

N° d'ordre:



THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR

Mention SPECTROCHIMIE

par

Jamila SAJID

APPORTS DES SPECTROSCOPIES RAMAN ET INFRAROUGE AUX DIAGNOSTICS DE LA MALADIE D'ALZHEIMER.

**Caractérisation du tissu humain et étude du mécanisme d'interaction
entre le rouge Congo et le peptide amyloïde-bêta dans le tissu cérébral
des malades Alzheimer**

Soutenue le 27 Novembre 1997 devant la Commission d'Examen

Président:	G. SPIC
Directeur de thèse:	S. TURRELL
Rapporteurs:	M-H. BARON G. PUPPELS
Examineurs:	A. DELACOURTE J. LAUREYNS M-M. RUCHOUX

A ma mère,

à mes frères et soeurs,

à l'âme sainte de mon père.

«Penseurs positifs»
«Positive thinker»

*Hier, ne m'appartient plus; je ne peux que m'en souvenir.
Demain ne m'appartient pas encore; je ne peux que le préparer.
Mais aujourd'hui est à moi et personne ne peut me l'enlever.
Aujourd'hui m'appartient et son succès dépend de ce que j'en fais.*

Tsunao Saitoh

*La pensée a des ails,
nul ne peut arrêter son envol*

Youssef Chahine

*Notre plus grande gloire, ce n'est pas de ne jamais tomber,
mais de nous relever chaque fois que nous tombons.*

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Spectroscopie Infrarouge et Raman (LASIR) à l'Université des Sciences et Technologies de Lille I, UPR CNRS 2631L, sous la direction du Professeur S. Turrell et en collaboration avec le Docteur A. Delacourte (INSERM, U422).

Je remercie particulièrement les personnes qui ont accepté de faire partie du jury.

Madame G. Spic, Professeur à l'Université de Lille I, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury.

Madame S. Turrell, Professeur à l'Université de Lille I, pour m'avoir accueillie dans son équipe de recherche. Au cours de ces années de travail, ses compétences scientifiques, l'ambiance chaleureuse et la bonne humeur qu'elle a fait régner m'ont permis de mener à bien mes travaux.

Madame M-H. Baron, maître de conférences à Paris, qui a accepté avec beaucoup d'amabilité de juger ce travail, en prenant la responsabilité d'en être le rapporteur, mais aussi pour son aide, sa compréhension, ses conseils inestimables et pour le temps qu'elle m'a consacré.

Monsieur G. J. Puppels, Professeur associé à l'Université de Médecine de Rotterdam, d'avoir bien voulu prendre le temps de juger cette thèse et d'en être le rapporteur. Je lui exprime aussi toute ma gratitude pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, j'ai pu ainsi bénéficier de sa compétence dans le domaine de l'analyse du tissu.

Monsieur A. Delacourte, Directeur de Recherche à l'INSERM U422 à Lille, d'avoir accepté d'examiner ce travail, mais aussi pour sa passion scientifique, pour les fructueux échanges d'idées que nous avons eu, et pour les échantillons qu'ils m'ont offert généreusement.

Monsieur J. Lauryens pour sa présence dans le jury et également pour sa patience lors de la prise pénible des spectres d'imagerie Raman du tissu à mes cotés.

Madame M-M. Ruchoux, Docteur en Médecine (anatomopathologue, service de neuropathologie au CHRU de Lille), d'avoir accepté d'examiner ce travail, mais aussi pour ses conseils, sa disponibilité et surtout d'avoir mis à ma disposition certains échantillons dont l'analyse m'a été très fructueuse pour l'élaboration de ce travail.

Je remercie très chaleureusement Madame M. Henneron, technicienne au service d'anatomopathologie (CHRU de Lille) qui a consacré une partie de son temps pour les coupes de tissu.

Qu'il me soit permis de remercier Monsieur B. Sombret pour le temps précieux passé sur le spectromètre FT-Raman et micro-infrarouge à essayer de trouver les bonnes conditions pour obtenir des spectres corrects de mes échantillons.

J'exprime également ma profonde reconnaissance à Monsieur J. Barbillat pour le temps qu'il m'a consacré chez la Société DILOR et pour ses conseils inestimables pour la réalisation de ce travail.

Une reconnaissance particulière à Monsieur Elhaddaoui, qui a joué avec une grande sympathie un rôle non négligeable dans l'animation d'un esprit d'amitié; sans son soutien et toutes les connaissances qu'il m'a prodigué au cours de toutes ces années, il m'aurait été difficile de mener à bien ce travail.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux Docteurs F. Galley, M. Bethouard et A-M. Bonin, Anatomopathologues, pour leurs conseils, et pour m'avoir initiée aux techniques d'histopathologie. Je les remercie également pour m'avoir permis d'utiliser leur matériel d'histologie pour la préparation des tissus, et pour les échantillons qu'ils m'ont offert généreusement.

J'exprime également ma reconnaissance à Monsieur B. Gosselin, Professeur à la Faculté de Médecine de Lille et Chef de Service d'anatomopathologie au CHRU de Lille, qui m'a orientée vers les personnes responsables des autopsies.

Ma reconnaissance s'adresse à Madame le Professeur Lecomte (Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques à la Faculté de Médecine de Lille), qui a accepté de me confier quelques échantillons de peau.

Enfin, que toutes les personnes, et en particulier Monsieur J. P. Labaeye et Madame C. Decamps, qui par leurs conseils, leurs remarques et leur patience, m'ont permis d'arriver au terme de ce travail, trouvent ici l'expression de ma gratitude.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION GENERALE-----1

CHAPITRE I

GENERALITES

I.1	DESCRIPTION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER (MA) -----	9
1.1	HISTORIQUE-----	9
1.2	EPIDEMIOLOGIE-----	9
1.3	SIGNES CLINIQUES-----	10
1.4	LESIONS HISTOPATHOLOGIQUES DE LA MA-----	11
I.2	CAUSES PROBABLES DE LA MA-----	14
2.1	LA CIRCULATION SANGUINE-----	14
2.2	LE MODELE INFECTIEUX-----	14
2.3	L'ACETYLCHOLINE-----	15
2.4	LES TOXINES-----	15
2.5	LA GENETIQUE OU L'HEREDITE -----	16
2.6	LES PROTEINES ANORMALES-----	18
I.3	PREVENTION ET TRAITEMENT-----	19
I.4	ELEMENTS DE DIAGNOSTIC -----	21
4.1	EXAMENS CLINIQUES-----	21
4.2	LE DIAGNOSTIC-----	21
4.3	METHODES DE DETECTION DES PROTEINES AMYLOIDES-----	23
4.4	DIAGNOSTIC SPECROSCOPIQUE DE LA MA-----	24
I.5	DESCRIPTION DE LA SUBSTANCE AMYLOIDE-----	25
5.1	HISTORIQUE-----	25
5.2	DEFINITION-----	25
5.3	SUBSTANCE AMYLOIDE DE LA MA: <u>le peptide amyloïde Aβ</u> -----	26
a)	Origine de A β -----	27
b)	Mécanisme de formation de A β -----	28
c)	Neurotoxicité de A β -----	31
5.4	PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'AMYLOIDE -----	31
a)	Les fibres amyloïdes de la MA -----	32
b)	Les études «in vitro» des peptides amyloïdes de la MA-----	34
c)	Comment réagit le RC avec les protéines amyloïdes-----	34
I.6	QUELLES TECHNIQUES ANALYTIQUES CHOISIR?-----	37
	BIBLIOGRAPHIE-----	38

CHAPITRE II	MATERIELS ET METHODES
-------------	-----------------------

INTRODUCTION-----	43
II.1 TECHNIQUES ET MATERIELS BIOLOGIQUES-----	44
1.1 LES PRELEVEMENTS-----	44
1.2 HISTOTECHNOLOGIE-----	45
1.3 PREPARATIONS DES ECHANTILLONS-----	48
1.4 METHODES DE DETECTION DES PROTEINES AMYLOIDES-----	49
1.5 METHODES DE DENATURATION-----	50
A) Les Tissus-----	50
B) Les peptides et les protéines-----	51
a) <i>La poly-L-lysine</i> -----	52
b) <i>La polyglycine et la poly-L-sérine</i> -----	52
c) <i>L'insuline</i> -----	52
d) <i>La fibroïne de soie</i> -----	52
e) <i>L'élastine</i> -----	53
f) <i>Le collagène</i> -----	53
g) <i>Peptides Amyloïdes synthétiques $\beta(1-28)$ et $\beta(16-28)$</i> -----	53
1.6 ETUDES DES INTERACTIONS-----	56
1.7 RECAPITULATIF DES PRODUITS ETUDIES-----	58
II.2 METHODES D'ANALYSES SPECTROSCOPIQUES-----	59
2.1 SPECTROMETRIE D'ABSORPTION UV-VISIBLE-----	61
2.2 SPECTROMETRIES VIBRATIONNELLES-----	61
A) Spectrométrie d'absorption infrarouge-----	61
a) <i>Macrospectrométrie IR</i> -----	61
b) <i>Microspectrométrie IR</i> -----	62
B) Spectrométrie de diffusion Raman-----	63
a) <i>Comparaison des spectrométries IR et Raman</i> -----	63
b) <i>Raman de résonance (RR)</i> -----	64
c) <i>Avantages et inconvénients du Raman et de l'IR</i> -----	64
d) <i>Macrospectrométrie FT-Raman</i> -----	65
e) <i>Microspectrométrie Raman</i> -----	65
f) <i>Imagerie Raman</i> -----	66
2.3 RECAPITULATIF DES METHODES UTILISEES-----	67
III.3 INSTRUMENTATION-----	69
CONCLUSION-----	76
BIBLIOGRAPHIE-----	77

CHAPITRE III

INTERACTIONS ENTRE LA MOLECULE ROUGE CONGO (RC) ET LES PROTEINES AMYLOIDES IN VITRO ET IN SITU

INTRODUCTION-----	78
III.1 LE ROUGE CONGO (RC)-----	80
1.1. CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES-----	80
1.1.1 Spectrométrie d'absorption électronique UV-visible-----	81
1.1.2 Structures chimiques du RC en milieu acido-basique-----	82
1.1.3 Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire-----	83
1.1.4 Spectrométries vibrationnelles-----	84
1.2 CONCLUSION-----	86
III.2 COMPOSANTES PRINCIPALES DU TISSU-----	87
2.1 PROTEINES-----	87
2.1.1 Description-----	87
2.1.2 Rappels des structures chimiques-----	88
A) La liaison peptidique-----	88
B) Structures secondaires-----	90
1) L'hélice α -----	90
2) Les feuillets β -----	90
3) Les coudes β -----	90
4) La forme désordonnée-----	90
2.1.3 Caractérisation des structures secondaires-----	93
2.2 LIPIDES ET ACIDES NUCLEIQUES-----	102
2.2.1 Description-----	102
2.2.2 Etudes spectroscopiques-----	104
III.3 ETUDES DES INTERACTIONS <i>IN VITRO</i> ET <i>IN SITU</i> -----	108
3.1 INTERACTIONS <i>IN VITRO</i> -----	108
3.1.1 Etudes conformationnelles des protéines-----	109
3.1.2 Interactions du RC avec des protéines amyloïdes-----	113
3.1.3 Conclusion-----	120
3.2 INTERACTIONS <i>IN SITU</i> -----	123
3.2.1 Etudes conformationnelles des protéines dans le tissu traité-----	123
3.2.2 Interactions du RC avec des protéines amyloïdes dans le tissu-----	124
3.2.3 Conclusion-----	130
BIBLIOGRAPHIE-----	132

CHAPITRE IV

DIAGNOSTICS SPECTROSCOPIQUES DE LA MA

PARTIE I. LE TISSU CEREBRAL

INTRODUCTION-----	135
IV.1 CARACTERISATION DU TISSU CEREBRAL SAIN-----	137
1.1 HISTOLOGIE-----	137
1.2 TISSU FRAIS-----	137
1.3 TISSU DEPARAFFINE PREALABLEMENT FIXE AU CARNOY-----	148
IV.2 EFFET DES SOLVANTS SUR LE TISSU FRAIS SAIN-----	150
2.1 EFFET DU CARNOY SUR LES COMPOSANTES DU TISSU-----	153
2.2 EFFET DES COMPOSANTES DU CARNOY-----	154
IV.3 DIAGNOSTICS SUR LES TISSUS TRAITES-----	159
3.1 DIAGNOSTIC PAR DES SOLVANTS DENATURANTS-----	159
3.2 DIAGNOSTIC PAR DES SOLVANTS NON DENATURANTS-----	164
IV.4 DIAGNOSTICS SUR LES TISSUS FRAIS-----	168
4.1 INTRODUCTION-----	168
4.2 CARACTERISATION DU TISSU ALZHEIMER-----	169
4.3 TESTS DE FIABILITE DU DIAGNOSTIC-----	182
4.4 DIAGNOSTICS SUR LE TISSU DE MALADES NON ALZHEIMER--	191

PARTIE II LA PEAU

INTRODUCTION-----	192
IV.5 CARACTERISATION DE LA PEAU SAINE-----	194
5.1 HISTOLOGIE-----	194
5.2 LE COLLAGENE-----	194
5.3 ETUDES SPECTROSCOPIQUES-----	197
IV.6 CARACTERISATION DE LA PEAU D'AMYLOIDOSES-----	202
6.1 ETUDES SPECTROSCOPIQUES-----	202
6.2 CONCLUSION-----	203
BIBLIOGRAPHIE-----	204
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES-----	206
ANNEXES-----	210

INTRODUCTION GENERALE

La maladie d'Alzheimer (MA) est une **démence neuro-dégénérative** qui touche principalement les personnes âgées. Pourtant, cette maladie du cerveau n'est pas un effet naturel du vieillissement. La lente dégradation mentale puis physique, observée dans cette affection résulte d'un trouble cérébral très sérieux qui s'intensifie avec l'évolution de la maladie.

La MA existe sous deux formes: **une forme tardive**, dite **démence sénile de type Alzheimer**, où la maladie apparaît après l'âge de 65 ans, et **une forme précoce**, dite, **démence présénile** qui s'empare des individus avant l'âge de 65 ans. Dans cette forme précoce, la MA s'attaque surtout aux individus de la tranche d'âge 40 à 50 ans. Cependant, on dénombre certains cas, fort rares, où le malade est plus jeune encore. Le cas familial le plus précoce de la MA que l'on connaisse est survenu entre 29 et 35 ans. Le patient a présenté des désordres mnésiques progressifs dès l'âge de 29 ans et il est devenu sérieusement dément à 32 ans [1].

La durée de la MA varie selon qu'il s'agit de la forme précoce ou tardive; mais en général, elle évolue sur des périodes allant de 1 à 10 ans (parfois plus) après l'apparition des symptômes, puis, elle aboutit irrémédiablement à la mort. En outre, quand elle frappe, la MA ne se contente pas d'une seule victime; elle en réclame au moins deux: le malade lui-même et la personne qui en prend soin chaque jour. Elle exige encore plus si d'autres proches se partagent les soins à donner. La société tout entière est donc sollicitée, et la construction des structures d'accueil comme des centres de longs séjours est désormais indispensable. Aux Etats-Unis, la prise en charge diagnostique et l'aide aux patients coûtent environ 480 milliards de francs par an. En France, le coût pour chaque malade est d'environ 14 000 francs par mois (d'après l'Association France Alzheimer).

Souvenons-nous qu'à l'heure actuelle, en France, environ 300 000 personnes sont concernées par cette affection, sans espoir de guérison tangible. Mais, d'ici peu, avec le vieillissement de la population, la MA touchera encore un plus grand nombre de familles.

Personne ne sait au juste ce qui provoque la MA. Les chercheurs, jusqu'à ce jour, ont été incapables d'en déterminer les causes. Des études indiquent que la maladie pourrait provenir d'un virus lent, de la présence de métaux lourds, ou d'un déséquilibre biochimique dans le cerveau. On a pu établir un lien génétique, dans la mesure où une forme rare de la MA, dite familiale, semble être héréditaire. De plus, étant donné que sur **le plan neuro-pathologique**, la MA se caractérise par la présence dans le tissu cérébral de **dépôts de protéines anormalement constituées**, dont les **protéines amyloïdes**, certains chercheurs proposent **une théorie, voulant que la MA résulte du dépôt d'amyloïde**. Dans l'état actuel des recherches, il semble plus probable que cette maladie soit due à des causes multiples; ceci reste cependant à déterminer.

Actuellement, il n'existe que deux médicaments actifs dans cette maladie: **la tacrine** et **le donepezil**. Ces médicaments améliorent sans doute les fonctions intellectuelles et les activités quotidiennes de certains patients. Mais, ils n'agissent que sur les symptômes et non sur l'évolution de la maladie.

A ce jour, il n'existe aucun diagnostic de certitude *in vivo* de la MA. Le **diagnostic certain** de cette maladie est possible grâce à l'étude microscopique de cerveau à l'**autopsie**. Cette étude doit révéler systématiquement la présence des lésions suivantes: **des plaques séniles (PS)**, **des angiopathies amyloïdes (AA)** [dépôts d'amyloïde dans les parois des vaisseaux cérébraux (VC)], et une **dégénérescence neuro-fibrillaire (DNF)**.

Les dépôts d'amyloïde sont principalement localisés dans les régions liées à la mémoire, en l'occurrence, **le cortex cérébral** et **l'hippocampe** (Figure 1) [2]. Les points rouges observés dans la Figure 1 indiquent les endroits riches en dépôts d'amyloïde dans le cerveau des malades Alzheimer [2]. La détection des protéines amyloïdes est possible grâce à deux colorants «dits» spécifiques, **le rouge Congo (RC)** et **la thioflavine S (TS)** [3]. Sur la Figure 2, nous avons représenté une photo d'une section tissulaire de quelques micromètres d'épaisseur, colorée à la TS (prise sous microscope optique), qui provenait du cortex cérébral de l'un de nos malades Alzheimer. Les dépôts «jaune-clair» dans des parois des VC (AA) et hors des parois des VC (PS), contiennent de la protéine amyloïde-bêta.

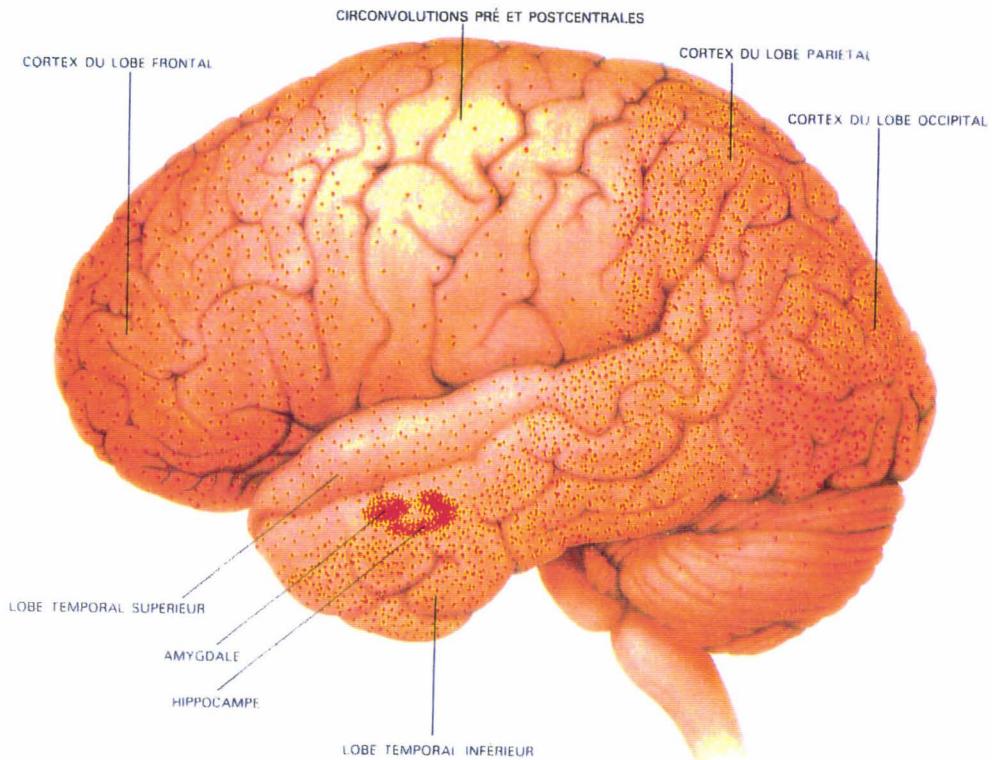


Figure 1: Le cerveau d'une victime de la **maladie d'Alzheimer (MA)** contient de nombreuses plaques de protéine amyloïde-bêta (petits points rouges). Ces plaques, qui apparaissent dans des zones spécifiques du cerveau liées à la mémoire, sont des foyers de dégénérescence de neurones [2].

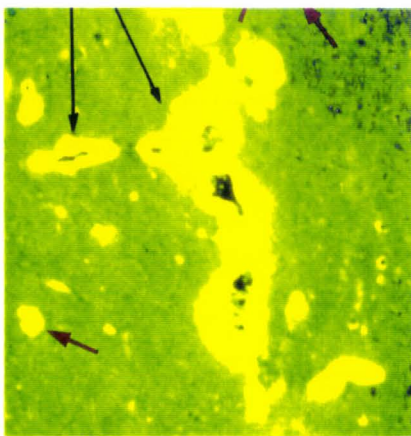


Figure 2: Une section cérébrale de 5 micromètre d'épaisseur d'un tissu cérébral provenant de l'un de nos échantillons Alzheimer, colorée à la thioflavine S (TS). Les dépôts «jaune-clair» dans des parois (AA) des vaisseaux cérébraux (VC) et hors des parois des VC (PS), contiennent de la protéine amyloïde-bêta.

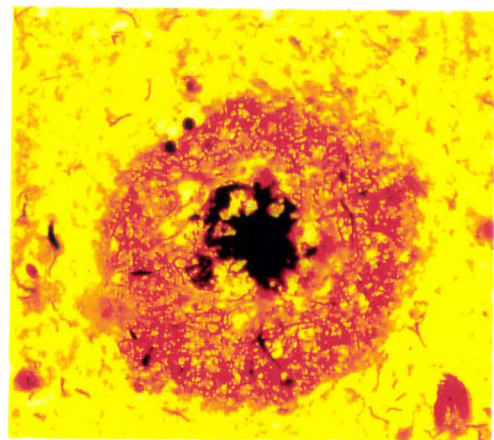


Figure 3: Une plaque de protéine amyloïde-bêta dans le cerveau d'un patient Alzheimer apparaît, après coloration, comme une masse globulaire. La plaque est entourée d'une couronne d'axones et de dendrites anormaux, et des corps cellulaires neuronaux en cours de dégénérescence, qui sont plus foncés que les neurones normaux [2].

Avant ce travail, le mécanisme chimique impliqué dans l'interaction entre le RC et les protéines amyloïdes **dans le tissu cérébral** de malades Alzheimer (*in situ*) **n'était pas encore connu**. En revanche, le mécanisme d'interaction entre le RC et les protéines **modèles de l'amyloïde** (*in vitro*) venait d'être déterminé [4,5]. Les résultats des études physico-chimiques obtenus avaient montré que **ce colorant se lie sélectivement avec des protéines de structures en feuillets β -plissés**.

Etant donné qu'il n'existe aucun diagnostic *pré-mortem* fiable de la MA, l'objectif de notre recherche était de trouver des moyens spectroscopiques de diagnostic de la MA applicables *in vivo*. Nous avons donc voulu voir si le mécanisme d'interaction ayant déjà été proposé pour les protéines modèles est aussi valable pour le tissu. La connaissance de ce mécanisme ouvrira peut être de nouvelles perspectives thérapeutiques. Notamment, on visait l'utilisation de la molécule RC, comme sonde *in vivo*, soit, pour la détection des dépôts d'amyloïde, soit, pour bloquer leur formation, ou encore, pour atténuer l'effet de leur toxicité [6].

Les techniques biophysiques d'investigation structurale des macromolécules ayant considérablement évolué durant la dernière décennie, nous nous sommes donc proposés d'effectuer cette étude par l'intermédiaire des techniques spectroscopiques UV-visible, infrarouge et Raman. Ces techniques permettent la caractérisation des tissus biologiques et apportent des informations précieuses concernant **la structure secondaire des protéines**. A ceci, s'ajoute la possibilité de profiter de la grande expérience acquise par le L.A.S.I.R dans ce domaine depuis près de 40 ans.

A noter que le diagnostic histopathologique de la MA est établi sur **des tissus qui ont déjà subi de nombreux traitements chimiques**. Les solvants utilisés lors des techniques de coloration sont susceptibles d'affecter la structure des composantes du tissu, et en particulier la structure secondaire des protéines. Nous avons donc étendu notre étude au **tissu sain traité, coloré au RC**. Les résultats obtenus nous ont amené à identifier des artefacts susceptibles de provoquer des **faux positifs**. L'origine de ces artefacts réside dans l'utilisation de **certains solvants dénaturants** comme fixateurs par les laboratoires d'histopathologie. Nous avons donc étudié l'effet de chaque solvant sur le tissu.

Afin contourner ces difficultés inhérentes aux solvants, il nous a semblé important d'utiliser **du tissu frais** dans le **diagnostic** de la MA. Or, le tissu cérébral frais se dégrade rapidement à l'air libre; ceci rend difficile la détection des lésions recherchées (PS et AA) sous microscope.

Les étapes suivantes nous ont conduit à déterminer un solvant qui préserve la structure secondaire des protéines et à mettre au point des protocoles fiables qui utilisent des méthodes **spectroscopiques** appropriées pour la **détection des protéines amyloïdes** dans du tissu cérébral **frais** provenant de malades Alzheimer.

Ce mémoire se déploie sur IV parties:

Nous présenterons dans **le premier chapitre** des connaissances générales sur la MA. Nous insisterons sur **l'importance de la structure en feuillets β -plissés des protéines amyloïdes** impliquées dans la MA et dans **d'autres pathologies**.

Dans **le second chapitre**, nous détaillerons dans un premier temps les techniques histologiques que nous avons utilisées pour la préparation de nos échantillons biologiques, puis nous présenterons les méthodes de dénaturation de certains de nos échantillons. Nous ferons enfin un rappel sur les principes des techniques spectroscopiques, et nous décrirons brièvement le matériel utilisé.

Etant donné que le diagnostic histopathologique de la MA est établi sur des tissus colorés, préalablement **traité** par des solvants chimiques. **Le troisième chapitre** sera consacré à la détermination du mécanisme chimique impliqué dans l'interaction entre le RC et les protéines amyloïdes dans le tissu traité au **carnoy**. Nous montrerons que les spectrométries infrarouge, Raman et UV-visible sont adaptées à cette étude. Nous commencerons par un rappel sur les études physico-chimiques de la molécule RC et sur la structure des composantes principales du tissu (les protéines, les lipides et les acides nucléiques), en insistant surtout sur **la structure secondaire des protéines**. Comme le tissu Alzheimer ne contient pas seulement des protéines amyloïdes, nous présenterons les résultats des études spectroscopiques du mécanisme d'interaction du RC avec des protéines de différentes conformations. Nous proposerons alors un mécanisme chimique pour cette interaction dans le tissu traité au **carnoy**. Puis nous comparerons l'ensemble de ces résultats avec ceux obtenus pour le tissu **Alzheimer frais coloré au RC**. Nous discuterons enfin l'ensemble des résultats du mécanisme d'interaction obtenus *in vitro* et *in situ*.

Le chapitre quatre sera consacré à l'élaboration des méthodes spectroscopiques qui seront utilisées pour établir le diagnostic spectroscopique de la MA. Cette étude a un triple but:

- (i) montrer l'effet que peuvent avoir certains solvants chimiques sur la structure secondaire des protéines dans les tissus. Nous appliquerons ensuite ces connaissances pour

proposer les conditions optimales d'utilisation des solvants de fixation aussi bien en histopathologie qu'en spectroscopie.

(ii) présenter des méthodes spectroscopiques appropriées pour la détection des protéines amyloïdes dans des **tissus cérébraux Alzheimer frais**. Nous montrerons que les **spectrométries FT-Raman et micro-Raman** peuvent être utilisées comme un **nouvel outil de diagnostic** de la MA sur le **tissu cérébral frais**.

(iii) tester notre méthode diagnostic sur des échantillons qui provenaient d'autres maladies neuro-dégénératives, car les dépôts d'amyloïde ne sont pas spécifiques à la MA. Nous montrerons alors que la **spectrométrie Raman** peut être utilisée pour la **détection des protéines de structure en feuillets β -plissés** dans **tout** tissu cérébral qui en contient.

De plus, comme selon la littérature, des dépôts d'amyloïde ont été détectés dans des organes extra-cérébraux de patients atteints de la MA, dont **la peau** [7-11].. Nous avons pensé qu'il s'agit là d'éléments très importants pouvant ouvrir des perspectives nouvelles dans la prise en charge de cette maladie, en particulier en ce qui concerne le **diagnostic *in vivo***. Dans ces conditions, notre méthode pourrait avantageusement concourir à ce but. Il est cependant évident que ceci n'est possible qu'à la condition qu'il n'existe pas dans la peau normale et en cas d'autres maladies, de protéines de structure en feuillets β -plissés, ce qui fausserait naturellement les données. Nous avons donc voulu éliminer ces conditions artefactuelles en faisant des tests spectroscopiques sur des peaux provenant de personnes saines et de peau provenant de patients atteints d'amyloïdose systémique diffuse (tissus très riches en amyloïde). Nous exposerons les résultats des études spectroscopiques des échantillons de peau saine et de peau de patients atteints d'amyloïdoses. Enfin, nous proposerons les régions de la peau qui peuvent être utilisées pour le diagnostic précoce de la MA.

Dans **la conclusion de ce travail**, nous rappellerons les résultats que nous avons obtenus, puis nous proposerons les perspectives que nous envisagerions de donner à cette étude.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] **Campion D., Brice A., Dumanchin C., Puel M., Baulac M., De la Sayette V., Hannequin D., Martin C., Duyckaerts V., Michon A., Martin C., Moreau V., Penet C., Martinez M., Clerget-Darpoux F., Agid Y., Frebourg T.,** *Neuroreport* **7** (1996) 1582-1584.
- [2] **Selkoe D. J.,** *Revue pour la Science* **171** (1992) 34-41.
- [3] **Kelenyi G.,** *Acta Neuropathol.* **7** (1967) 336-348
- [4] **Elhaddaoui A., Merlin J. C., Delacourte A. and Turrell S.,** *J. Mol. Struct.* **267** (1992) 113-116.
- [5] **Elhaddaoui A., Delacourte A. et Turrell S.,** *J. Mol. Struct.* **294** (1993) 115-118.
- [6] **Pollack S. J., Salder I. I. J., Hawtin S. R., Tailor V. J. and Shearman M. S.,** *Neurosci. Lett.* **197** (1995) 211-214.
- [7] **Joachim C. L, Mori H. and Selkoe D.J.,** *Nature* **341** (1989) 226-230.
- [8] **Soininen H., Syrjänen S., Heinonen O.,** *Lancet* (1992) 339-245.
- [9] **Ikeda M., Shoji M., Yamaguchi H., Matsubara E., Amari M., Ishiguro K., Kwarabayashi T., Harigaya Y. and Hirai S.,** *Neurosci. Lett.* **150** (1993) 159-161.
- [10] **Wen G. Y., Wisniewski H. M., Blondal H., Benedikz E., Frey H., Pirtilla T., Rudelli R. et Kim K. S.,** *Acta Neuropathol.* **88** (1994) 201-208.
- [11] **Vega J. A., Diaz-Trelles R., Haro J. J., del Valle M. E., Naves F. J., Fernandez-Santchez M. T.,** *Neuroscienci. Lett.* **192** (1995) 132-136.

CHAPITRE I

GENERALITES



I.1 DESCRIPTION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

1.1 HISTORIQUE

En 1906, le Neurologue allemand Aloïs Alzheimer (1864-1915) décrit pour la première fois les manifestations de la maladie qui porte aujourd'hui son nom. Il avait soigné une femme âgée de 51 ans, dont les facultés intellectuelles avaient graduellement disparu en 4 ans [1]. A l'autopsie, le docteur Alzheimer nota deux types d'anomalies importantes: **à l'extérieur des cellules cérébrales** s'étaient formées des plaques (sphères, contenant des terminaisons nerveuses dégénérées) appelées **plaques séniles (PS)**, et **dans les cellules** elles-mêmes se trouvaient des enchevêtrements neuro-fibrillaires appelés **dégénérescences neuro-fibrillaires (DNF)**. A partir de cette observation, en particulier à cause de **l'âge relativement précoce de la survenue des lésions cérébrales**, il a été désormais individualisé une nouvelle entité nosologique appelée **maladie d'Alzheimer (MA)** qui concernera les patients atteints **avant l'âge de 65 ans (démence présénile)**. En revanche, le terme **démence sénile de type Alzheimer** continuera à être appliqué aux patients **de plus de 65 ans** jusqu'en 1979 où on s'est aperçu qu'il s'agissait **d'une seule et même maladie**. On a constaté aussi que, lorsque la maladie survenait **avant l'âge de 65 ans** (la forme précoce), son évolution semblait être beaucoup **plus rapide** que chez les **plus de 65 ans** (la forme tardive).

La MA, ce nom qui nous terrifie, existe, on s'en doute bien depuis longtemps. Pourtant, il y a à peine quelques années qu'on a commencé à en entendre parler, surtout depuis que certaines personnalités célèbres ont osé déclarer en souffrir. Nous citons deux cas: celui de l'actrice Rita Hayworth atteinte de la forme précoce, et celui de Ronald Reagan atteint de la forme tardive. Agé de 83 ans, l'ancien président des Etats-Unis a expliqué dans une lettre adressée à ses concitoyens qu'il souhaitait rendre public son état de santé pour attirer l'attention sur une maladie qui touche des millions de gens, et contre laquelle les médecins restent désarmés.

1.2 EPIDEMIOLOGIE

La maladie d'Alzheimer (MA) ne fait pas partie du processus normal du vieillissement, comme on le croit parfois; sinon, toutes les personnes âgées en seraient atteintes. L'étude des maladies neuro-dégénératives a montré que cette maladie est la

forme la plus commune des démences séniles. L'épidémiologie de la MA est encore fragmentaire. Les statistiques de mortalité ne sont pas très fiables à cause entre autres de l'imprécision du diagnostic *pré-mortem*.

Les recherches nous apprennent aussi que la MA touche plus les femmes que les hommes [2]. Mais sur ce point, on pourrait toutefois objecter que les hommes meurent en général plus jeunes que les femmes suite à des maladies vasculaires. Une autre objection impliquerait le rôle protecteur des oestrogènes dans la MA [3]. Certains auteurs expliquent ce dernier phénomène par le fait que chez les femmes ménopausées, la sécrétion oestrogénique s'arrête, tandis que chez les hommes âgés, la transformation de la testostérone en oestrogène se poursuit.

1.3 SIGNES CLINIQUES

Toujours sans cause connue, la MA reste une maladie insidieuse, très invalidante et résistante à tout traitement. Elle apparaît souvent, dans ses manifestations, comme l'amplification des phénomènes du vieillissement cérébral normal. Il est donc normal d'oublier, mais il n'est pas normal que l'oubli se double d'une détérioration de toutes les facultés cognitives, c'est-à-dire de tout ce qui est appris depuis la marche jusqu'au langage en passant par la manière de se vêtir. En neurologie, la recherche s'avère difficile parce qu'on ne dispose pas vraiment d'un modèle de détérioration «normale» des tissus du cerveau en rapport avec le vieillissement: cela varie d'un individu à l'autre.

La sémiologie de la MA comporte essentiellement une altération progressive des fonctions intellectuelles (ex: désorientation dans l'espace et dans le temps, troubles de la pensée abstraite, du jugement et du langage), des troubles du comportement (ex: dépression, comportements passifs, agitations) et quelques signes neurologiques (ex: augmentation du tonus musculaire). L'évolution varie beaucoup d'une personne à l'autre, sans que l'on sache vraiment pourquoi. Eventuellement, en l'absence de traitement, tous ces problèmes s'aggravent avec perte de la mémoire à long terme. Malgré ces déficits, la personne malade conservera la faculté d'entendre, de répondre aux émotions et le sens du toucher.

La présence de ces symptômes ne signifie pas forcément qu'il s'agit de la MA. Certains symptômes peuvent résulter d'affections curables, telles que la dépression ou une maladie cardiaque. C'est pourquoi, il est essentiel d'établir un bilan de santé complet. De ce fait, **un diagnostic clinique de la MA est uniquement un diagnostic de probabilité.**

1.4 LESIONS HISTOPATHOLOGIQUES DE LA MA

L'histologie du cerveau des alzheimeriens révèle l'existence de différents types de lésions qui affectent le parenchyme et certains neurones corticaux, les vaisseaux cérébraux (VC) et les neurones cholinergiques. **Deux lésions histopathologiques particulières sont retenues pour caractériser la MA: les dépôts d'amyloïde (dans les PS et dans les AA) et la dégénérescence neuro-fibrillaire (DNF).** Ces deux marqueurs sont nécessaires pour établir le **diagnostic certain** de la MA.

a) Les plaques séniles (PS)

Les plaques séniles (PS) (Voir Figures 2 et 3) sont des structures complexes, sphériques, extra-neurales, évoluant lentement et mesurant entre 5 et 100 micromètres (μm) de diamètre [4]. Elles s'établissent en plusieurs années, voire des dizaines d'années. Le **noyau central** est constitué **principalement d'une protéine fibrillaire appelée amyloïde-bêta**. Quand ces plaques deviennent matures (dites plaques neuritiques), elles sont souvent entourées de neurones dégénérés (Voir Figure 1.4). Les **PS** affectent surtout les régions cérébrales liées à la mémoire (Voir Figure 1), notamment, **l'hippocampe et le cortex** (les lobes temporaux et occipitaux sont les plus atteints, puis viennent le lobes pariétaux et frontaux).

Il existe aussi des plaques diffuses «dites préamyloïdes», d'environ 200 à 600 μm d'épaisseur [5], où les dépôts d'amyloïde peuvent se présenter sous **forme amorphe et non fibrillaire**. Ces plaques sont beaucoup plus abondantes que les plaques neuritiques (matures), et ont été détectées non seulement dans les aires cérébrales responsables des symptômes de la maladie, tels l'hippocampe et cortex, mais aussi dans d'autres zones, tels **le cervelet et le thalamus** [6]. Les études en microscopie électronique de ces plaques diffuses ont montré que le tissu cérébral dans ces plaques, ne se différencie pas du tissu cérébral normal environnant.

Certains chercheurs se sont intéressés à la structure spatiale des dépôts d'amyloïde dans le cortex cérébral alzheimerien et ont examiné à cet effet (par coloration et par immunohistochimie) plusieurs fragments de tissus cérébraux provenant de malades Alzheimer [5]. Leurs observations ont révélé que les dépôts d'amyloïde qui parsèment le cerveau alzheimerien ont tendance à s'accumuler de manière irrégulière, verticalement, sous forme de colonnes.

D'autres molécules sont également présentes dans les plaques séniles. On y trouve:

- * des protéines trouvées traditionnellement dans les amyloïdoses comme les apolipoprotéines E, J, et le composé P amyloïde,
- * des inhibiteurs de protéases, comme l'alpha-1 antichymotrypsine et la protéase nexine I,
- * des protéines du complément, des immunoglobulines et des interleukines,
- * des constituants de la matrice extra-cellulaire tels que la fibronectine et le collagène.
- * de l'ARN.

Cette liste est loin d'être exhaustive; mais parmi ces molécules, certaines pourraient favoriser la formation des filaments amyloïdes, et par conséquent, la formation des dépôts de substance amyloïde.

b) La dégénérescence neuro-fibrillaire (DNF)

La dégénérescence neuro-fibrillaire (DNF) apparaît principalement dans les corps cellulaires des neurones. Cette dégénérescence est progressive, et touche les régions hippocampiques et parahippocampiques, en particulier le cortex entorhinal et le CA1. Elle est caractérisée par une accumulation intra-neuronale de filaments torsadés appariés en hélice appelés Paires Hélicoïdales de Filaments (ou PHF) [7]. Les protéines Tau sont les constituants majeurs de ces PHF.

Les protéines Tau normales jouent un rôle dans la stabilisation des microtubules qui assurent le transport de matériel synthétisé du corps cellulaire vers les terminaisons nerveuses. Ces protéines forment une famille dont le poids moléculaire varie de 50 à 64 kDa. Au cours de la MA, on observe une dépolymérisation des microtubules, les protéines Tau s'agrègent et présentent alors une hyperphosphorylation.

Mais, **les dépôts d'amyloïde et la DNF**, «ces deux marqueurs biologiques de la MA», **ne sont pas spécifiques de la MA**. Ils sont tous les deux retrouvés au cours du vieillissement et dans d'autres maladies neuro-dégénératives [8], comme par exemple, dans le cas du **syndrome de Down** (trisomie 21 ou mongolisme), de la **maladie de Parkinson avec démence (MPD)**, de certaines **démences vasculaires (DV)**, de la **maladie de Creutzfeldt Jakob (MCJ)**, etc...

Les études réalisées sur la trisomie 21 ont montré que cette maladie présente les mêmes lésions que celles de la MA. Chez ces patients, les dépôts d'amyloïde sont détectés vers l'âge de 20 ans et la DNF vers l'âge de 35 ans [9,10]. Les dépôts d'amyloïde précéderaient, dans ce cas, la dégénérescence neuronale. Cette hypothèse pourrait peut-être s'appliquer aussi à la MA.

La localisation cérébrale des PS et de la DNF étant différente, l'hypothèse selon laquelle ces deux lésions seraient indépendantes est également proposée. Pour pouvoir répondre à ces ambiguïtés, il faut établir les causes de la maladie. Mais **l'absence de bons modèles animaux** ne permet pas de connaître les mécanismes exacts qui mènent à ces lésions cérébrales.

I.2 CAUSES PROBABLES DE LA MA

Pour trouver un remède à la MA, il importe parfois d'en trouver l'origine. Les causes de déclenchement de cette maladie sont mal définies. Toutefois les études épidémiologiques ont mis en évidence certains facteurs de risque comme l'âge et la présence d'antécédents familiaux. Actuellement, six pistes de recherche [11] sont envisagées, telles que la circulation sanguine, le virus à action lente, l'acétylcholine, les toxines, l'hérédité et les protéines anormales. Mais les recherches se poursuivent et aucune hypothèse n'est retenue seule, puisqu'il y a déjà au moins deux formes de la maladie (précoce et tardive) et que plus d'un facteur pourraient provoquer son apparition.

2.1 MODELE DE LA CIRCULATION SANGUINE

Certaines affections, comme les accidents vasculaires ou l'artériosclérose, entraînent parfois chez leurs victimes des formes de démences qu'on a rapprochées de la MA. Or, on a remarqué que ces affections entraînent une réduction d'environ 30 % du débit sanguin cérébral normal. Il en résulte donc que la quantité d'oxygène et de glucose qu'apporte le sang au cerveau diminue d'autant, tout comme l'énergie que produisent à leur tour l'oxygène et le glucose. Toutefois, on pense aujourd'hui que le modèle de la circulation sanguine est à écarter, parce qu'on a constaté que la réduction du débit sanguin cérébral chez les malades n'est pas aussi importante qu'on l'avait d'abord crue, comparativement à la réduction que l'on trouve dans le cerveau des personnes âgées en bonne santé. L'autopsie du cerveau de patients atteints de démences vasculaires révèle parfois des dépôts d'amyloïde.

2.2 LE MODELE INFECTIEUX

Certaines maladies infectieuses mettent des années à se développer. Parmi elles, on peut noter la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) et la maladie de Kuru. Ces maladies virales provoquent donc la démence à partir d'une origine infectieuse. A cause de la similitude des symptômes et du moment de leur apparition (ce sont des maladies tardives qui laissent supposer une incubation fort longue), il faut se demander si la MA ne serait pas de la même nature que la MCJ.

L'autopsie du cerveau de patients atteints de la MCJ indique une spongieuse et des dépôts d'amyloïde. Les protéines infectieuses impliquées, les prions (*proteinaceous infectious particles*) existent sous deux formes. L'une **normale** appelée **protéine du prion cellulaire (PrPc)** qui est de structure en hélice α . L'autre **anormale** appelée **protéine du prion scrapie (PrPsc)** est une transformation de la conformation spatiale de la première en une **conformation pathogène, la structure en feuillets β -plissés**.

Comme dans le cas de la MA, pendant l'incubation et pendant la maladie elle-même, le malade atteint de la MCJ semble être en bonne santé physique et ne présente pas de fièvre ou de signes précurseurs de la maladie. Signalons pour mémoire une forme animale de cette maladie, **l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB)** appelée communément, «**la maladie de la vache folle**», dont les déterminants anatomiques semblent se superposer à ceux retrouvés en pathologie humaine. **Il n'est donc pas exclu qu'à l'avenir, cette maladie animale puisse fournir un modèle expérimental intéressant pour la compréhension de la pathologie de la MA.**

2.3 LE MODÈLE DE L'ACÉTYLCHOLINE

En 1976, certains chercheurs de la Faculté de Médecine d'Edimbourg et de l'Institut Neurologique de Londres ont constaté pour la première fois une anomalie biochimique associée à la MA. Les terminaisons cholinergiques de l'hippocampe jouent un rôle important dans la formation de la mémoire. Or, «dans l'hippocampe et dans le cortex des malades, la concentration en choline acétyltransférase (CAT) est réduite parfois de 90 %»: les terminaisons contenant de la CAT font donc défaut dans certaines régions du cerveau des personnes atteintes de la MA. Les neurones qui utilisent l'acétylcholine, ceux dont dépend le processus de mémorisation, seraient déficitaires chez les malades Alzheimer [12].

2.4 LE MODÈLE DES TOXINES

Des métaux tels que l'aluminium, le fer et autres existent dans le cerveau des personnes âgées, mais leur taux est significativement plus élevé chez les personnes atteintes de la MA. Cependant, on ignore si ce trouble est une conséquence, une cause, ou s'il est même lié à la maladie. En revanche, on sait que l'aluminium induit des lésions neuro-fibrillaires chez l'animal, mais de morphologie différente de celle de la MA [13].

2.5 LE MODÈLE GÉNÉTIQUE OU HÉRÉDITAIRE

On peut actuellement distinguer au moins deux formes de la MA: l'une qui **serait héréditaire** et l'autre qui serait **sporadique**. Grâce à l'existence de familles dans lesquelles la MA sévit sur plusieurs générations, des études génétiques ont pu être réalisées. Toutes les mutations pathogènes correspondent à des formes familiales précoces. On connaît maintenant **cinq gènes** situés sur des **chromosomes différents** qui prédisposent à cette affection. Trois de ces gènes sont porteurs de mutations pathogéniques et les deux autres agiraient comme des facteurs de prédisposition au développement de la maladie.

Les mutations intéressent le précurseur de la protéine amyloïde-bêta (APP), la préséniline 1 (PS 1) et la préséniline 2 (PS 2) (Figure I.1). Leurs gènes sont localisés respectivement sur les chromosomes 21, 14, et 1. Ils interviennent dans des formes familiales rares où la maladie sévit avant l'âge de 65 ans (forme précoce). Par contre, les facteurs de risque découverts sur les chromosomes 19 et 14 intéressent surtout les formes apparaissant après l'âge de 65 ans (forme tardive). Il s'agit de certaines formes de l'apolipoprotéine E (APOE), et de l' α 1-antichymotrypsine. La découverte de ces mutations et de ces facteurs de risque aidera peut être à mieux comprendre le développement de la maladie et à mieux définir les stratégies thérapeutiques.

Gène de l'APP

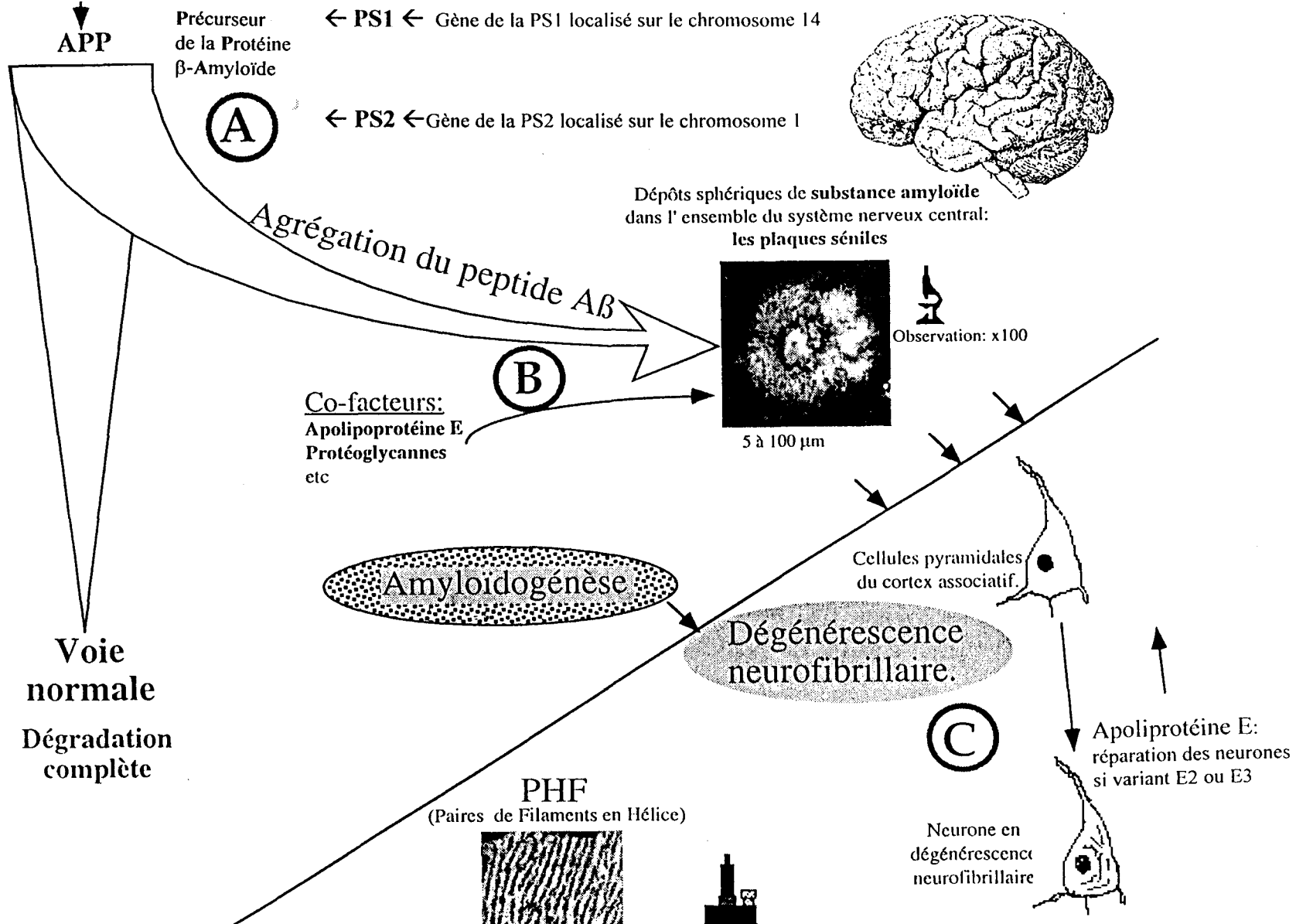


Figure I.1: Les **plaques séniles (PS)** et la **dégénérescence neuro-fibrillaire (DNF)** sont les deux marqueurs biologiques essentiels pour le diagnostic certain de la MA. Le mécanisme de formation du peptide amyloïde-bêta est expliqué dans les pages 27-29 (Communication Privée, A. Delacourte).

2.6 LE MODÈLE DES PROTÉINES ANORMALES

Les protéines anormales caractéristiques de la maladie d'Alzheimer sont les PHF et les protéines amyloïdes. Dans ce travail, nous nous sommes intéressées uniquement aux protéines amyloïdes. Ces dernières sont fibrillaires, de structure en feuillets β -plissés, se lient au RC et à la TS, sont insolubles dans l'eau et résistent à la majorité des réactifs chimiques. Les protéines amyloïdes existent dans des maladies neuro-dégénératives (MA, DV, MCJ, etc...), où les dépôts sont principalement cérébraux, mais aussi dans d'autres maladies appelées amyloïdoses où les dépôts sont abondants et principalement extra-cérébraux.

Nous insisterons sur les éléments suivants.

- * Les protéines amyloïdes sont de structure en feuillets β -plissés, alors que la majorité des protéines dans le tissu cérébral sont de structure en hélice α .
- * Les PHF, qui sont de structure α au départ, deviennent de structure en feuillets β -plissés à un stade avancé de la MA.
- * Le prion (PrPc) dans la MCJ de structure native α qui est inoffensif au début de la maladie, devient (PrPsc) pathogène après sa transformation en structure β .

Le caractère pathogène des protéines «dites anormales», notamment les protéines amyloïdes, la protéine prion scrapie et autres, semble résider en majeure partie dans leur structure en feuillets β -plissés.

Remarque: Les six modèles de recherches présentés brièvement ici sont tous importants. Aucune hypothèse n'est écartée quand il s'agit de trouver l'origine et le traitement de la MA, un problème essentiel de notre siècle.

I.3 PREVENTION ET TRAITEMENT

Actuellement, il n'existe aucun moyen ni pour prévenir ni pour guérir de la MA. Cependant, on possède deux médicaments: la tacrine et le donepezil. Ils semblent améliorer les fonctions intellectuelles et les activités quotidiennes chez certains patients. Mais ils n'agissent que sur les symptômes et non sur l'évolution de la maladie. Selon de récentes études américaines, les patients traités efficacement par ces médicaments gagnent au moins deux ans avant le placement en institution. Malheureusement ceux-ci ont beaucoup d'effets secondaires. Par exemple, la tacrine, toxique pour le foie, provoque une très grande perte de poids et ne donne pas de bons résultats chez tous les malades. De plus, il n'existe pas de critères permettant de prévoir ses effets. «Au total, compte tenu des effets secondaires et de l'efficacité variable selon les patients, le traitement est utile chez environ 30 à 40 % des malades. Ce pourcentage est certes modeste, mais avant, il n'y avait rien».

Les autres pistes explorées sont celles qui s'opposeraient à la mort neuronale: les facteurs de croissance (mais une intervention de neurochirurgie est nécessaire pour les faire arriver dans le cerveau) et les inhibiteurs calciques, normalement prescrits dans les maladies cardiaques et dans l'hypertension artérielle. S'ils font preuve d'efficacité, ces produits pourraient être associés à la tacrine et au donepezil pour ralentir l'évolution de la maladie. Enfin, les anti-inflammatoires et les traitements hormonaux [3] substitutifs de la ménopause pourraient avoir un rôle protecteur. L'aspirine pourrait également avoir un rôle dans la prévention de la MA. Grilli M. et ses collaborateurs (Brescia, Italie) viennent de découvrir une nouvelle propriété à l'aspirine: la protection contre la neurotoxicité [14]. Ils existent aussi des substances naturelles, notamment celles d'origine végétale, qui contiennent également des piègeurs de radicaux libres. Notamment le vin. Depuis longtemps, les spécialistes connaissent les bénéfices d'une consommation modérée d'alcool, et plus particulièrement le vin rouge, sur les maladies cardio-vasculaires. Aujourd'hui, il apparaît également qu'une consommation quotidienne de trois à quatre verres de vin par jour (de 250 à 500 millilitres) peut aussi avoir un effet protecteur contre le développement des démences en général et de la MA en particulier [15].

D'autres chercheurs étudient des produits capables d'empêcher la formation et le dépôt de la protéine amyloïde-bêta. S'ils y parviennent, il sera possible de bloquer l'évolution de la maladie dès son début, à condition d'avoir les moyens de la dépister très tôt, voire d'identifier les personnes génétiquement prédisposées. A ce propos, certains chercheurs ont tenté de trouver un moyen pour diagnostiquer la MA *in vivo*. Un exemple est le cas de Scinto et ses collaborateurs à Harvard qui ont rapporté, il y a un peu plus de trois ans [16], qu'un simple test de dilatation pupillaire permettrait d'effectuer un diagnostic de la MA à un stade précoce (voire même un diagnostic d'anticipation). En effet, les patients Alzheimer examinés dans une étude relativement restreinte présentaient tous une hypersensibilité aux antagonistes cholinergiques. Mais ces résultats ont été contredits par certains auteurs, qui ont été incapables de mettre en évidence la moindre différence à ce test entre patients et témoins [17].

I.4 ELEMENTS DE DIAGNOSTIC

Le diagnostic de la MA, on l'a vu, reste très difficile à poser en raison des autres affections avec lesquelles on peut la confondre. **En attendant un test de diagnostic certain**, le diagnostic de probabilité de la MA repose sur des examens cliniques mettant en oeuvre différents tests: physiques, neuro-psychologiques et une évaluation psychiatrique, mais aussi des examens paracliniques qui permettent d'éliminer d'autres pathologies susceptibles de retentir sur les fonctions cognitives.

4.1 EXAMENS CLINIQUES

A) Examens physiques

Le médecin doit chercher des éléments pouvant être à l'origine des troubles cliniques. Pour cela, plusieurs examens sont nécessaires: des examens sanguins (pour déceler une infection), l'analyse du liquide céphalo-rachidien (LCR) (pour éliminer la possibilité de troubles du système nerveux central), un électroencéphalogramme (pour enregistrer l'activité électrique du cerveau) et un scanner cérébral (qui doit révéler la présence d'une atrophie cérébrale prédominante sur les lobes temporaux ainsi qu'un élargissement des ventricules [18]).

B) Tests neuro-psychologiques

Le neurologue soumet le malade à un examen qui a pour but de déterminer les régions cérébrales affectées et celles qui continuent de bien fonctionner. Le psychologue effectue habituellement un test qui rend compte de la capacité de mémoriser, de raisonner, d'écrire, de lire, de s'exprimer, de comprendre des instructions générales et de coordonner les mouvements corporels.

C) Evaluation psychiatrique

Le psychiatre doit diagnostiquer l'origine des troubles comportementaux.

4.2 LE DIAGNOSTIC

Même si l'étude des différents tests décrits ci-dessus confirme l'absence de toute autre maladie organique cérébrale, seule **l'autopsie du cerveau** est en mesure de confirmer sans aucun doute qu'il s'agit bien de la MA. Les patients doivent généralement

se contenter d'un diagnostic de probabilité, selon qu'il existe ou non d'autres maladies. Pour les chercheurs, les critères pour établir un diagnostic clinique de la MA sont les suivants [19]:

A) Alzheimer possible

- * Démence observée à l'examen clinique.
- * Détérioration progressive de plus de deux facultés cognitives (un trouble en plus des déficits de la mémoire récente).
- * **Présence** d'une seconde maladie systémique ou cérébrale mais qui n'est pas jugée comme la cause de la démence.

B) Alzheimer probable

- * Démence observée à l'examen clinique.
- * Détérioration progressive de plus de deux facultés cognitives.
- * **Absence** de toute autre maladie systémique ou cérébrale susceptible de causer la démence.

C) Alzheimer certain

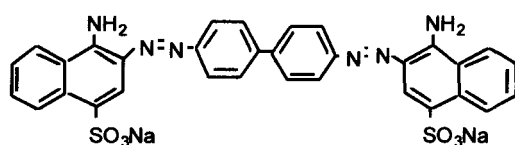
- * Réponse positive aux critères cliniques de la MA et biopsie ou étude positive à l'autopsie. **Le diagnostic *post-mortem* de la MA** repose sur la détection des deux lésions histopathologiques: les dépôts d'amyloïde et la DNF (Voir Figures 2 et 3).

Lors du diagnostic histopathologique *post-mortem* de la MA, la détection des protéines amyloïdes est possible grâce à la fixation de certains ligands comme le rouge Congo (RC) et la thioflavine S (TS) (Figure 1.2). Cette interaction laisse penser que la molécule RC pourrait être utilisée pour d'autres buts. Une meilleure connaissance de la nature et des propriétés physico-chimiques à la fois, de la molécule RC et des protéines amyloïdes, pourrait peut-être permettre des avancées importantes dans l'optique de contrer la formation des PS et l'avancée dans un processus neuro-dégénératif. Un second objectif serait d'utiliser la molécule RC comme sonde *in vivo* pour détecter les dépôts d'amyloïde à un stade précoce de la maladie. Eventuellement, ceci serait possible si le RC est non toxique et se lie uniquement aux protéines amyloïdes. Ce colorant est donc une cible thérapeutique potentielle et il n'est pas utopique de penser que le développement de

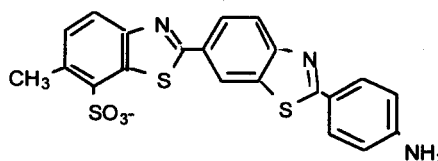
molécules sondes puisse permettre le ralentissement ou, de manière plus optimiste, l'arrêt définitif de la maladie. C'est en tout cas dans cet espoir que nous nous sommes intéressés au laboratoire à l'identification et à la caractérisation des protéines amyloïdes, ainsi qu'à l'étude du mécanisme d'interaction entre le RC et les protéines amyloïdes dans le tissu cérébral.

4.3 METHODES DE DETECTION DES PROTEINES AMYLOIDES

Les dépôts d'amyloïde sont caractérisés par différents procédés d'histologie classique: les colorations spéciales (Voir Figures 2 et 3) et l'immunohistochimie. Pour l'étude immunohistochimique, on utilise des anticorps spécifiques dirigés contre la protéine amyloïde-bêta, dont l'anticorps polyclonal R1280 de DAKO [20] et l'anticorps monoclonal de DAKO. En revanche, pour les colorations spéciales, les colorants les plus utilisés pour la détection des dépôts d'amyloïde sont le RC et la TS. Les structures chimiques de ces deux ligands sont représentées sur la Figure I.2.



rouge Congo (RC)



thioflavine S (TS)

Figure I.2: Structures chimiques des ligands révélateurs des dépôts d'amyloïde: le rouge Congo (RC) et la thioflavine S (TS).

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au procédé de coloration. Des coupes de tissu de quelques micromètres d'épaisseur sont déparaffinées et colorées soit au RC, soit à la TS. Dans le cas du tissu cérébral, les dépôts d'amyloïde sont localisés dans les plaques séniles (PS) et dans la paroi des vaisseaux cérébraux (AA). Après coloration au RC, les dépôts d'amyloïde présentent un dichroïsme jaune-vert lorsqu'ils sont observés sous microscope optique muni de deux polariseurs croisés. En revanche, après coloration à la TS, les coupes tissulaires sont observées sous microscope optique comprenant une lampe ultraviolette excitatrice. Les lésions ayant retenu le réactif, émettent une fluorescence jaune.

Remarque: Pour tous nos tests histopathologiques et pour certaines études spectroscopiques, les sections cérébrales du tissu témoin et les sections cérébrales du tissu malade ont été traitées simultanément.

4.4 DIAGNOSTIC SPECTROSCOPIQUE DE LA MA

Jusqu'à présent, le diagnostic *post-mortem* de la MA est basé sur des tests histopathologiques. Certaines techniques spectroscopiques ont largement évoluées cette dernière décennie. Aussi, les spectrométries vibrationnelles (infrarouge et Raman) ont été exploitées en tant **qu'outil de biodiagnostic de certaines maladies** [21-25]. Ainsi, certains chercheurs ont tenté de détecter les dépôts d'amyloïde dans des tissus cérébraux de malades Alzheimer par spectrométrie infrarouge [22,23]. Mais, les résultats obtenus n'étaient pas reproductibles car la technique utilisée nécessitait une quantité importante de protéines amyloïdes. Dans ce travail, nous avons utilisé d'autres techniques spectroscopiques plus fiables pour la détection des protéines et qui nécessitaient peu de protéines amyloïdes.

I.5 DESCRIPTION DE LA SUBSTANCE AMYLOÏDE (SA)

5.1 HISTORIQUE

Si Alzheimer est le premier à avoir associé la protéine bêta-amyloïde à la démence sénile qui porte aujourd'hui son nom, la protéine était connue avant lui. Les pathologistes savaient que le cortex cérébral humain contenait parfois des plaques sphériques, composées d'axones et de dendrites (les terminaisons des neurones) endommagés, autour d'une masse extra-cellulaire de filaments fins. Au microscope, ces filaments ressemblaient aux dépôts extra-cellulaires qui s'accumulent en dehors du système nerveux dans certaines maladies appelées amyloïdoses. Ces maladies sont toutes caractérisées par la présence d'innombrables dépôts extra-cellulaires de fragments protéiques normaux ou mutés. Dans ces dépôts, les sous-unités protéiques sont toujours repliées dans un arrangement tridimensionnel appelé conformation bêta-plissée. Ces fibres anormales résistent aux solvants et à la dégradation. En 1853, le pathologiste allemand Rudolf Virchow nomma ces dépôts «amyloïdes», parce que la substance des dépôts ressemblait à de l'amidon [26].

5.2 DÉFINITION

La substance amyloïde (SA) est un terme qualifiant un ensemble de substances de nature protéique ou glycoprotéique et de composition chimique complexe et variable. La SA est extra-cellulaire, solide, translucide, résistante aux enzymes protéolytiques, et elle infiltre les organes sans les déformer. Histologiquement, elle se présente comme une matière anhiste qui se dépose dans le tissu interstitiel et dans les tuniques des petits vaisseaux en englobant les éléments cellulaires préexistants.

Les substances amyloïdes ont en commun:

- * une structure moléculaire en feuillets plissés de type bêta [27],
- * une insolubilité dans les conditions biologiques [28],
- * un aspect éosinophile homogène après coloration par l'hématéine éosine,
- * une biréfringence verte en lumière polarisée après coloration au RC,
- * une fluorescence jaune sous lumière ultraviolette après coloration à la TS,
- * un aspect micro-fibrillaire en microscopie électronique.

5.3 SUBSTANCE AMYLOÏDE DE LA MA: Le Peptide Amyloïde A β

Ce qui diffère la substance amyloïde (SA) de la MA de la SA des autres maladies, est sa structure chimique. En effet, la SA de la MA contient essentiellement un peptide appelé amyloïde bêta (A β) dont la longueur varie de 39 à 43 acides aminés (aa) [29,30]. La séquence de ce peptide A β a été déterminée tout d'abord à partir de la SA déposée dans la paroi des vaisseaux cérébraux des méninges (AA) [29] où la forme de 1 à 40 aa domine, noté [A β (1-40)]. Le même peptide, avec une extrémité C-terminale plus longue, a ensuite été purifié à partir des plaques séniles et est alors constitué de 42 à 43 aa [A β (1-42)43] [28-31]. La structure primaire du peptide A β (1-42)43 est présentée sur la Figure I.3.

NH₂-Asp¹-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr¹⁰-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe²⁰-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala³⁰-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val⁴⁰-Ile-Ala-(Thr)-COOH

Figure I.3: Structure primaire du peptide amyloïde-bêta (A β). Ce peptide peut être formé soit de 40 acides aminés (aa)[A β (1-40)], soit de 42 ou 43 aa [A β (1-42)43].

Au cours de la MA, le peptide A β (1-42)43 se dépose dans le cerveau des alzheimeriens sous forme de filaments antiparallèles, droits, de 4 à 10 nanomètre de diamètre, qui s'agrègent pour former une **structure secondaire de feuillets β -plissés** [32] dont la solubilité est fortement limitée aux solvants aqueux dénaturants [33-35].

Depuis 1989, des dépôts du peptide A β extra-cérébraux ont été détectés par immunohistologie au niveau de divers tissus prélevés chez des patients atteints de la MA, en l'occurrence, dans la peau et dans l'intestin. Dans ces organes, la protéine amyloïde-bêta se dépose en quantité minime dans la paroi de certains vaisseaux sanguins (VS) et autour de ceux-ci [20, 31, 36-38]. Ainsi, le peptide A β ne s'accumule pas uniquement dans le cerveau des victimes de la MA.

En 1992, on a découvert une forme **soluble** du peptide A β (constituée de 40 aa) dans les liquides biologiques (Liquide céphalo-rachidien (LCR) et plasma). Mais ce peptide A β (1-40) soluble semble être une composante normale du sérum [39,40] et du LCR [41,42].

a) Origine du peptide A β

D'où provient le peptide A β ? Des axones, des dendrites, ou des vaisseaux cérébraux situés à proximité? (Figure 1.4). Serait-il la cause ou la conséquence de la maladie? Toutes ces questions demeurent jusqu'à ce jour sans réponse exacte.

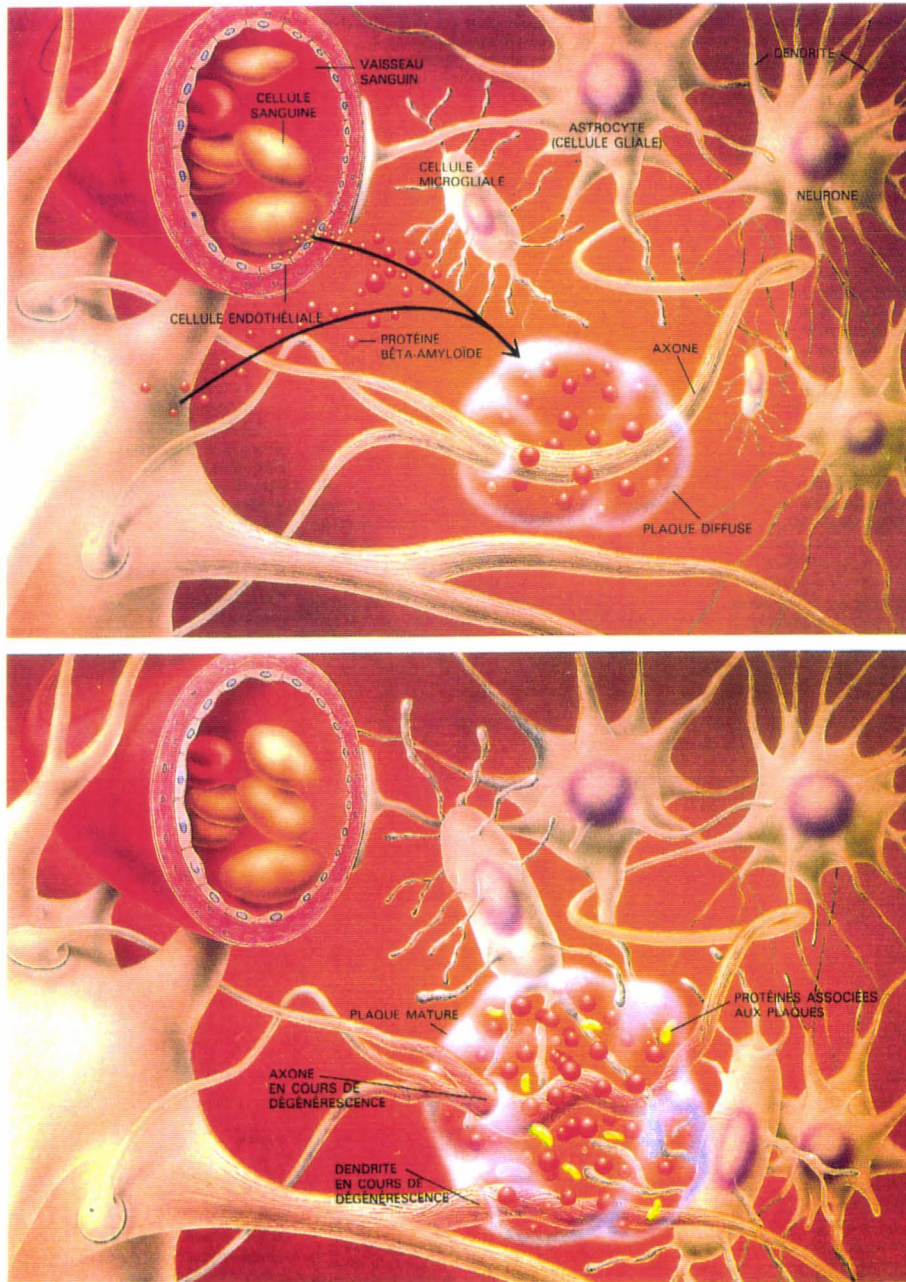


Figure 1.4: Le peptide A β pourrait déclencher la maladie d'Alzheimer (MA) par le mécanisme représenté sur cette Figure. Le peptide A β libéré soit par les neurones, soit par les cellules gliales ou par les cellules sanguines, s'accumulerait dans le système nerveux sous forme de multiples plaques diffuses (*en haut*). Puis le peptide A β (1-42)43, diverses cellules gliales et d'autres protéines progressivement incluses dans les plaques en cours de maturation provoqueraient la dégénérescence progressive des neurones avoisinants (*en bas*) [6].

On sait que le peptide A β est un fragment qui provient d'une protéine précurseur plus longue APP (amyloid protein precursor) formée de 695 à 770 acides aminés (aa), dont la structure évoque celle d'un récepteur membranaire [29]. L'APP possède un grand domaine extra-cellulaire et un court domaine cytoplasmique. Le peptide A β se situe à la fois dans la partie extra-cellulaire et la partie trans-membranaire (Figure I.5).

Différentes isoformes sont obtenus par épissage alternatif du gène de l'APP. Il existe trois formes majeures: la forme 695 est prédominante dans le cerveau tandis que les formes à 751 et 770 aa sont principalement trouvées dans les organes périphériques. De nombreuses fonctions ont été proposées pour le peptide A β et l'APP [43]. Toutefois, leurs fonctions réelles demeurent inconnues.



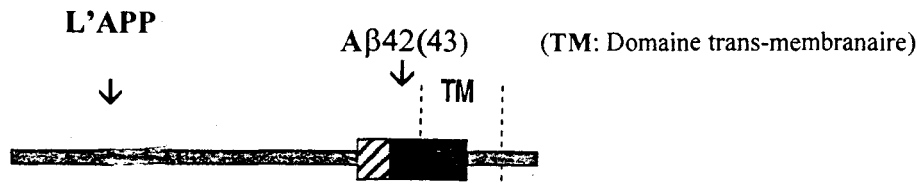
Figure I.5: Le précurseur de la protéine β -amyloïde (A β) (APP) est une protéine trans-membranaire (à gauche) que des protéases scindent de plusieurs façons. Normalement, les enzymes coupent l'APP au milieu de la région qui correspond au peptide A β (au centre), mais parfois les enzymes libèrent le peptide A β entier, (à droite), qui s'accumule dans les tissus. Certaines formes de l'APP contiennent un élément régulateur des protéases qui participerait au fonctionnement normal de la protéine [6].

b) Mécanisme de formation du peptide A β

Le constituant majeur des plaques séniles est le peptide A β . Pourtant, ce fragment de l'APP est aussi un produit du métabolisme cellulaire normal puisqu'il est retrouvé dans les fluides biologiques de personnes non affectées par la MA. De nombreux événements environnementaux, métaboliques ou génétiques, contribuent vraisemblablement au passage d'une production normale de A β à une situation potentiellement pathogénique. Toutefois, la formation du peptide A β à partir de son précurseur met en jeu des enzymes appelées secrétases.

Il existe donc deux voies protéolytiques de l'APP: l'une **non-amyloïdogénique** (Figure I.6) (**voie A**), où le peptide sécrété majoritairement est le **peptide A β (1-40)** et l'autre **amyloïdogénique** (Figure I.7) (**voie B**), où le peptide sécrété majoritairement est le **peptide A β (1-42)43 aa**.

A) Voie non amyloïdogénique (Figure I.6)



Une première enzyme, l' **α -sécrétase** (α sec) intervient dans la voie physiologique d'hydrolyse du précurseur et conduit à la **libération de l'APP $_{\alpha}$** qui est ensuite libéré dans la circulation [44,45]. L'APP $_{\alpha}$ est particulièrement important puisqu'il serait impliqué dans le processus de réparation cellulaire [46]. Il présenterait aussi des propriétés neurotrophiques et cytoprotectrices *in vitro* et *in vivo* [47].

Le produit C-terminal de 10 kDa peut ensuite subir une coupure par une autre activité, la **γ -sécrétase** (γ sec) qui relargue le **produit p3 formé de 40 aa (A β (1-40))** et qui ne présente pas de potentialité amyloïdogénique [44].

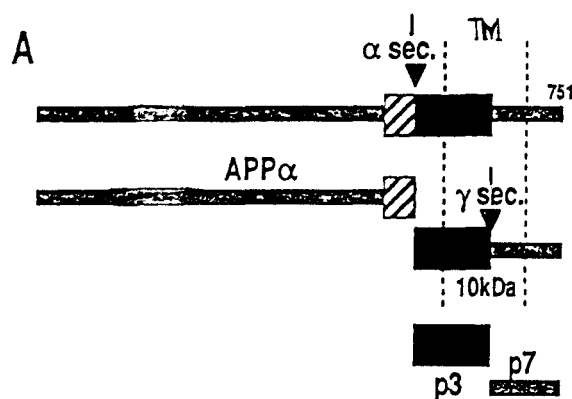


Figure I.6: Coupure enzymatique non amyloïdogénique: les α -sécrétases coupent dans le peptide A β et les γ -sécrétases libèrent l'extrémité droite de l'A β . Le peptide A β (1-40) ou (p3) ainsi libéré contient 40 acides aminés [48].

B) Voie amyloïdogénique (Figure I.7)

La voie amyloïdogénique produit **les peptides contenant la séquence de A β intacte** en faisant intervenir deux enzymes: **la β -sécrétase (β sec)** et **la γ -sécrétase**. La seule coupure par la β sécrétase conduit à **un produit de 12 kDa (ou p12)** qui présente déjà une **potentialité amyloïdogénique** puisqu'il porte en son N-terminal, une **séquence A β complète**.

La libération finale de peptide **complet [A β (1-42)43]** formé de 42 à 43 aa nécessite la coupure subséquente de **p12** par une activité de type γ -sécrétase.

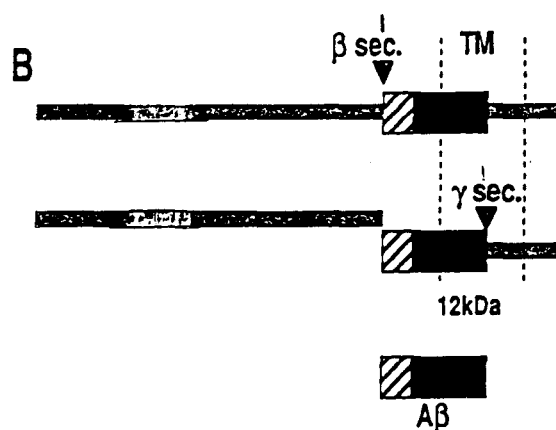


Figure I.7: Coupure enzymatique amyloïdogénique, les β -sécrétases coupent dans le peptide A β au niveau de l'extrémité gauche et les γ -sécrétases libèrent l'extrémité droite de l'A β . Le peptide A β (1-42)43 est libéré en entier. Il contient donc 42 à 43 acides aminés [48].

Il semble donc que cette forme A β (1-42)43 favorise le développement de la MA. Il a été également montré que le peptide long A β (1-42)43 est capable de s'agréger *in vitro* plus rapidement que le peptide court A β (1-40) pour former des fibres d'amyloïde [49,50].

Dans un travail récent, Selkoe [51] a insisté sur le fait que les quatre mutations génétiques différentes impliquées dans les formes familiales de la MA se traduisent toutes par l'augmentation de la production de la protéine amyloïde-bêta. Un phénomène qui renforce la validité de l'hypothèse amyloïde, laquelle semble majoritaire dans la communauté des spécialistes. Toutefois, Selkoe pense que si la protéine amyloïde-bêta est nécessaire au processus pathogène, elle n'est pas forcément suffisante [51]. Le dépôt de l'amyloïde-bêta serait une étape précoce dans la pathogenèse de toutes les formes familiales connues de la MA, mais elle devrait être suivie par d'autres changements

moléculaires et cellulaires qui aboutiraient à la perte synaptique et aux déficits en neurotransmetteurs, et par là même, à la démence. Il y aurait donc à la fois un mécanisme commun à toutes les formes de MA et plusieurs étapes impliquées dans la pathogenèse qui constituent chacune des cibles potentielles pour bloquer la cascade des événements aboutissant à la démence.

c) Neurotoxicité du peptide A β

Nous pensons que le peptide A β est probablement neurotoxique [52,53] car les PS sont souvent entourées de neurones dégénérés et de cellules gliales (Voir Figure I.4) [54]. De plus, comme les PS contiennent principalement le peptide long A β (1-42)43 considéré comme étant pathogénique, ce peptide semble donc être capital dans la pathologie. Certains auteurs pensent que la «sévérité» de la MA est corrélée avec l'abondance du dépôt d'amyloïde dans le cerveau [4, 55-58]. Certains auteurs ont montré que l'injection directe du peptide A β synthétique dans le cerveau du rat produit des effets cytotoxiques [59].

Des études effectuées sur des souris transgéniques porteuses du gène APP muté (cette mutation est impliquée dans des formes familiale de la MA) créées par l'équipe de Dora Games [60] et présentant une pathologie de type Alzheimer, ont montré que ces souris développent des plaques de substance amyloïde mais pas de DNF. Dans un travail récent, Johnson et ses collaborateurs montrent que **dans l'hippocampe de ces souris , la concentration du peptide A β s'accroît de 17 fois entre l'âge de 4 à 8 mois et de 500 fois entre 4 et 18 mois** [61]. Et surtout, ils montrent que le **peptide A β qui se dépose correspond à la forme longue, celle qui contient 42 acides aminés.**

5.4 PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'AMYLOIDE

Les investigations de la SA, utilisant une grande variété de techniques physiques et chimiques, ont commencé par l'approche de Cohen qui a démontré par microscopie électronique que les dépôts d'amyloïde sont constitués essentiellement de fibres [62]. Ces dernières sont formées principalement de protéines dont la nature diffère selon le type de maladie.

Les fibres d'amyloïde ne sont pas solubles dans les solvants aqueux. La découverte de méthodes permettant leur dissolution dans des solvants dénaturants a facilité le

fractionnement de leurs constituants protéiques [63-65]. Par conséquent, l'analyse des fibres purifiées a permis de déterminer leur nature chimique [66], ainsi que celle de leurs protéines précurseurs [67-69]. Les études histochimiques faites par Romhanyi ont montré que les fibres d'amyloïde ont une structure ordonnée [70].

a) Les fibres d'amyloïde de la MA

Les fibres d'amyloïde isolées par Wisniweski et ses collaborateurs à partir de cerveaux de malades Alzheimer [71] mesurent environ 20 à 100 Å de diamètre et possèdent des étranglements périodiques de 300 à 400 Å (Figure I.8). Niyakawa et ses collaborateurs [72] ont décrit les fibres d'amyloïde comme étant des tubes creux composés de filaments arrangés fermement en hélice sous forme de spires. Chaque tour de spire est formé de 5 sous-unités globulaires.

Les études par diffraction de rayons X des fibres d'amyloïde de sources variées [73,74] ont démontré un espacement entre les chaînes peptidiques d'environ 4,7 Å, indiquant une conformation en feuillets β -antiparallèles, formant des agrégats de fibres de longueur indéfinie. Les études par diffraction de rayons X de Gueft [75] ont mis en évidence une structure générale en hélice macromoléculaire formée de cristaux de feuillets β plissés. L'utilisation de la diffraction de rayons X a permis d'évaluer la longueur des cristaux de fibres d'amyloïde à 75 et 100 Å et leur largeur à 40 Å [31]. Ces dimensions correspondent à peu près à 4 chaînes peptidiques en feuillets β [27], chaque peptide étant plissé perpendiculairement à la direction des fibres, avec approximativement 16 liaisons hydrogène intermoléculaires entre 2 plis antiparallèles (Figure I.9).

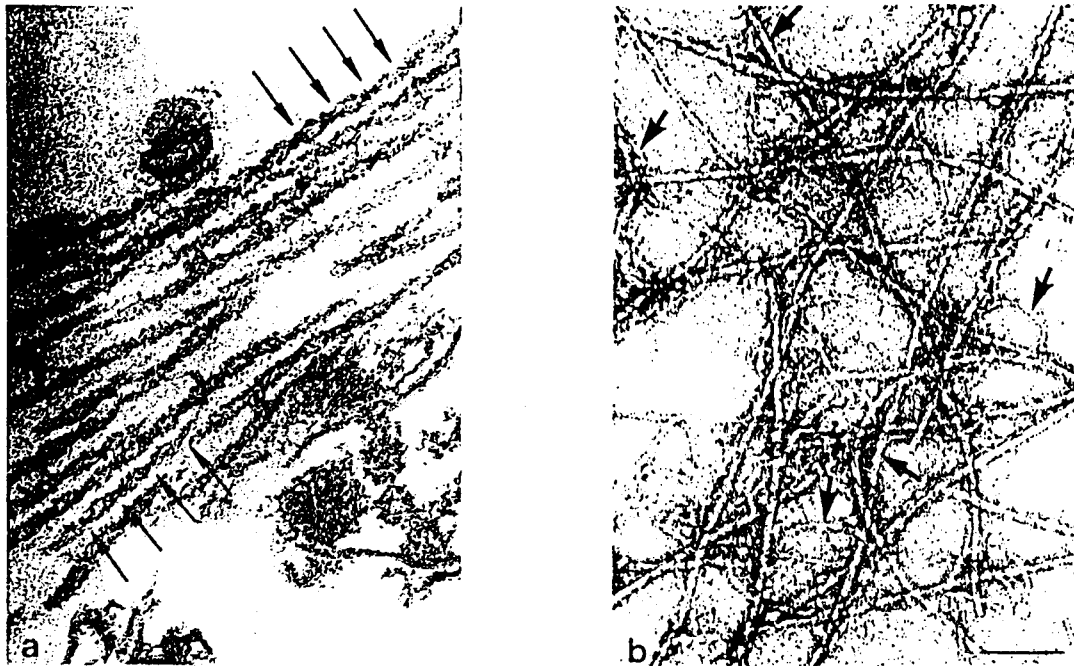


Figure I.8: Micrographies des fibres d'amyloïde de la MA: a) Les fibres arrangées en hélice sous forme de filaments présentant des étranglements périodiques (x 117000); b) fibres d'amyloïde des PS et des AA (barre=100 nm).

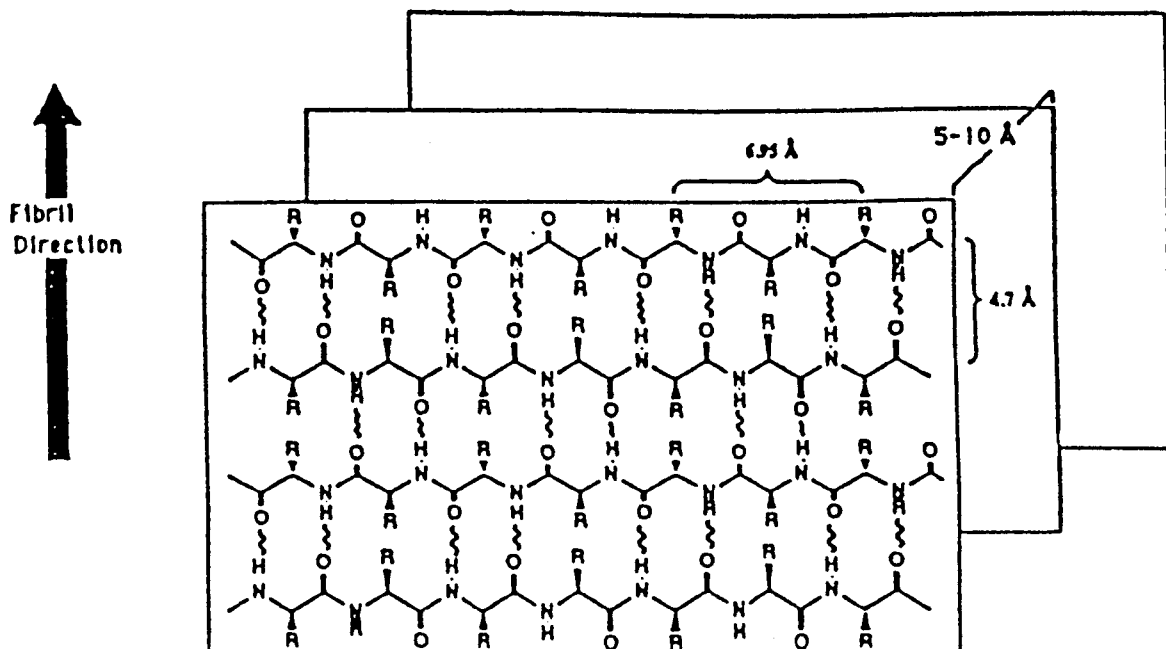


Figure I.9: Structure chimique des fibres d'amyloïde de la MA obtenue par diffraction de rayons X [74].

b) Les études *in vitro* des peptides amyloïdes de la MA

Les 28 premiers acides aminés [$A\beta(1-28)$] du peptide $A\beta(1-42)_{43}$ se trouvent dans une région extra-cellulaire hydrophile et les 12 à 15 derniers acides aminés [$A\beta(29-42)(43)$] de ce peptide se trouvent dans une région intra-membranaire hydrophobe (Figure I.10). Afin d'élucider la relation qui existe entre la formation des fibres d'amyloïde de la MA et la structure primaire du peptide $A\beta$, plusieurs investigations se sont portées sur la capacité de certains peptides synthétiques, notamment le $A\beta(1-28)$ et le $A\beta(29-42)$ de former des fibres *in vitro*: (Voir Figure I.5),

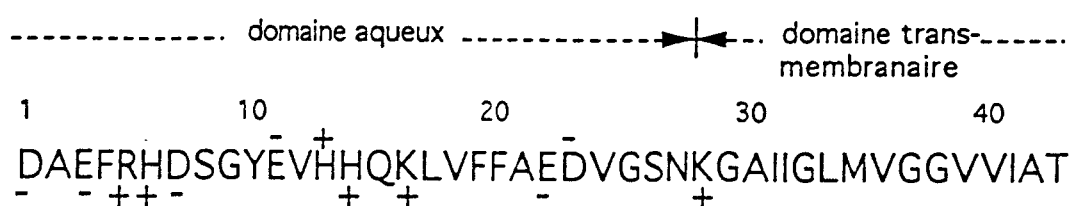


Figure I.10: Répartition des charges sur le peptide $A\beta(1-42)_{43}$ (les codes des acides aminés (aa) sont donnés dans la Figure II.1)

Certains auteurs ont montré que les filaments du peptide $A\beta(1-28)$ *in vitro* ressemblent à ceux trouvés dans les PS [32]. Des calculs de simulation et les études expérimentales par dichroïsme circulaire (DC) et par résonance magnétique nucléaire (RMN) [76-78] ont suggéré que ce peptide peut adopter un mélange de conformations selon le pH du milieu dans lequel il se trouve: la structure en hélice α , la forme désordonnée, et la structure en feuillets β -plissés. A l'inverse, le peptide $A\beta[29-42]$ s'agrège toujours en feuillets β -plissés [34,76,77,79].

c) Comment réagit le RC avec les protéines amyloïdes *in vitro*?

Les fibres d'amyloïde ont une grande affinité avec le RC et la TS [80]. Ainsi, plusieurs hypothèses ont été proposées pour essayer d'expliquer la nature du mécanisme d'interaction mis en jeu. En effet, avant la découverte du peptide $A\beta$ de la MA, les chercheurs pensaient que l'amyloïde était une glycoprotéine. Puchtler, par analogie à l'interaction du RC avec la cellulose, pensait que l'interaction entre l'amyloïde et le RC se faisait entre les groupements hydroxyles des polysaccharides et les groupements amines du RC, via des liaisons hydrogène[81,82].

Des études faites par Cooper [83] n'étaient pas en accord avec les hypothèses de Puchtler. Cooper a suggéré que la structure en feuillets β -plissés des fibres d'amyloïde est primordiale dans l'interaction, le RC est simplement piégé dans les «canaux» de cette structure β par des forces non spécifiques. Il a ajouté que cette conformation doit être elle-même suffisante pour établir un bon substrat pour l'interaction avec le RC. Delellis et ses collaborateurs ainsi que d'autres équipes ont soutenu l'implication de la structure secondaire en feuillets β -plissés des fibres d'amyloïde dans l'interaction avec le RC [75,82,83].

Les premières études spectroscopiques concernant le mécanisme d'interaction *in vitro* ont été limitées à l'absorption électronique [84]. Les résultats obtenus indiquaient la présence d'une interaction, mais, ils ne renseignaient pas sur la nature des groupements chimiques qui y sont impliqués. A ce propos, deux modèles moléculaires de l'amyloïde ont été largement étudiés: **l'insuline bovine** et **la poly-L-lysine**. Ils possèdent tous les deux les propriétés physico-chimiques de l'amyloïde: ils sont biréfringents après coloration au RC [85,86], ils forment des fibres quand elles sont visualisées en microscopie électronique [87,88], et ils peuvent exister dans la conformation en feuillets β plissés après dénaturation.

Les études spectroscopiques entreprises dans notre laboratoire depuis 1989 ont montré que les hypothèses de Cooper n'étaient pas crédibles. Les résultats obtenus par spectrométries IR et Raman ont montré que la conformation β -plissée peut aider mais elle ne suffit pas à assurer l'interaction. Cette interaction fait intervenir des groupements sulfonyles (SO_3^- chargés négativement) du colorant et des résidus aminés peptidiques chargés positivement [89] des protéines amyloïdes. A ceci, s'ajoute des forces de types Van-der-Waals et les cycles conjugués du colorant.

Ce modèle est soutenu par des calculs de modélisation qui ont montré que la molécule RC peut adopter deux conformations stables et de même énergie. La distance entre les groupements SO_3^- (19 Å) correspond à 4 chaînes latérales de la poly-L-lysine. Cette distance correspond à peu près à celle qui sépare 5 chaînes de l'agrégat peptidique en feuillets β -plissés parallèles ou antiparallèles du peptide A β [89] (Figure I.11). Cette étude a été confirmée par d'autres travaux de modélisation du peptide A β (1-28) [90].

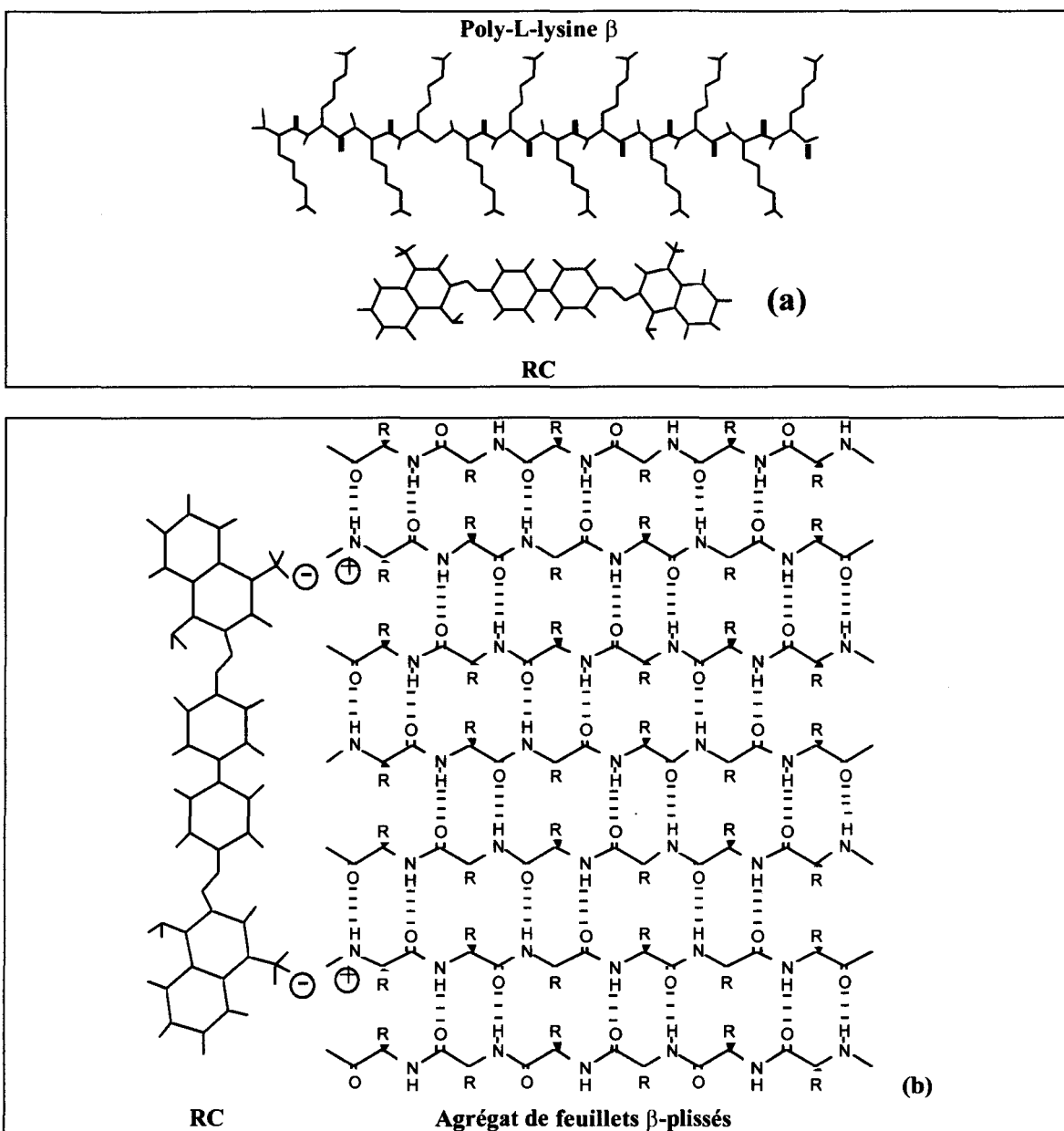


Figure I.11: Modèles d'interaction de la molécule RC avec la poly-L-lysine β (a) et avec le peptide A β (b).

I.6 QUELLES TECHNIQUES ANALYTIQUES CHOISIR?

A travers une bibliographie très riche, on peut constater que **le peptide A β est bien impliqué dans la pathologie de la MA**. Notre étude a pour objectif de déterminer des protocoles utilisant des techniques spectroscopiques fiables, applicables pour le diagnostic *in vivo* de la MA. Nous projetons d'effectuer cette étude par les techniques de spectrométries UV-visible, infrarouge, FT-Raman, micro-Raman et cartographie Raman.

Pour la détection des protéines amyloïdes, il convient donc de se tourner vers des techniques analytiques donnant des informations structurales précises sur la structure des composants tissulaires. Malgré les difficultés rencontrées lors de la prise des spectres Raman, l'utilisation des raies excitatrices émettant dans **le domaine du visible** s'est révélée être adaptée pour l'analyse nos tissus biologiques **non colorés**. Cependant, l'utilisation de la spectrométrie **Raman à excitation dans l'infrarouge** est adaptée à la fois à l'étude des tissus colorés et des tissus non colorés. De plus, elle permet de minimiser les problèmes liés à la dégradation des tissus et à la fluorescence.

Il est vrai qu'il faut considérer d'autres problèmes expérimentaux associés aux mesures spectroscopiques, notamment, l'instabilité des tissus sous le faisceau laser, le manque des montages nécessaires adaptés à la détection des dépôts d'amyloïde dans les tissus colorés (lampe UV pour les tissus colorés à la TS et polariseurs pour les tissus colorés au RC), et enfin, la difficulté de visualiser les lésions à étudier dans les sections cérébrales du tissu frais (colorés et non colorés). Mais malgré tous ces problèmes, les spectrométries vibrationnelles sont appropriées à notre étude. Elles permettent en effet, la caractérisation des tissus biologiques, en présentant à la fois un bon compromis entre la sensibilité de détection, la rapidité d'acquisition et un échantillonnage permettant de travailler dans les conditions de sécurité optimale.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] **Alzheimer A.**, *Allg Z Psychiat.* **64** (1907) 146-147.
- [2] **Rocca et al.**, *Ann. Neurol.* **30** (1991) 381-390.
- [3] **Jaffe A. B., Toran-Allerand C. D., Greengard P., Gandy S. E.**, *J. Biol. Chem.* **269** (1994) 13065-13068.
- [4] **Selkoe**, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **53** (1994) 438-447.
- [5] **Akiyama H., Yamada T., McGeer P. L., Kawamata T., Tooyama I., Ishii T.**, *Acta. Neuropathol.* **85** (1993) 400-403.
- [6] **Selkoe D. J.**, *Revue pour la Science* **171** (1992) 34-41.
- [7] **Delacourte A. and Défossez A.**, *J. Neurological. Sci.* **76** (1986) 173-186.
- [8] **Delacourte A.**, *Fondation Nationale de Gérontologie, Paris, in Forette, Christen, Boller (eds)* (1995) 49-60.
- [9] **Mann D. M. A. et al.**, *J. Neurol. Sci.* **92** (1989) 247-260.
- [10] **Mann D. M. A.**, *Neurobiol Aging* **10** (1989) 397-399.
- [11] **Wurtman**, *Science* (1985) 47-56.
- [12] **Wurtman**, *op. cit* (1988) 51.
- [13] **Langui et al.**, *Acta. Neuropathol.* **80** (1990) 649-655.
- [14] **Grilli M., Pizzi M., Memo M., Spano P.**, *Science* **274** (1996) 1383-1385.
- [15] **Orgogozo J. M., Dartigues J. F., Lafont S., Letenneur L., Commenges D., Salamon R., Renaud S., Breteler M.B.**, *Revue Neurologique.* **153** (1997) 185-192.
- [16] **Scinto L. F. M., Daffner K. R., Dressler D., Ransil B. I., Rentz D., Weintraub S., Mesulam M., Potter H.**, *Science* **266** (1994) 1051-1054.
- [17] **Litvan I., Fitz E.**, *J. Gibbon Neurology* **47** (1996) 1324-1326.
- [18] **Katzman R. et Jackson J. E.**, *J. Am. Geriatr. Soc.*, **39** (1990) 516-525.
- [19] **Mokhan G. et al.**, *Neurology* (1984) 939-944.
- [20] **Joachim C. L., Mori H. and Selkoe D.J.**, *Nature* **341** (1989) 226-230.
- [21] **Choo L. P., Jackson M., Halliday W.C., et Mansch H. H.**, *Biochim. Biophys. Acta* **1182** (1993) 333-337.

-
- [22] Fabian H., Choo L. P., Szendrei G. I., Jackson M., Halliday W. C., Otvos L., et Mansch H. H., *Appl. Spectroscopic.* **47** (1993) 1513-1518.
- [23] Choo L. P; Mansfield J. R., Pizzi N., Somorjai R. L., Jackson M., Halliday W. C. et Mansch H. H., *Biospectroscopy I* (1995) 141-148.
- [24] Fabian H., Jackson M., Murphy L., Watson P. H., Fichtner I. et Mansch H. H., *Biospectroscopy I* (1995) 37-45.
- [25] Mansch H. et Jackson M., *J. Molec. Struct.*, **347**, (1995) 148-167.
- [26] Virchow R. et Zur, *Virchows Arch.* **8** (1854) 140.
- [27] Kirshner D. A., Abraham C. and Selkoe D. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83** (1986) 503-507.
- [28] Masters C. L, Multhaup G., Pottgiesser I., Martins R. N., Beyreuther K., *EMBO. J.* **4** (1985) 2755-2763.
- [29] Glenner et Wong, *Biochem Biophys Res Commun*, **120** (1984) 885-890.
- [30] Kang J., Lemaire H-G., Unterbeck A., Salbum J. M., Masters C. L., Grzeschik K-H., Multhaup G., Beyreuther K. et Müller-Hill B., *Nature* **325** (1987) 733-736.
- [31] Prelli F., Castano E., Glenner G. G. and Frangione B., *J. Neurochem.* **51** (1988) 648-651.
- [32] Kirschner D. A., Inouye H., Duffy L. K., Sinclair A., Lind M., et Selkoe D. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **84** (1987) 6953-6957.
- [33] Halverson K. J., Sucholeiki I., Ashburn T. T. and Lansbury P. T., *J. Am. Chem. Soc.* **113** (1991) 6701-6703.
- [34] Hilbich C., Kister-Woike B., Reed J., Masters C. L. et Beyreuther K., *J Mol Biol* **218** (1991) 149-163.
- [35] Burdick D., Soreghan B., Kwon M., Kosmoski J., Knauer M., Henschen A., Yates J., Cotman C. and Glabe C., *J. Biol. Chem.* **267** (1992) 546-554.
- [36] Ikeda M., Shoji M., Yamaguchi H., Matsubara E., Amari M., Ishiguro K., Kwarabayashi T., Harigaya Y. and Hirai S., *Neurosci. Lett.* **150** (1993) 159-161.
- [37] Vega J. A., Diaz-Trelles R., Haro J. J., del Valle M. E., Naves F. J., Fernandez-Santchez M. T., *Neuroscienci. Lett.* **192** (1995) 132-136.
- [38] Wen G. Y., Wisniewski H. M., Blondal H., Benedikz E., Frey H., Pirtilla T., Rudelli R. et Kim K. S., *Acta Neuropathol.* **88** (1994) 201-208.
- [39] Seubert P., Vigo-Pelfrey C., Each F., Lee M., Dovey H., Davis D., Sinha S., Sclossmacher M., Whaley J., Swindlehurst C., McCormack R., Wolfert R., Selkoe D., Lieberburg I., Schenk D., *Nature* **359** (1992) 325-327.

-
- [40] **Busciglio J., Gabuzda D. H., Matsudaira P., Yankner B. A.,** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90** (1993) 2092-2096.
- [41] **Shoji M., Golde T. E., Ghiso J., Gheung T. T., Estus S., Shaffer L. M., Cai X. D., McKay D. M., Tintner R., Frangionne B. et Younkin S. G.,** *Science* **258** (1992) 126-129
- [42] **Haass C., Schlossmacher M. G., Hung A. Y., Vigo-Pelffery C., Mellon A., Ostaszewski B. L., Lieberburg I., Koo E. H., Schenk D., Teplow D., B., Selkoe D. J.,** *Nature* **359** (1992) 322-324.
- [43] **Selkoe et al.,** *J. Biol. Chem.* **271** (1996) 18295-18298.
- [44] **Haass C. et Sekoe D. J.,** *Cell.* **75** (1993) 1039-1042.
- [45] **Chesler F.,** *J. Neurochem.* **65** (1993) 1431-1444.
- [46] **Oltersdorf T., Fritz L. C., Schenk D. B., Lieberburg L., Johnson-Wood K. L., Beattie E. C., Ward P. J., Blachen R. W., Dovey H. F. et Sinha S.,** *Nature* **341** (1989) 144-147.
- [47] **Mattson M. P., Cheng B., Culwell A. R., Esch F. S., Lieberburg I., Rydel R. E.,** *Neuron.* **10** (1993) 243-254.
- [48] **Alzheimer Actualités, Ipsen 114** (1996) 8-9.
- [49] **Jarrett J. T., Berger E. P., Lansbury P.,** *Biochemistry* **32** (1993) 4693-4697.
- [50] **Suzuki et al.,** *Neurosci.* **48** (1992) 755-761.
- [51] **Selkoe D. J.,** *Science,* **275** (1997) 630-631.
- [52] **Selkoe D. J.,** *Neuron* **6** (1991) 487-498.
- [53] **Golde T. E., Estus S., Younkin L.H., Selkoe D. J., Younkin S. G.,** *Science* **225** (1992) 728-730.
- [54] **Goldman J. et Côté L.,** *Elsevier Science Publ. Co, New York* (1991) 974-983.
- [55] **Yankner B. A, Duffy L. K., et Kirschner D. A.,** *Science* **250** (1990) 279-282.
- [56] **Flood J. F., Morley J. E. et Roberts E.,** *Proc. Natl. Acad. USA* **88** (1991) 3363-3366.
- [57] **Pike C. J., Burdick D., Walencewicz A. J., Glabe C.J. and Cotman C. W.,** *J. Neurosci.* **13** (1993) 1676-1687.
- [58] **Fraser P. E., Levesque L et McLachlan D. R.,** *Clin. Biochem.* **26** (1993) 330-349.
- [59] **Kowall N. W., Beal M. F., Busciglio J., Duffy L. K., Yankner B. A;** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88** (1991) 7247.
- [60] **Games et al.,** *Nature* **359**, 325-327, 1992
-

- [61] Johnson -Wood K., Lee M., Motter R., Hu K., Gordon M., Tan H., Games D., Lieberburg I., Schenk D., Seubert P., McConlongue L., *The Proc. Nat. Acad. Sci.* **94** (1997) 1550-1555.
- [62] Cohen A S., *N. Engl J. Med.* **277** (1967) 522-530, 574-583, 628-638.
- [63] Glenner G. G., Harada M., Isersky C., Cuatrecasas P., Page D., Keiser H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **41** (1970) 1009-1013.
- [64] Harada M., Isersky C., Cuatrecasas P., Page D., Keiser H. and Glenner G. G., *J. Histochem. Cytochem.* **19** (1971) 1-15.
- [65] Glenner G. G., Harada M., Isersky C., *Prep. Biochem.* **2** (1972) 39-51.
- [66] Pras M. and Gafni J., *London John Wiley* (1978) 509-531.
- [67] Glenner G. G., Terry W. D., Isersky C., *Semin. Hematol.* **10** (1973) 65-86.
- [68] Terry W. D., Page D. L., Kumura S., Isobe T., Osserman E. F., Glenner GL. G., *J. Clin. Invest.* **52** (1973) 1276-1281.
- [69] Glenner G. G., Page D. L., *New York: Academic Press*, **15** (1976) 1-92.
- [70] Romhanyi G., *Virchows Arch. Abt. A. Pathol. Anat.* **354** (1971) 209-222.
- [71] Merz P. A., Wisniewski H. M., Somerville R. A., Bobin S. A., Masters C. L. et Iqbal K., *Acta Neuropathol.* **60** (1983) 113-124.
- [72] Miyakawa T., Watanabe K. and Katsuragi S., *Virchows Arch. [Cell. Patho.]* **52** (1986) 99-106.
- [73] Eanes E. D., Glenner G. G., *J. Histochem. Cytochem.* **16** (1986) 673-677.
- [74] Inouye H., Fraser P. E. et Kirschner., *Biophys. J.* **64** (1993) 502-519.
- [75] Gueft B., *Mt. Sinai. J. Med. Ny.* **39** (1972) 91-102.
- [76] Barrow C. J. et Zagorski M. G., *Science* **253** (1991) 179-182.
- [77] Barrow C. J., Yasuda A., Kenny P. T. M. , et Zagorski M. G., *J. Mol. Biol.* **225** (1992) 1075-1093.
- [78] Zagorski M. G., et Barrow C. J., *Biochemistry* **31** (1992) 5621-5631.
- [79] Halverson K., Fraser P. E, Kirschner D. A. and Lansbury P. T., *Biochemistry* **29** (1990) 2639-2644.
- [80] Kelenyi G., *Acta Neuropathol.* **7** (1967) 336-348.
- [81] Puchtler H., Sweat F. and Levine M., *J. Histochem. Cytochem.* **10** (1962) 355-364.

- [82] **Puchtler H., Sweat F., Kuhns J. G.,** *J Histochem. Cytochem.* **12** (1964) 900-907.
- [83] **Cooper J H.,** *Lab. Invest.* **31** (1974) 232-238.
- [84] **Delellis R.A., Glenner G.G. et Ram J.S.,** *J. Histochem. Cytochem.* **16** (1968) 663-665.
- [85] **William et al.,** *J. Histochem. Cytochem.* **37** (1989) 1273-1281.
- [86] **Burke M. J. and Rougvie M. A.,** *Biochem.* **11** (1972) 2435-2439.
- [87] **Glenner G. G., Eanes E. A., Termine J. T., Bladen H. A. and Linke R. P.,** *J. Histochem. Cytochem.* **21** (1973) 406.
- [88] **Sarkar P. K., Doty P.,** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **55** (1966) 981-989.
- [89] **Elhaddahoui A,** *thèse n°716, Université de Lille II, France* (1992)
- [90] **Cavillon F., Elhaddaoui A., Dauchez M., Turrell S. and Alix A. J. P.,** *Kluwer Academic Publishers,* (1995) 491-492.

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

INTRODUCTION

Le **diagnostic certain** de la maladie d'Alzheimer (MA) est établi sur des **tissus cérébraux colorés** à l'aide de certains colorants «**dits spécifiques**» comme le **rouge Congo (RC)** et la **thioflavine S (TS)** (Voir Figures 2 et 3) [1].

Très peu d'études spectroscopiques ont été menées jusqu'ici sur la caractérisation des tissus cérébraux. Celles menées sur des tissus **non colorés** ont été limitées à la **spectroscopie d'absorption infrarouge (IR)** [2,3], tandis que celles réalisées sur des tissus colorés au RC et à la TS ont été limitées à la fluorescence [4].

Notre but a consisté à trouver d'autres **méthodes spectroscopiques appropriées** à l'étude des **tissus colorés** et des **tissus non colorés**. Ces méthodes basées sur la **détection des protéines amyloïdes**, deviendront ainsi un moyen supplémentaire pour diagnostiquer la MA, mais aussi pour confirmer la présence des dépôts d'amyloïde dans tout tissu qui en contient.

Ce **second chapitre** permettra de décrire les **techniques histologiques, spectroscopiques, et l'instrumentation** que nous avons utilisées pour l'analyse de nos échantillons en précisant les conditions expérimentales choisies. Nous porterons l'attention sur certains avantages et sur certains inconvénients de chacune de ces techniques.

Remarque: Les principes des techniques que nous avons utilisées sont présentés dans les Annexes I et II.

II.1 TECHNIQUES ET MATERIELS BIOLOGIQUES

Pour établir le diagnostic positif de la maladie d'Alzheimer (MA), la structure du tissu à analyser doit être préalablement préservée. Cette étape est très importante car la méthode de préservation utilisée doit sauvegarder au mieux les structures natives du tissu en question.

Dans un premier temps, nous décrirons brièvement la méthode de prélèvement des tissus biologiques humains ayant servi pour notre étude, puis nous détaillerons les deux techniques les plus utilisées dans les laboratoires d'histologie pour la conservation des tissus: **la congélation et l'inclusion en paraffine**. Nous décrirons ensuite, les méthodes de coloration histologique et les réactions histochimiques qui permettent de mettre en évidence la présence des dépôts d'amyloïde dans les tissus malades.

Dans un second temps, nous présenterons les méthodes de dénaturation de certaines **protéines bovines et humaines**. **L'objectif de cette dénaturation** est de pouvoir caractériser ces protéines dans diverses conformations d'une part, et d'autre part de montrer **l'effet des traitements histochimiques sur leur structure secondaire dans le tissu**. Nous donnerons ensuite le protocole expérimental concernant la préparation des échantillons que nous avons utilisés pour nos analyses spectroscopiques.

Enfin, nous ferons un récapitulatif de l'ensemble des échantillons étudiés.

1.1 LES PRELEVEMENTS

A) Les tissus cérébraux

Les tissus cérébraux humains utilisés pour notre étude proviennent des autopsies de plusieurs sujets d'âges variés. Certains sont considérés comme étant des sujets témoins et d'autres atteints de la MA.

Les autopsies ont été réalisées au Service de Neuropathologie au CHRU de Lille. Les échantillons que nous avons reçus mesurent environ 2 à 3 millimètres d'épaisseur et 2 cm de côté. Ils proviennent, pour la plupart, des régions corticales (frontales, occipitales, et temporale, mais aussi de l'hippocampe et de la corne d'amon. Le choix de ces régions

est lié à l'abondance des dépôts d'amyloïde. Les tissus étaient soit congelés à -80°C , soit inclus dans des blocs de paraffine. Notons que les techniques de conservation des tissus étaient réalisées dans le laboratoire du Docteur A. Delacourte (INSERM, U422) et dans le Laboratoire de Neuropathologie du Professeur B. Gosselin (Neuropathologie, CHRU de Lille).

B) Les échantillons de peau

Les échantillons de peau que nous avons utilisés provenaient de différentes régions de l'organisme, en l'occurrence, les doigts, le front, les joues, le genou et le sein. Ces échantillons ne provenaient pas tous des **autopsies**, certains étant prélevés par **biopsies cutanées**. Les échantillons de peau de personnes malades ne provenaient pas de malades Alzheimer, mais de patients atteints d'amyloïdoses systémiques (localisées et diffuses). La plupart des échantillons de peau étaient soit fraîchement prélevés lors d'extemporanées, soit fixés à froid (congelés à -80°C), soit plongés dans des flacons contenant du carson (formol tamponné). D'autres échantillons étaient déjà inclus dans des blocs de paraffine.

Remarque: Les échantillons de peau utilisés dans cette étude sont des dons des Docteurs: M. Bethouart et A. M. Bonin (Cabinet médical d'anatomie et de cytologie pathologiques (CMACP) à Roubaix), F. Galley (CMACP à Villeneuve D'ASCQ), M-M Ruchoux (Neuropathologie, CHRU de Lille) et du Pr Lecomte (Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques à la Faculté de Médecine de Lille).

1.2 L'HISTOTECHNOLOGIE

Le premier problème à résoudre est celui de la **préservation** des structures. En effet, tout tissu vivant qui est prélevé et laissé à lui-même, subit des modifications qui entraînent une altération de sa structure morphologique. On évite cet inconvénient en fixant le tissu dès qu'il est prélevé. Cette manipulation comprend la mort du tissu et l'immobilisation de ses structures et de ses composantes dans un état semblable à l'état vivant. Une fois la préservation du tissu assurée, il faut, pour l'étudier au microscope, en confectionner des coupes minces (~ 5 à $10\ \mu\text{m}$) que la lumière pourra traverser. Le tissu lui-même étant trop malléable pour qu'on puisse en tirer des coupes de l'épaisseur désirée,

on doit donc trouver un moyen d'augmenter la rigidité des pièces. On y arrive grâce à **la congélation** (Voir **chemin A** de la Figure II.1A) ou à la suite de **l'imprégnation du tissu par un matériel solide** et chimiquement inactif **comme la paraffine** (Voir **chemin B** de la Figure II.1B).

A) La congélation

La congélation de l'eau contenue dans le tissu entraîne son durcissement. Les tissus congelés, sont découpés finement à froid en tranches de 8 à 15 μm d'épaisseur à l'aide des microtomes spéciaux appelés **cryotomes** (Figure II.1A).

B) Inclusion en paraffine

Cette technique (Figure II.1B) repose sur le remplacement de l'eau qui est dans le tissu par la paraffine. Or la paraffine et l'eau ne sont pas miscibles, ce qui nous oblige à chercher des liquides intermédiaires entre les deux. Cette opération se fait en plusieurs étapes: **la fixation, la déshydratation, l'imprégnation** et enfin **l'enrobage**.

a) La fixation

La fixation consiste à plonger le tissu prélevé dans certains solvants dits fixateurs pour lui assurer une certaine rigidité tout en amorçant la déshydratation. Le temps de fixation varie en fonction de la taille du prélèvement et du fixateur utilisé.

Les tissus imprégnés de paraffine ayant servi pour notre étude étaient **fixés** soit au **carnoy**, soit au **formol à 10%** ou encore au **carson** (formol tamponné). Les propriétés physiques et le mode d'action de ces fixateurs sur certaines composantes chimiques du tissu biologique (les protéines, les lipides, les acides nucléiques) sont détaillées dans l'Annexe II.1. **Le carnoy** est un fixateur composé de trois solvants dans la proportion (6:3:1): **l'alcool éthylique absolu** (ou l'éthanol absolu), le **chloroforme**, et l'**acide acétique glacial**. L'une des caractéristiques principales du carnoy est sa rapidité à fixer. Le **formol** ou formaldéhyde est le fixateur le plus utilisé dans les laboratoires d'histopathologie où il est utilisé normalement en solution aqueuse à 10 %. Le **carson** est du formol à 10 % tamponné.

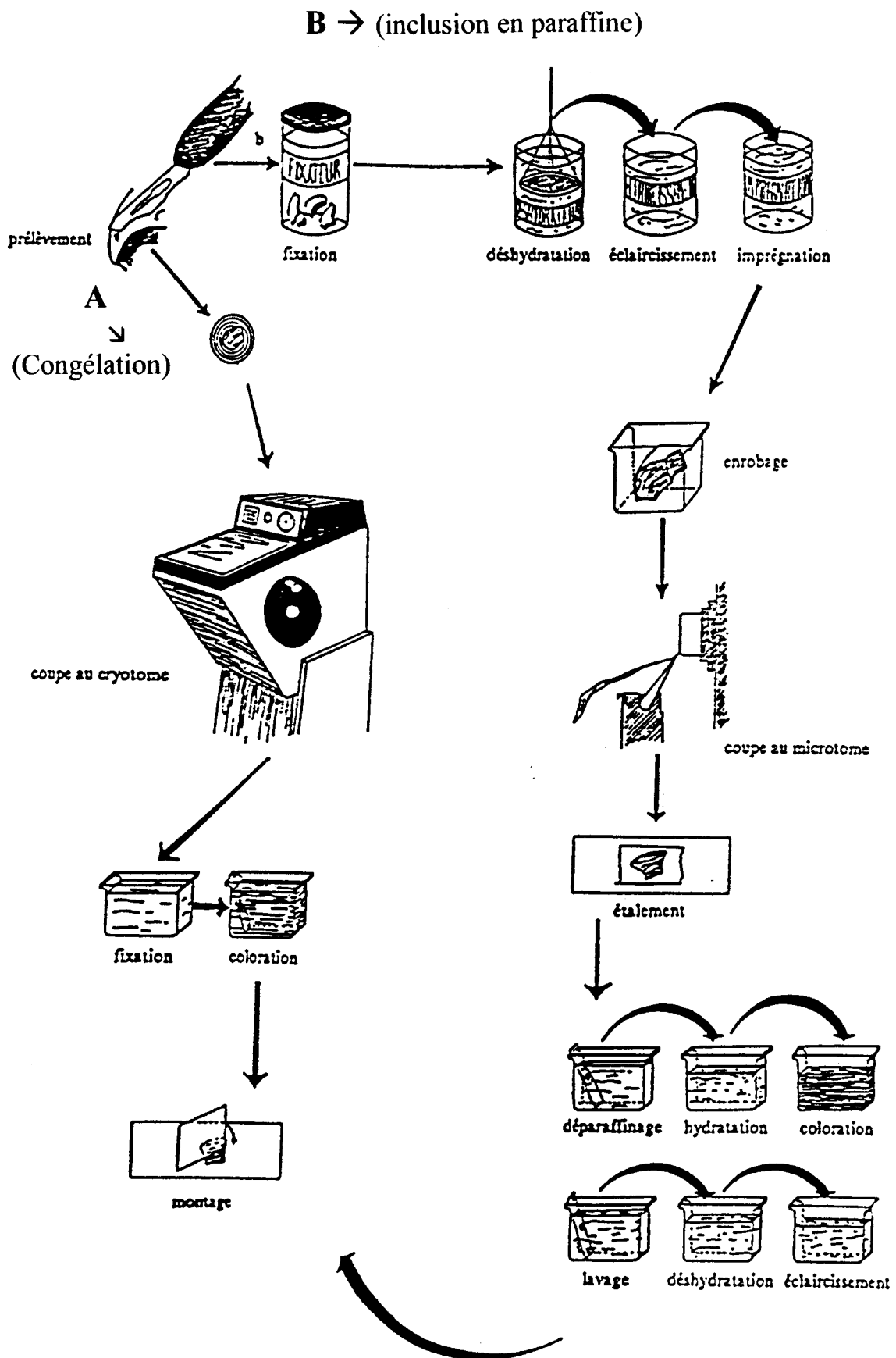


Figure II.1: Schématisation des diverses étapes qui conduisent à la confection de lames:
 A) Technique de la congélation (cryotome);
 B) Technique de l'inclusion en paraffine (microtome).

b) La déshydratation

Le tissu fixé est progressivement déshydraté dans de l'éthanol à 95 % puis dans de l'éthanol absolu. Le reste de l'alcool absorbé par le tissu est retiré par le toluène. L'excès du toluène est ensuite dissout dans la paraffine. Deux ou trois bains de solvants sont nécessaires pour chaque étape. Le temps de passage dans chaque bain de solvant est d'environ 1 heure. Le tissu imprégné est enfin inclus dans un bloc de paraffine au cours de l'enrobage. Une fois dans le bloc, le tissu froid est prêt à être tranché à l'épaisseur désirée au moyen d'un **microtome**.

1.3 PREPARATION DES ECHANTILLONS

Pour nos recherches, nous avons confectionné des coupes de tissu de 5 à 20 micromètres (μm). Pour les analyses par spectrométrie d'absorption infrarouge (supports transparents dans le moyen infrarouge et dans le visible), les tissus sont étalées sur des fenêtres de CaF_2 , soit sous forme de coupes tissulaires congelées ou imprégnées de paraffine, soit sous forme de film (quelques microgrammes de tissu frais sont étalés sur les fenêtres IR) Pour les études par spectrométries micro-Raman et UV-visible, les coupes imprégnées de paraffine sont déposées sur des lames de verre contenant quelques gouttes d'eau chaude. L'excès d'eau est ensuite retiré sous un flux d'air chaud, et les lames sont conservées jusqu'au moment de l'analyse.

A) Déparaffinage et hydratation

Avant les analyses spectroscopiques et histochimiques, les tissus imprégnés de paraffine sont déparaffinés, puis réhydratés. Les lames et les fenêtres infrarouges sont déposées sur un support. Pour éliminer la paraffine, les coupes sont ensuite recouvertes de quelques microlitres de toluène à l'aide d'une pipette Pasteur. Après 10 minutes, l'excès de toluène adsorbé par le tissu est dissout dans l'éthanol absolu. Les tissus sont hydratés progressivement dans de l'éthanol à 95 %, puis à 50 %, et enfin rincés à l'eau distillée. Le temps de passage dans chaque solvant est de 5 à 10 minutes. Chacune de ces étapes est répétée 2 à 3 fois pour éliminer toute trace de solvant.

B) Colorations histologiques

Le **rouge Congo (RC)** utilisé ici est un produit Sigma qui se présente sous forme de poudre rouge brique. Sa masse molaire est de 696,67 grammes/mole et sa pureté est de

98%. Il est soluble dans l'eau à raison de 7 grammes/litre. La concentration du RC utilisée pour la coloration était de 10^{-3} M, mais, la concentration retenue par les tissus était difficile à évaluer après plusieurs rinçages. Les lames et les fenêtres IR contenant les coupes de tissu déparaffinées ont été déposées sur un support, puis recouvertes de deux à trois gouttes de RC. Après 15 minutes, l'excès du colorant est rincé à l'eau distillée.

1.4 METHODES DE DETECTION DES PROTEINES AMYLOIDES

A) Méthodes histopathologiques

Pour les tests histopathologiques, les coupes de tissu de 5 μ m d'épaisseur déposées sur lames de verre, sont déparaffinées, hydratées, puis colorées. Après 15 minutes, l'excès du colorant est éliminé par l'alcool éthylique à 50 %. Les préparations sont ensuite montées au glycérol à 50 %. La visualisation des lésions dans les tissus colorés est possible grâce à un microscope optique muni d'accessoires et de pièces optiques adaptés à ce genre d'études. Notamment, une platine porte échantillon mobile, une paire de polariseurs croisés pour les tissus colorés au RC, et une lampe ultraviolette pour les tissus colorés à la TS.

B) Méthodes spectroscopiques

Pour **les études spectroscopiques**, les préparations ne sont pas montées au glycérol. Ce dernier est fluorescent et possède des spectres de vibration qui présentent des bandes qui interfèrent avec celles du tissu. De ce fait, les préparations sont soit **montées à l'eau** (micro-Raman et UV-visible), soit séchées et analysées directement (IR et FT-Raman).

Remarques: Une partie des préparations (Coupes de Congélation et Inclusion en paraffine) a été réalisée au Cabinet Médical d'anatomie et de cytologie pathologiques des Dr M. Bethouart et A. M. Bonin à Roubaix.

Pour le diagnostic histopathologique, nous avons toujours utilisé à la fois les colorations au rouge Congo (RC) et à la thioflavine S (TS). En revanche, pour les études spectroscopiques, nous avons étudié uniquement les tissus colorés au RC.

1.5 METHODES DE DENATURATION

La dénaturation d'une protéine est un phénomène habituellement réversible qui a pour effet de briser les liens hydrogène. L'arrangement spatial des chaînes protéiques se trouve modifié: les protéines fibreuses ont tendance à se replier quelque peu, alors que les globulaires, ont plutôt tendance à se déplier. La dénaturation d'une protéine a des effets sur ses activités biologiques et brise les liens hydrogène qui la lient à des molécules d'eau, ce qui entraîne une diminution de sa solubilité. En effet, les groupes réactifs libérés par la dénaturation sont fort susceptible de provoquer des associations chimiques entre des chaînes protéiques qui n'avaient auparavant aucune relation les unes avec les autres.

A) Le tissu

Le tissu cérébral analysé par **spectrométrie infrarouge** est déposé sur des fenêtres IR, soit sous forme de film mince (échantillons cérébraux), soit sous forme de coupes d'environ 15 μm (tout tissu). L'usage des films minces s'avère une méthode excellente pour l'étude des échantillons cérébraux. Pour obtenir un film, quelques microgrammes du tissu cérébral frais (décongelé) sont étalés uniformément sur la surface d'une fenêtre IR, puis séchés à l'air libre ou sous un flux d'air chaud. Pour les études par spectrométrie **Raman à transformée de Fourier (FT-Raman)**, quelques microgrammes du tissu sont déposés dans des cellules métalliques séchées (pas toujours) puis analysées. Les conformations des protéines restent conservées après séchage, et les spectres sont reproductibles.

Pour l'étude **de l'effet des solvants de fixation sur la structure du tissu**, ces derniers sont recouverts par quelques microlitres de solvants (le carnoy, l'acide acétique glacial, l'éthanol absolu ou le formol). Le temps d'incubation variait de 5 minutes à 72 heures. Les sections tissulaires sont lavées à l'eau, ensuite séchées systématiquement avant chaque mesure spectroscopique pour l'analyse par spectrométrie IR. A l'inverse, pour les spectres FT-Raman, les échantillons n'étaient pas déshydratés systématiquement. La dénaturation est suivie **spectroscopiquement** par l'analyse de **la bande amide I**.

B) Les peptides et les protéines

a) La poly-L-lysine

La méthode de Sarkar et Doty [5] permet d'obtenir la structure fibrillaire β de la poly-L-lysine à partir de sa forme α . Ce peptide est commercialisé dans différents poids moléculaires (PM). Nous avons étudié les peptides de poids moléculaires suivants: 3600, 5000, 20 000, 50 000 et 133 000.

Avec la méthode de Sarkar et Doty [5], le pH d'une solution de 4 milligrammes/millilitres de la poly-L-lysine (Figure II.2a) (Sigma) est ajustée à pH 11 avec du NaOH 1 M. Cette solution est ensuite chauffée dans un tube en verre scellé à 50 °C pendant 10 minutes, donnant un gel très fin, qui est par la suite refroidi à température ambiante. Un chauffage à température supérieure ou durant un temps plus long conduit à une agrégation. Le changement de conformation est suivie spectroscopiquement par analyse de la bande amide I. Le degré de dénaturation augmente avec le PM.

b) La polyglycine et la poly-L-sérine

La polyglycine (de PM 7000) et la poly-L-sérine (de PM 9900) sont des produits (Sigma) qui sont commercialisés sous forme de poudres blanches totalement insolubles. Leurs structures natives sont en feuillets β -plissés. Ces polypeptides ont été analysés sous forme de poudre. Leurs formules chimiques sont représentées sur la Figure II.2(b et b').

c) L'insuline

La structure primaire de l'insuline pancréatique bovine est représentée sur la Figure II.2c. La forme native (Sigma) de cette protéine, se présente sous forme de poudre blanche. Elle possède une structure tertiaire globulaire, majoritaire en hélice α . Pour la dénaturer, nous avons utilisé deux méthodes: celle de Burke et Rougvie [6] et celle à l'acide acétique. Le choix de ce dernier repose sur son utilisation dans certains fixateurs (exemple le carnoy) qui sont utilisés dans des laboratoires d'histopathologie pour la fixation des tissus. Notre but est de vérifier son effet sur la structure secondaire des protéines.

*/ Suivant la méthode **de Burke et Rougvie** [6], en partant d'une solution d'insuline bovine native à 5 grammes/litres, il est nécessaire d'ajuster la solution à pH 2 par ajout d'HCl 1N. On fait ensuite chauffer cette solution préalablement placée dans un tube en verre de diamètre faible (pipette Pasteur scellée par exemple) dans un bain-marie à 80 à

100°C pendant quelques minutes. Puis on refroidit l'échantillon brusquement en le plaçant dans de la glace. On recommence cette opération jusqu'à ce qu'un trouble apparaisse indiquant que la protéine s'est transformée en structure β . Le pH est ensuite ajusté à 7 à l'aide d'une solution de NaOH 1N.

*/ La méthode de dénaturation à l'acide acétique consiste à solubiliser quelques milligrammes d'insuline dans quelques millilitres d'acide acétique glacial (~ 4mg/ml). La dénaturation $\alpha \rightarrow \beta$ est quasi instantanée. Les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus par la méthode de Burke et Rougvie. Cependant, cette dernière est préférable pour les études des interactions car le solvant utilisé (l'eau) est moins agressif pour les protéines que l'acide acétique.

d) La fibroïne de soie

La fibroïne de ver à soie nous a été fournie par l'Institut Scientifique de Sericiculture de Tsukuba au Japon. La soie liquide est directement prélevée dans la partie postérieure de la glande séricigène de la larve du ver à soie (*Bombyx Mori* et *Antherea Pernyi*). Cette soie liquide est alors diluée dans l'eau à une concentration d'environ 0,3 %. En laissant sécher cette solution aqueuse sur un film de polyéthylène à 20°C et à 65 % d'humidité relative, on obtient un film d'une dizaine de micromètres d'épaisseur (les échantillons que nous avons reçus ont été préparés de cette façon [7]). La structure chimique de la Fibroïne de soie est représentée sur la Figure II.2d.

La méthode à employer pour la dénaturation de la fibroïne de ver à soie dépend de l'espèce étudiée et de la nature des acides aminés. Ces protéines ont un poids moléculaire élevé, dont la composition en acides aminés se caractérise par une grande quantité d'alanine, glycine et sérine [8]. La présence en grande quantité d'alanine permet à la fibroïne de soie de prendre une conformation moléculaire en hélice α . Pour nos études, un film de fibroïne de ver à soie du *Bombyx Mori* (BM) (un ver domestique) était dissout dans une solution tampon de phosphate 0,01M afin de maintenir un pH stable de valeur 7. La conversion de la structure $\alpha \rightarrow \beta$ était instantanée. Les fibres de soie d'origine *Antherea Pernyi* (AP) de structure native en feuillets β -plissés ont été directement analysées sous forme de film.

e) L'élastine

L'élastine se présente sous forme de grains jaunes très compacts, insolubles et difficilement broyables. Cette protéine d'origine bovine est extraite des ligaments de la nuque. La forme native de l'élastine est **désordonnée** [9], et sa dénaturation est très difficile, mais après de nombreuses tentatives, nous avons réussi à en dénaturer une partie. Pour cela, quelques milligrammes d'élastine sont dissout dans 1 millilitre d'acide acétique. La solution obtenue est sous forme de gel trouble, et le surnageant récupéré au bout de 24 heures est rincé à l'eau, séché puis analysé.

f) Le collagène

Les fibres de collagène ne sont pas très solubles. Le collagène d'origine bovine que nous avons étudié est extrait des tendons d'Achille. Il est de type I et se présente sous forme de fibres de coton de couleur blanche. D'après la littérature, les fibres de collagène sont de structure en triple hélice α [10]. Quelques milligrammes de fibres de collagène sont recouverts par 1 millilitre d'eau. On obtient un gel. Le surnageant est récupéré au bout de 48 heures et ensuite séché sur une fenêtre IR. Le film de collagène que nous avons obtenu était très riche en lipides. Ces derniers sont éliminés après rinçage à l'éthanol. Pour la dénaturation, le film rincé est ensuite recouvert avec une goutte d'acide acétique pendant 5 minutes. Après l'évaporation de l'acide, le dépôt est rincé très délicatement à l'eau distillé. La forme dénaturée que l'on obtient est un mélange de structures α et β .

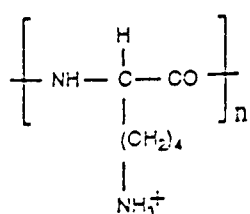
g) Les peptides amyloïdes de synthèse: le $\beta(16-28)$ et le $\beta(1-28)$

Ce sont des fragments du peptide A β (1-42)43 (Sigma) (Voir Figure I.3), où les résidus chargés y sont indiqués. Leurs structures primaires sont les suivantes:

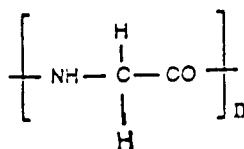
$\beta(16-28)$ $\text{NH}_2\text{-K}^+\text{-L-V-F-F-A-E}^-\text{-D}^-\text{-V-G-S-N-K}^+\text{-COOH}$

$\beta(1-28)$ $\text{NH}_2\text{-D}^-\text{-A-E}^-\text{-F-R}^+\text{-H}^+\text{-D}^-\text{-S-G-Y-E}^-\text{-V-H}^+\text{-H}^+\text{-Q-K}^+\text{-L-V-F-F-A-E}^-\text{-D}^-\text{-C-G-S-N-K}^+\text{-COOH}$

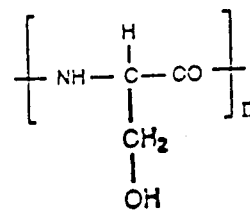
Remarque: Les méthodes d'extraction des fibres de collagènes et d'élastine sont très agressives et utilisent des solvants dénaturants, ceci pourrait affecter les structures natives de ces protéines.



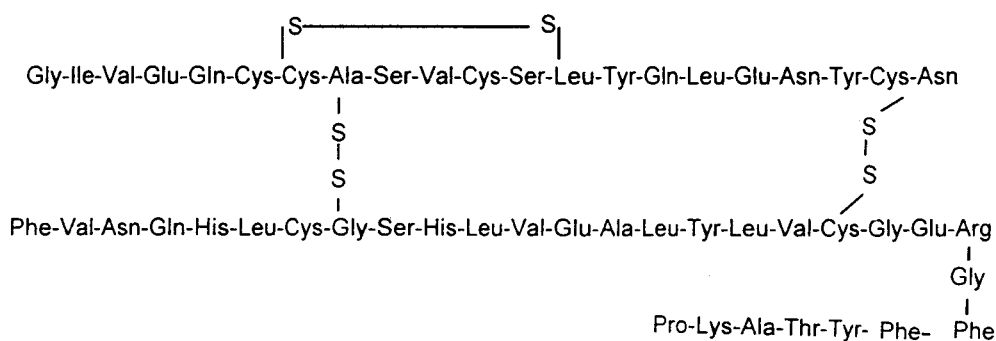
a) Poly-L-lysine



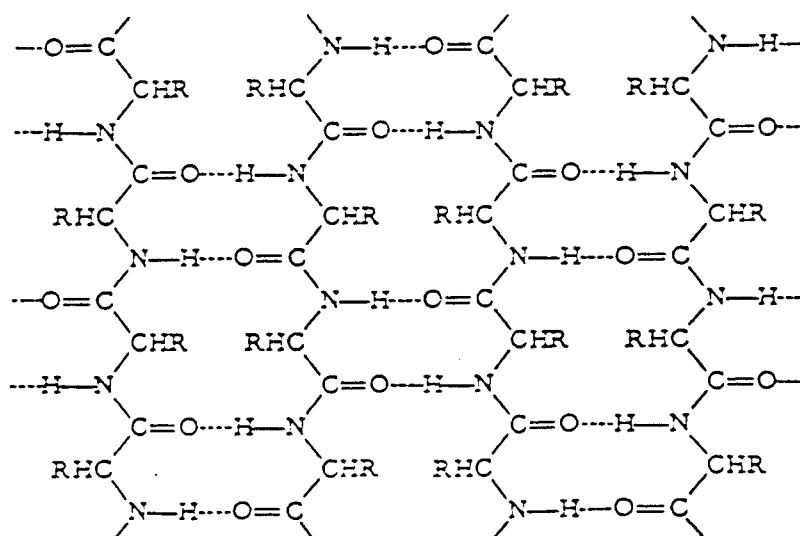
b) Polyglycine



b') Poly-L-sérine



c) insuline bovine



d) Fibroïne de soie

Figure II.2: Structures chimiques de: a) la poly-L-lysine, b) la polyglycine, b') la poly-L-sérine et c) l'insuline et d) la fibroïne de soie. La liste des acides aminés et leurs abréviations sont représentés sur la Figure II.3.

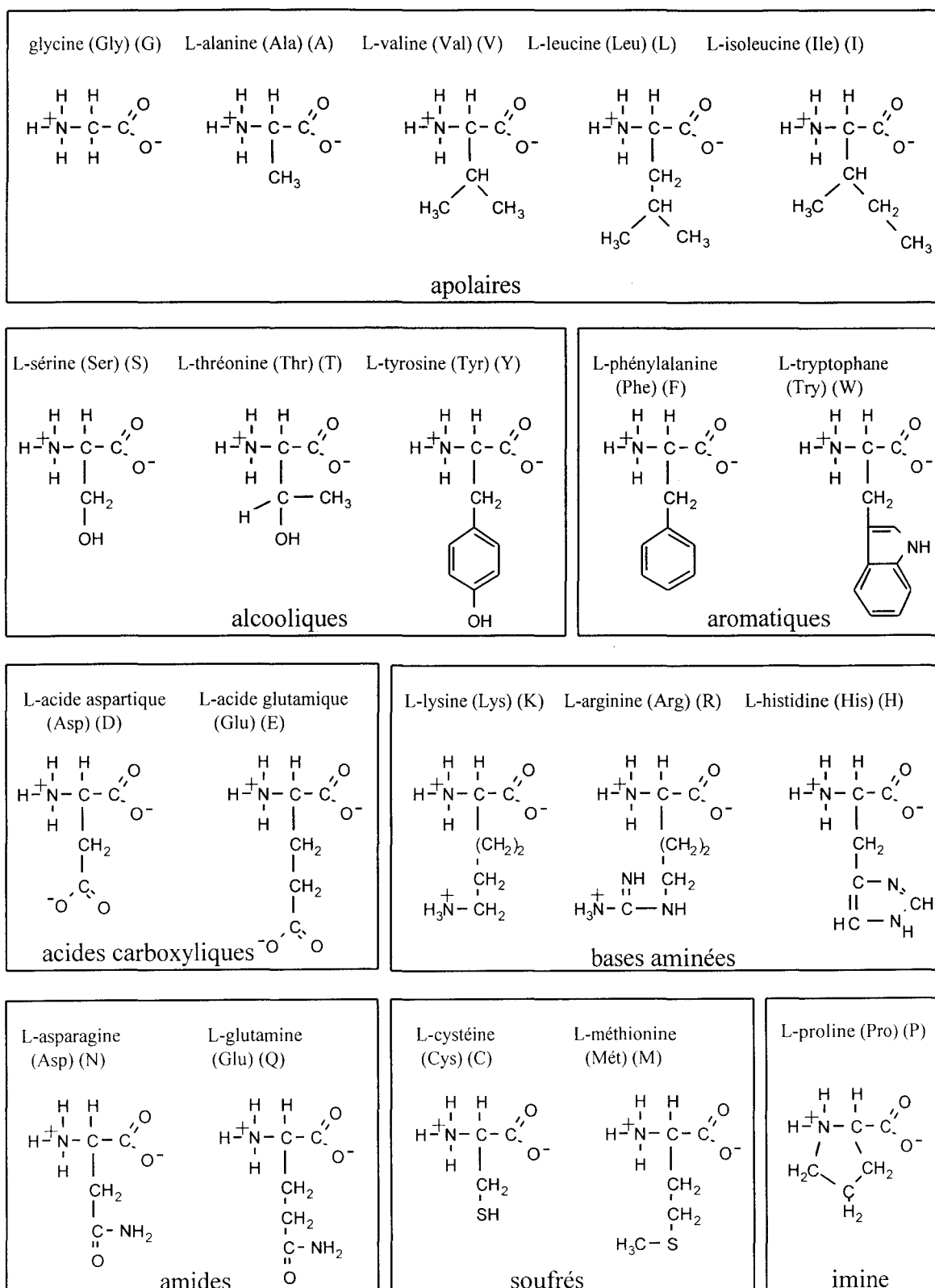


Figure II.3: Structure de 20 acides aminés, leurs abréviations ainsi que leurs codes à une lettre.

1.6 ETUDES D'INTERACTIONS

A) *In vitro* (avec les protéines modèles)

Pour les spectres UV-visible, le rouge Congo (Aldrich) est solubilisé dans l'eau distillée ou dans du tampon phosphate 5 mM à une concentration de 10^{-5} M, puis filtré plusieurs fois sur coton de verre. Les protéines et les polypeptides étudiés sont ensuite mélangés au RC dans la proportion de 1/100 en masse (1 mg du RC pour 100 mg de protéine). A cette concentration, nous estimons que tout le colorant est lié. Le temps de réaction nécessaire avant l'analyse varie selon le type des protéines de 5 à 30 minutes (~ 20 minutes en moyenne).

Pour les spectres d'absorption infrarouge à transformé de Fourier (FT-IR), nous avons commencé par la conversion des protéines sous leurs configuration β (quand c'est possible). Ensuite, nous avons recherché les concentrations adéquates qui donneront des spectres d'absorption IR dans les normes d'exploitation pour chaque échantillon (ni de trop faibles intensités, ni saturés). Pour faire les mesures, deux gouttes du colorant ou du substrat sont évaporées sur des fenêtres de KRS_5 ou de CaF_2 . Cependant lors de la préparation des mélanges, deux gouttes du colorant sont additionnées à deux gouttes du substrat. On agite le mélange puis on le laisse incuber pendant environ 15 minutes. Après les mesures, les échantillons peuvent être récupérés et réutilisés pour d'autres études. La concentration du RC était de 10^{-2} M et la concentration des peptides était d'environ 4 mg/ml.

Pour les spectres Raman, les protéines et les peptides amyloïdes étaient mélangées dans une solution aqueuse de RC dans la proportion de 1/50 en masse (1 mg du colorant pour 50 mg de protéine), puis séchées avant les mesures spectrales.

B) *In situ* (dans les tissus biologiques)

Pour les spectres d'absorption UV-visible et de diffusion Raman, des sections cérébrales de l'échantillon à étudier (10 à 15 micromètres d'épaisseur) sont déposées sur des lames de verre, puis déparaffinées et colorées avec une solution concentrée de RC. L'excès du colorant est éliminé après plusieurs rinçages à l'eau distillé. La concentration de RC ainsi retenue par le tissu est difficile à évaluer. Mais, les spectres d'absorption UV-visible obtenus ont une absorbance inférieure à 1.

Pour les spectres d'absorption infrarouge, les études d'interaction du RC avec les protéines amyloïdes présentes dans le tissu des malades ont été entreprises en faisant des mesures directes sur des sections cérébrales placées sur des fenêtres de CaF₂. Dans le cas des tissus fixés au formol à 10 %, les spectres enregistrés ne font pas apparaître les bandes caractéristiques du RC car le tissu ne retient pas bien colorant, d'où la difficulté d'analyse de fixation du colorant par cette méthode. Pour y remédier, nous avons été amené à prolonger le temps de fixation de 20 à 30 minutes. En revanche, les tissus fixés au carnoy offrent une meilleure coloration au RC, et les spectres IR montrent un signal du colorant correct à partir d'un temps de coloration compris entre 5 et 10 minutes.

Des essais d'analyses par microspectrométrie d'absorption infrarouge des coupes minces de cerveau, colorées délicatement et déposées sur des fenêtres de CaF₂ étaient réalisés dans le but d'une étude directe des lésions cérébrales (plaques séniles et angiopathies amyloïdes) (Voir Figures 2 et 3), qui seraient riches soit en colorant, soit en substance amyloïde. Mais, les préparations n'étant pas montées au glycérol, la détection des lésions cérébrales était très difficile.

Remarques: Pour les protéines très peu solubles (l'élastine, le collagène, la poly-L-sérine et la polyglycine), les interactions *in vitro* n'ont pas pu être réalisées à cause de leurs faibles concentration en solution.

Nous avons aussi essayé d'effectuer les interactions des protéines amyloïdes avec **la tacrine (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine)**, mais les résultats étaient négatifs.

1.7 RECAPITULATIF DES PRODUITS ETUDIES

Les échantillons de protéines commerciales et de tissus humains que nous avons étudiés sont répertoriés dans les Tableaux suivants:

A) Les protéines commerciales étudiées (Tableau II.1)

STRUCTURES	SECONDAIRES DES	PROTEINES
hélice α	feuillet β	désordonnée
Poly-L-lysine Insuline Fibroïne de Soie BM Collagène Albumine	Poly-L-sérine Polyglycine Fibroïne de Soie AP A β (1-28) et A β (16-28)	Elastine

B) Les tissus humains (Tableau II.2)

Sujets témoins	Origine des prélèvement	Sujets malades
Sujet alcoolique jeune Sujets âgés Foetus	Cerveau	Alzheimer Parkinsoniens Vasculaires
Sujets jeunes (10-40 ans)	Peau doigts genou pommette sein	avec amyloïdose diffuse localisée (épiderme) localisée (derme)

II.2 METHODES D'ANALYSES SPECTROSCOPIQUES

La **caractérisation** structurale des tissus est un outil important pour l'évaluation des **conditions pathologiques**. De plus, la bio-compatibilité entre le rouge Congo (RC) et les protéines amyloïdes peut être reliée à des interactions moléculaires. Pour caractériser les tissus malades et étudier de telles interactions, il faut des techniques non-destructives et non-invasives, applicables à des structures et à des états physiques divers.

Les techniques spectroscopiques sont particulièrement adaptées à ce type de problème car elles permettent souvent un examen à la fois **non-destructif** et **sensible**. Ainsi, dans la littérature, on trouve que toutes les techniques spectroscopiques ont été essayées: vibrationnelles (IR et Raman), électronique (UV-visible), de fluorescence et la résonance magnétique nucléaire (RMN). De nombreuses adaptations de ces techniques ont aussi été employées, et malgré la difficulté de ce genre d'études, de nombreuses équipes ont développé des méthodes de travail spécifiques à certains domaines médicaux, notamment, en ophtalmologie, en cancérologie, en dermatologie, etc.

Compte tenu de la complexité et parfois de la nouveauté de certaines de ces méthodes, il nous a semblé important de mettre l'accent sur **les techniques spectroscopiques** que nous avons utilisées: **l'UV-visible, le macro- et micro-FT-IR, le FT-Raman, le micro-Raman et l'imagerie Raman (ou cartographie Raman)** (un rappel sur le principe de chacune de ces techniques est présenté dans l'Annexe II). Ces méthodes ont été largement utilisées pour la caractérisation de **la structure des protéines**, des lipides, des acides nucléiques et du tissu en général (ce qui permet d'aider aux attributions des bandes présentes dans les spectres de vibration de nos échantillons).

Remarques: Les spectres d'absorption électronique UV-visible ont été réalisés au LASIR dans l'équipe du Pr J. P. Merlin et du Dr C. Bremard.

Tous les spectres FT-Raman et micro-infrarouge ont été réalisés au LASIR par le Dr B. Sombret, dans l'équipe du Pr P. Legrand sous la direction du Pr J. Pr. Huvenne.

Les spectres micro-Raman et Imagerie Raman ont été réalisés au LASIR sous la direction du Dr J. Laureyns.

Les spectres micro-Raman à excitation dans le proche infrarouge (1,064 μm) ont été réalisés par le Dr J. Barbillat chez la Société DILOR à Lille sous la Direction du Dr E. Da Silva

Les spectres micro-Raman à excitation dans le proche infrarouge (815 nm) ont été réalisés par le Dr G. J. Puppels à Rotterdam (Institute Erasmus University Rotterdam, Laboratory for intensive Care Research & Optical Spectroscopy, Department of General Surgery).

2.1 SPECTROMETRIE ELECTRONIQUE UV-VISIBLE

L'absorption dans les régions **ultraviolette** et **visible** n'est observée que si certains **chromophores** se trouvent dans la molécule à étudier. D'une manière générale les **chromophores** sont des groupements dotés d'**électrons polarisables**. D'autres groupes, **non nécessairement chromophores** par eux-mêmes, peuvent **influencer** par leur présence sur la **position** et la **valeur du maximum d'absorption**. On les nomme **auxochromes**. Ceux qui déplacent le **maximum de la bande d'absorption** vers le **rouge** sont **bathochromes**, alors que ceux qui le déplacent **vers l'U.V. lointain** sont **hypsochromes**. En revanche, ceux qui **exaltent l'intensité** sont **hyperchromes**, alors que ceux qui **l'abaissent** sont **hypochromes**.

Les spectres UV-visible peuvent être obtenus soit à l'état solide (produit dispersé dans une matrice), soit en solution. Pour que ces spectres soient acceptables, il faut que la concentration maximale du produit à analyser permette d'obtenir une densité optique inférieure ou égale à 1 sur la zone spectrale sélectionnée, de manière à rester dans le domaine de linéarité de la loi de Beer-Lambert.

Comme la **molécule RC** possède des **chromophores** avec des **électrons π polarisables**, la spectrométrie **UV-visible** est très adaptée à la fois, à l'étude de sa **structure dans différents solvants**, et en **interaction avec les protéines *in vitro* et *in situ***.

2.2 SPECTROMETRIES VIBRATIONNELLES

A) Spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) [11]

a) La macrospéctrométrie FT-IR

La spectrométrie d'absorption infrarouge est une technique analytique fiable et facile à utiliser. Les progrès récents obtenus en instrumentation infrarouge, notamment par l'apport de la transformée de Fourier (TF) au début des années 80, ont fait de cette spectrométrie un outil de haute technologie par les gains qu'elle procure en précision et en temps d'analyse. Un des avantages des systèmes à transformée de Fourier est de pouvoir accumuler de nombreux interferogrammes très rapidement, puis de les moyennner afin d'améliorer le rapport signal/bruit (S/B).

Par rapport à un système dispersif, la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) présente plusieurs avantages [12]. Le plus important est appelé avantage de Fellgett ou encore avantage du multiplex. Il permet d'acquérir un spectre plus rapidement et d'améliorer le rapport signal/bruit (S/B) pour une résolution donnée. Par exemple, la région $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ comporte 3600 éléments spectraux pour une résolution de 1 cm^{-1} . L'interféromètre peut donc acquérir le spectre 1/3600 fois moins de temps qu'un spectromètre dispersif ou, à temps de mesure constant, il permet d'améliorer d'un facteur 60 sur le rapport signal sur Bruit (S/B).

L'avantage de Jacquinot est une mesure de la quantité d'énergie qui peut atteindre le détecteur. Le gain en luminosité par rapport à un système dispersif est plus important. Un autre avantage de l'infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) réside dans le fait que la limite de résolution du spectromètre reste constante sur le domaine spectral. Enfin, l'avantage de Connes énonce que, grâce à l'utilisation du Laser He-Ne, la calibration en fréquence est plus précise et plus stable à long terme que dans le cas d'un instrument dispersif.

b) La microspectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) [13]

Cette technique est un couplage de la microscopie optique et de la spectrométrie infrarouge. En effet le premier microscope infrarouge dispersif a été commercialisé en 1953. A cette époque, le développement de la microscopie infrarouge était limité par sa très faible sensibilité et des temps d'acquisition très long. Au début des années 80, un regain d'intérêt pour cette technique se produit. Les raisons sont: les avantages énergétiques de la spectrométrie FT-IR (Fellgett et Jacquinot) permettent de faire le couplage avec le microscope en conservant un meilleur rapport signal sur bruit.

De nombreux phénomènes physiques influencent la qualité des spectres obtenus par microspectrométrie FT-IR. Parmi eux, on trouve les aberrations sphériques et chromatiques (qui sont des effets inhérents à tous les systèmes optiques contenant des associations de miroirs) et l'effet de diffraction. La diffraction affecte la résolution spatiale et cause souvent un brouillage de l'information image. Il n'est pas possible d'éliminer ce phénomène, mais on peut en minimiser les effets par des modifications judicieuses de l'agencement des optiques du microscope.

L'échantillonnage en microspectrométrie TF-IR est souvent une tâche difficile car dans la plupart des cas, la taille des échantillons à analyser ne convient pas et la détection des lésions cérébrales sur les tissus déshydratés est pratiquement impossible. Dans le cas d'une étude en transmittance, l'épaisseur des échantillons doit être choisie de façon à ce que la quantité d'énergie atteignant le détecteur soit suffisante. Dans ce cas, les spectres enregistrés ont un bon rapport signal/bruit et ne présentent pas de saturation sur les bandes les plus importantes. Cependant, la difficulté principale rencontrée résidera dans l'interprétation des spectres. En effet, de nombreuses vibrations parasites sont susceptibles d'être dues à des phénomènes de réflexions spéculaire ou diffuse.

B) Spectrométrie de diffusion Raman [14]

Depuis la date de sa découverte en 1928 par le scientifique Indien **C.V. Raman** et jusqu'à encore une vingtaine d'années, la spectrométrie Raman a été essentiellement utilisée pour l'analyse moléculaire d'échantillons de taille macroscopique. Cette technique est basée sur l'analyse spectrale de la lumière diffusée par un échantillon lorsque celui-ci est éclairé par une source de lumière monochromatique. Elle permet d'obtenir directement des informations sur la nature chimique des espèces polyatomiques présentes en tant que composés spécifiques dans l'échantillon analysé.

Les spectres Raman donnent des informations détaillées sur les vibrations des atomes à l'intérieur des molécules. Les vibrations qui donnent lieu à des pics en Raman peuvent produire des «pics» (des maxima d'absorption) en infrarouge. La plupart des informations obtenues par spectrométrie infrarouge peuvent être transférées à la spectrométrie Raman et vice et versa. Ce sont en fait les principes physiques qui régissent ces deux techniques qui diffèrent.

a) Comparaison des spectrométries infrarouge et Raman

Le Raman est un phénomène de diffusion alors que, au contraire, les bandes d'un spectre IR correspondent aux énergies des photons infrarouges que la molécule a absorbée (Voir Annexe II).

La complémentarité de l'infrarouge et du Raman provient des règles de sélection qui montrent que pour une molécule présentant un centre de symétrie, les transitions

vibrationnelles qui sont permises en infrarouge (IR) sont interdites en Raman et inversement. Pour les systèmes ayant une symétrie faible, tous les modes doivent être actifs en Raman et en IR. La diffusion Raman dépend du changement de polarisabilité d'une liaison alors que l'absorption infrarouge caractérisera une variation du moment dipolaire permettant cette liaison. Ainsi, on convient en général, que l'on observera un pic d'intensité forte en Raman pour une liaison symétrique et/ou polarisable, et une bande d'intensité IR pour une liaison asymétrique et / ou polarisée. De manière générale, les informations vibrationnelles obtenues par ces deux techniques sont de même nature mais, on remarque cependant des différences entre les spectres suivant la géométrie des liaisons de la molécule étudiée. Une autre différence majeure entre ces deux techniques réside dans le fait qu'il n'existe aucun phénomène équivalent en IR du phénomène de Raman de résonance (RR).

b) Raman de résonance (RR)

Ce phénomène intervient lorsque la longueur d'onde du laser excitateur, qui permet d'obtenir le spectre Raman, correspond à une longueur d'onde de forte absorption d'un chromophore. Dans de tels conditions, on observe une augmentation considérable, d'un facteur 10^3 à 10^5 , de l'intensité Raman de certaines bandes exaltées. En pratique, des spectres RR peuvent être obtenus pour des composés dont la concentration est de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-6} M en solution aqueuse. L'augmentation d'intensité associé au phénomène de résonance permet d'envisager l'obtention du spectre vibrationnel d'un chromophore particulier lorsque celui-ci fait partie d'une molécule complexe ou d'un mélange complexe d'autres molécules.

c) Avantages et inconvénients de la spectrométrie Raman par rapport à l'IR

* Quelques avantages de la spectrométrie Raman

On peut obtenir des spectres Raman de molécules en solution aqueuses ou dans l'alcool car la liaison O-H donne lieu à des bandes de faible intensité en Raman et de forte intensité en infrarouge.

De faibles quantités de produit à analyser sont requises puisque le volume actif de diffusion Raman est gouverné par la taille du faisceau laser. Les liaisons homoplanaires telles que **C-C**, **S-S** et **O-O** donneront des **bandes Raman intenses à modérées** alors que **l'infrarouge** ne donnera que des **bandes faibles** ou **inexistantes**. A l'inverse, des liaisons

telles que C=O, C-N, N-H donneront des **bandes IR intenses à modérées** alors que le **Raman** ne donnera que des **bandes faibles ou inexistantes**.

Par conséquent, les spectrométries infrarouge et Raman donnent des informations complémentaires.

* Quelques inconvénients de la spectrométrie Raman

Le flux intense des photons du laser peut provoquer des phénomènes photochimiques inattendus ou parasites. La diffusion Raman est très souvent en compétition avec le phénomène de fluorescence apparaissant comme un signal très intense et rendant très difficile l'observation des spectres Raman. Ce phénomène peut être provoqué par les composés eux mêmes (fluorescence intrinsèque: par exemples le RC ou le sang dans les tissus) ou par certaines impuretés organiques apportées généralement par les solvants (fluorescence extrinsèque). Dans ce cas, un traitement de purification du solvant (filtration sur charbon actif, distillation) est nécessaire. Ce dernier point peut être résolu par l'utilisation d'une radiation excitatrice de grande longueur d'onde (**proche infrarouge en général**).

d) Le FT-Raman

Depuis quelques années, la technique du Raman à transformée de Fourier (FT-Raman) est désormais commercialisée par de nombreux fabricants de spectromètres. L'excitation est produite par un laser Nd-YAG irradiant à 1,064 μm , à cette longueur d'onde la fluorescence est évitée dans la majorité des cas. La calibration est toujours assurée par un laser He-Ne. Parmi les nombreuses qualités de la spectrométrie FT-Raman, on note: la possibilité d'analyser une grande quantité de produit, la minimisation des problèmes liés à la fluorescence et à la dégradation des échantillons sous le faisceau laser, et surtout une grande précision sur la position des nombres d'onde (cm^{-1}), ce qui permet d'interpréter même de faibles déplacements.

e) Microspectrométrie Raman

Grâce aux progrès réalisés dans les domaines des sources **laser**, la **microspectrométrie Raman** est apparue dans les années 1974. Cette dernière est maintenant devenue une technique de microanalyse moléculaire applicable en routine à la résolution de problèmes liés aussi bien à la recherche fondamentale qu'au contrôle des

matériaux industriels. De plus, grâce à l'arrivée de détecteurs bidimensionnels très performants tels que les CCD (Charges Coupled Devices dans la terminologie anglo-saxonne), les différentes techniques qui permettent de réaliser les **cartographies Raman** [15,16] ont beaucoup évolué. Ces techniques diffèrent essentiellement par la façon dont l'échantillon est exploré par le faisceau laser (**point par point** ou **ligne par ligne**) ainsi que par le détecteur utilisé (monocanal, multicanal mono- ou bidimensionnel) [18,19]. La **technique point par point** a été utilisée pour l'acquisition des **spectres micro-Raman**, alors que la technique ligne par ligne a été utilisée pour l'acquisition des **images Raman**.

f) Cartographie ou Imagerie Raman (Eclairement ligne par ligne)

La surface des échantillons en configuration confocale (Figure II.7B) est éclairée ligne par ligne. L'éclairement de l'échantillon selon une ligne permet un bien meilleur usage d'un détecteur CCD car il est possible de recueillir simultanément les informations spatiales et spectrales concernant l'échantillon: la distribution d'éclairement le long de la fente du spectrographe est directement reliée à la répartition dans l'échantillon des espèces moléculaires le long de la ligne éclairée alors que celle dans une direction perpendiculaire est reliée à l'intensité relative des raies Raman émises (spectre). Cette technique d'exploration ligne par ligne de l'échantillon mise au point au LASIR, préserve intégralement la configuration confocale [17,18] (Figure II.7C).

2.3 RECAPITULATIF DES METHODES UTILISEES

La **spectrométrie UV-visible** a été limitée à l'étude du colorant, **seul** ou **lié** aux **protéines *in situ* et *in vitro***. Pour **déterminer les groupements chimiques** impliqués dans l'interaction, **les spectrométries vibrationnelles** (IR et Raman) sont **nécessaires**.

La **macrospectrométrie** permet de renseigner sur la **composition chimique globale** d'un échantillon donné, alors que la **microspectrométrie** permet l'étude de la distribution spatiale des composantes au sein des échantillons (par exemple la caractérisation des lésions dans les tissus biologiques).

La **spectrométrie infrarouge** est **adaptée** à l'étude de nos **échantillons colorés et non colorés**. Elle permet de caractériser la **structure secondaire des protéines**, mais aussi d'autres composantes du tissu, notamment les lipides et les acides nucléiques. Cependant, elle présente un inconvénient majeur pour les échantillons hydratés à cause de l'interférence de certaines bandes d'absorption de l'eau avec celles du tissu, ce qui peut influencer l'interprétation des spectres. Pour la caractérisation par microspectrométrie infrarouge des lésions cérébrales dans les tissus des malades Alzheimer, nous n'avons pas pu visualiser avec exactitude les endroits à étudier car les tissus étaient illisibles sous microscope.

La **spectrométrie Raman** est très précieuse pour notre étude. D'une part, elle permet la caractérisation des échantillons biologiques, et d'autre part, l'eau semble présenter peu de problèmes pour nos systèmes car l'intensité des bandes d'absorption dues aux modes de vibrations des groupements OH est faible. Toutefois, d'autres problèmes sont à considérer, notamment, **la fluorescence, la dégradation et l'instabilité des échantillons sous le faisceau laser**. Ainsi, différentes excitatrices sont nécessaires pour répondre à chaque cas présenté.

Dans le cas **des échantillons colorés**, par un choix judicieux de la longueur d'onde excitatrice, on peut obtenir des spectres Raman de bonne qualité car le maximum de fluorescence dépend de la longueur d'onde excitatrice. Ainsi, des excitatrices émettant dans le **domaine de l'infrarouge** sont plus appropriées. Nous avons utilisé le laser YAG (**raie proche IR à 1,064 μm**) pour l'acquisition des spectres **FT-Raman** et **micro-Raman**.

Les spectres RR du rouge Congo en solution aqueuse et du tissu cérébral non coloré ont été obtenus avec la raie verte à 514,5 nm.

La spectrométrie FT-Raman a été utilisée pour **l'étude** de l'ensemble de nos **échantillons colorés et non colorés**. De plus, cette technique **s'est avérée un moyen** très intéressant pour **discriminer** un tissu contenant **des protéines amyloïdes** d'un tissu qui n'en contient pas. Elle peut donc être utilisée comme **un nouvel outil** pour le **diagnostic spectroscopique de la maladie d'Alzheimer**.

Quant à **la cartographie Raman**, les images Raman 2D obtenues permettent de **renseigner sur la nature des composantes chimiques** contenues dans la région du tissu analysé. Notamment, on peut connaître la répartition des composantes α et β associées à la bande amide I dans les spectres Raman du tissu malade. Ainsi, la discrimination entre un tissu contenant des dépôts d'amyloïde et un tissu qui n'en contient pas est possible, ce qui permet de vérifier les résultats des tests histopathologiques.

Pour l'étude des **échantillons non colorés**, trois excitatrices ont été utilisées dont deux émettant dans le domaine du proche infrarouge et une émettant dans le domaine du visible.

* la raie **IR** à **1,064 μm** pour l'acquisition des spectres **FT-Raman** et **micro-Raman**.

* la raie **IR** à **815 nm** pour l'acquisition des spectres **micro-Raman**.

* la raie **verte** à **504,5 nm** pour l'acquisition des spectres **micro-Raman** et **d'imagerie Raman**.

III INSTRUMENTATION

Les progrès obtenus cette dernière décennie en instrumentation infrarouge et Raman, notamment par l'apport de la transformée de Fourier, le développement des détecteurs très performants (CCD), des fibres optiques, du Raman confocal, etc.. ont fait de ces spectrométries des outils de haute technologie par les gains qu'elle procure en précision et en temps d'analyse. La plupart de ces techniques ont été limitées à la caractérisation de produits purement industriels. Mais maintenant, leur domaine d'application s'est élargi, notamment dans des applications biomédicales pour le biondiagnostic *in vivo* de certaines maladies.

Simultanément, le développement informatique et statistiques des traitements des données a conduit à une utilisation accrue des informations contenues dans les spectres de vibration moléculaire. Appliquée à l'étude des mélanges complexes, l'association de ces deux méthodologies a permis de progresser dans différentes voies

III.1 SPECTROMETRE UV-VISIBLE

Pour les études *in vitro*, les solutions à étudier étaient placées dans des cuves en quartz de manière à pouvoir explorer le domaine du proche UV. La cuve de référence contient le solvant, alors que la cuve à échantillon contient le mélange solvant-soluté. En revanche, les préparations du tissu déposées sur des lames de verres étaient directement introduites dans le spectromètre, à 1 cm du trajet optique.

L'appareil utilisé est un spectromètre **modèle Cary 1** (version Cary 13E) de la Société Varian avec double faisceau et une résolution de 1 manomètre sur la zone spectrale 210-800 manomètres. En général, les appareils usuels ne descendent que rarement en dessous de 200 micromètres.

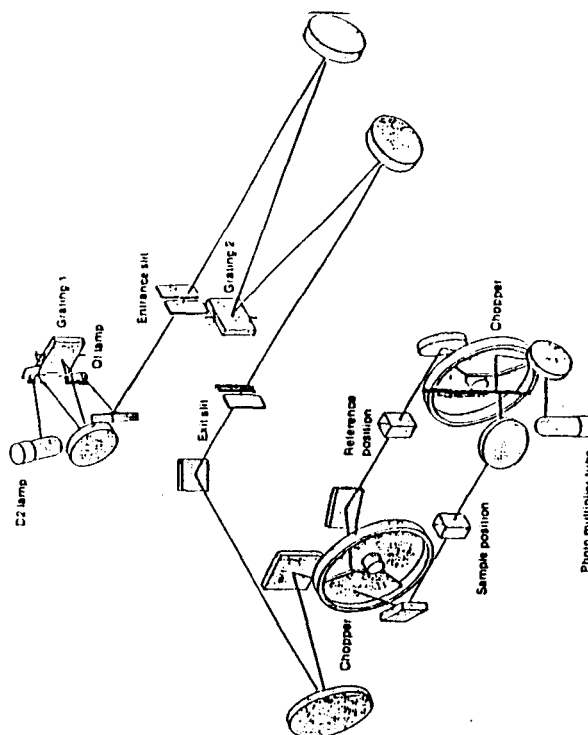


Figure II.4: Spectromètre UV-visible Cary 13E

III.2 SPECTROMETRES INFRAROUGE

A) Spectromètre Bomem MB 122

Les spectres IR ont été obtenus à l'aide d'un interféromètre de Michelson Bomem (modèle MB122). Cet ensemble d'analyse FT-IR est spécialement conçu pour opérer à des longueurs d'ondes comprises entre 4000 et 400 cm^{-1} avec une grande stabilité et une bonne sensibilité. La stabilité de la source est réalisée par un circuit électronique de régulation, développé par Bomem. Le système optique est composé d'une source céramique de haute intensité stabilisée en température, et d'un interféromètre de Michelson à balayage continu dont la séparatrice en KBr est recouverte de germanium.

L'appareil est équipé d'un détecteur DTGS (sulfate de triglycine deutéré). Pour chaque étude, 10 interférogrammes ont été collectés, dont la moyenne a été convertie par transformée de Fourier pour générer le spectre de l'échantillon. Les spectres FT-IR étaient obtenus avec une résolution de 2 cm^{-1} dans la région $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ pour les fenêtres de KRS_5 , et dans la région $4000\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ pour les fenêtres de CaF_2 .

B) Spectromètre Brüker IFS 88

Le spectromètre utilisé était le modèle IFS 88 de la Société Brüker muni d'un accessoire FRA 106 et équipé d'un détecteur pour l'infrarouge moyen: MCT (Mercure-cadmium-Tellurium) refroidi à l'azote liquide. Le microscope optique de l'appareil est couplé à une caméra CCD de visualisation de haute résolution, permettant ainsi de faciliter la mise au point sur les grains de l'échantillon déposé sur des fenêtres IR. Il permet de focaliser le faisceau issu de la source, remplaçant ainsi le compartiment échantillon. Celui-ci qui est en faible quantité, est déposé sur une fenêtre transparente dans l'infrarouge. La surface à étudier varie de quelques dizaines à quelques centaines de μm^2 , selon le détecteur utilisé. La surface éclairée est de $30 \mu\text{m}^2$, la résolution est de 4 cm^{-1} et le nombre d'accumulations variait de 200 à 500.

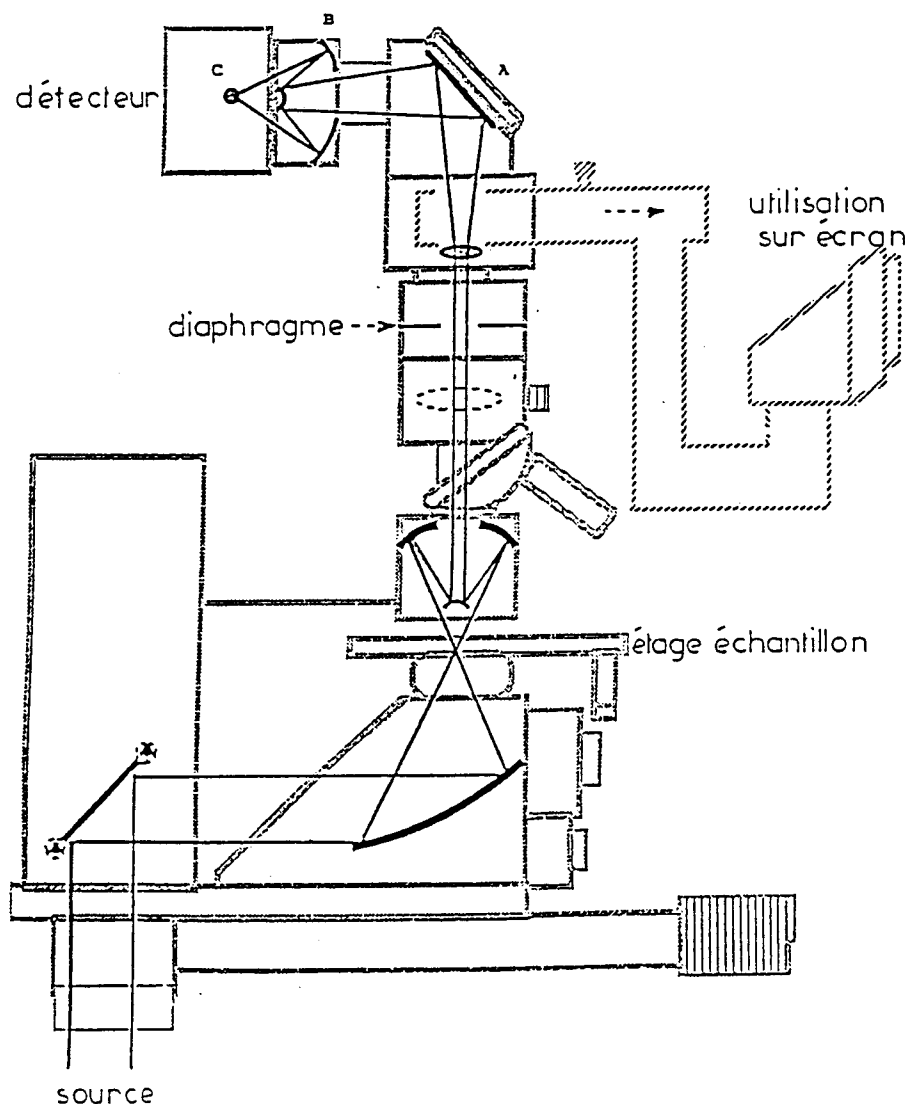


Figure II.5: Spectromètre FT-IR BRUKER IFS 88

III.3 SPECTROMETRES RAMAN

A) Module Raman Brüker FRA 106

Les spectres FT-Raman ont été enregistrés sur un système FRA 106 (comprenant une source laser IR, un système d'illumination, une chambre échantillon et un détecteur) couplé à un spectromètre Brüker modèle IFS 88 (qui fournit l'interféromètre). Les spectres sont enregistrés par l'accumulation d'interférogrammes, en utilisant un laser Nd YAG émettant une radiation excitatrice dans le proche IR, de longueur d'onde de 1,064 μm , et à une puissance laser variait de 200 à 400 mW selon la nature de l'échantillon étudié. Une excitation à cette longueur d'onde permet d'éliminer la fluorescence. Nous avons procédé à un nombre d'accumulations entre 200 et 500 pour l'acquisition des spectres dans la gamme 200 à 4000 cm^{-1} avec une résolution de 4 cm^{-1} .

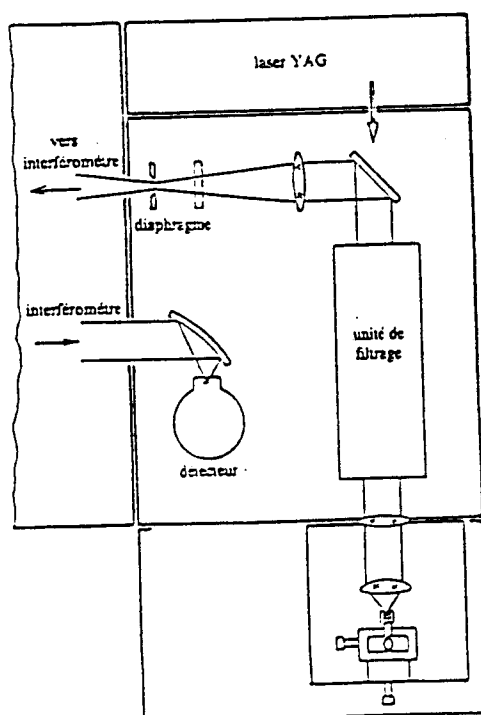


Figure II.6: Module FT-Raman Brüker FRA 106

B) Spectromètre Raman Dilor XY

Le spectromètre Dilor XY est un appareil Raman multicanal qui permet de travailler sur des échantillons macroscopiques et microscopiques solides ou liquides. Il se compose de quatre parties:

- * la source est un laser Argon qui émet à 514 nm ou un laser IR YAG qui émet à 1,064 μm .
- * le compartiment échantillon est constitué d'une platine conventionnelle sur laquelle est posée l'échantillon pour les microanalyses, et d'un microscope sous lequel est placé une lame en verre supportant le composé à étudier par microspectrométrie Raman.
- * le prémonochromateur comporte un double monochromateur à réseau plans identiques en montage soustractif. Sa dispersion est nulle, son rôle est d'éliminer la radiation excitatrice. Le premier réseau disperse la lumière polychromatique sur une fente large positionnée de manière à couper cette radiation. Le second recombine les composantes de la lumière source sauf la longueur d'onde correspondant à l'excitatrice.
- * le spectrographe est constitué d'un monochromateur qui disperse la lumière envoyée sur un détecteur multicanal de type CCD (Charges Coupled Devices dans la terminologie anglo-saxonne) refroidi à l'azote liquide. Le fonctionnement de spectrographe est contrôlé par un PC et une station de travail, équipée d'un logiciel spécifique utilisant des méthodes mathématiques qui permettent de gérer l'acquisition et le traitement des spectres, ainsi que la reconstruction des images spectrales.

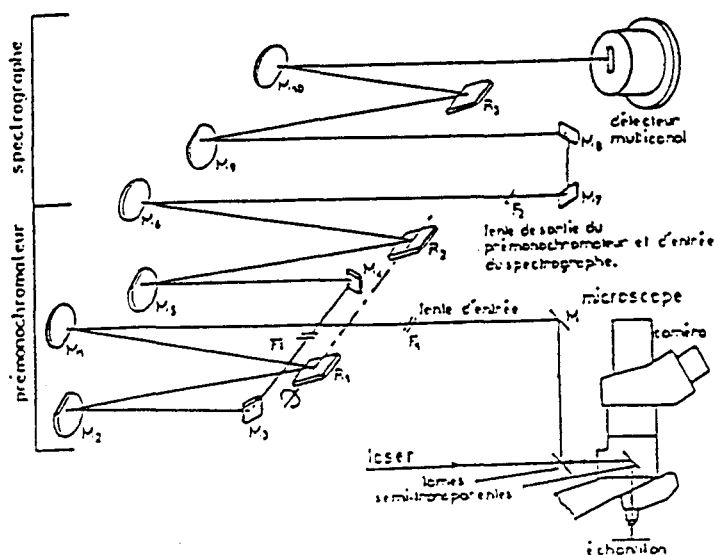


Figure II.7A: Spectromètre Raman XY multicanal

En utilisant le principe de la cartographie Raman (Figure II.7B) ou imagerie Raman pour l'acquisition des images Raman, différentes régions cérébrales qui variaient entre 10x10 et 30x30 μm ont été étudiées. Les paramètres utilisés sont (x100 objectif, ON 0,95, une radiation excitatrice de 514,5 nm (100 à 200 mW). Le temps d'intégration variait de 1 à 5 minutes et le temps d'acquisition total des spectres de 20 minutes à 2 heures. Pour le diagnostic spectroscopique de la MA, la **décomposition** de la bande amide I dans les spectres micro-Raman de tissu des malades Alzheimer a permis d'évaluer les contributions des **deux composantes α et β** associées à cette bande. Les images 2D étaient créées en utilisant l'intensité intégrale de la bande amide I (la gamme spectrale de 1800-1600 cm^{-1}) de telle sorte qu'une couleur blanche signifie la valeur la plus élevée d'intensité et une couleur noir signifie la valeur la plus basse. La forme des objets est reproduite correctement et chaque élément structurelle du microéchantillon est bien présenté.

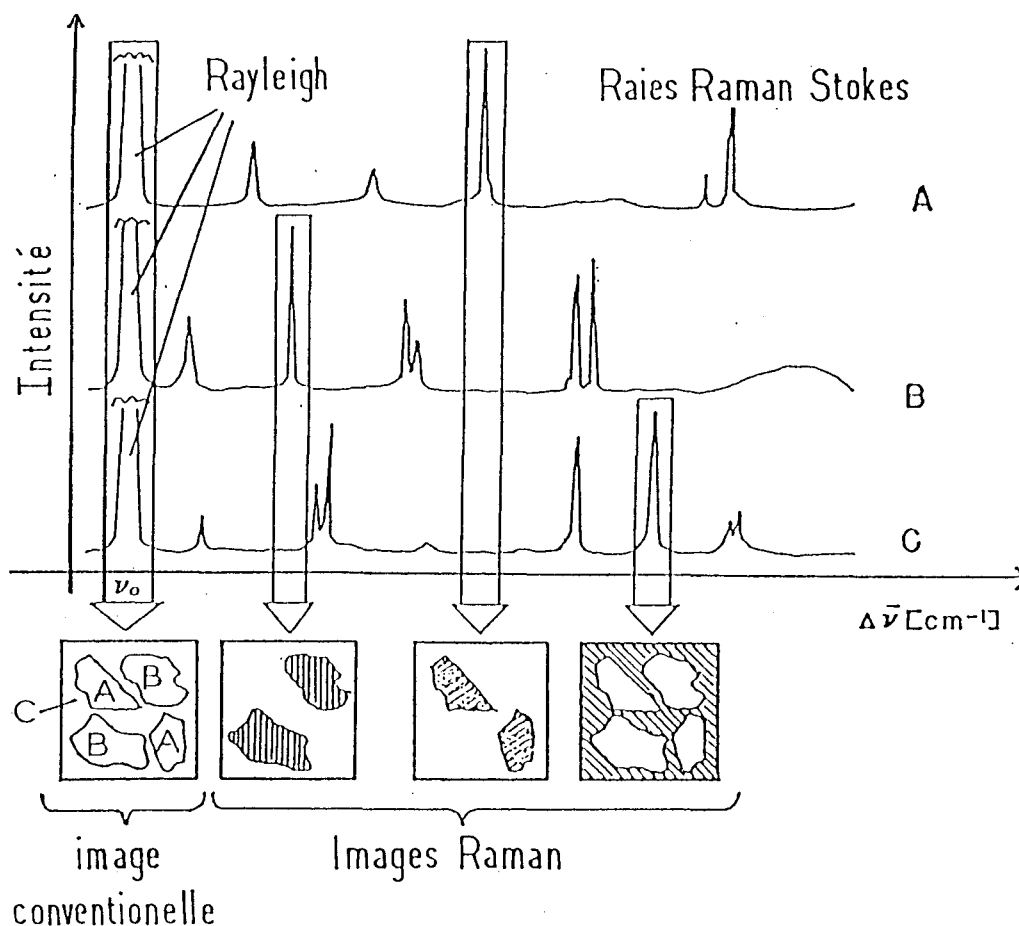


Figure II.7B: Schéma illustrant le principe de la Cartographie Raman

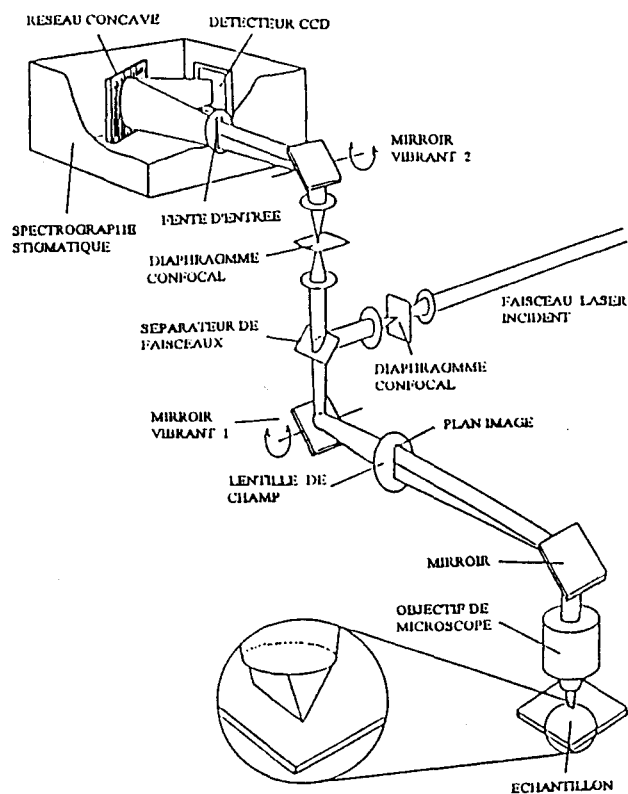


Figure II.7C: Schéma illustrant le principe de l'obtention de cartographies Raman par éclairage ligne par ligne de la surface de l'échantillon en configuration confocale.

CONCLUSION

L'une des principales difficultés rencontrées au cours de l'étude des échantillons biologiques par spectrométrie Raman est le problème de la fluorescence apparaissant comme un signal très intense et rendant très difficile l'interprétation des spectres Raman. A cela s'ajoute la dégradation des échantillons par le faisceau laser et l'absence parfois du matériel optique nécessaire à la détection des protéines amyloïdes. C'est pourquoi nous avons utilisé toutes les techniques spectroscopiques qui pouvaient être adaptées aux diverses analyses. Toutes ces techniques sont complémentaires pour pouvoir interpréter les phénomènes observés.

Cependant, la microspectrométrie Raman reste à ce jour la seule technique de microanalyse moléculaire pour laquelle la limite de détection est de l'ordre du nanogramme. Cette technique est actuellement utilisée en routine pour traiter aussi bien des problèmes liés à la recherche fondamentale qu'au contrôle des matériaux. Le développement récent d'instruments travaillant en configuration confocale rigoureuse a encore augmenté le potentiel de cette technique notamment pour la réalisation de cartographies Raman à résolution latérale et axiale élevées.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] **Kelenyi G.**, *Acta Neuropathol.* **7** (1967) 336-348.
- [2] **Choo L. P; Mansfield J. R., Pizzi N., Somorjai R. L., Jackson M., Halliday W. C. et Mansch H. H.**, *Biospectroscopy I* (1995) 141-148.
- [3] **Jackson M., Choo L. P., Watson P., Halliday W. C. et Mansch H. H.**, *Biochim. Biophys. Acta.* **1270** (1995) 1-6.
- [4] **Elhaddaoui A., Delacourte A. et Turrell S.**, *Biospectroscopy I* (1995) 351.
- [5] **Sarkar P. K., Doty P.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **55** (1966) 981-989.
- [6] **Burke M. J. and Rougvie M. A.**, *Biochem.* **11** (1972) 2435-2439.
- [7] **Tsukada M., Freddi G., Monti P., Bertoluzza A et Kasai N.**, *J. Polymer. Sci.: Part B: Polymer. Physics.* **33** (1995) 1995-2001.
- [8] **Sakabe et al.**, *Sen-i. Gakkaishi.* **45** (1989) 487-487.
- [9] **Prescott B., Renugopalakrishnan V. et Thomas G. J. Jr.**, *Biopolymers* **26** (1987) 934-936.
- [10] **Veis A. et Brownell A. G.**, *Proc Natl Acad Sci USA* **74** (1977) 902.
- [11] **Theophanides D.**, *D. Reidel Publishing Co.* (1984)
- [12] **Ferraro R., Basile L. J.**, «to Chemical *Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Application Systems*», *Academic Press, New York I* (1978).
- [13] **Messerschmidt R. G., Harthcock M. A.**, *Infrared Microscopy: Theory and Applications*», *Academic Press, New York* (1988).
- [14] **Carey P. R.**, «*Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies*» *Academic Press: Molecular Biology, New York* (1982).
- [15] **Puppels G. J., Colier W., Olminkhof J. H. F., Otto C., de Mul F. F. M. et Greve J.**, *J. Raman Spectrosc.* **22** (1991) 217-225.
- [16] **Sharonov S., Chourpa I., Valisa P., Fleury F., Feofanov A., Manfait M.**, *European Microscopy and Analysis* (1993) 23-26.
- [17] **Delhaye et al.**, *European patent N° 92400141.5* (1992).
- [18] **Barbillat et al.**, *Chichester and NewYork* (1992) 1074-1075.

CHAPITRE III

*INTERACTIONS ENTRE LE ROUGE CONGO ET LES
PROTEINES AMYLOIDES DANS LE TISSU
CEREBRAL DES MALADES ALZHEIMER*

INTRODUCTION

Depuis plusieurs décennies, **la coloration au rouge Congo (RC)** a été, et demeurera probablement encore longtemps l'un des moyens le plus utilisé pour le **diagnostic histopathologique** de la maladie d'Alzheimer (MA) [1]. Cette **coloration** est **établi sur du tissu cérébral déparaffiné**, préalablement **fixé** par des solvants dénaturants, comme **le carnoy, le formol, le bouin, le méthanol et autres**.

Les **fibres d'amyloïde** ont une grande **affinité avec le RC** et exhibent une biréfringence jaune-verte caractéristique d'un dichroïsme après coloration au RC [2]. De nombreuses études histochimiques [3-5] et spectroscopiques [6-10] ont été entreprises dans le but de comprendre la nature de la spécificité de cette coloration. Cependant, **le mécanisme moléculaire impliqué dans cette interaction n'est pas encore entièrement compris**. Les études publiées dans ce domaine ont été limitées aux systèmes modèles de l'amyloïde, notamment à l'insuline et à la poly-L-lysine [8-10], mais aussi à certains peptides amyloïdes synthétiques dont le $\beta(1-28)$ [9]. En revanche, le mécanisme d'interaction entre le RC et les protéines amyloïdes dans le **tissu (*in situ*) n'était pas encore connu avant ce travail**, probablement, à cause de la difficulté d'extraire les protéines amyloïdes des échantillons cérébraux avec une grande pureté.

Les résultats des études physico-chimiques réalisées *in vitro* qui ont été publiés sont contradictoires. Certains auteurs ont suggéré que l'interaction devait être due à des liaisons hydrogène ou à une réaction type «piège» du colorant entre les feuillets β -plissés de la protéine amyloïde [11]. Par contre, les études qui ont été entreprises dans notre laboratoire par Elhaddaoui et ses collaborateurs ont montré que le **RC se lie «spécifiquement» aux protéines de structure en feuillets β -plissés**. Cette interaction impliquerait les groupements **sulfonyles du colorant** et les groupements **amines des protéines amyloïdes** [9] (Voir Figures I.11).

Afin d'étendre ce travail, nous avons étudié le mode de fixation de la molécule RC sur les protéines amyloïdes dans des **tissus cérébraux Alzheimer, préalablement fixés au carnoy**. Le choix de ces tissus repose sur leur utilisation dans le **diagnostic**

histopathologique de la MA. La connaissance du mécanisme d'interaction dans le tissu pourrait ouvrir de nouvelles perspectives diagnostics et thérapeutiques. Notamment, on visait l'utilisation de la molécule **RC**, comme **sonde «*in vivo*»**, soit, pour détecter les dépôts d'amyloïde, soit, pour bloquer leur formation, ou encore, pour atténuer l'effet de leur toxicité [12]. Le tissu cérébral Alzheimer étant complexe et ne contient pas seulement des **protéines amyloïdes (anormales), de structures β** , mais aussi des protéines de **structures non- β (normales)**, des lipides, des acides nucléiques et autres, il nous a donc semblé important d'étudier d'abord le mode de fixation de la molécule RC sur des protéines de différentes conformations avant d'étudier le tissu.

Dans ce troisième chapitre, nous montrerons que les spectrométries **infrarouge, Raman et UV-visible** sont adaptées à l'étude des tissus colorés. Pour mieux comprendre le mode d'interaction du RC avec les protéines amyloïdes dans le tissu, nous commencerons par un rappel sur les études physico-chimiques de la molécule RC et des composantes principales du tissu (les protéines, les lipides et les acides nucléiques), en **insistant sur la structure secondaire** des protéines. Puis, nous présenterons les résultats des études du mécanisme d'interaction entre le RC et des protéines *in vitro* et *in situ*. Nous comparerons enfin l'ensemble des résultats obtenus pour le tissu **traité au carnoy** à ceux obtenus pour le tissu **frais**.

III.1 LE ROUGE CONGO (RC)

Le rouge Congo (RC) est le premier diazoïque dérivé de la benzidine qui a été synthétisé pour la première fois en 1884 par Böttiger. L'application industrielle majeure de ce colorant se rencontre dans la teinture. Cependant, comme nous l'avons déjà cité, le RC est également un ligand qui est largement utilisé dans les laboratoires d'histopathologie pour démontrer la présence d'amyloïde dans les spécimens pathologiques [3-5].

1.1 CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES

La molécule rouge Congo (RC) possède deux groupements **azo** ($N=N$), deux groupements **amines** (NH_2), deux groupements **sulfonyles** (SO_3^-), deux groupements **sodium** (Na^+), deux groupements **naphtalènes** et un groupement **biphényl** (Figure III.1).

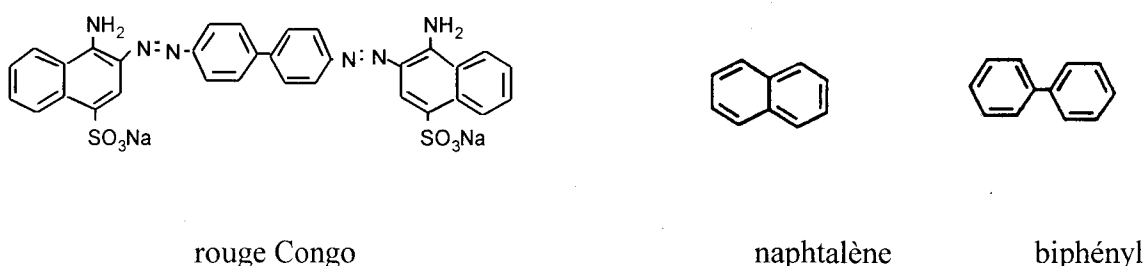


Figure III.1: Structures chimiques de la molécule Rouge Congo (RC), du naphtalène et du biphényl.

Le RC est utilisé comme indicateur coloré en milieu acido-basique. Sa solution aqueuse qui est rouge en milieu basique, vire au violet puis au bleu à partir du pH 5. A pH inférieur à 2,7, la solution du RC devient bleue foncée et le colorant a tendance à précipiter hors de la solution. Cette forme acide bleue peut aussi être favorisée par la lumière et la température. Ce changement de coloration observé en milieu acido-basique est expliqué par la protonation de la molécule RC et par l'installation d'un équilibre tautomérique [13,14]. Ces changements de structures ont été étudiés en fonction du pH et du solvant par différentes techniques spectrométriques: absorption électronique UV-visible [13,15,16], résonance magnétique nucléaire du proton (RMN 1H) et de carbone 13 (RMN ^{13}C) [17] et vibrationnelles (Raman et infrarouge) [9]. L'ensemble des résultats obtenus ont permis d'identifier clairement les différentes espèces présentes dans les solutions du RC à différents pH (acide et basique).

1.1.1 Spectrométrie d'absorption électronique UV-visible

Des spectres d'absorption électronique UV-visible ont été enregistrés à partir de solutions aqueuses du RC préparées à différents pH (de 10 à 1,5). Par simple souci de clarté, nous ne présentons sur la Figure III.2 que trois spectres obtenus pour trois solutions analysées (rouge à pH=6,2 (A), violette à pH=4,1 (B) et bleue à pH=3,0 (C)), montrant ainsi les différentes structures de la molécule RC obtenues en milieu acido-basique [9].

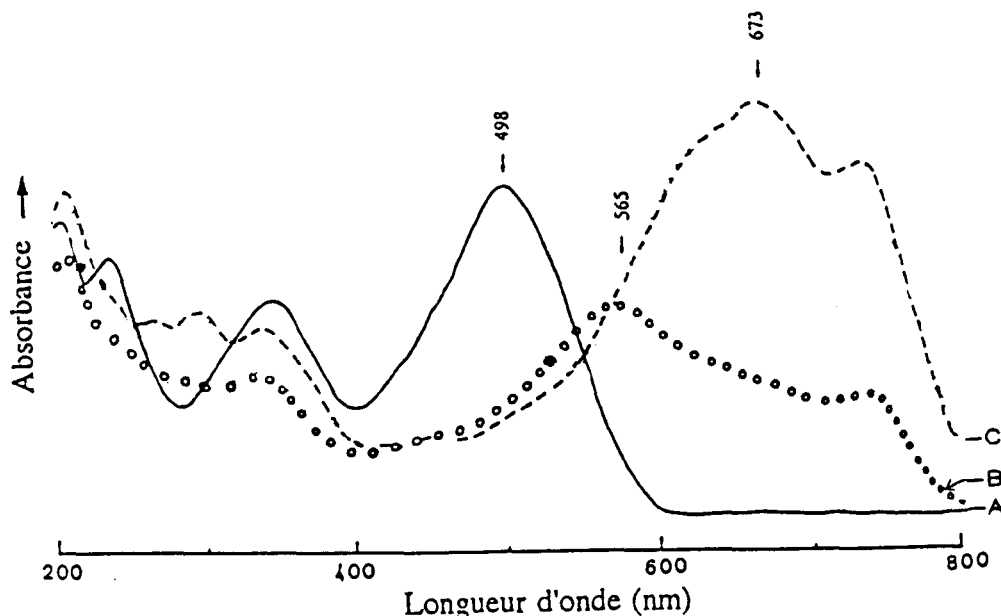


Figure III.2: Spectres d'absorption électronique UV-visible montrant les trois formes de la molécule RC
 A) d'une solution du RC 10^{-5} M dans du Tampon phosphate à pH=6,2 (forme basique rouge).
 B) d'une solution du RC $5 \cdot 10^{-6}$ M dans du tampon phosphate 5 mM à pH=4,1 (forme acide violette).
 C) d'une solution du RC $5 \cdot 10^{-6}$ M dans du tampon phosphate 5 mM à pH=3,0 (forme acide bleue).

De manière générale, on peut observer que chaque solution analysée possède un spectre d'absorption électronique distinct. A pH=6,2, le spectre de la solution rouge présente **deux bandes** dont les maxima d'absorption sont situés respectivement à **348 nm** et **498 nm**, qui sont attribuées aux **transitions $n-\pi^*$ et $\pi-\pi^*$** du groupement azo ($N=N$); l'un des groupements les plus affectés par les variations du pH [17] (A). A pH=4,1, la solution du RC devient **violette** et le spectre caractéristique de cette forme acide (B) montre essentiellement une bande à **565 nm** et un massif de faible intensité situé entre **600-800 nm**. Cette couleur violette est causée par la **protonation** de la molécule RC. Le spectre de la solution acide bleue obtenu à pH=3,0 (C) est distinct de celui de la forme violette (B), montrant ainsi un nouveau réarrangement dans la structure électronique de la

molécule RC. Ce spectre (C) se caractérise par une **diminution** de l'intensité de la bande à **565 nm** et une **augmentation** des intensités des bandes à **673** et **760 nm**.

1.1.2 Structures chimiques de la molécule RC en milieu acido-basique

Les spectres d'absorption électronique UV-visible ont permis de proposer les structures des deux formes tautomères dues à la protonation de la molécule RC en solutions acides, dites **ammonium** et **azonium** (Figures III.3) [17].

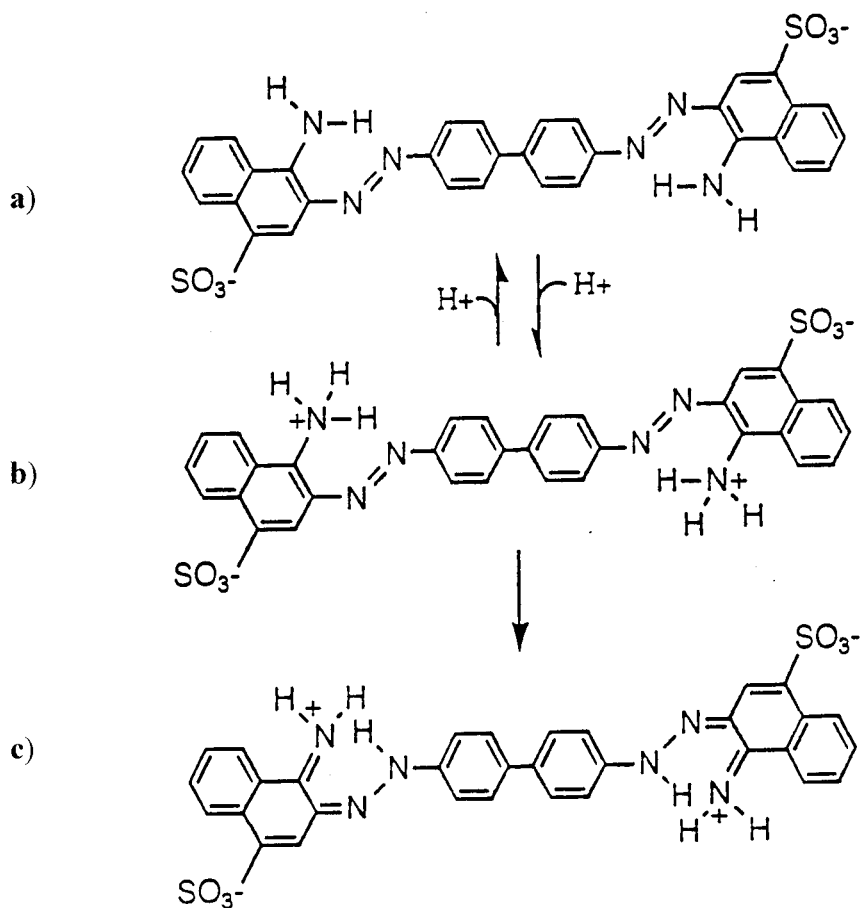


Figure III.3: Protonation et équilibre tautomérique de la molécule RC dans des solutions acides. **a)** Forme basique rouge azoïque. **b)** Forme acide violette ammonium (avec un proton attaché au groupement amine (-NH₃⁺)). **c)** Forme acide bleue azonium (avec un proton additionné au groupement α-azo (-_αNH-N=)).

La bande à **565 nm** dans le spectre caractéristique de la forme **acide violette** (Voir Figure III.2B) a été attribuée à la forme **ammonium** avec un proton attaché au groupement amine (-NH₃⁺). Dans cette forme la structure azoïque est préservée, alors que la conjugaison des groupements azo liés aux cycles aromatiques est entravée. En revanche,

les bandes du massif entre **600-800 nm** observées dans le spectre caractéristique de la forme acide bleue (Voir Figure III.2C) sont attribuées à la forme **azonuim** avec un proton additionné au groupement α -azo ($-\alpha\text{NH}-\text{N}=\text{}$) qui caractérise **la forme quinone** (qui absorbe à des fortes longueurs d'ondes). Il semblerait que ces deux formes tautomères ammonium et azonuim sont en équilibre dans les solutions acides. L'équilibre tautomérique entre ces deux formes est stabilisé par la formation des six cycles aromatiques avec les groupements amines et azo avec l'oscillation du proton entre eux.

1.1.3 Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ^1H)

Les résultats des spectres d'absorption électronique ont été confirmés par les spectres de RMN ^1H et de ^{13}C du sel de disoduim du RC basique et du RC acide bleue, solubilisés dans un solvant aprotique (DMSO) [17]. Le spectre RMN du proton est représenté sur la Figure III.4, alors que les changements chimiques et les attributions sont reportés dans le Tableau III.1. Ces attributions ont été réalisées à partir des études des colorants azoïques, du phényl et du naphthalène [18-20].

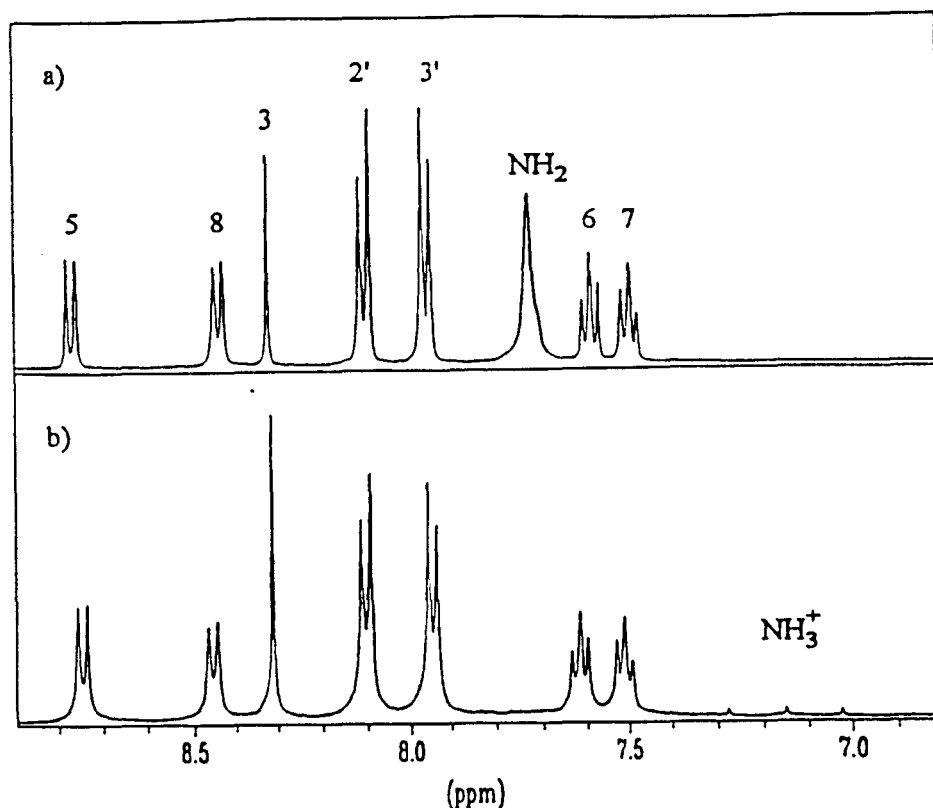


Figure III.4: Spectres ^1H RMN (en ppm) d'une solution concentrée du RC basique (a) et d'une solution du RC acide (b) dans du DMSO [enrico].

Le spectre ^1H RMN du sel du RC (**a**) caractéristique de la forme basique du colorant montre un signal à 7,73 ppm qui est attribué au groupement amine. Ce signal disparaît dans le spectre du RC acide (**b**), où on observe un triplet de faible intensité et une constante de couplage $^1J(^{14}\text{NH})$ de 51,3 Hz à 7,15 ppm. Cette caractéristique est un modèle typique de la protonation du groupement amine [21]. D'autres changements chimiques sont identiques pour les deux formes sel et acide, indiquent que les pics des systèmes aromatiques sont inaltérés et que la majorité des molécules RC acides qui existent dans le DMSO sont de structure azoïque protonée sur le groupement amine. Les spectres RMN du carbone 13 ont donné des résultats similaires à ceux du proton.

Tableau III.1: Changements chimiques observés sur les spectres ^1H RMN (en ppm) du sel de disodium du RC (**a**) et du RC acide dans du DMSO (**b**).

H/C	$\delta(^1\text{H})$ du RC sel	$\delta(^1\text{H})$ du RC acide
1		
2		
3	8,32	8,32
4		
5	8,77	8,75
6	7,59	7,62
7	7,49	7,51
8	8,44	8,46
4a		
8a		
1'		
2'	8,11	8,11
3'	7,96	7,95
4'		
NH ₂	7,73	
NH ₃ ⁺		7,15*

* $^1J(^{14}\text{NH}) = 51,3 \text{ Hz}$

1.1.4 Spectrométries vibrationnelles

Les spectres Raman de résonance [22-24] et FT-Raman confirment la présence des structures azoïques ammonium et quinoniques dans les solutions acides du RC. Les attributions des bandes observées dans ces spectres sont reportées dans le Tableau III.2.

Tableau III.2: Nombres d'ondes en cm^{-1} et attributions proposées pour les bandes observées dans les spectres Raman de résonance et FT-Raman obtenus à partir des solutions aqueuses du RC, (a) pH=6,2 (raie 514,5 nm), (b) pH=6,2 (raie 1064 nm) et (c) pH=3 (raie 514,5 nm).

a)	Raman b)	c)	Attributions
1157	1157		$\nu\text{C-N=}$
	1179	1182	$\nu\text{N-N}$
	1266	1267	
	1292	1289	$\nu\text{C-N-}$
		1306	
		1322	
1376	1375	1374	$\nu\text{N=N}$
1401	1400	1400	
1453	1457	1458	$\nu\text{C-C}$ des cycles aromatiques
	1566	1567	$\nu\text{C=N}$
1592	1592	1592	$\nu\text{C-C}$ des cycles aromatiques

En se référant aux travaux de spectrométrie vibrationnelle qui ont été publiés pour les colorants azoïques [15-17], le spectre de la solution du RC à **pH=6,2 (a)** obtenu avec une excitatrice émettant dans le domaine du visible (raie verte à 514,5 nm) montre des bandes dominantes à **1376 et 1401 cm^{-1}** qui sont attribuées aux modes d'élongations $\nu\text{C-N=}$ et $\nu\text{N=N}$ des groupements azo et d'autres bandes à **1453 et 1592 cm^{-1}** qui sont attribuées aux vibrations des cycles aromatiques. En revanche, le spectre FT-Raman de cette même solution obtenu avec une excitatrice émettant dans le domaine du proche infrarouge (1064 nm) **(b)** montre en plus des bandes caractéristiques de la structure azoïque, d'autres bandes situées à **1179, 1266, 1292 et 1566 cm^{-1}** qui sont attribuées à la structure **quinone**. Dans le spectre de la solution **acide bleue** obtenu avec la raie verte à 514,5 nm **(c)**, ces bandes deviennent plus intenses, alors que les bandes dues aux mode de l'élongation $\nu\text{N=N}$ de la structure **azoïque du colorant disparaissent**. On a pu ainsi conclure que la forme quinone domine dans la solution acide bleue. Cependant, la distinction entre les différentes molécules protonées ne peut pas être due aux spectres Raman de résonance.

1.2 CONCLUSION

Les études physico-chimiques de la molécule RC ont montré que l'équilibre acido-basique entre les différentes structures de résonance de la molécule RC protonée dépend des propriétés du solvant. Cet échange peut être expliqué par des interactions hydrophobes entre les molécules du colorant et celles du solvant. A faible pH, le spectre d'absorption UV-visible de la molécule RC montre un grand changement bathochrome de la bande azo ($N=N$), qui serait alors stabilisé à pH élevé ($-\alpha NH-N=$). Ces corrélations montrent que les interactions hydrophobes peuvent jouer un rôle important dans le mécanisme d'interaction entre la molécule RC et les protéines amyloïdes. Cette importance de l'effet hydrophobique de la molécule RC a été aussi démontré par Turnell et Finch [25]. D'autres contributions de cette interaction peuvent être des forces de type Van der Waals, dues à l'importance des systèmes aromatiques de la molécule [26].

III.2 CARACTERISATION DES COMPOSANTES DU TISSU

Le tissu cérébral est composé de 80 % d'eau et 20 % de matière organique. Si l'on retire l'eau, on trouve environ 60 à 70 % de protéines, 10 à 13 % de lipides, 2 à 5 % des acides nucléiques et le reste. Nous avons donc étudié les trois composantes principales du tissu humain, à savoir les protéines, les lipides et les acides nucléiques, en insistant sur les structures secondaires des protéines. Cette étude a pour but d'identifier les composantes mises en jeu dans l'interaction avec le colorant dans le tissu.

2.1 LES PROTEINES

Nous avons insisté sur **la caractérisation de la structure secondaire des protéines dans le tissu** car le peptide amyloïde-bêta se dépose dans le cerveau des malades Alzheimer sous forme de filaments antiparallèles qui s'agrègent pour former une **structure secondaire de feuillets β -plissés**. Ce peptide pourrait, par accumulation, produire au fil des années l'édifice que constitue la plaque sénile; ce qui expliquerait le caractère essentiellement neuropathologique de la maladie d'Alzheimer (MA).

Nous commencerons par une description rapide des protéines, puis nous ferons un rappel sur leurs structures secondaires. Nous exposerons ensuite les éléments théoriques et expérimentaux sur lesquels sont basées les analyses spectroscopiques infrarouge et Raman. Enfin, nous présenterons quelques exemples de spectres de protéines que nous avons étudiées avant et après dénaturation.

2.1.1 Description

Les protéines jouent un rôle essentiel dans le métabolisme et le maintien de l'intégrité de la structure chez les organismes vivants. La complexité de leurs fonctions résulte de la diversité de leurs structures. Selon leur configuration spatiale, les protéines sont séparées en **deux classes: fibrillaires** (ex: l'élastine et le collagène) et **globulaires** (ex: l'insuline native). Les protéines fibrillaires sont constituées de chaînes polypeptidiques à disposition parallèle. Ces chaînes sont rattachées les unes aux autres par des liens intermoléculaires qui leurs donnent une grande stabilité et les rendent relativement insolubles. En revanche, les protéines globulaires sont formées de chaînes polypeptidiques

très repliées sur elles-mêmes, ce qui leur donne un arrangement tridimensionnel bien précis.

Les propriétés **physico-chimiques** et l'**activité biologique** d'une protéine **dépendent** étroitement de sa **structure spatiale**. Selon leur rôle biologique, les protéines fonctionnent en solution ou à l'état adsorbé, mais rarement à l'état solide. Les caractéristiques physico-chimiques des solvants (pour les solutions et pour les tissus fixés), des supports (pour l'état adsorbé), peuvent avoir une influence significative sur la structure des protéines, donc sur leur activité. Pour comprendre ces relations entre la structure et l'activité, des différentes méthodes ont été élaborées pour l'analyse de la structure d'une même protéine dans différents états. Ainsi, la diffraction par des rayons X (RX) permet de déterminer la structure des protéines à l'état cristallin. La RMN donne des informations très précises sur la structure tridimensionnelle des protéines en solution. Les mesures de fluorescence et de dichroïsme circulaire apportent des informations ponctuelles ou globales. Enfin, les **spectrométries vibrationnelles infrarouge** et **Raman** permettent l'étude des protéines dans les trois états: solide, en solution ou adsorbé.

2.1.2 Rappels des structures chimiques

Une protéine est un enchaînement covalent d'acides aminés (aa), reliés entre eux deux à deux par **une liaison peptidique CO-NH** (Figures III.5). La liste des 20 acides aminés les plus courants est donnée dans la Figure II.3.

A) La liaison peptidique

La liaison peptidique est une liaison covalente plane (Figure III.5a). Sa présence définit le premier niveau d'organisation de la protéine: la **séquence protéique** ou **structure primaire**, c'est-à-dire l'ordre d'apparition des aas (ou résidus) au sein de la chaîne polypeptidique. Cette liaison est formée par la condensation entre le groupement carboxylique d'un acide aminé et le groupement amine d'un autre aa, avec élimination d'une molécule d'eau (Figure III.5b).

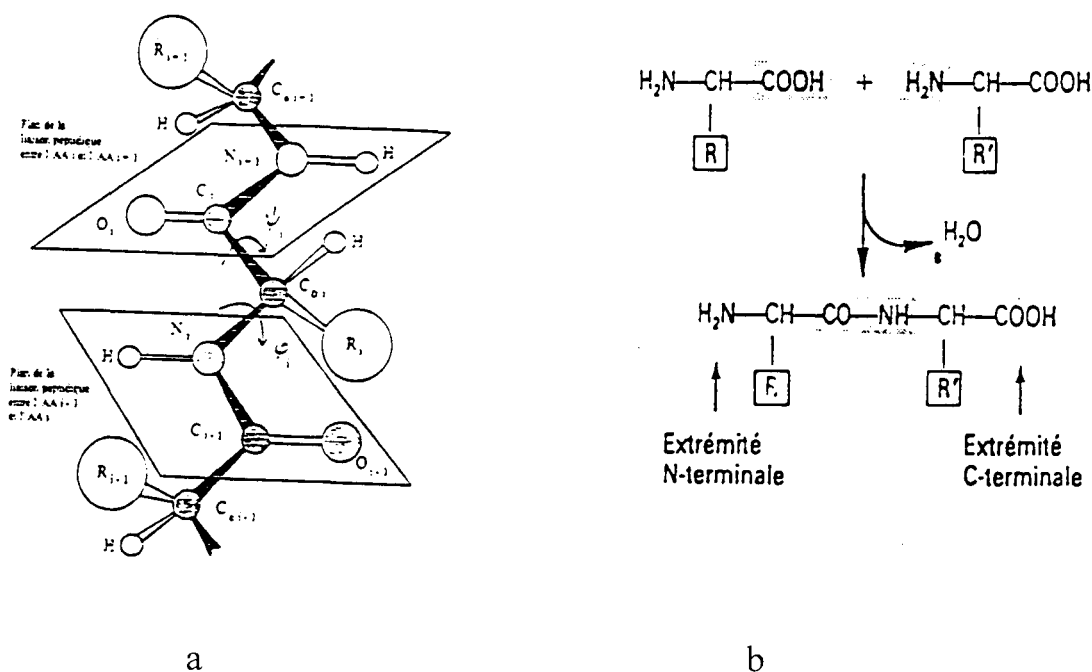
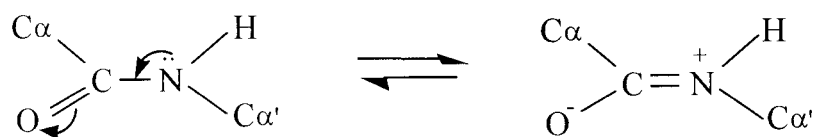


Figure III.5: La liaison peptidique. a) Nomenclature des atomes et des angles dièdres φ et ψ , R_i désigne la chaîne latérale de l'acide aminé i . b) Réaction de formation de la liaison peptidique, (R et R' représentent les chaînes latérales des acides aminés).

La liaison peptidique peut s'écrire de deux façons (formes mésomères):



Elle possède donc un caractère de **liaison double**, ce qui implique que tous les atomes ($\text{C}\alpha$, C , O , N , H et $\text{C}\alpha'$) soient coplanaires. En outre, il existe une possibilité d'isomérisie **cis-trans** pour les deux carbones $\text{C}\alpha$ et $\text{C}\alpha'$ par rapport à cette liaison. Dans les peptides et les **protéines naturelles**, on trouve essentiellement la configuration **trans**. Quand les acides aminés sont liés entre eux, il y a quatre possibilités de disposition spatiale des plans formés par les liaisons peptidiques successives dans une chaîne peptidique: l'hélice α , les feuillets β -plissés, les coudes et la forme désordonnée.

B) Structure secondaire des protéines (Figures III.6)

1) L'hélice α (Figure III.6A₁ et 6A₂)

Quand les plans successifs tournent régulièrement toujours dans le même sens l'un par rapport à l'autre, on obtient une structure de type hélicoïdale. Des liaisons hydrogène s'établissent entre l'aa(i) et l'aa(i+3), stabilisant ainsi l'édifice hélicoïdal (A₁). Dans l'hélice α , les groupements C=O des liaisons peptidiques sont pratiquement parallèles les uns aux autres. Un tour d'hélice correspond à 3,6 aa pour un pas de 0,54 nm. Il faut donc au moins 20 à 22 aa pour former une hélice α (A₂).

2) Les feuillets β (Figures III.6B₁, B₂, B₃).

Si les plans successifs alternent l'un par rapport à l'autre selon deux orientations spatiales privilégiées, on parle de structure en feuillets β -plissés. Dans un feuillet β , les liaisons hydrogène s'établissent entre deux brins β de la chaîne protéique qui s'associent soit antiparallèlement (B₁, B₂) soit parallèlement (B₃). Le feuillet β est en forme de tôle ondulée avec les C $_{\alpha}$ des résidus sur les plis de celle-ci, alors que leurs chaînes latérales R sont orientées perpendiculairement aux arêtes du feuillet sur chacune de ses faces.

3) Les coudes (Figure III.6B4).

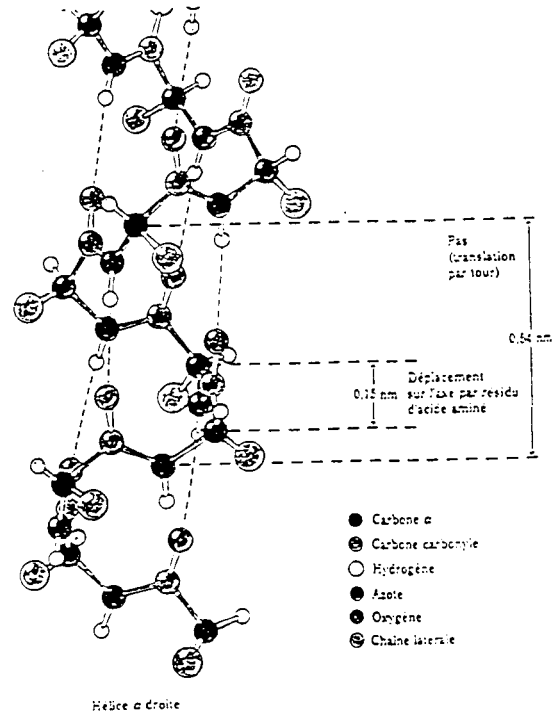
Un coude c est caractérisé par un changement de direction de la chaîne polypeptidique. Ce type d'architecture implique au plus 4 résidus consécutifs. Il existe de nombreux types de coudes qui sont différenciés par la position relative des acides aminés impliqués dans les liaisons hydrogène qui les stabilisent. On les appelle coudes β (les plus fréquents) quant il s'agit d'une liaison hydrogène aa(i)-aa(i+3). Le coude β de type II est le plus courant de tous; il contient invariablement un résidu gly en position 3 (B4).

4) La forme désordonnée

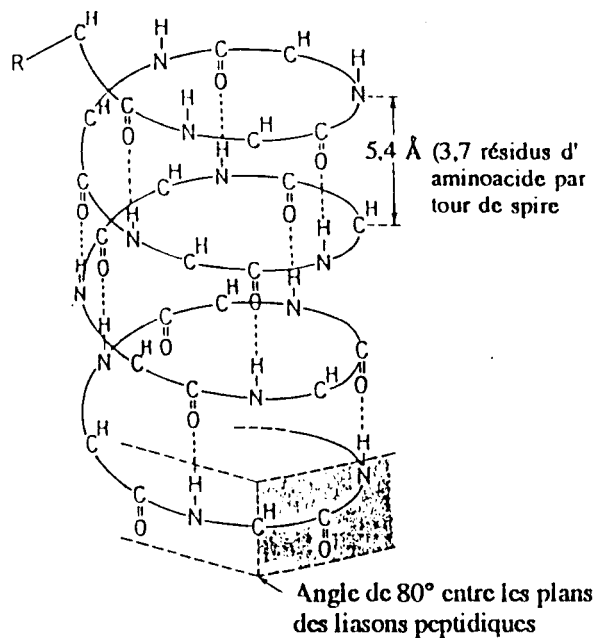
Les plans peuvent tourner au hasard l'un par rapport à l'autre, la forme résultante est dite désordonnée. Dans cette forme, la chaîne peptidique n'a pas de forme géométrique régulière dans l'espace, contrairement aux états précédents. Ce type de conformation que l'on notera (**u** ou **d**) par la suite, correspond donc à tout ce qui est ni α , ni β , ni c. On dénote généralement un manque local de liaisons hydrogène interchaînes. Cependant, les angles de valence sont toujours respectés.

IR et Raman → HELICE α : 1650-1665 cm^{-1}

Hélice α droite. Une hélice droite (ou, avec pas à droite, comme un tire-bouchon pour droitiers, ou comme le pas d'une vis ordinaire) est une hélice enroulée en tournant dans le sens des aiguilles d'une montre (rotation) quand on avance sur l'axe de l'hélice (translation) en s'éloignant de l'observateur. Seule l'hélice α droite a été observée dans les polypeptides naturels. On retourne à des positions équivalentes de l'enroulement (rotation de 360°) avec une translation de 0,54 nm, qui est le pas de cette hélice. Chaque résidu d'acide aminé supplémentaire allonge l'hélice de 0,15 nm. Un tour d'hélice comporte 3,6 résidus. (Illustration de Mike Webb.)

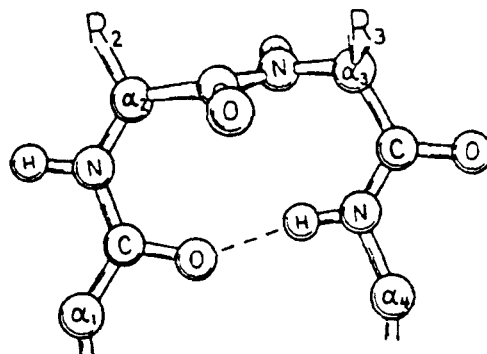


A₁



A₂

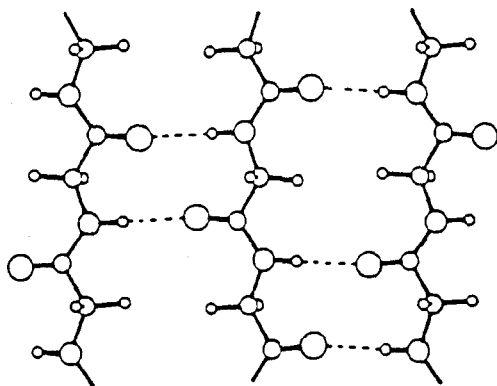
Figure III.6A: Structures secondaires des protéines (l'hélice α) et fréquences de vibration des bandes amide I, [1650-1665]. A₁) L'hélice α : Architecture locale droite (illustration de Mike Webb), représentation balles et bâtons. Les chaînes latérales sont représentées par des boules et les tirets correspondant aux liaisons hydrogène. D'après Krimm et Bandekar [27]. A₂) Autre représentation.



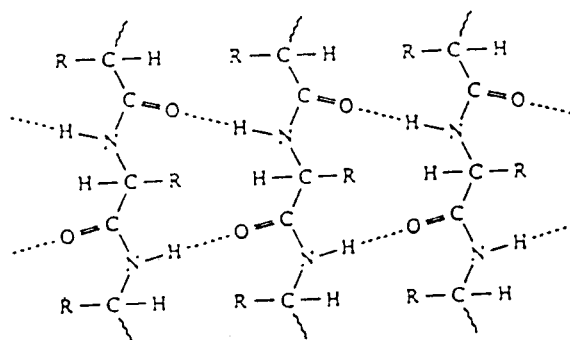
$R_3 = \text{Gly}$

B₄: Coude β de type II

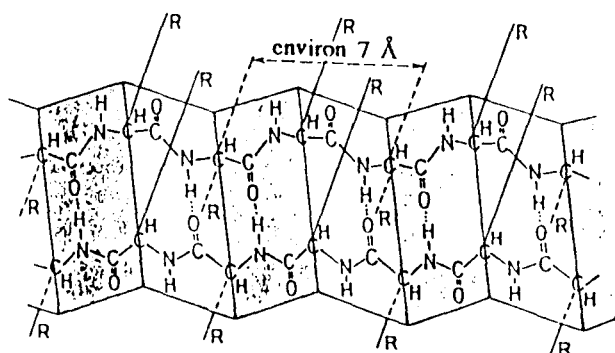
FEUILLETS β	IR $\rightarrow$ 1620-1640 cm^{-1}
	Raman $\rightarrow$ 1666-1676 cm^{-1}



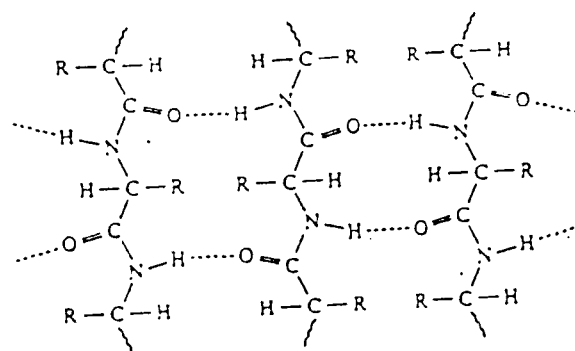
B₁: Structure de feuillet β -plissé antiparallèle



B₃: Structure de feuillet β -plissé parallèle



B₅: Etat étiré



B₂: Structure de feuillets β -plissés antiparallèles

Figure III.6B: Structures secondaires des protéines (un coude β de type II et les feuillets β) et fréquences de vibration respectives des bandes amide I, [1620-1640] et [1680-1690]. **B₁)** Architecture locale d'un feuillet β plan plissé antiparallèle. Représentation balles et bâtons. Les chaînes latérales sont représentées par des boules et les tirets correspondent aux liaisons hydrogène. D'après Krimm et Bandekar [29]. **B₂)** Autres représentation les feuillets β antiparallèles et parallèles (**B₃**). **B₄)** Architecture locale d'un coude β de type II. D'après Richardson et Richardson [28]. **B₅:** Etat étiré

Mais une protéine n'adopte jamais dans sa totalité une conformation unique. Il existe deux autres types de structures appelées tertiaire et quaternaire, qui correspondent à l'organisation globale de la protéine selon les différentes structures secondaires.

2.1.3 Caractérisation de la structure secondaire des protéines

Les spectrométries vibrationnelles infrarouge et Raman ont été largement utilisées pour caractériser la structure secondaire des protéines. Les premiers travaux avaient mis en évidence des propriétés spectrales communes aux protéines et aux peptides à l'état solide. La synthèse de polyaminoacides (polypeptides) ainsi que leurs analyses spectroscopiques ont permis de révéler l'existence de corrélations entre des fréquences de vibration caractéristiques des fonctions peptidiques et la conformation de ces polypeptides (Voir Figure III.6).

L'analyse du *N-méthyl-acétamide* qui ne possède qu'un groupement peptidique a permis la caractérisation de **sept bandes** de cette fonction qui ont été répertoriées (**bandes amide I à VII**). A partir de l'étude des dérivés deutérés, des attributions ont été proposées pour ces sept modes de vibrations; mais des ambiguïtés persistent encore pour décrire la dynamique vibrationnelle de certains d'entre eux, en particulier II et V [29].

A) Détermination quantitative des structures secondaires globales

La structure des bandes spectrales étant souvent complexe, il est parfois utile de leur faire subir un traitement mathématique permettant d'atteindre les contributions individuelles des vibrations qui les composent. L'amélioration des performances des spectromètres à transformée de Fourier ont permis la mise en oeuvre de traitements informatiques des informations spectrales. Dans le cas des protéines globulaires à l'état solide et en solution, plusieurs méthodes de décomposition des profils de la bande amide I ont été développées [30-34]. Elles sont toutes basées sur le fait que de telles protéines présentent toujours plusieurs domaines plus ou moins identifiables à des structures secondaires régulières connues, de type: hélice α , feuillets β ou coudes β .

Si ces structures impliquent un nombre suffisant important des groupements peptidiques de même nature, elles doivent donner lieu à une accumulation d'intensité amide I à des fréquences caractéristiques de ces structures. Mais dans la plupart des cas,

ces techniques ne sont pas d'une grande fiabilité, car elles dépendent des paramètres d'entrée, fixés ou non par l'utilisateur (par exemples; nombre de composantes, type de profils, largeurs à mi-hauteur, positions des pics et intensités). En effet, la décomposition d'une région spectrale donnée, n'est utilisable que si l'on connaît approximativement le nombre et la nature des bandes qui la composent. Pour certaines bandes très complexes (dont le nombre de composantes est inconnu), il faut d'autres critères de décomposition plus objectifs.

B) Attributions des bandes observées dans les spectres de vibration

Certaines vibrations IR et Raman sont caractéristiques de la structure secondaire des protéines [27]. On distingue:

1) Les raies du squelette carboné

Elles correspondent aux vibrations d'élongations $\nu\text{C}\alpha\text{-C}$: 900 à 1000 cm^{-1} et $\nu\text{C}\alpha\text{-N}$: 1050 à 1100 cm^{-1} .

2) Les raies de la liaison peptidique plane

Ce sont des **marqueurs de conformations** qui renseignent sur la géométrie locale de la protéine. Suivant la nature de cette dernière, la liaison peptidique ne forme pas les mêmes liaisons hydrogène. Cette variabilité fait qu'une hélice α et un feuillet β ne possèdent pas les mêmes modes normaux de vibration (Figure III.7) et par conséquent donnent des signaux Raman et infrarouge sensiblement différents. Les **bandes amide** observables en **Raman** sont principalement les bandes **amide I et III**. En revanche, les bandes observables en **infrarouge** sont principalement les bandes **amide I et II**. Une **décomposition** de ces diverses **bandes amide** peut permettre d'accéder aux pourcentage de structures secondaires globaux d'une protéine. Dans la littérature, les calculs des **pourcentages de structures secondaires** n'ont été réalisés que sur la **bande amide I** car elle reste, de loin, la plus utilisée pour les quantifications de structures secondaires et donc la mieux connue, aussi bien en Raman [36-37], qu'en infrarouge [35-38] (Figure III.8).

La région spectrale de la bande amide III a été décomposée, mais, elle n'a pas été quantifiée par des chercheurs car ses composantes sont très nombreuses et difficilement attribuables. En effet, elle présente des modes des chaînes latérales de certains résidus

[36]. De même, la sensibilité de la bande amide II à la structure secondaire n'est pas complètement établie et aucune quantification n'a été réalisée avec elle [34].

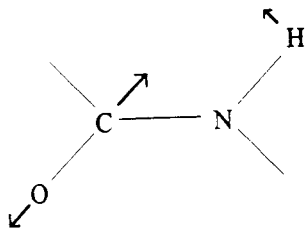
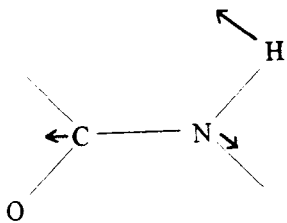
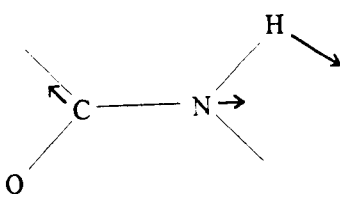
Vibration	Bande	Fréquence
	Amide I	1610-1700 cm ⁻¹
	Amide II	1500-1580 cm ⁻¹
	Amide III	1230-1300 cm ⁻¹

Figure III.7: Description schématique des modes normaux de vibration de la liaison peptidique associés aux bandes amide I, II et III. Seules les amplitudes (→) de vibration les plus importantes sont représentées.

C) Traitements des données spectroscopiques

Que ce soit en Raman à transformée de Fourier ou en infrarouge à transformée de Fourier, le spectre peut être enregistré entre 4000 à 50 cm⁻¹ et doit subir un certain nombre de traitements pour être plus facilement analysable. En particulier, il est nécessaire d'éliminer le fond continu (correction de la ligne de base) et de lisser le spectre parfois.

1) Accumulations et lissages des spectres

Le fait d'augmenter le nombre de spectres pris successivement permet d'améliorer le rapport signal / bruit. Le lissage permet de rendre les comparaisons entre spectres traités plus aisées. De plus, il permet de minimiser le bruit de l'appareillage et les bandes fines de vapeur d'eau résiduelle (surtout en IR) dans les spectres (15 itérations sont suffisantes).

2) Exploitation des spectres Raman et infrarouge

Les fréquences des différentes vibrations sont dépendantes de la géométrie moléculaire, des masses des atomes et du champ de forces intramoléculaire. Chaque raie est caractérisée par sa position dans le spectre (sa fréquence), son intensité, son profil et son état de polarisation.

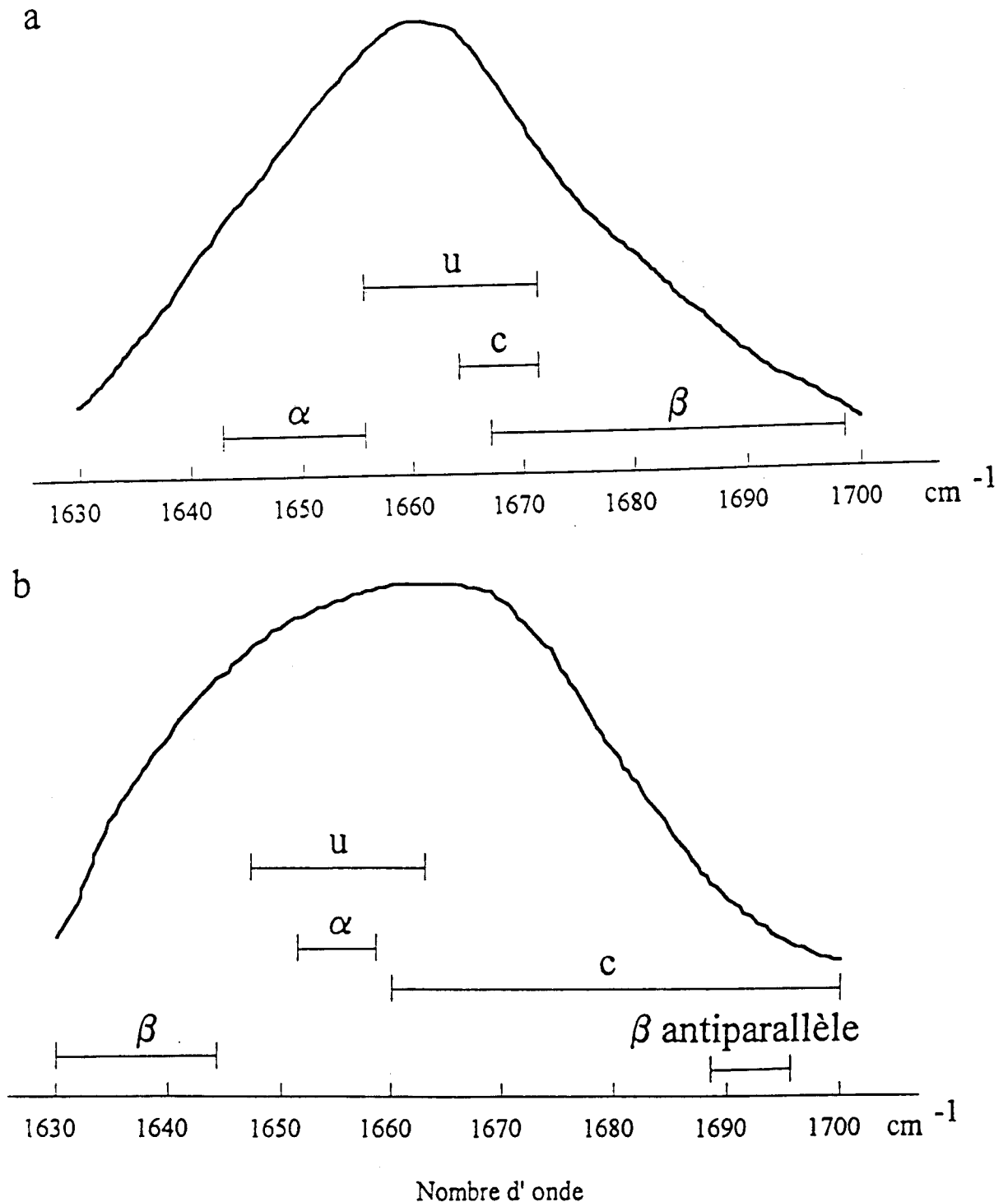


Figure III.8: Domaine de fréquences des différentes structures secondaires d'après Krimm et Bandekar [27]; (a) dans la bande amide I Raman; (b) dans la bande amide I infrarouge; α : hélice α , β : feuillets β et u: forme indéterminée.

3) Attributions des composantes spectrales

Pour l'étude des protéines, un spectre Raman est plus riche en informations qu'un spectre infrarouge. En effet, dans **un spectre Raman**, on peut y repérer des **bandes** caractéristiques des **acides aminés des chaînes latérales**, des bandes du **squelette carboné** et enfin des bandes de **la liaison peptidique**. En revanche, **un spectre infrarouge** ne présente essentiellement que des **bandes** de la **liaison peptidique**.

Les attributions des diverses bandes observées dans les spectres de vibration des protéines sont faites à l'aide de la littérature [27,39,40]. La bande amide I peut présenter plusieurs composantes dont l'activité optique diffère en infrarouge et en Raman. Dans des travaux développés par Bandekar [41], il a montré que pour un polymère de structure secondaire homogène, les vibrations responsables de ces bandes pourraient s'expliquer par les couplages mécaniques et dipolaires entre les carbonyles impliqués dans les motifs peptidiques successifs le long d'une chaîne polypeptidique et entre ceux qui sont liés par des liaisons hydrogène qui s'établissent entre ces chaînes. Ces couplages qui diffèrent dans le cas des structures secondaires, seraient à l'origine des différences spectrales observées pour ces deux structures. A partir des calculs de champ de forces selon la méthode de Wilson [42], il a proposé une attribution complète des spectres de vibration d'homopolypeptides de structures déterminées: différents types de structures en hélices α , différents types de structures en feuillets β -plissés (parallèles et antiparallèles) et différents types de structures de coudes (Voir Figures III.6B). Cependant compte tenu du grand nombre de vibrations et de couplages possibles, de nombreuses indéterminations persistent dans l'attribution des spectres de l'ensemble.

D) Etudes spectroscopiques des protéines

Nous avons représenté sur la Figure III.9 un exemple typique de spectres FT-IR (**A**) et FT-Raman (**B**) caractéristiques d'une protéine donnée. Les domaines des bandes amide les plus importantes dans les spectres infrarouge (I et II) et dans les spectres Raman (I et III) sont regroupés dans les Tableaux III.3a et 3b.

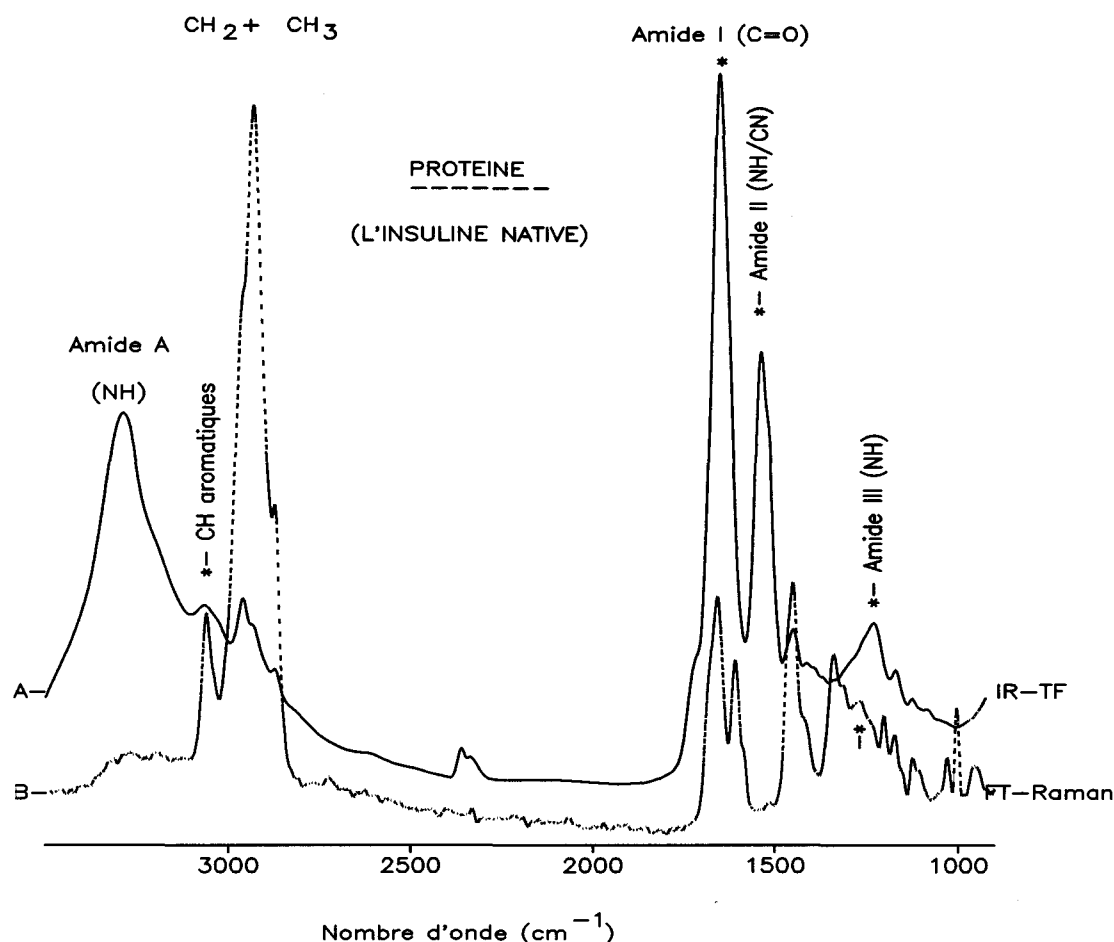


Figure III.9: Spectres d'absorption FT-IR (A) et de diffusion FT-Raman (B) d'une protéine.

1) *Les bandes de la liaison peptidique*

Les corrélations entre les fréquences de vibration amide I et les structures secondaires des protéines (Voir Figure III.8) sont plutôt empiriques que théoriques. Elles sont justifiées par de nombreuses données expérimentales obtenues par les spectrométries infrarouge et Raman pour les protéines et les peptides dont les proportions de structures hélicoïdales (α), de feuillets plus ou moins étendus (β), de coudes β ou de forme désordonnée étaient connues à partir de l'analyse par diffraction de RX de ces composés dans leur forme cristallisée [30,31,34].

La bande amide A ($3280-3300\text{ cm}^{-1}$) est due au mode d'élongation $\nu\text{N-H}$. Elle est de moyenne intensité dans les spectres IR et de faible intensité dans les spectres Raman.

La **bande amide I** correspond à la contribution de **80%** et de **20%** des modes $\nu\text{C=O}$ et $\nu\text{C-N}$. Elle est de forte intensité en **IR** et de moyenne intensité en Raman. Pour l'**hélice α** , elle apparaît dans la même région entre **1650-1660 cm^{-1}** en **Raman et en IR**. Pour la **forme désordonnée**, elle apparaît à **1665 cm^{-1}** en Raman et à **1655 cm^{-1}** en IR. Enfin; pour les **feuillets β -plissés**, elle apparaît entre **1666-1676 cm^{-1}** en Raman et entre **1628-1635 cm^{-1}** en IR. Parfois, on peut observer une petite bande en IR entre **1680-1700 cm^{-1}** caractéristique des **coudes β** . Ainsi, la bande amide I permet de distinguer entre les structures α , β et désordonnée dans les spectres Raman, mais pas entre la structure β et la forme désordonnée. En revanche, dans les spectres IR, elle permet de distinguer entre les structures α et β , mais pas entre la structure α et la forme désordonnée. De plus sa largeur est restreinte en Raman par rapport à l'IR, ce qui permet de mieux distinguer entre les composantes α et β quand la quantité des protéines de structure β est faible dans l'échantillon à étudier.

La **bande amide II** est due à la contribution de **60%** des modes de déformations $\delta\text{N-H}$ et de **40%** des modes d'élongations $\nu\text{C-N}$. Elle est de moyenne intensité en IR et de très faible intensité en Raman (Voir inexistante) et apparaît en **IR et Raman** entre **1545-1551 cm^{-1}** pour l'**hélice α** et entre **1521-1525 cm^{-1}** pour les **feuillets β** .

La **bande amide III** est moins définie, elle est due aux modes $\nu\text{C-N}$ couplés à ceux des $\delta\text{N-H}$ dans le plan, $\nu\text{C-C}$, $\delta\text{C=O}$ et des modes des wCH_2 des acides aminés des chaînes latérales. Elle apparaît en **Raman et en IR** entre **1230-1300 cm^{-1}** . Dans les spectres **Raman**, elle apparaît entre **1230-1240 cm^{-1}** pour les **feuillets β** , à **$\sim 1252 \text{ cm}^{-1}$** pour la forme **désordonnée**, et **1260-1295 cm^{-1}** pour l'**hélice α** [43,44], ce qui permet parfois de distinguer entre les structures α et désordonnée.

Les **bandes amide IV à VII** sont mal définies et sont de faibles intensités en IR et Raman. Les bandes amide **IV et V (γNH)** apparaissent entre **600 et 800 cm^{-1}** pour l'**hélice α** et les **feuillets β -plissés**.

Tableau III.3a: Domaines d'apparition des composantes associées aux bandes amide I et II dans les spectres FT-IR pour l'hélice α , les feuillets β -plissés et la forme désordonnée [43,44].

Structure secondaire	<u>Bandes amide IR</u>	
	Amide I	Amide II
L'hélice α	1650-1657 cm^{-1}	1540-1550 cm^{-1}
La forme désordonnée (d)	idem	idem
Les feuillets β	1628-1635 cm^{-1}	1520-1530 cm^{-1}

Tableau III.3b: Domaines d'apparition des composantes associées aux bandes amide I et III dans les spectres Raman pour l'hélice α , les feuillets β -plissés et la forme désordonnée [43,44].

Structure secondaire	<u>Bandes amide Raman</u>	
	Amide I	Amide III
L'hélice α	$\sim 1651\text{--}1661$	~ 1267
La forme désordonnée (d)	~ 1661	~ 1252
Les feuillets β	1667–1673	entre 1230 et 1240 (Parfois inexistante)

2) Les bandes Raman caractéristiques des résidus d'acides aminés

Nous présentons les raies dont les fréquences sont situées entre 1800-900 cm^{-1} :

* aromatiques

- Tyrosine (Tyr) (Y): 1618, 1578, 1206 et 1176 cm^{-1} .
- Phénylalanine (Phe) (F): 1618, 1585, 1207, 1183, 1033 et 1006 cm^{-1} .
- Tryptophane (Try) (W): 1618, 1582, 1553, **1363**, 1338 et 1014 cm^{-1} .

La raie à 1363 cm^{-1} renseigne sur l'environnement; plus elle est intense, plus les résidus du tryptophane sont enfouis dans la protéine.

* Bases aminées

- Histidine (His) (H) et Arginine (Arg) (R): 1282 cm^{-1}

* Acides carboxyliques

- Acide aspartique (Asp) (D) et Acide glutamique (Glu) (E): 1585 et 1565 cm^{-1} .

D'autres bandes peuvent apparaître entre 1770-1700 cm^{-1} . Elles sont attribuées aux modes νCO des groupements carboxyliques. Ils donnent lieu à des modes de plus hautes fréquences lorsqu'ils sont localisés dans les domaines hydrophobes que lorsqu'ils sont associés à des fonctions polaires

* Soufrées

- Vibrations d'élongations $\nu\text{S-S}$ des ponts disulfures sensibles aux modifications de l'environnement local: 541 et 524 cm^{-1} .

- Vibrations d'élongations $\nu\text{C-S}$ des résidus Méthionine (Mét) (M) et Cystéine (Cys) (C): 674 cm^{-1} et 732 cm^{-1} .

3) Les bandes du squelette

- Les raies situées dans les régions 930-1000 cm^{-1} et 1050-1100 cm^{-1} correspondent respectivement aux vibrations d'élongations $\nu\text{C}\alpha\text{-C}$ et $\nu\text{C}\alpha\text{-N}$, et sont fortement perturbées par les solvants.

- Les raies situées dans la régions entre 3300-2800 cm^{-1} : $\nu\text{CH arom}$, $\nu\text{CH}_3 + \nu\text{CH}_2$.

	$\nu_{\text{as}} + \nu_{\text{s}}\text{CH}_2$	$\nu_{\text{as}} + \nu_{\text{s}}\text{CH}_3$	δCH_2	δCH_3	CH_{arom}
IR	2922 et 2852	2956 et 2874	1457	1468	-
Raman	2883 et 2852	2958 et 2931	1451	1438	3060

2.2 LIPIDES ET ACIDES NUCLEIQUES

Les lipides et les acides nucléiques font partie des composantes principales du tissu biologique, ainsi leurs caractérisations aideraient à mieux attribuer les bandes observées dans les spectres de vibration du tissu.

2.2.1 Description

A) *Lipides*

Les lipides du tissu biologique sont principalement constitués d'environ 60 à 70% **de phospholipides**, 20% de **sphingolipides** et 20% du **cholestérol**. Ils sont principalement localisés dans les membranes plasmiques et dans la gaine de myéline qui enveloppe les axones. Les structures chimiques de ces trois lipides sont représentées sur la Figure III.10.

Les phospholipides présentent comme maillon de base, la chaîne carbonée du glycérol (**a**). En position 1 et 2 sont fixés des acides gras par une liaison ester pour former un diglycéride. Les acides gras saturés les plus courants sont l'acide palmitique (C_{16}) et l'acide stéarique (C_{18}). Les acides gras insaturés sont représentés notamment par l'acide oléique (C_{18} , avec une liaison double en C_9) et l'acide arachidonique (C_{20} , avec 4 liaisons doubles) (**a**). La position de la double liaison dans la chaîne carbonée de l'acide gras détermine sa **conformation trans** ou **cis**. Un acide gras peut interagir sous sa forme ionisée avec des sites hydrophobes.

Les sphingolipides sont composés par une sphingosine et un alcool aminé à longue chaîne. Pour former la sphingomyéline (**b**), constituant principal de la myéline des axones des cellules nerveuses, l'alcool aminé est lié en position 2 à un acide gras par une liaison amide, et estérifiée en position 3 par une phosphorylcholine.

Le cholestérol est formé d'une partie alcool et d'une partie aliphatique (**c**).

B) *Acides nucléiques*

Les acides nucléiques, l'ADN (adénosine désoxyribonucléique) et l'ARN (adénosine ribonucléique) sont principalement localisés dans les noyaux des cellules et renferment le matériel génétique.

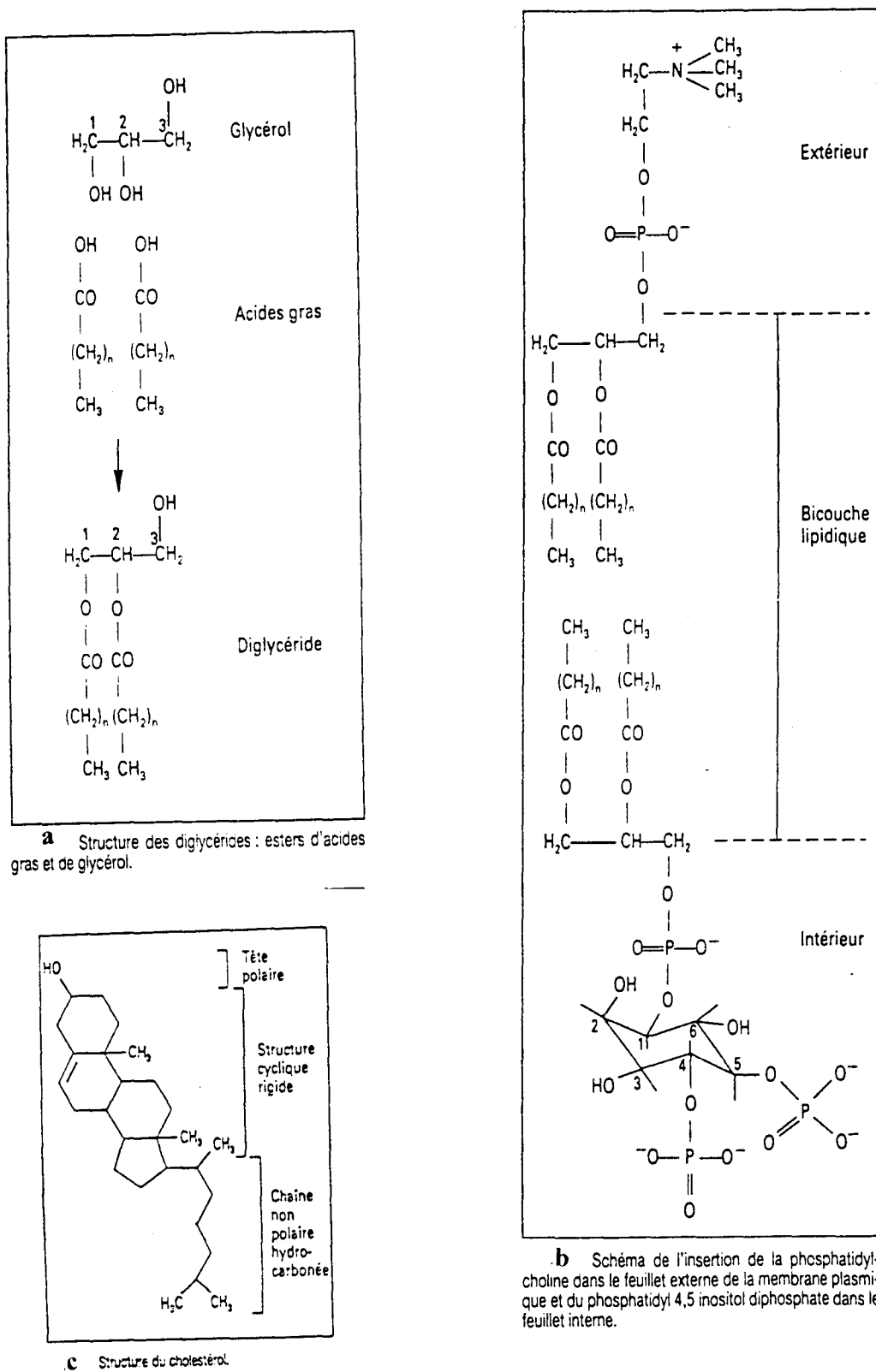


Figure III.10: Structures chimiques des diglycérides: esters d'acides gras et du glycérol (a), de la sphingomyéline (b) et du cholestérol (c).

2.2.2 Etudes spectroscopiques

Nous présentons quelques spectres de vibration caractéristiques des lipides et des acides nucléiques dans le but de mieux caractériser le tissu, mais aussi pour identifier les composantes (autres que les protéines) qui seraient susceptibles d'interagir avec le RC.

A) *Spectrométrie d'absorption infrarouge*

Sur la Figure III.11 sont représentés deux spectres FT-IR montrant un exemple de lipides [phospholipides ou diméthylphosphatidylcholine (DMPC)] et un exemple d'acide nucléique (l'ADN).

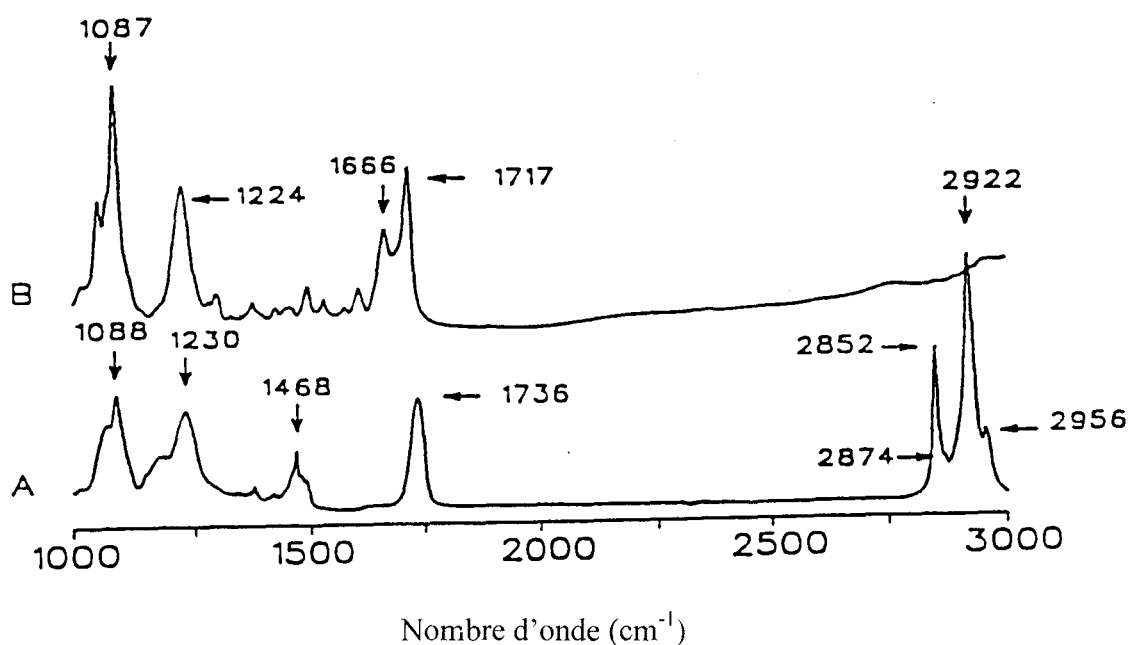


Figure III.11: Spectres d'absorption infrarouge montrant un exemple de phospholipides (DMPC) (A) et un exemple d'acide nucléique (l'ADN) (B) [46].

Dans le spectre FT-IR caractéristique des lipides (A), on observe des bandes intenses (valable pour tous les lipides) dans la région entre $2800-3000\text{ cm}^{-1}$, et par analogie aux spectres des alcanes, ces bandes ont été attribuées aux modes de **valence asymétriques et symétriques** des groupements méthyles CH_3 (2956 et 2874 cm^{-1}) et acyles CH_2 (2922 et 2852 cm^{-1}) des chaînes alkyles/acyles **des acides gras** [39,40-51]. Comme le nombre de groupements acyles ($-\text{CH}_2$) dans les phospholipides est plus élevé que celui des groupements alkyles ($-\text{CH}_3$) (on compte environ 18 CH_2 pour 1 CH_3), l'intensité des bandes dues aux modes CH_2 est 10 à 20 fois supérieure à celle des CH_3 . Dans cette même

région, les intensités des bandes d'absorption dans le spectre (B) caractéristique des acides nucléiques sont très réduites. Ces faibles bandes dues aux modes $\nu\text{C-H}$ des **bases des nucléotides**, sont observés dans les spectres de polynucléotides.

La région spectrale entre $1800\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ est en général **dépourvue d'absorptions** dans le cas des **matériaux biologiques**. Quant à la région entre $1600\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$, attribuée aux modes $\nu\text{C=O}$, **elle renferme** une bande à 1736 cm^{-1} qui est due aux mode d'élongation des **esters** d'acides gras des lipides. Pour des lipides isolés, cette bande est sensible à l'hydratation [45,46], sa position peut donc changée. Les acides nucléiques présentent deux bandes typiques dans cette région (à 1717 et 1666 cm^{-1}), attribuées aux modes $\nu\text{C=O}$ des **bases purique** et **pyrimidique** [51].

La région entre $1250\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ est peuplée par des faibles bandes, dont une relativement intense à 1468 cm^{-1} qui est attribuée au mode δCH_2 des lipides. Les bandes qui dominant dans la région entre $1000\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$ sont dues aux modes de vibrations des groupements **phosphates**. Dans cette région, le spectre de l'ADN présente deux bandes situées respectivement à 1224 ($\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$) et 1087 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}}\text{PO}_2^-$), et celui des lipides présente aussi deux bandes situées à 1230 ($\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$) et 1088 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}}\text{PO}_2^-$).

B) Spectrométrie de diffusion Raman

Sur la Figure III.12 est représenté le spectre FT-Raman de la graisse prélevée d'un sein humain. Dans ce spectre, on distingue quatre domaines pour les vibrations Raman caractéristiques des Acides Gras insaturés. Les attributions des bandes sont rassemblées dans le Tableau III.4, et ont été faite à partir des spectres Raman de l'oléate de sodium (C_{18} avec une double liaison en C_9) [47-50].

* Le domaine de 2800 à 3000 cm^{-1} : Modes des élongations νCH_2 et νCH_3 des groupements méthylènes (CH_2) et méthyles (CH_3).

* La bande à 1747 cm^{-1} : Modes de vibrations d'élongations $\nu\text{C=O}$ des groupements **esters**.

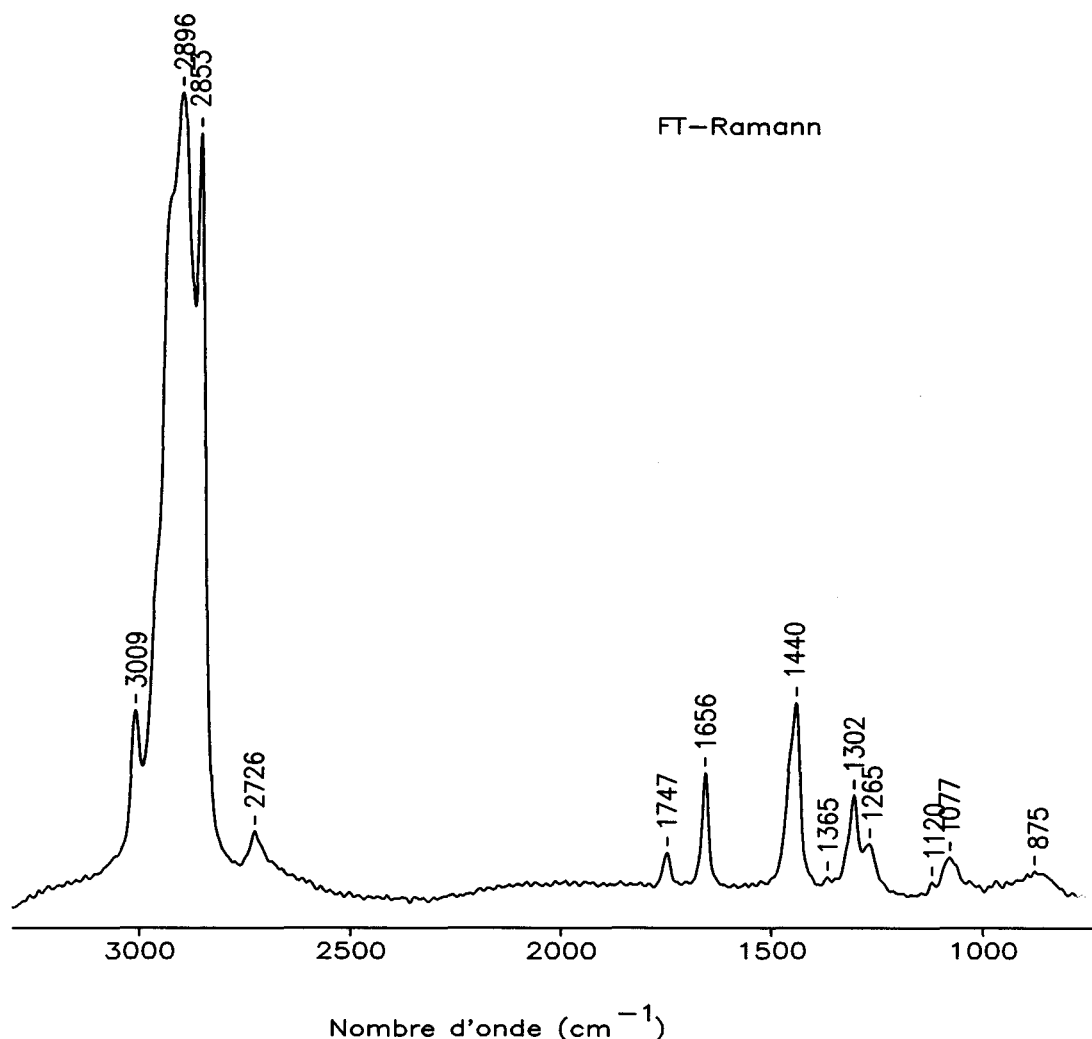


Figure III.12: Spectre FT-Raman d'un échantillon de graisse prélevé d'un sein d'une personne saine

Le domaine de **1650 à 1700 cm^{-1}** : Vibrations d'élongations $\nu\text{C}=\text{C}$ de la double liaison des acides gras insaturés. La bande caractéristique de cette vibration apparaît vers **1656 cm^{-1}** pour des lipides de **conformation cis** et vers **1670 cm^{-1}** pour les lipides de **conformation trans**. Dans le cas où le tissu cérébral sain renfermerait ce genre de lipides (trans), ceci risquerait de poser un problème pour le diagnostic spectroscopique de la MA. A ce propos, nous rappelons que ce dernier serait fiable seulement si le tissu sain ne contient pas des protéines de conformation bêta ou toute autre composante dont le domaine d'apparition se chevaucherait avec celui des protéines amyloïdes, ce qui rendrait l'interprétation des spectres difficile. Cependant, on peut constater que le spectre de graisse présenté sur la Figure ci-dessus ne présente pas de bande à **1670 cm^{-1}** , mais plutôt une

bande à 1656 cm^{-1} indiquant que les lipides du sein sont de conformation **cis**. Il n'est donc pas exclu que les lipides du tissu cérébral seraient de conformation **cis**.

* Le domaine de $1438\text{ à }1450\text{ cm}^{-1}$: Vibrations de déformation angulaire δCH_2 et δCH_3 des acides gras des lipides. Dans ce spectre, la bande à 1440 cm^{-1} est attribuée au mode δCH_2 .

* Le domaine de $1000\text{ à }1200\text{ cm}^{-1}$: Vibrations d'élongation du squelette $\nu\text{C-C}$.

Tableau III.4: Attributions des fréquences des spectres Raman de la graisse du sein [47-50].

Bandes Raman (cm^{-1})	Groupements	Attributions
Graisse du sein		Modes de vibrations
2960	méthyl	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$
2896	polyméthylène	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$
2855	polyméthylène	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$
1747	esters	$\nu(\text{COO})$
1656	double liaison cis	$\nu(\text{C}=\text{C})$
1440	polyméthylène	$\delta_{\text{sc}}(\text{CH}_2)$
1365	méthyl	$\delta_{\text{s}}(\text{CH}_2)$
1302	polyméthylène	$\delta_{\text{t}}(\text{CH}_2), \delta_{\text{r}}(\text{CH}_2)$
1265	double liaison cis	$\delta(\text{C-H})$
1120	double liaison cis	$\nu_{\text{s}}(\text{C-C})$
1077	phosphates	νPO_2^-

ν : Stretching, δ : Bending, r: Rocking, sc: Scissoring, t: Twisting, w: Wagging, s: Symétrique, as: Anti-Symétrique.

III.3 ETUDES DES INTERACTIONS *IN VITRO* ET *IN SITU*

Nous nous sommes proposés, au moyen des spectrométries (Raman, infrarouge et UV-visible) de détecter les protéines amyloïdes dans le tissu cérébral de malades Alzheimer et d'étudier le mécanisme de leurs interactions avec le rouge Congo (RC) dans le tissu dans le but de pouvoir diagnostiquer la MA *in vivo*. Nous avons ainsi présenté des caractéristiques physico-chimiques du RC et des structures secondaires des protéines. Nous avons émis des hypothèses quant aux possibilités d'interactions entre le RC et les autres composantes principales du tissu, nous avons donc étudié des lipides et des acides nucléiques.

Nous présenterons dans cette dernière partie de ce chapitre III, les résultats obtenus pour les études du mécanisme d'interaction entre le RC et les protéines amyloïdes *in vitro*, puis dans le tissu cérébral de malades Alzheimer.

3.1 INTERACTIONS *IN VITRO*

Les protéines que nous avons étudiées étaient sélectionnées selon certains critères. **Les peptides amyloïdes synthétiques $\beta(1-28)$ et $\beta(16-28)$** sont deux fragments du peptide **$A\beta(1-42)(43)$** . Ils contiennent tous les deux des résidus amines chargés positivement. Nous avons voulu voir s'ils étaient capables d'assurer une interaction avec le RC et dans le cas positif, voir si cette interaction est de même nature.

L'insuline bovine est de structure **native α** [52], elle peut adopter une **structure en feuillets β -plissés** en milieu **acide** qui reste stable même si l'on revient en milieu neutre. Cette protéine est considérée comme étant **un bon modèle** de l'amyloïde.

Selon l'origine du ver à soie, **la fibroïne de soie** est une protéine **fibrillaire** qui peut être soit de **structure β** , soit de **structure α** [53]. Cette protéine est considérée comme étant un bon modèle de l'amyloïde. Cependant, elle est riche en acides aminés non chargés positivement tels que l'alanine, la glycine et la serine [54]. Notre objectif est de voir si la structure fibrillaire est suffisante pour assurer son interaction avec le RC.

Les fibres de **collagène** que nous avons étudiées sont de structure en **hélice α** alors que les fibres **d'élastine** sont de forme **désordonnée** [55]. Ces protéines sont des composantes **majoritaires** du tissu conjonctif qui ne contiennent pas des résidus amines, et pourtant, elles exhibent une biréfringence verte après coloration au RC. Cette observation indique une interaction possible, que nous avons voulu caractériser spectroscopiquement.

La **poly-L-sérine** et la **polyglycine** sont deux polypeptides commerciaux de **structures natives β** [52] non chargés positivement. La poly-L-sérine est riche en groupements hydroxyles (-OH). Nous nous sommes demandé si ces groupements pouvaient être mis en jeu dans l'interaction. L'étude de ces peptides peut aussi aider dans l'attribution de certaines bandes observées dans les spectres de vibration du tissu.

3.1.1 Etudes conformationnelles des protéines

Toutes les protéines ne sont pas forcément des bons modèles de l'amyloïde; elles ne sont pas toujours capables d'assurer une conformation β . Le degré de dénaturation varie d'une protéine à l'autre et dans la plupart des cas on obtient un mélange de conformations α et β . Pour notre étude, nous avons estimé que le degré de dénaturation est satisfaisant quand l'intensité de la composante β associée à la bande amide I dans les spectres de vibration est supérieure à celle de la composante α . Avant d'étudier leurs modes de fixation au RC, nous avons analysé les structures conformationnelles par spectrométries FT-IR (Figures III.13 et 14) et FT-Raman (Figures III.15) des protéines que nous avons étudiés avant et après dénaturation, ainsi que celles des peptides amyloïdes.

A) Spectrométrie FT-IR

1) Insuline β

Les spectres d'absorption infrarouge de la Figure III.13 montrent la conversion de l'insuline native de sa conformation en hélice α à sa forme fibrillaire en feuillets β -plissés. Ainsi, la bande amide I qui apparaît à 1657 cm^{-1} dans le spectre de l'insuline native (**a**) se déplace vers 1632 cm^{-1} quand la protéine se convertie à la conformation β (**c**). Le faible épaulement à 1660 cm^{-1} est due aux faible pourcentage de protéines non transformées qui sont incorporées dans la structure β . La bande à 3300 cm^{-1} augmente en intensité et se déplace vers les faibles fréquences (3275 cm^{-1}) quand la protéine passe de sa structure α à la structure β . Le spectre (**b**) montre une transformation intermédiaire montrant la présence

simultanée des composantes α et β associées aux bandes amide I, II et III. La bande amide I caractéristique de la composante β est plus précise que celle de la composante α indiquant une régularité des liaisons hydrogène imposées par la conformation en feuillets β -plissés.

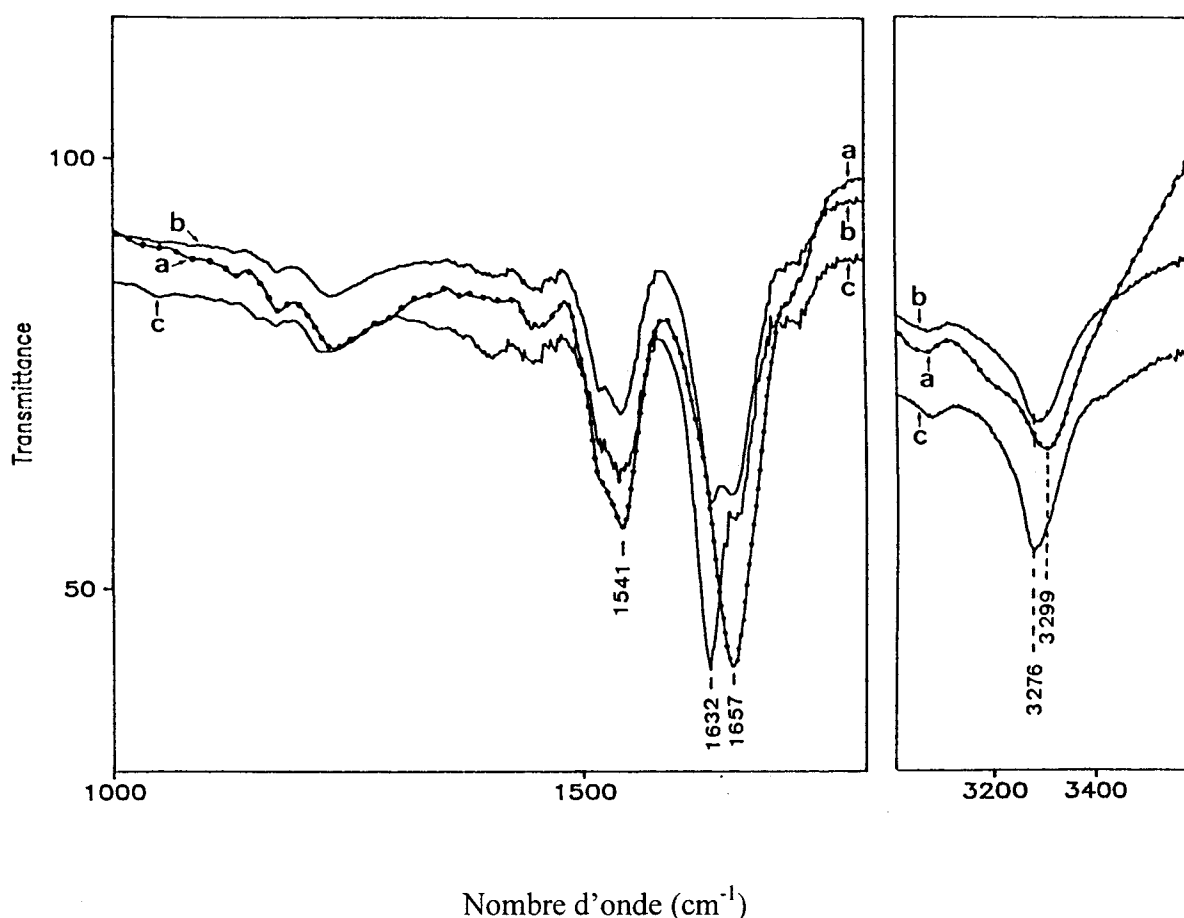


Figure III.13: Spectres d'absorption FT-IR de films obtenus à partir de 5,7 mg / ml de l'insuline native en solution aqueuse avant et après dénaturation. a) Insuline native (hélice α), b) dénaturation partielle (hélice α + feuillets β) et c) insuline totalement dénaturée (structure β).

2) *peptide A β (1-28) et Autres protéines*

Dans le cas du peptide amyloïde A β (1-28), quelques microgrammes de ce peptide ont suffi pour les analyses microinfrarouge. Nous avons d'abord analysé la structure conformationnelle de sa séquence qui apparaît sous microscope optique sous forme de fibres. Les analyses des spectres micro-infrarouge du peptide A β (1-28) (Figure III.14 (—)) confirment sa structure β . La bande amide I montre une composante intense à 1624 cm^{-1} , caractéristique de la structure β , et un épaulement à 1656 cm^{-1} , due à une quantité minime

des formes non- β . L'épaule à 1694 cm^{-1} est caractéristique des coudes β ; il a été montré que ce peptide est en vérité agrégé dans sa forme en feuillets β -plissés.

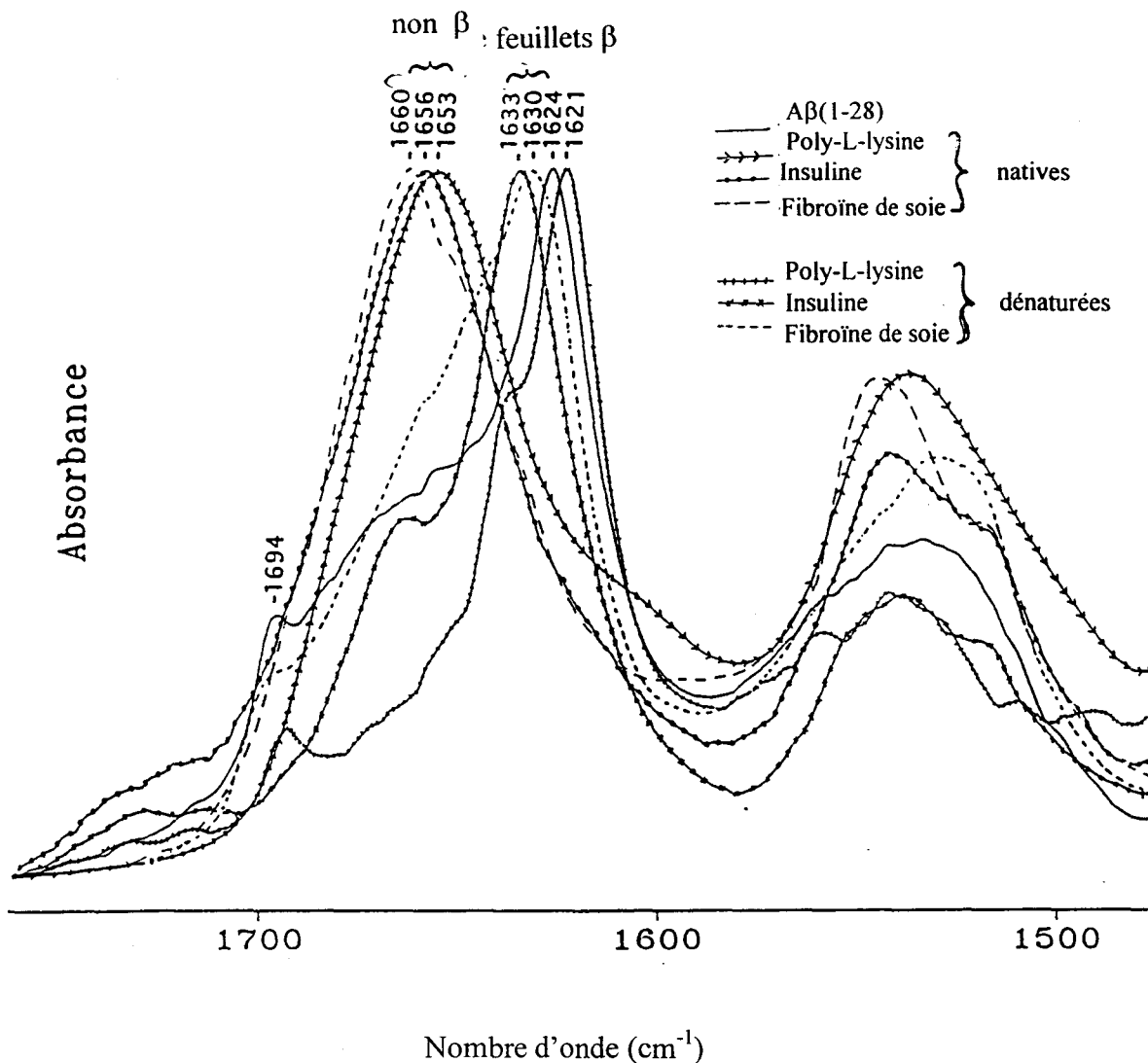


Figure III.14: Spectres d'absorption FT-IR montrant les structures secondaires des protéines (l'insuline, la poly-L-lysine, la fibroïne de soie) avant et après dénaturation. Les spectres des protéines dénaturées sont comparés au spectre du peptide A β (1-28) dans sa conformation native en feuillets β -plissés.

Sur cette même Figure III.14, nous avons rassemblé des spectres FT-IR obtenus pour la poly-L-lysine, l'insuline et la fibroïne de soie BM, avant et après dénaturation. Le but recherché est de montrer que la spectrométrie IR permet de **distinguer** entre les composantes **non- β** et β associées à la bande amide I. Ainsi, dans l'ensemble des spectres étudiés, la bande amide I apparaît entre $1653\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$ pour les protéines de structures natives **non- β** et entre $1621\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$ pour ces **protéines dénaturées** de structures β .

B) Spectrométrie FT-Raman

Nous avons représenté sur la Figure III.15 des spectres FT-Raman du peptide A β (1-28) (A) et de l'insuline avant (C) et après dénaturation (B). Quant au Tableau III.5, il regroupe des résultats obtenus pour les structures secondaires de l'ensemble des protéines que nous avons étudiées par spectrométrie de vibration. Pour les échantillons dénaturés, seules les nombres d'ondes correspondant au maximum d'intensité **de la composante majoritaire** associée aux **bandes amide I et III** sont présentés.

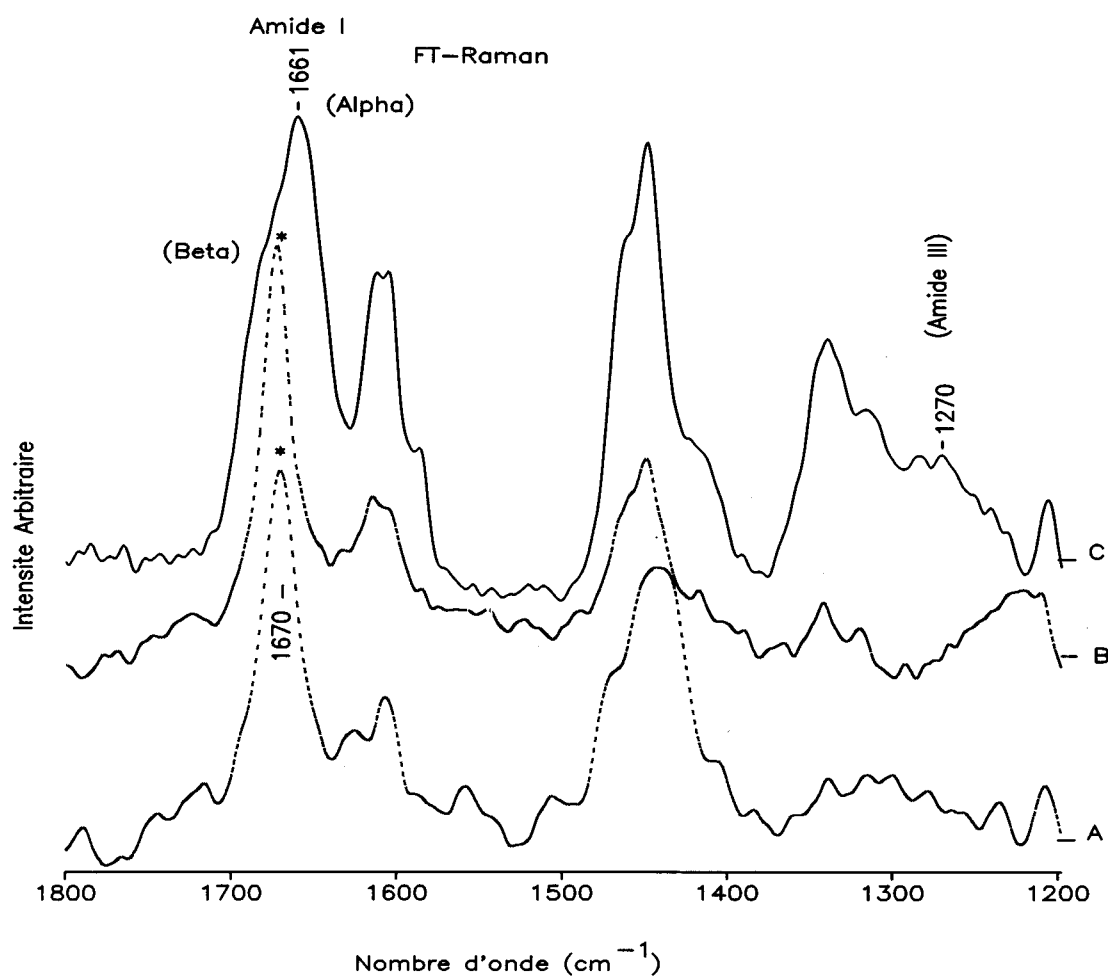


Figure III.15: Spectres FT-Raman des échantillons de poudres du peptide A β (1-28) (A), de l'insuline dénaturée (structure β) (B) et de l'insuline native de (hélice α) (C). Excitatrice=1064 nm et 200 à 500 accumulations.

La bande amide I apparaît dans les spectres FT-Raman à **1661 cm⁻¹** pour l'insuline native (C) et à **1670 cm⁻¹** pour l'insuline dénaturée (B) et le peptide A β (1-28) (A). Ceci indique que l'insuline native est de conformation **non- β** , alors que l'insuline dénaturée et le peptide A β sont de **conformation β** .

La comparaison des bandes Raman amide I et III observées dans les spectres des protéines que nous avons étudiées (Voir Tableau III.5) avec celles de la littérature (Voir Tableaux III.3a et 3b) a permis de montrer que **l'insuline**, la **poly-L-lysine**, la **fibroïne de soie BM** et les **fibres de collagène** seraient de structures en **hélice α** . En revanche, **l'élastine** serait un mélange de structure en **hélice α** et de forme **désordonnée**. On peut ainsi conclure que les spectrométries vibrationnelles IR et Raman peuvent être utilisées pour discriminer un tissu cérébral sain d'un tissu cérébral de malades Alzheimer à condition que le tissu sain ne contient pas des protéines de structures en feuillets β -plissés.

Tableau III.5: Domaines d'apparition des bandes amide I et amide III dans les spectres IR et Raman de protéines de certains échantillons que nous avons étudiés.

Protéines	Fréquences de la bande amide I en (cm ⁻¹)					
	protéines natives			protéines dénaturées		
	IR	FT Raman		IR	FT Raman	
		I	III		I	III
Poly-L-lysine (α)	1653	1660	1267	1621	1670	
Insuline (α)	1657	1661	1269	1634	1668	
Fibroïne de soie BM	1660	1661	1267	1630	1670	1234
Collagène (α)	1652	1652		1628	1668	
Elastine (d)	1651	1661	$\frac{1269}{1251}$	1621	1668	
Polyglycine (β)	1628	1670	1242			
Poly-L-sérine (β)	1628	1673	1239			
Aβ (1-28)	1624 (β)	1670 (β)				
Aβ (16-28)	1621 (β)	1670 (β)				

3.1.2 Interactions entre le RC et des protéines de différentes conformations

A) Spectrométrie d'absorption électronique UV-visible

La spectrométrie d'absorption électronique UV-visible permet d'évaluer en solution la concentration relative du ligand libre et du ligand lié et de montrer les changements induits par cette interaction. Ceci est important car la séparation entre le ligand libre et le ligand lié par filtration est difficile quand la constante de dissociation est supérieur à 10^{-8} M. Pour les études des solutions des mélanges colorant-protéine, seul le RC présente une

bande d'absorption (π - π^*), en raison de ses électrons délocalisés. La **présence** d'interactions entraîne un changement dans sa structure électronique, ce qui donne lieu à un **spectre différent**, mais aussi à un **changement de coloration**. A l'inverse, en **absence d'interactions**, son **spectre** et la **couleur** de la solution restent **inchangés**.

Pour obtenir le maximum de colorant lié, nous avons travaillé avec une quantité de protéine nettement supérieure à celle du colorant et attendu entre 5 à 30 minutes avant l'acquisition des spectres. Sur la Figure III.16, nous avons représenté des spectres d'absorption UV-visible du RC seul (—), du RC-peptide A β (16-28) (.....), du RC-insuline dénaturée (β) (---) et du RC-peptide A β (1-28) (-.-.-).

Lors des préparations des mélanges, les solutions obtenues étaient de couleur rouge. Au bout de quelques minutes, nous avons observé une coloration rose vif pour le peptide A β (16-28) et l'insuline (β), et rose-orangée pour le peptide A β (1-28). Ce changement de coloration témoigne d'une interaction intervenue entre le ligand et le substrat, qui s'est confirmée dans les spectres d'absorption UV-visible de ces solutions (Figure III.16).

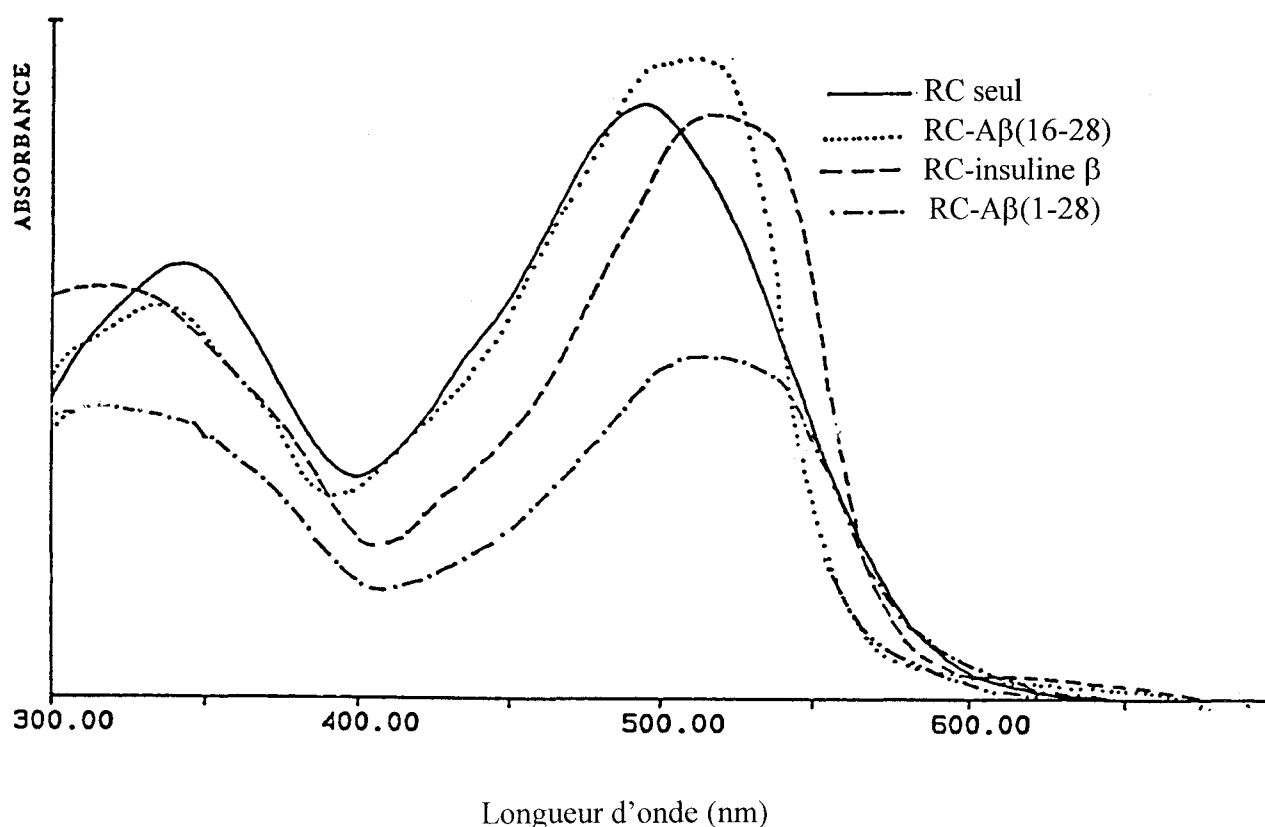


Figure III.16: Spectres d'absorption électronique UV-visible obtenus pour des solutions du RC libre et lié (ligand-substrat) préparées dans du tampon phosphate 5 mM à pH=7, $c=10^{-5}$ M: RC seul (—), RC-peptide A β (16-28) (.....), RC-insuline dénaturée (de structure β) (---) et RC-peptide A β (1-28) (-.-.-).

Le maximum de la bande d'absorption apparaît à **498 nm** dans le spectre du **colorant libre** (—). On observe un effet bathochrome et un élargissement des bandes d'absorption du colorant qui deviennent dissymétriques dans les spectres des mélanges. Cette bande apparaît vers **510 nm** pour le peptide **A β (16-28)** (...), et vers **530 nm** pour le peptide **A β (1-28)** (.-.-.) et **l'insuline β** (---). Ceci suggère que la nature **d'interaction** est la même pour le peptide A β (1-28) et l'insuline, mais de nature différente pour le peptide A β (16-28). De plus ce dernier induit un effet hyperchrome, alors que le peptide A β (1-28) induit un effet hypsochrome qui est certainement due à sa faible solubilité (le mélange se dépose très vite au fond de la cellule). Ainsi, on peut conclure que la spectrométrie d'absorption électronique UV-visible permet seulement d'affirmer ou d'infirmer la présence d'interactions.

La structure **fibrillaire**, la **conformation bêta**, la présence des **sites positifs** au sein de la structure, seraient apparemment les conditions nécessaires pour assurer des interactions avec le RC. Parmi toutes les protéines que nous avons étudiées, seules **l'insuline β** , la **poly-L-lysine (β)** et les **peptides amyloïdes β (1-28) et β (16-28)** (Voir p53) répondaient à l'ensemble de ces conditions, les autres ne partageaient pas toutes ces propriétés. Par exemple, les spectres d'absorption UV-visible n'ont révélé aucun changement pour **la fibroïne de soie AP** qui est pourtant **fibrillaire**, de **structure β** , mais riche en **sites négatifs**. Il serait donc évident que le mode d'interaction qui intervient entre le RC et les protéines amyloïdes dépend à la fois de la **conformation** et de la **composition chimiques**. Les études par spectrométries vibrationnelles infrarouge et Raman des protéines amyloïdes et des protéines non-amyloïdes peut aider à mieux comprendre ce mécanisme.

B) Spectrométrie de diffusion FT-Raman

En spectrométrie de diffusion Raman, les bandes du colorant sont intenses, alors que celles des protéines sont pratiquement invisibles, ce qui permet de suivre les changements intervenus dans le spectre du colorant lors des interactions. Pour les préparations des solutions des mélanges, nous avons utilisé un rapport de 1/50 en masse de ligand-substrat afin de s'assurer que tout le ligand soit lié. Cependant, malgré cette quantité importante de protéine, les bandes amides n'apparaissaient pas dans les spectres. Sur la

Figure III.17, nous avons représenté des spectres FT-Raman du RC seul (a), RC-peptide A β (16-28) (b), RC-insuline dénaturée (β)(c) et RC-peptide A β (1-28) (d).

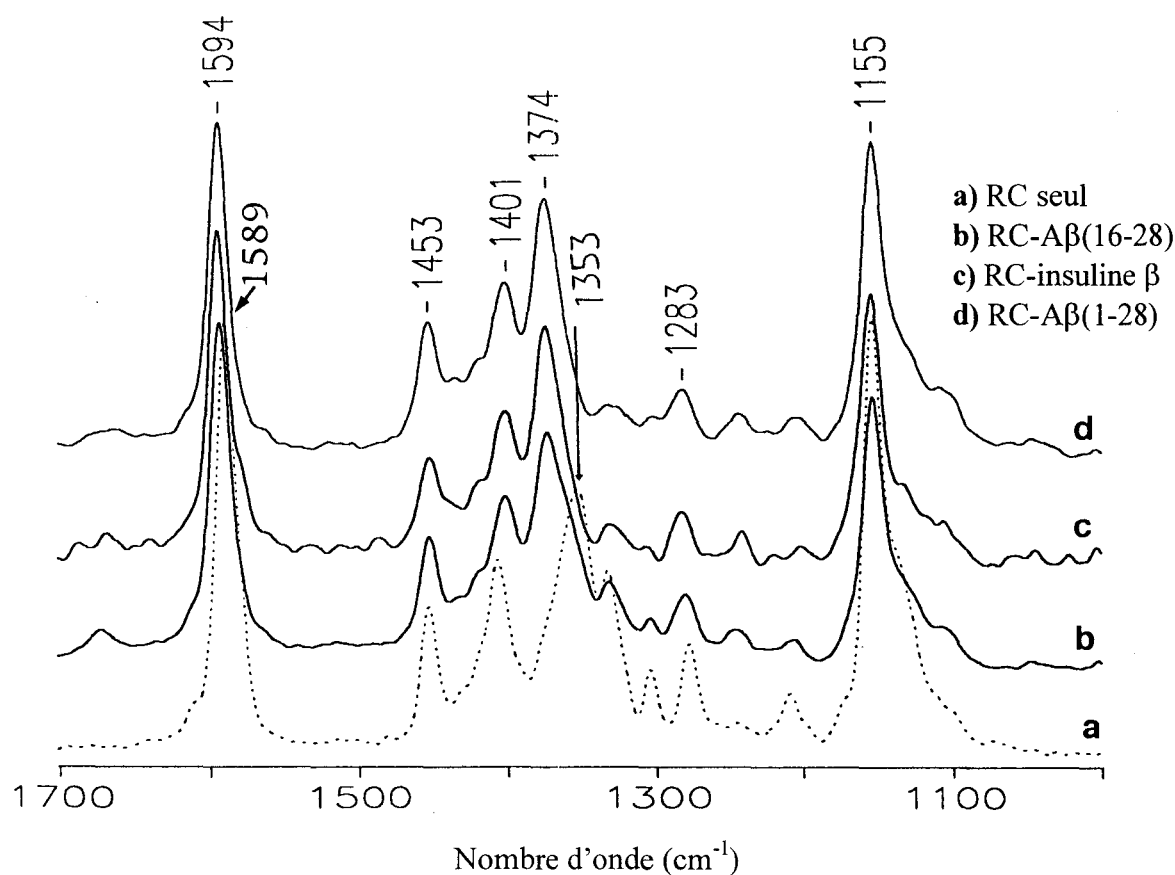


Figure III.17: Spectres FT-Raman obtenus pour des échantillons de poudres du RC seul (a), RC-peptide A β (16-28) (b), RC-insuline dénaturée (β) (c) et RC-peptide A β (1-28) (d).

Les spectres ligand-substrat sont pratiquement identiques entre eux, mais distincts du spectre du colorant libre. Ces substrats semblent induire des changements importants dans la région entre $1250\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$, notamment un déplacement de la bande à 1353 cm^{-1} dans le spectre du colorant libre vers 1374 cm^{-1} ($\nu\text{N}=\text{N}$ (azo)) dans le spectre du mélange. Nous pouvons déduire deux remarques, d'une part que les spectres des mélanges ne laissent paraître que les bandes du colorant, et d'autre part que ce dernier interagit dans sa forme basique (dite **azo**).

D'autres changements moins importants sont observés dans le domaine des vibrations des cycles aromatiques du colorant (1300-1580 cm^{-1}), notamment un léger déplacement de la bande initialement à **1594 cm^{-1}** dans le spectre du colorant seul vers **1589 cm^{-1}** dans les spectres des mélanges. Ceci indique que ces **interactions** impliquent non seulement les groupements **azo**, mais aussi les **cycles aromatiques**. Dans le Tableau III.6, nous avons rassemblé quelques résultats montrant des modifications observées dans les spectres Raman des mélanges.

Tableau III.6: Domaines d'apparition des bandes du RC dans les spectres FT-Raman des interactions RC-protéines et de peptides amyloïdes.

Rouge Congo (RC)	RC-peptide A β (16-28)	RC-insuline β	RC-peptide A β (1-28)	Attributions
1589	1595	1593	1594	$\nu\text{C}=\text{C}$ cycles
1407	1402	1402	1401	$\nu\text{N}=\text{N}$
1353	1374	1374	1374	$\nu\text{N}=\text{N}$
1279	1284	1282	1283	$\nu\text{N}-\text{N}$
1155	1155	1155	1155	$\nu(\text{C}-\text{N}=\text{)}$

C) Spectres d'absorption infrarouge

Pour suivre les variations induites à la fois dans les structures du colorant et des protéines, nous avons utilisé la spectrométrie FT-IR. Mais, certaines bandes des protéines se superposent avec celles du colorant, ce qui complique l'interprétation du spectre du mélange. De plus, il est difficile de diminuer la quantité de substrat sans risquer d'avoir des bandes du colorant non liées. Pour maintenir une intensité correcte des bandes sans utiliser une quantité importante de substrat, il nous a fallu rechercher un rapport ligand-substrat convenable. Après plusieurs essais, le rapport optimal qui permettait d'avoir le maximum de RC lié était de 1/4 (1 mg du colorant pour 4 mg de protéine), mais ce rapport dépend aussi de la solubilité de l'échantillon étudié.

1) RC-insuline β

Pour les études d'interactions de colorant-protéine, les analyses sont limitées aux zones spectrales entre **1000-1800 cm^{-1}** et **3000-3600 cm^{-1}** . Ces domaines de fréquences

sont importants pour nos analyses parce qu'ils couvrent les régions des modes des νNH des groupements **amines** et $\nu\text{S=O}$ des groupements **sulfonyles**, ainsi que les **bandes amide I**, **II** et **III** des polypeptides. Pour les mesures, on enregistre à chaque fois le spectre du ligand seul, le spectre du substrat seul et le spectre du mélange ligand-substrat, puis on superpose les trois spectres pour les analyser.

La Figure III.18 représente les spectres d'absorption FT-IR de l'insuline (β) (**a**), du RC (**b**) et du mélange RC-insuline (β) (**c**). Le spectre du mélange montre des changements importants dans les intensités relatives des bandes observées dans les régions des modes νNH , aussi bien que celles observées à 1170 et 1230 cm^{-1} . Ce domaine correspond aux modes des vibrations des groupements SO_3^- du colorant.

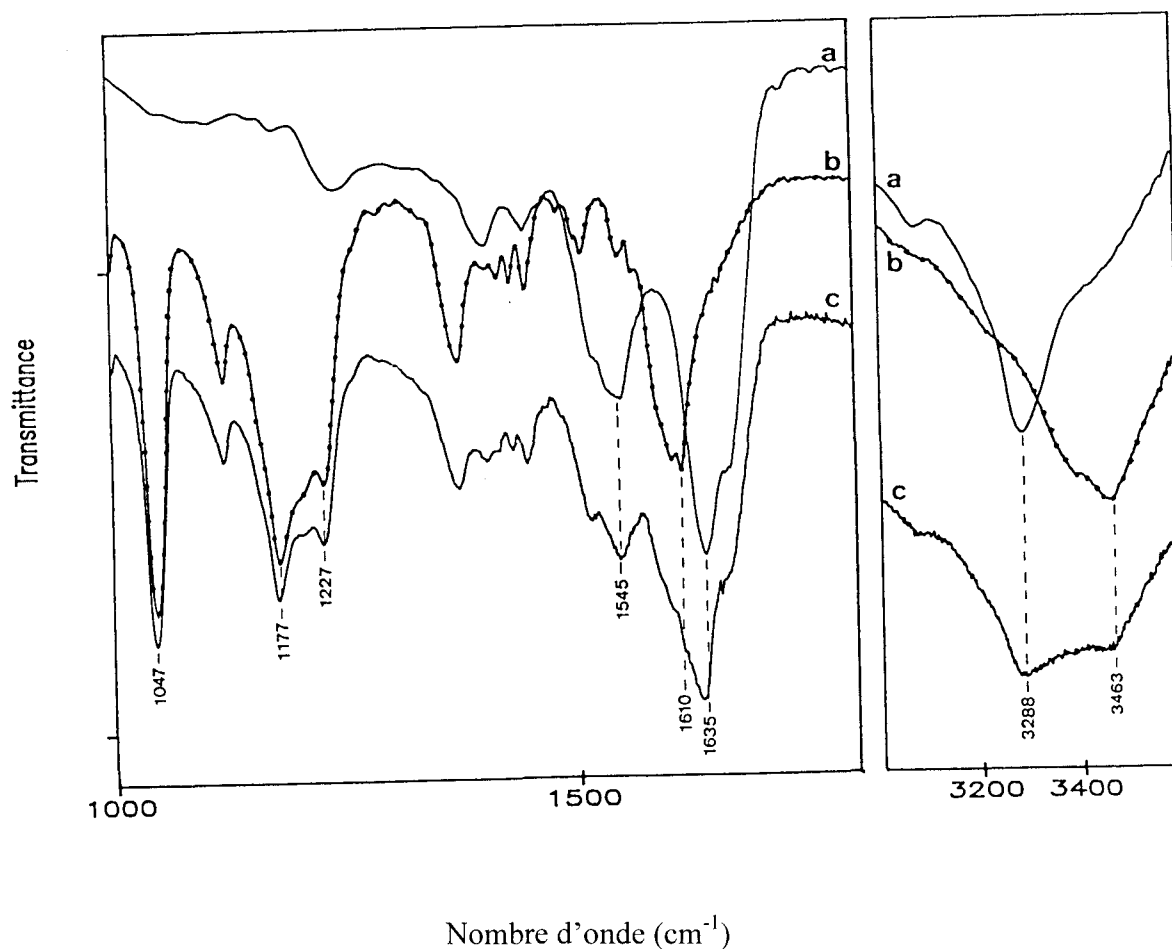


Figure III.18: Spectres d'absorption FT-IR de films obtenus dans du tampon phosphate 5mM à pH=7. **a**) 5,7 mg / ml de l'insuline dénaturée (de structure β), **b**) 5,6 mg / ml du RC seul, **c**) RC-insuline [56].

2) *RC-peptide A β (1-28)*

La Figure III.19 représente les spectres d'absorption FT-IR du RC (a), du peptide A β (1-28) (b), et du peptide A β (1-28) coloré au RC (c). Le spectre des fibres colorées montre des différences dans les intensités relatives des bandes amide par rapport aux spectres des échantillons seuls. La bande amide I augmente en intensité par rapport à la bande amide II et à l'épaule due aux formes non- β .

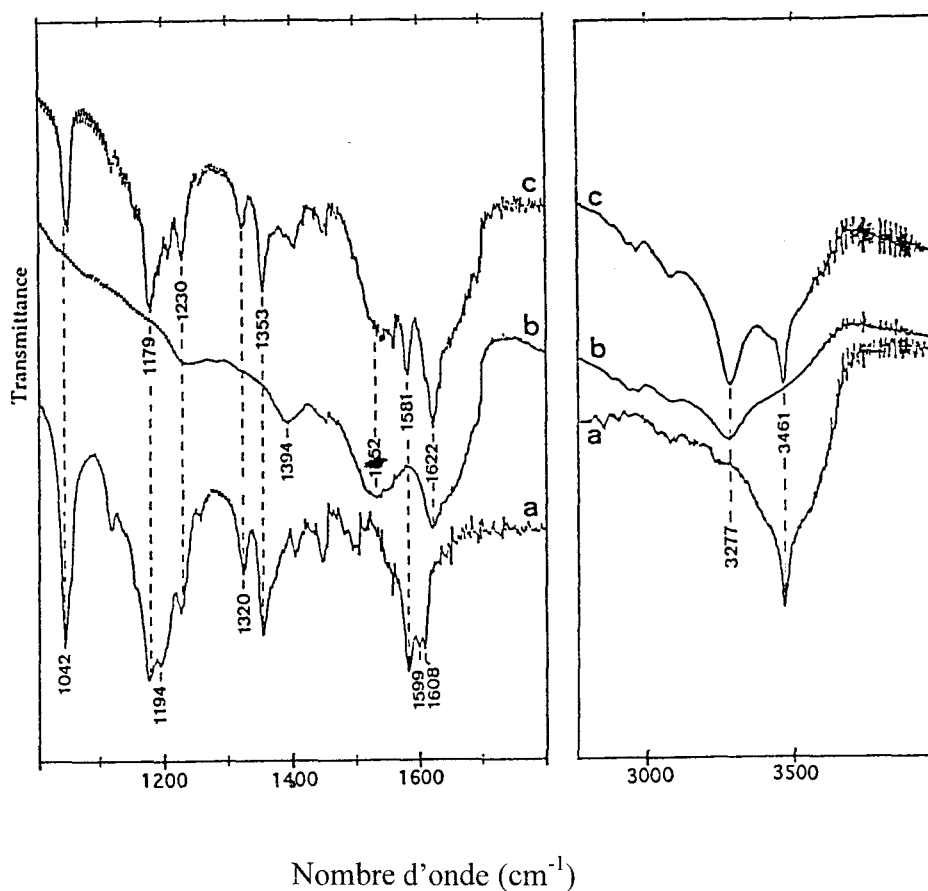


Figure III.19: Spectres microinfrarouges FT-IR du RC seul (a), du peptide A β (1-28) seul (b) et du peptide A β (1-28) coloré au RC (c).

Dans les régions spectrales caractéristiques du RC, non seulement on observe des variations entre **1170-1230 cm⁻¹** (domaine des modes de vibrations des SO₃⁻), mais aussi la disparition de la bande à **1194 cm⁻¹** dans le spectre des fibres d'amyloïde colorées. On observe un affinement dans le profil de la bande à **3275 cm⁻¹** (vNH) dans le spectre du mélange, qui est initialement large dans le spectre du peptide seul.

3.1.3 Discussion et conclusion

Le Tableau III.7 récapitulatif résume les propriétés de chaque substrat que nous avons étudié.

Tableau III.7: Propriétés chimiques des substrats étudiés (amyloïdes, bons modèles de l'amyloïde et non-amyloïdes).

Substrats	Propriétés				Nature chimique
	Fibres	Structure β	Dichroïsme	Interactions	
Insuline dénaturée (β)	+	+	+	+	Arg, Lys
poly-L-lysine dénaturée (β)	+	+	+	+	Lys
Peptide A β (1-28)	+	+	+	+	Arg, Lys
Peptide A β (16-28)	+	+	+	+	Lys
Fibroïne de soie AP (β)	+	+	-	-	Ser
Polyglycine native (β)	-	+	-	-	Gly
Poly-L-sérine native (β)	-	+	-	-	Ser
Fibroïne de soie BM (α)	+	-	-	-	Ser
Insuline native (α)	-	-	-	-	Arg, Lys
poly-L-lysine native (α)	-	-	-	-	Lys
Collagène (α)	+	-	+	?	Pro
Elastine (désordonnée)	+	-	+	?	Tyr, Try

Le mécanisme d'interaction entre le RC et les fibres d'amyloïde dépend en partie de la conformation en feuillets β -plissés [5]. En effet Cooper avait proposé que la conformation β seule suffisait pour bloquer les molécules du colorant dans les plis β via des interactions non-spécifiques [4]. Cependant, les études spectroscopiques précédentes avaient montré que les polymères riches en acides aminés chargés positivement, tels que la poly-L-lysine, peuvent aussi interagir avec le RC dans leurs structures non- β [6,8].

Il est vrai que la structure en feuillets β -plissés semble être importante dans les interactions avec le colorant; mais il a été montré que cette structure seule ne suffit pas pour assurer la fixation du colorant. Cette conclusion a été déduite par le fait que le colorant ne se lie pas à la polyglycine ou à la poly-L-sérine, deux polymères existant sous la conformation β , mais qui ne possèdent pas des acides aminés chargés positivement [57]. C'est aussi le cas pour la fibroïne de soie AP qui est de conformation native β , mais qui ne se lie pas au RC; elle est riche en résidus aminés alcooliques chargés négativement (sérine).

Les études par spectrométries Raman et UV-visible, avaient montré qu'une fois arrivé à son site actif, le RC se bloque dans sa forme basique azo quelque soit le pH [8-10]. Les résultats des études par spectrométrie d'absorption IR avaient aussi montré que le RC se lie aux protéines modèles de l'amyloïde via des groupements SO_3^- [7,9].

Pour les peptides amyloïdes et les bons modèles que nous avons étudiés, le même type d'interactions semble survenir. Dans les spectres Raman, on observe que le RC interagit dans sa forme basique azo et nos études par spectrométrie infrarouge montrent qu'après l'interaction entre le RC et le substrat, un changement survient toujours dans la région spectrale des modes des vibrations SO_3^- . A ajouter, le même déplacement observé dans les spectres d'absorption électronique UV-visible (de 498 nm à 510 et 530 nm pour les molécules liées) pour l'insuline et pour les peptides amyloïdes-bêta.

D'où, bien qu'il est certain que la structure secondaire joue un rôle important, d'autres interactions types hydrogène, hydrophobes et Van der Waals, semblent intervenir dans le mécanisme d'interaction entre le colorant et les acides aminés chargés positivement [25]. Dans le cas de l'insuline, qui comprend six résidus d'acides aminés chargés positivement qui peuvent être des sites d'interactions: deux résidus N-terminaux (chaînes A et B), deux histidines, un résidu arginine et un résidu lysine. La séquence du peptide $\text{A}\beta(1-28)$ comprend 1 résidu N-terminal, 1 résidu histidine, un résidu arginine et deux résidus lysine. Quant au peptide $\text{A}\beta(16-28)$, il comprend 1 résidu N-terminal, 1 résidu histidine et deux résidus lysine.

Certainement les résidus d'acides aminés chargés ne suffisent pas seuls à assurer une bonne interaction; d'où, la conformation β doit servir à stabiliser les cations pour obtenir une interaction optimale. (Il a été montré que la distance qui sépare les deux groupements SO_3^- du RC est 19Å cette distance correspond approximativement à la séparation entre 5 feuillets du peptide β -amyloïde agrégé) [9] (Voir Figures I.11). Cette étude a été confirmée par d'autres travaux de modélisation du peptide $\text{A}\beta(1-28)$ [58] (Figures III.20). Cependant, il semble certain que les feuillets β -plissés agrégés du peptide β -amyloïde doivent jouer un rôle important dans les interactions avec les indicateurs colorés.

Les protéines fibrillaires comme le collagène et l'élastine, qui sont de structures non- β montrent une biréfringence verte après coloration au RC. Ce mode de fixation n'a pas pu être confirmée par spectroscopie à cause de leurs faibles solubilités. Mais, si on se réfère aux résultats précédents, ces protéines n'auraient pas pu interagir avec le colorant; d'une part, elles ne possèdent pas des acides aminés chargés positivement (le collagène est riche en serine, en proline et hydroxyproline) et d'autre part, elles sont de structures non- β . On peut ainsi conclure que seules les protéines qui possèdent **toutes les propriétés** de l'amyloïde peuvent assurer des interactions importantes avec le colorant.

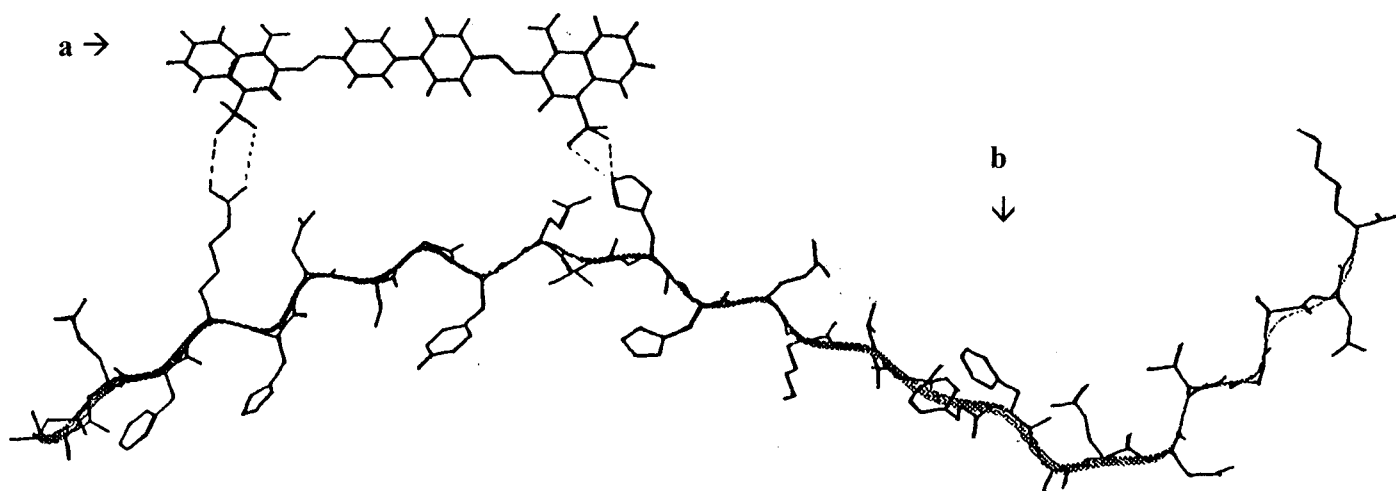


Figure III.20: Modèle d'interactions de la molécule RC avec le peptide A β (1-28) [58]. a) Molécule RC et b) Peptide A β (1-28).

3.2 INTERACTIONS AVEC LES PROTEINES *IN SITU*

Pour avoir le maximum d'information sur la rétention du colorant, nous avons étudié un échantillon de substance amyloïde extraite du cerveau de malades Alzheimer. Mais, les études spectroscopiques ont montré que l'échantillon en question n'était pas pur, il ne contenait pas de protéines. Ce problème de purification des échantillons de substance amyloïde a déjà été rencontré auparavant [59].

Pour les études spectroscopique du mécanisme d'interaction entre le colorant et les protéines amyloïdes dans le tissu, nous avons travaillé sur des tissus cérébraux provenant de malades Alzheimer et de personnes saines. Nous présenterons d'abord des spectres de vibration du tissu Alzheimer et du tissu sain déparaffinés **non colorés**, préalablement fixés au **carnoy**. Ensuite, nous exposerons les résultats obtenus pour l'étude du **tissu coloré**.

3.2.1 Etudes spectroscopique du tissu non coloré (fixé au carnoy)

Des spectres de vibration et d'absorption UV-visible ont été enregistrés pour des prélèvements de malades Alzheimer dans le but d'étudier directement les modifications structurales causées par la maladie d'Alzheimer. Pour nos analyses, des coupes d'environ 10 micromètres d'épaisseur du tissu cérébral sain et du tissu cérébral Alzheimer ont été déparaffinées simultanément puis colorées. Les spectres ont été enregistrés avant et après coloration. Nous avons représenté sur la Figure III.21 des spectres FT-IR obtenus pour un tissu sain (**S**) et pour un tissu malade (**M**) avant coloration et sur Figure III.22 les spectres obtenus pour les mêmes échantillons après coloration.

L'analyse du tissu donne des spectres d'absorption infrarouge caractéristiques des protéines. En d'autre termes, les bandes polypeptidiques sont mieux exprimées que le reste des constituants tissulaires, lipidiques et autres. Les différences observées entre les deux spectres (**S**) et (**M**) sont situées dans la région de la bande amide I. Les deux spectres présentent une composante **non-β majoritaire à 1651 cm^{-1}** , mais le spectre du **tissu malade** présente une autre composante **β à 1630 cm^{-1}** , qui apparaît comme un épaulement dans le spectre du **tissu sain**. Ceci indique que le **tissu malade** est riche en protéines de **structures β**, alors que le **tissu sain** est plutôt riche en protéines de **structures non-β**.

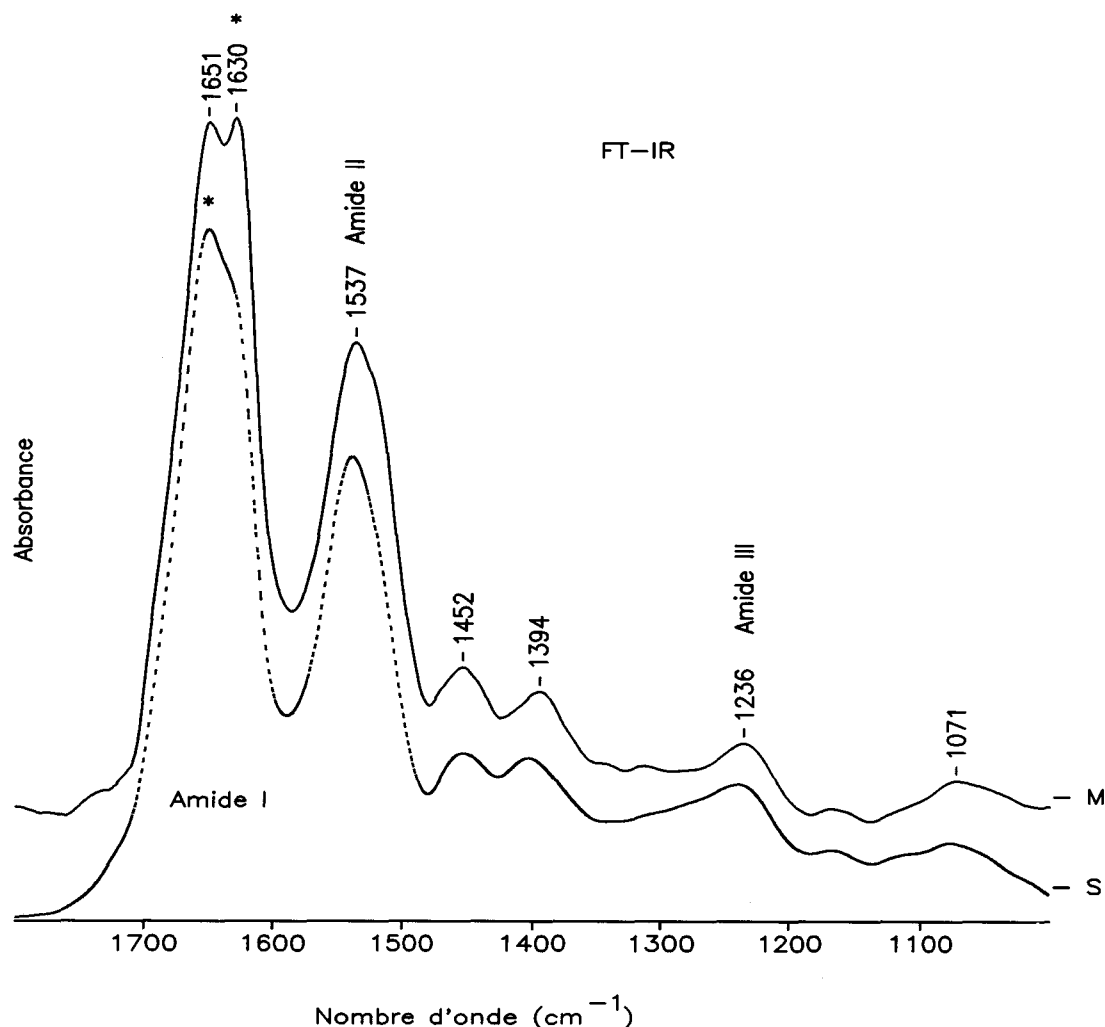


Figure III.21. Spectres d'absorption FT-IR des coupes de 10 micromètres du tissu cérébral déparaffinées, préalablement fixé au carnoy. Tissu sain (S) et tissu Alzheimer (M).

3.2.2 Etudes spectroscopiques du tissu coloré (fixé au carnoy)

A) Spectrométrie d'absorption UV-visible

Les spectres UV-visible obtenus après coloration du tissu sain (---) et du tissu malade (xxx), ainsi que les spectres obtenus pour deux solutions aqueuses du RC seul (—) et du mélange RC-peptide A β (16-28) (....) sont représentés sur la Figure III.22.

Dans la gamme spectrale **300-700 nm**, le spectre du **RC seul** à pH neutre et basique présente une bande d'absorption à **498 nm**, attribuée à la transition $\pi-\pi^*$ du groupement **azo (N=N)**. Le maximum d'absorption de cette bande s'est déplacé vers **510 nm** dans le spectre du **tissu malade**, alors qu'il est **restée inchangée** dans le spectre du **tissu sain**.

Ceci indique que le **colorant s'est lié** aux **composantes du tissu malade**, mais pas à celles du tissu sain.

Etant donné que les variations apparentes entre les spectres des échantillons non colorés (Voir Figure III.21) semblent être localisées dans la région de la bande amide I, nous avons déduit que les changements observés dans le spectre du tissu malade coloré étaient dues à des interactions possibles entre le **colorant** et les **protéines de structure β** . En outre, les profils spectraux semblent être identiques pour le tissu malade et le peptide $A\beta(16-28)$. Ceci nous a permis de **déduire** que le **mécanisme** impliqué dans l'interaction entre le RC et les protéines de structures β présentes **dans le tissu Alzheimer est identique** à celui du **peptide amyloïde** synthétique. Pour élucider la nature de ces interactions, nous avons eu recours aux spectrométries vibrationnelles.

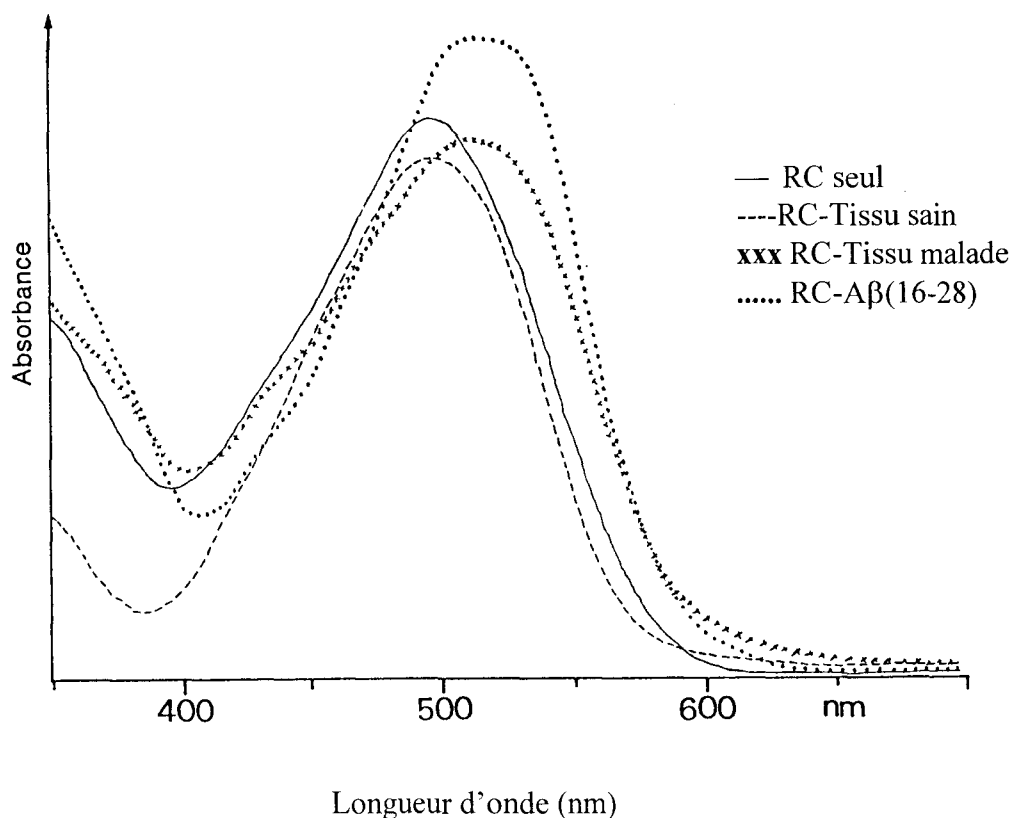


Figure III.22: Spectres d'absorption UV-visible d'une solution du RC seul $10^{-5}M$ (—), d'une section de $10\ \mu m$ d'épaisseur d'un tissu cérébral sain coloré au RC (---), d'une section de $10\ \mu m$ d'épaisseur d'un tissu cérébral Alzheimer coloré (xxx) et d'une solution du mélange RC / peptide $A\beta(16-28)$ $10^{-5}M$ (....).

Les tests **histopathologiques** obtenus pour ces tissus sont en accord avec nos résultats, ils étaient **positifs** pour le **tissu malade** et **négatifs** pour le **tissu sain**.

B) Microspectrométrie Raman

Pour confirmer les résultats des études obtenus par spectrométrie d'absorption UV-visible, nous avons enregistré des spectres micro-Raman directement dans la paroi de certains VC. Les spectres étaient obtenus avec une excitatrice émettant dans le proche IR (1064 nm) afin de minimiser les problèmes liés à la fluorescence. Sur la Figure III.23, nous avons représenté des spectres micro-Raman enregistrés à l'intérieur (A) et à l'extérieur (B) des parois des VC pour un tissu malade et pour un tissu sain.

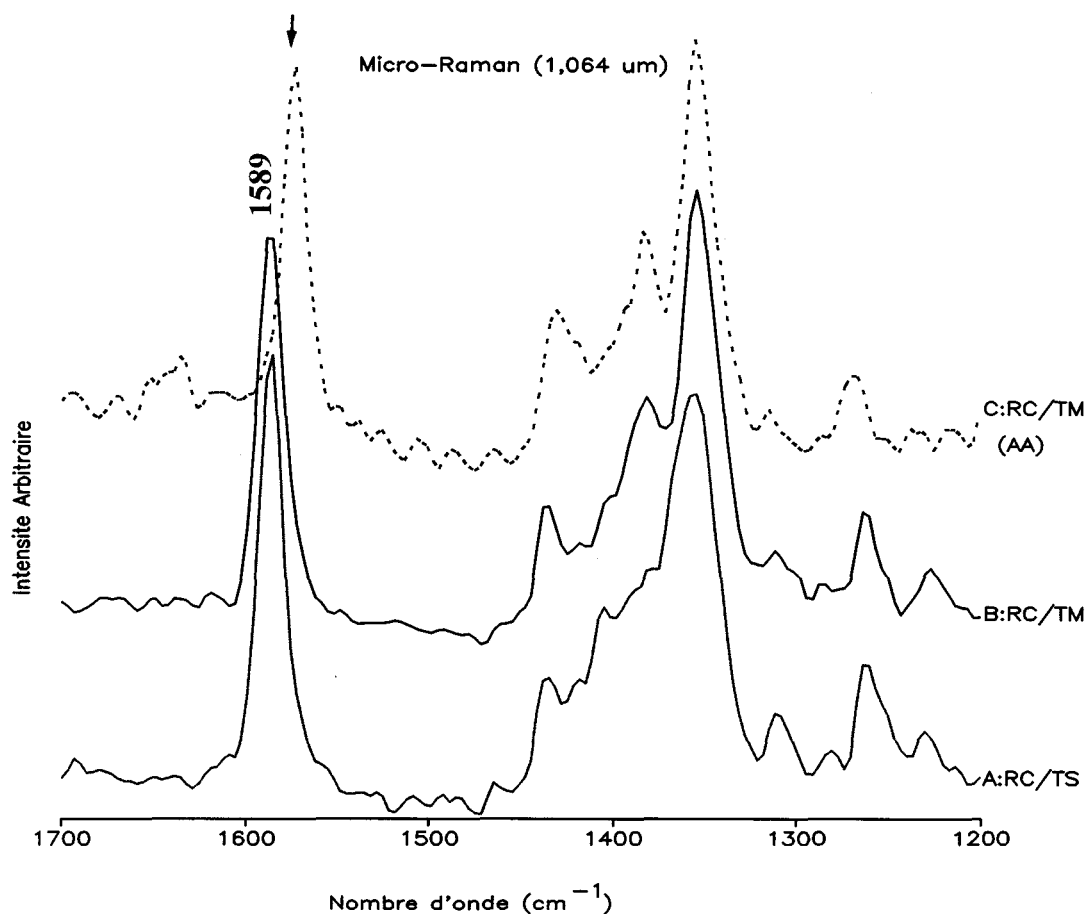


Figure III.23: Spectres micro-Raman de deux sections cérébrales de 10 µm provenant d'un tissu sain (TS) et d'un tissu Alzheimer (TM). Spectres enregistrés hors de la paroi d'un VC du tissu sain (A) et dans la paroi d'un VC tissu Alzheimer (B). Spectres enregistrés dans la paroi d'un VC du tissu sain (A) et dans la paroi d'un tissu malade (C).

Les spectres du tissu sain et du tissu malade enregistrés **hors** de la paroi des VC semblent être identiques (RC/TS et RC/TM). L'absence de variations spectrales et de biréfringence verte sous microscope optique indiquent que les régions du tissu cérébral analysées étaient saines dans les deux cas. En revanche, dans le spectre du tissu malade enregistré **dans la paroi des VC (AA)**, on observe un déplacement de la bande du colorant

due aux modes des elongations des cycles à 1573 cm^{-1} , les régions spectrales des vibrations $\nu(\text{N}=\text{N})$ ne semblaient pas interagir. Etant donné que la paroi des VC des malades Alzheimer contient des protéines amyloïdes (AA), nous avons conclu que le RC s'est lié aux protéines amyloïdes via les cycles. Les tests **histopathologiques** étaient **positifs** pour le **tissu malade** et **négatifs** pour le **tissu sain**. Ainsi, la micro-spectrométrie Raman permet de distinguer entre des régions saines et des régions malades dans le tissu Alzheimer.

C) Spectres d'absorption infrarouge

1) Tissu cérébral traité

Sur la Figure III.24, sont superposés des spectres FT-IR d'un tissu cérébral sain enregistrés avant (C) et après coloration au RC (C+RC), et d'un tissu cérébral provenant d'un malade Alzheimer enregistrés avant (Alz) et après coloration (Alz +RC). Seule la région spectrale entre 1300 et 1000 cm^{-1} est représentée; elle renferme de domaine des vibrations des groupements sulfonyles du colorant.

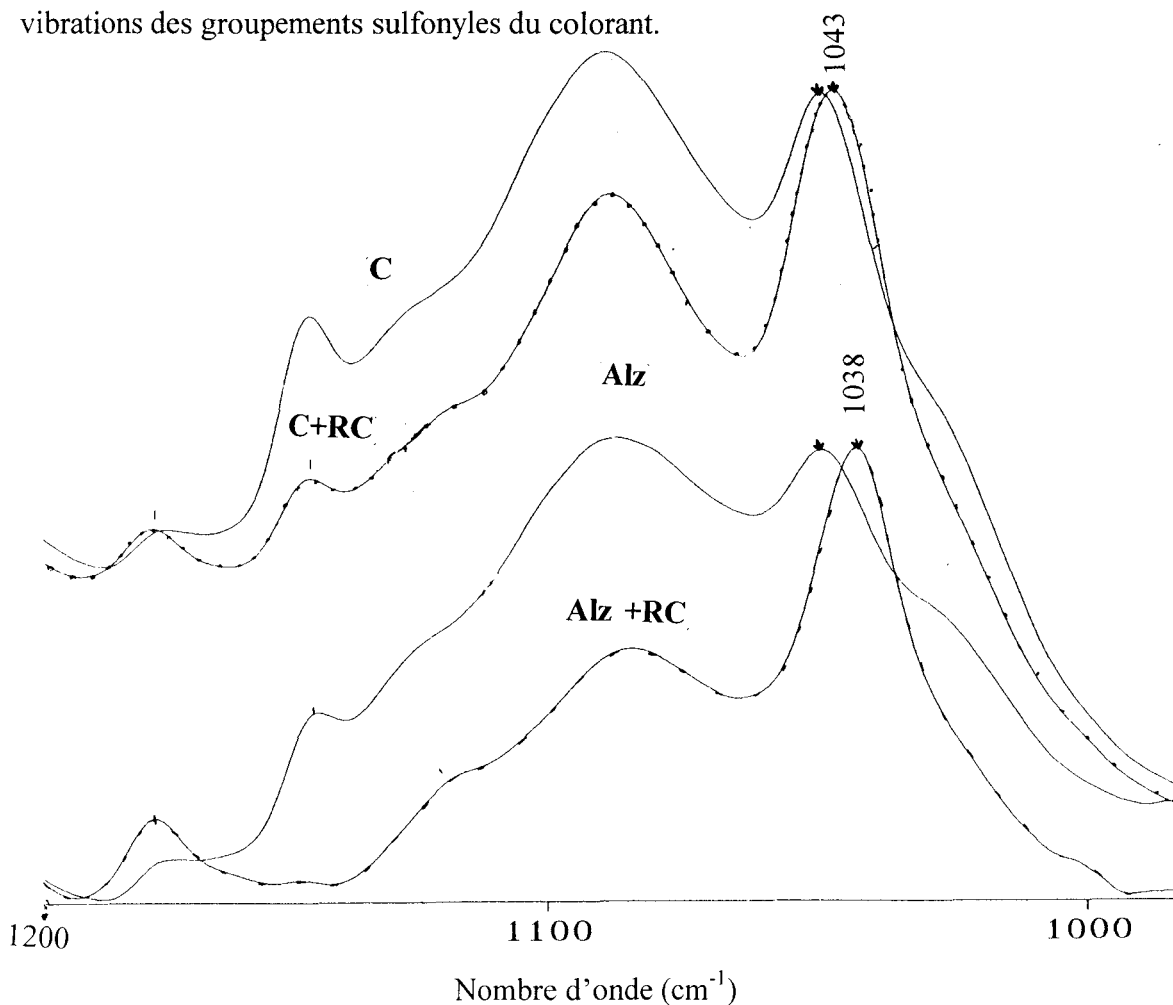


Figure III.24: Région $1200\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ des spectres d'absorption FT-IR enregistrés pour des sections cérébrales de 10 micromètres d'épaisseur fixées au **carnoy** qui provenaient d'un tissu sain et d'un tissu d'un patient d'un malade Alzheimer. **C)** Tissu sain non coloré, **C+RC)** tissu sain coloré au RC, **Alz)** Tissu malade non coloré, **Alz+RC)** tissu malade coloré au RC.

La comparaison des spectres (**C** et **C + RC**) et des spectres (**Alz** et **Alz + RC**) montre un déplacement de la bande à 1048 cm^{-1} du colorant vers 1043 cm^{-1} pour le tissu **sain** et vers 1038 cm^{-1} pour le tissu **malade**. Ces variations indiquent que le tissu sain interagit peu avec le colorant, contrairement au tissu malade. Ce déplacement varie d'un tissu à l'autre entre 7 cm^{-1} pour le tissu sain et 12 cm^{-1} pour le tissu traité. Comme le tissu a été traité avant la coloration, il est difficile de voir si les composantes non protéiques avaient interagi avec le colorant.

2) Tissu cérébral frais

Etant donné que le diagnostic histopathologique de la MA est établi sur du tissu traité par des solvants dénaturants, nous avons étudié le mode de fixation du colorant sur les composantes du tissu Alzheimer **frais**, dans le but de vérifier si le traitement peut affecter le mode d'interaction. Des spectres FTIR du RC seul (**a**), du tissu Alzheimer avant (**b**) et après coloration au RC (**c**) sont représentés sur les Figures III.25a et 25b.

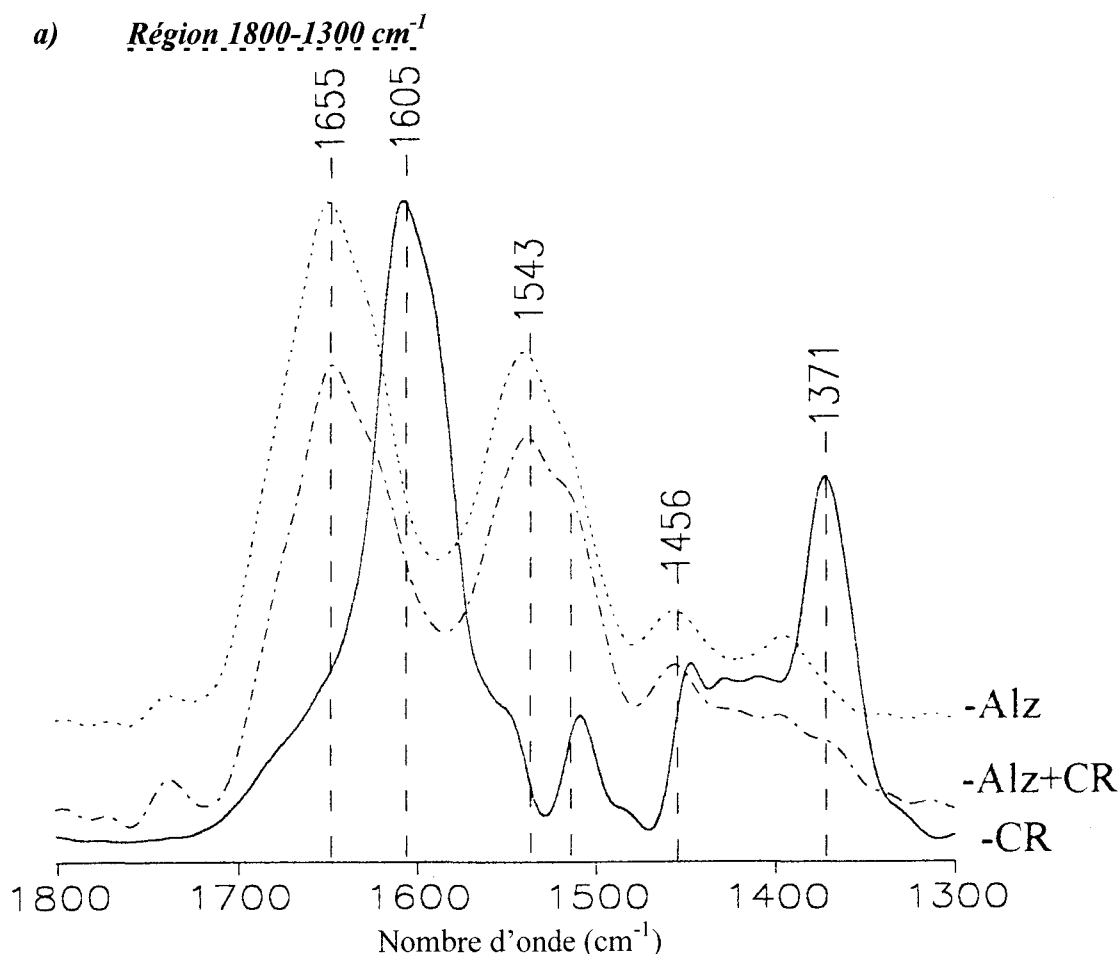


Figure III.25a Spectres d'absorption infrarouge d'une section cérébrale de 10 micromètres d'épaisseur provenant d'un tissu **cérébral Alzheimer frais** montrant la région spectrale entre $1800\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$. **A)** Tissu non coloré, **B)** film de RC préparé à partir d'une solution aqueuse de 10^{-3} M , **C)** Tissu frais coloré au RC.

Les spectres FT-IR du tissu malade coloré montrent quelques changements par rapport à ceux du tissu non coloré. Dans cette région spectrale, aucun déplacement de fréquences n'a été observé pour les bandes amide I et II; ceci est normal car cette bande concerne les modes des elongations $\nu\text{C=O}$ des protéines. Pour les bandes du colorant, on constate une diminution de l'intensité des bandes à 1605 et 1371 cm^{-1} , caractéristiques des cycles aromatiques du RC. L'implication des cycles dans le mécanisme d'interaction a déjà été montré par la microspectrométrie Raman pour le tissu, mais aussi pour les protéines modèles.

b) Région $1300\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$

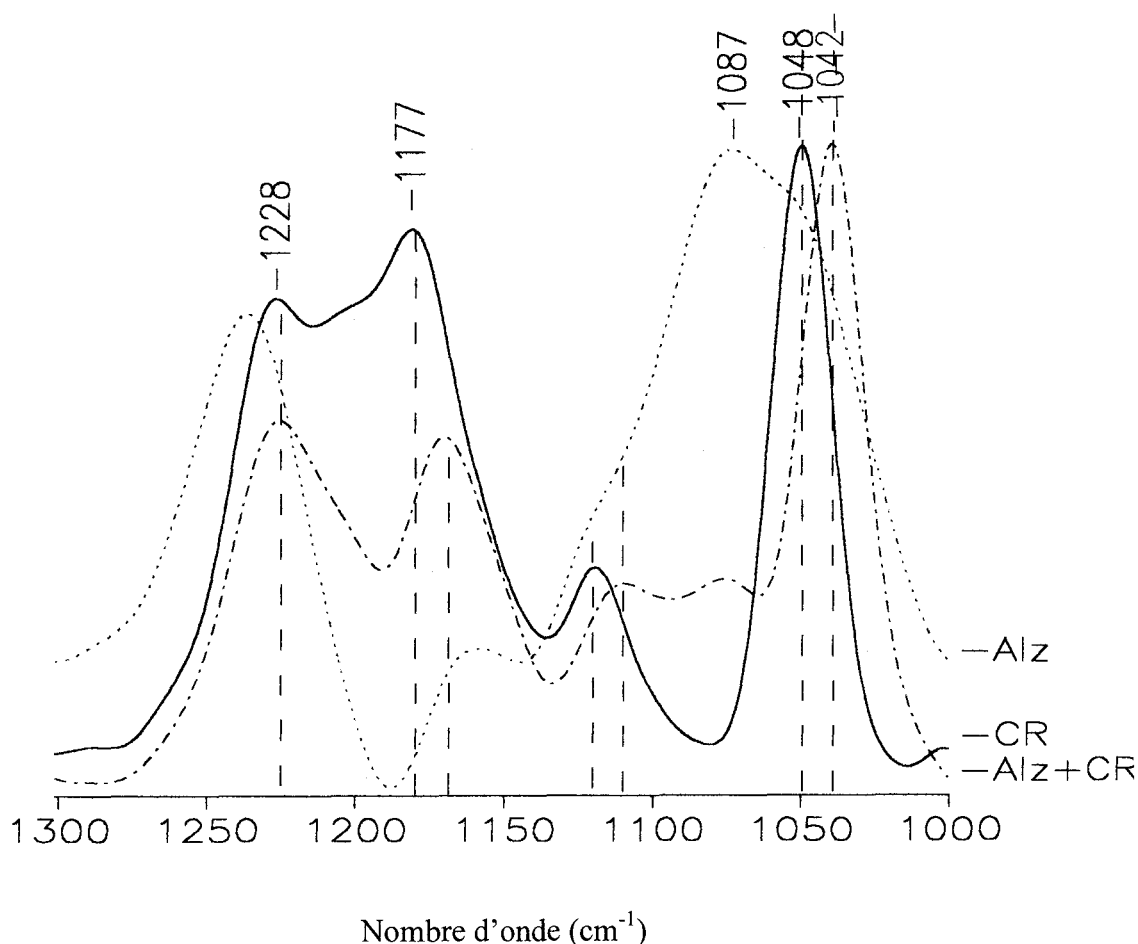


Figure III.25b Spectres d'absorption infrarouge d'une section cérébrale de 10 micromètres d'épaisseur provenant d'un tissu **cérébral Alzheimer frais** montrant la région spectrale entre $1300\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$. **A)** Tissu non coloré, **B)** film de RC préparé à partir d'une solution aqueuse de 10^{-3} M , **C)** Tissu frais coloré au RC.

Sur la Figure III.25b, on observe des variations similaires à celles observées pour les protéines modèles de l'amyloïde. Ainsi, on note la disparition des bandes à 1194 et

1117 cm⁻¹, avec un déplacement de bande située initialement à **1048 cm⁻¹** dans le spectre du colorant seul vers **1042 cm⁻¹**. Toutes ces bandes sont reliées aux vibrations des groupements **SO₃⁻**. Le déplacement de la bande à 1048 cm⁻¹ varie d'un tissu à l'autre entre **2 à 7 cm⁻¹** pour le tissu **frais**, mais elle peut atteindre **12 cm⁻¹** pour le même tissu **après traitement**. Ces variations sont certainement liés au degré de dénaturation des protéines dans le tissu. Cette conclusion a été déduite par le fait que le colorant se lie à des protéines de conformation β , mais à condition qu'elles contiennent des sites positifs.

Par ailleurs, si l'on compare le spectre du **tissu Alzheimer frais** obtenu avant et après coloration, on peut constater la disparition de la composante à **1087 cm⁻¹** attribuée aux modes de vibration des groupements phosphates. Des variations similaires sont également observées pour le tissu sain frais. Ces interactions seraient possibles entre les groupements amines du colorant et les groupements phosphates des composantes non protéiques.

3.2.3 Conclusion

La corrélation des résultats obtenus par les diverses techniques spectroscopiques que nous avons utilisées nous a permis de tirer les conclusions suivantes:

Le mode d'interaction de colorant-substrat observé pour les protéines modèles de l'amyloïde semble être identique pour le tissu [60]. Les spectres d'absorption électronique UV-visible montrent un déplacement de la bande d'absorption du colorant. Cette interaction a été confirmée dans les spectres micro-Raman par un déplacement de la bande caractéristique des cycles du colorant lié dans des AA. On a pu ainsi distinguer des endroits sains et des endroits malades. A ajouter les spectres infrarouges qui montrent qu'après l'interaction de RC-substrat, un changement survient toujours dans la région spectrale des modes des vibrations **SO₃⁻**.

Toutefois, un changement moins important a été également observé pour le tissu sain. L'étude du tissu frais a permis d'une part de montrer que le tissu Alzheimer traité au carnoy se lie mieux au colorant que le tissu frais, et d'autre part l'existence d'autres interaction impliquant des groupements phosphates des composantes non- protéiques du tissu sain et du tissu malade.

L'analyse conformationnelle de la bande amide I dans le spectre du tissu traité indique que la contribution en feuillets β existe dans le tissu sain, mais est supérieure pour le malade. Il est donc important de souligner que les modifications observées dans le spectre IR du tissu sain traité résultent d'une interaction avec les protéines β . Cette interaction n'a pas pu être confirmée dans les spectres Raman et UV-visible; probablement à cause de la faible quantité des protéines β dans le tissu sain traité.

D'une part, il sera intéressant de compléter et d'approfondir les études entreprises en spectroscopie infrarouge et Raman afin de mieux caractériser l'interaction colorant-protéines amyloïdes en étudiant l'effet du solvant sur le tissu, d'autre part voir si on peut déterminer un seuil (quantité limite) au dessus duquel il n'y a pas d'interactions entre le colorant et les protéines du tissu sain. Nous envisageons d'appliquer ces études dans le but de vérifier la fiabilité du diagnostic histopathologique par colorations et d'étudier la spécificité de la molécule RC, ce dernier pouvant faire l'objet d'applications diagnostics *pré-mortem*.

Les résultats obtenus seront présentés dans le chapitre IV.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] **Glennner G. G.**, *N. Engl. J. Med.* **302** (1980) 1283.
- [2] **Wolmn W. et Bubis J. J.**, *Histochemie* **4** (1965) 351.
- [3] **Puchtler H., Sweat F. et Levine M.**, *J. Histochem. Cytochem.* **10** (1962) 355.
- [4] **Cooper H.**, *Lab. Invest.* **31** (1974) 232.
- [5] **Glennner G. G., Eanes E. D et Page D. L.**, *J. Histochem. Cytochem* **20** (1972) 821.
- [6] **Benditt E. P., Eriksen N. et Berglund C.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **66** (1970) 1044.
- [7] **Klunk E. , Pettegrew J. W. et Abraham D. J.**, *J. Histochem. Cytochem* **37** (1989) 1273.
- [8] **Elhaddaoui A., Merlin J. C., Delacourte A. et Turrell S.**, *J. Mol. Struct.* **267** (1992) 113-116.
- [9] **Elhaddahoui A.**, thèse n°716, Université de Lille II, France (1992)
- [10] **Elhaddaoui A., Delacourte A. et Turrell S.**, *J. Mol. Struct.* **294** (1993) 115-118.
- [11] **Cooper J. H.**, *Lab. Invest* **31** (1974) 232-238.
- [12] **Pollack S. J., Salder I. I. J., Hawtin S. R., Tailor V. J. et Shearman M. S.**, *Neurosci. Lett.* **197** (1995) 211-214.
- [13] **Hantzsch A.**, *Ber. Chem. Ges.* **48** (1915) 162.
- [14] **Pauli W. et Singer L.**, *Biochem. Z.* **244** (1932) 76.
- [15] **Jones T. P. et Porter M. D.**, *Anal. Chem.* **60** (1988) 404.
- [16] **Mera S. L. et Davies J. D.**, *Histochem. J.* **16** (1984) 195.
- [17] **Pigorch E., Elhaddaoui A. et Turrell S.**, *Spectrochemica Acta* **50A** (1994) 2145-2152.
- [18] **Lycka A.**, *Coll. Crech. Chem. Commun.* **48** (1983) 3104.
- [19] **Lycka A. et Machacek V.**, *Dyes and Pigments* **7** (1986) 171.
- [20] **Freeman H. S., Hsu W. N., Esancy J. F. et Esancy M. K.**, *Dyes and Pigments* **9** (1988) 67.

- [21] **Mathieson D. W.**, *NMR for Organic Chemists*, Academic Press London (1967) 185.
- [22] **Hacker H.**, *Spectrochim. Acta* **21** (1965) 1989
- [23] **Machida K., Li H. et Kuwae A.**, *J. Raman Spectrosc.* **9** (1980) 198.
- [24] **Kelemen J., Moss S., Sauter cH. et Winkler T.**, *Dyes and Pigments* **9** (1988) 67.
- [25] **Turnell W. G. et Finch J. T.**, *J. Mol. Biol.* **227** (1992) 1205.
- [26] **Horobin W.**, *J. Microsc.* **119** (1980) 345.
- [27] **Krimm S. et Bandekar J.**, *Advances in Protein Chemistry* **38** (1986) 181-364.
- [28] **Richardson J. S. et Richardson D. C.**, *Fasman G. D. (ed), Plenum Press, New York* (1989) 1-98.
- [29] **Fontaine J. P.**, (1993).
- [30] **Byler D. M. et Susi**, *J. Ind. Microbiol.* **3** (1988) 1126.
- [31] **Surewicz W. K. et Mansch H. H.**, *Biophys. Biochem. Acta* **951** (1988) 1155.
- [32] **Fabian H., Naumann D., Misselwitz R., Ristau O., Gerlach D. et Welfle H.**, *Biochemistry* **31** (1992) 6532.
- [33] **Querol E., Padros E., Junkosa M., Plana A., Lloberas J.**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184** (1992) 612.
- [34] **Arrondo J. L. R., Muga A., Castresana J. et Goni F. M.**, *Prog. Biophys. Molec.* **59** (1993) 23.
- [35] **Alix A. J. P., Berjot M. et Marx J.**, *Spectroscopy of biological molecules*, Alix A. J. P., Bernard L. et Manfait M. (eds.), Jhon Wiley et Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 149-154.
- [36] **Williams R. W.**, *Methods in Enzymology* **130** (1986) 311-331.
- [37] **Berjot M., Marx J. et Alix A. J. P.**, *Journal of Raman Spectroscopy* **18** (1987) 289-300.
- [38] **Surewicz W. K., Mansch H. H. et Chapman D.**, *Biochemistry* **32** (1993) 289-394.
- [39] **Tu A. T.**, *Raman spectroscopy in biology*, Willey J. & Sons, New York, (1982) 187-201.
- [40] **Parker F. S.**, «*Applications of infrared, Raman and resonance Raman spectroscopy in biochemistry*», Plenum Press, New York.
- [41] **Bandekar J.**, *Biophys. Biochem. Acta* **1120** (1992) 123.
- [42] **Wilson E.B., Decius J. C., Cross P. C.**, *Molecular Vibrations*, ed. Mc Graw Hill, N. Y. (1955).

- [43] **Koenig J. L. et Frushour B. G.**, *Biopolymers* **11** (1972) 1871.
- [44] **Yu N. T., Jo B. H. et O'Shea D. C.**, *Arch. Biochem. Biophys.* **156** (1973) 71.
- [45] **Casal H. L. et Mansch H. H.**, *Biochimica Biophysica Acta* **779** (1984) 381.
- [46] **Jackson M. et Mantsch H. H.**, *Spectrochimica Acta Review* **15** (1993) 53.
- [47] **Carey P. R. et Salares V. R.**, *Heyden & Son Ltd. London* **7** (1980) 45-51.
- [48] **Koyama Y. et Ikeda K. I.**, *Chemistry and Physics of lipids* **26** (1980) 149-172.
- [49] **Tasumi M., Shimanouchi T., Miyazawa T.**, *In Shimanouchi T. (ed.), Department of Chemistry, University of Tokyo, Japan*, (1977) 54-60.
- [50] **Vergoten G., Fleury G., Moschetto Y.**, *Heyden & Son Ltd., London*, **4** (1978-1980) 195-265.
- [51] **Taillandier E., Liquier J. et Taboury J. A.**, *Clark R J. H. et Hester E., Eds., Wiley, New York, Chapitre 8* (1985).
- [52] **Frushour B. G. et Koenig J. L.**, *in advances in Infrared and Raman Spectroscopy I* (Clark R. J. H. et Hester R. E., eds.) *Heyden, London* (1975) 35-97.
- [53] **Tsukada M., Freddi G., Gotoh Y., Kazai N.**, *J. Appl. Polym. Sci.* **32** (1994) 1407.
- [54] **Freddi G., Kato H., Tsukada M, Allara G. et Shiozaki H.**, *J. Appl. Polym. Sci.* **32** (1994) 1407.
- [55] **Prescott B., Renugopalakrishnan V. et Thomas G. J. Jr.**, *Biopolymers* **26** (1987) 934-936.
- [56] **Elhaddaoui A., Pigorsch E., Delacourte A. et Turrell S.**, *J. Mol. Struct.* **347**(1995) 363-370.
- [57] **Elhaddaoui A., Delacourte A., Pigorsch E., Sajid J. et Turrell S.**, *in Proceedings of the Fifth Intern. Conf. on Spectroscopic. of Biol. Mol., T. Theophanides, J. Anastassopoulou and N. Fotopoulos (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*, (1993) 153J.
- [58] **Cavillon F., Elhaddaoui A., Dauchez M., Turrell S. and Alix A. J. P.**, *Kluwer Academic Publishers*, (1995) 491-492.
- [59] **Palutke M., Kuhuruga D., Wolfe D. et Roher A.**, *Cytometry* **8** (1987) 494-499.
- [60] **Sajid J., Elhaddaoui A. et Turrell S.**, *J. Mol. Struct* **408/409** (1997) 181-184.

CHAPITRE IV

*DIAGNOSTICS SPECTROSCOPIQUES DE LA
MALADIE D'ALZHEIMER*

INTRODUCTION

Tous les états pathologiques des maladies sont causés par des changements dans la biochimie du tissu. C'est le cas du tissu cérébral Alzheimer, où la neurotoxicité du peptide A β est probablement responsable du dérèglement mentale observé chez les malades Alzheimer.

Le diagnostic clinique *post-mortem* de la MA repose **en partie** sur la **détection des dépôts d'amyloïde dans des tissus cérébraux colorés au rouge Congo (RC), préalablement traités par des solvants dénaturants**. Or, ces derniers peuvent affecter la structure des composantes du tissu. **De tels changements pourraient alors remettre en question la fiabilité du diagnostic histopathologique**. Pour éviter ce problème, il faut travailler sur **du tissu frais**. Mais, ce dernier se déshydrate à l'air libre; ceci rend difficile la détection des lésions cérébrales sous microscope optique.

Pour pouvoir répondre à l'ensemble des questions soulevées dans le chapitre III, nous avons décidé d'entreprendre une étude dont le but était triple:

- (i) Montrer que les traitements chimiques avaient un effet sur la structure des composantes du tissu et déterminer les conditions optimales pour que le diagnostic histopathologique de la MA reste fiable.
- (ii) Proposer un solvant qui préserve la structure secondaire des protéines tissulaires.
- (iii) Mettre au point **des méthodes spectroscopiques plus fiables** qui permettraient d'établir **le diagnostic de la maladie d'Alzheimer sur le tissu frais**.

Comme les dépôts d'amyloïde ne sont pas spécifiques à la MA, puisqu'ils ont été détectés dans le cerveau de patients atteints d'autres démences neuro-dégénératives et même chez des personnes âgées cliniquement saines, nous avons donc caractérisé des échantillons cérébraux qui provenaient de patients atteints **de la maladie de Parkinson, de démence vasculaire** et de **personnes âgées démentes**. Pour tous ces cas, nous avons comparé les résultats des tests histopathologiques et spectroscopiques.

Enfin, d'après la littérature, **des dépôts d'amyloïde** ont été détectés dans **des organes extra-cérébraux de patients atteints de la MA**, dont la **peau** [1-6]. Ceci laisse

entrevoir la possibilité d'un éventuel diagnostic **par biopsie cutanée**. Dans ces conditions, notre méthode spectroscopique pourrait concourir à ce but. Ceci est évidemment possible si la peau saine ne contient pas de protéines de structure en feuillets β -plissés.

Ce chapitre s'articule sur deux parties: le tissu cérébral et la peau:

Dans **cette première partie**, nous caractériserons d'abord du **tissu cérébral frais**, ensuite du tissu déparaffiné, **préalablement fixé au carnoy**, prélevé dans différentes régions cérébrales de personnes saines. Le tissu frais a été caractérisé dans le but de nous assurer de **l'absence des protéines de structure en feuillets β -plissés** susceptibles de nuire aux diagnostics spectroscopiques. Nous caractériserons par la suite la substance blanche et la substance grise.

Dans **un second temps**, nous présenterons l'effet de solvants sur le tissu frais sain et Alzheimer, et nous exposerons les conditions optimales pour que les diagnostics histopathologiques et spectroscopiques de la MA restent fiables. Nous vérifierons ensuite la fiabilité de ces conditions optimales en travaillant sur des tissus de natures inconnue, et nous proposerons alors un diagnostic spectroscopique par des solvants dénaturants.

Afin d'éviter les problèmes engendrés par les solvants, dans **un troisième temps**, nous caractériserons le tissu **Alzheimer frais** et nous présenterons les méthodes appropriées pour discriminer entre un tissu contenant des protéines amyloïdes et un tissu qui n'en contient pas. Nous testerons ensuite la fiabilité de nos méthodes spectroscopiques sur des tissus sains et des tissus Alzheimer de natures inconnues, en comparant nos diagnostics avec ceux établis par les médecins. Enfin, nous appliquerons ces méthodes pour détecter les protéines amyloïdes dans des tissus atteints d'autres démences de types non Alzheimer.

Dans la **deuxième partie**, nous ferons un bref rappel sur l'histologie de la peau, puis, nous exposerons les résultats des études spectroscopiques des échantillons de peau provenant de personnes saines et de patients atteints d'amyloïdoses. Enfin, nous discuterons les résultats exposés et nous proposerons les régions de la peau qui sont susceptibles d'être utilisés pour le diagnostic *pré-mortem* de la MA.

PARTIE I

LE TISSU CERVEBRAL

V.1 CARACTERISATION DU TISSU CEREBRAL SAIN

1.1 HISTOLOGIE

Le tissu cérébral est composé de deux types de substances que l'on peut distinguer visuellement, **la substance grise (SG)** et **la substance blanche (SB)**. L'histologie de ces dernières est différente. **La substance grise** contient les **corps cellulaires** des cellules nerveuses (neurones) qui emmagasinent toutes les informations indispensables pour le métabolisme cellulaire et les dendrites (ramifications non myélinisées qui servent de connections entre les neurones). Quant à **la substance blanche**, elle contient les **axones myélinisés**, dont le rôle est de conduire l'information d'un neurone à un autre. Ces deux tissus diffèrent considérablement de par leurs fonctions et de par leurs structures.

Le tissu cérébral étant un mélange de SG et SB, d'où la variation de sa structure chimique selon les régions. L'effet de chaque variation sera illustré par la discussion des spectres de vibration. Nous avons d'abord caractérisé le mélange de SG et de SB, puis ces deux substances séparément; d'une part pour pouvoir distinguer entre elles et d'autre part pour vérifier par la suite si la SB des malades Alzheimer contient aussi des protéines amyloïdes; car selon la littérature, ces dernières sont plutôt concentrées dans la SG.

1.2 TISSU SAIN FRAIS

Comme, il nous a été impossible d'obtenir du tissu fraîchement prélevé à l'autopsie, nous avons caractérisé du tissu décongelé. Dans ce dernier, des réactions enzymatiques continuent même si la matière a été congelée; ainsi, des dégradations biochimiques peuvent se produire à cause de certains spécimens biologiques résistants à basse température. Pour notre étude spectroscopique, **malgré cette éventuelle** dégradation, aucun changement n'a été observé dans les spectres des tissus décongelés. Nous avons caractérisé du tissu sain prélevé dans différentes régions, en l'occurrence, **le cortex et l'hippocampe**. Le choix de ces régions est lié à **l'abondance des dépôts d'amyloïde** dans le cerveau des malades Alzheimer.

1.2.1 Etudes spectroscopiques du tissu cérébral

Le tissu cérébral est un mélange de substance blanche et de substance grise. Il est donc évident que l'interprétation des spectres de vibration est très complexe; si l'on

considère les absorptions liées à la majorité des espèces qui y sont présentes. En effet, les spectres de vibration dépendent de la variation de la composition chimique du tissu. Ainsi **les lipides, les protéines et les acides nucléiques excisent dans tous les tissus**, mais leurs **proportions varient relativement** d'un tissu à l'autre.

A) Spectrométrie d'absorption IR

Pour notre étude par spectrométrie d'absorption infrarouge, nous avons travaillé avec du tissu déshydraté à l'air libre ou sous un flux d'air chaud.

1) Caractérisation des composantes dans le tissu cérébral frais

L'analyse globale de l'ensemble des données spectrales d'un tissu biologique ne peut pas être basée sur des études théoriques; elle doit être déduite par extrapolation des spectres de vibration des composantes biochimiques majoritaires. Donc, pour caractériser le tissu cérébral **sain frais**, nous avons comparé sur la Figure IV.1 des spectres FT-IR montrant un exemple de chacune des composantes principales du tissu ayant été décrites auparavant dans le chapitre III (Voir Figures III.11 et 12): le DMPC (lipides) (A), l'ADN (acides nucléique) (B), l'insuline (protéine) (C) à un exemple de spectre FT-IR d'un tissu cérébral frais prélevé du cortex temporal d'une personne saine.

L'analyse globale du spectre du tissu (Figure IV.1D) nous permet d'attribuer l'ensemble des bandes observées. Ainsi, dans la région entre $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$, les bandes d'absorption observées dans le spectre du tissu cérébral (D) proviennent principalement des acides gras des **lipides** [1,2], et sont attribuées aux modes $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ à 2922 cm^{-1} et $\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$ à 2850 cm^{-1} . La région spectrale entre $1800\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ est dépourvue d'absorptions, alors que celle entre $1800\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ ($\nu\text{C=O}$) renferme plusieurs bandes qui proviennent de l'ensemble des trois composantes. Mais, vue leurs proportions dans le tissu, **les bandes majoritaires sont protéiques**. La bande à 1736 cm^{-1} (D) provient des esters des lipides.

Le massif à 1653 cm^{-1} est complexe; il renferme à la fois des bandes **moins intenses** provenant des **sphingolipides**, des acides aminés des chaînes latérales des protéines (**l'asparagine et l'acide glutamique**) et des bandes à 1717 cm^{-1} et à 1666 cm^{-1} (B), qui proviennent des **bases purique et pyrimidique** des acides nucléiques [3]. Mais aussi des bandes plus **intenses** provenant des **protéines (mode amide I) dont la position**

peut renseigner sur leurs structures secondaires [4,5]. La bande **amide I** à 1653 cm^{-1} indique que la majorité des protéines du tissu cérébral sain et frais sont **non β** (c'est-à-dire soit de **structure en hélice α** soit de **forme désordonnée** [6]. Ce point est important pour discriminer un tissu sain d'un tissu Alzheimer.

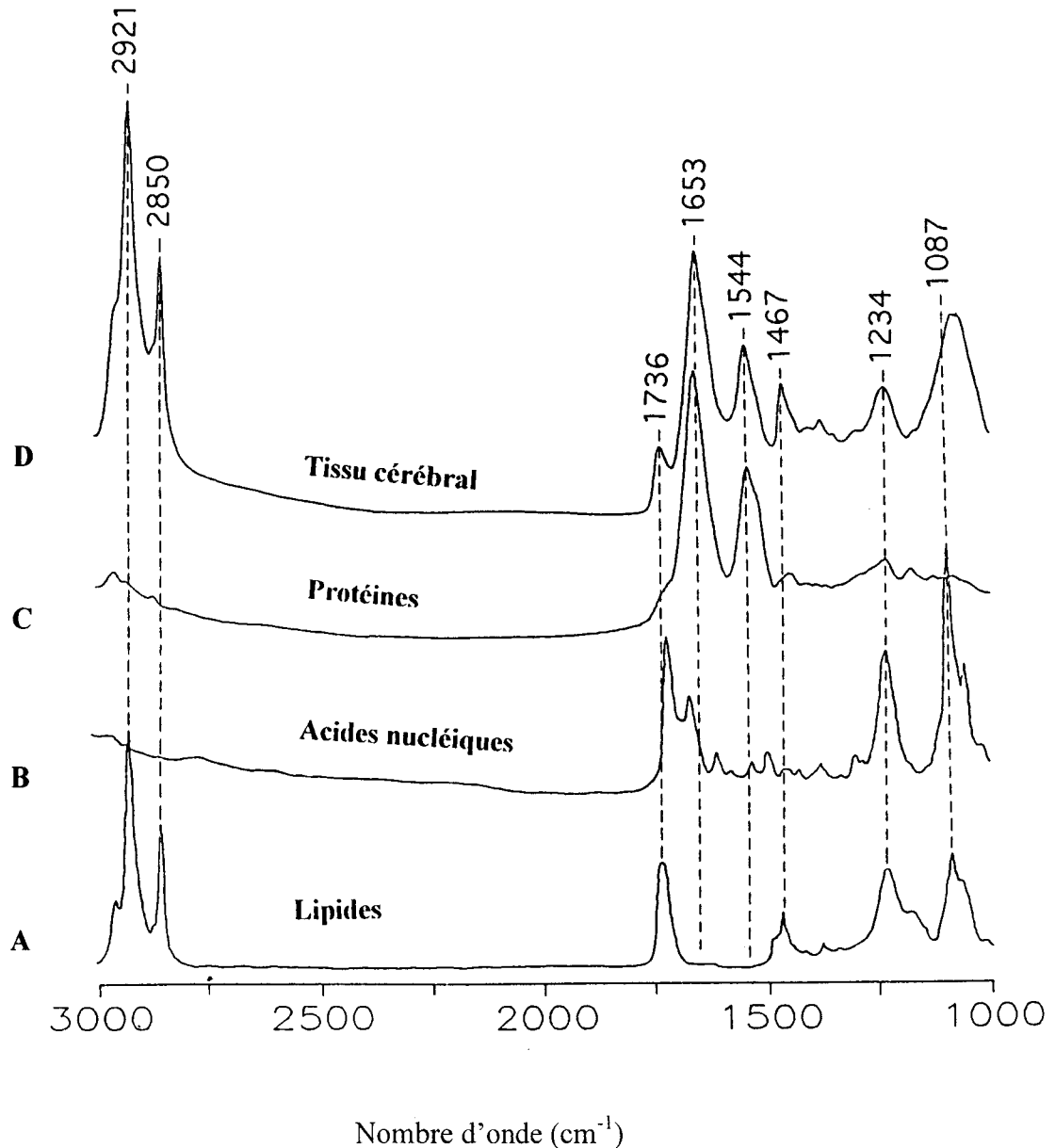


Figure IV.1: Spectres FT-IR de phospholipides (DMPC) (A), de l'ADN (B), de l'insuline (C), et du tissu cérébral sain (D).

Le massif à 1544 cm^{-1} (D) est aussi complexe que le précédent. La bande la plus intense à 1544 cm^{-1} observée dans cette région correspond au mode **amide II** des protéines

qui sont soit de structure en **hélice α** , soit de **la forme désordonnée**. Il faut toutefois ajouter des contributions moins intenses provenant des aa des chaînes latérales des protéines (**l'arginine, aspartate, glutamate et tyrosine**), et des **nucleotides** (ADN, ARN).

La bande à **1467 cm^{-1}** (δCH_2) provient principalement des lipides, alors que la faible bande à **1400 cm^{-1}** (νCOO^-) provient des acides aminés ionisés des chaînes latérales **des protéines**. La **bande amide III** ($\nu\text{C-N}$ / $\delta\text{N-H}$ dans le plan, δCH_2) à **1234 cm^{-1}** , provient des protéines, des lipides et des acides nucléiques. Cette bande amide III est moins marquée de conformations en IR que les deux autres.

Enfin, la région entre **1000-1200 cm^{-1}** est aussi complexe que la précédente et renferme principalement contient des bandes dues aux modes des élongations des groupements **phosphates** ($\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$ à **1224 cm^{-1}** et $\nu_{\text{s}}\text{PO}_2^-$ à **1087 cm^{-1}**). D'autres bandes d'absorption dues aux modes ($\nu\text{C-O}$) sont également observées dans cette région spectrale.

ii) Effet de l'eau sur la région des bands amide I et II

La **bande amide I** (**1610-1695 cm^{-1}**) est très importante pour notre étude, car elle permet de renseigner sur la structure secondaire des protéines dans les spectres de vibration du tissu. Par conséquent, elle peut permettre d'établir le diagnostic spectroscopique de la MA. Cependant, la présence des bandes **non protéiques** dans cette région peut poser un **problème** pour l'interprétation des spectres. En effet, parmi les bandes non protéiques notées, on note celle à **~ 1649 cm^{-1}** , due au mode de déformation (δOH) de l'eau présent dans le tissu. Ainsi la quantité de ce dernier peut influencer le profil de la bande amide I.

Le tissu cérébral renferme une quantité non négligeable d'eau. Or ce dernier possède un spectre IR avec des bandes très larges qui coïncident avec le domaine d'absorption de bande amide I des matériaux biologiques. Pour résoudre ce problème, certains chercheurs ont développé des méthodes mathématiques et informatiques [7] permettant de travailler directement dans l'eau. Ainsi, on peut soit soustraire le spectre du produit pur de celui de l'eau, soit décomposer les bandes spectrales [8] contenant les informations recherchées. Mais certains auteurs [9] ont conclu que l'analyse des bandes amide des protéines en solution dans l'eau n'était pas très fiable. En effet, l'intensité, la

fréquence et le profil de la bande due au mode δOH des molécules d'eau fixées à la protéine [10] se sont révélés très difficiles à modéliser, donc à soustraire des spectres avec précision.

iii) Etude de la déshydratation du tissu cérébral par spectrométrie infrarouge

Pour montrer l'effet de l'eau sur le profil de la bande amide I, nous avons suivi spectroscopiquement la déshydratation du tissu cérébral frais en fonction du temps (Figure IV.2). Quelques microgrammes de tissu ont été déposés entre deux fenêtres IR de CaF_2 , et les spectres FT-IR ont été enregistrés tous les 2 minutes. Sur la Figure IV.2, nous avons représenté un spectre du tissu hydraté (B), des spectres du tissu déshydraté en fonction du temps (2, 4, et 10 minutes) (C, D et E), et le spectre de la vapeur d'eau (A),

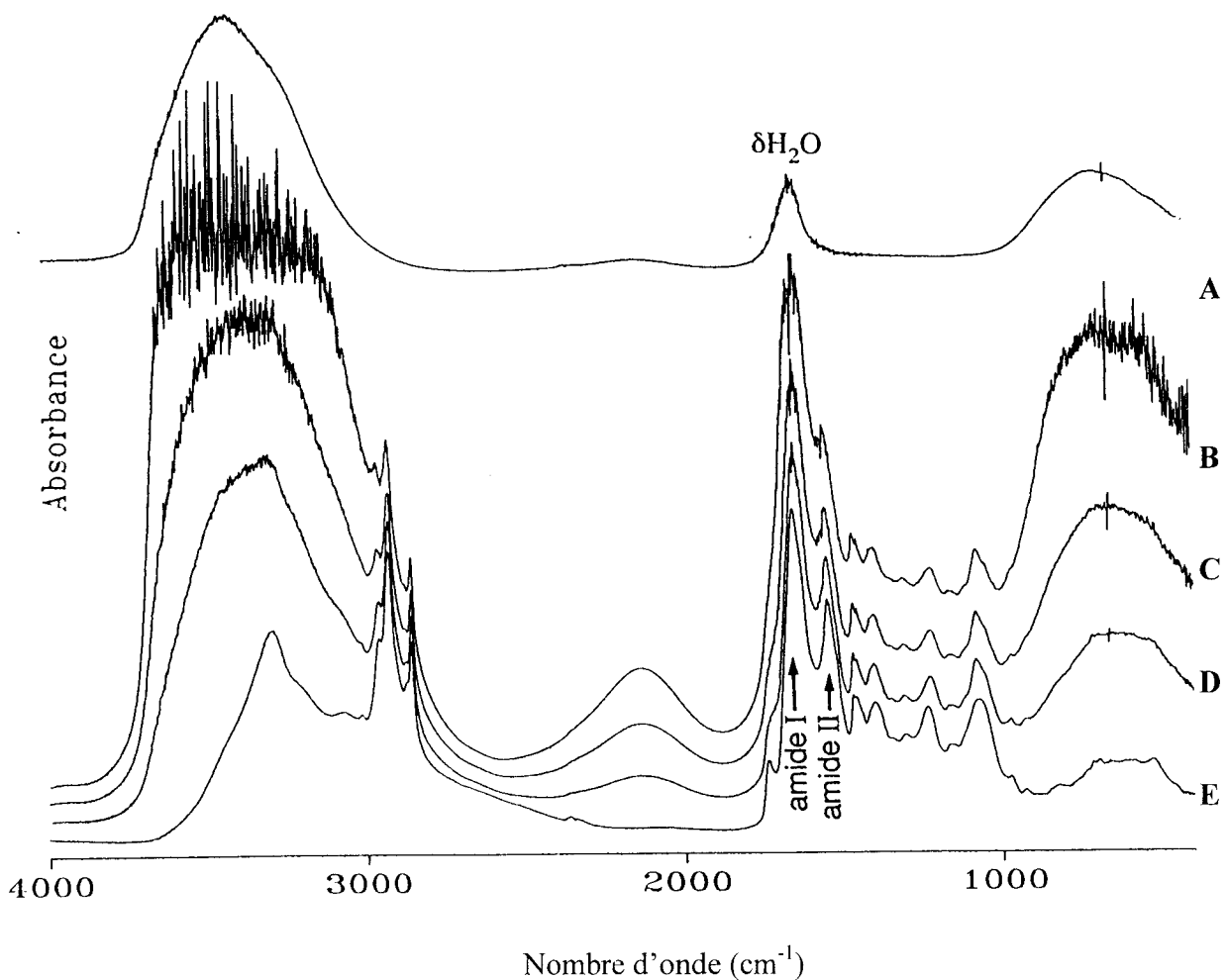


Figure IV.2: Spectres FT-IR de la vapeur d'eau résiduelle (A) et du tissu cérébral déshydraté (B, C, D et E) en fonction de temps (2, 4, 6, et 10 minutes).

Le spectre de la vapeur d'eau (A) présente trois bandes plus ou moins larges situées respectivement entre **900-1000 cm⁻¹**, **1500-1800 cm⁻¹** et **2800-3800 cm⁻¹**. Ces bandes sont attribuées respectivement **aux modes de libration**, de déformation δHOH et de l'élongation νOH de l'eau. La comparaison du spectre du tissu frais avant (B) et après sa déshydratation (spectres C, D et E), montre que les rapports d'intensités apparentes des bandes: **amide I / amide II** et des bandes $\nu\text{N-H}$ / $\nu(\text{CH}_2 + \text{CH}_3)$ varient en fonction de degré de déshydratation du tissu. Cette variation est due au changement d'intensité des bandes dues aux modes δOH et νOH de l'eau.

Un déplacement du maximum d'absorption des bandes amide I et II vers les grands nombres d'ondes et un affinement de leur profil sont également notés. Le spectre final obtenu après une bonne déshydratation du tissu (E) est d'aussi bonne qualité que ceux de la littérature (spectres traités mathématiquement).

B) Spectrométrie de diffusion Raman

Le signal de l'eau est plus faible en Raman qu'en infrarouge. Pour l'acquisition des spectres, nous avons travaillé aussi bien en macro- qu'en micro- spectrométries Raman; l'une pour connaître la composition globale du tissu, et l'autre pour connaître la répartition des composantes chimiques dans le tissu. Nous avons utilisé des excitatrices émettant dans le domaine du **proche infrarouge** pour minimiser les problèmes de fluorescence et de dégradation du tissu, et des excitatrices émettant dans le domaine **du visible** pour exalter certaines bandes de certains chromophores présents dans le tissu.

1) Macrospectrométrie FT-Raman du tissu cérébral sain frais

Sur la Figure IV.3, nous avons représenté un exemple de spectre FT-Raman d'un tissu cérébral **frais** prélevé du cortex temporal d'une **personne saine**, montrant deux tissulaires, l'une riche en protéine (A) et l'autre riche en lipides (B).

Dans la région entre **1700-1630 cm⁻¹**, la **bande amide I** présente une composante unique à **1660 cm⁻¹** dans les deux spectres. Selon le diagramme de Krimm et Bandekar [9], ce nombre d'onde peut être caractéristique soit de l'hélice α , soit de la forme désordonnée, alors que les études de Frushour et Koenig [11,12] indiquent qu'il est caractéristique de **l'hélice α** . La position de la bande **amide III à 1267 cm⁻¹** associée à la bande à **1298 cm⁻¹**,

(δCH_2) appuie la conformation α [12,13]. Ainsi, la combinaison des bandes amide I et III montre que la majorité des protéines du tissu cérébral **frais sain** sont de structure α . Ce résultat est en accord avec la littérature [14-16].

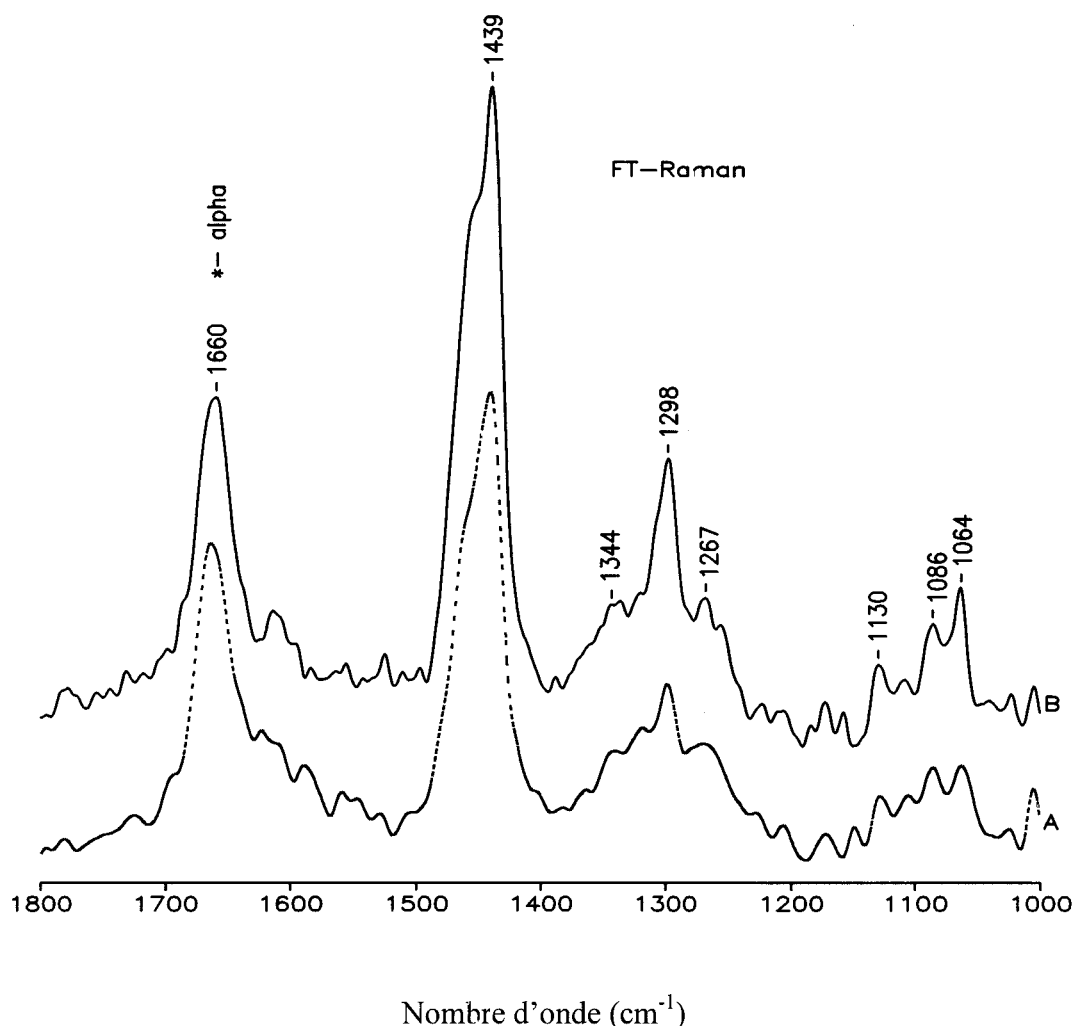


Figure IV.3 : Spectres FT-Raman d'un exemple de tissu cérébral frais prélevé dans le cortex temporal d'une personne saine. A) zone tissulaire riche en protéines et B) zone tissulaire riche en lipides.

Cependant, les spectres A et B présentent des bandes caractéristiques des lipides, notamment à 1439, 1298, 1267, 1130, 1086 et 1064 cm^{-1} . Les attributions de ces bandes faites à partir de la littérature [17-20], sont rassemblés dans le Tableau IV.1. Nous avons vu dans le chapitre III que les lipides peuvent exister sous deux conformations (Voir Figure III.12): **cis** (1656 cm^{-1}) et **trans** (1668 cm^{-1}). Ainsi, la région de la bande amide I peut contenir à la fois des contribution des lipides et des protéines. Mais, vu que la bande amide I apparaît dans le spectre B à 1660 cm^{-1} , on peut dire que les **lipides** du tissu **cérébral sain** dans la région tissulaire analysée sont de conformation **cis** (comme les lipides du sein).

Cette hypothèse était valable pour toutes les régions corticales et hippocamiques que nous avons analysées. Les lipides de conformation trans semblent être absents, nous avons donc conclu que les lipides du tissu cérébral seraient de **conformation cis**.

Tableau III.1: Attributions des fréquences des spectres Raman du tissu sain [17-20].

Bandes Raman (cm^{-1})	Groupements	Attributions Modes de vibrations
Graisse du sein		
1660	amide I	$\nu(\text{C=O})$ hélice α
	double liaison cis	$\nu(\text{C=C})$
1439	polyméthylène	$\delta_{\text{sc}}(\text{CH}_2)$
1298	polyméthylène	$\delta_{\text{t}}(\text{CH}_2)$, $\delta_{\text{r}}(\text{CH}_2)$
1267	amide III hélice α	$\nu(\text{CN})$ et $\delta(\text{NH})$
	double liaison cis	$\delta(\text{C-H})$
1130	double liaison cis	$\nu_{\text{s}}(\text{C-C})$
1086	phosphates	$\nu(\text{C-C})^-$
1064	polyméthylène	$\nu_{\text{as}}(\text{C-C})$ squelette cis

ν : Stretching, δ : Bending, r : Rocking, sc : Scissoring, t : Twisting, w : Wagging, s : Symétrique, as : Anti-Symétrique.

ii) Microspectrométrie Raman

Nous avons représenté deux spectres micro-Raman d'un tissu cérébral prélevé dans le cortex temporal d'une personne saine. L'un montre une région tissulaire riche en protéines (Figure IV.4) et pauvre en lipides.

Dans la gamme entre **1700 et 1400 cm^{-1}** , la bande **amide I** apparaît à **1661 cm^{-1}** et la bande **amide III** à **1264 cm^{-1}** . Ces deux bandes sont caractéristiques de la conformation en **hélice α** . Cette région du tissu cérébral sain est riche en protéines (composante intense à **1449 cm^{-1}**).

Les bandes entre **1620-1540 cm^{-1}** , qui sont pratiquement inexistantes dans les spectres FT-Raman du tissu sont observables dans les spectre micro-Raman, sont caractéristiques des résidus d'acides aminés aromatiques (tyrosine, phénylalanine et tryptophane).

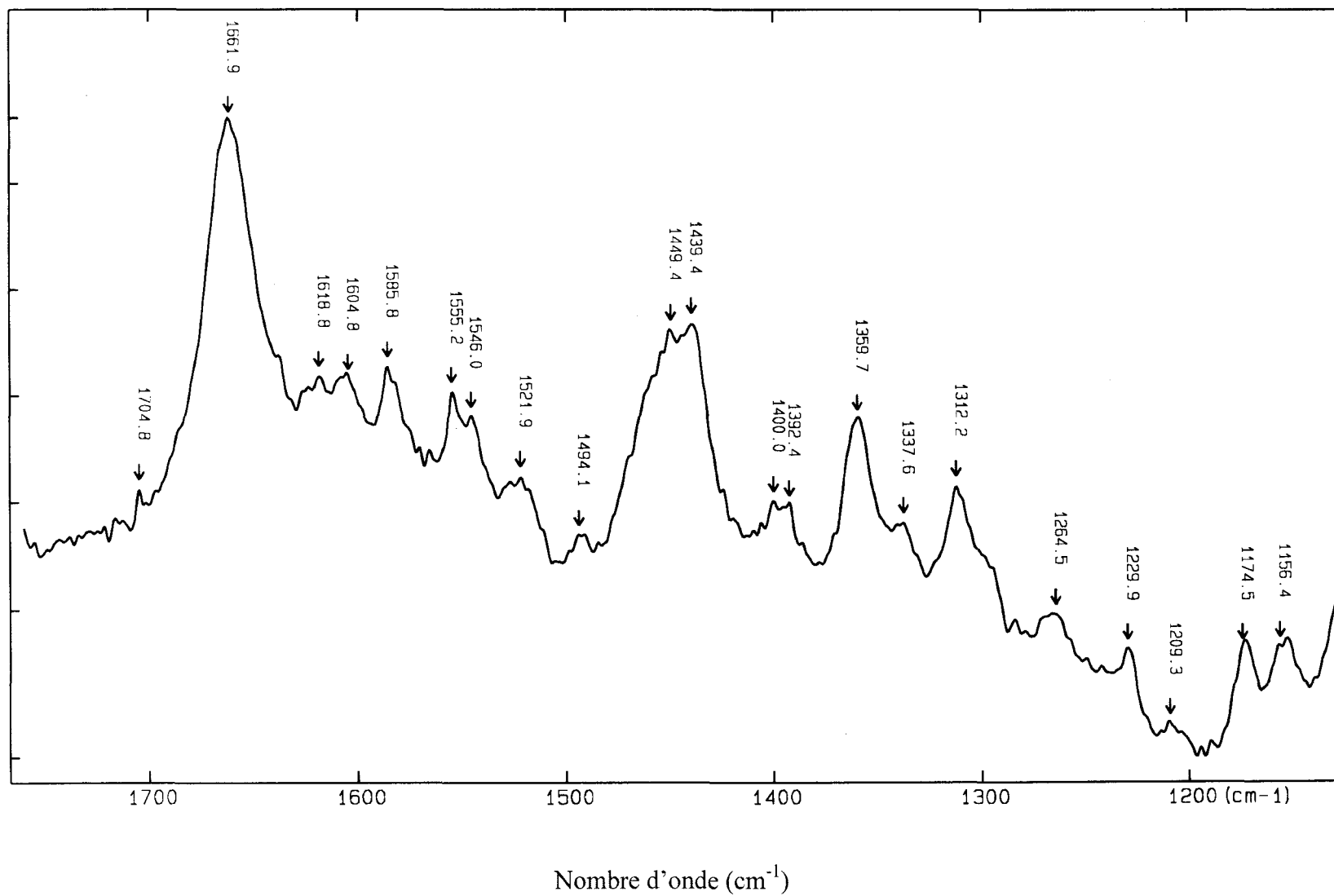


Figure IV.4: Spectre micro-Raman d'un tissu cérébral frais prélevé du cortex temporal d'une personne saine montrant une région tissulaire riche en protéines et pauvre en lipides.

La gamme spectrale entre $1400\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ est caractérisée par la présence de plusieurs bandes situées vers 1392 , 1359 , 1336 , 1312 cm^{-1} , attribuées aux modes δCH_2 . En revanche, les bandes situées à 1229 et 1174 et 1156 cm^{-1} , sont attribuées aux modes de vibrations des groupements C-C du squelette.

B) Caractérisation spectroscopique des substances grise et blanche

Le cerveau humain apparaît à l'œil nu comme un tissu homogène. Cependant, l'histologie du cerveau, montre de types des substance distinctes la SB et la SG, qui peuvent être distinguées à l'œil nu, mais aussi par spectrométrie de vibration. Des spectres FT-IR et FT-Raman des échantillons de SB (WM) et de SG (GM) sont représentés sur la Figure IV.5.

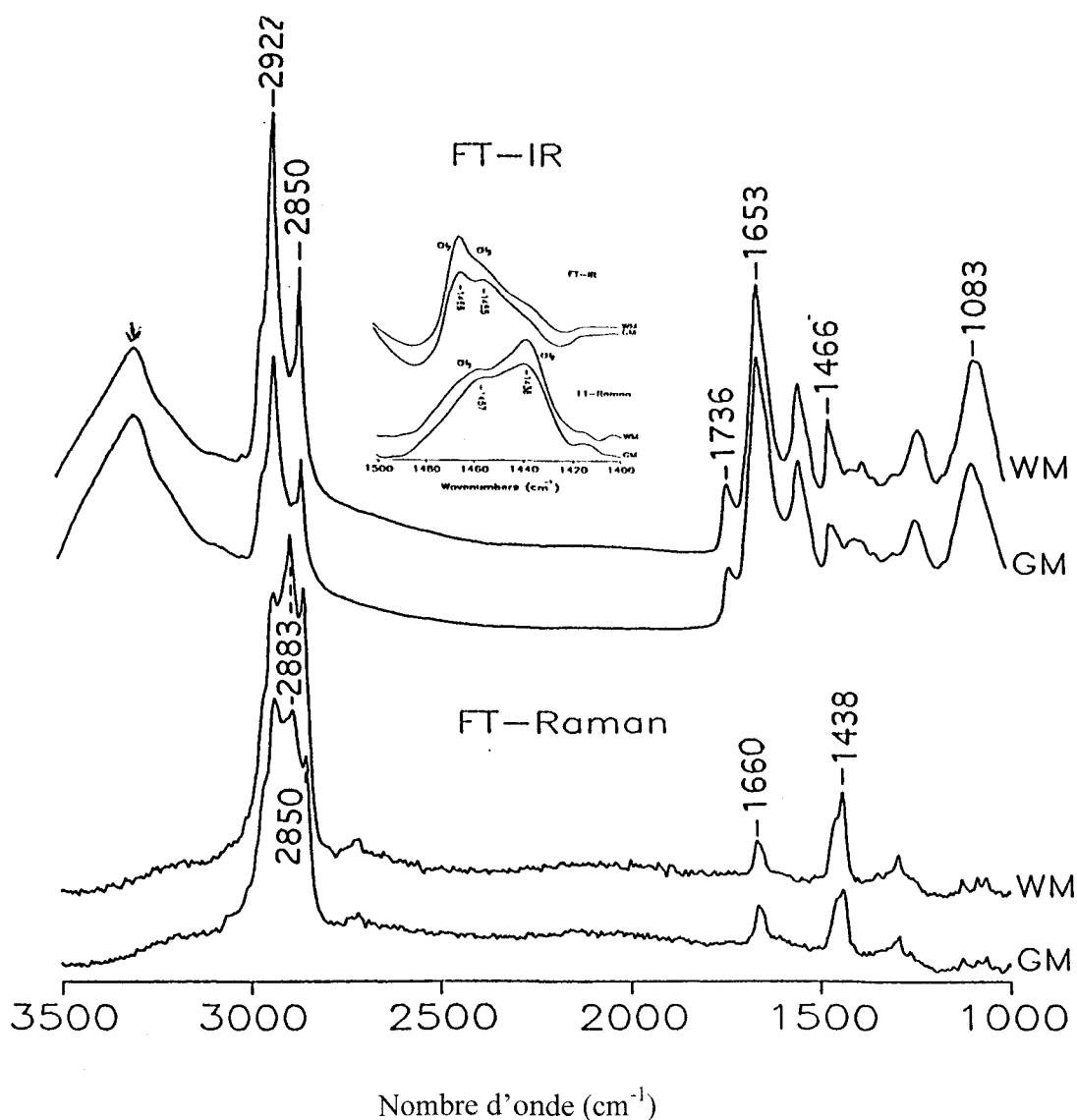


Figure IV.5 : Spectres FT-IR (Quelques microgrammes du tissu étalés sur fenêtre IR) et FT-Raman (quelques microgrammes du tissu séchés, 400 accumulations, 200 mW) du même tissu cérébral sain frais déshydraté de substance grise (GM) et de substance blanche (WM).

Les différences principales entre ces spectres sont localisées dans les régions entre 3400-2800 cm^{-1} et 1500-1400 cm^{-1} . Les variations des rapports d'intensités relatives des bandes caractéristiques des lipides observées entre les spectres de vibration de ces substances sont dues à leurs natures chimiques. En effet, la SB (WM) est riche en acides gras en C_{18} , composés de longues chaînes de groupements CH_2 , alors que la SG est riche en protéines avec une forte proportion de groupements CH_3 . Les bandes caractéristiques des lipides et leurs attributions sont regroupées ci-dessous:

	$\nu_{\text{as}}+\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$	$\nu_{\text{as}}+\nu_{\text{s}}\text{CH}_3$	δCH_2	δCH_3	$\nu\text{C=O esters}$
IR	2922 et 2850	2956 et 2874	1457	1466	1736
Raman	2883 et 2850	2958 et 2931	1451	1438	

C) Conclusion

Pour mieux caractériser le tissu cérébral **sain frais**, nous avons d'abord analysé différents prélèvements provenant d'un même échantillon, ensuite, des prélèvements qui provenaient de différents échantillons prélevés dans différentes régions du cerveau, en l'occurrence, le cortex (frontal, temporal et occipital), l'hippocampe et la corne d'amon. Le choix de ces régions étant lié au dépôts d'amyloïde dans le cerveau des malades Alzheimer. Les spectres de vibration de ces tissus ne sont pas tous présentés, car **les résultats étaient reproductibles**.

Nous avons analysée des régions tissulaires très riches en lipides, mais, nous n'avons jamais détecté la présence de la bande à 1668 cm^{-1} caractéristique des lipides trans. Le cortex et l'hippocampe semblent contenir des lipides de conformation cis (1656 cm^{-1}). L'analyse des régions cérébrales riches en protéines, indiquaient que les protéines du tissu sain sont de conformation en hélice α . Ainsi, on peut conclure que la bande amide I pourrait être utilisée dans le diagnostic spectroscopique de la MA

1.3 TISSU DEPARAFFINE PREALABLEMENT FIXE AU CARNOY

Le diagnostic histopathologique de la MA est établi sur du tissu cérébral ayant déjà été inclue en paraffine. Le processus de paraffinage permet l'inhibition des réactions biochimiques subséquentes, mais il nécessite l'utilisation de plusieurs solvants. Nous avons donc caractérisé du tissu cérébral sain **déparaffiné**, préalablement fixé au **carnoy**. Sur la Figure IV.6 sont rassemblés des exemples de spectres FT-IR et FT-Raman du tissu frais (FT) et du tissu traité au carnoy (PT).

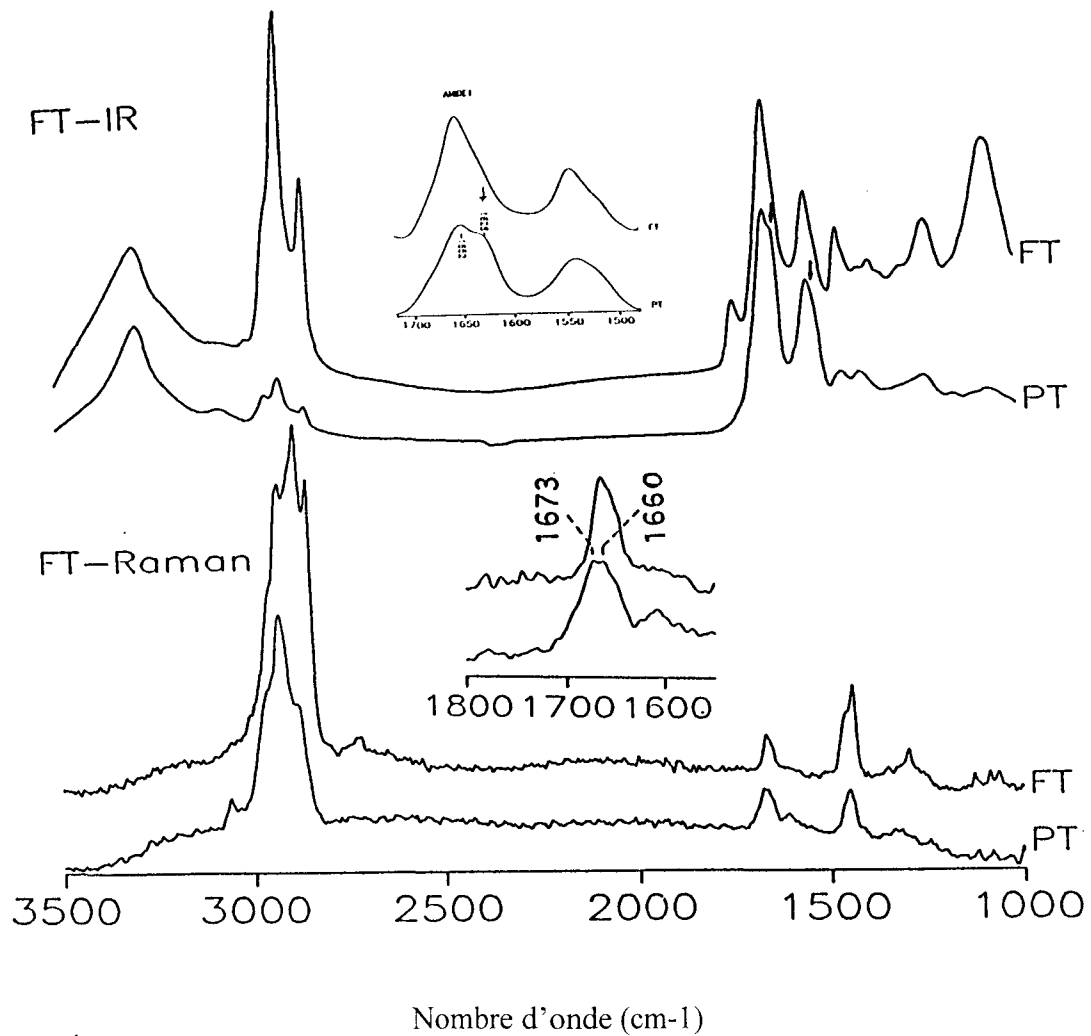


Figure IV.6: Comparaison de spectre FT-IR et FT-Raman du même tissu cérébral sain frais (FT) et déparaffiné (PT)

La comparaison des spectres de vibration du tissu frais (FT) et traité (PT) montrent un changement dans le profil de l'ensemble des bandes spectrales du tissu traité. Ce changement se manifeste par une délipidation, une solubilisation d'une partie des acides

nucléiques et une dénaturation des protéines. Ces processus sont rendus évidents dans les spectres de vibration du tissu traité par une diminution importante en intensité des bandes caractéristiques des lipides [entre 3000-2800 cm^{-1} (ν_{as} et $\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$ des acides gras), à $\sim 1736 \text{ cm}^{-1}$ ($\nu\text{C}=\text{O}$ des esters) et entre 1430-1470 cm^{-1} (δCH_2)] et des acides nucléiques [entre 1100-1000 cm^{-1} (ν_{as} et $\nu_{\text{s}}\text{PO}_2$)], ainsi qu'un changement de conformation des protéines.

En effet, dans les spectres de vibration du tissu **frais**, la bande **amide I** possède une **seule composante** caractéristique des protéines de conformation en **hélice α** , à **1653 cm^{-1}** en **IR** et à $\sim$ **1660 cm^{-1}** en **Raman**. En revanche, dans le **spectre IR** du tissu **traité** apparaît une **seconde composante** de la bande **amide I** à **1628 cm^{-1}** et une autre sur la bande amide II à 1524 cm^{-1} (initialement à 1540 cm^{-1} dans le spectre du tissu traité). Ces composantes sont indiquées par des flèches dans les spectres FT-IR.

Des changements similaires dans le spectre **FT-Raman** du tissu **traité** montrent aussi une seconde composante sur la bande **amide I** à **1673 cm^{-1}** et un déplacement de la bande **amide III** vers **1246 cm^{-1}** (initialement à $\sim$ **1265 cm^{-1}** dans le tissu frais). Ces nombres d'ondes indiquent la présence des protéines dénaturées dans le tissu **traité**, de conformation en **feuillet β -plissés**.

IV.2 EFFETS DES SOLVANTS SUR LE TISSU FRAIS SAIN

Pour connaître l'effet de chaque solvant utilisé lors de la technique de l'inclusion en paraffine, nous avons repris tous les étapes utilisées depuis le prélèvement (Voir Figure II.1) jusqu'à la prise des spectres. Après la mort du sujet, le tissu est soit congelé à basse température, soit fixé dans certains solvants chimiques et inclue en paraffine (Figure IV.7).

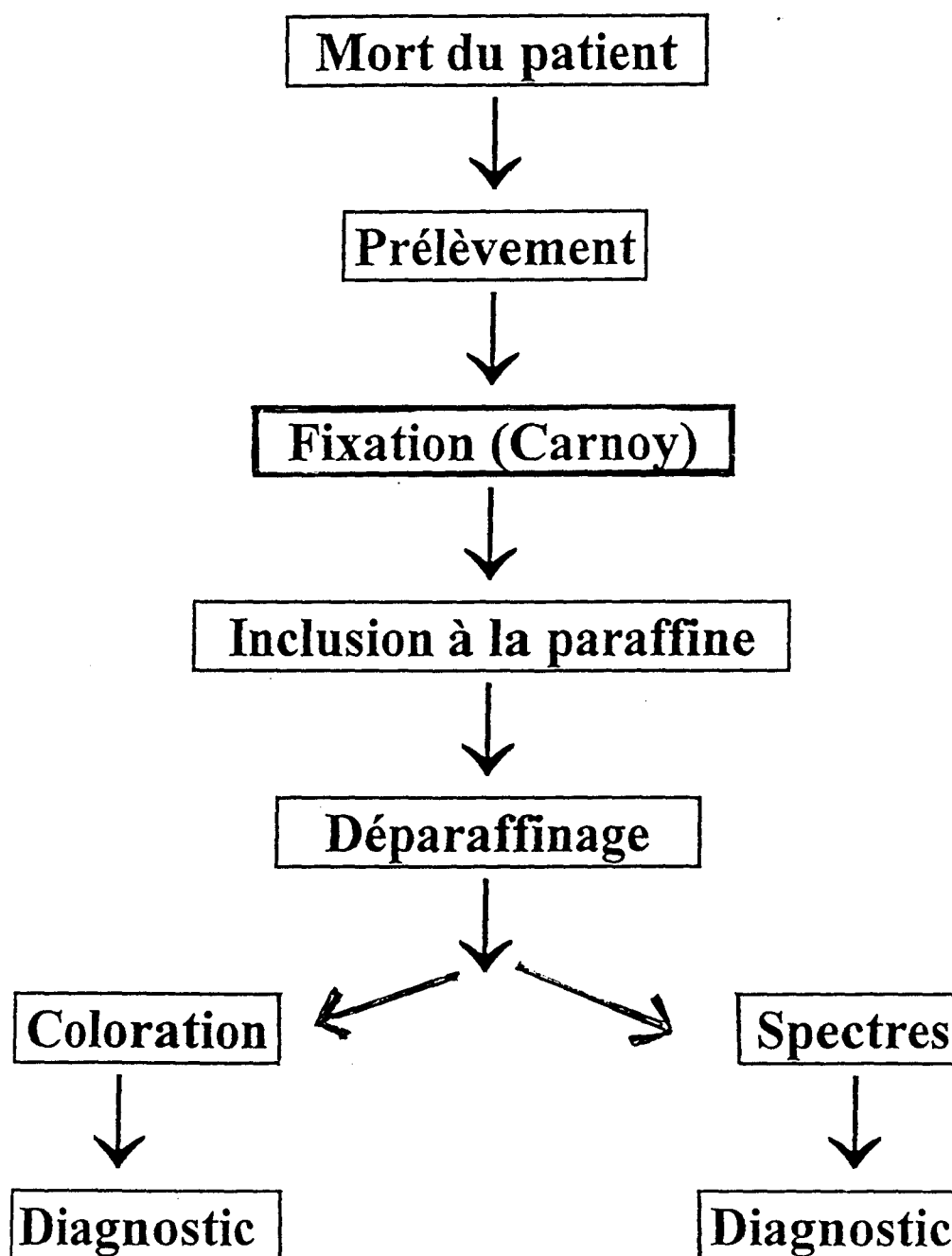


Figure IV.7: étapes effectués pour les traitements des échantillons biologiques depuis le prélèvement jusqu'à la prise des spectres.

Les premiers échantillons que nous avons étudiés étaient fixés au **carnoy**. Ce fixateur a été conçu en particulier pour la fixation des glucides, mais, il est utilisé dans certains laboratoires d'histopathologie pour **sa rapidité à fixer** d'une part, et parce qu'il offre une **meilleure coloration** d'autre part. Le tissu fixé est ensuite déshydraté dans l'alcool absolu puis dans le toluène, ensuite inclut dans des blocs de paraffine. Après le déparaffinage, les diagnostics histopathologiques et spectroscopiques peuvent être établis.

2.1 EFFET DE CARNOY SUR LES COMPOSANTES DU TISSU

Nous avons travaillé sur du tissu décongelé qui provenait de personnes saines. Pour l'acquisition des spectres FT-IR, quelques microgrammes de tissu étaient étalés sur des fenêtres de CaF_2 , puis séchés. En revanche, pour les spectres FT-Raman, environ 5 mg du tissu étaient déposés dans des cellules métalliques. Pour l'étude de l'effet des solvants, les échantillons étaient ensuite imprégnés de solvant et le temps de fixation (T_f) variait de 5 minutes à 72 heures. L'excès du solvant était éliminé après rinçages des échantillons à l'eau avant chaque mesure spectroscopique.

2.1.1 Spectrométrie d'absorption infrarouge

Sur la Figure IV.8a sont représentés les spectres FT-IR du **tissu cérébral frais sain** enregistrés **avant** et **après** le traitement **au carnoy** ($t_{\text{fixation}} = 2, 7, 10, \text{ et } 24 \text{ heures}$).

La comparaison de l'ensemble de ces spectres montre que **le carnoy semble avoir altéré toutes les bandes associées aux protéines, aux lipides et aux acides nucléiques**. Ces altérations se manifestent par une diminution d'intensité et un changement du profil de certaines bandes, en particulier celui de la bande amide I, où on note la diminution d'intensité de la composante α à 1653 cm^{-1} , et l'apparition d'une nouvelle composante β à 1628 cm^{-1} dont l'intensité augmente avec le temps de fixation. Dans la région de la bande amide I, on peut constater que la composante α domine entre 0 et 8 heures de traitement au carnoy, et inversement, c'est la composante β qui domine après 8 heures de traitement. Ces deux composantes ont quasiment la même intensité au bout de 8 heures de traitement.

Les autres changements se manifestent par une réduction de l'intensité des bandes des lipides [$(2800\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}) (\nu\text{CH}_2)$, $1467 \text{ cm}^{-1} (\delta\text{CH}_2)$, $1735 \text{ cm}^{-1} (\nu\text{C=O})$] et des bandes

acides nucléiques [1224 et 1087 cm^{-1} $\nu_{\text{as}} + \nu_{\text{s}}(\text{PO}_2^-)$]. Ces observations indiquent une solubilisation d'une partie des graisses (délipidation) et d'une partie d'acides nucléiques.

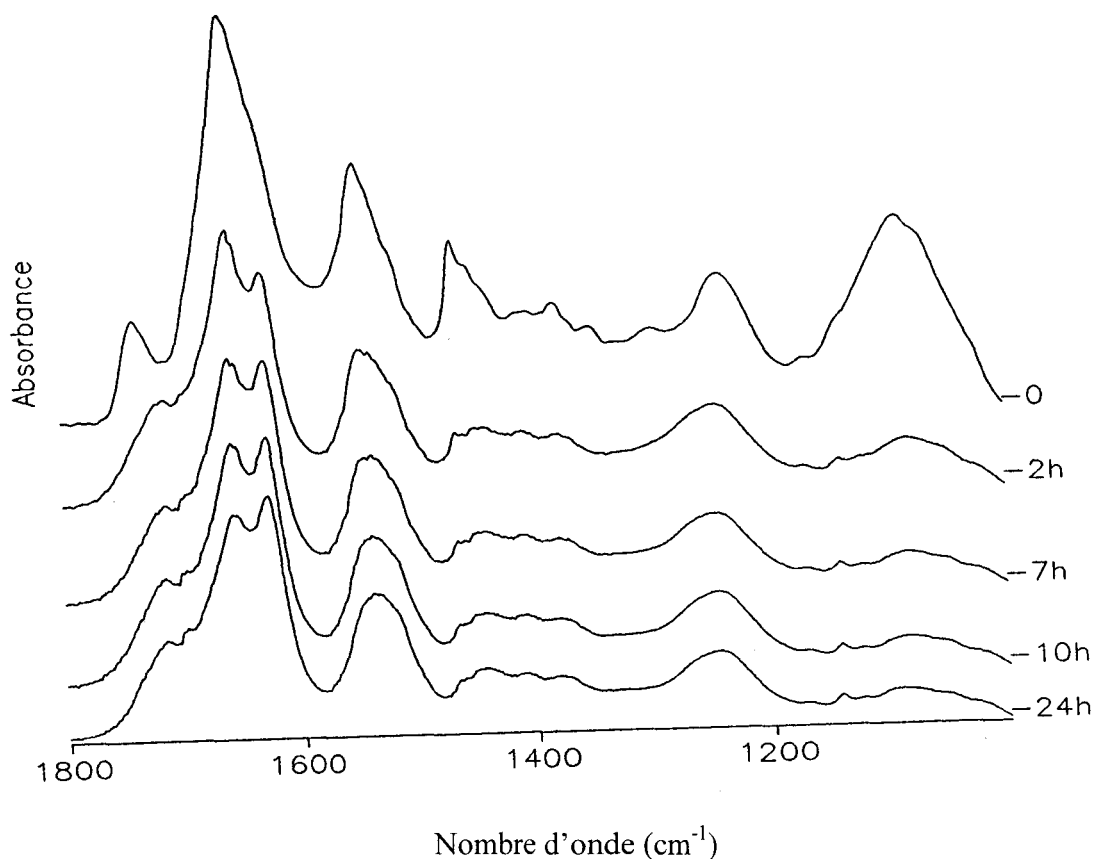


Figure IV.8a: Spectres FT-IR du tissu frais montrant l'évolution du profil de la bande amide I en fonction du temps de fixation au carnoy ($t_{\text{fixation}} = 2, 7, 10, \text{ et } 24$ heures).

2.1.2 Spectrométrie de diffusion Raman

Sur la Figure IV.8b sont représentés quelques exemples de spectres FT-Raman montrant l'effet du carnoy sur les composantes du tissu cérébral sain frais. Le temps de fixation (t_f) variait de 5 minutes à 4 heures. L'ensemble des résultats obtenus montre une dénaturation et une délipidation. En effet, la bande amide I dans le spectre du tissu non traité (A) présente une composante α unique à 1660 cm^{-1} . En revanche, les spectres du tissu traité en fonction du temps [30 minutes (B), 1 heure (C) et 4 heures (D)] montrent une diminution d'intensité de la composante α et une apparition d'une nouvelle composante β à 1668 cm^{-1} , dont l'intensité augmente avec le temps de fixation. La composante β devient unique dans le spectre C obtenu après 4 heures de traitement au carnoy. Ces résultats sont similaires à ceux de l'IR, cependant, la composante β évolue plus rapidement dans les

spectres Raman, par exemple, le résultat obtenu au bout de 4 heures de traitement en Raman est équivalent celui qui est obtenu au bout de 24 heures en IR.

La délipidation augmente avec la dure de traitement au carnoy et se manifeste par une chute d'intensité des bandes caractéristiques des lipides [2883 et 2850 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}+\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$) et 1438 cm^{-1} (δCH_2)].

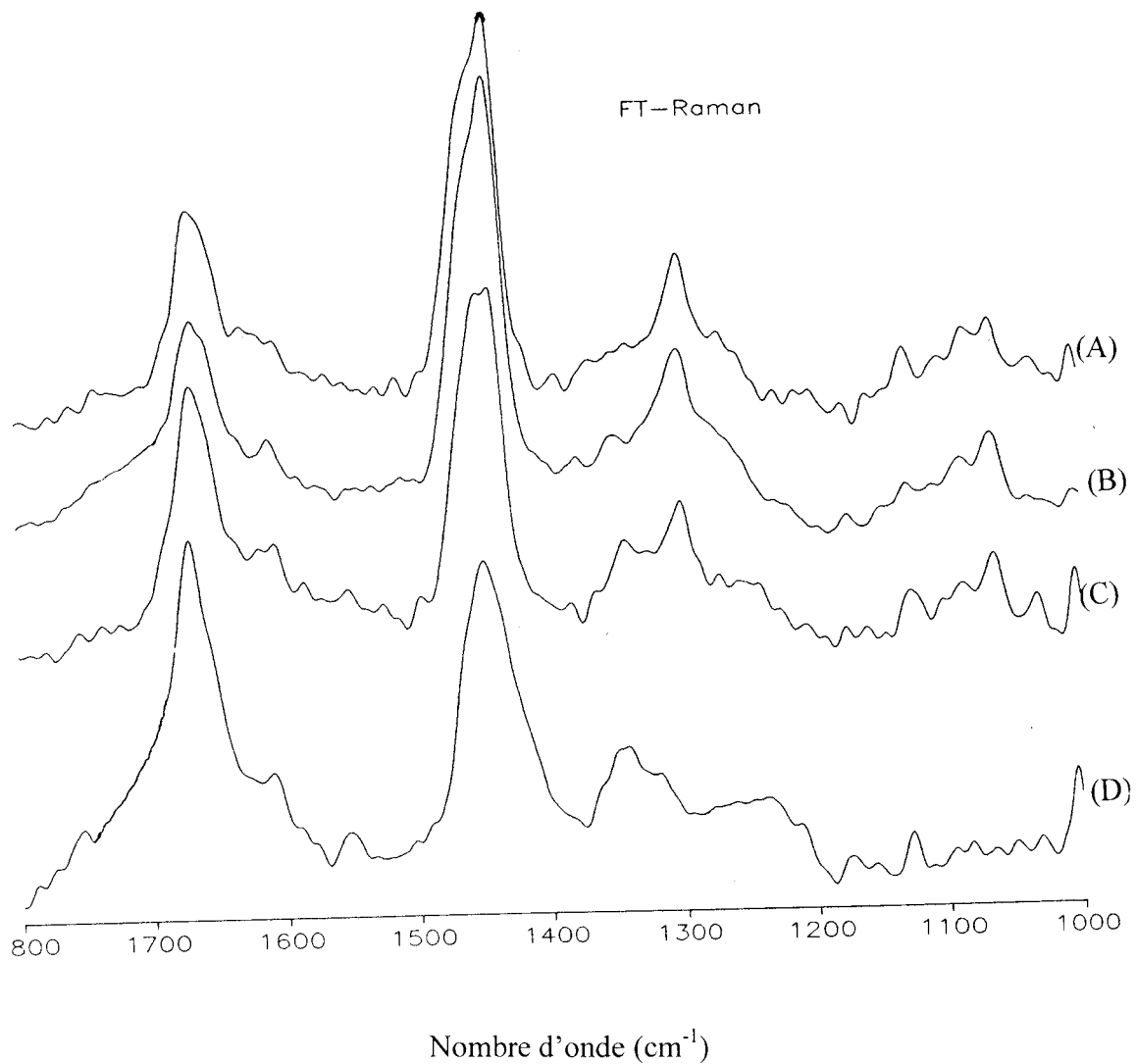


Figure IV.8b: Spectres FT-Raman du tissu cérébral frais montrant l'évolution du profil de la bande amide I en fonction du temps de fixation au carnoy (30 minutes (B), 1 heure (C) et 4 heures (D)).

2.2 EFFET DES COMPOSANTES DU CARNOY SUR LE TISSU

Les spectres de vibration ont montré que le carnoy ne solubilise pas seulement des lipides, des acides nucléiques, mais il dénature en plus une partie des protéines du tissu.

Comme carnoy est un mélange de trois solvants: l'**acide acétique**, le **chloroforme**, et l'**éthanol absolu** en proportion (1/3/6), nous avons donc étudié l'effet de chacun de ces solvants sur la structure secondaire des protéines du tissu.

A) Le chloroforme et l'éthanol absolu

Nous avons étudié l'effet de ces deux solvants sur le tissu cérébral frais en fonction du temps de traitement. La durée de fixation variait de 5 minutes à plusieurs jours. Pour chaque cas, nous avons représenté sur la Figure IV.9 un exemple de spectres d'absorption IR avant (A) et après 30 minutes de traitements au chloroforme (B) et à l'éthanol absolu (C). Sur cette même Figure, nous avons représenté un spectre du tissu cérébral traité au toluène pendant le même temps (D). Le choix de ce dernier repose sur son utilisation dans la procédure de déparaffinage.

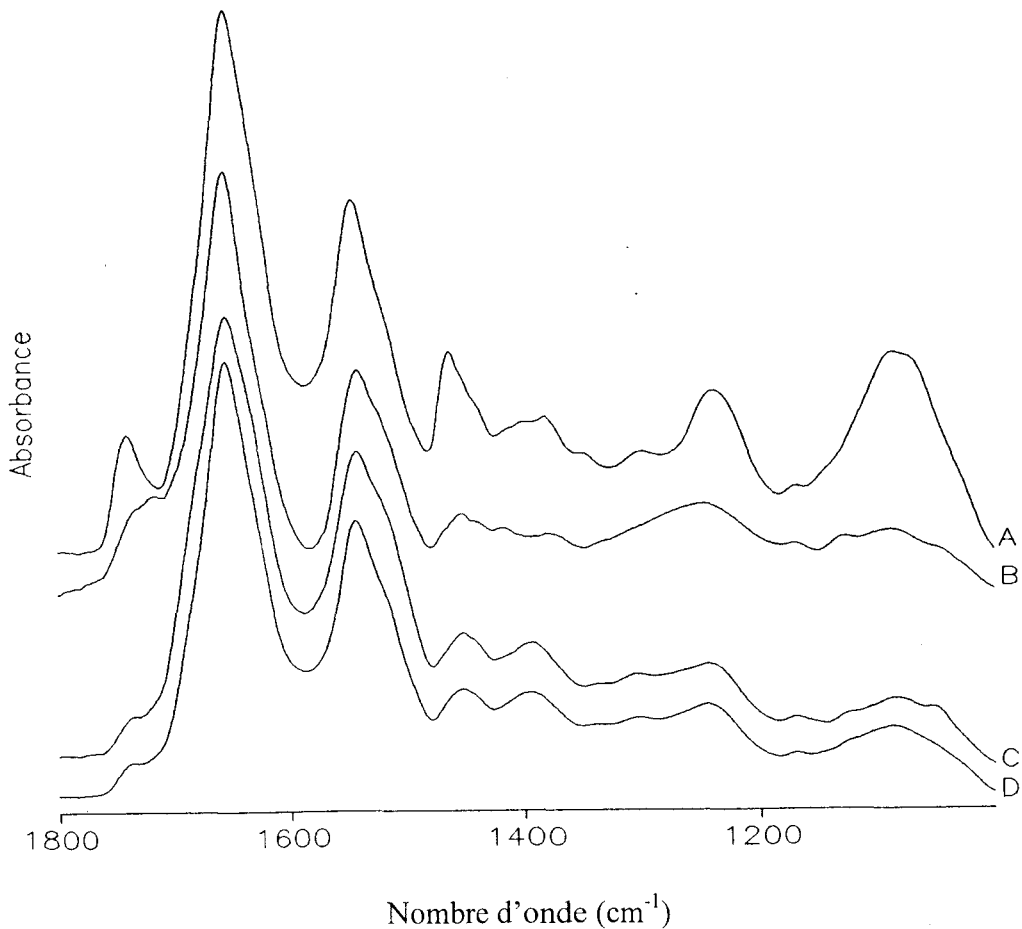


Figure IV.9: Spectres d'absorption FT-IR du tissu cérébral frais sain enregistrés avant et après traitement au chloroforme (B), à l'éthanol absolu (C) et au toluène (D).

Ces spectres montrent seulement une délipidation, la structure secondaire des protéines dans le tissu semble être préservée. Cependant, un temps long de traitement à l'alcool (plus de 48 heures) fait apparaître un épaulement caractéristique des protéines de structure β .

B) Le méthanol

Etant donnée que le méthanol est utilisé dans les laboratoires d'histopathologie pour la fixation des tissus biologiques, il nous a semblé important d'étudier son effet sur la structure des protéines (quelques exemples de spectres seront représentés par la suite). De plus, l'un de nos témoins était atteint de la maladie d'alcoolisme. Nous avons représenté sur la Figure IV.10, des spectres FT-Raman d'un tissu cérébral sain avant (A) et après sa fixation au méthanol (B) ainsi qu'un tissu non Alzheimer provenant d'un sujet alcoolique (C).

La bande amide I dans le spectre du tissu sain non traité (A) présente une composante α unique à 1660 cm^{-1} . A l'inverse, le spectre (B) du même tissu fixé au méthanol pendant 8 heures présente une composante β unique à 1668 cm^{-1} , ce qui indique une dénaturation. Le spectre (C) montre deux composantes α et β sur la bande amide I. On peut donc conclure que le méthanol affecte la structure secondaire des protéines dans le tissu

On peut se demander si une consommation excessive en alcool ne peut avoir à long terme un effet néfaste sur les structures des protéines dans l'organisme. D'une façon indirecte, ces résultats seraient contradictoires avec ceux qui étaient publiés récemment et qui évoquaient le rôle protecteur du vin rouge contre la MA. Peut être qu'une consommation **non modérée** du vin rouge pourrait aussi au fil des années entraîner des problèmes liés aux conformations des protéines.

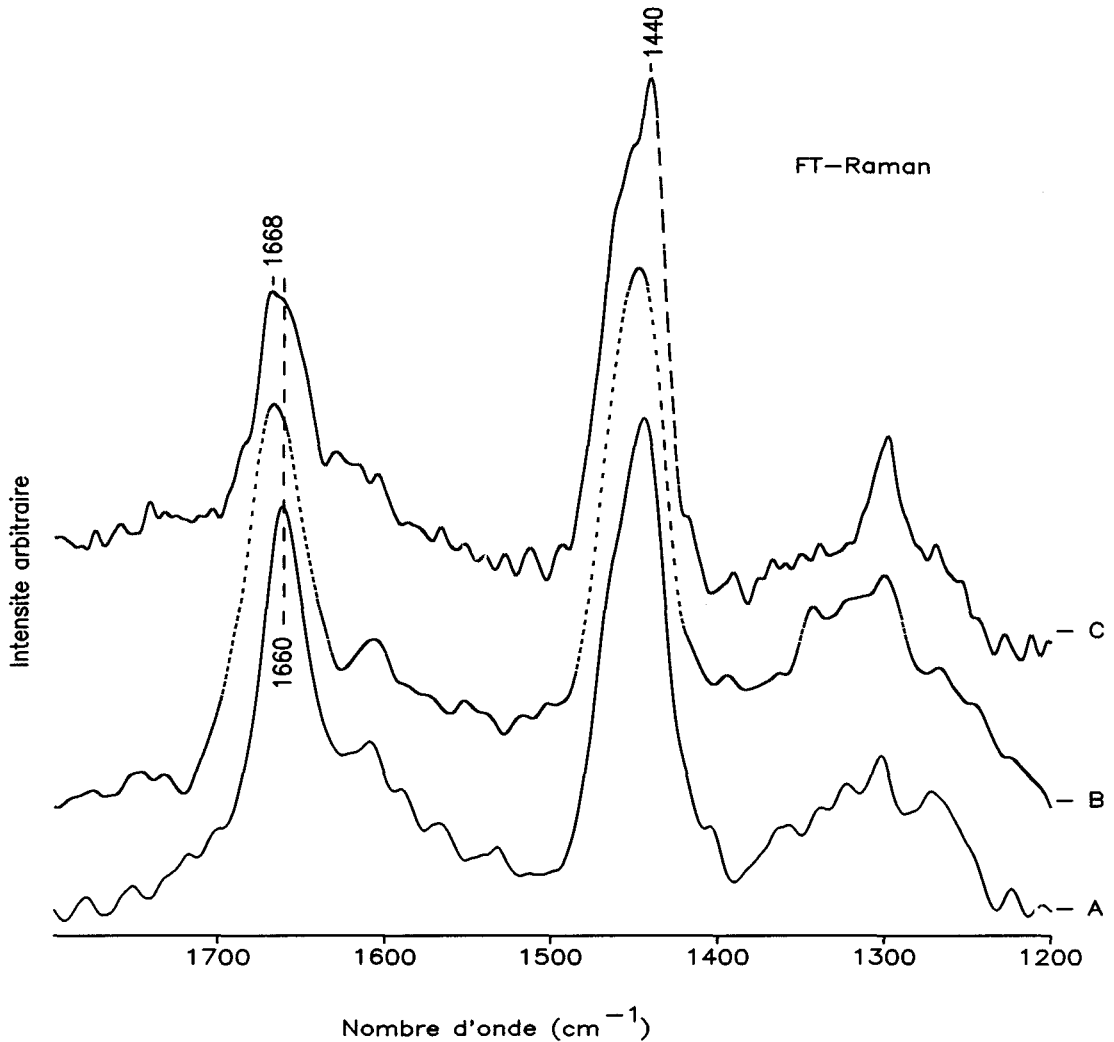


Figure IV.10: Ses spectres FT-Raman d'un tissu cérébral sain avant (A) et après sa fixation dans du méthanol pendant 8 heures (B) et d'un tissu provenant d'un sujet atteint de la maladie d'alcoolisme (C).

C) L'acide acétique glacial

a) *Effet sur les composantes du tissu cérébral*

Les spectres IR du tissu cérébral ont été enregistrés avant et après traitement à l'acide acétique en fonction du temps de fixation (30 minutes, 2, 4 et 12 heures) sont représentés sur la Figure IV.11.

Les spectres obtenus sont similaires à ceux du tissu traité au carnoy (voir Figure IV.8a). Cependant, tout en respectant la même durée de fixation, l'intensité de la composante β à 1628 cm⁻¹ évolue plus rapidement dans le cas du tissu traité à l'acide acétique par rapport à celui traité au carnoy. Par exemple, le résultat obtenu après 2 heures

de fixation au carnoy est obtenu au bout de 30 minutes avec l'acide acétique, ceci est normal car l'acide acétique ne représente que 10% dans le carnoy.

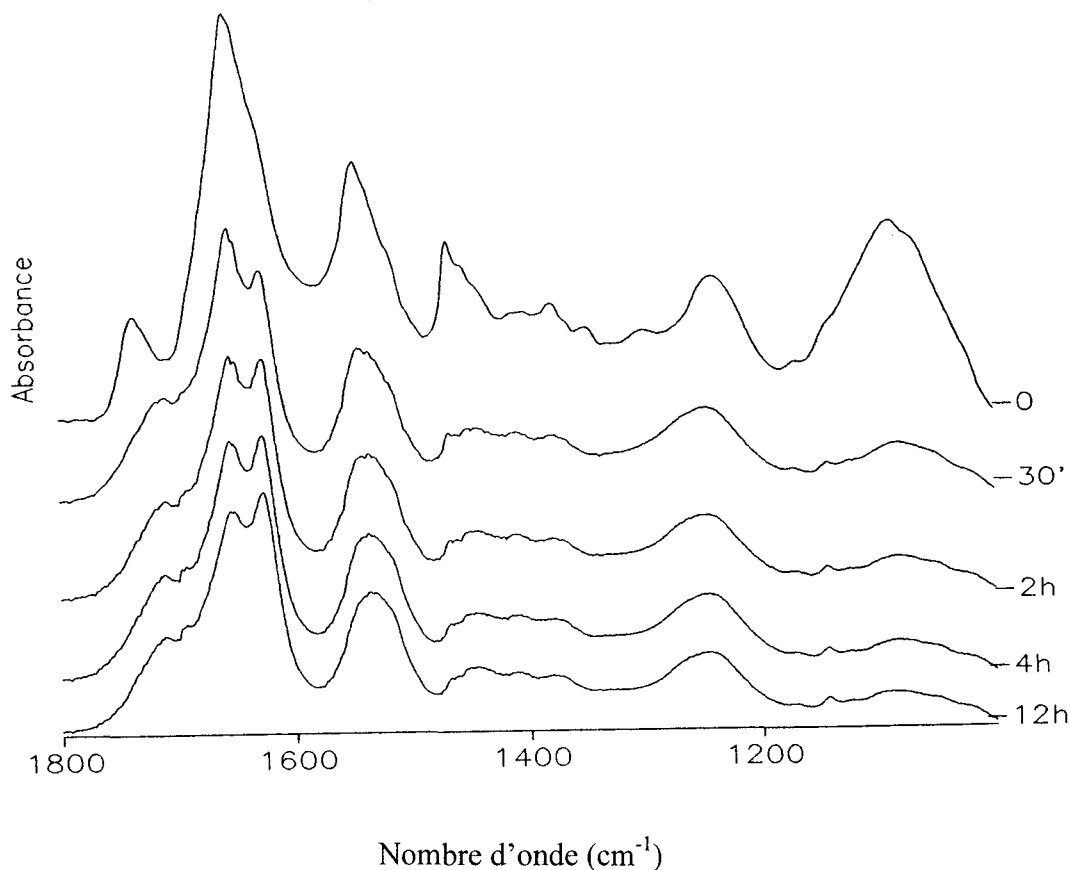


Figure IV.11: Spectres FT-IR montrant l'effet de l'acide acétique sur le tissu cérébral en fonction du temps (t_{fixation} = 0, 30 minutes, 2, 4 et 24 heures)..

b) Effet sur la structure secondaire des protéines modèles

Etant donné que les spectres du tissu traité à l'acide acétique et au carnoy montrent une chute d'intensité des bandes caractéristiques des protéines, nous avons envisagé l'éventualité que le tissu sain pouvait contenir à l'origine une faible quantité de protéines de structure β . Les changements observés pouvaient être alors dus à une solubilisation des protéines de structure α , ce qui laisse apparaître la composante β . Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié l'effet de l'acide acétique sur la structure secondaire de certaines protéines: l'insuline, l'élastine et le collagène.

Sur la Figure IV.12 sont représentés les spectres FT-IR (A et A') et FT-Raman (B et B') de l'insuline bovine avant et après dénaturation à l'acide acétique. Les bandes amide

I à 1657 cm^{-1} (A) et à 1661 cm^{-1} (B) montrent que l'insuline native est de structure α . En revanche, les spectres de vibration de l'insuline dénaturée montre des bande amide I à 1634 cm^{-1} (A') et à 1668 cm^{-1} (B'), caractéristiques de la structure β . Ceci permet de conclure qu'il s'agit bien d'une dénaturation.

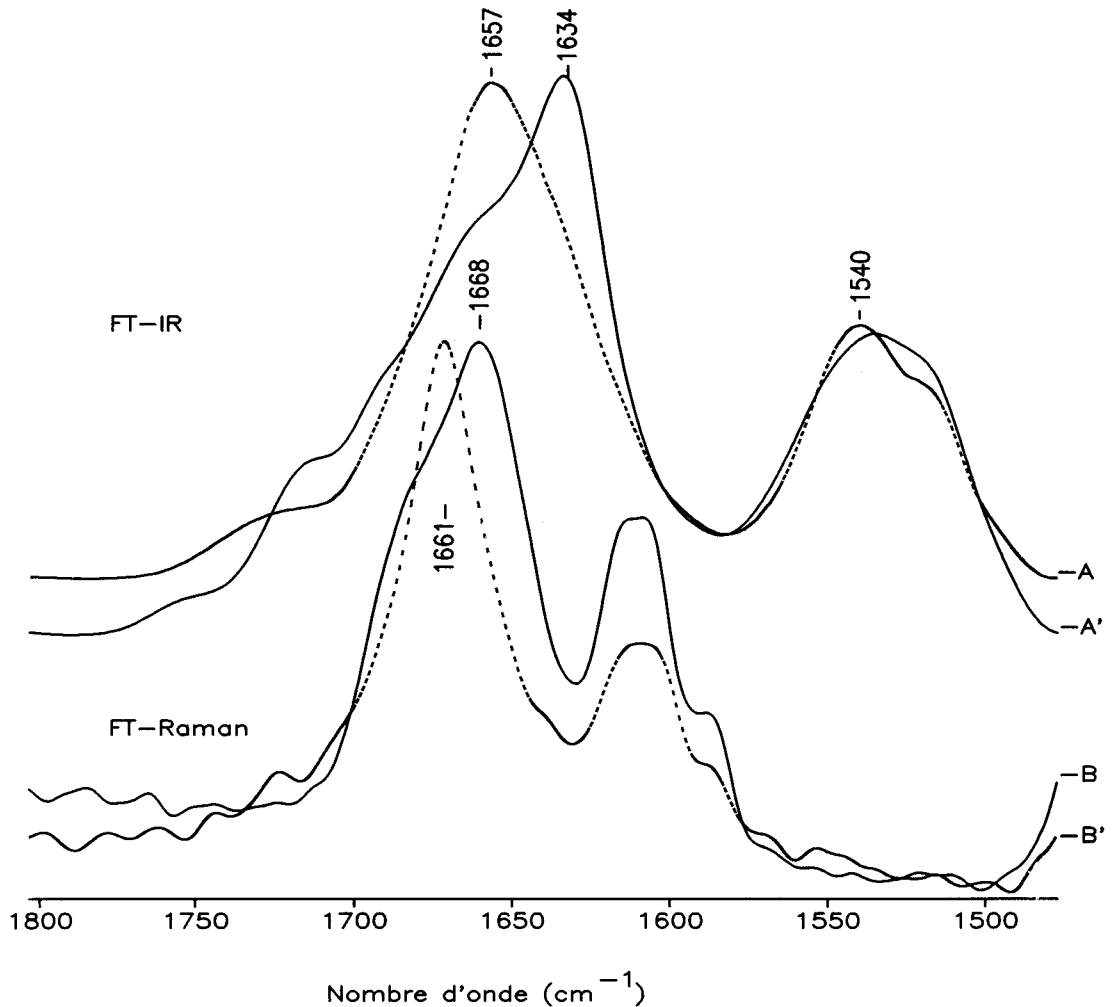


Figure IV.12: Spectres de vibration montrant l'effet de l'acide acétique sur la structure secondaire des protéines. Spectres FT-IR (A et A') et spectres FT-Raman (B et B') de l'insuline avant et après dénaturation dans l'acide acétique.

Ainsi l'ensemble des résultats obtenus après la fixation du tissu **au chloroforme** et à **l'éthanol absolu** montrent que le changement observé dans le profil de la bande amide I pour le tissu traité **au carnoy** semble être due à l'acide acétique seul. Cependant, l'alcool absolu peut dénaturer une partie des protéines si le temps de fixation est très long.

IV.3 DIAGNOSTICS SUR LES TISSUS TRAITES

3.1 DIAGNOSTIC PAR LES SOLVANTS DENATURANTS

A) Comparaison du tissu sain et tissu Alzheimer, frais et traités

Sur la Figure IV.13 sont représentés quelques exemples de spectres FT-IR montrant la région des bandes amide I et II d'un tissu sain frais (CFT), d'un tissu Alzheimer frais (AFT), d'un tissu sain déparaffiné (CPT) et d'un tissu Alzheimer déparaffiné (APT). Ces deux derniers sont préalablement fixé au carnoy.

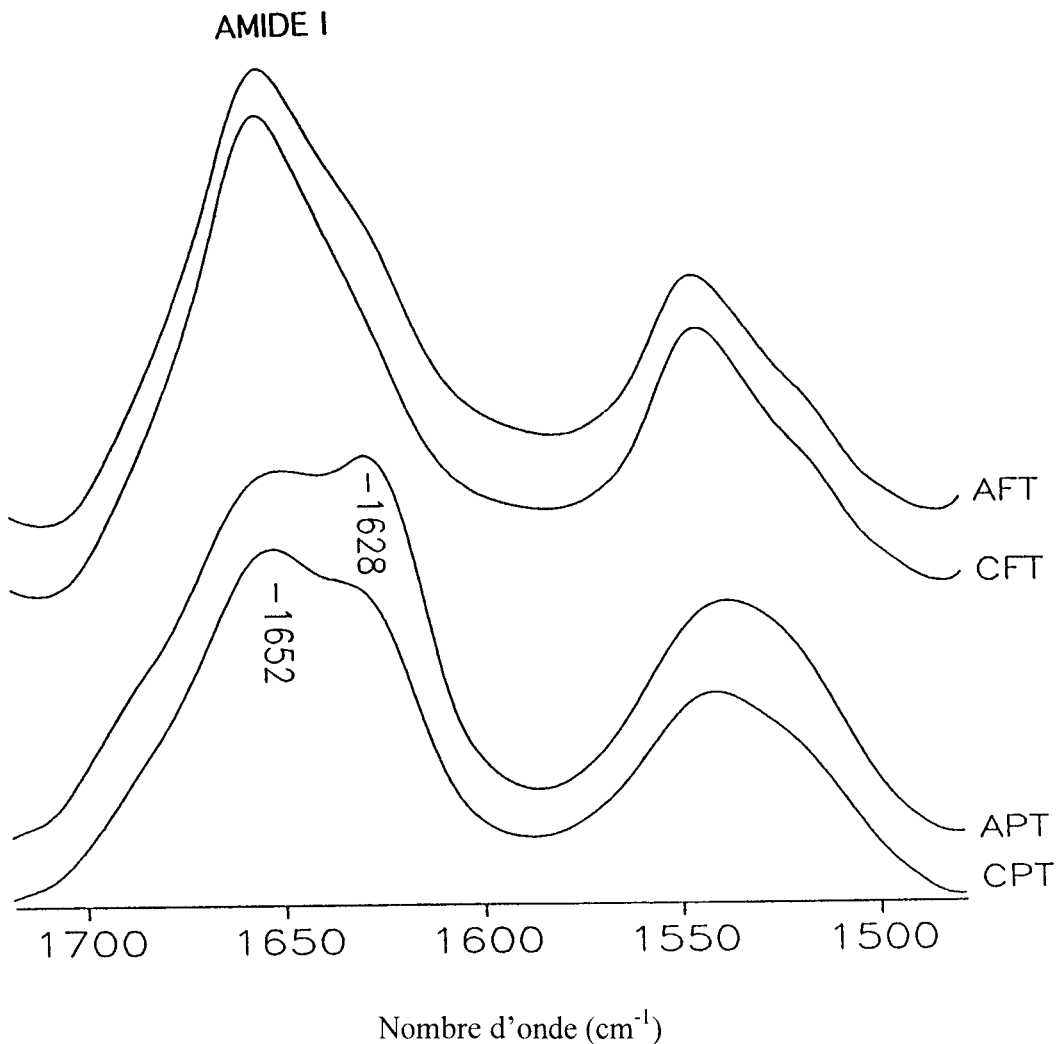


Figure IV.13: Comparaison des spectres FT-IR montrant les régions des bandes amide I et II d'un même tissu cérébral sain frais (CFT) et déparaffiné (CPT) et du même tissu Alzheimer frais (AFT) et déparaffiné (APT).

La comparaison des spectres du tissu **sain frais**(CFT) et du tissu **Alzheimer frais** (AFT) montre que ces tissus sont «pratiquement» identiques, mis à part la présence d'un

faible épaulement β à 1628 cm^{-1} chez le malade (**AFT**). Comme le tissu Alzheimer n'a pas été traité par des solvants, nous avons attribué cet épaulement aux protéines amyloïdes- β . Ce résultat est en accord avec celui de la littérature [14-16].

Pour vérifier la reproductibilité de ces résultats, nous avons caractérisé plusieurs prélèvements. Les résultats obtenus ont montré que l'épaulement β n'apparaît pas systématiquement des les spectres du tissu malade; il dépend de la quantité de protéines amyloïdes. Ceci nous a permis de conclure que le diagnostic de la MA par spectrométrie infrarouge ne peut pas être établi sur du tissu frais,

Par ailleurs, si l'on compare les spectres **du tissu traité (CPT)** et (**APT**), on peut constater que la composante α domine chez le **sain**, alors que la composante β domine chez le **malade**. Ceci suggère que **la majorité des protéines** dans le **tissu sain traité** est de structure α , alors que la **majorité des protéines** dans le **tissu Alzheimer** est de structure β . A partir de ces observations, on peut envisager d'établir un **diagnostic spectroscopique** de la MA par spectrométrie infrarouge sur du **tissu traité non coloré**. Ces résultats sont en accord avec les tests histopathologiques établis pour ces mêmes tissus qui étaient **positifs** pour le tissu **Alzheimer (APT)** et **négatifs** pour le tissu **sain (CPT)** malgré la **présence des protéines de structure β** . Ceci indique que la quantité ou la nature des protéines β dans le tissu doit avoir un rôle dans le degré d'interaction avec le colorant.

Pour vérifier la fiabilité de ces tests, nous avons analysé différents prélèvements déparaffinés, préalablement fixés au carnoy, mais les résultats obtenus n'étaient pas reproductibles. Ceci résultait certainement de l'échantillonnage. Par conséquent, il nous a semblé important de déterminer les conditions optimales de fiabilité d'utilisation des solvants de fixation aussi bien en histopathologie qu'en spectroscopie. Eventuellement, ceci serait possible si la cinétique de fixation au carnoy est différente pour le tissu sain et le tissu Alzheimer.

B) Conditions optimales de fiabilité de diagnostic aux solvants dénaturants

Nous avons étudié la cinétique de fixation à l'acide acétique et au carnoy sur le tissu cérébral Alzheimer frais de la même façon que pour le tissu sain frais (Voir Figures IV.8 et

IV.11). Sur la Figure IV.14, nous avons représenté des spectres FT-IR d'un tissu sain et d'un tissu Alzheimer enregistrés avant (A) et après fixation au carnoy (B et C).

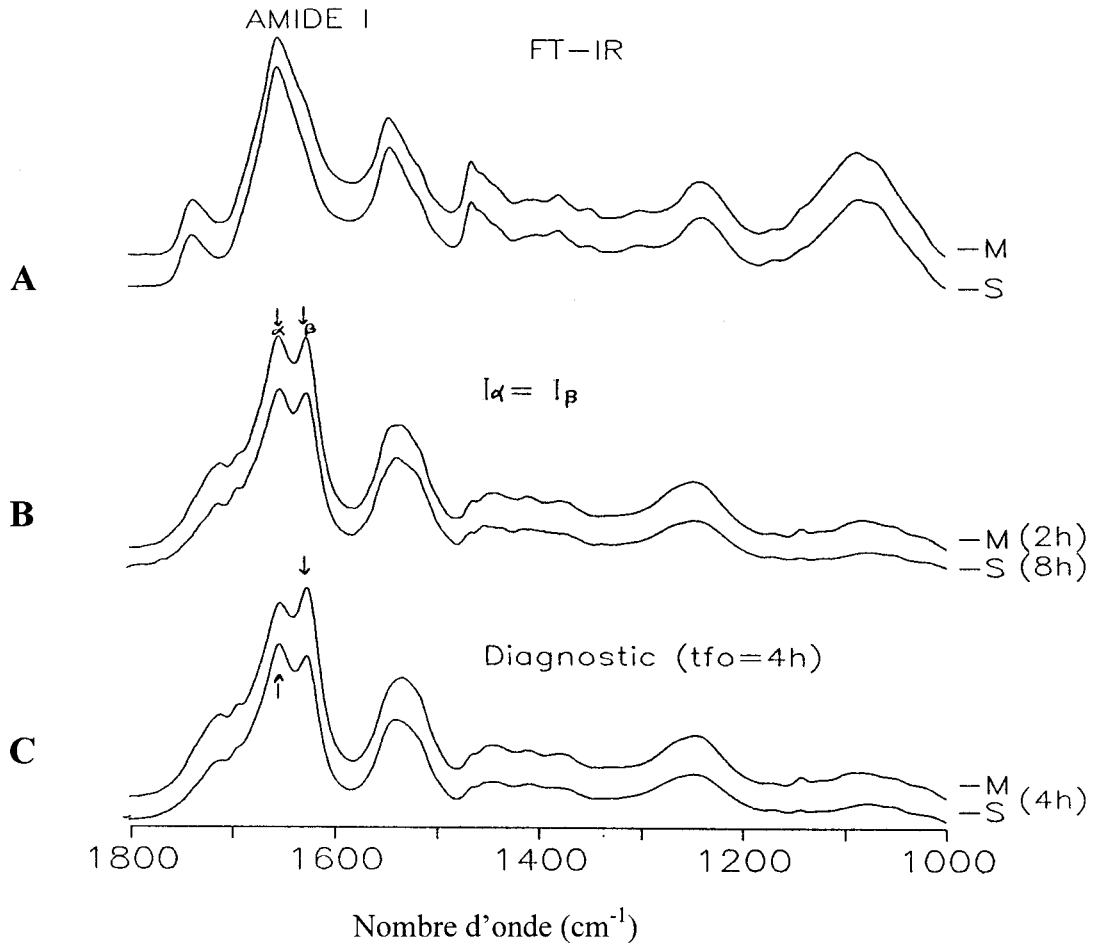


Figure IV.14: Spectres FT-IR d'un tissu sain et d'un tissu Alzheimer frais (A) et fixé au carnoy (B et C) montrant que la cinétique du carnoy sur la structure secondaire des protéines du tissu sain est différente de celle du tissu Alzheimer. **(A): La majorité des protéines sont de structure en hélice α ($I_\alpha > I_\beta$),** tissu sain frais (S) et tissu Alzheimer frais (M). **(B): A Autant de protéines de configuration α que de configuration β ($I_\alpha = I_\beta$),** tissu sain fixé ($t_f=8h$) (S) et tissu Alzheimer frais (M) ($T_f=2h$). **A $t_f=4$, la majorité des protéines sont de structure en feuillets β -plissés ($I_\alpha < I_\beta$), pour le tissu Alzheimer frais (M), mais ($I_\alpha > I_\beta$) pour le tissu sain frais.**

L'ensemble des spectres montre l'évolution de la bande amide I en fonction du temps de fixation au carnoy. Les spectres des tissus frais (S) et (M) sont pratiquement identiques. La bande amide I à 1652 cm^{-1} montre que la majorité des protéines dans les deux types de tissus sont de structure α . En revanche, les spectres des tissus traités (B et C) montrent l'évolution de la composante β en fonction de la durée de fixation, mais, cette évolution est plus accentué chez le malade.

Les composantes associées aux structures α et β dans les spectres (Figure IV.14B) sont de même intensité à un temps de fixation d'environ **2 heures chez le malade (M)**, alors que ce même résultat a été atteint au bout d'environ **8 heures** pour le **tissu sain (S)**. Ceci montre **que le tissu malade est plus sensible au solvant que le tissu sain**. A noter qu'un temps de fixation long (> 8 heures dans le cas du tissu sain) peut provoquer une dénaturation importante des protéines, et par conséquent engendrer des faux positifs.

Nous avons constaté qu'un temps de fixation situé entre **2 à 8 heures** nous permettrait de distinguer un tissu sain d'un tissu Alzheimer. Dans cet intervalle, **le tissu sain** gardera une **composante α majoritaire**, et **le tissu Alzheimer développera une composante β majoritaire**. A partir de ces observations, nous avons essayé de déterminer un temps optimal (t_0) permettant ainsi **les diagnostics spectroscopiques et histopathologiques** de la maladie d'Alzheimer par les solvants dénaturants. Après de nombreux analyses, **ce temps était fixé à 4 heures** (Figure IV.14C). A ce temps t_0 , le diagnostic spectroscopique établi sur des tissus sains et sur des tissus Alzheimer non colorés (C) est en accord avec le diagnostic histopathologique établi sur les mêmes tissus après colorations au RC et à la TS.

Remarque: Les résultats des tests histopathologiques et spectroscopiques effectuées parallèlement sur le tissu cérébral sain et sur le tissu cérébral malade à l'acide acétique sont semblables à ceux obtenus pour le carnoy. Cependant, le temps de fixation optimal est plus court (environ 1 heure) pour l'acide acétique glacial. Mais, pour certains tissus Alzheimer prélevés dans la région hippocampique (la corne d'Amont), ce temps est encore plus court (5 à 10 mn). Cette région est donc plus sensible aux solvants que les régions corticales. Ceci est probablement dû à la grande quantité de protéines amyloïdes ou bien à la fragilité des protéines du tissu, ce qui facilite leur dénaturation.

Dans les laboratoires d'histopathologie, il arrive parfois que les tissus restent plusieurs jours dans des solvants de fixation. Ceci rend difficile la détermination des conditions optimales de fiabilité de diagnostic. Les protéines du tissu en contact direct avec le solvant vont se dénaturer plus rapidement, ce qui explique en partie, l'hétérogénéité

observée pour les échantillons inclus en paraffine (carnoy) que nous avons étudiés. La coloration des tissus traités est nécessaire pour la visualisation des lésions histopathologiques de la MA; il est difficile de les détecter sous microscope sur des tissus frais. Par conséquent, il faut trouver un fixateur qui préserve la structure des protéines.

D) Tests de fiabilité des diagnostics histopathologiques et spectroscopiques

Pour vérifier la crédibilité du diagnostic spectroscopique par les solvants dénaturants, nous avons procédé à des tests aveugles sur des tissus sains et Alzheimer. Sur la Figure IV.15 sont rassemblés les spectres d'absorption IR de huit tissus provenant de patients Alzheimer et de personnes saines, non-identifiés. Les huit tissus étaient traités simultanément au carnoy et au bout de 4 heures, ils étaient rincés à l'eau puis séchés et analysés spectroscopiquement.

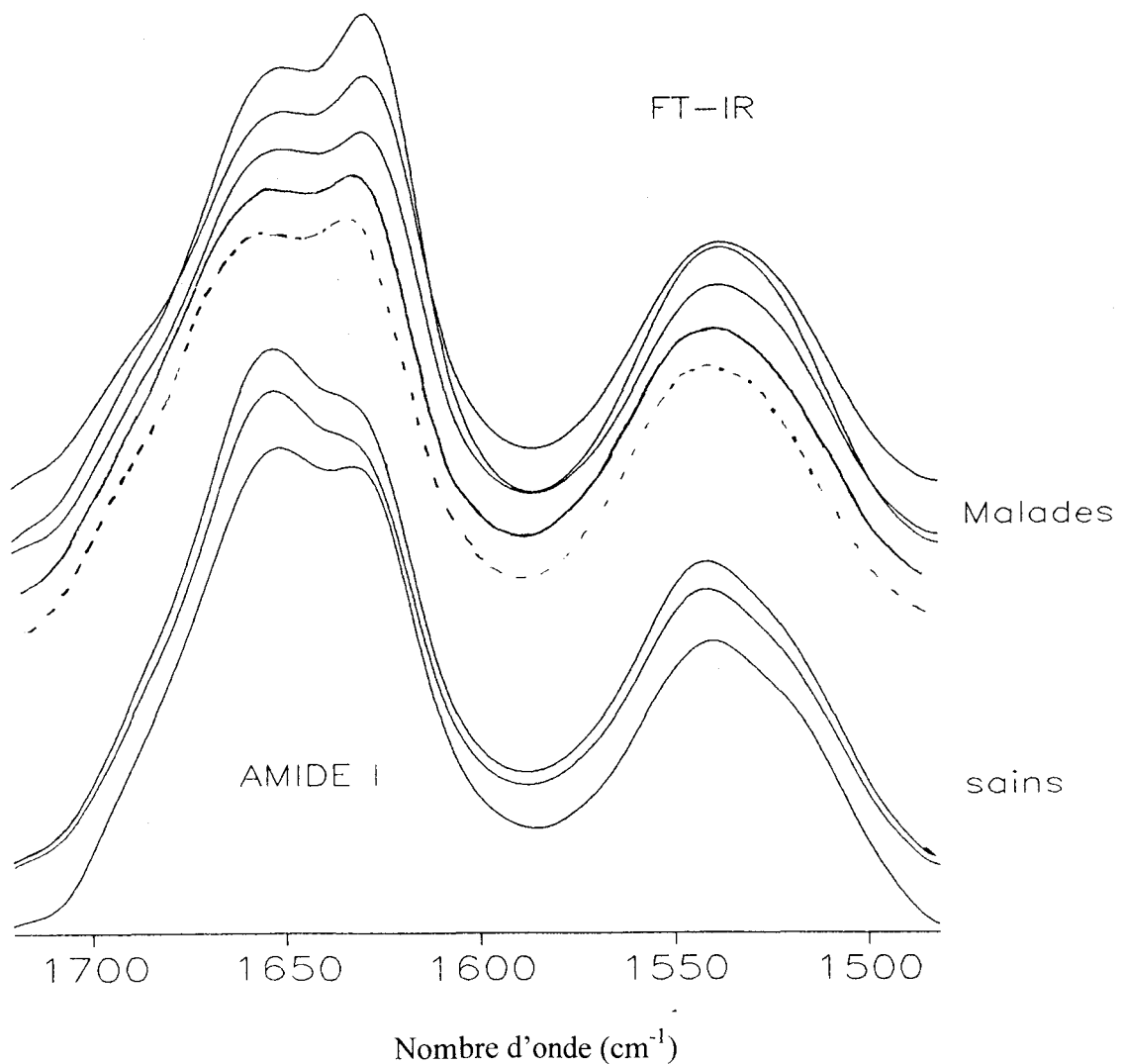


Figure IV.15: Spectres IR de certains tissus cérébraux de nature inconnue montrant les résultats des tests de fiabilité du diagnostic spectroscopique de la MA

L'analyse de l'ensemble des spectres FT-IR montre que trois tissus présentent les caractéristiques du tissu sain, à savoir la composante α majoritaire à 1652 cm^{-1} . Nous les avons, par conséquent, classés sains. En revanche, cinq spectres présentent des caractéristiques du tissu Alzheimer, à savoir la composante β à 1628 cm^{-1} majoritaire. Nous les avons donc classés Alzheimer.

En comparant nos diagnostics à ceux établis par les médecins, il s'avère que dans tous les cas, nos diagnostics «par solvants» étaient bons, sauf pour un. Dans ce cas (spectre en pointillé de la Figure IV.15) que nous avons classé Alzheimer, cette personne était citée comme saine. Après vérification du dossier médical de cette personne, il s'avère que ce patient (relativement jeune) était atteint de la maladie d'alcoolique. Or, nous avons pu montrer qu'un traitement prolongé à l'alcool peut mener à une dénaturation de certaines protéines tissulaires (Voir Figure IV.12). Ce dernier cas peut engendrer des faux témoins à la fois pour les tests histopathologiques et spectroscopiques.

Donc, d'après tous nos tests spectroscopiques, on peut dire que notre diagnostic spectroscopique par les solvants dénaturants est bien crédible car il permet de discriminer un tissu malade contenant des protéines de structure β d'un tissu sain qui n'en contient pas. Cependant ce diagnostic ne permet pas de discriminer un tissu Alzheimer d'un tissu malade contenant des protéines de structure β (comme le cas du patient atteint de la maladie d'alcoolisme).

3.2 DIAGNOSTICS AUX SOLVANTS NON DENATURANTS: FORMOL

Nous avons étudié le **formol**, parce qu'il est le fixateur le plus utilisé dans les laboratoires d'histopathologie surtout pour les techniques de coloration ordinaire.

A) Effet du formol sur le tissu cérébral en fonction de la concentration

Pour commencer, nous avons étudié l'effet du formol sur le tissu en fonction de la concentration (10%, 20%, 30%, et 40%). Tous les tissus étaient traités en même temps. Après 30 mn, l'excès du solvant était éliminé à l'eau et les échantillons étaient ensuite séchés puis analysés avant et après traitement. Sur la Figure IV.16a, sont représentés des spectres FT-IR issus de quatre prélèvements d'un même échantillon enregistrés avant et après fixation au formol à différentes concentrations.

L'analyse de l'ensemble de ces spectres montre que le spectre du tissu fixé au formol à 10 % est pratiquement identique à celui du tissu non fixé (0). Ceci indique que sa structure est apparemment préservée. Au delà de cette concentration, des changements apparaissent dans la région de la bande amide I et celle des acides nucléiques. Ceci se manifeste par l'apparition d'un épaulement dans la région de la bande amide I à 1628 cm^{-1} (caractéristique de la conformation β) et de nouvelles bandes dans la région des acides nucléiques. Les bandes de lipides semblent en revanche être préservées.

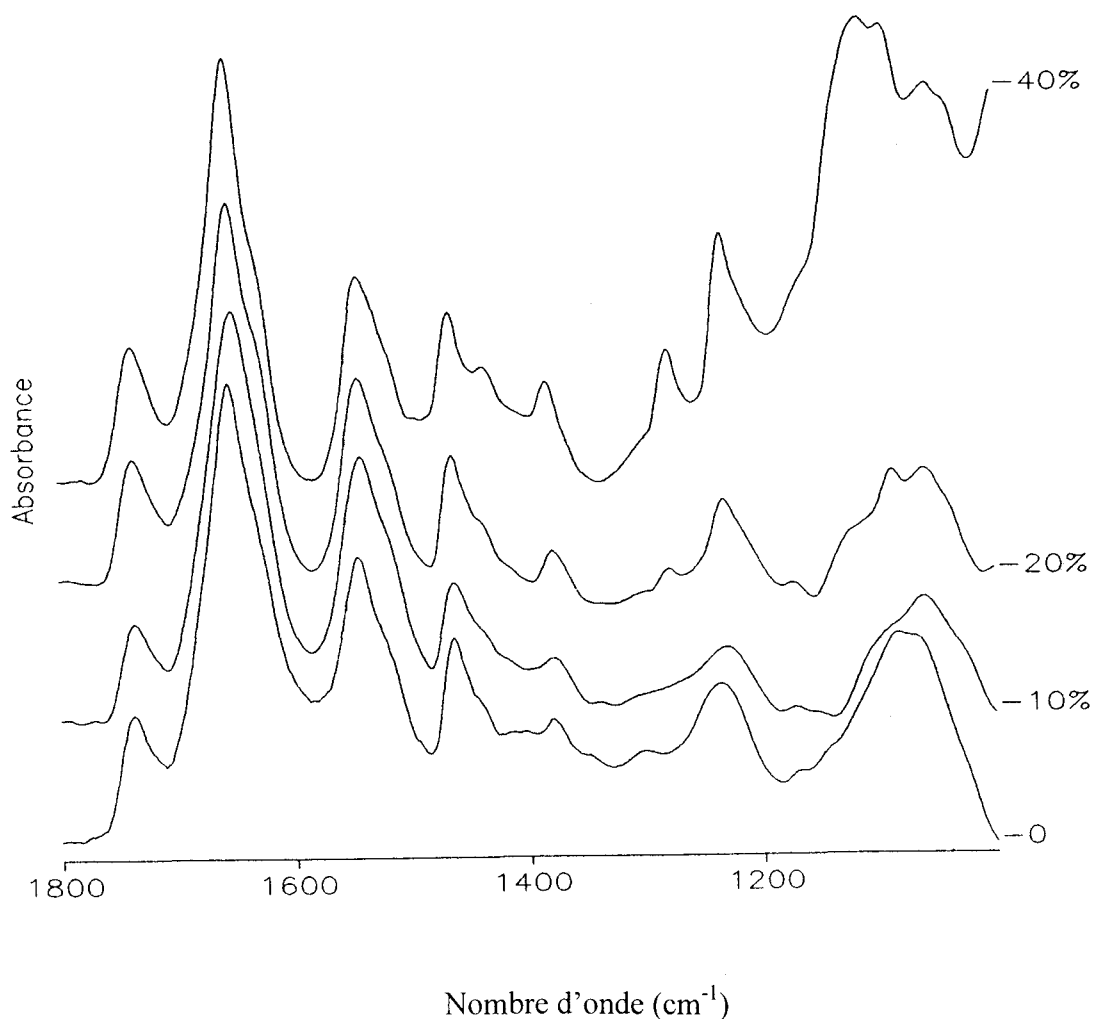


Figure IV.16a: Spectres FT-IR montrant effet du formol sur les composantes chimiques principales du tissu en fonction de la concentration.

Le formol a fortement tendance à se lier à des molécules d'eau et à former des composés d'addition (les ponts méthylènes) entre plusieurs types de radicaux, que l'on trouve sur les protéines (Voir annexe II.1). Ces ponts méthylènes constituent des liens

entre les chaînes protéiques. En revanche, il semble que le formol fixe bien les lipides, étant donnée que l'intensité des bandes associées aux lipides reste inchangée.

B) Effet du formol à 10 % sur le tissu cérébral en fonction de temps

Comme le formol à 10 % semble préserver la structure secondaire des protéines dans le tissu, nous avons étudié l'effet du temps de fixation sur le tissu y est traité. Sur la Figure IV.16b sont représentés les spectres FT-IR d'un même tissu avant (0) et après fixation au formol à 10% en fonction du temps (30 minutes, 2 et 12 heures). L'analyse de l'ensemble de ces spectres ne montre aucun changement significatif dans l'ensemble de la région analysée. On peut donc conclure que le formol à 10% semble préserver la structure du tissu.

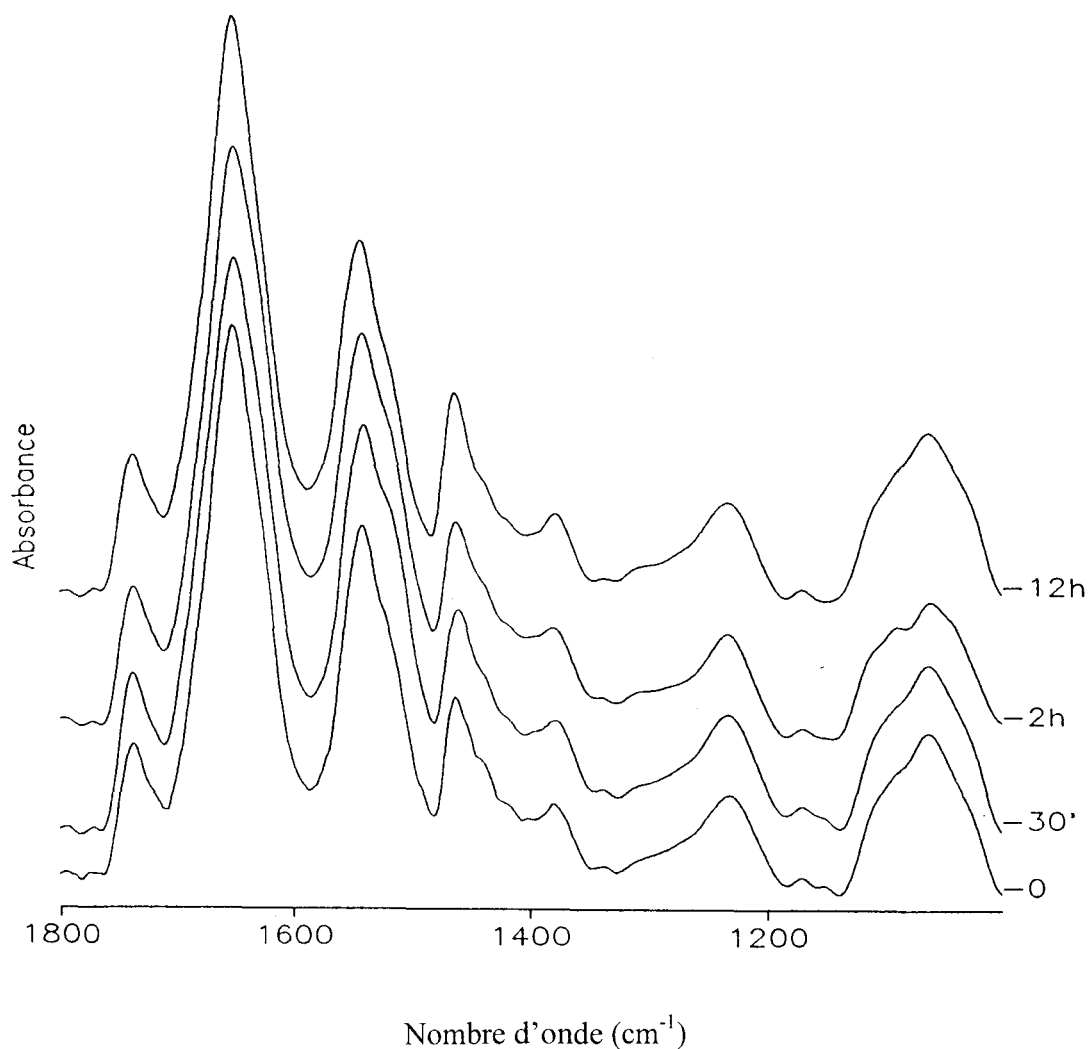


Figure IV.16b: Spectres FT-IR montrant l'effet du formol à 10% sur le tissu cérébral en fonction de temps de fixation (30 minutes à 12 heures).

Nous avons montré que le formol à 10% ne semble pas modifier la structure secondaire des protéines du tissu, quelque soit le temps de fixation utilisé. En revanche, à partir d'une concentration de 20%, la structure secondaire des protéines n'est plus préservée. Donc, le formol à 10% semble être un bon fixateur pour les tissus biologiques. En effet, ce fixateur est très utilisé dans les laboratoires d'histopathologie pour les colorations ordinaires. Mais, il l'est moins pour les colorations «dites spéciales» comme les colorations au RC et à la TS. Pour ces dernières, on utilise souvent des fixateurs acides (par exemple: le bouin (acide picrique) et le carnoy (acide acétique)), car ils offrent une très bonne coloration.

D'ailleurs, nos études spectroscopiques ont montré que les tissus fixés au formol à 10 % retiennent beaucoup moins le colorant que ceux fixés au carnoy, bien que les échantillons soient préparés dans les mêmes conditions. Ceci est certainement du en partie à l'abondance de protéines dénaturées de structure β dans les tissus fixés au carnoy. Ainsi, nous avons répondu à l'ensemble des questions ayant été soulevées dans le chapitre III.

Les étapes subséquentes nous ont conduit à proposer le formol à 10 % comme fixateur pour préserver la structure secondaire des protéines si l'on respecte certaines conditions d'échantillonnage, notamment les temps de fixation et de coloration. Cependant, pour éviter tous les problèmes des techniques longues et compliquées, nous avons mis au point des méthodes spectroscopiques plus fiables et appropriées pour la détection des protéines amyloïdes dans des tissus cérébraux **frais**, n'ayant subi aucun traitement par des solvants.

IV.4 DIAGNOSTICS SPECTROSCOPIQUES SUR DES TISSU FRAIS

4.1 INTRODUCTION

Dans un travail ultérieur Fabian et ses collaborateurs [16] avaient tenté de diagnostiquer la MA par spectrométrie IR en travaillant sur du tissu cérébral **frais**. Ils avaient ainsi observé un épaulement à 1615 cm^{-1} sur le côté des basses fréquences de la bande amide I. Ce nombre d'onde est caractéristique des protéines agrégées en une conformation en feuillets β -plissés. Comme les protéines du tissu sain sont de structure α , ils ont alors relié cet épaulement au peptide amyloïde A β .

Pour étudier la fiabilité de ce diagnostic, les auteurs avaient travaillé sur un grand nombre d'échantillons prélevés dans différentes régions de cerveau de différents patients Alzheimer et de différentes personnes saines. Ils avaient constaté que cet épaulement n'était pas systématiquement observé dans tous les échantillons Alzheimer étudiés. Des études plus poussées qui étaient entreprises sur des échantillons de SB et de SG avaient montré que cet épaulement est peu présent dans les échantillons de SB. En revanche, il est très présent dans la SG et son intensité décroît progressivement au fur et à mesure que l'on passe du cortex frontal au cortex occipital (Voir Figure 1). Les auteurs avaient relié cette variation à la concentration des protéines amyloïdes dans le cerveau. Il avaient conclu que la spectrométrie d'absorption IR peut être un nouvel outil de diagnostic spectroscopique de la MA; éventuellement si les tissus étudiés sont riches en amyloïde.

Nous avons donc entrepris des études similaires dans notre laboratoire en travaillant sur du **tissu frais** dans le but de trouver **d'autres méthodes spectroscopiques plus fiables** qui permettront de mettre en évidence la présence d'amyloïde dans les tissus Alzheimer.

4.2 CARACTERISATION DU TISSU ALZHEIMER FRAIS

A) Microspectrométrie d'absorption IR

Sur la Figure IV.17 sont représentés deux spectres micro-infrarouge montrant une région saine (S_f) et une région malade (M_f) d'un tissu cérébral prélevé de la région hippocampique (corne d'Amont) d'un malade Alzheimer. Seule les régions des bandes amide I et II sont représentés.

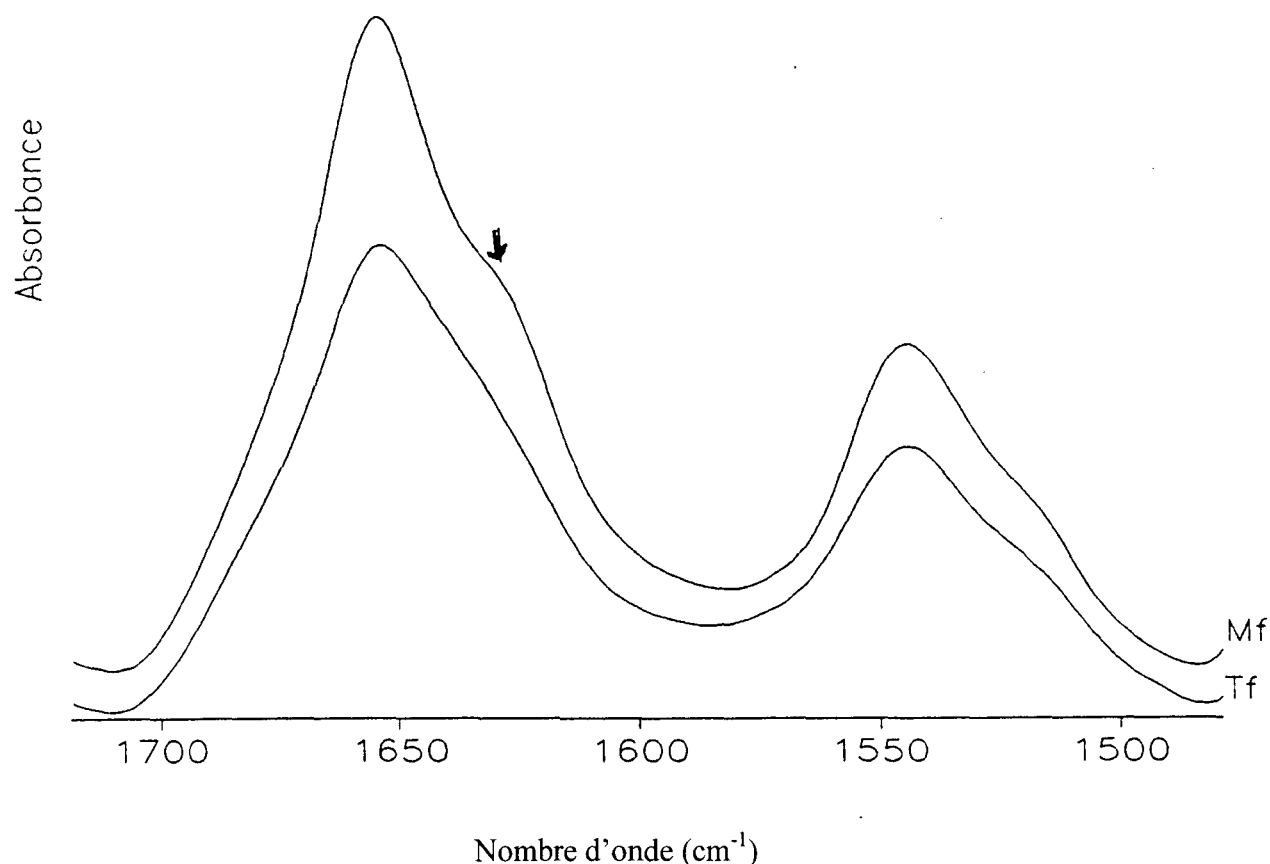


Figure IV.17: Spectres microinfrarouge d'un même tissu cérébral **frais** prélevé de la région hippocampique d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer. Ces spectres montrent une région saine (S_f) et une région malade (M_f).

La comparaison de ces spectres montre que la majorité des protéines dans les deux régions saine et malade sont de structure en hélice α . Ceci est normal, si l'on considère que le tissu Alzheimer puisse contenir beaucoup de régions saines. Cependant, la bande amide I dont le maximum d'absorption est initialement à 1653 cm^{-1} dans la région saine, montre un épaulement à 1628 cm^{-1} dans le spectre de la région malade qui est caractéristique des protéines en feuillets β -plissés. Comme le tissu est non traité, nous avons attribué cet

épaulement aux protéines amyloïdes. Mais, cet épaulement n'a pas été systématiquement observé dans tous les spectres d'absorption IR enregistrés dans différentes régions du même tissu ou de tous les tissus malades. En revanche, il a toujours été absent dans les spectres du tissu cérébral de sujets sains.

Nous avons également caractérisé séparément des prélèvements de substance grise et de substance blanche. Contrairement aux résultats de la littérature [16], l'épaulement caractéristique des protéines amyloïdes a été observé de la même façon dans les deux substances. Ceci peut être expliquer soit par le fait que les tissus étudiés étaient assez riches en amyloïde, soit par la contamination des échantillons de substance blanche par de la substance grise. Dans tous les cas, il nous a été difficile de vérifier cette hypothèse parce que le nombre des échantillons que nous avons étudié était trop restreint pour faire des études statistiques. L'ensemble de ces observations nous ont permis de conclure que la spectrométrie d'absorption infrarouge n'est pas une technique adaptée à la détection des dépôts d'amyloïde dans les tissus Alzheimer, car, elle nécessite une quantité non négligeable des protéines amyloïdes. Cependant, elle peut être utilisée comme une méthode complémentaire pour le diagnostic spectroscopique de la MA.

B) Spectrométrie de diffusion Raman

a) Spectres FT-Raman

Région hippocampique (la corne d'amont)

Nous avons représenté sur la Figure IV.18a un spectre FT-Raman du même tissu Alzheimer étudié par microspectrométrie infrarouge (Voir Figure IV.17). Dans la gamme spectrale entre $1800\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$, la bande amide I présente une composante β dominante à 1667 cm^{-1} α . Ainsi, le tissu Alzheimer étudié peut être considéré comme suffisamment malade.

Dans la région spectrale entre $1500\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$, on observe une bande intense à 1438 cm^{-1} (δCH_2) et une autre composante à 1451 cm^{-1} , (δCH_3). Les bandes à 1344 et 1300 cm^{-1} sont attribuées aux modes de déformation δCH_2 . Enfin, les bandes à 1130 , 1087 , et 1068 cm^{-1} sont attribuées au mode de l'élongation $\nu\text{C-C}$ du squelette des lipides et des acides nucléiques.

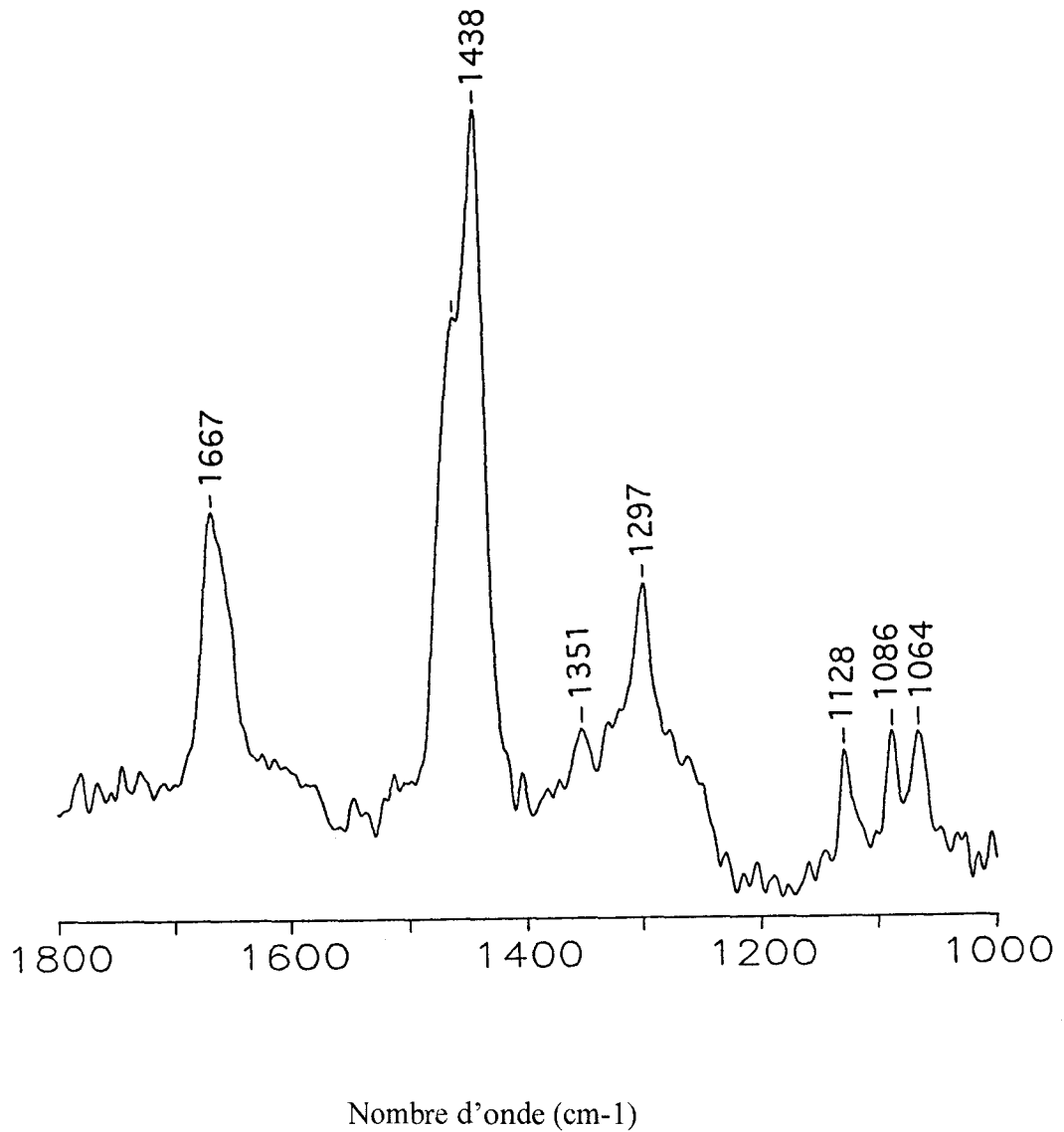


Figure IV.18a: Spectre FT-Raman d'un tissu cérébral frais prélevé de la région hippocampique (corne d'Amont) d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer montrant une région malade.

Région corticale

Sur la Figure IV.18b sont rassemblés trois spectres FT-Raman montrant trois régions: une saine (A), une moyennement malade (B) et une très malade (C) d'un même prélèvement du cortex temporal d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer,

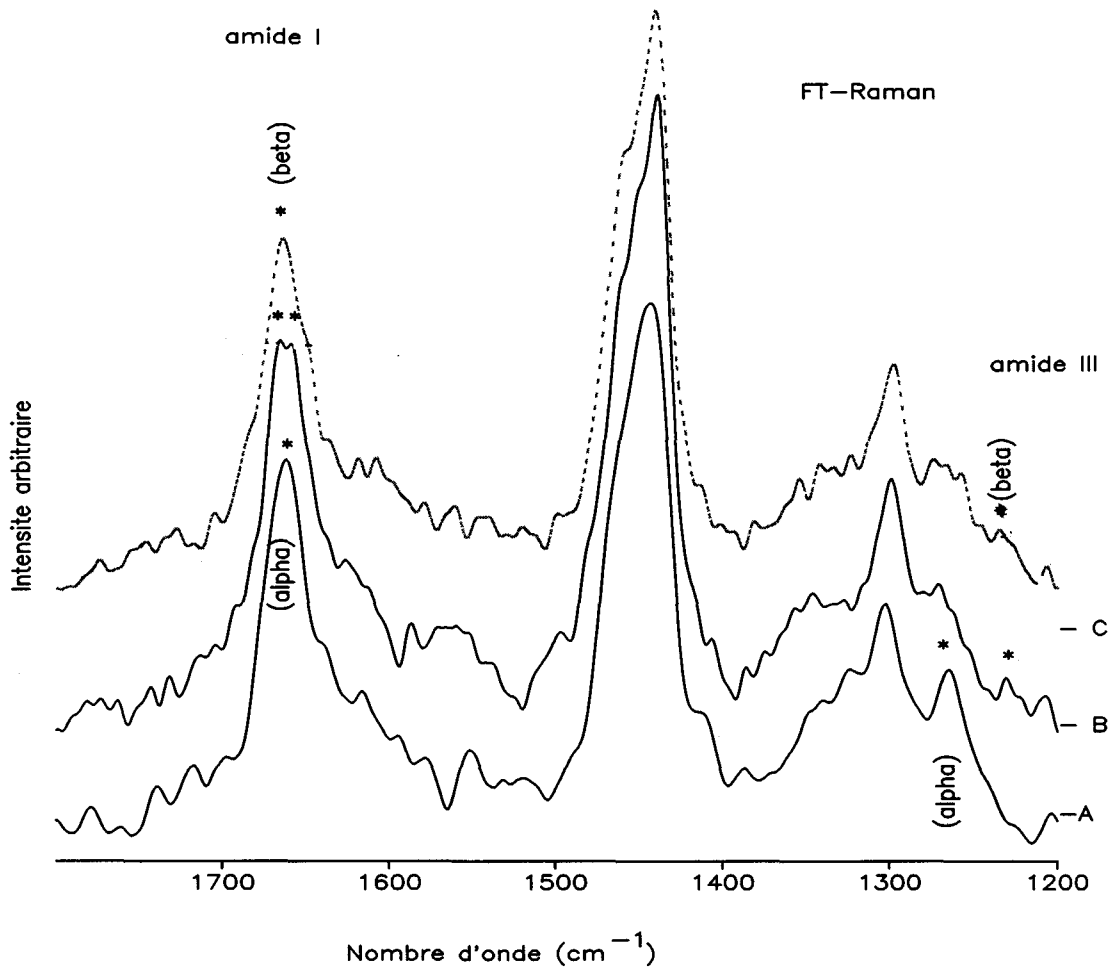


Figure IV.18b: Spectres FT-Raman d'un tissu cérébral frais prélevé du cortex temporal d'un patient Alzheimer montrant trois régions, une saine (A), une moyennement malade (B) et une très malade (C).

Dans la région de la bande amide I ($1690\text{--}1610\text{ cm}^{-1}$), le spectre A montre une composante α dominante à 1659 cm^{-1} indiquant ainsi une région relativement saine. À l'inverse, le spectre C présente une composante β dominante à 1667 cm^{-1} montrant une région très malade. Dans le spectre B, les composantes α et β sont relativement de même intensité, cette dernière région du tissu est alors considérée comme moyennement malade.

L'analyse de la région de la bande amide III ($1230\text{--}1285\text{ cm}^{-1}$) montre que les protéines dans le spectre A sont de structure en hélice α . Le nombre d'onde caractéristique de cette conformation apparaît à 1267 cm^{-1} . En revanche, dans les spectres B et C, la

bande amide III à 1245 cm^{-1} confirme la présence des protéines de structure en feuillets β -plissés. Cependant, il est difficile de repérer la composante caractéristique des protéines en hélice α dans le spectre **B**. Ces résultats appuient ceux de l'analyse de la bande amide I.

Ainsi, les études du tissu cérébral frais par **spectrométrie FT-Raman** nous ont permis une analyse globale et une caractérisation des échantillons étudiés provenant de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Elles nous ont également permis de discriminer des régions saines qui ne renferment pas de protéines amyloïdes des régions malades qui en contiennent. De plus, l'analyse de l'intensité de la composante β associée à la bande amide I dans les spectres FT-Raman nous a permis de renseigner sur la quantité relative des protéines amyloïdes présentes dans les régions étudiées, donc sur «le degré de la maladie». Ainsi, on peut conclure que **la spectrométrie FT-Raman** peut être utilisée comme une **nouvelle méthode de détection des dépôts d'amyloïde** dans les **tissus frais**, et par conséquent, comme un **nouvel outil** de diagnostic **spectroscopique** de la MA.

Remarque: Les spectres FT-Raman ont montré que le tissu est hétérogène, quelque soit la région cérébrale analysée. Cependant, nous avons constaté que la région hippocampique contient plus de protéines amyloïdes que les régions corticales. Ces résultats sont (en partie) contradictoires avec ceux de la littérature qui ont affirmé que les dépôts d'amyloïde sont plutôt concentrés dans les régions corticales alors que les dégénérescence neuro-fibrillaires (seconde lésion caractéristique de la MA) sont plutôt concentrées dans les régions hippocampiques. Or, dans notre cas, ceci est relatif, puisqu'à un stade avancé de la maladie, les dépôts d'amyloïde deviennent trop abondants et envahissent toutes les régions liées au bon fonctionnement du cerveau, dont l'hippocampe.

Pour connaître la répartition des dépôts d'amyloïde dans les échantillons provenant de patients atteints de la MA, nous avons eu recours à la microspectrométrie Raman.

b) Spectres Micro-Raman

Nous avons travaillé avec deux lasers: le laser argon émettant dans le domaine du visible (raie verte à $514,5\text{ nm}$) et le laser YAG émettant dans le domaine du proche

infrarouge (raies à: 815 nm et 1064 nm). La raie excitatrice verte qui est très énergétique a été utilisée dans le but d'exalter certains chromophores dans le tissu. Cependant, elle présente quelques inconvénients dont la fluorescence et la dégradation de certains échantillons. En revanche, les raies excitatrices IR qui sont moins énergétiques ont été utilisées pour minimiser ces problèmes. Ici, nous avons représenté seulement des exemples de spectres micro-Raman de résonance, car les spectres micro-Raman enregistrés avec des excitatrices émettant dans l'infrarouge sont quasiment identiques aux spectres FT-Raman.

Au début, le micro-Raman a été utilisé dans le but de détecter les dépôts d'amyloïde directement dans les lésions cérébrales de la MA, à savoir, les plaques séniles (PS) et les angiopathies amyloïde (AA). Cependant, l'utilisation du tissu **frais** non coloré a rendu cet objectif difficile à atteindre. En effet, le tissu cérébral frais, contrairement aux autres tissus biologiques, n'a pas de structure qui nous permet de visualiser le contour des vaisseaux cérébraux lorsqu'il est non fixé. De plus sa forte teneur en eau et sa richesse en lipides contribuent à son déshydratation et son instabilité sous le faisceau laser.

Malgré tous ces problèmes, le micro-Raman s'est révélé une technique très précieuse pour la détection des dépôts d'amyloïde. En effet, quelques micro-grammes du tissu malade étalés sur une lame et / ou non protégés par une lamelle, suffisent pour nous renseigner à la fois sur la répartition et sur l'abondance des protéines amyloïdes dans les régions cérébrales étudiées, donc sur le «degré de la maladie».

Sur les Figures (IV.19a, IV.19b et IV.19c), nous avons représentés trois spectres micro-Raman de résonance enregistrés dans trois points différents du même prélèvement provenant de la région hippocampique (corne d'Amont) d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer: une région considérée comme étant **saine** (Figure IV.19a), une **région très malade** (Figure IV.19b), et une région **moyennement malade** (Figure IV.19c).

i) *Région saine*

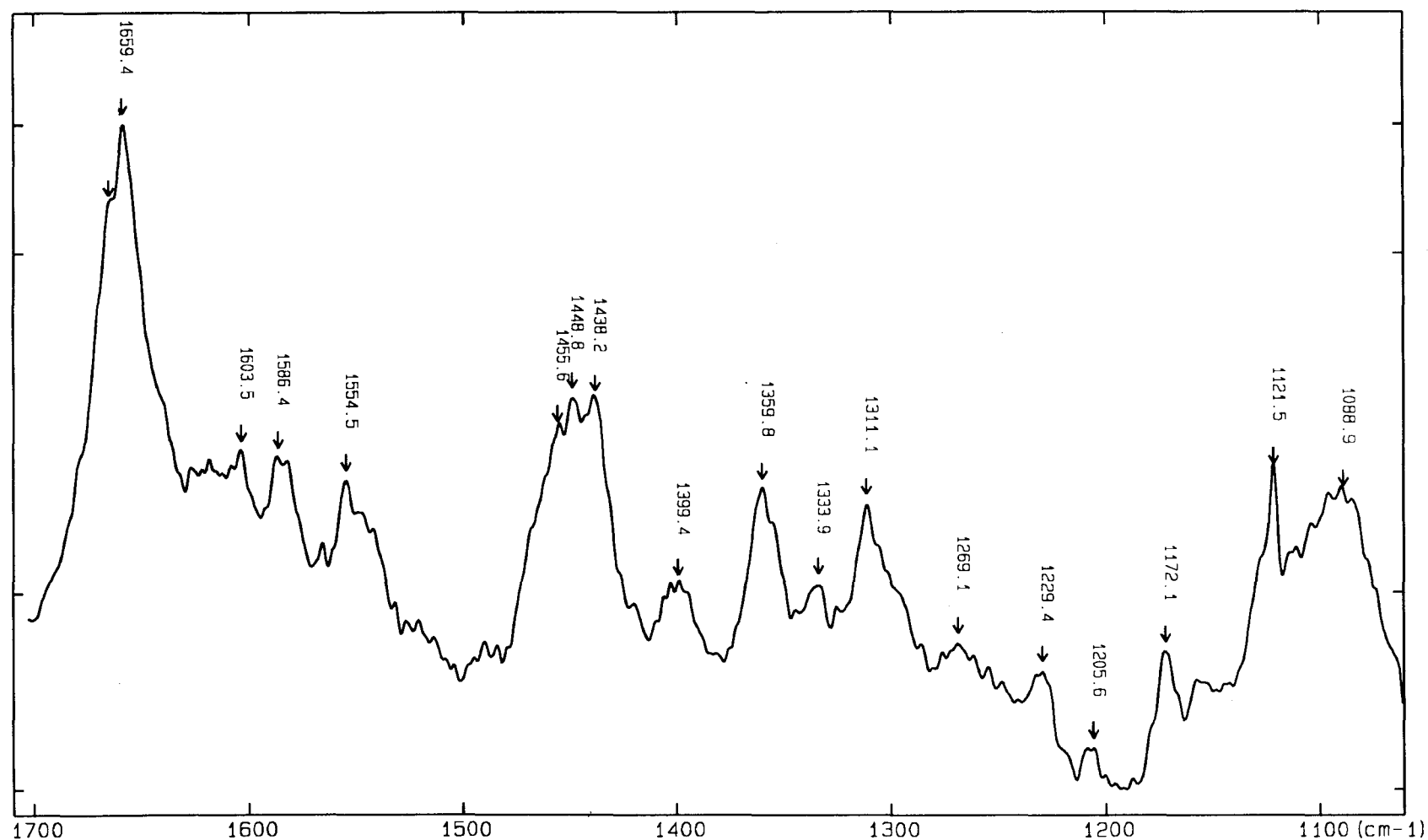


Figure IV.19a : Spectre micro-Raman de résonance d'une **région cérébrale relativement saine** d'un échantillon cérébral frais prélevé dans la région **hippocampique** d'un patient atteint de la **maladie d'Alzheimer**. La bande amide I (1680-1610 cm⁻¹) indique que les **dépôts d'amyloïde** sont **pratiquement inexistants**. Dans cette région la **composante dominante** associée à la bande amide I, caractéristique des **protéines de structure en hélice α** apparaît à 1659 cm⁻¹.

Dans la gamme spectrale entre **1600-1500 cm^{-1}** , les bandes de faibles intensités apparaissant vers 1604 et 1586 cm^{-1} sont caractéristiques des résidus des acides aminés aromatiques (tyrosine, phénylalanine et tryptophane). Ces bandes, exaltées par effet de résonance étaient pratiquement «inexistantes» dans les spectres FT-Raman (Voir Figures (IV.18a et 18b). La bande de faible intensité à 1554 cm^{-1} peut être reliée soit au mode amide II soit à un artefacts du à l'absorption du verre. La région spectrale entre **1500-1450 cm^{-1}** est caractéristique des modes de déformation des groupements CH_2 (des lipides) et CH_3 (des protéines). Dans cette région, on observe une bande avec trois composantes apparaissant respectivement à 1455 cm^{-1} (δCH_3), à 1449 cm^{-1} (δCH_3) et 1438 cm^{-1} (δCH_2).

La région spectrale entre **1400-1200 cm^{-1}** est un mélange de modes de vibrations de déformation des groupements $[\text{C}(\text{CH}_3)_2$ et $\delta\text{CH}_2]$ et amide III. Cette dernière apparaît dans le spectre correspondant à la région saine à 1269 cm^{-1} . Ce nombre d'onde est caractéristique des protéines en hélice α . Enfin, la région entre **1200-1000 cm^{-1}** est attribuée aux modes des élongations des groupements CC du squelette des lipides, des protéines et des acides nucléiques.

ii) *Région très malade*

Le spectre micro-Raman caractéristique d'une région très malade est représenté sur la Figure IV.19b. A l'inverse du spectre enregistré dans la région saine, la **bande amide I** montre une **composante dominante** à **$\sim 1668 \text{ cm}^{-1}$** , caractéristique des protéines de structure en feuillets β -plissés. Cette bande présente un épaulement à **1657 cm^{-1}** , caractéristique des protéines de conformation en hélice α . On peut ainsi conclure que la région du tissu analysée est **très riche en protéines amyloïdes**. Nous l'avons par conséquent classé très malade. La présence de l'amyloïde a été confirmée dans le spectre FT-IR enregistré pour le même prélèvement, par la présence d'un épaulement bien accentué situé vers 1628 cm^{-1} , et par le spectre FT-Raman qui était pratiquement identique au spectre micro-Raman (**b**).

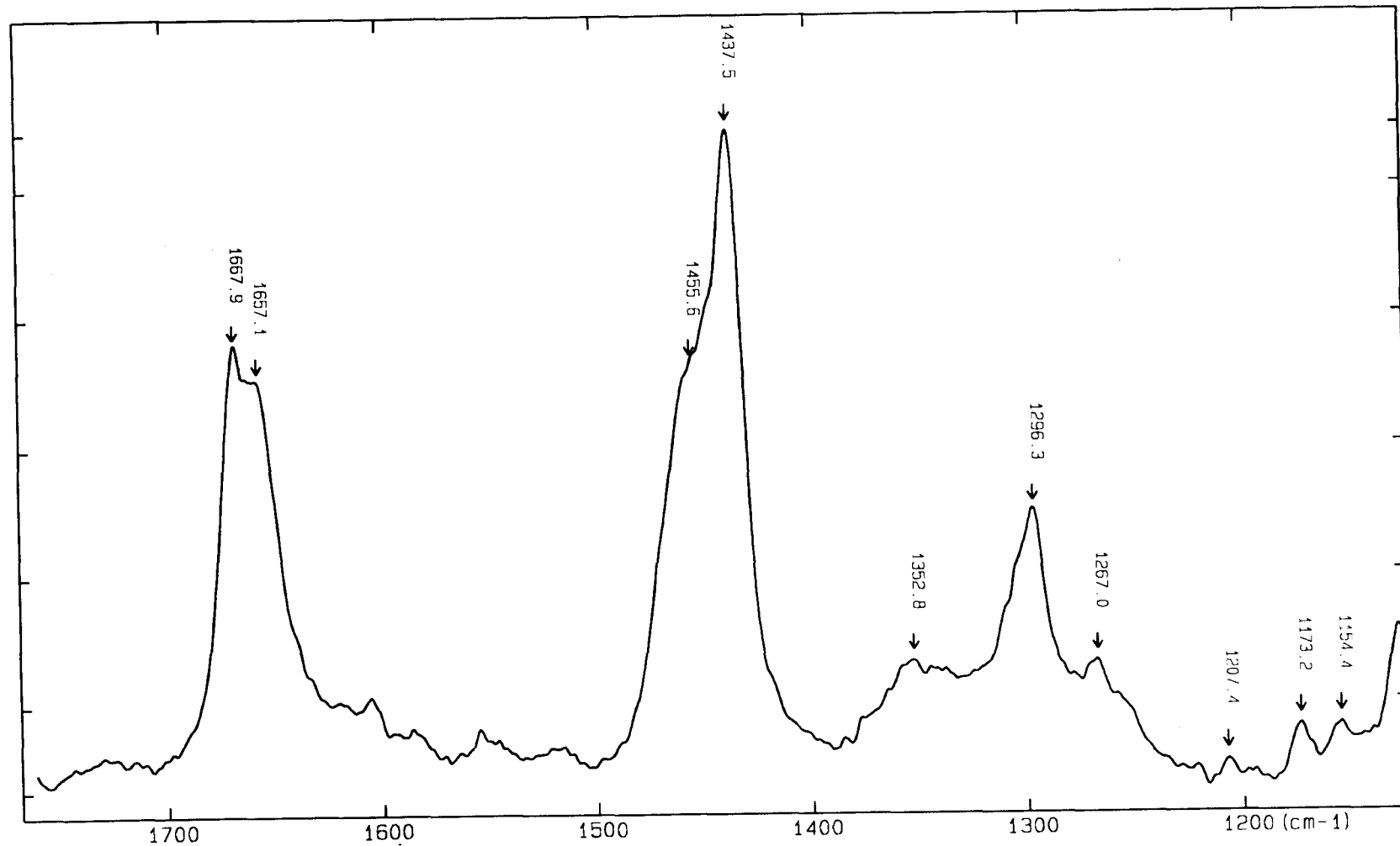


Figure IV.19b : Spectre micro-Raman de résonance d'une **région très malade** d'un échantillon cérébral frais prélevé dans la région **hippocampique** (corne d'Amont) d'un patient atteint de la **maladie d'Alzheimer**. La bande amide I ($1680\text{-}1610\text{ cm}^{-1}$) indique que les **dépôts d'amyloïde** sont très **abondants**. Dans cette région la composante **dominante** associée à la bande amide I, caractéristique des **protéines de structure en feuillets β -plissés**, apparaît à $\sim 1668\text{ cm}^{-1}$.

Dans la région spectrale entre **1600-1500 cm^{-1}** , ce spectre est similaire au spectre FT-Raman car il ne présente pratiquement pas de bandes d'absorption. En revanche, la région entre **1500-1400 cm^{-1}** présente deux composantes situées respectivement vers 1455 cm^{-1} et 1437 cm^{-1} , attribuées respectivement aux modes de vibrations de déformation des groupements CH_3 et CH_2 des lipides et des protéines. La région spectrale entre **1400-1000 cm^{-1}** est caractérisée par la présence d'une bande à 1296 cm^{-1} qui est attribuée aux modes de vibration de δCH_2 conjugués avec ceux de la bande amide III, dont l'épaule apparaît à 1267 cm^{-1} (qui montre que cette région contient aussi des protéines en hélice α). Enfin, des bandes de très faible intensité situées respectivement à 1173 cm^{-1} et à 1154 cm^{-1} sont attribuées aux modes d'élongation des groupements C-C du squelette des composantes tissulaires.

iii) *Région moyennement malade*

Enfin, le spectre micro-Raman représentatif d'une région moyennement malade du même tissu cérébral est représenté sur la Figure IV.19c.

Dans région entre **1700-1600 cm^{-1}** , la **bande amide I** montre **deux composantes de même intensité**, l'une située vers **1667 cm^{-1}** , caractéristique des **protéines** de structure en feuillets β -plissés, et l'autre vers **1657 cm^{-1}** , caractéristique des **protéines** de conformation en **hélice α** . On peut **donc conclure** que cette région contient **autant de protéines amyloïdes que de protéines de structure en hélice α** , ce qui permet d'établir un diagnostic spectroscopique. par conséquent, nous l'avons classé **moyennement malade**. La présence des protéines amyloïdes a été confirmé dans le spectre FT-IR enregistré dans la même région, par la présence d'un faible épaulement vers 1628 cm^{-1} , ainsi que dans le spectre FT-Raman qui est pratiquement identique au spectre micro-Raman (c). Les bandes observées dans la région spectrale entre **1400-1100 cm^{-1}** sont identiques à celles observées dans la même région dans le spectre micro-Raman (b).

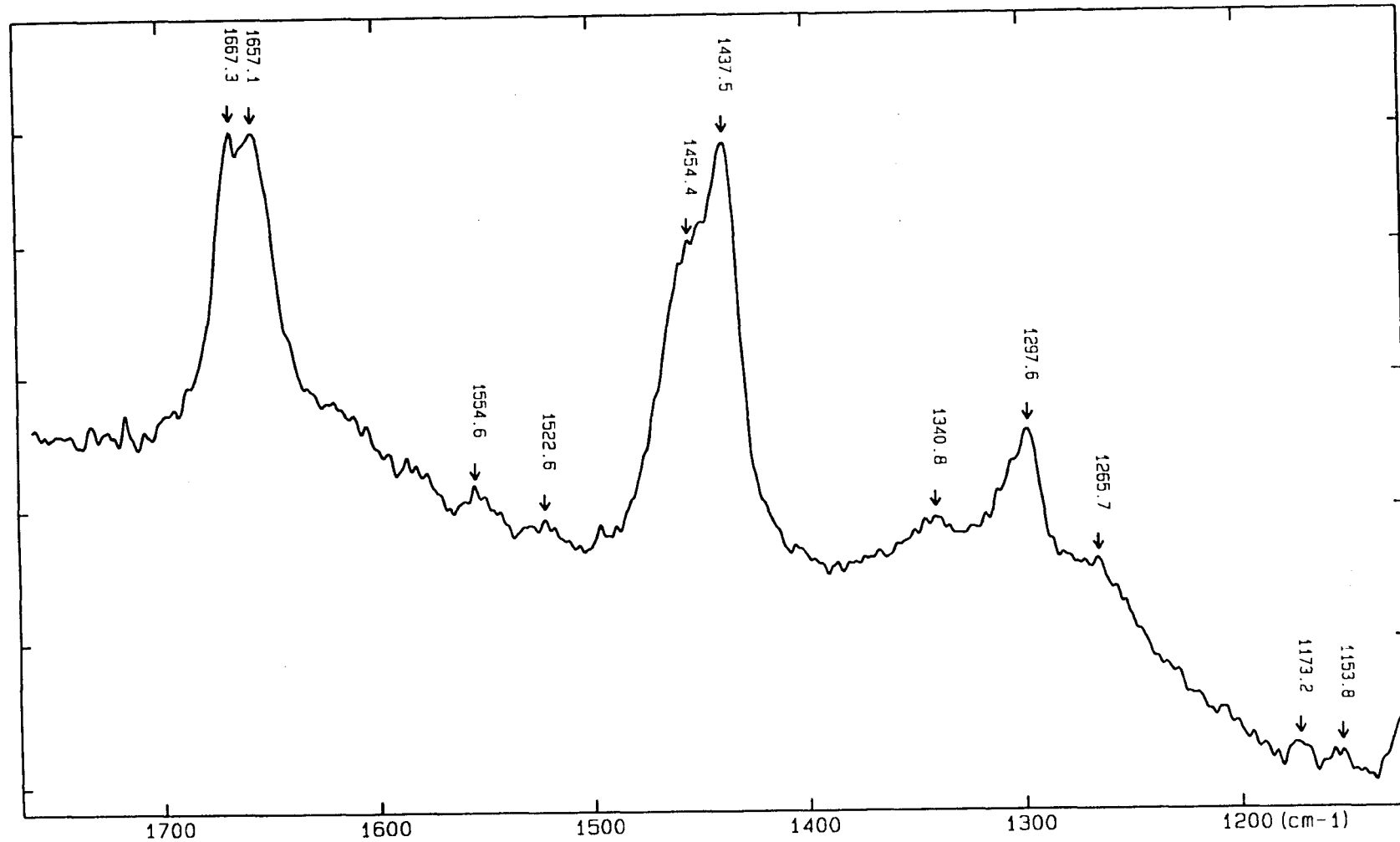


Figure IV.19c : Spectre micro-Raman de résonance une **région moyennement malade** d'un échantillon cérébral frais prélevé dans la région **hippocampique** (corne d'Amont) d'un patient atteint de la **maladie d'Alzheimer**. La **bande amide I** (1680-1610 cm⁻¹) indique que les **dépôts d'amyloïde** assez **abondants**. Dans cette région la **bande amide I** présente deux composantes relativement de mêmes intensités, caractéristique à des **protéines en feuillets β -plissés** (à ~ 1668 cm⁻¹) et des **protéines en hélice α** (à ~ 1657 cm⁻¹).

Ainsi, les spectres micro-Raman nous ont permis de mettre en évidence la présence des dépôts amyloïde dans les tissus cérébraux atteints de la maladie d'Alzheimer. Nous rappelons que cette technique ne nécessite que peu de tissu. De plus, la méthode d'échantillonnage permettant la détection des lésions cérébrales ne nécessite ni coloration ni d'appareillage histologiques. Ainsi, **on peut conclure que la microspectrométrie Raman peut être un excellent moyen de détection des dépôts d'amyloïde** dans les tissus Alzheimer, donc, une seconde méthode efficace pour le **diagnostic spectroscopique** de la maladie d'Alzheimer.

C) Caractérisation du tissu Alzheimer dans différentes régions cérébrales

Nous avons caractérisé différents échantillons frais prélevés dans différentes régions cérébrales de plusieurs patients atteints de la maladie d'Alzheimer, en l'occurrence le cortex (frontal, temporal et occipital), l'hippocampe et la corne d'Amont (les spectres n'ont pas tous été présentés ici). L'ensemble des études spectroscopiques a montré que tous les échantillons ayant été analysés étaient plus ou moins riches en protéines amyloïdes. Cependant, les prélèvements les plus riches en amyloïde que nous avons étudiés provenaient de la région hippocampique (corne d'Amont). Ces résultats étaient confirmés par les tests histopathologiques. A titre d'exemple, sur 32 spectres micro-Raman enregistrés dans des endroits pris au hasard du même prélèvement, seul deux spectres représentaient des régions saines. Toutes les autres régions étaient soit moyennement malades, soit très malades. Cette étude était confirmée par les spectres FT-Raman, car sur 10 spectres enregistrés, huit présentaient une double composante dans la région de la bande amide I, alors que les deux autres spectres étaient caractéristiques de régions saines.

Pour les **spectres infrarouge**, nous n'avons jamais détecté une véritable **bande** pour la composante β associée à la bande amide I. Quand les tissus analysés sont riches en protéines amyloïdes, on observe **un épaulement** à 1628 cm^{-1} caractéristique des protéines de conformation en feuillets β -plissés. En revanche, quand les tissus sont moins riches en amyloïde, cet même épaulement n'est pas observé, bien que les spectres de diffusion Raman prouvent le contraire.

D) Discussion et conclusion

Nous rappelons que notre **diagnostic spectroscopique** est basé sur la détection des **protéines amyloïdes** de structure en **feuillets β -plissés** dans du **tissu cérébral frais** provenant de **patients atteints de la maladie d'Alzheimer**. Trois critères très importants étaient alors à mettre en compte, notamment:

- * utiliser des techniques spectroscopiques fiables permettant ainsi la caractérisation de la structure secondaire des protéines dans les tissus biologiques;
- * s'assurer que le tissu cérébral sain est dépourvu de protéines de structure en feuillets β -plissés, susceptibles de nuire au diagnostic spectroscopique;
- * enfin, trouver une méthode spectroscopique permettant de détecter même des quantités minimales de protéines amyloïdes dans les tissus qui en contiennent.

Toutes les techniques spectroscopiques que nous avons utilisées ont montré que les **protéines** présentes dans le **tissu cérébral sain** prélevé des régions corticales et hippocampiques (ces régions ont été choisies pour leur abondance en protéines amyloïdes) sont de structure **non β** . En revanche, elles ont permis de mettre en évidence des protéines **de structure β** dans les tissus Alzheimer. L'ensemble des résultats obtenus nous a permis de tirer quelques conclusions. En effet, comme le tissu **est frais**, nous avons conclu qu'il s'agit bien des protéines amyloïdes. Ainsi, la spectroscopie de vibration permet de discriminer un tissu sain d'un tissu Alzheimer. Par conséquent, elle permet d'établir le diagnostic spectroscopique. Cependant, chacune de ces techniques présente des avantages et des inconvénients.

La technique la plus fiable qui peut être utilisée comme un nouvel outil de diagnostic est la **spectrométrie de diffusion Raman** (FT-Raman, micro-Raman et imagerie Raman). Cette technique permet de détecter même une quantité très minime de protéines amyloïdes **de structure en feuillets β -plissés**, présentes dans les échantillons Alzheimer. De plus, elle ne nécessite pas de préparation particulière, ni d'accessoires pour détecter les dépôts d'amyloïde. La spectrométrie **FT-Raman** à excitation dans le proche infrarouge permet de renseigner sur la nature de l'échantillon étudié. Elle permet ainsi de discriminer un tissu sain qui ne contient pas de protéines amyloïdes, d'un autre tissu malade qui en contient. Quant à la **microspectrométrie Raman**, elle permet une analyse plus précise des échantillons en montrant la répartition de l'amyloïde dans les tissus malades.

En revanche, la **spectrométrie FT-IR** s'est révélé être une technique inadaptée pour être utilisée comme un outil de diagnostic de la maladie d'Alzheimer; car, elle nécessite une quantité trop importante de protéines amyloïdes. Cependant, elle peut être utilisée comme un moyen supplémentaire pour évaluer le degré de la maladie.

Le **diagnostic spectroscopique** de la maladie d'Alzheimer est basé sur l'**analyse de la bande amide I** par **spectrométrie de vibration** (FT-macroinfrarouge, FT-microinfrarouge, FT-Raman, Micro-Raman et imagerie Raman).

Critères du diagnostic par analyse de la bande amide I (1690-1610 cm^{-1})

* **Tissu sain:** composante α **unique**

* **IR** [1651-1656 cm^{-1}] et en **Raman** [1658-1664 cm^{-1}]

* **Tissu Alzheimer:** double composante (α et β)

* **IR** (composante α à $\sim 1652 \text{ cm}^{-1}$) et (épaulement β à $\sim 1628 \text{ cm}^{-1}$ (pas toujours observé))

* **Raman** (composante α [1654-1660 cm^{-1}]) et (composante β [1666-1669 cm^{-1}])

- Si pas de composante $\beta \Rightarrow$ **région saine** (composante α unique à $\sim 1660 \text{ cm}^{-1}$)

- Si $I_\alpha > I_\beta \Rightarrow$ région **relativement saine** (composante majoritaire α à $\sim 1660 \text{ cm}^{-1}$)

- Si $I_\alpha = I_\beta \Rightarrow$ région **moyennement malade** (α à $\sim 1654 \text{ cm}^{-1}$ et β à $\sim 1667 \text{ cm}^{-1}$)

- Si $I_\beta > I_\alpha \Rightarrow$ région **très malade** (composante majoritaire β à $\sim 1668 \text{ cm}^{-1}$)

4.3 TESTS DE FIABILITES DE DIAGNOSTIC PAR SPECTROSCOPIE

Pour mieux tester la fiabilité de nos diagnostics spectroscopiques, nous avons demandé à l'INSERM et au laboratoire de Neuropathologie (CHRU de Lille) de nous donner quelques prélèvements à diagnostiquer. Ces tissus ont été caractérisés par différentes techniques spectroscopiques (FT-IR, FT-Raman, micro-Raman, et Imagerie et Cartographie Raman). Tous nos diagnostics spectroscopiques étaient bons. Ici, nous exposons quelques exemples de spectres de nos tests aveugles. Pour chaque technique spectroscopique utilisée, nous avons sélectionné les spectres de vibration montrant les résultats les plus fréquents pour deux échantillons A et B que nous avons caractérisé.

A) Spectrométrie d'absorption IR

Sur la Figure IV.20a sont représentés deux spectres FT-IR de deux échantillons cérébraux A et B.

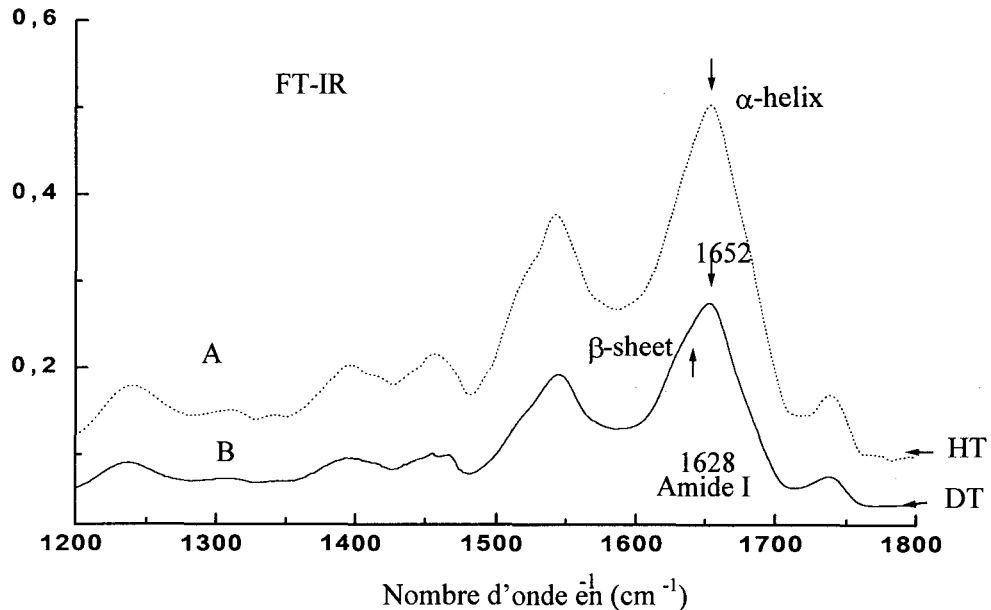


Figure IV.20a: Spectres d'absorption FT-IR enregistrés pour deux échantillons cérébraux (A et B).

Si l'on observe le profil de toutes les bandes présentes dans ces deux spectres d'absorption, et en particulier celui de la bande amide I, a priori, il serait quasiment impossible de discriminer entre le tissu (A) et le tissu (B). Le maximum d'absorption de la bande amide I dans les deux spectres apparaît à 1653 cm^{-1} , ce qui signifie que la majorité des protéines présentes dans les deux tissus sont de structure en hélice α . Comme, l'épaule à 1628 cm^{-1} , caractéristique des protéines amyloïdes de structure β est absent dans les deux spectres, il serait difficile de discriminer entre ces deux tissus. Ces deux échantillons pourraient être tous soit les deux malades, soit tous les deux sains, soit l'un sain et l'autre malade.

Ainsi, on peut conclure que la spectrométrie infrarouge, ne permet pas dans notre cas de déterminer de diagnostic certain de ces deux échantillons. Nous avons donc eu recours à la spectrométrie de diffusion Raman.

B) Spectrométrie de diffusion Raman

a) Spectres FT-Raman

Nous avons représenté sur la Figure IV.20b, deux exemples de spectres FT-Raman des mêmes échantillons A et B, ayant déjà été caractérisés par spectrométrie infrarouge (Voir Figure IV.20a).

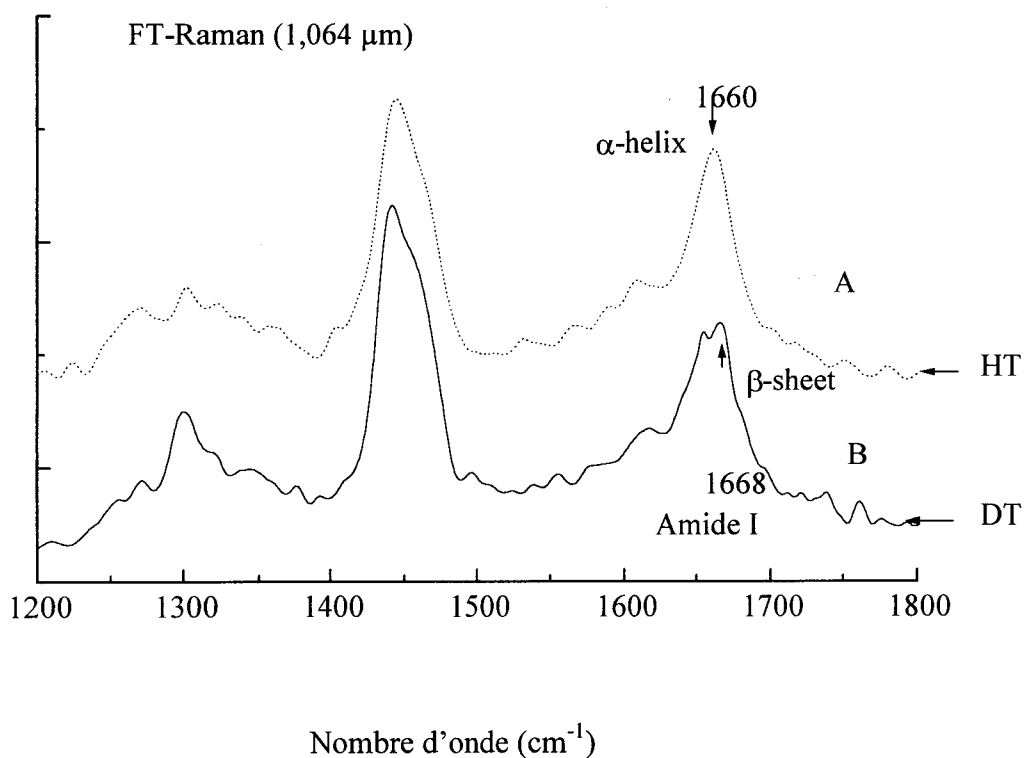


Figure IV.20b: Spectres de diffusion FT-Raman enregistrés pour deux échantillons cérébraux (A) et (B). A) Spectre caractéristique d'un tissu cérébral sain. B) Spectre caractéristique d'un tissu cérébral malade.

Dans le spectre A, la bande amide I présente une **composante unique à 1660 cm⁻¹**. Ce nombre d'onde est caractéristique de protéines de conformation en hélice α . Ceci montre que ce tissu ne contient pas de protéines amyloïdes. Par conséquent nous l'avons classé **sain**.

En revanche, dans le **spectre B**, la bande amide I présente **une double composante**: l'une à 1660 cm^{-1} caractéristique des protéines de structure en hélice α et l'autre à 1668 cm^{-1} , caractéristique des protéines de structure en feuillets β -plissés. Nous l'avons par conséquent **classé malade**. De plus, étant donné que l'intensité de la composante β est **supérieure** à celle de la composante α , nous avons estimé que ce tissu est riche en amyloïde. On peut donc conclure que la spectrométrie FT-Raman permet de discriminer entre ces deux échantillons. Ainsi l'échantillon **A** analysé peut provenir d'un **sujet sain**, alors que l'échantillon **B** provient d'un **patient malade**. Mais, en aucun cas, nous pouvons affirmer qu'il s'agit d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer.

La comparaison des résultats des spectres FT-IR et FT-Raman ne sont pas compatibles. En effet, les spectres FT-Raman ont montré que l'échantillon **B** est riche en amyloïde, alors le spectre FT-IR (B) devrait normalement montrer un épaulement à 1628 cm^{-1} , caractéristique des protéines de structure en feuillets β -plissés. Or, il n'en est rien; ceci peut être lié à la concentration des protéines amyloïdes dans l'échantillon B. Mais aussi aux profils des bandes amide I dans les spectres IR et Raman. En effet la bande amide I est très large dans les spectres infrarouge, alors qu'elle est fine dans les spectres Raman, ce qui permet de bien distinguer les composantes α et β associées à la bande amide I même si la concentration des protéines β dans les tissus malades. Ainsi la spectrométrie FT-IR ne peut pas être considérée comme une technique fiable pour le diagnostic spectroscopique de la MA.

b) Spectres micro-Raman

Deux exemples de spectres micro-Raman de résonance de ces mêmes échantillons A et B, ayant déjà été caractérisés (Voir Figures IV.20a et IV.20b) sont représentés sur la Figure IV.20c.

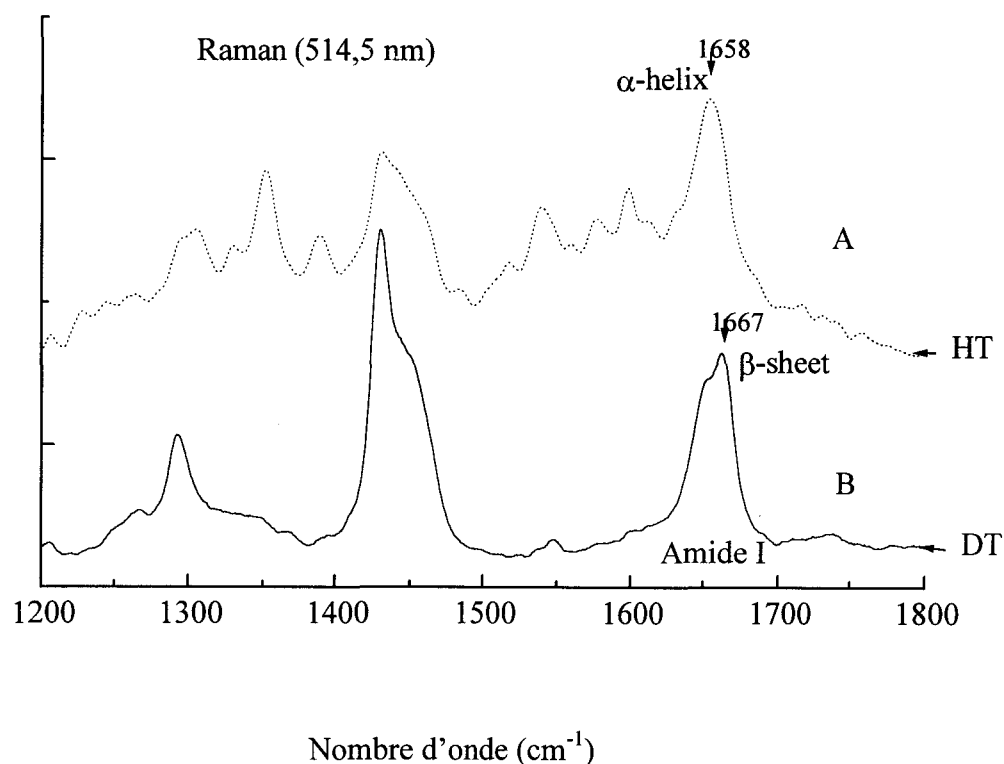


Figure IV.20c: Spectres d'absorption micro-Raman de résonance enregistrés pour de deux échantillons cérébraux. D'après ces spectres, le spectre (A) peut provenir d'une personne saine et le spectre (B) doit provenir d'un patient malade.

Le maximum de la bande amide I apparaît à 1658 cm^{-1} dans le spectre A et à 1667 cm^{-1} dans le spectre B. Ceci indique que l'échantillon A est caractéristique d'un tissu sain, alors que l'échantillon B est caractéristique d'un tissu malade. De plus, l'épaule moins prononcée sur le côté gauche de la bande amide I dans l'échantillon B, indique que ce dernier est faible en protéines de structure en hélice α , ce qui montre que le tissu B est malade. Ces spectres micro-Raman confirment les résultats de la spectrométrie FT-Raman.

Pour étudier la répartition des protéines normales (en hélice α) et des protéines «pathologiques» (feuillets β -plissés) dans ces deux échantillons A et B, nous avons eu recours à l'imagerie Raman.

c) Spectres d'Imagerie Raman

L'imagerie (ou cartographie) Raman est une technique très récente qui permet de caractériser une surface importante d'un échantillon donné et reproduire des images Raman 2D de ces différents constituants. Pour réaliser la cartographie Raman d'un échantillon donné, on procède de la manière suivante: On repaire d'abord l'endroit à étudier sous microscope optique. Puis, on sélectionne la surface à analyser et on enregistre son image Raman à l'aide d'un logiciel. L'acquisition d'un nombre important de spectres micro-Raman est réalisé ligne par ligne le long de toute la surface étudiée. Les spectres sont enregistrés tous les (x) micromètres pendant un temps relativement court. Mais le temps de la cartographie peut être long (d'environ 30 minutes à quelques heures), car il dépend de la surface de l'échantillon à étudier et des conditions d'acquisition des spectres. Enfin, un autre logiciel permet de reconstruire des images Raman à partir de tous les spectres différents cumulés, et qui caractérisent chacune des composantes de l'échantillon étudié. On peut aussi reconstruire des images Raman à partir de la décomposition de la (ou les) gamme (s) spectrale (s) contenant des informations recherchées.

Pour étudier la répartition des protéines dans les deux échantillons cérébraux (A et B), l'imagerie Raman s'est révélée être un outil très important car elle permet de reproduire spectroscopiquement l'équivalent des images d'une angiopathie amyloïde (dépôts amyloïde dans la paroi d'un vaisseau cérébral) ou d'une plaque sénile observées lors du diagnostic histopathologique par coloration. La gamme spectrale qui détermine le diagnostic spectroscopique de la maladie d'Alzheimer est celle de la bande amide I ($1690-1610\text{ cm}^{-1}$). Dans cette région spectrale, les intensités et les positions des deux composantes α et β dans les spectres Raman varient d'un tissu sain à un tissu malade.

i) Echantillon A

Sur la Figure IV.21a, sont représentés trois spectres obtenus par la décomposition de la bande amide I à partir de l'ensemble des spectres micro-Raman différents enregistré pour une section cérébrale de l'échantillon B de $10\text{ }\mu\text{m} \times 10\text{ }\mu\text{m}$. Sur cette même Figure, nous avons représenté l'image Raman reconstituée à partir de l'ensemble des spectres différents.

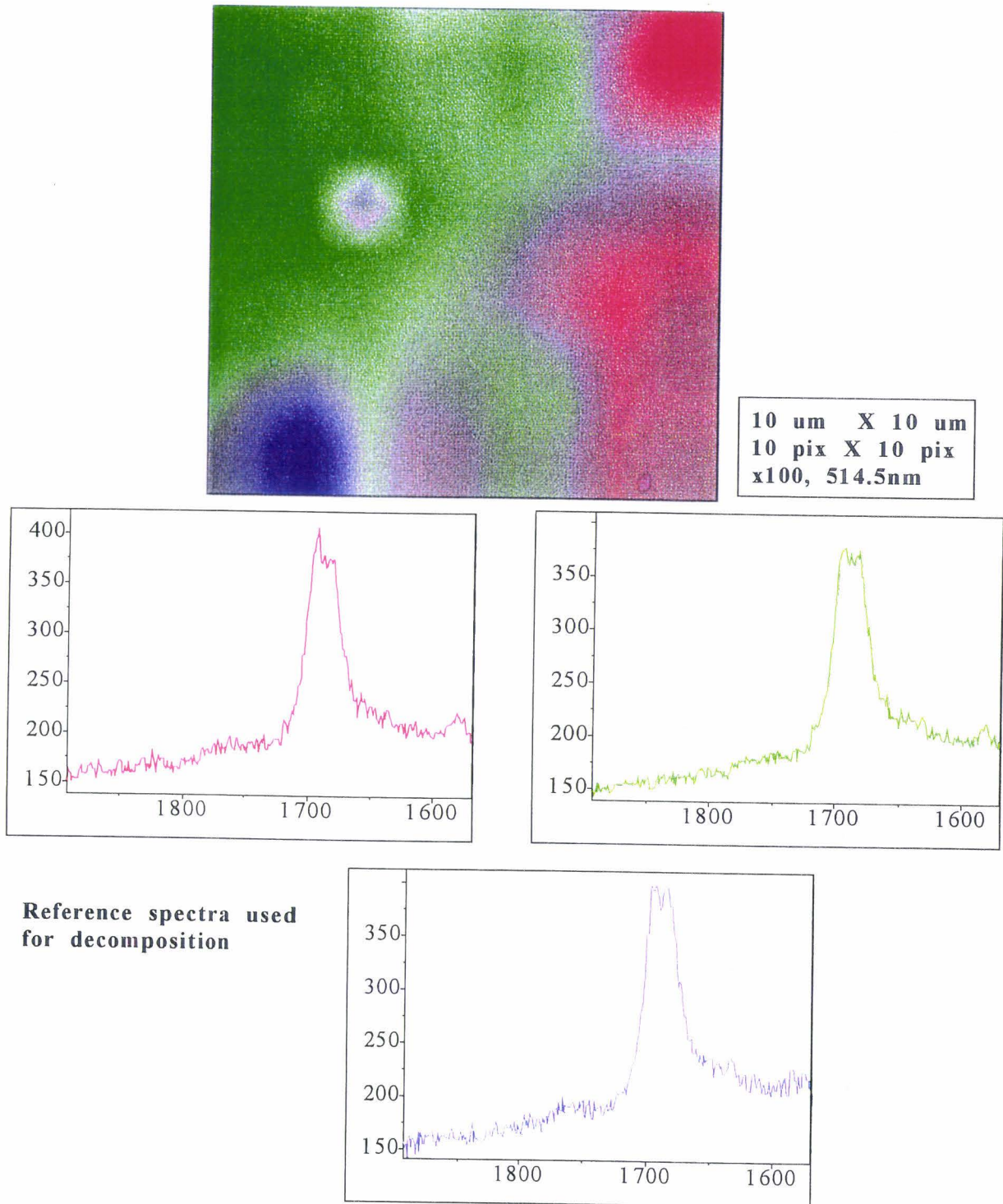


Figure IV.21a: a). Les spectres rouge, bleu et vert étaient obtenus à partir de la décomposition des bandes amide I de tous les spectres Raman enregistrés dans une section cérébrale de 10 μm x 10 μm , sélectionnée de l'échantillon B. Ces différentes couleurs observées dans l'image Raman indiquent que le tissu est hétérogène et que les protéines sont de conformations différentes. Le spectre rouge indique les endroits où le tissu est riche en protéines pathologiques de structure en feuillets β -plissés. En revanche, les spectres bleu et vert indiquent les régions où le tissu contient autant de protéines de structure α que de protéines de structure β . b) Image Raman reconstituée à partir de l'ensemble de ces trois spectres, montrant la distribution spatiale des protéines dans la section cérébrale analysée. La couleur rouge indique les endroits où le tissu est très malade, alors que les couleurs verte et bleue indiquent les endroits où le tissu est moyennement malade.

La bande amide I dans l'ensemble des spectres enregistrés dans la surface cérébrale sélectionnée de l'échantillon B montre que le tissu dans cette région présente trois spectres différents. Ces derniers présentent tous deux composantes dont l'intensité varie d'un spectre à l'autre. La composante à 1668 cm^{-1} est caractéristique des protéines de structures en feuillets β -plissés et la composante à 1659 cm^{-1} , caractéristique des protéines de structure en hélice α . La composante β domine dans le spectre rouge relevé. En revanche, dans les spectres bleu et vert les deux composantes α et β sont de même intensité. Ces trois spectres ne présentent pas de composante α unique ou sous forme d'épaulement, ce qui laisse suggérer que cette section cérébrale est plutôt riche en protéines pathologiques.

L'image Raman réalisée à partir de la décomposition de la gamme spectrale de la bande amide I de ces trois spectres Raman montre la distribution spatiale des protéines dans cette section, ce qui indique une hétérogénéité de la région analysée. Le région rouge indique les endroits du tissu qui contiennent surtout des protéines anormales car l'intensité de la composante β domine dans le spectre rouge relevé. Par conséquent cet endroit est caractéristique d'une région très malade. En revanche, les régions bleue et verte sont caractéristiques d'une région moyennement malade, car les composantes α et β sont relativement de même intensité. On peut Ainsi conclure que cette section analysée de l'échantillon B ne semble pas contenir des endroits véritablement sains.

Nous avons analysé plusieurs sections de l'échantillon B, et nous avons constaté que quelque soit la section cérébrale analysée, la bande amide I présente toujours une double composante. En effet, toutes ces sections renfermaient une quantité plus au moins importante de protéines de structure en feuillets β -plissés. **Ainsi, on peut conclure que l'échantillon B provient certainement d'un patient malade. Cependant, on ne peut pas affirmer avec certitude que ce patient est atteint de la maladie d'Alzheimer.**

ii) Echantillon A

Sur la Figure IV.21b est représentée trois spectres micro-Raman obtenus suite à la décomposition de la bande amide I de tous les spectres enregistrés dans une section cérébrale (de $15\text{ }\mu\text{m} \times 15\text{ }\mu\text{m}$) de l'échantillon A. Sur cette même Figure est représenté l'image Raman résultante de l'ensemble de ces trois spectres montrant t ainsi l'endroit correspondant à chacun de ces spectres dans la région tissulaire analysée.

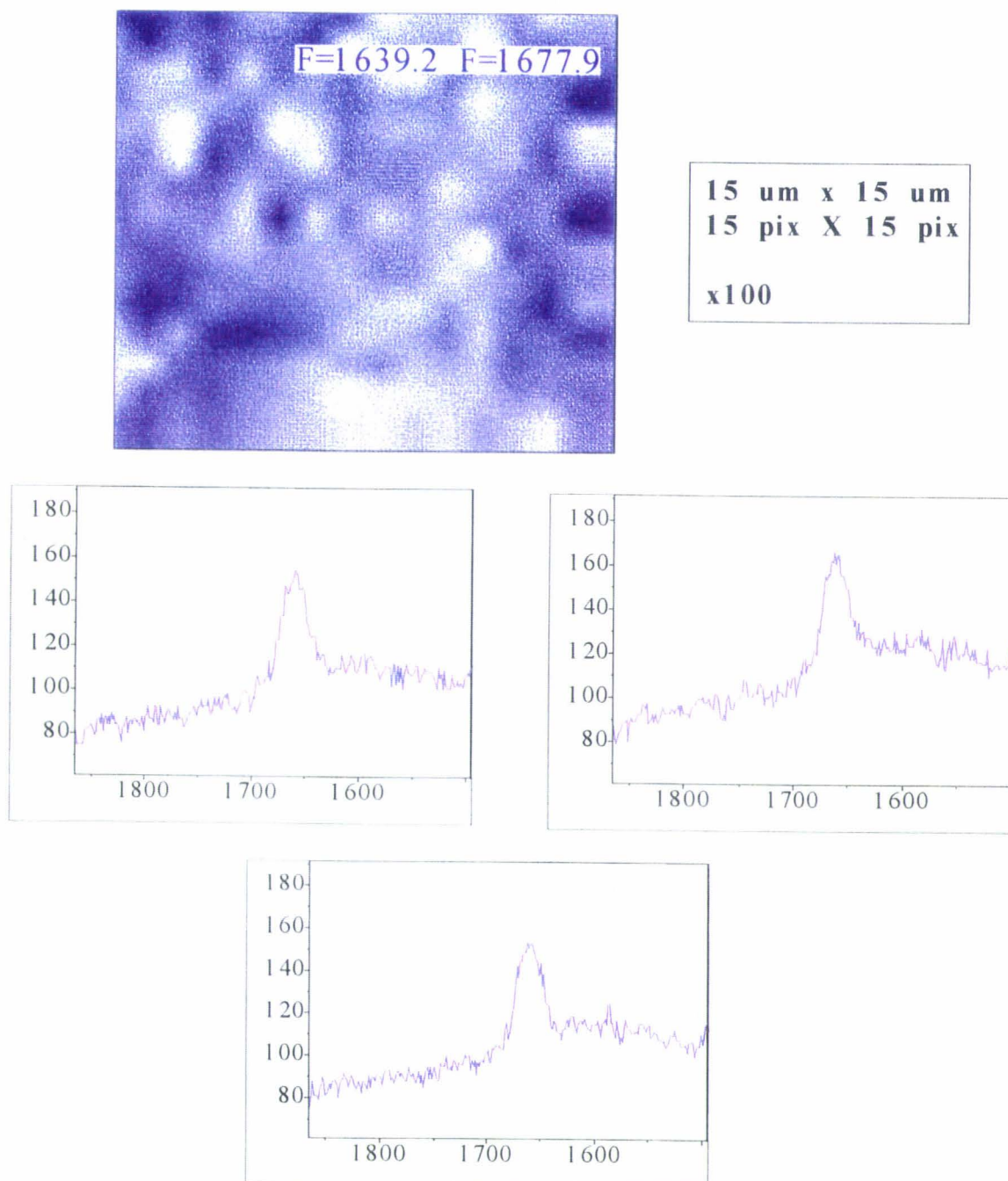


Figure IV.21b: a) Les spectres bleus étaient obtenus à partir de la décomposition des bandes amide I de tous les spectres enregistrés dans une section cérébrale de $15\ \mu\text{m} \times 15\ \mu\text{m}$ de l'échantillon A. Ces spectres montrent une composante unique caractéristique des protéines de structure en hélice α . **b)** Image Raman montrant la répartition des protéines dans cette section choisie de l'échantillon A. La couleur bleue uniforme indique que le tissu est homogène et que les protéines dans cette région sont de même conformation. Cette section est saine.

La comparaison de ces trois spectres bleus montre une différence négligeable au niveau des profils des bandes amide I. Cependant, le maximum et la position de la bande amide I dans ces spectres sont identiques. Ils présentent tous une seule composante à 1658 cm^{-1} , caractéristique des protéines de structure en hélice α , ce qui montre que cette région est dépourvue de protéines pathologiques. Cette section de l'échantillon A peut être classée saine.

La couleur bleue dans l'image Raman reconstituée à partir de ces trois spectres indique une répartition homogène des protéines dans cette région de l'échantillon A. Ceci indique que cette section est saine.

Nous avons analysé plusieurs sections de l'échantillon A, et nous avons constaté que quelque soit la section cérébrale analysée, la bande amide I présente toujours une composante unique caractéristique des protéines de structure en hélice α . **Ainsi, on peut conclure que l'échantillon A provient certainement d'un sujet sain.**

La combinaison des techniques spectroscopiques FT-Raman, micro-Raman et cartographie Raman peuvent désormais être des nouveaux outils de diagnostic pour la détection des protéines de structure en feuillets β -plissés dans tout tissu qui en contient.

4.4 DIAGNOSTIC SPECTROSCOPIQUE DU TISSU NON ALZHEIMER

Les dépôts d'amyloïde ne sont pas spécifiques à la maladie d'Alzheimer, puisqu'ils ont été détectés dans le cerveau de patients atteints d'autres maladies neuro-dégénératives, telles que les démences vasculaires, la maladie de Creutzfeldt Jacob, et même chez des personnes âgées cliniquement saines. Nous avons donc testé nos méthodes spectroscopiques sur des échantillons qui provenaient de patients atteints de démences vasculaires, de patients atteints de la maladie de Parkinson et d'une personne âgée, dont le diagnostic histopathologique a confirmé la présence des dépôts d'amyloïde.

Nous présentons sur la Figure IV.22, un exemple de spectre micro-Raman enregistré pour un tissu prélevé dans le cortex d'un patient atteint de démence vasculaire, et nous commenterons les autres résultats spectroscopiques obtenus pour les autres échantillons étudiés, provenant de patients et de sujets non Alzheimer.

Le spectre micro-Raman représenté sur la Figure IV.22 la montre que le tissu cérébral analysé contient autant de protéines que de lipides. Ceci est justifié par les intensités relatives de la bande amide I caractéristique des protéines et de la bande à 1438 cm^{-1} , caractéristique de lipides. Dans la région spectrale entre 1700 et 1690 cm^{-1} , la bande amide I présente deux composante.

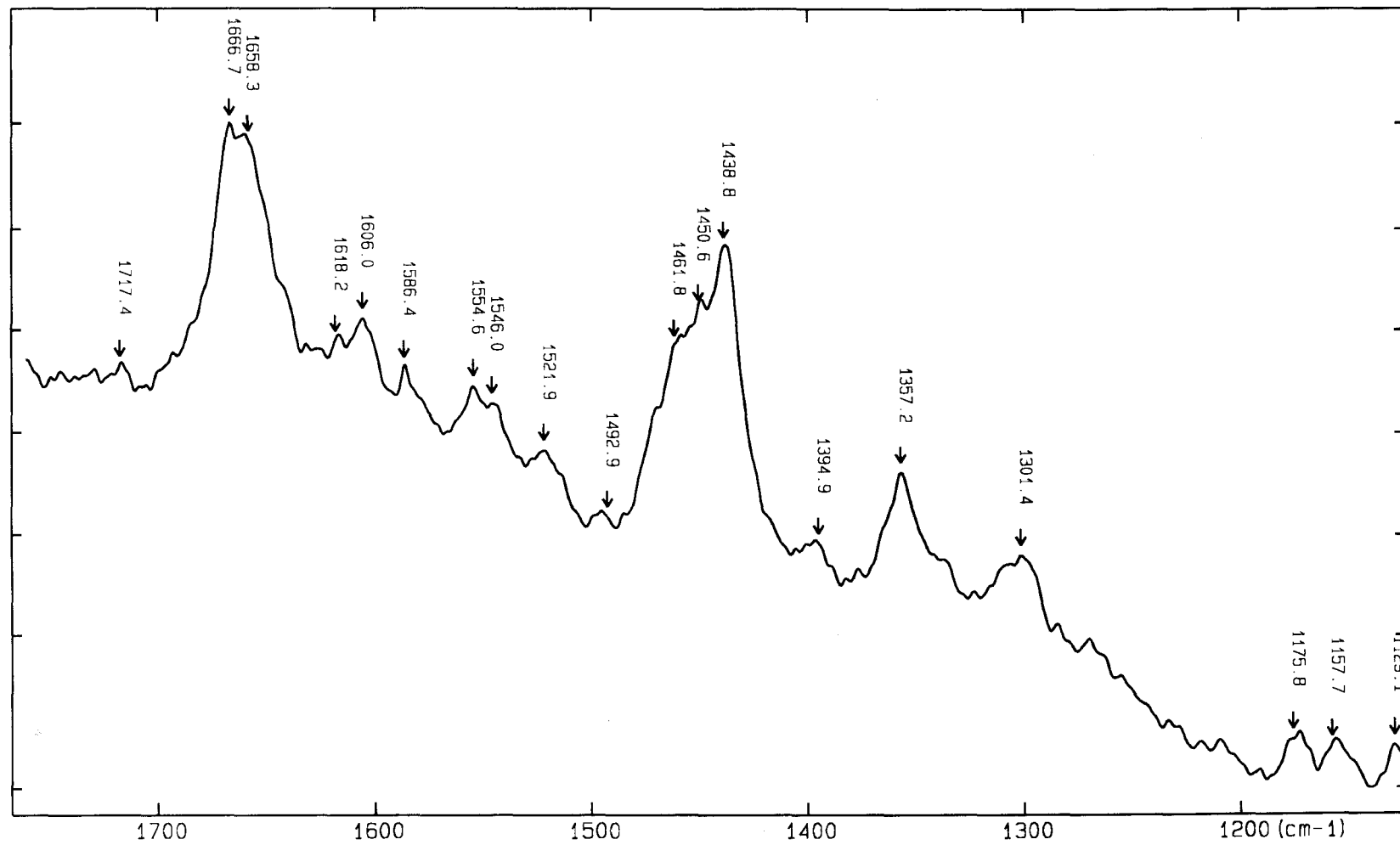


Figure IV.22: a) Spectre micro-Raman d'un tissu prélevé du cortex cérébral d'un patient atteint de démence vasculaire. (Excitatrice: 514,5 nm), P=100 mW, temps d'acquisition du spectre = 2 minutes.

L'une est située à 1667 cm^{-1} , montre que le tissu analysé contient des protéines de structure en feuillets β -plissés, et l'autre à 1658 cm^{-1} , indique que ce tissu contient aussi des protéines de structure en hélice α . Dans cette région spectrale, il est impossible de distinguer ce tissu provenant d'un patient atteint de démence vasculaire d'un tissu provenant d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer.

Certaines bandes observées dans la région spectrale entre 1690 et 1500 cm^{-1} , sont caractéristiques des acides aminés des chaînes latérales des protéines. Ces bandes sont exaltées par effet résonance. Dans la région spectrale entre 1500 et 1400 cm^{-1} , les composantes à 1460 et 1450 cm^{-1} sont dues principalement aux modes de déformation des groupements δCH_3 des protéines, alors que la composante à 1438 cm^{-1} est due principalement au mode δCH_2 des lipides. Quant aux faibles bandes observées entre 1400 et 1100 cm^{-1} sont dues aux groupements CH_2 et CC du squelette

Nous avons essayé de comparer ce spectre micro-Raman avec des spectres des tissus Alzheimer pour voir si l'on peut distinguer entre eux. Malheureusement, ceci était impossible car ces spectres sont à peu près similaires. Cependant, la comparaison de l'ensemble des résultats spectroscopiques recueillis pour de tous les tissus provenant des patients atteints de la maladie d'Alzheimer et de patients atteints de démences vasculaires que nous avons étudié, ont montré que les tissus Alzheimer contiennent une grande quantité de protéines de configuration β que les tissus «vasculaires».

L'ensemble des résultats obtenus ont montré que les patients atteints de démences vasculaires ne sont pas de bons témoins car ils peuvent contenir des dépôts amyloïde. En revanche, les patients atteints de la maladie de Parkinson que nous avons étudiés se sont avérés être des excellents témoins, car les spectres obtenus pour ces tissus ne présentaient pas de protéines amyloïdes. Pour tous ces cas, les diagnostics spectroscopiques étaient en accord avec les diagnostics histopathologiques.

Les diagnostics spectroscopiques du tissu provenant d'une personne âgée non démente étaient négatifs. Pourtant, les tests histopathologiques ont montré la présence des plaques d'amyloïde. Pour expliquer cette différence, nous avons proposé deux idées:

* nous avons montré dans le chapitre III que le colorant peut réagir avec des protéines non β comme l'élastine et le collagène.

* nous avons évoqué dans le chapitre I (Généralités) que les dépôts d'amyloïde peuvent se présenter sous forme de plaques diffuses dites «préamyloïdes». D'après la littérature, ces dernières sont très abondantes dans le cerveau de certains sujets âgés non déments et précèdent largement le déclenchement de la maladie d'Alzheimer.

Donc, les tests par spectrométrie Raman établis sur des tissus cérébraux non démentes sont plus fiables que les testes histopathologiques par coloration spéciales au rouge Congo et à la thioflavine S, car ils permettent de discriminer un tissu malade contenant des protéines de structure en feuillets β -plissés d'un tissu qui n'en contient pas.

4.5 CONCLUSION

Pour nos échantillons cérébraux, la spectroscopie FT-IR permet la caractérisation de l'ensemble de la structure des composantes chimiques d'un tissu biologique. Toutefois, elle présente quelques inconvénients en l'occurrence; la bande amide I est très large et contient des composantes non protéiques. Pour que cette technique soit fiable, les tissus cérébraux malades doivent être extrêmement riches en de protéines amyloïdes.

La spectrométrie Raman en revanche, s'est révélée être un excellent moyen pour la détection des protéines amyloïdes dans tout tissu qui en contient. De plus, la bande amide I est fine fait que la détection d'une faible quantité d'amyloïde est désormais possible. Cette technique pourrait donc être étendue à d'autres organes extra-cérébraux Alzheimer, comme la peau pour établir le diagnostic pré-mortem sur des biopsies de peau, ou comme un moyen supplémentaire pour la confirmation du diagnostic histopathologique de la MA.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] **Casal H. L. et Mansch H. H.**, *Biochimica Biophysica Acta* **779** (1984) 381.
- [2] **Jackson M. et Mantsch H. H.**, *Spectrochimica Acta Review* **15** (1993) 53.
- [3] **Taillandier E., Liquier J. et Taboury J. A.**, *Clark R J. H. et Hester E., Eds., Wiley, New York, Chapitre 8* (1985).
- [4] **Susi H. et Byler D. M.**, *Biochem. Biophys. Research Commun.* **115** (1983) 391.
- [5] **Surewicz W. K. et Mansch H. H.**, *Havel H. H., Ed., VCH Publishers, New York, Chapitre 8* (1994).
- [6] **Krimm S. et Bandekar J.**, *Advances in Protein Chemistry* **38** (1986) 181-364.
- [7] **Kauppinen J. K., Moffat D. J., Mansch H. H. et Cameron D. J.**, *Applied Spectroscopy* **35** (1981) 271-276.
- [8] **Fabian H., Naumann D., Misselwitz R., Ristau O., Gerlach D. et Welfle H.**, *Biochemistry* **31** (1992) 6532.
- [9] **Baron M. H. et Quiquampoix H.**, *Kluwer Acad. Publishers* (1993) 109.
- [10] **Jakobsen R. J., Wasacz F. M., Brasch J. W. et Smith K. B.**, *Biopolymers* **25** (1986) 639.
- [11] **Frushour B. G. et Koenig J. L.**, *Biopolymers* **14** (1975) 649.
- [12] **Koenig J. L. et Frushour B. G.**, *Biopolymers* **11** (1972) 1871.
- [13] **Yu N. T., Jo B. H. et O'Shea D. C.**, *Arch. Biochem. Biophys.* **156** (1973) 71.
- [14] **Choo L. P.; Mansfield J. R., Pizzi N., Somorjai R. L., Jackson M., Halliday W. C. et Mansch H. H.**, *Biospectroscopy* **1** (1995) 141-148.
- [15] **Jackson M., Choo L. P., Watson P., Halliday W. C. et Mansch H. H.**, *Biochim. Biophys. Acta.* **1270** (1995) 1-6.
- [16] **Fabian H., Choo L. P., Szendrei G. I., Jackson M., Halliday W. C., Otvos L., et Mansch H. H.**, *Appl. Spectroscopic.* **47** (1993) 1513-1518.

- [17] **Carey P. R. et Salares V. R.**, *Heyden & Son Ltd. London* 7 (1980) 45-51.
- [18] **Koyama Y. et Ikeda K. I.**, *Chemistry and Physics of lipids* 26 (1980) 149-172.
- [19] **Tasumi M., Shimanouchi T., Miyazawa T.**, *In Shimanouchi T. (ed.), Departement of Chemistry, University of Tokyo, Japan*, (1977) 54-60.
- [20] **Vergoten G., Fleury G., Moschetto Y.**, *Heyden & Son Ltd., London*, 4 (1978-1980) 195-265.

PARTIE II

LA PEAU

INTRODUCTION

Au cours de la MA, le **peptide A β (1-42)43** se dépose dans le cerveau des malades Alzheimer sous forme de filaments antiparallèles, qui s'agrègent pour former une **structure secondaire de feuillets β -plissés**. Depuis 1989, des dépôts extra-cérébraux du peptide A β [21-25], de la protéine pressueur de A β (β APP) [25], et de l'amyloïde amorphe (non-fibrillaire) [26] ont été détectés par immunohistochimie au niveau de divers tissus prélevés chez des patients atteints de la MA, de la trisomie 21 et même chez des personnes âgées normales, dont la peau [27-30] suggérant la présence d'un procédé de dépôts systématiques chez les alzheimeriens.

Ces études ont été développées grâce à la synthèse de certains anticorps dirigés contre le peptide amyloïde cérébral A β natif. Certains chercheurs ont utilisé un antisérum dirigé contre le peptide bêta-amyloïde cérébral natif pour analyser simultanément des biopsies de peau d'un groupe de témoins et d'un groupe de malades Alzheimer. Ils ont constaté que les glandes sudoripares, les nerfs dermales et la base de l'épiderme ont été marqués dans les deux groupes par l'antisérum amyloïde natif. Cependant, ce dernier marque fréquemment les parois vasculaires dans la peau des malades Alzheimer, mais rarement la peau des personnes saines contrôlées. Les analyses semi-quantitatives des vaisseaux positifs ont montré une différence significative entre les deux groupes. Ils ont ainsi conclu que la paroi vasculaire marquée dans la peau avec l'antisérum amyloïde natif est utile pour le diagnostic *pré-mortem* de la MA. Ils ont également ajouté que les contrôles ont été effectués à un stade préliminaire, il sera donc intéressant de les suivre pour voir s'ils développeraient un jour la MA.

D'autres auteurs en revanche ont contredits ces études, ils ont affirmé que les dépôts d'amyloïde dans la peau ne peuvent pas être des marqueurs fiables pour le diagnostic de la MA [24]. Par ailleurs, aucune étude spectroscopique n'a été faite à ce jour dans ce sens pour confirmer ou infirmer ces résultats. Comme la MA serait une anomalie liée à la conformation des protéines, nous avons pensé que la spectrométrie Raman pourrait être un nouvel outil pour le diagnostic *pré-mortem* de la MA sur des biopsies cutanées.

Eventuellement, ceci est possible si la peau saine ne contient pas des protéines de structure en feuillets β -plissés.

Nous commencerons par la caractérisation de la peau saine, ensuite, de la peau de malades (amyloïdoses). Nous discuterons ensuite les résultats obtenus et nous proposerons les régions tissulaires qui seraient valables pour le diagnostic spectroscopique de la MA *in vivo*.

IV.5 CARACTERISATION DE LA PEAU SAIN

5.1 HISTOLOGIE

La peau humaine est un système complexe, hétérogène, contenant plusieurs lipides et des protéines différentes. Elle a été classiquement conçue comme une membrane presque imperméable entre le corps et l'environnement extérieur. C'est une barrière protectrice contre les agressions chimiques, physiques, micro-biologiques et radiologiques, qui contient une variété de sites pour l'administration des agents thérapeutiques. La peau se compose essentiellement de trois couches de tissus: une profonde (**le derme**), une intermédiaire (**l'épiderme**) et une externe (**la couche cornée**).

Le **derme** est une masse de protéines fibreuses (dont le collagène et l'élastine) incorporée dans des mucopolysaccharides. **L'épiderme** est une membrane multicouche. La **couche cornée** est une membrane de 10 μm d'épaisseur qui fournit habituellement la barrière principale contre l'entrée des contaminants environnementaux, est constituée principalement de 10 à 15 couches de cellules kératinisées, incorporées dans une matrice lipoïdale. Cette couche cornée contient 75-80 % de protéines (environ 70% de la kératine de structure α) et 5-15% de lipides et 5-10 % de matières non identifiées [31]. Les lipides ne sont pas présents ni dans l'épiderme, ni dans le derme [31,32]. Leur composition varie selon la région du corps, on trouve principalement des lipides neutres, notamment, les shingolipides (ceramides), les lipides polaires, et le sulfate de cholestérol. Mais à la différence de la plupart des membranes biologiques, les phospholipides sont largement absents [31].

Etant donné que le derme est riche en fibres de collagène, il nous a semblé important de présenter quelques spectres de vibration de ces protéines.

5.2 LE COLLAGENE

Il existe plusieurs types de collagène (I à XII), que l'on trouve dans tout l'organisme, excepté dans le sang et dans la majorité des zones du système nerveux central. La répartition des différents types de collagène varie selon les régions du corps. Les membranes des cellules épithéliales sont riches en collagène de type IV, alors que la

matrice cellulaire est plutôt riche en collagène de types I et III. Nous avons étudié uniquement le collagène de type I, car il est le plus abondant.

Nous présenterons des spectres du collagène type I car c'est la protéine la plus abondante du tissu conjonctif (environ 30 % de toutes les protéines du corps). Cette protéine fibrillaire est de structure triple hélice alpha [33]. Cette structure est favorisée par la présence des acides aminés suivants: la proline, l'hydroxyproline et la glycine. Cette richesse en hydroxyproline est responsable de la rigidité des fibres de collagène et de leur grande résistance à la dénaturation. Elle est stabilisée par des ponts hydrogène intermoléculaires, ce qui confère à ces protéines des propriétés physico-chimiques remarquables. Les fibres de collagène se transforment en gélatine par de l'eau bouillante.

A) Spectrométrie d'absorption FT-IR

Sur la Figure IV.23a, nous avons représenté deux spectres FT-IR de collagène de type I (Sigma): l'un est extrait des tendons d'Achille des bovins et l'autre est extrait de la peau de veau (B) [34].

Le spectre (B) montre un nombre de bandes relativement intenses qui sont soit inexistantes, soit d'intensité réduite dans le spectre (A). La bande amide I présente une seule composante à 1661 cm^{-1} dans le spectre A, ce qui indique que le collagène type I des tendons est de structure α . En revanche, la bande amide I dans le spectre B présente deux composantes: l'une à 1661 cm^{-1} , et l'autre à 1636 cm^{-1} , ce qui indique qu'une partie de collagène type I de la peau est de structure triple hélice α (3α). Or, ce nombre d'onde coïncide avec la position d'une composante en feuillets β -plissés en spectrométrie IR. La présence du collagène dans la peau peut donc nuire au diagnostic spectroscopique de la MA qui dépend de la détection des protéines bêta.

Dans la région entre $1400\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$, les bandes à 1031, 1061 et 1082 observées dans le spectre B ont été attribuées [32] aux modes de vibration d'élongation $\nu\text{C-O}$ des résidus hydratés du collagène, sont de faible intensité dans le spectre A. Cette différence est probablement liée aux traitements chimiques utilisés pour la purification et l'extraction de ces échantillons.

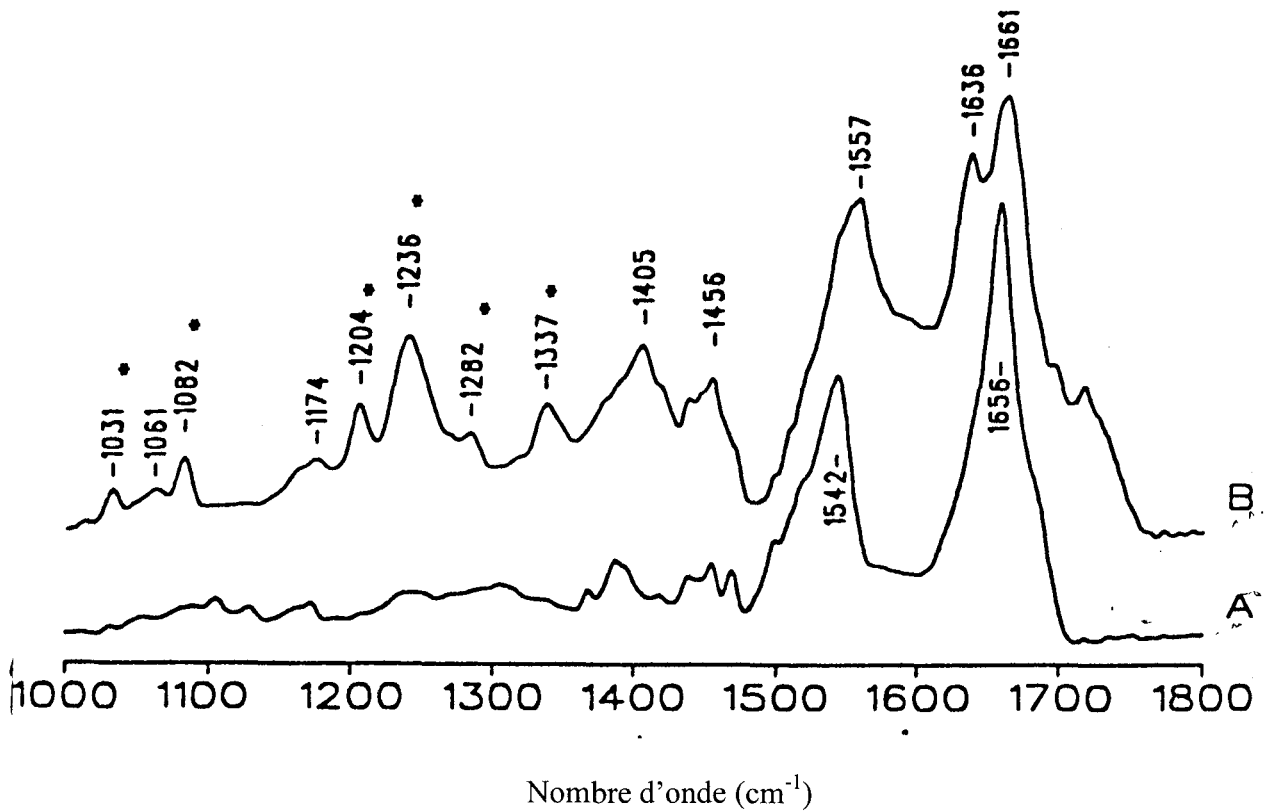


Figure IV.23a: Spectres d'absorption FT-infrarouge de deux films de collagène de type I (Sigma): l'un est extrait des tendons d'Achille des bovins et l'autre extrait de la peau de veau [34].

B) Spectrométrie de diffusion Raman

Sur la Figure IV.23b, est représenté un spectre FT-Raman du collagène type I: extraits des tendons d'Achille des bovins (Sigma) rapporté de la littérature [11].

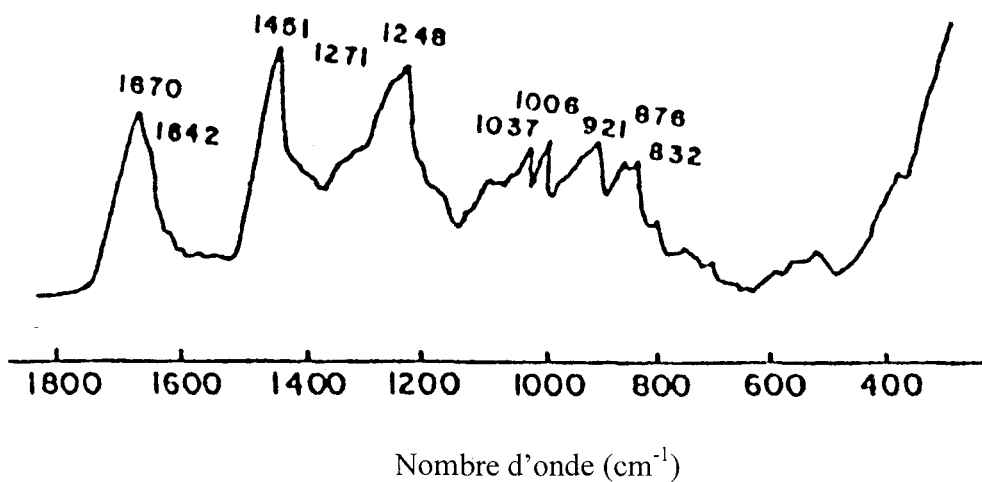


Figure IV.23b: Spectres FT-Raman de collagène extrait des tendons d'Achille des bovins: Spectre de la littérature [11]. P = 600 mW, temps d'acquisition: 10 sec.

Le spectre présente des bandes caractéristiques des protéines de structure en feuillet β -plissés, avec une bande amide I à 1670 cm^{-1} . Selon la littérature, le collagène est de structure 3α , la bande amide III apparaît à 1272 et 1248 cm^{-1} . Frushour et Koenig pensent que la présence de ces deux bandes est reliée au fait que la molécule du tropocollagène contient des régions non-polaires et polaires qui existent au sein de la chaîne. La bande amide III à 1248 cm^{-1} est caractéristique des régions 3α dans la molécule du tropocollagène. Les bandes et les attributions sont rassemblés dans le tableau suivant

Bandes Raman dans un spectre du collagène extrait des tendons d'Achille.

Collagène A	Attributions
tf= très faible intensité, f= faible, F= forte, m= moyenne	
1670 (F)	$\nu(\text{C=O})$ Amide I
1642 (tf)	idem
1464 (tf)	$\delta(\text{CH}_3, \text{CH}_2)$
1451 (F)	$\delta(\text{CH}_3, \text{CH}_2)$
1422 (m)	$\nu(\text{COO}^-)$
1271 (F)	Amide III
1248 (F)	Amide III
1211 (tf)	Hyp, Tyr
1178 (tf)	Tyr
1161 (tf)	NH_3^+
1128 (tf)	idem
1101 (tf)	$\nu(\text{C-N})$
1087 (tf)	idem
1067 (tf)	idem
1037 (m)	pro
1006 (m)	phe

A noter que les fibres de collagène subissent beaucoup de traitements chimiques nécessaires à leur extraction, ce qui risque de les dénaturer.

5.3 ETUDES SPECTROSCOPIQUES DE LA PEAU SAINTE

Nous avons étudié les trois régions tissulaires de la peau saine: la couche cornée, l'épiderme et le derme. Nous avons travaillé avec des sections de peau saine d'environ 7 micromètres d'épaisseur déparaffinée, préalablement fixée au formol. Le formol à 10 % peut préserver les structures des protéines et des lipides. Le choix de ce type de tissu repose sur le fait que les échantillons de peau de malades amyloïdoses que nous avons reçu

avaient subis les mêmes traitements. La plus grande information dans les spectres de vibration provient de la région 1000 à 1800 cm^{-1} .

A) Microspectrométrie FT-IR

Sur la Figure IV.24, nous avons représenté un spectre FT-IR enregistré dans le derme.

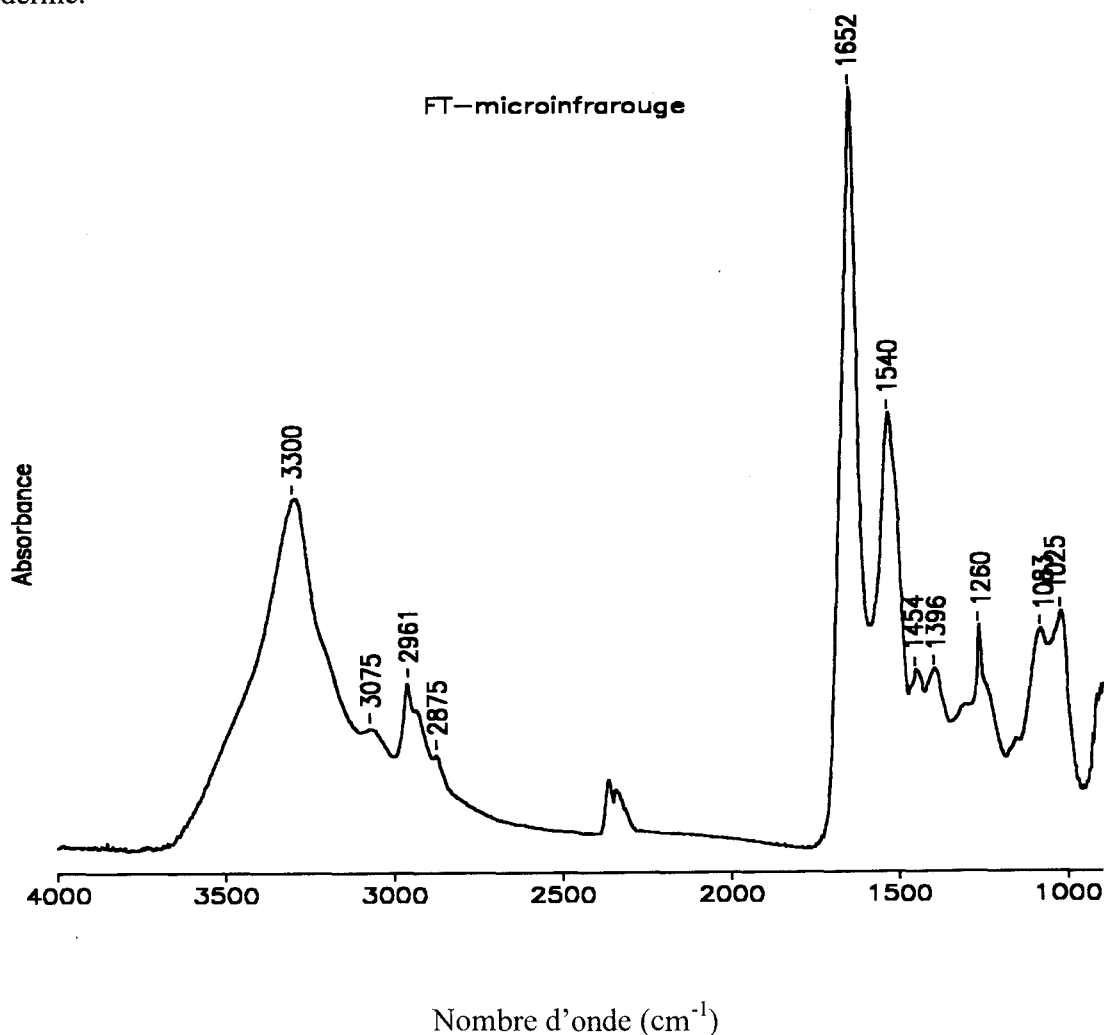


Figure IV.24: Spectres d'absorption microinfrarouge enregistré dans et le derme (La surface analysée était de: $33\text{ }\mu\text{m}^2$, la résolution: 4 cm^{-1} avec 200 accumulations.

Cette section donne des spectres infrarouge caractéristique des protéines. Dans ce spectre, les bandes situées à 3300 cm^{-1} ($\nu\text{N-H}$), 3075 cm^{-1} ($\nu\text{C-H}$ aromatiques), 2961 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}\text{CH}_3$) et 2875 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}}\text{CH}_3$), sont associées aux protéines. Dans la région 1800 - 1200 cm^{-1} , la bande amide I à 1652 cm^{-1} , la bande amide II à 1540 cm^{-1} et la bande amide III à 1260 cm^{-1} montrent que les protéines dans cette région tissulaire sont de structures en

hélice α . Les faibles bandes à 1454 cm^{-1} (δCH_3) et 1396 cm^{-1} ($\delta[\text{C}(\text{CH}_3)_2]$), sont associées aux acides aminés des chaînes latérales des protéines.

La majorité des protéines du derme sont le collagène et l'élastine, ainsi, les bandes apparaissant à 1083 et 1025 cm^{-1} , sont attribuées aux modes d'élongation des groupements C-O des résidus carbohydratés des protéines. Les bandes associées aux lipides endogènes n'apparaissent pas, d'une part à cause des solvants de déparaffinage de l'échantillon avant «la collection du spectre», et d'autre part parce que le derme n'est pas riche en lipide.

B) Spectrométrie de diffusion Raman

Nous présenterons d'abord des spectres FT-Raman enregistrés pour un échantillon de peau humaine fixé au formol à 10 %, ensuite, des spectres micro-Raman d'un échantillon de peau décongelée (non traité).

1) Spectres FT-Raman du tissu fixé au formol

Sur la Figure IV.25a sont représentés trois spectres FT-Raman d'une section de peau humaine d'environ 1 millimètre de diamètre, fixée au formol et rincée à l'eau. Ces échantillons n'ont pas été inclus dans la paraffine. Les mesures ont été réalisées dans la l'épiderme (A), le derme (B) et la graisse (C).

La bande amide I apparaît à 1653 cm^{-1} dans le spectre de l'épiderme (A), et à 1669 cm^{-1} dans le spectre du derme (B). Ceci indiquerait que les protéines de l'épiderme sont de conformation α et les protéines de derme sont de conformation β . Or, d'après la littérature, le derme ne renferme pas des protéines de structure bêta, mais plutôt des protéines de conformation triple hélice alpha (le collagène). Ainsi, on peut conclure que le derme ne peut pas être utilisé pour le diagnostic spectroscopique de la MA.

Si l'on compare les spectres FT-Raman de l'épiderme (A) et du derme (B) avec le spectre FT-Raman de la graisse (C), on peut constater que les spectres A et B ne présentent pas des bandes caractéristiques des lipides.



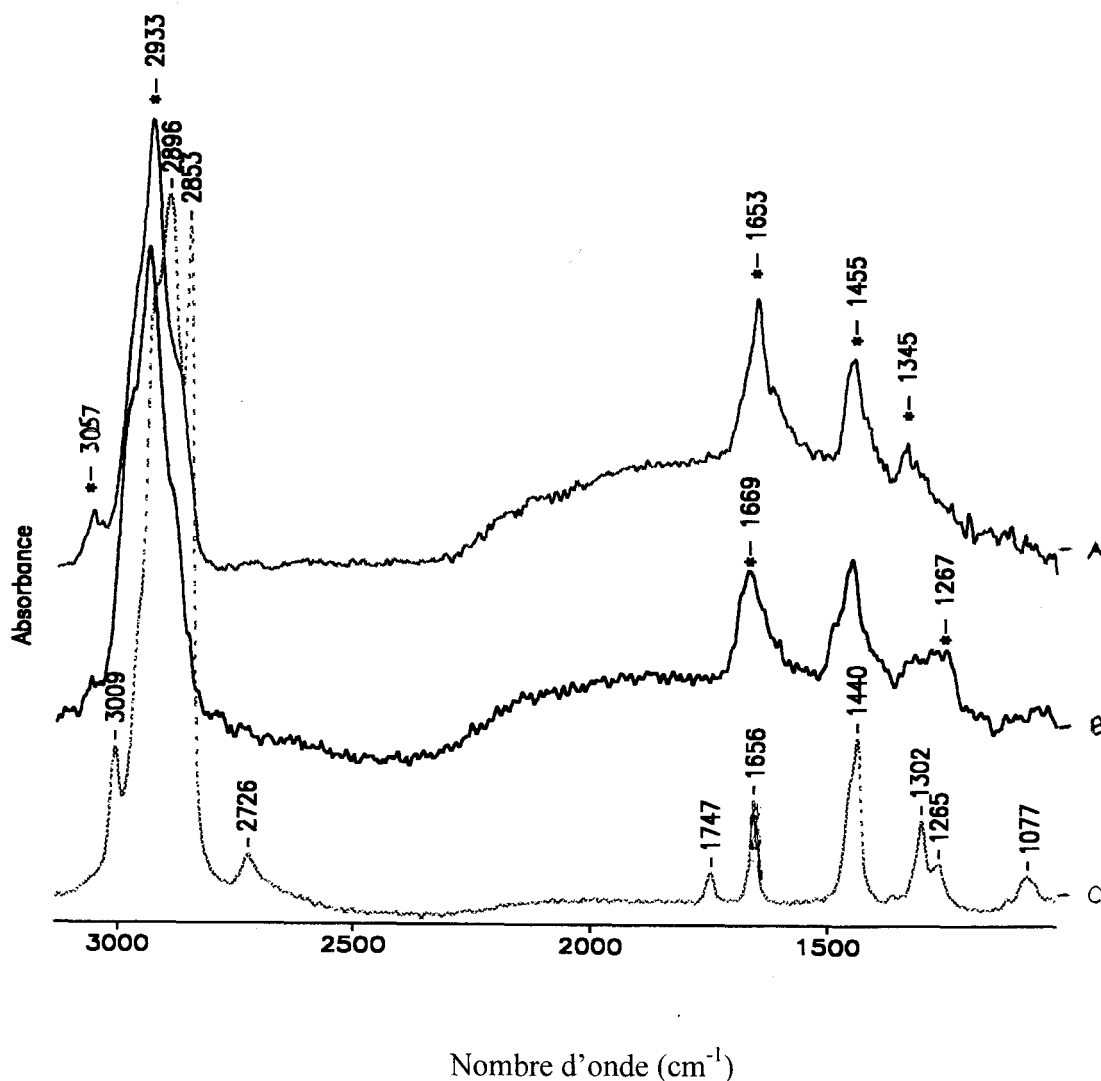


Figure IV.25a: Spectres FT-Raman de peau fixée au formol à 10 %, provenant du sein d'une personne saine. Ces spectres représentent trois régions tissulaires: A) L'épiderme, B) le derme, C) la graisse. $\lambda=1064$ nm, Puissance: 300 mW, temps d'acquisition: 10 minutes.

2) Spectres microRaman du tissu frais

Sur la Figure IV.25b sont représentés trois spectres micro-Raman rapportés de la littérature [36] d'une section de peau d'un sein humain d'environ 1 millimètre de diamètre décongelée, montrant la couche cornée (A), l'épiderme (B) et le derme (C).

Dans le spectre de la couche cornée (A), la bande amide I apparaît à 1653 cm^{-1} et la bande amide III à 1267 cm^{-1} . Ces bandes sont principalement dues à la présence des protéines α -keratine [36] qui sont les composantes majoritaires de la couche cornée. Dans ce spectre (A), on observe des bandes à 1062 , 1127 et 1296 cm^{-1} , qui sont virtuellement absents dans les spectres de l'épiderme (B) et du derme (C), car l'une des caractéristiques

des spectres de vibration de la couche cornée du tissu humain est la présence des bandes associées aux lipides endogènes.

Le spectre du derme (C) est similaire à celui du collagène, qui est la composante protéique la plus abondante dans le derme, avec la bande amide I à 1669 cm^{-1} . Enfin, dans le spectre de l'épiderme (B), la bande amide I présente les deux composantes: l'une à 1653 cm^{-1} et l'autre à 1669 cm^{-1} . Ceci indique que le spectre de l'épiderme renferme des protéines de collagène et de kératine.

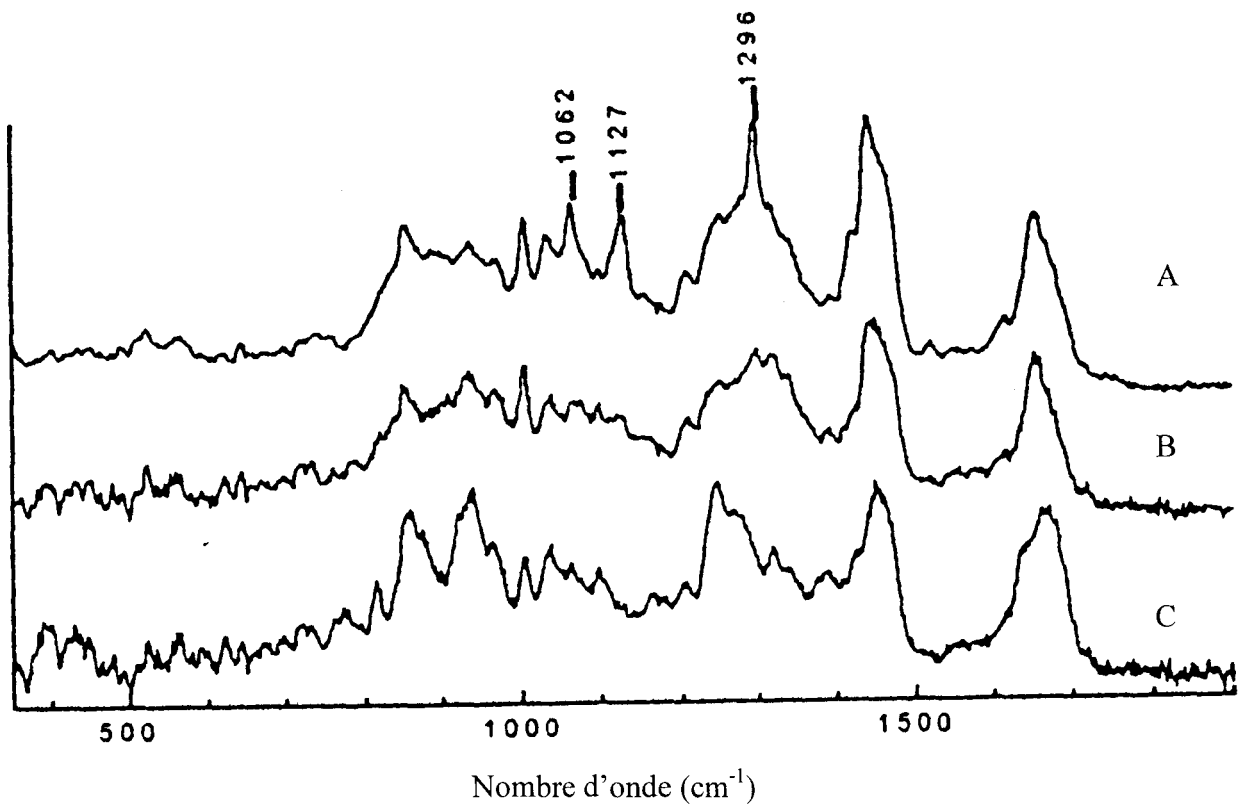


Figure IV.25b: Spectres micro-Raman d'une section de peau décongelée provenant du sein d'une personne saine. A) couche extérieure ou couche cornée, B) couche intermédiaire ou épiderme, C) couche externe ou derme. $\lambda=850\text{ nm}$, Puissance: 200 mW, temps d'acquisition: 60 s [36].

Nous avons convenu que la peau peut être recommandée pour le diagnostic *pré-mortem* de la MA par biopsie cutanée; à condition que les spectres de vibration ne présentent pas de protéines de structure en feuillet β -plissés. Ainsi, la couche cornée, contrairement au derme et à l'épiderme peut pas être recommandée pour le diagnostic. En revanche, peut être utilisée pour le diagnostic; elle est riche en protéines de structure en hélice α .

IV.6 CARACTERISATION DE PEAU D'AMYLOIDOSE

Les amyloïdes sont des dépôts protéiques insolubles, homogènes, qui s'accumulent dans l'espace intercellulaire provoquant ainsi des maladies dites amyloïdoses. Les amyloïdes sont originaires des protéines naturelles dénaturées. Le point commun le plus important dans la définition des fibres d'amyloïde repose sur leur **structure en feuillets bêta plissés**; structure qui normalement ne se trouve pas en conformation pure dans les tissus sains. Par conséquent, elles ne peuvent pas être catabolisées par l'organisme humain. La maladie d'Alzheimer (MA) est reconnue comme étant la maladie la plus fréquente des amyloïdoses, incluant ainsi des dépôts d'amyloïde dans l'espace interneuronale et aussi, exceptionnellement, dans les parois des vaisseaux cérébraux. Dans les amyloïdoses, les dépôts d'amyloïde sont principalement extra-cérébraux (cœur, rate, peau, intestin, ect..)

6.1 ETUDE SPECTROSCOPIQUE

Dans les spectres de vibration de l'épiderme et du derme, les fibres de collagène présentent des bandes qui peuvent se substituer aux protéines de configuration β dans la région de la bande amide I, ainsi, nous avons analysé des échantillons provenant de patients atteints d'amyloïdose systémique localisée et diffuse. Dans ce dernier type de maladie, les dépôts d'amyloïde sont très abondants et sont localisés à la fois dans la couche cornée, l'épiderme et le derme. Nous avons donc choisi de représenter un spectre du tissu malade enregistré dans la couche cornée de la peau d'un patient atteint d'amyloïdose diffuse car cette région tissulaire contient surtout de l' α -keratine dans la peau saine.

Sur la Figure IV.26a, nous avons représentés deux spectres d'absorption infrarouge de coupes de peau **déparaffinées**, préalablement fixées au formol à 10 % dans le but de détecter les dépôts amyloïde. Dans la région entre **1800 et 1500 cm^{-1}** , le spectre de la peau saine présente une composante unique à 1653 cm^{-1} , caractéristique des protéines de structure en hélice α . Par contre le spectre du tissu malade (B), présente une seconde composante à 1634 cm^{-1} , caractéristique des protéines de structure en feuillets β . Etant donné que la couche cornée est normalement riche en protéines de structure en hélice α , nous avons attribué cette bande à la contribution des protéines amyloïdes.

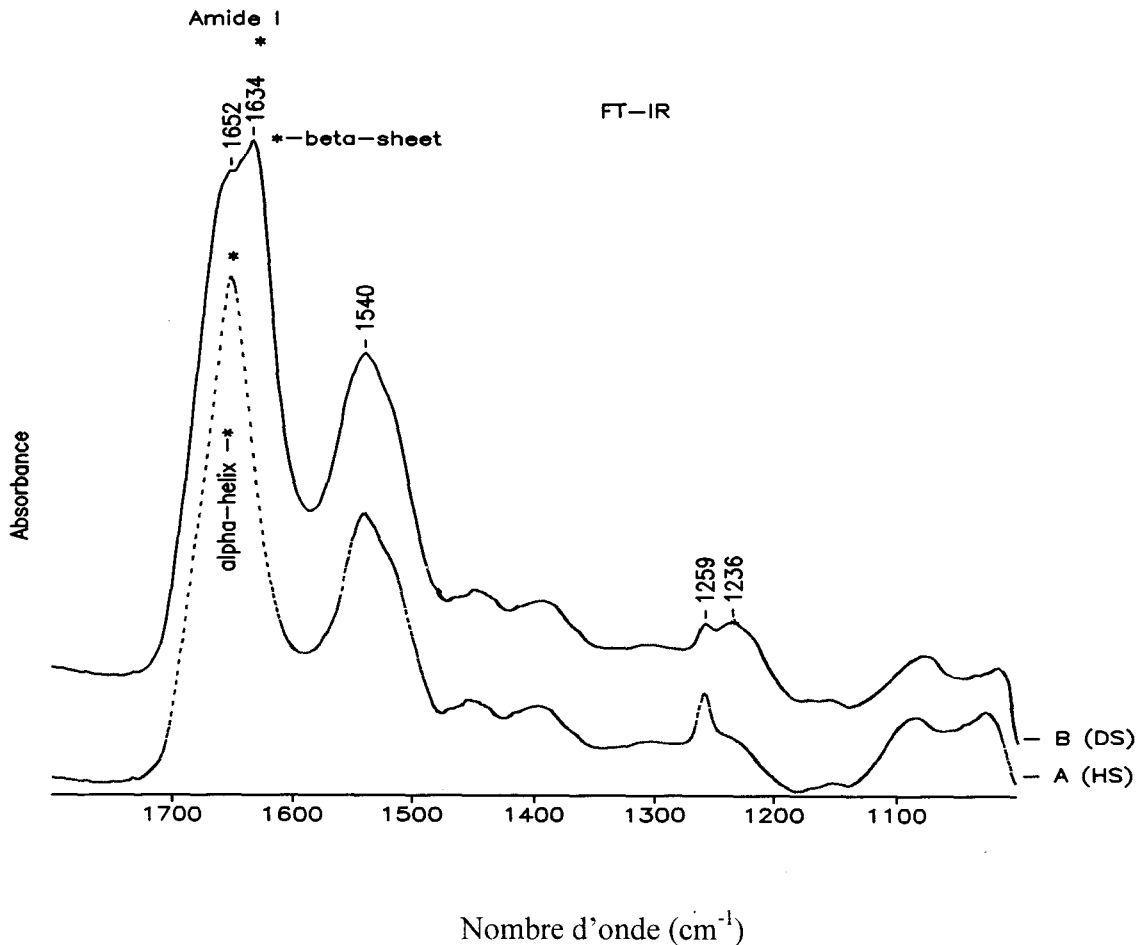


Figure IV.26: Spectre micro-Raman de la couche cornée de la peau; A) tissu sain et B) tissu d'un patient atteint d'amyloïdose diffuse. $\lambda = 850$ nm, 60 sec, 200 mW.

6.2 CONCLUSION

Cette étude nous a permis de constater que les spectrométries infrarouge et Raman peuvent être utilisés pour identifier les dépôts amyloïde dans les tissus de peau de patients atteints d'amyloïdose. Mais, les analyses doivent être limitées à la couche cornée pour la détection des protéines amyloïdes sur des biopsies cutanées de malades Alzheimer. Cependant il sera possible de faire des tests au niveau des ongles et de la peau morte des pieds; ils contiennent des cellules mortes riches en protéines kératinisées de structure en hélice α .

BIBLIOGRAPHIE

- [1] **Casal H. L. et Mansch H. H.**, *Biochimica Biophysica Acta* **779** (1984) 381.
- [2] **Jackson M. et Mantsch H. H.**, *Spectrochimica Acta Review* **15** (1993) 53.
- [3] **Taillandier E., Liquier J. et Taboury J. A.**, *Clark R J. H. et Hester E., Eds., Wiley, New York, Chapitre 8* (1985).
- [4] **Susi H. et Byler D. M.**, *Biochem. Biophys. Research Commun.* **115** (1983) 391.
- [5] **Surewicz W. K. et Mansch H. H.**, *Havel H. H., Ed., VCH Publishers, New York, Chapitre 8* (1994).
- [6] **Krimm S. et Bandekar J.**, *Advances in Protein Chemistry* **38** (1986) 181-364.
- [7] **Kauppinen J. K., Moffat D. J., Mansch H. H. et Cameron D. J.**, *Applied Spectroscopy* **35** (1981) 271-276.
- [8] **Fabian H., Naumann D., Misselwitz R., Ristau O., Gerlach D. et Welfle H.**, *Biochemistry* **31** (1992) 6532.
- [9] **Baron M. H. et Quiquampoix H.**, *Kluwer Acad. Publishers* (1993) 109.
- [10] **Jakobsen R. J., Wasacz F. M., Brasch J. W. et Smith K. B.**, *Biopolymers* **25** (1986) 639.
- [11] **Frushour B. G. et Koenig J. L.**, *Biopolymers* **14** (1975) 649.
- [12] **Koenig J. L. et Frushour B. G.**, *Biopolymers* **11** (1972) 1871.
- [13] **Yu N. T., Jo B. H. et O'Shea D. C.**, *Arch. Biochem. Biophys.* **156** (1973) 71.
- [14] **Choo L. P; Mansfield J. R., Pizzi N., Somorjai R. L., Jackson M., Halliday W. C. et Mansch H. H.**, *Biospectroscopy* **1** (1995) 141-148.
- [15] **Jackson M., Choo L. P., Watson P., Halliday W. C. et Mansch H. H.**, *Biochim. Biophys. Acta.* **1270** (1995) 1-6.
- [16] **Fabian H., Choo L. P., Szendrei G. I., Jackson M., Halliday W. C., Otvos L., et Mansch H. H.**, *Appl. Spectroscopic.* **47** (1993) 1513-1518.
- [17] **Carey P. R. et Salares V. R.**, *Heyden & Son Ltd. London* **7** (1980) 45-51.
- [18] **Koyama Y. et Ikeda K. I.**, *Chemistry and Physics of lipids* **26** (1980) 149-172.
- [19] **Tasumi M., Shimanouchi T., Miyazawa T.**, *In Shimanouchi T. (ed.), Departement of Chemistry, University of Tokyo, Japan*, (1977) 54-60.

- [20] Vergoten G., Fleury G., Moschetto Y., Heyden & Son Ltd., London, 4 (1978-1980) 195-265.
- [21] Joachim C. L., Mori H. and Selkoe D.J., *Nature* 341 (1989) 226-230.
- [22] Ikeda M., Shoji M., Yamaguchi H., Matsubara E., Amari M., Ishiguro K., Kawarabayashi T., Harigaya Y. and Hirai S., *Neurosci. Lett.* 150 (1993) 159-161.
- [23] Soininen H., Syrjänen S., Heinonen O., *Lancet* (1992) 339-245.
- [24] Heinonen H. et al., *Arch. Neurol* 51 (1994) 799-804.
- [25] Vega J. A., Diaz-Trelles R., Haro J. J., del Valle M. E., Naves F. J., Fernandez-Santchez M. T., *Neurosci. Lett.* 192 (1995) 132-136.
- [26] Wen G. Y., Wisniewski H. M., Blondal H., Benedikz E., Frey H., Pirtilla T., Rudelli R. et Kim K. S., *Acta Neuropathol.* 88 (1994) 201-208.
- [27] Mansch H. et Jackson M., *J. Molec. Struct.*, 347, (1995) 148-167.
- [28] Kang J., Lemaire H-G., Unterbeck A., Salbum J. M., Masters C. L., Grzeschik K-H., Multhaup G., Beyreuther K. et Müller-Hill B., *Nature* 325 (1987) 733-736.
- [29] Prelli F., Castano E., Glenner G. G. and Frangione B., *J. Neurochem.* 51 (1988) 648-651.
- [30] Kirschner D. A., Inouye H., Duffy L. K., Sinclair A., Lind M., et Selkoe D. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 6953-6957.
- [31] Edwards E. G. M. et al., *J. Raman Spectroscopy* 23 (1992) 641-645.
- [32] Anigbogu A.N.C., *International journal of Pharmaceutics*, 125 (1995) 265-282.
- [33] Veis A. et Brownell A. G., *Proc Natl Acad Sci USA* 74 (1977) 902.
- [34] Jackson M., Choo L. P., Watson P., Halliday W. C. et Mansch H. H., *Biochim. Biophys. Acta* 1270 (1995) 1-6.
- [35] Puppels G.J. and Greve J., *Biomedical Applications of Spectroscopy, Advances in spectroscopy 25*, ed. by Clark, R.J.H and Hester R. E., John Wiley & Sons. 25 (1996)
- [36] Bowden P. E., *Molecular Aspects of Dermatology*, John Wiley & Sons (1993).

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

La maladie d'Alzheimer (MA) est une démence neuro-dégénérative qui se caractérise sur le plan neuropathologique par la présence dans le cerveau de protéines anormalement constituées, dont le **peptide amyloïde** ($A\beta$). Ce peptide qui s'accumule dans des plaques séniles et dans les parois des vaisseaux cérébraux des malades Alzheimer est **de structure en feuillets β -plissés**. Actuellement, le **diagnostic certain** de MA repose en majeure partie sur la détection *post-mortem* des dépôts d'amyloïde dans des tissus cérébraux colorés au rouge Congo (RC). Le but de notre travail était de développer des méthodes spectroscopiques fiables applicables pour le diagnostic *in vivo* de la MA.

Tout d'abord, l'affinité de la molécule RC pour les protéines amyloïdes nous a incité à penser d'utiliser ce colorant comme sonde *in vivo*. Le mécanisme d'interaction entre le RC et les protéines modèles de l'amyloïde étant déjà proposé, nous avons donc voulu approfondir notre étude et vérifier si ce mécanisme était le même pour le tissu cérébral des malades Alzheimer. Or, le tissu cérébral des alzheimeriens ne contient pas seulement des protéines amyloïdes, nous avons donc étudié le mécanisme d'interaction avec des protéines de conformations différentes avant d'étudier le tissu.

Le mécanisme ayant été proposé pour les systèmes modèles s'est avéré applicable pour le tissu. Les résultats obtenus par les spectrométries UV-visible, FT-IR, FT-Raman et micro-Raman ont montré que le RC interagit avec des protéines de structure en feuillets β -plissés. Le mécanisme d'interaction met en jeu des groupements chargés négativement du colorants (sulfonyles et les cycles aromatiques) et des groupements chargés positivement des protéines (amines), mais aussi d'autres facteurs moins bien définis.

Etant donné que le diagnostic histopathologique de la MA est établi sur **du tissu traité par des solvants dénaturants**, nous avons donc étendu notre étude au **tissu sain traité**. Les résultats obtenus ont montré que les protéines du tissu sain traité interagissent aussi avec le RC, mais aussi des composantes non protéiques, via des groupements phosphates. Les tests histopathologiques et spectroscopiques du tissu cérébral **sain traité**

et **coloré au RC** nous ont amené à identifier des artefacts susceptibles de provoquer des **faux positifs**. L'origine de ces artefacts réside dans l'utilisation de **certains solvants dénaturants** comme fixateurs par les laboratoires d'histopathologie. Ce résultat a soulevé de nombreuses questions concernant la fiabilité du diagnostic histopathologique.

Les études spectroscopiques de l'effet de certains solvants utilisés dans les procédures de paraffinage standard nous ont permis de montrer qu'à la suite du traitement, non seulement, les différents solvants utilisés solubilisent une partie des acides nucléiques et des lipides, mais aussi, ils entraînent des changements de conformations des protéines dans le tissu cérébral. Pour voir si la cinétique de fixation est la même dans le tissu sain et dans le tissu malade, nous avons alors étudié simultanément l'effet de certains solvants dénaturants (qui affectent la structure secondaire des protéines, le carnoy et l'acide acétique) sur les protéines du tissu sain et les protéines du tissu Alzheimer. Ceci nous a permis de montrer que les protéines du tissu Alzheimer sont plus sensible aux solvants que celle du tissu sain. La discrimination entre un tissu Alzheimer et un tissu sain était basée sur l'analyse de la bande amide I dans les spectres de vibration. Nous avons donc déterminé les conditions optimales d'utilisation des solvants de fixation aussi bien en histopathologie qu'en spectroscopie.

Pour éviter l'utilisation des solvants dénaturants, nous avons envisagé d'utiliser du tissu frais pour établir le diagnostic histopathologique par coloration. Cependant, le tissu frais se déshydrate à l'air libre, ce qui rend difficile la détection des lésions cérébrales sous microscope. Pour résoudre ce problème, nous avons donc déterminé un fixateur non dénaturant qui peut préserver la structure secondaire des protéines dans le tissu.

L'étape suivante nous a conduit à contourner ces difficultés inhérentes aux solvants en mettant au point des protocoles fiables qui utilisent des méthodes spectroscopiques appropriées pour la détection des protéines amyloïdes dans du tissu cérébral **frais** provenant de malades Alzheimer. Nous avons d'abord exploité la composition biochimique du tissu cérébral sain frais pour déterminer ses caractéristiques spectrales et de s'assurer qu'il ne contient pas de protéines de structure en feuillets bêta-plissés susceptibles de nuire au diagnostic spectroscopique. L'ensemble des techniques spectroscopiques utilisées ont montré que les protéines du tissu cérébral sain sont de structure en hélice α , alors que

certaines protéines du tissu des malades Alzheimer sont de structure en feuillets β -plissés. Nous avons ainsi pu conclure que les techniques de spectrométries **FT-Raman**, **micro-Raman** et **imagerie Raman** peuvent être des nouveaux outils de diagnostic spectroscopique pour détecter les protéines de structure en feuillets β -plissés dans le tissu cérébral des malades Alzheimer.

Les dépôts d'amyloïde n'étant pas spécifiques à la MA, nous avons donc testé nos méthodes diagnostiques sur des échantillons qui provenaient d'autres maladies neuro-dégénératives. Les résultats obtenus ont montré que les tissus prélevés de patients atteints de la maladie de Parkinson étaient de bons témoins, contrairement à ceux qui provenaient de patients atteints de démences vasculaires qui contiennent parfois des dépôts d'amyloïde. Cependant nous avons constaté que ces derniers sont beaucoup plus abondants dans les prélèvements de nos malades Alzheimer. Ainsi, la spectrométrie Raman peut être utilisée comme un moyen supplémentaire pour la détection des protéines de structure en feuillets β -plissés dans tout tissu cérébral qui en contient.

De plus, comme selon la littérature, des dépôts d'amyloïde ont été détectés dans des organes extra cérébraux de patients atteints de la MA, dont **la peau**. Nous avons pensé qu'il s'agit là d'éléments très importants pouvant ouvrir des perspectives nouvelles dans la prise en charge de cette maladie, en particulier en ce qui concerne le **diagnostic pré-mortem**. Il est cependant évident que nos méthodes ne seraient applicables qu'à la condition qu'il n'existe pas dans la peau normale et en cas d'autres maladies, des protéines de structure en feuillets β -plissés, ce qui fausserait naturellement les données. Nous avons donc voulu éliminer ces conditions artefactuelles en faisant des tests spectroscopiques sur des peaux provenant de personnes saines et de peau provenant de patients atteints d'amyloïdose systémique diffuse (dépôts d'amyloïde détectés par histopathologie dans **la couche cornée**, l'épiderme et le derme). L'ensemble des résultats obtenus ont montré que le derme et certaines régions de l'épiderme ne peuvent pas être recommandées pour le diagnostic spectroscopique de la MA, car ces tissus contiennent des protéines dont la position de la bande amide I coïncide avec celle des protéines de structure en feuillets β -plissés. En revanche, les tests spectroscopiques ont montré que les protéines de la **couche cornée de la peau saine** sont de structure en hélice α , alors qu'une partie des protéines de la couche cornée de patients atteints d'amyloïdose sont de structure en feuillets β -plissés.

Ceci laisse entrevoir la possibilité d'utiliser la couche cornée pour le diagnostic *pré-mortem* de la MA par biopsie cutanée. Mais, étant donné que la fiabilité de nos méthodes spectroscopiques dépend de l'absence des protéines de conformation bêta dans les tissus qui peuvent être recommandés pour le diagnostic précoce de la MA, nous proposons d'autres régions tissulaires telles que **la peau morte des pied et les ongles**. Par ailleurs, il ne faut pas négliger d'autres tissus ainsi que les liquides biologiques (liquide céphalo-rachidien (LCR) et plasma). En effet, des expériences préliminaires de discrimination des LCR des malades Alzheimer et des LCR des sujets sains nous laissent aussi entrevoir des possibilités d'un diagnostic précoce de la MA par ponction lombaire.

La spectrométrie vibrationnelle, et le Raman en particulier, montrent ici ces nombreuses applications à la fois dans le domaine de la compréhension de mécanisme d'interaction entre le RC et les protéines amyloïdes dans les tissus cérébraux Alzheimer colorés, mais aussi dans la caractérisation des tissus frais non colorés. Le perfectionnement des techniques FT-Raman, micro-Raman et imagerie Raman (par addition des fibres optiques), ainsi que l'adaptation du matériel histologique adapté à l'appareillages spectroscopiques, assureront sans doute, un regain d'intérêt pour les spectroscopie vibrationnelles tant au niveau du laboratoire de recherche que dans le cadre d'une application directe dans le domaine biomédical, en vu des diagnostics spectroscopiques *in vivo de la MA mais aussi d'autres maladies*.

ANNEXES

ANNEXE I LA FIXATION**I PRINCIPE DE LA FIXATION**

La fixation permet de conserver les tissus dans un état aussi proche que possible de l'état vivant. Celle-ci doit aller plus loin que la simple préservation du tissu: elle doit lui permettre de résister à toutes les manipulations qu'il aura à subir subséquemment. Enfin, il est important de noter que la fixation est une étape critique de la préparation des tissus, puisqu'un tissu mal préservé ne peut être reconstruit. La fixation agit sur les molécules qui composent les tissus. Cette action a deux facettes qui, à certains égards, peuvent paraître contradictoires. La première est l'inactivation des molécules qui pourraient changer la morphologie tissulaire (par exemple, les enzymes). La seconde consiste en la préservation de l'intégrité chimique des tissus, ce qui permet de faire la relation entre leur morphologie et leur chimie; comme on le sait, la morphologie d'un tissu est fonction de sa constitution chimique. Cependant, la fixation des tissus s'accompagne d'une rétraction du tissu c'est à dire, d'une modification plus ou moins prononcée de son volume; on peut donc affirmer que les tissus, quel que soit le fixateur utilisé, arrivent toujours rétractés dans le bloc de paraffine. Par conséquent, cette rétraction peut rendre leur observation impossibles au microscope. La fixation modifie l'indice de réfraction des tissus, mais de manière non uniforme pour les divers éléments constitutifs, ce qui permet de distinguer certains détails structuraux même avant la coloration. Cependant, il est difficile de se faire une idée très précise de l'effet exact de chacun des agents fixateurs. Nous verrons les effets de la fixation sur les principales classes de molécules biologiques.

A) Fixation des protéines

La fixation des protéines est un aspect qu'on ne peut jamais négliger. D'une part, puisque les protéines sont importantes au point de vue de la structure (morphologie) des tissus vivants, il est essentiel de les conserver. D'autre part, comme les enzymes peuvent avoir des effets majeurs sur les tissus, en particulier sur le tissu nerveux, dont les neurones sont extrêmement sensibles à tout manque d'oxygène, est sujet à subir rapidement une autolyse après le prélèvement. Ces enzymes comprennent d'abord des protéinases capables de couper les chaînes protéiques en polypeptides. La fixation doit inactiver ces enzymes pour éviter la destruction des protéines du tissu qui,. Avant de parler des mécanismes de la

fixation des protéines, nous allons faire une mise au point sur l'état des protéines dans les tissus.

B) Fixation des lipides

La fixation des lipides est un problème complexe, du point de vue de la fixation, on peut rassembler les lipides en deux groupes: les lipides simples et les lipides complexes.

a) Les lipides simples

Les lipides simples se trouvent dans les tissus sous forme de gouttelettes, sont chimiquement libres, ils sont hydrophobes, ce qui rend leur solubilisation difficile dans l'eau, et dans le formol; et facile dans la plus part des autres solvants organiques, comme l'éthanol, le chloroforme, l'acide acétique, le carnoy et le toluène

b) Les lipides complexes

Dans le groupe des lipides complexes, on trouve les phospholipides qui sont particulièrement intéressants car, ils ont une "tête polaire" qui leur permet de se lier à des substances telles que les protéines ou l'eau. Ainsi, ils sont susceptibles d'être solubilisés au cours de la fixation, par contre, l'utilisation du formol et de sels, permet d'insolubiliser certains phospholipides. Le mécanisme supposé de cette préservation est l'addition de certains cations aux molécules lipidiques et leur participation subséquente à la formation de complexes avec les autres composants tissulaires.

C) Fixation des acides nucléiques

Le plus souvent, les acides nucléiques sont liés à des protéines (d'où l'appellation de nucléoprotéines), ce qui modifie leur comportement sur coupes. La fixation des protéines auxquelles ils sont attachés aide donc à leur préservation. Cette modification d'un composant des complexes protéines-acides nucléiques est susceptible d'agir également sur les groupes réactifs disponibles. Il semble que la fixation des protéines auxquelles ils ne sont pas liés favorise aussi leur conservation: les protéines ainsi fixées "emprisonnent" les acides nucléiques. L'agent qui est reconnu comme le plus efficace fixateur de nucléoprotéines est l'acide acétique. Il précipite les acides nucléiques, tant en solution que dans les tissus. En même temps, il brise progressivement les liens qui unissent les protéines basiques nucléaires aux fonctions phosphate des acides nucléiques, ce qui augmente la basophilie de ces derniers.

ANNEXE I LA FIXATION**I PRINCIPE DE LA FIXATION**

La fixation permet de conserver les tissus dans un état aussi proche que possible de l'état vivant. Celle-ci doit aller plus loin que la simple préservation du tissu: elle doit lui permettre de résister à toutes les manipulations qu'il aura à subir subséquemment. Enfin, il est important de noter que la fixation est une étape critique de la préparation des tissus, puisqu'un tissu mal préservé ne peut être reconstruit. La fixation agit sur les molécules qui composent les tissus. Cette action a deux facettes qui, à certains égards, peuvent paraître contradictoires. La première est l'inactivation des molécules qui pourraient changer la morphologie tissulaire (par exemple, les enzymes). La seconde consiste en la préservation de l'intégrité chimique des tissus, ce qui permet de faire la relation entre leur morphologie et leur chimie; comme on le sait, la morphologie d'un tissu est fonction de sa constitution chimique. Cependant, la fixation des tissus s'accompagne d'une rétraction du tissu c'est à dire, d'une modification plus ou moins prononcée de son volume; on peut donc affirmer que les tissus, quel que soit le fixateur utilisé, arrivent toujours rétractés dans le bloc de paraffine. Par conséquent, cette rétraction peut rendre leur observation impossibles au microscope. La fixation modifie l'indice de réfraction des tissus, mais de manière non uniforme pour les divers éléments constitutifs, ce qui permet de distinguer certains détails structuraux même avant la coloration. Cependant, il est difficile de se faire une idée très précise de l'effet exact de chacun des agents fixateurs. Nous verrons les effets de la fixation sur les principales classes de molécules biologiques.

A) Fixation des protéines

La fixation des protéines est un aspect qu'on ne peut jamais négliger. D'une part, puisque les protéines sont importantes au point de vue de la structure (morphologie) des tissus vivants, il est essentiel de les conserver. D'autre part, comme les enzymes peuvent avoir des effets majeurs sur les tissus, en particulier sur le tissu nerveux, dont les neurones sont extrêmement sensibles à tout manque d'oxygène, est sujet à subir rapidement une autolyse après le prélèvement. Ces enzymes comprennent d'abord des protéinases capables de couper les chaînes protéiques en polypeptides. La fixation doit inactiver ces enzymes pour éviter la destruction des protéines du tissu qui,. Avant de parler des mécanismes de la

fixation des protéines, nous allons faire une mise au point sur l'état des protéines dans les tissus.

B) Fixation des lipides

La fixation des lipides est un problème complexe, du point de vue de la fixation, on peut rassembler les lipides en deux groupes: les lipides simples et les lipides complexes.

a) Les lipides simples

Les lipides simples se trouvent dans les tissus sous forme de gouttelettes, sont chimiquement libres, ils sont hydrophobes, ce qui rend leur solubilisation difficile dans l'eau, et dans le formol; et facile dans la plus part des autres solvants organiques, comme l'éthanol, le chloroforme, l'acide acétique, le carnoy et le toluène

b) Les lipides complexes

Dans le groupe des lipides complexes, on trouve les phospholipides qui sont particulièrement intéressants car, ils ont une "tête polaire" qui leur permet de se lier à des substances telles que les protéines ou l'eau. Ainsi, ils sont susceptibles d'être solubilisés au cours de la fixation, par contre, l'utilisation du formol et de sels, permet d'insolubiliser certains phospholipides. Le mécanisme supposé de cette préservation est l'addition de certains cations aux molécules lipidiques et leur participation subséquente à la formation de complexes avec les autres composants tissulaires.

C) Fixation des acides nucléiques

Le plus souvent, les acides nucléiques sont liés à des protéines (d'où l'appellation de nucléoprotéines), ce qui modifie leur comportement sur coupes. La fixation des protéines auxquelles ils sont attachés aide donc à leur préservation. Cette modification d'un composant des complexes protéines-acides nucléiques est susceptible d'agir également sur les groupes réactifs disponibles. Il semble que la fixation des protéines auxquelles ils ne sont pas liés favorise aussi leur conservation: les protéines ainsi fixées "emprisonnent" les acides nucléiques. L'agent qui est reconnu comme le plus efficace fixateur de nucléoprotéines est l'acide acétique. Il précipite les acides nucléiques, tant en solution que dans les tissus. En même temps, il brise progressivement les liens qui unissent les protéines basiques nucléaires aux fonctions phosphate des acides nucléiques, ce qui augmente la basophilie de ces derniers.

D) Fixation des glucides

On peut considérer la fixation des glucides de deux points de vue, selon que l'on a affaire à des polysaccharides ou à des glycoprotéines.

a) Les polysaccharides

Le principal polysaccharide qui nous intéresse est le glycogène. Le glycogène peut se présenter sous deux formes: le glycogène libre ou lié à des protéines. Dans les tissus, la présence des molécules d'eau serait nécessaire à sa stabilité. La disparition de ces molécules d'eau par la chaleur ou des solvants tel l'éthanol, entraînerait une dénaturation du glycogène qui serait accompagnée d'une perte de solubilité (comme dans le cas des protéines). Il serait possible que le formol puisse induire la formation de ponts intermoléculaires dont l'apparition serait susceptible de modifier les propriétés de solubilité du glycogène.

b) Les glycoprotéines

La fixation des glycoprotéines par l'éthanol peut invoquer leur précipitation

II CLASSIFICATION DES AGENTS FIXATEURS

On peut essayer de classer les agents fixateurs de plusieurs façons. Cependant, à cause de la complexité des réactions qui sont en cause, chaque système est susceptible d'être critiqué.

* **Effet sur les protéines:** Comme nous l'avons déjà dit, la préservation des protéines est toujours un point essentiel de la fixation des tissus.

* **Caractère additif:** Le caractère additif touche également le mécanisme d'action des agents fixateurs.

* **Propriétés de tolérance:** Il est important de savoir, d'un point de vue pratique, si un agent fixateur est tolérant ou intolérant.

* **Nature chimique:** Il est difficile de retenir la nature chimique des agents comme critère de classification, puisque l'on peut souvent voir des agents chimiquement parents produire des effets très différents.

III PRINCIPAUX AGENTS FIXATEURS

Nous allons donc décrire les fixateurs que nous avons utilisés, de la façon la plus uniforme et la plus complète possible. Nous donnerons dans l'ordre, pour chaque agent fixateur, les informations suivantes:

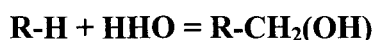
- * La formule chimiques;
- * La concentration à laquelle il est le plus souvent utilisé;
- * Les propriétés physiques;
- * Le mode d'action sur les protéines, les lipides, les acides nucléiques, et les glucides;
- * Les traitements de post-fixation

A) Le formol ou formaldéhyde (HCHO)

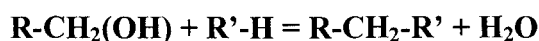
Le formaldéhyde est un gaz incolore et inflammable que l'on achète en solution aqueuse (40 %). La solution commerciale contenant 40 % de formaldéhyde est appelée formol; on la considère comme du formol à 100 % dans la fixation des tissus. On l'utilise en solution aqueuse à 10 % (4 % de formaldéhyde).

Le formaldéhyde a une tendance marquée à la polymérisation; on donne à sa forme hautement polymérisée, le nom de paraformaldéhyde (ou polyoxyméthylène). Le parapormaldéhyde se présente sous la forme d'un précipité blanc, et sa formation est favorisée lorsque les solutions sont concentrées. Les solutions commerciales contiennent 15 à 20% de méthanol (qui sert à empêcher la polymérisation). Le formol, dans ses solutions aqueuses, a fortement tendance à se lier à des molécules d'eau pour former de méthylèneglycol: $\text{CH}_2(\text{OH})_2$. Le paraformaldéhyde, qui a la même tendance, constitue des polyoxyméthylèneglycols de formol $\text{HO}(\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$.

Le formol, comme tous les aldéhydes, va former des composés d'addition qui constituent des liens entre les chaînes protéiques. Les types de liens formés et des radicaux impliqués sont multiples; le mécanisme de formation des plus connus de ces liens: les ponts méthylène. Premièrement, il a constitution d'un groupement hydroxyméthylé:



Ce groupe est instable et réagit rapidement avec un autre groupe réactif pour constituer un pont méthylène:



Ces ponts méthylène peuvent être formés entre plusieurs types de radicaux qu'on trouve sur les protéines. Les nucléoprotéines sont bien préservées par le formaldéhyde, bien

qu'une certaine proportion des acides nucléiques soit extraite. Le formol fixe aussi certains phospholipides, et n'exerce aucun effet sur les glucides.

B) Le Carnoy

Le carnoy est un fixateur composé de trois solvants :

- * Ethanol absolu: 60 ml;
- * Chloroforme: 30 ml;
- * Acide acétique pur: 10 ml;

Une des caractéristique principale du carnoy est sa rapidité à fixer. Notons , également, que ce fixateur amorce la déshydratation, il dissout les lipides et la myéline; il semble fixer les glucides, par contre, il ne fixe pas les protéines car, il en solubilise ,et dénature certaines

C) L'acide acétique (CH_3COOH):

L'acide acétique utilisé habituellement en solution à 5 %, il ne semble pas fixer les protéines. Par contre, il paraît briser certains liens qui retiennent les chaînes protéiques les unes aux autres, ce qui favorise la prise de molécules d'eau . Il n'exerce aucun effet sur les glucides, il dissout certains lipides et il précipite les nucléoprotéines et l'ADN. On utilise jamais l'acide acétique seul, à titre d'agent fixateur car, il ne préserve pas bien les tissus, par contre, on l'incorpore à des mélanges à cause de sa tolérance.

D) L'éthanol

L'éthanol, lorsqu'on l'utilise seul en tant que fixateur, on doit maintenir la concentration à plus que 80 %. L'éthanol ne constitue pas un bon fixateur des lipides, de plus, il en dissout un certain nombre, le plus souvent, on l'utilise jamais seul pour fixer les tissus, mais associé à d'autres fixateurs tel que le carnoy.

E) Chloroforme (CHCl_3)

Le chloroforme est un solvant coûteux et volatil. Il est tolérant, mais son action est relativement lente. Il n'est pas inflammable et son indice de réfraction n'entraîne aucun éclaircissement des tissus. Sa densité est élevée, ce qui le rend plus difficile à manipuler en grandes quantités; de plus, les tissus ont tendance à y flotter au début de éclaircissement. Il est toxique lorsqu'il est ingéré, et narcotique si on respire les vapeurs.

ANNEXE II.2 TECHNIQUES SPECTROMETRIQUES UTILISEES

I UV-VISIBLE

Le principe de cette loi est décrit ci-dessous:

La proportion de lumière absorbée ($I-dI$) par l'échantillon est indépendante de la lumière incidente (I), la proportion absorbée est donc:

$$\begin{aligned} -dI &= k I dL \\ -dI / I &= k dL \\ -\int_{I_0}^{I_s} \frac{dI}{I} &= \int_0^L k dL \quad \text{d'où} \quad \ln I_0 / I_s = k L \end{aligned} \quad (1)$$

De plus, un photon n'est absorbé par l'échantillon que lorsqu'il entre en collision avec l'une de ses molécules. La probabilité de collision dépend du nombre de molécules, par conséquent de la concentration.

$$\begin{aligned} k &= \epsilon c \quad (2) \\ (1) \text{ et } (2) \quad D &= \ln I_0 / I_s = \epsilon c L \end{aligned}$$

Avec ϵ : coefficient d'extinction molaire (l / mol cm)
 c : concentration (mole / l)
 D : densité optique
 l : largeur de la cuve (cm)

La concentration de la solution est peu à peu augmentée et l'intensité des pics observés est noté. Si la loi de Beer-Lambert est effectivement vérifiée, nous devrions obtenir une droite ou plusieurs droites selon le nombre de pics observés dans la gamme étudiée. Pour cela, il sera nécessaire de tracer la courbe représentant l'intensité des pics en fonction de la concentration. La pente correspond alors à ϵ .

II SPECTROMETRIES VIBRATIONNELLES

Les spectrométries vibrationnelles (Raman et infrarouge) donnent accès aux vibrations de la molécule étudiée car elles permettent de travailler aussi bien en solution qu'à l'état solide. Les spectres obtenus par ces techniques contiennent de nombreuses informations structurales.

Que ce soit en Raman ou en infrarouge, dans un spectre, la position d'une bande correspondant à une vibration de fréquence ν est repérée par son nombre d'onde ν exprimé en cm^{-1} sachant que $\nu = v/c$ (c = vitesse de la lumière).

Vibrations moléculaires

Une molécule n'est jamais rigide. Les vibrations dépendent de la nature chimique de l'édifice (paramètres valenciels) et de sa forme (structure). Ces mouvements de **déformations élémentaires** sont classés suivant leur nature et notés de la façon suivante:

élongation	(stretching)	noté	ν
déformation	(bending)	noté	δ
tortion	(tortion)	noté	τ
balancement hors du plan	(wagging)	noté	ω
torsion angulaire	(twisting)	noté	t
balancement plan	(rocking)	noté	r

Ces mouvements élémentaires se combinent pour donner lieu aux **vibrations moléculaires** qui sont beaucoup plus complexes. Par exemple: ν_s élongation symétrique, ν_{as} élongation antisymétrique, etc...

Pour une molécule polyatomique non linéaire comportant N atomes, il existe en général $3N-6$ modes normaux de vibrations. Un mode normal propre a une **fréquence caractéristique** ν_i , qui dépend à la fois de l'architecture de la molécule et des atomes impliqués. A ce mode correspond une valeur particulière de l'énergie de la molécule, et ainsi, à chaque mode de vibration, correspond **un niveau d'énergie discret** repéré par son **nombre quantique de vibration** V_i (Figure A).

C'est surtout la géométrie locale qui influence la fréquence d'une vibration. Ainsi, si un motif est répété plusieurs fois au sein du même édifice atomique, chacun de ces groupements vibrera sensiblement de la même façon, se sont les **fréquences de groupe**.

Lorsqu'on éclaire un échantillon par une lumière monochromatique (**laser**) de fréquence ν_0 , cette lumière est à la fois transmise, absorbée et diffusée (Figure A). Pour la majorité des photons diffusés, la diffusion est élastique:

Les photons qui constituent cette lumière diffusée ont pour la plupart la même fréquence que la lumière excitatrice soit $\nu_d = \nu_0$, c'est la **diffusion Raleigh**. Un très petit

nombre de photons voient au contraire leur fréquence varier ($\nu_d \neq \nu_0$), il s'agit de la **diffusion Raman**:

- * si $\nu_d < \nu_0$, on parle de **diffusion Raman Stokes**,
- * si $\nu_d > \nu_0$, on parle de **diffusion Raman anti-Stokes**.

Les écarts entre ν_d et ν_0 ne dépendent pas de la radiation excitatrice, mais sont caractéristiques des fréquences de vibration des molécules de l'échantillon étudié.

La **diffusion Raman** peut s'interpréter comme une **diffusion inélastique des photons** par la matière (Figure A).

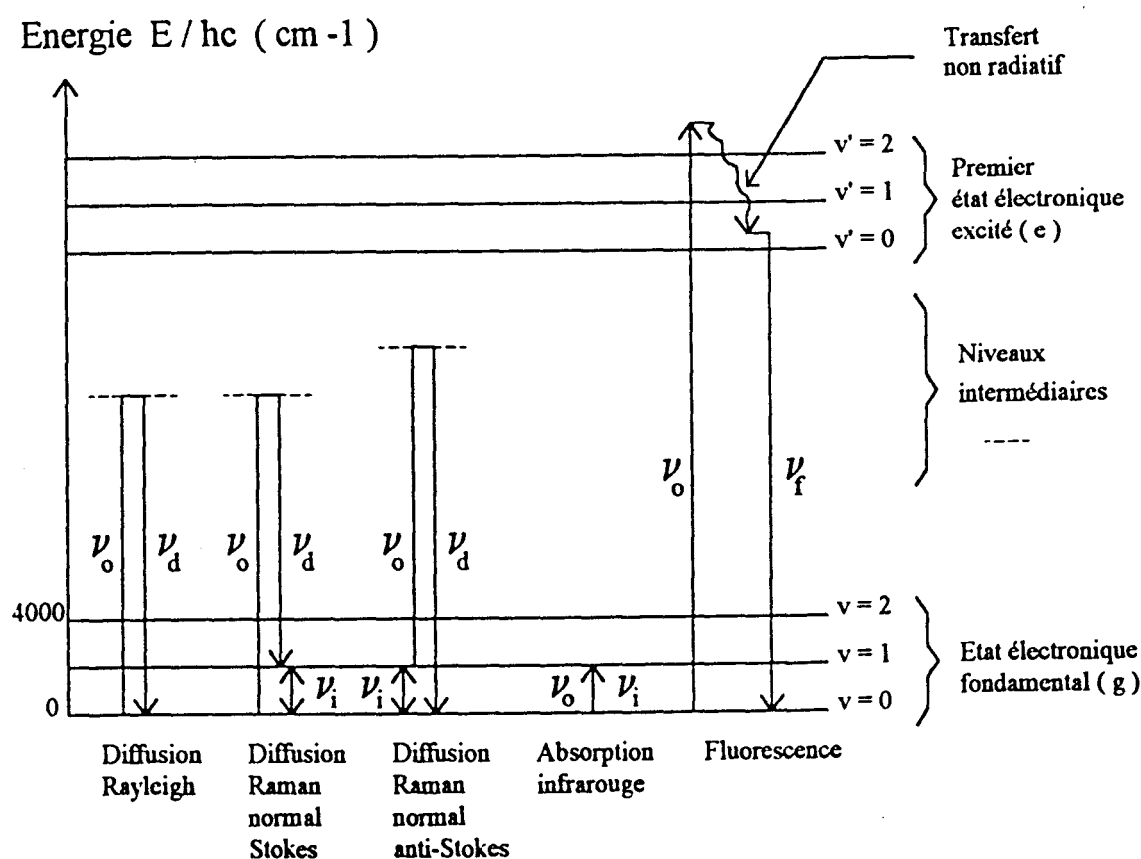


Figure A: Transitions moléculaires intervenant dans les phénomènes de diffusion Raleigh, diffusion Raman, absorption infrarouge et fluorescence.

D'après les **règles de sélection Raman**, seuls les modes de vibrations qui entraînent une **variation de la polarisabilité** $[\alpha]$ de la molécule seront actifs et donc observables en spectroscopie Raman. La polarisabilité étant la faculté de déformation du nuage des charges constituant la molécule sous l'influence d'un champ électrique.

Il existe plusieurs types de diffusion Raman: le **Raman de pré-résonance** et le **Raman de résonance**. Ces phénomènes s'observent quand la radiation excitatrice du laser exciteur, qui permet d'obtenir le spectre Raman, correspond à une longueur d'onde de forte absorption d'un chromophore de l'échantillon. Les vibrations exaltées sont celles des groupements d'atomes (chromophores) dont les vibrations électroniques sont responsables de l'absorption. Cette technique permet donc d'envisager l'obtention du spectre vibrationnel d'un chromophore particulier lorsque celui-ci fait partie d'une molécule complexe ou d'un mélange complexe d'autres molécules.

Quand une molécule absorbe un photon $h\nu_0$, il peut arriver que celle-ci soit portée sur le premier état électronique excité. Après une émission non-radiative, la molécule se retrouve sur son état fondamental en émettant un photon $h\nu_f$ (Figure A). Ce processus, appelé **fluorescence**, donne naissance, quand il existe, à un rayonnement parasite beaucoup plus intense que l'effet Raman et masque souvent complètement ce dernier.

Une excitation utilisant une source émettant dans l'infrarouge (IR) permet de s'affranchir de ce phénomène, car les photons dans cette région sont peu énergétiques pour permettre une excitation de la molécule. L'intensité des bandes Raman étant proportionnelles à $(\nu_0 - \nu_i)^4$, le spectre de diffusion est alors bien moins intense. Cette méthode s'est avérée très efficace pour la caractérisation du tissu et des protéines que nous avons étudié.

