress. *Exp. Neurol.* 136: 22-31.
- 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.
- Pangalos MN, Efthimiopoulos S, Shioi J, Robakis NK (1995) The chondroitin sulfate attachment site of appican is formed by splicing out exon 15 of the amyloid precursor gene. *J. Biol. Chem.* 270: 10388-10391.
- Papasozomenos SC et Binder LI (1987) Phosphorylation determines two distinct species of Tau in the central nervous system. *Cell Motility and Cytoskeleton* 8:210-226.
- Papastoitsis G, Siman R, Scott R, Abraham CR (1994) Identification of a metalloprotease from Alzheimer's disease brain able to degrade the beta-Amyloid precursor protein and generate amyloidogenic fragments. *Biochemistry* 33: 192-199.
- Perez-Tur J, Campion D, Martinez M, Brice A, Tardieu S, Hannequin D, Agid Y, Delacourte A, Clergetdarpoux F, Chartier-Harlin MC, Bellis M, Dubois B, Goas Y, Thomasanteriorion C, Jaillarderradt A, Ledoze F, Mallet J, Michon A, Pasquier F, Puel M, Zimmerman MA (1995) Evidence for apolipoprotein E epsilon 4 association in early-onset Alzheimer's patients with late-onset relatives. *Am. J. of Med. Gen.* 60: 550-553.

- Perlmutter LS, Chui HC, Saperia D, Athanikar J (1990) Microangiopathy and the Colocalization of Heparan Sulfate Proteoglycan with Amyloid in Senile Plaques of Alzheimers Disease. *Brain. Res.* 508: 13-19.
- Perry G, Kawai M, Kalaria R, Tabaton M, Cras P (1992) Transformation of neurofibrillary tangles. *Neurobiol. Aging* 13: S37.
- Pike CJ, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW (1991) In vitro Aging of beta-Amyloid Protein Causes Peptide Aggregation and Neurotoxicity. *Brain Res.* 563: 311-314.
- Podlisny MB, Stephenson DT, Frosch MP, Lieberburg I, Clemens JA, Selkoe DJ (1992) Synthetic amyloid beta-Protein fails to produce specific neurotoxicity in monkey cerebral cortex. *Neurobiol. Aging* 13: 561-567.
- Ponte P, Gonzales-DeWhitt P, Schilling J Miller J, Hsu D, Greenberg B, Davis K, Wallace W, Lieberburg I, Fuller F, Cordell B (1988) A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine protease inhibitors. *Nature* 331: 525-527.
- Potter H, Abraham CR, Dressler D (1991) The Alzheimer amyloid component alpha-1-antichymotrypsin and β -protein form a stable complex in vitro. Iqbal K, McLachlan DRC, Winblad B, Wisniewsky HM, eds. *Alzheimer's disease: basic mechanism, diagnosis and therapeutic strategies*. Chichester: Wiley and sons: 275-279.
- Prelli F, Castano E, Glenner GG, Frangione B. (1988) Differences between vascular and plaque core amyloid in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 51: 648.
- Price DL, Whitehouse PJ, Struble RG (1986) Alzheimer's disease. *Ann. Rev. Med.* 36: 349-356.
- Price JL, Davis PB, Morris JC, and White DL (1991) The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 12: 295-312.
- Prusiner SB (1990) Novel Structure and Genetics of Prions Causing Neurodegeneration in Humans and Animals. *Biologicals.* 18: 247-262.
- Qiu WQ, Ferreira A, Miller C, Koo EH, Selkoe DJ (1995) Cell-surface β -amyloid precursor protein stimulates neurites outgrowth of hippocampal in an isoform-dependant manner. *J. Neurosci.* 15: 2157-2167.
- 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.
- Rasmussen LK, Sorensen ES, Petersen TE, Gliemann J, Jensen PH (1994) Identification of glutamine and lysine residues in alzheimer amyloid beta A4 peptide responsible for transglutaminase-catalysed homopolymerization and cross-linking to alpha(2)M receptor. *FEBS Lett.* 338:161-166.

- Razzaboni BL, Papastoitsis G, Koo EH, Abraham CR (1992) A Calcium-Stimulated serine protease from monkey brain degrades the beta-Amyloid precursor protein. *Brain Res.* 589: 207-216.
- Robakis NK, Ramakrishna N, Wolfe G, Wisniewski HM (1987) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and neuritic plaque amyloid peptides. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 84: 4190-4194.
- Roberts GW, Allsop D, Bruton C (1990) The occult aftermath of boxing. *J. Neurol. Neurosurg. Psy.* 53: 373-378.
- Roberts SB, Ripellino JA, Ingalls KM, Robakis NK, Felsenstein KM (1994) Non-Amyloidogenic cleavage of the beta-Amyloid precursor protein by an integral membrane metalloendopeptidase. *J. Biol. Chem.* 269: 3111-3116.
- Rogers J, Cooper NR, Webster S, Schultz J, McGeer PL, Styren SD, Civin WH, Brachoval L, Bradt B, Ward P, Lieberburg I (1992) Complement activation by beta-Amyloid in alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10016-10020.
- Roher AE, Lowenson JD, Clarke S, Wolkow C, Wang R, Cotter RJ, Reardon IM, Zürcher-Neely HA, Heinrikson RL, Ball MJ, Greenberg BD (1993a) Structural alterations in the peptide backbone of beta-Amyloid core protein may account for its deposition and stability in alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 268:3072-3083.
- Roher AE, Lowenson JD, Clarke S, Woods AS, Cotter RJ, Gowing E, Ball MJ (1993b) β -Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits implications for the pathology of alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10836-10840.
- Roher AE, Palmer KC, Yurewicz EC, Ball MJ, Greenberg BD (1993c) Morphological and biochemical analyses of amyloid plaque core proteins purified from alzheimer disease brain tissue. *J. Neurochem.* 61: 1916-1926.
- Rosenblatt DE, Geula C, Mesulam MM (1989) Protein Nexin I immunostaining in Alzheimer's disease. *Annal. Neurol.* 26: 628-634.
- Rumble B, Retallack R, Hilbich C, Simms G, Multhaup G, Martins R, Hockey A, Montgomery P, Beyreuther K, Masters CL (1989) Amyloid A4 Protein and Its Precursor in Down's Syndrome and Alzheimers Disease. *N. Engl. J. Med.* 320: 1446-1452.
- Sahasrabudhe SR, Spruyt MA, Muenkel HA, Blume AJ, Vitek MP, Jacobsen JS (1992) Release of Amino-Terminal fragments from amyloid precursor protein reporter and mutated derivatives in cultured cells. *J. Biol. Chem.* 267: 25602-25608.
- Sahasrabudhe SR, Brown AM, Hulmes JD, Jacobsen JS, Vitek MP, Blume AJ Sonnenberg JL (1993) Enzymatic generation of the amino terminus of the beta-Amyloid peptide. *J. Biol. Chem.* 268: 16699-16705.

- Saido TC, Iwatsubo T, Mann DMA, Shimada H, Ihara Y, Kawashima S (1995) Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta(N3(pE)), in senile plaques. *Neuron* 14: 457-466.
- Saitoh T, Sundsmo M, Roch JM, Kumura N, Cole G, Schubert D, Oltersdorf T, Schenk Db (1989) Secreted form of amyloid β -protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. *Cell* 58: 615-622.
- Sambamurti K, Shioi J, Anderson JP, Pappolla MA, Robakis NK (1992) Evidence for intracellular cleavage of the alzheimer's amyloid precursor in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* 33: 319-329.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory press pp E3-E4.
- Sanan DA, Weisgraber KH, Russell SJ, Mahley RW, Huang D, Saunders A, Schmechel D, Wisniewski T, Frangione B, Roses AD, Strittmatter WJ (1994) Apolipoprotein E associates with beta amyloid peptide of Alzheimer's disease to form novel monofibrils - Isoform ApoE4 associates more efficiently than ApoE3. *J. Clin. Invest.* 94: 860-869.
- Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, St GeorgeHyslop PH, PericakVance MA, Joo SH, Rosi BL, *et al.* (1993) Association of Apolipoprotein-E allele epsilon-4 with Late-Onset familial and sporadic alzheimers disease. *Neurology* 43: 1467-1472.
- 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. *Ann. Biochem.* 166: 368-379.
- Scharzman A, Gregori L, Vitek M, Lyubski S, Strittmatter WJ, Enghilde JJ, Bhasin R, Silverman J, Weisgraber KH, Coyle PK, Zagorski MG, Talafous J, Eisenberg M, Saunders AM, Roses AD, Goldgaber D (1994) Tranthyretin sequesters amyloid β protein and prevets amyloid formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8368-8372.
- 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) Heterogeneity of alzheimer's disease. *Rev. Neurol.* 149: 14-25.
- Scheuner D (1995) Fibroblasts from carriers of familial AD linked to chromosome 14 show increased A β production. *Soc. Neurosci. Abstr.* vol. 21, 1500.
- Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, PericakVance MA, Goldgaber D, Roses AD (1993) Increased amyloid beta-Peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of Apolipoprotein-E genotype in Late-Onset alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 9649-9653.

- Schönlein C, Löffler J, Huber G (1994) Purification and characterization of a novel metalloprotease from human brain with the ability to cleave substrates derived from the N-terminus of β -amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201: 45-53.
- Schubert D, Schroeder R, La Corbiere M, Saitoh T, Cole G (1988) Amyloid beta protein precursor is possibly a heparan sulfate proteoglycan core protein. *Science* 241: 223-225.
- Schubert DM, Lacorbiere T, Saitoh G, Cole G (1989) Characterization of an Amyloid Beta-Precursor Protein That Binds Heparin and Contains Tyrosine Sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2066-2069.
- Selkoe DJ, Douglas SB, Podlisny MB, Price DL, Cork LC (1987) Conservation of brain amyloid proteins in aged mammals and humans with Alzheimer's disease. *Science* 235: 873-877.
- Selkoe DJ, Podlisny MB, Joachim CL, Vickers EA, Lee G, Fritz LC, Oltersdorf T (1988) Beta amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135 kilodalton membrane-associate proteins in neural and noneural tissues.. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7341-7345.
- Sergeant N, Bussiere T, Vermersch P, Lejeune JP, Delacourte A (1995) Isoelectric point differentiates PHF-tau from biopsy-derived human brain tau proteins. *Neuroreport*. 6: 2217-2220.
- Seubert P, Vigopelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S *et al.* (1992) Isolation and quantification of soluble alzheimer's beta-Peptide from biological fluids. *Nature* 359: 325-327.
- Shearman MS, Ragan CI, Iversen LL (1994) Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of beta-Amyloid-Mediated cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1470-1474.
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Dasilva HAR, Haines JL, Pericakvance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St-GeorgeHyslop PH (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375: 754-760.
- Shigematsu K, Mcgeer PL, Mcgeer EG (1992) Localization of amyloid precursor protein in selective postsynaptic densities of rat cortical neurons. *Brain Res.* 592: 353-357.
- Shimokawa M, Yanagisawa K, Nishiye H, Miyatake T (1993) Identification of amyloid precursor protein in synaptic plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196: 240-244.

- Shioi J, Anderson JP, Ripellino JA, Robakis NK (1992) Chondroitin Sulfate Proteoglycan Form of the Alzheimer's beta-Amyloid Precursor. *J. Biol. Chem.* 267: 13819-13822.
- Shoji M, Golde TE, Ghiso J, Cheung TT, Estus S, Shaffer LM, Cai XD, Mc Kay DM, Tintner R, Frangione B, Younkin SG (1992) Production of the alzheimer amyloid-beta protein by normal proteolytic processing. *Science* 258: 126-129.
- Shuvaev VV, Siest GR (1996) Interaction between human amphipathic apolipoproteins and amyloid beta-peptide: Surface plasmon resonance studies. *FEBS Lett.* 383: 9-12.
- Siman R, Card JP, Nelson RB, Davis LG (1989) Expression of β -amyloid precursor protein in reactive astrocytes following neuronal damage. *Neuron* 3: 275-285.
- Simmons MA, Schneider CR (1993) Amyloid-beta peptides act directly on single neurons. *Neurosci. Lett.* 150: 133-136.
- Sisodia SS (1992) beta-Amyloid Precursor Protein Cleavage by a Membrane-Bound Protease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89: 6075-6079.
- Slack BE, Nitsch RM, Livneh E, Kunz GM, Breu J, Eldar H, Wurtman RJ (1993) Regulation by phorbol esters of amyloid precursor protein release from swiss 3T3 fibroblasts overexpressing protein Kinase-C-alpha. *J. Biol. Chem.* 268: 21097-21101.
- Slunt HH, Thinakaran G, Vonkoch C, Lo ACY, Tanzi RE, Sisodia SS (1994) Expression of a ubiquitous, Cross-Reactive homologue of the mouse beta-amyloid precursor protein (APP). *J. Biol. Chem.* 269: 2637-2644.
- Small DH, Moir RD, Fuller SJ, Michaelson S, Bush AI, Li QX, Milward E, Hilbich C, Weideman A, Beyreuther K, Masters CL (1991) A Protease Activity Associated with Acetylcholinesterase Releases the Membrane-Bound Form of the Amyloid Protein Precursor of Alzheimer's Disease. *Biochemistry* 30: 10795-10799.
- Small DH, Nurcombe V, Reed G, Clarris H, Moir R, Beyreuther K, Masters CL (1994) A Heparin-Binding domain in the amyloid protein precursor of alzheimers disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *J. Neurosci.* 14: 2117-2127.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goetze NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using Bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85.
- Smith RP, Higuchi DA, Broze GJ Jr (1990) Platelet coagulation factor XIa inhibitor, a form of Alzheimer amyloid precursor protein. *Science* 248: 1126-1128.
- Smith MA, Kalaria RN, Perry G (1993) alpha-1-Trypsin immunoreactivity in alzheimers disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193: 579-584.
- Snow AD, Mar H, Nochlin D, Kimata K, Kato M, Suzuki S, Hassell J, Wight TN (1988) The presence of heparan sulfate proteoglycans in the neuritic plaques and congophilic angiopathy in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 133: 456-463.
- Snow AD, Wight TN (1989) Proteoglycans in the pathogenesis of Alzheimer's disease and other amyloidoses. *Neurobiol. Aging* 10: 481-497.

- Snow AD, 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 AD, Mar H, Nochlin D, Kresse H, Wight TN (1992) Peripheral Distribution of Dermatan Sulfate Proteoglycans (Decorin) in Amyloid-Containing Plaques and Their Presence in Neurofibrillary Tangles of Alzheimer's Disease. *J. Histochem. Cytochem.* 40: 105-113.
- Snow AD, Sekiguchi R, Nochlin D, Fraser P, Kimata K, Mizutani A, Arai M, Schreier WA, Morgan DG (1994a) An important role of heparan sulfate proteoglycan (Perlecan) in a model system for the deposition and persistence of fibrillar α -Amyloid in rat brain. *Neuron.* 12: 219-234.
- Snow AD, Sekiguchi RT, Nochlin D, Kalaria RN, Kimata K (1994b) Heparan sulfate proteoglycan in diffuse plaques of hippocampus but not of cerebellum in alzheimer's disease brain. *Am. J. Pathol.* 144: 337-347.
- Snyder SW, Lador US, Wade WS, Wang GT, Barrett LW, Matayoshi ED, Huffaker HJ, Krafft GA, Holzman TF (1994) Amyloid-beta aggregation: Selective inhibition of aggregation in mixtures of amyloid with different chain lengths. *Biophys. J.* 67: 1216-1228.
- Sorbi S, Nacmias B, Forleo P, Piacentini S, Sherrington R, Rogaev E, Hyslop PSG, Amaducci L (1995) Missense mutation of S182 gene in Italian families with early-onset Alzheimer's disease. *Lancet* 346: 439-440.
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, PericakVance 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. USA* 90: 1977-1981.
- Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong LM, Salvesen GS, PericakVance M, Schmechel D, Saunders AM, Goldgaber D, Roses AD (1993b) Binding of human Apolipoprotein-E to synthetic amyloid beta peptide: Isoform-Specific effects and implications for Late-Onset alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8098-8102.
- Suzuki T, Nairn AC, Gandy SE, Greengard P (1992) Phosphorylation of Alzheimer Amyloid Precursor Protein by Protein Kinase-C. *Neuroscience* 48: 755-761.
- Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L, Eckman C, Golde TE, Younkin SG (1994a) An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor beta APP(717)) mutants. *Science* 264: 1336-1340.
- Suzuki N, Iwatsubo T, Odaka A, Ishibashi Y, Kitada C, Ihara Y (1994b) High tissue content of soluble β 1-40 is linked to cerebral amyloid angiopathy. *Am. J. Pathol.* 145:452-460.

- Tagawa K, Kunishita K, Maruyama K, Yoshikawa K, Kominani E *et al.* (1991) Alzheimer's disease amyloid Beta-clipping enzyme (APP secretase) : Identification, purification, and characterization of the enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177: 377-387.
- Tagliavini, F., Giaccone G., Frangione B., Bugiani O (1988) Preamyloid deposits in the cerebral cortex of patients with AD and non demented individuals. *Neurosci. Lett.* 93: 191-196.
- Takashima A, Noguchi K, Sato K, Hoshino T, Imahori K (1993) tau-Protein Kinase-I is essential for amyloid beta-Protein-Induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7789-7793.
- 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, Nakamura S, Ueda K, Kameyama M, Shiojiri S, Takahashi Y, Kitaguchi N, Itoh H (1988) Three types of amyloid protein precursor mRNA in human brain: their differential expression in Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157: 472-479.
- Tanaka S, Shiojiri S, Takahashi Y, Kitaguchi N, Kimura J, Nakamura S, Ueda K (1991) Differential expression of three types of amyloid- β protein precursor mRNA in the brain and nonneural tissues. In Iqbal K, McLachlan DRC, Winblad B, Wisniewski HM (eds). *Alzheimer's disease: Basic mechanisms, diagnosis and therapeutic strategies.* Chichester: Wiley & Sons, 331: 528-530.
- Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, Bruns GAP, St George-Hyslop P, Van Keuren ML, Patterson D, Pagan S, Kurnitt DM, Neve RL (1987) Amyloid β -protein gene: cDNA, mRNA distribution and genetic linkage near the Alzheimer's locus. *Science* 235: 880-884.
- Tanzi RE, McClatchey AI, Lamperti ED, Villa-Komaroff L, Gusella JF, Neve RL (1988) Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature* 311: 528-530.
- Teller JK, Russo C, DeBusk LM, Angelini G, Zaccheo D, Dagna-Bricarelli F, Scartezzini P, Bertolini S, Mann DMA, Tabaton M, Gambetti P (1996) Presence of soluble amyloid β -peptide precedes amyloid plaque formation in Down's syndrome. *Nature Medicine* 2: 93-95.
- Tennent GA, Lovat LB, Pepys MB (1995) Serum amyloid P component prevents proteolysis of the amyloid fibrils of Alzheimer disease and systemic amyloidosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4299-4303.

- 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, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Kaztman 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.
- Tokuda T, Ikeda S, Yanagisawa N, Ihara Y, Glenner GG (1991) Re-Examination of Ex-Boxers' Brains Using Immunohistochemistry with Antibodies to Amyloid beta-Protein and Tau Protein. *Acta Neuropathol.* 82: 280-285.
- Tomiyama T, Asano S, Furiya Y, Shirasawa T, Endo N, Mori H (1994) Racemization of Asp(23) residue affects the aggregation properties of Alzheimer amyloid beta protein analogues. *J. Biol. Chem.* 269: 10205-10208.
- Tomlinson BE et Corsellis JAN (1984) Ageing and the dementias. In Greenfield's Neuropathology. 4^e édition. JH Adams, JAN Corsellis, LW Duchon, éditeurs. Edward Arnold, Londres, pp. 951-1025.
- 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.
- Ueda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, Yoshimoto M, Otero DAC *et al.* (1993) Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11282-11286.
- Ueda K, Fukui Y, Kageyama H (1994a) Amyloid-beta Protein-Induced neuronal cell death: neurotoxic properties of aggregated amyloid-beta protein. *Brain Res.* 639: 240-244.
- Ueda K, Saitoh T, Mori H (1994b) Tissue-dependent alternative splicing of mRNA for NACP, the precursor of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205: 1366-1372.
- 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.
- Van Nostrand WE, Wagner SL, Suzuki M, Choi BH, Farrow JS, Geddes JW, Cotman CW, Cunningham DD (1989) Protease nexin II, a potent antichymotrypsin, shows identity to amyloid β -protein precursor. *Nature* 341: 546-549.
- Vasilakos JP, Carroll RT, Emmerling MR, Doyle PD, Davis RE, Kim KS, Shivers BD (1994) Interleukin-1 β dissociates β -amyloid precursor protein and β -amyloid peptide secretion. *FEBS Lett.* 354: 289-292.

- Vermersch P, Frigard B, Delacourte A (1992) Mapping of neurofibrillary degeneration in alzheimer's disease: evaluation of heterogeneity using the quantification of abnormal tau proteins. *Acta Neuropathol.* 85: 48-54.
- Vermersch P, Sautiere PE, Goudemand M, Delacourte A (1993) General cortical involvement in a Late-Onset case of alzheimer disease: a biochemical approach by quantitation of abnormal tau proteins. *Mol. Chem. Neuropathol.* 18: 213-224.
- 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.
- Vitek M.P. Bhattacharya, K. Glendening, J.M. Stopa, E. Vlassara, H. Bucala, R. Manogue, K. Cerami, A. (1994) Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:4766-4770.
- Wasco W, Bupp K, Magendantz M, Gusella JF, Tanzi RE, Solomon F (1992) Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the alzheimer Disease-Associated Amyloid-beta-Protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10758-10762.
- Wasco W, Gurubhagavatula S, paradis MD, Romano DM, Sisodia SS, Hyman BT, Neve RL, Tanzi RE (1993) Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the alzheimer's associated amyloid beta-Protein precursor. *Nature Genetics.* 5: 95-100.
- Wechsler D (1956) *La mesure de l'intelligence de l'adulte.* Paris, PUF, 292 pages.
- Weidemann A, König G, Bunke D, Fisher P, Salbaum JL, Masters CL, Beyreuther K (1989) Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 57: 115-126.
- Whitson JS, Selkoe DJ, Cotman CW (1989) Amyloid-beta protein enhances the survival of hippocampal neurons in vitro. *Science* 243: 1488-1490.
- Whitson J S, Glabe CG, Shintani E, Abcar A, Cotman CW (1990) Amyloid protein promotes neuritic branching in hippocampal cultures. *Neurosci. Lett.* 110: 319-324.
- Whitson JS, Mims MP, Strittmatter WJ, Yamaki T, Morrisett JD, Appel SH (1994) Attenuation of the neurotoxic effect of a beta amyloid peptide by apolipoprotein E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199: 163-170.
- Wilcock GK, Esiri MM (1982) Plaques, tangles and dementia, a qualitative study. *J. Neurol. Sci.* 56: 343-356.
- Wisniewski HM et Terry RD (1973) Reexamination of the pathogenesis of the senile plaque. In : HM Zimmerman. *Progress in neuropathology (Vol 2)*, New York, Grune and Straton, pp 1-26.

- Wisniewski HM, Bancher C, Barcikowska M, Wen GY, Currie J (1989) Spectrum of morphological appearance of amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 78: 337-347.
- Wisniewski T, Ghiso J, Frangione B (1991) Peptides Homologous to the Amyloid Protein of Alzheimer's Disease Containing a Glutamine for Glutamic Acid Substitution Have Accelerated Amyloid Fibril Formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179: 1247-1254.
- Wisniewski T, Frangione B (1992) Apolipoprotein E: A Pathological Chaperone Protein in Patients with Cerebral and Systemic Amyloid. *Neurosci. Lett.* 135: 235-238.
- Wisniewski T, Golabek A, Matsubara E, Ghiso J, Frangione B (1993) Apolipoprotein-E: binding to soluble alzheimer's beta-Amyloid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192: 359-365.
- Wisniewski T, Lalowski M, Golabek A, Vogel T, Frangione B (1995) Is Alzheimer's disease an apolipoprotein E amyloidosis? *Lancet.* 345: 956-958.
- Wisschik CM, Novak HC, Thogersen HC, Edwards PC, Runswick MJ, Jakes R, Walker JE (1988a) Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4506-4510.
- Wisschik CM, Novak HC, Edwards PC, Klug A, Tichelaar W, Crowther RA (1988b) Structural alteration of the core of the paired helical filament of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4884-4888.
- Yamaguchi H, Sugihara S, Ishiguro K, Takashima A, Hirai S (1995) Immunohistochemical analysis of COOH-termini of amyloid beta protein (A beta) using end-specific antisera for A beta 40 and A beta 42 in Alzheimer's disease and normal aging. *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.* 2:7-16.
- Yamamoto H, Saitoh Y, Fukunaga K, Nishimura H, Miamoto E (1988) Dephosphorylation of microtubule proteins by brain protein phosphatases 1 and 2A, and its effect on microtubule assembly. *J. Neurochem.* 50: 1614-1623.
- Yang F, Mak K, Vinters HV, Sally AF, Cole GM (1994) Monoclonal antibody to the C-terminus of β -amyloid. *Neuroreport* 5: 2117-2120.
- Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA (1990) Neurotrophic and Neurotoxic Effects of Amyloid Beta-Protein: Reversal by Tachykinin Neuropeptides. *Science.* 250: 279-282.
- Younkin SG (1991) Processing of the Alzheimer's disease BA4 amyloid protein precursor (APP). *Brain Pathol.* 1: 253-262.
- Zhang ZY, Drzewiecki GJ, Hom JT, May PC, Hyslop PA (1994) Human cortical neuronal (HCN) cell lines: A model for amyloid beta neurotoxicity. *Neurosci. Lett.* 177: 162-164.

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 (citron, clé, ballon) déjà appris (1 point par réponse correcte).

LANGAGE

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

ACTIVITÉ MOTRICE

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

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

* MINI MENTAL TEST — Folstein et coll. (1975), traduit par L. Izard.
 * M.F. Folstein, S.E. Folstein, P.N. McHugh : « Mini-Mental Test ». A practical method for grading the clinician. J. Psychiat. Res., 12, 129-136.

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 ? (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

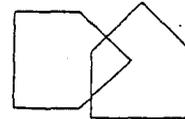
19.
20. Vous souvenez-vous des trois mots que vous avez répétés tout à l'heure ?
21.

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

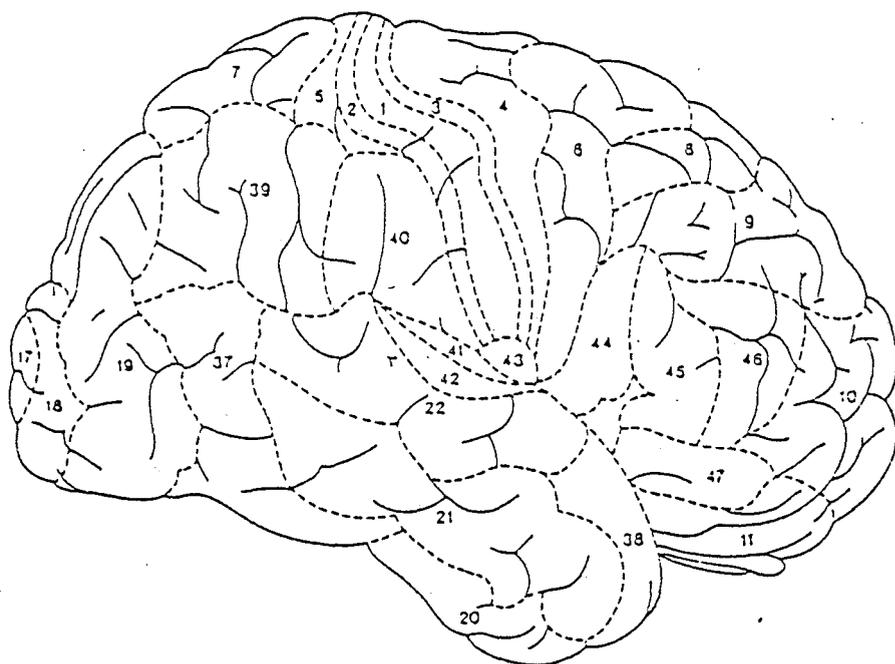
Critères du NINCDS-ADRDA

Selon MCKHANN et Coll. (1984)

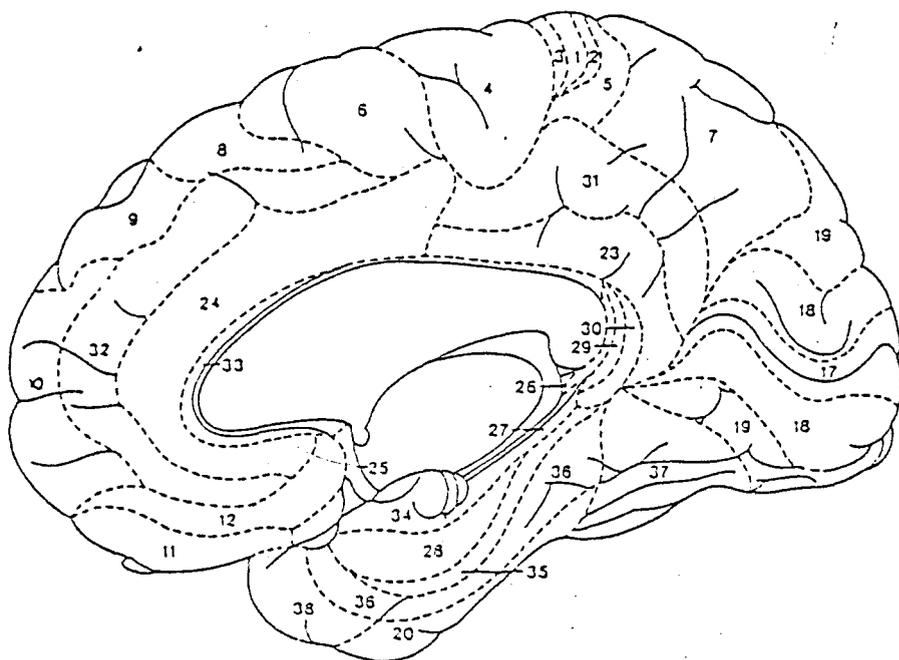
- I. The criteria for the clinical diagnosis of PROBABLE Alzheimer's disease include:
- dementia established by clinical examination and documented by the Mini-Mental Test,¹ Blessed Dementia Scale,² or some similar examination, and confirmed by neuropsychological tests;
 - deficits in two or more areas 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.

ANNEXE III

Aires de Brodmann



A



B

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIERES

GÉNÉRALITÉS	8
I-Description clinique de la maladie d'Alzheimer	10
I-1-La démence de type Alzheimer	10
I-2-Les troubles cognitifs	10
I-2-1-Les troubles de la mémoire	10
I-2-2-Les troubles du langage (aphasie)	11
I-2-3-Les troubles praxiques	12
I-2-4-Les troubles gnosiques	12
I-2-5-Les troubles intellectuels	12
I-3-Les troubles du comportement	13
I-3-1-Dépression	13
I-3-2-Comportements psychopathologiques	13
I-4-Les troubles neurologiques	14
I-5-Le diagnostic	14
I-5-1-Les éléments du diagnostic	14
I-5-2-Les critères du diagnostic	15
II-Aspects neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer	15
II-1-Aspects macroscopiques	15
II-2-Aspects microscopiques	16
II-2-1-La perte neuronale	16
II-2-2-La réaction gliale	16
II-2-3-Les lésions neuropathologiques	16
III-Aspects biochimiques de la maladie d'Alzheimer	24
III-1-La dégénérescence neurofibrillaire	24
III-1-1-Les protéines tau	24
III-1-2-Les protéines tau durant la maladie d'Alzheimer	27
III-2-La substance amyloïde	30
III-2-1-Le peptide amyloïde ou peptide A β	30
III-2-2-Les autres constituants des dépôts amyloïdes	46
III-3-Altération des neurotransmetteurs	52
IV-Etiologie de la maladie d'Alzheimer	53
IV-1-Facteur de risque	53
IV-2-Facteurs génétiques	54
IV-2-1-Le chromosome 21 (les mutations de l'APP)	54
IV-2-2-Le chromosome 14	56
IV-2-3-Le chromosome 1	57

IV-2-4-Conclusion	57
V-Hétérogénéité de la maladie d'Alzheimer	57
VI-Approche thérapeutique et amyloïde	59
VI-1-Traitements	59
VI-2-Modèles de la maladie d'Alzheimer	60
VI-2-1-Les modèles animaux	60
VI-2-2-Les modèles cellulaires.....	61
VI-2-3-Modèles et formation de l'amyloïde.....	61
VII-Amyloïdoses cérébrales	62
VII-1-Les maladies à prions	62
VII-2-La démence à corps de Lewy	63
VII-3-La démence pugilistique	63
VII-4-Le vieillissement cérébral "normal"	63
RESULTATS-DISCUSSION.....	65
I-Purification de la substance amyloïde et mise en évidence du peptide A β	66
I-1-Analyse des protéines solubles dans le surnageant S100 000g	67
I-1-1-Analyse des protéines tau solubilisées en SDS	67
I-1-2-Détection de la GFAP.....	67
I-1-3-Détection du peptide A β	68
I-2-Extraction des protéines du culot C1	68
I-2-1-Solubilisation du peptide A β dans le culot C1	68
I-2-2-Mise en évidence du peptide A β	69
I-2-3-Conclusion	69
II-Mise au point de la quantification du peptide A β par dot-blot	71
II-1-Choix de l'anticorps	72
II-1-1-Caractérisation de l'anticorps polyclonal anti-A β ₁₇₋₂₈ et du monoclonal anti-A β ₁₇₋₂₄ (4G8)	72
II-1-2-Caractérisation de l'anti-A β ₁₋₂₈ polyclonal.....	73
II-1-3-Caractérisation de l'anticorps anti-A β ₈₋₁₇ monoclonal	73
II-1-4-Conclusion	74
II-2-Définition de la gamme étalon de peptide A β ₁₋₄₂ synthétique	76
II-3-Standardisation de la méthode	76
II-3-1-Modification de la concentration en acide formique	76
II-3-2-Extraction du peptide A β par centrifugation basse vitesse	77
(14 000g).....	77
II-3-3-Conclusion	78
III-Recherche d'une région cérébrale envahie par la substance amyloïde	79
III-1-Présentation d'une population de 17 individus âgés.....	80
III-2-Données neuropathologiques.....	80

III-3-Quantification du peptide A β par dot-blot.....	81
III-3-1-Analyse dans l'aire de Brodmann 22.....	81
III-3-2-Analyse dans les aires de Brodmann 9, 39 et 44	82
III-3-3-Conclusion	83
III-4-Quantification biochimique du peptide A β et présence des différents types de dépôts amyloïdes.....	83
III-4-1-Analyses biochimiques et neuropathologiques.....	84
III-4-2-Détection du peptide A β dans l'ensemble des dépôts amyloïdes.....	85
IV-Analyse quantitative du peptide A β	87
IV-1-Analyse comparative du contenu en peptide A β entre patients 'Alzheimer' et sujets témoins.....	88
IV-2-Détermination de la quantité de peptide A β dans un cerveau 'Alzheimer'	89
IV-3-Quantité de peptide A β en fonction des facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer	90
IV-3-1-Influence de l'âge et du sexe sur la quantité de peptide A β	90
IV-3-2-L'influence du génotype de l'Apo E sur la quantité d'A β	92
IV-3-3-Conclusion	94
V-Analyse qualitative de la substance amyloïde	94
V-1-Etude des fragments du peptide A β	95
V-1-1-Analyse par dot-blot.....	95
V-1-2-Analyse par immunoempreintes	95
V-1-3-Conclusion	96
V-2-Les constituants de la substance amyloïde	97
V-2-1-Outils immunologiques.....	97
V-2-2-Recherche des constituants de la substance amyloïde	97
V-3-Etude de l'Apo E sur une population plus importante.....	99
V-3-1-Détection de l'apolipoprotéine E par immunohistochimie	99
V-3-2-Etude de l'apolipoprotéine E par dot-blot	99
V-3-3-Influence du génotype sur la quantité d'Apo E	101
V-3-4-Corrélation entre quantité d'Apo E et de peptide A β	102
V-3-5-Conclusion	103
VI-Analyse de la substance amyloïde durant le syndrome de down	104
VI-1-Introduction	104
VI-2-Etude sur une série de 9 cas de trisomie 21	105
VI-2-1-Description de la population.....	105
VI-2-2-Corrélation entre quantité de peptide A β et de dépôts amyloïdes A β 40+.....	106

CONCLUSION	108
PERSPECTIVES	112
MATERIELS ET METHODES	115
I-Matériel	115
I-1-Matériel autopsique	115
I-2-Peptides synthétiques	117
II-Sondes immunologiques	118
II-1-Anticorps polyclonaux	118
II-2-Anticorps monoclonaux	120
III-Analyses biochimiques	122
III-1-Purification de la substance amyloïde	122
III-1-1-Homogénéisation du tissu cérébral	122
III-1-2-Purification de la substance amyloïde	122
III-2-Techniques biochimiques	123
III-2-1-Le Dot-blot.....	123
III-2-2-Electrophorèses en gel de polyacrylamide en présence de SDS	125
III-2-3-Technique des immunoempreintes	127
III-2-4-Dosage colorimétrique des protéines	128
IV-Quantification par densitométrie	128
V-Immunohistochimie	129
BIBLIOGRAPHIE	130
ANNEXES	162
TABLE DES MATIERES	165

