

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

UFR DE BIOLOGIE

Année: 1998

Numéro d'ordre:

Thèse de Sciences de la Vie et de la santé

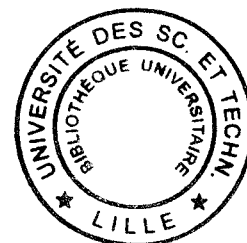
présentée à l'Université de Lille I

pour l'obtention du grade de

Docteur en Biochimie

par

Laetitia WALLOIS-DUPONT



**ETUDE DES CELLULES DE NEUROBLASTOMES HUMAINS,
LES SKNSH-SY 5Y ET KELLY, COMME MODELES POTENTIELS
DE DEGENERESCENCE NEUROFIBRILLAIRE:
1- MISE EN EVIDENCE DE LA SYNTHESE DE L'APOLIPOPROTEINE E
ET CARACTERISATION DES TRANSCRITS DE TAU;
2- ETUDE DE LA PHOSPHORYLATION DES PROTEINES TAU
ENDOGENES OU TRANSFECTEES.**

présentée le 30 Janvier 1998 devant le jury composé de:

Président de jury: Monsieur le Professeur André Verbert

**Rapporteurs: Madame le Docteur Marie-Madeleine Portier
Monsieur le Professeur Jean-Pierre Brion**

**Examineurs: Monsieur le Docteur Jean-Claude Beauvillain
Monsieur le Docteur André Delacourte**

Directeur de thèse: Madame le Docteur Marie-Laure Caillet

A Hugh, patient, attentif à tous ces instants difficiles

A mes parents

A Karine

A mes grands-mères et grands pères

A toute ma famille

Ce travail a débuté dans l'unité INSERM 156 (directeur: Monsieur le Pr. Mazzuca) et s'est achevé dans l'unité l'unité INSERM 422 (Directeur: Monsieur le Dr. Beauvillain), au sein du groupe « Vieillissement Cérébral et Dégénérescence du Neurone » dirigé par Monsieur le Dr. Delacourte.

J'exprime tous mes remerciements à:

Monsieur le Professeur André Verbert. Je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté malgré vos nombreuses occupations et responsabilité de présider cette thèse.

Madame le Docteur Marie-Madeleine Portier. Votre disponibilité, vos précieux conseils, notre discussion scientifique et le climat de confiance que vous avez instauré dès notre première rencontre m'ont particulièrement touché. Je vous en suis très reconnaissante et vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail.

Monsieur le Professeur Jean-Pierre Brion. Votre renommée internationale et vos compétences scientifiques me rendent votre avis très précieux. Je tiens à vous remercier très sincèrement d'avoir accepté d'emblé de juger ce travail.

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

Monsieur le Docteur André Delacourte. J'espère ne pas faillir à la confiance que vous m'avez accordée en m'accueillant dans votre laboratoire et en me permettant d'effectuer ce travail de recherche. Par des réunions bibliographiques, vous avez su stimuler puis entretenir notre esprit de synthèse dans ce domaine de recherche très vaste. Que ce manuscrit soit le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Madame le Docteur Marie-Laure Caillet. Je te remercie pour ta disponibilité et ton soutien dans les moments difficiles et pour m'avoir guidée et supportée tout au long de ces 4 années de thèse.

Je te suis particulièrement reconnaissante pour ton efficacité et tes remarques constructives lors de la rédaction de ce manuscrit.

Mes remerciements s'adressent également à:

Madame Annick Wattez. Je te suis reconnaissante pour m'avoir initié à la culture cellulaire, pierre de l'édifice indispensable à la mise en place de ce travail. Je te remercie pour ta gentillesse et ta promptitude à proposer ton aide et tes connaissances.

Madame le Docteur Marie-Christine Chartier-Harlin et Monsieur le Docteur Luc Buée pour leurs précieux conseils.

Madame le Docteur Marie-Henriette Loucheux, Monsieur le Docteur Bernard Bailleul et toute l'équipe de l'unité INSERM 124 qui m'ont accueilli lors de mon DEA. Mes remerciements s'adressent particulièrement à Monsieur le Docteur Claude Cocquerelle et l'équipe de Monsieur le Docteur Jean-Claude D'Halluin pour leur assistance humaine et technique au cours de ces années.

Cathia, pour son soutien moral, sa chaleur, son amitié et sa complicité.

Olga et Virginie qui m'ont soutenu moralement, notamment lors de nos déjeuners hebdomadaires.

Didier, pour sa gentillesse et son éternel empressement à rendre service particulièrement appréciés lors des soirées interminables devant l'écran d'ordinateur.

Je voudrais également remercier, Christel, Marie-Jöelle, Valérie, Nicolas, Thierry et tous les membres de l'unité INSERM 422 pour leur soutien et leur gentillesse qu'ils m'ont témoigné.

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

LISTE DE PUBLICATIONS

Publiées

- 1- Sautière P.-E., Wallois L., Caillet-Boudin M.-L., Watzet A., Cocquerelle C., Bailleul B. et Delacourte A. (1994): Un modèle cellulaire pour l'étude de la formation des protéines tau pathologiques de type Alzheimer. Actualités sur la maladie d'Alzheimer et les syndromes apparentés. Eds Poncet M, Michel B, Nieoullon A. SOLAL, pp. 171-174 (Marseille, France).
- 2- Dupont-Wallois L., Sautière P.-E., Cocquerelle C., Bailleul B., Delacourte A. and Caillet-Boudin M.-L. (1995): Shift from fetal-type to Alzheimer-type phosphorylated tau proteins in SKNSH-SY 5Y cells treated with okadaic acid. FEBS Letters 357: 197-201.
- 3- Dupont-Wallois L., Soulié C., Sergeant N., Wavrant-de Vrieze F., Chartier-Harlin M.-C., Delacourte A. and Caillet M.-L. (1997): Apo E synthesis in human neuroblastoma cells. Neurobiology of Disease: sous presse.

Soumises

- 1- Soulié C., Dupont-Wallois L., Mitchell V., Chartier-Harlin M.-C., Beauvillain J.C., Delacourte A. and Caillet-Boudin M.-L.: Variation of apolipoprotéine E during neuronal differentiation of human SKNSH-SY 5Y neuroblastoma cells: soumise.
- 2- Dupont-Wallois L., Delacourte A. et Caillet-Boudin M.L.: Etude de la phosphorylation des protéines tau après transfection des cellules de neuroblastome humain par l'ADNc de l'isoforme la plus longue: soumise. Eds Poncet M, Michel B, Nieoullon A. SOLAL, (Montpellier, France).
- 3- Dupont-Wallois L., Sergeant N., Goedert M., Delacourte A. and Caillet-Boudin M.-L.: Expression, phosphorylation and hyperphosphorylation of tau proteins in human neuroblastoma cells: study of endogenous tau and transfected longest tau isoform: soumise.
- 4- Caillet-Boudin M.-L., Dupont-Wallois L. and Delacourte A.: Apo E synthesis and tau phosphorylation in human neuroblastoma cells: soumise.

LISTE DE COMMUNICATIONS

Orale

Caillet-Boudin M.-L., Dupont-Wallois L., Soulié C. et Delacourte A. Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire. **Colloque du groupe thématique "Phosphorylation des protéines"**, 9-11 Juin 1996 (Dourdan, France).

Affichées

- 1- Sautière P.E., Wallois L., Caillet-Boudin M.L., Watez A., Cocquerelle C., Bailleul B. et Delacourte A. **II ème Réunion Francophone sur la maladie d'Alzheimer et les syndromes apparentés**, 26-27 Novembre 1993 (Marseille, France).
- 2- Sautière P.-E., Wallois L., Cocquerelle C., Bailleul B., Watez A., Delacourte A. and Caillet-Boudin M.-L. (1994). Alzheimer's disease: lessons from cell biology. **Colloque médecine et recherche, Fondation IPSEN**, 25 Avril 1994 (Paris, France)
- 3- Wallois L., Sautière P.E., Delacourte A. and Caillet-Boudin M.-L. **Third Lille Neurosciences Workshop**, 20-21 Octobre 1994 (Lille, France).
- 4- Dupont-Wallois L., Soulié C., Pérez-Tur J., Chartier-Harlin M.-C., Lépagnot J., Delacourte A. et Caillet-Boudin M.-L. **III ème Réunion Francophone sur la maladie d'Alzheimer et les syndromes apparentés**, 13-14 Octobre 1995 (Lille, France).
- 5- Soulié C., Dupont-Wallois L., Pérez-Tur J., Chartier-Harlin M.-C., Lépagnot J., Delacourte A. and Caillet-Boudin M.-L. **Society for Neuroscience**, 11-16 Novembre 1995 (San Diego, Californie, Etats Unis).
- 6- Dupont-Wallois L., Soulié C, Delacourte A., Vermersch P., Chartier-Harlin M.-C. and Caillet-Boudin M.-L. **Society for Neuroscience**, Novembre 1996 (Washington, Etats Unis).
- 7- Buée L., Mailliot C., Dupont-Wallois L., Caillet M.-L., Buée-Scherrer V., Pérez-Tur J., Duff K., Goedert M. et Delacourte A. **Colloque médecine et recherche, Fondation IPSEN**, avril 1997 (Paris, France)
- 8- Dupont-Wallois L., Soulié C., Sergeant N., Delacourte A., Caillet-Boudin M.-L.: Etude de la phosphorylation des protéines tau après transfection des cellules de neuroblastome humain par l'isoforme la plus longue. **Réunion Francophone sur la maladie d'Alzheimer et les syndromes apparentés**, Octobre 1997 (Montpellier, France).

TABLE DES
MATIERES

GENERALITES	14
I LA MALADIE D'ALZHEIMER.....	16
I- 1- LA DEMENCE DE TYPE ALZHEIMER.....	16
I- 2- HETEROGENEITE DE LA MALADIE.....	17
I- 2- 1- <i>Hétérogénéité clinique</i>	17
I- 2- 1- 1- Les troubles cognitifs	17
I- 2- 1- 2- Les troubles comportementaux	18
I- 2- 1- 3- Les troubles neurologiques	19
I- 2- 2- <i>Hétérogénéité génétique</i>	19
I- 2- 2- 1- Chromosome 21	19
I- 2- 2- 2- Chromosome 14.....	20
I- 2- 2- 3- Chromosome 1	21
I- 2- 2- 4- Chromosome 12.....	21
I- 2- 2- 5- Conclusion	22
I- 3- LES FACTEURS DE RISQUE.....	22
I- 4- DESCRIPTION DES ALTERATIONS PRESENTES DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER.....	24
I- 4- 1- <i>Altération au niveau neuropathologique</i>	24
I- 4- 1- 1- L'atrophie cérébrale	24
I- 4- 1- 1- 1- Aspect macroscopique	24
I- 4- 1- 1- 2- Aspect microscopique.....	24
I- 4- 1- 2- Les lésions histologiques.....	25
I- 4- 1- 2- 1- Les plaques séniles	25
I- 4- 1- 2- 1- 1- Description	25
I- 4- 1- 2- 1- 2- Composition	26
I- 4- 1- 2- 1- 3- Distribution topographique.....	27
I- 4- 1- 2- 2- La dégénérescence neurofibrillaire.....	28
I- 4- 1- 2- 2- 1- Description	28
I- 4- 1- 2- 2- 2- Composition	29
I- 4- 1- 2- 2- 3- Distribution topographique.....	30
I- 4- 1- 2- 2- 4- Evolution au cours du temps.....	30
I- 4- 1- 2- 2- 5- Conclusion	32
I- 4- 1- 2- 3- Les plaques AMY.....	33
I- 4- 2- <i>La réaction gliale</i>	33
I- 4- 3- <i>La réaction immunitaire</i>	34
I- 4- 4- <i>Anomalies vasculaires</i>	34
I- 4- 5- <i>Altération neurochimique</i>	35
II- ETUDE DU PEPTIDE AMYLOIDE, PRINCIPAL CONSTITUANT DES PLAQUES SENILES.....	38
II- 1- DESCRIPTION DU PEPTIDE A β	38
II- 1- 1- <i>Modification de la région carboxy-terminale</i>	38
II- 1- 2- <i>Modification de la région amino-terminale</i>	39
II- 1- 3- <i>Structure du peptide Aβ</i>	39
II- 2- METABOLISME DE L'A β	39
II- 2- 1- <i>Structure du gène de l'APP</i>	40
II- 2- 2- <i>Distribution tissulaire de l'APP</i>	41
II- 2- 3- <i>Métabolisme de l'APP</i>	42
II- 2- 3- 1- Voies de synthèse de l'APP.....	42
II- 2- 3- 1- 1- Voie métabolique utilisant l'a-sécrétase	43
II- 2- 3- 1- 1- 1- Principe.....	43
II- 2- 3- 1- 1- 2- Enzymes candidates.....	44
II- 2- 3- 1- 2- Voie métabolique utilisant la β -sécrétase.....	44
II- 2- 3- 1- 2- 1- Principe.....	44
II- 2- 3- 1- 2- 2- Enzymes candidates.....	45
II- 2- 3- 1- 2- 3- Localisation cellulaire de cette activité enzymatique	45
II- 2- 3- 1- 3- Clivage par la g-sécrétase	47
II- 2- 3- 1- 3- 1- Principe.....	47
II- 2- 3- 1- 3- 2- Enzymes candidates.....	47

II- 2- 3- 2- Localisation des voies de synthèse	48
II- 2- 3- 3- Régulation du métabolisme de l'APP	49
II- 2- 4- Fonctions de l'APP	51
II- 3- FONCTION DU PEPTIDE AMYLOÏDE	52
II- 4- COMPOSES SE LIANT AU PEPTIDE A β	54
II- 4- 1- Les protéoglycannes	54
II- 4- 2- L'apolipoprotéine E (apo E)	55
II- 5- LES FRAGMENTS AMYLOÏDOGENIQUES CARBOXY-TERMINAUX	57
III- LES PROTÉINES TAU	59
III- 1- STRUCTURE DU GENE	59
III- 1- 1- Promoteur	59
III- 1- 2- Les régions codantes du gène tau	61
III- 2- LES DIFFÉRENTS TRANSCRITS	62
III- 2- 1- Les transcrits de 6 kb	62
III- 2- 2- Les transcrits de 2 kb	63
III- 2- 3- Les transcrits de 8 kb	64
III- 3- STRUCTURE DES PROTÉINES TAU ET LEUR EXPRESSION	64
III- 3- 1- Protéines tau de bas poids moléculaire	64
III- 3- 1- 1- Partie amino-terminale	65
III- 3- 1- 2- Partie centrale	66
III- 3- 1- 3- Partie carboxy-terminale	66
III- 3- 2- Protéines tau de haut poids moléculaire	68
III- 4- FONCTIONS DES PROTÉINES TAU	69
III- 4- 1- Intéraction avec les microtubules	69
III- 4- 2- Implication des protéines tau sur la polymérisation des microtubules	71
III- 4- 3- Régions des protéines tau impliquées dans les fonctions des protéines tau ..	73
III- 4- 3- 1- Le domaine amino-terminal ou domaine de projection	74
III- 4- 3- 2- Le domaine carboxy-terminal ou domaine d'assemblage	75
III- 4- 4- Région de la tubuline impliquée dans la liaison aux protéines tau	78
III- 5- RÔLE DE LA PHOSPHORYLATION DES PROTÉINES TAU	79
III- 5- 1- Les protéines tau sont des protéines phosphorylées	79
III- 5- 2- Activités kinasiques potentiellement impliquées	81
III- 5- 2- 1- les PDPK	81
III- 5- 2- 2- Les non-PDPK	82
III- 5- 3- Activité phosphatasique potentiellement impliquée dans la	
déphosphorylation des protéines tau	85
III- 5- 3- 1- Protéine phosphatase 1 ou PP1	86
III- 5- 3- 2- Protéine phosphatase 2A ou PP2A	86
III- 5- 3- 3- Protéine phosphatase 2B ou PP2B	87
III- 5- 4- Régulation de la phosphorylation	88
III- 5- 5- Implication de la phosphorylation sur les fonctions et le métabolisme	
des protéines tau	91
III- 6- LES AUTRES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES	92
III- 7- LOCALISATION DES PROTÉINES TAU	93
III- 7- 1- Dans les cellules de type neuronal	93
III- 7- 1- 1- Les protéines tau sont principalement localisées dans l'axone	93
III- 7- 1- 2- La phosphorylation intervient dans la compartimentation	
des protéines tau	95
III- 7- 2- Dans des cellules non neuronales	96
III- 8- PROTÉINES TAU ET MALADIE D'ALZHEIMER	97
III- 8- 1- Structure des PHFs et agencement des tau au sein de ces structures	97
III- 8- 1- 1- Ultra-Structure des PHFs	97
III- 8- 1- 2- Agencement des tau au sein des PHFs	98
III- 7- 1- 3- Présence de tels enchevêtrements dans d'autres démences	100
III- 8- 2- Phosphorylation des protéines tau-PHF	100
III- 8- 2- 1- Analyse de la phosphorylation des protéines tau-PHF	100
III- 8- 2- 2- Correspondance entre les bandes du triplet et les six isoformes	
des protéines tau	102
III- 8- 2- 3- Altération des fonctions des protéines tau-PHF	102
III- 8- 2- 4- Analyse des sites phosphorylés sur les protéines tau-PHF	103
III- 8- 2- 5- Recherche des kinases impliquées dans la phosphorylation	
des protéines tau-PHF	105

III- 8- 2- 6- Recherche des protéines phosphatases impliquées dans l'hyperphosphorylation des protéines tau-PHF	108
III- 8- 3- <i>Autres modifications</i>	110
III- 8- 3- 1- Glycosylation	110
III- 8- 3- 2- Glycation	110
III- 8- 3- 3- Ubiquitination.....	112
III- 8- 4- <i>Les protéines associées aux PHFs</i>	113
III- 8- 4- 1- L'apolipoprotéine E	113
III- 8- 4- 2- Les protéines de choc thermique ou hsp:	116
III- 8- 4- 3- l'héparine et les glycosaminoglycannes:.....	116
III- 8- 4- 4- L'aluminium:.....	116
III- 8- 4- 5- Glycolipides:.....	116
III- 8- 4- 5- La transglutaminase tissulaire :	117
III- 8- 5- <i>Assemblage in vitro des protéines tau en structure ressemblant aux filaments trouvés dans la MA</i>	118
CONCLUSION:	121

RESULTATS

CHAPITRE I	123
INTRODUCTION	124
I- EXPRESSION DE L'APOLIPOPROTEINE E PAR LES CELLULES DE NEUROBLASTOMES HUMAINS: LES CELLULES SKNSH-SY 5Y (SY 5Y) ET LES KELLY (ANNEXES 1 ET 2).....	126
I- 1- PRESENCE INTRACELLULAIRE DE L'APO E	126
I- 2- RECHERCHE DES TRANSCRITS APO E DANS LES DEUX LIGNEES CELLULAIRES.....	127
I- 3- CONFIRMATION DU TYPE NEURONAL DES DEUX LIGNEES CELLULAIRES	127
II- EXPRESSION DES PROTEINES TAU PAR CES DEUX LIGNEES CELLULAIRES (ANNEXES 3 ET 4)	128
II- 1- RECHERCHE DES PROTEINES TAU CELLULAIRES (ANNEXE 3)	128
II- 2- RECHERCHE DES TRANSCRITS TAU CELLULAIRES	129
II- 2- 1 <i>Recherche des exons épissés de manière alternative dans le système nerveux central (Annexe 4)</i>	<i>129</i>
II- 2- 2- <i>Recherche de l'expression éventuelle des exons spécifiques du système nerveux périphérique.....</i>	<i>129</i>
II- 2- 2- 1- L'exon 4A.....	130
II- 2- 2- 2- Exon 6	130
II-3- ACTION DES DEUX AGENTS DIFFERENCIATEURS SUR LES CELLULES SY 5Y	131
II- 3- 1- <i>Action du NGF et de l'acide rétinoïque sur la morphologie des cellules SY 5Y.....</i>	<i>131</i>
II- 3- 2- <i>Action de ces deux agents différenciateurs sur l'expression des isoformes des protéines tau dans les cellules SY 5Y.....</i>	<i>131</i>
DISCUSSION	133

I- ETUDE DE LA PHOSPHORYLATION ET DE L'HYPERPHOSPHORYLATION DES PROTEINES TAU CELLULAIRES AVANT ET APRES TRAITEMENT DES CELLULES PAR L'ACIDE OKADAÏQUE (ANNEXES 3) 140

I- 1- ANALYSE PAR LA TECHNIQUE DES IMMUNOEMPREINTES140
I- 1- 1- Analyse de l'état phosphorylé des protéines tau cellulaires des cellules natives 140
I- 1- 2- Analyse de l'état hyperphosphorylé des protéines tau cellulaires après traitement des cellules par l'acide okadaïque141

I- 2- RECHERCHE D'UNE MODIFICATION DE L'EXPRESSION DES TRANSCRITS TAU SYNTHETISES PAR LES CELLULES KELLY APRES TRAITEMENT PAR L'AO (ANNEXE 3).....143

I- 3- ACTION DU TRAITEMENT PAR L'ACIDE OKADAÏQUE SUR LA MORPHOLOGIE DES CELLULES SY 5Y.....143

II- ETUDE DE L'EXPRESSION DE L'ISOFORME TAU441 APRES TRANSFECTION TRANSITOIRE DANS LES CELLULES SY 5Y ET DANS LES CELLULES KELLY (ANNEXE 4)..... 144

II- 1- PREPARATION DU VECTEUR EUCARYOTIQUE144

II- 2- METHODE DE TRANSFECTION EMPLOYEE: LA LIPOFECTION145

II- 3- OPTIMISATION DES PARAMETRES DE TRANSFECTION POUR CHACUNE DES LIGNEES CELLULAIRES145

II- 3- 1- Les cellules Kelly145

II- 3- 2- Les cellules SY5Y.....147

III- ETUDE DE LA PHOSPHORYLATION ET DE L'HYPERPHOSPHORYLATION APRES TRAITEMENT PAR L'ACIDE OKADAÏQUE DES PROTEINES TAU441 ET DES PROTEINES TAU NATIVES (ANNEXE 4) 148

III- 1- ANALYSE PAR ELECTROPHORESE MONO-DIMENSIONNELLE (ANNEXE 4).....148

III- 2- ANALYSE PAR ELECTROPHORESE BI-DIMENSIONNELLE (ANNEXE 4).....149

IV- ETUDE DE L'ISOFORME TAU441 EXPRIMEE DE MANIERE STABLE DANS LES CELLULES KELLY..... 150

IV-1- SELECTION DE CLONES EXPRIMANT DE MANIERE STABLE L'ISOFORME LA PLUS LONGUE ... 150

IV- 2- COMPARAISON DU PROFIL ELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES TAU EXPRIMEES PAR LES CLONES SELECTIONNES151

IV- 2- 1- Avant traitement des clones par l'acide okadaïque151

IV- 2- 2- Analyse après traitement des clones par l'acide okadaïque.....152

V- ETUDE DES PROTEINES TAU EXPRIMEES DANS LE CLONE 16 153

V- 1- ANALYSE DES SITES PHOSPHORYLES SUR LES PROTEINES TAU ENDOGENES ET TAU441 AU SEIN DU CLONE 16 AVANT ET APRES TRAITEMENT PAR L'ACIDE OKADAÏQUE.....153

V- 1- 1- Avant traitement des cellules par l'acide okadaïque (AO)153

V- 1- 2- Après traitement par l'acide okadaïque154

V- 2- ETUDE DE LA DEPHOSPHORYLATION DES PROTEINES TAU CELLULAIRES PAR LES PROTEINES PHOSPHATASES ENDOGENES.....155

V- 3- ANALYSE DE LA LOCALISATION CELLULAIRE DES PROTEINES TAU441 DANS LES CELLULES DU CLONE 16.....159

V- 3- 1- Par fractionnement cellulaire.....159

V- 3- 2- Par immunofluorescence.....161

V- 4- ANALYSE DE LA SOLUBILITE DES PROTEINES TAU AVANT ET APRES TRAITEMENT DES CELLULES PAR L'ACIDE OKADAÏQUE.....162

V- 4- 1- Analyse de la solubilité des protéines tau cellulaires avant traitement par l'acide okadaïque.....162

V- 4- 2- Analyse de la solubilité des protéines tau cellulaires après traitement par l'acide okadaïque164

MATERIELS ET METHODES

I- BIOLOGIE MOLECULAIRE	192
I- 1- ANALYSE DES TRANSCRITS DE TAU, APO E ET GFAP, EXPRIMES PAR LES CELLULES DE NEUROBLASTOMES HUMAINS, LES CELLULES SY 5Y ET LES CELLULES KELLY:.....	192
I- 1- 1- <i>Extraction de l'ARN total</i>	192
I- 1- 1- 1- Méthode d'extraction au RNazol B.....	192
I- 1- 1- 2- Stockage de l'ARN total.....	193
I- 1- 2- <i>Amplification et analyse de régions spécifiques des différents ARNm par RT-PCR</i>	193
I- 1- 2- 1- Séquences des oligonucléotides de synthèse.....	193
I- 1- 2- 2- Obtention de l'ADN complémentaire (ADNc)	193
I- 1- 2- 3- Réaction de PCR	194
I- 1- 2- 4- Digestion par les enzymes de restriction.....	195
I- 1- 2- 5- Analyse des produits amplifiés, après électrophorèse sur gel d'agarose.....	195
I- 1- 2- 6- Analyse des produits digérés, sur gel de polyacrylamide 10% non dénaturant	196
I- 2- CONSTRUCTION DU VECTEUR D'EXPRESSION EUCARYOTIQUE, CONTENANT L'ADNc DE L'ISOFORME TAU441.....	196
I- 2- 1- <i>Les souches bactériennes utilisées</i>	196
I- 2- 1- 1- La souche BL21 (DE3) d'E. coli	196
I- 2- 1- 2- La souche JM 109 d'E. coli.....	197
I- 2- 1- 3- La souche TOP10F' d'E. coli.....	197
I- 2- 2- <i>Transformation bactérienne</i>	198
I- 2- 3- <i>Les vecteurs de clonage</i>	198
I- 2- 3- 1- Le plasmide pRK172-tau441	198
I- 2- 3- 2- Le plasmide eucaryotique pcDNA3	199
I- 2- 4- <i>Insertion de l'ADNc de l'isoforme tau441, dans le vecteur eucaryotique pcDNA3</i>	200
I- 2- 4- 1- Insertion du site BamH I, en amont de l'ADNc de l'isoforme tau441 ..	200
I- 2- 4- 2- Construction du vecteur d'expression pcDNA 3-tau441	201
I- 2- 4- 2- 1- Purification de fragments d'ADN sur membrane de DEAE cellulose.....	201
I- 2- 4- 2- 2- Insertion de l'ADNc de tau441, dans le plasmide eucaryotique pcDNA3	202
I- 2- 5- <i>Sélection des clones</i>	202
I- 2- 5- 1- Technique de purification du plasmide.....	202
I- 2- 5- 1- 1- Méthode de dénaturation par la chaleur.....	202
I- 2- 5- 1- 2- Technique de "mini-préparation" (d'après Serghini <i>et al.</i> , 1989)	203
I- 2- 5- 1- 3- Purification sur colonne de silice (Wizard), commercialisée par la société Promega.....	203
I- 2- 5- 1- 4- Purification par ultracentrifugation en chlorure de césium (Sambrouck <i>et al.</i> , 1989)	204
I- 2- 5- 2- Séquençage de l'ADNc de tau441 inséré, dans le vecteur pcDNA3.....	205
II- CULTURE CELLULAIRE.....	205
II- 1- LES CELLULES SY 5Y	206
II- 1- 1- <i>Description de la lignée</i>	206
II- 1- 2- <i>Entretien de la lignée</i>	209
II- 2- LES CELLULES KELLY.....	210
II- 2- 1- <i>Description de la lignée cellulaire</i>	210
II- 2- 2- <i>Entretien</i>	211
II- 3- REPIQUAGE OU RECUPERATION DES CELLULES.....	211
II- 4- TRAITEMENT DES CELLULES PAR L'INHIBITEUR DE PROTEINES PHOSPHATASES, L'ACIDE OKADAÏQUE (AO)	212
II- 5- EXPERIENCES DE TRANSFECTION.....	212
II- 6- ETABLISSEMENT DE LIGNEES STABLES DE KELLY EXPRIMANT L'ISOFORME TAU441	214

II- 6- 1- Détermination de la dose minimale létale de Généticine pour les cellules Kelly natives	214
II- 6- 2- Sélection des clones.....	215
III- RECHERCHE DE L'ACTIVITE PHOSPHATASIQUE ENDOGENE	215
IV- LE FRACTIONNEMENT CELLULAIRE.....	216
V- ANALYSE DE LA SOLUBILITE DES PROTEINES	217
VI-ANALYSE DES PROTEINES.....	217
VI- 1- SOLUTION REDUCTRICE DE LAEMMLI (LAEMMLI, 1970)	217
VI- 2- SEPARATION DES PROTEINES PAR ELECTROPHORESE.....	218
VI- 2- 1- <i>Electrophorèse monodimensionnelle en gel SDS</i>	218
VI- 2- 1- 1- Gel de séparation à pourcentage d'acrylamide/bis acrylamide constant.....	218
VI- 2- 1- 2- Gels de séparation en gradients.....	219
VI- 2- 1- 3- Gel de concentration	220
VI- 2- 1- 4- Le tampon d'électrophorèse.....	220
VI- 2- 2- <i>Electrophorèse bi-dimensionnelle</i>	220
VI- 3- ELECTROTRANSFERT	221
VI- 4- TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES	221
VI- 4- 1- <i>Techniques des immunoempreintes</i>	221
VI- 4- 2- <i>Les différents anticorps utilisés</i>	223
VI- 4- 2- 1- Les anticorps monoclonaux	223
VI- 4- 2- 1- 1- Anticorps dirigés contre les protéines tau	223
VI- 4- 2- 1- 1- 1- Anticorps détectant un épitope lorsqu'il est phosphorylé	223
VI- 4- 2- 1- 1- 2- Anticorps détectant un épitope lorsqu'il n'est pas phosphorylé.....	224
VI- 4- 2- 1- 2- Anticorps monoclonal dirigé contre les neurofilaments.....	224
VI- 4- 2- 1- 3- Anticorps monoclonal dirigé contre l'apo E.....	224
VI- 4- 2- 1- 4- Anticorps monoclonal dirigé contre la protéine gliale acide fibrillaire (GFAP)	225
VI- 4- 2- 2- Les anticorps polyclonaux.....	225
VI- 4- 2- 2- 1- Les anticorps polyclonaux dirigés contre les protéines tau... ..	225
VI- 4- 2- 2- 2- Anticorps polyclonal dirigé contre les neurofilaments	226
VI- 4- 2- 2- 3- Anticorps dirigé contre l'apo E	226
VI- 4- 3- <i>Le dosage colorimétrique des protéines</i>	226
VI- 4- 4- <i>Quantifications</i>	226
VI- 4- 5- <i>Techniques d'immunofluorescence</i>	227
VI- 4- 5- 1- Perméabilisation des cellules avant fixation (protocole adapté de l'étude de Lee et Rook, 1992)	227
VI- 4- 5- 2- Protocole ne comportant pas d'étape de perméabilisation	228

Volume II

BIBLIOGRAPHIE

ANNEXES

229

Publications publiées (Annexes 1 et 3)
Publications soumises (Annexes 2 et 4)

INTRODUCTION

GENERALITES

C'est en 1906 que le neuropathologiste Aloïs Alzheimer décrit les altérations anatomiques présentes dans le cerveau d'une patiente démente décédée à l'âge de 56 ans.

A partir de 1911, les formes de démence présénile (apparaissant avant l'âge de 65 ans) sont regroupées sous le terme de "maladie d'Alzheimer", tandis que les troubles psychiatriques apparaissant chez des individus âgés de plus de 65 ans sont décrits comme des démences séniles ou syphilitiques. A partir des années 60, cette appellation désignera aussi bien les formes de démence présénile que sénile.

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative responsable de la majorité des démences chez les personnes âgées. Elle touche en effet 5% des personnes de plus de 65 ans et près de 20% des plus de 80 ans. Les pays industrialisés, où la natalité est en baisse et l'espérance de vie toujours plus importante, sont les premiers concernés puisque la maladie d'Alzheimer touche principalement les personnes âgées. Cette maladie est à l'origine de morbidité, d'invalidité et d'une mortalité déjà très importante. Ce phénomène pose un réel problème socio-économique qui devrait s'accroître à plus ou moins long terme.

Si la mobilisation de la recherche, durant ces dix dernières années, a permis de déterminer les protéines impliquées, les mécanismes intervenant dans la survenue de la maladie d'Alzheimer restent encore mal connus. L'accumulation extracellulaire d'un peptide, sous la forme de dépôts amyloïdes, appelés plaques séniles, et la présence, à l'intérieur des neurones en cours de dégénérescence, de protéines du cytosquelette modifiées et agrégées représentent deux anomalies caractéristiques de la démence de type Alzheimer.

La maladie d'Alzheimer est une maladie spécifique à l'homme et présente une importante hétérogénéité. Ces deux paramètres montrent l'étendue de la difficulté de son étude.

I LA MALADIE D'ALZHEIMER

I- 1- La démence de type Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est la cause la plus fréquente de démence progressive chez l'adulte âgé. C'est une démence résultant de la détérioration progressive des fonctions intellectuelles. Elle provoque des troubles de mémoire, du langage, de la personnalité et une incapacité à effectuer des tâches routinières.

Les patients perdent progressivement leur autonomie et décèdent après une évolution de la maladie de 5 à 10 ans en moyenne.

On distingue les formes préséniles, survenant avant 65 ans, des formes séniles survenant après 65 ans. De plus, on différencie les formes dites familiales, liées à une hérédité, des formes dites sporadiques, survenant sans aucun lien héréditaire apparent.

L'accumulation de matériels denses intraneuronaux, les faisceaux de paires de filaments en hélice, les PHFs, ainsi que l'accumulation extracellulaire de substance amyloïde constituant les plaques séniles représentent les deux lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. Certaines espèces animales sont également capables de développer, au cours du temps, des plaques séniles composées de peptide amyloïde et de plaques neuritiques. C'est le cas des singes Rhésus, des chimpanzés, des chiens (Wisniewski *et al.*, 1970b, 1973; Gearing *et al.*, 1994). Le peptide A β composant ces plaques est identique, au niveau antigénique, à celui trouvé chez l'homme (Selkoe *et coll.*, 1987). Pourtant, chez ces espèces, les neurites dystrophiques ne contiennent pas de protéines tau et la perte cognitive est faible (Walker *et al.*, 1988). Par contre, d'autres espèces animales (chèvre et mouton) développent naturellement une dégénérescence neurofibrillaire qui contient des protéines tau et qui ressemble à celle trouvée chez l'homme (Nelson *et al.*, 1994; Nelson and Saper, 1995). L'ours âgé développerait également une dégénérescence

neurofibrillaire composée de protéines tau sans toutefois se présenter sous la forme de PHF (Cork *et al.*, 1988). Jusqu'à présent, aucun animal n'a développé la maladie d'Alzheimer. Cette maladie, non transmissible, est spécifique de l'espèce humaine.

I- 2- Hétérogénéité de la maladie

Selon l'âge d'apparition de la maladie, l'atteinte du cortex sera différente. En effet, l'atrophie cérébrale ainsi que la perte neuronale sont beaucoup plus importantes lorsque l'âge d'apparition de la maladie est faible (formes dite préséniles: avant 60-65 ans) que lorsque l'âge est plus avancé (formes séniles: après 65 ans). Elles conduisent aux troubles du langage (aphasie) et des réalisations gestuelles (apraxie). Les formes peu évolutives, où les troubles de la mémoire sont prédominants, sont rencontrées chez les sujets âgés.

La durée de l'évolution de la maladie varie également selon les malades, mais aussi au niveau des formes familiales et au niveau des formes sporadiques (Axelman *et al.*, 1994). Certaines formes présentent ainsi une évolution progressive ou par paliers mais peuvent tout autant présenter une évolution rapide. Les formes à évolution lente s'observent surtout chez les sujets âgés.

Le sexe des individus semble aussi intervenir. En effet, une plus grande fréquence de la maladie a été trouvée chez la femme.

Plusieurs acteurs semblent donc agir au niveau de la maladie d'Alzheimer (MA).

I- 2- 1- Hétérogénéité clinique

I- 2- 1- 1- Les troubles cognitifs

Les patients perdent progressivement leur autonomie. Elle est observée à différents niveaux.

- Troubles de la mémoire: Ce sont les premiers signes observés mais ils sont, dans un premier temps, fréquemment attribués à l'âge. Ces troubles s'accroissent rapidement et ont un impact sur l'activité quotidienne du patient.

- Troubles du langage: Retrouvés dans plus de 40% des cas, ce sont les troubles les plus fréquents après les troubles mnésiques. Les désordres touchent d'abord le langage écrit, ensuite viennent les troubles du langage oral.

- Troubles praxiques: Ils concernent la réalisation gestuelle et sont fréquemment associés à la maladie d'Alzheimer. Le patient éprouve alors des difficultés à utiliser des objets usuels, à s'habiller...

- Troubles gnosiques: Ils correspondent à l'incapacité à reconnaître un objet par l'intermédiaire de l'un de ses sens. Une agnosie visuelle est rencontrée chez environ 30% des sujets qui présentent alors des difficultés à lire, à distinguer des objets ou à reconnaître des visages familiers.

I- 2- 1-2- Les troubles comportementaux

Les sujets atteints de maladie d'Alzheimer présentent fréquemment des troubles du comportement plus ou moins importants, non spécifiques de cette maladie, allant: de la simple dépression (réaction psychologique du patient à la diminution de ses facultés intellectuelles consécutivement à des lésions dues à la maladie d'Alzheimer) à des comportements psychopathologiques tels que la perte d'initiative, l'agitation ou le délire.

I- 2- 1-3- Les troubles neurologiques

Quelques troubles neurologiques tels qu'une augmentation du tonus musculaire ou des troubles de la marche peuvent se manifester au cours de la maladie d'Alzheimer; leur intensité étant en relation avec la sévérité de la démence.

I- 2- 2- **Hétérogénéité génétique**

Bien que la majorité des cas de la MA soit sporadique, plusieurs arguments favorisent une implication de facteurs génétiques dans les formes familiales (ou FAD). La présence d'antécédents familiaux constitue un risque majeur de développer la maladie, et dans certaines familles, la maladie est transmise selon un mode autosomique dominant (Folstein, 1989). Trois gènes porteurs de mutations situés sur les chromosomes 21, 14 et 1 semblent notamment être impliqués dans les FAD à début précoce.

I- 2- 2- 1- Chromosome 21

Les similitudes neuropathologiques entre la MA et le syndrome de Down (trisomie 21) ont orientés les premières études génétiques sur le chromosome 21. Plusieurs études ont localisé le gène responsable de la maladie sur le bras long du chromosome 21 dans une région 21q11.2-21q22.1 (Goldgaber *et al.*, 1987; Robakis *et al.*, 1987; Tanzi *et al.*, 1987). En 1988, Patterson et collaborateurs montraient que le gène de l'APP (pour le terme en anglais *amyloid protein precursor*) était localisé près de la zone sus-envisagée. Plusieurs mutations pathogéniques ont été détectées sur ce gène et seraient impliquées dans certaines formes familiales de MA à début précoce: mutations localisées sur les codons 716, 717, et 670/671 (Chartier-Harlin *et al.*, 1991; Goate *et al.*, 1991; Murrell *et al.*, 1991; Mullan *et al.*, 1992; Eckman *et al.*, 1997).

Elles se situent de part et d'autre de la région codant pour le peptide A β , retrouvé agrégé dans les plaques séniles. Aucune de ces mutations n'a été retrouvée dans la population normale. Ces mutations ne sont pas de simples polymorphismes mais sont responsables de la pathologie.

D'autres mutations, au niveau des codons 692 et 693, ont été également localisées (Levy *et al.*, 1990; Hendricks *et al.*, 1992). Bien qu'elles n'aient jamais été trouvées dans la MA, ces mutations sont liées aux amyloïdoses de type angiopathie et correspondent à l'accumulation du même peptide amyloïde dans les vaisseaux.

Dès 1991, le groupe du Docteur J.Hardy suggérait que les mutations 717 et 670/671 seraient impliquées dans l'altération du métabolisme de l'APP conduisant à la formation du peptide A β (Chartier *et al.*, 1991; Goate *et al.*, 1991; Suzuki *et al.*, 1994a).

I- 2- 2- 2- Chromosome 14

Les formes familiales de la MA à début précoce, laissant apparaître une liaison des marqueurs du chromosome 21 avec la maladie, ne représentent qu'un faible pourcentage des cas familiaux à début précoce. Dès 1992, Schellenberg et collaborateurs mettaient en évidence une liaison génétique entre une région du chromosome 14 et d'autres formes familiales de la MA à début précoce. Après l'analyse de plusieurs gènes candidats dont l' α -1antichymotrypsine, un nouveau gène, appelé S182 puis PS-1, a été identifié dans cette région (Sherrington *et al.*, 1995). Ce gène code pour une protéine appelée préséniline 1 (PS-1) qui contient 6 à 8 domaines transmembranaires (TM), selon les auteurs, ainsi qu'une longue hélice hydrophyle entre les domaines transmembranaires VI et VII. Cette protéine PS-1 a été localisée au niveau du réticulum endoplasmique et du Golgi (Kovacs *et al.*, 1996; Cook *et al.*, 1996). Jusqu'à présent 33 mutations ont été décrites sur ce gène (Sherrington *et al.*, 1995; Wasco *et al.*, 1995; Clark *et al.*, 1995; Cruts *et al.*, 1995, 1996; Campion *et al.*, 1995; Van Broeckhoven, 1995; Hutton *et al.*, 1996; Boteva *et al.*, 1996;

Perez-Tur *et al.*, 1995). Elles sont localisées sur l'ensemble de la protéine mais, plus particulièrement, au niveau du deuxième domaine transmembranaire (TM II) et de l'hélice hydrophyle. Certaines de ces mutations sont capables d'avancer ou de retarder l'âge d'apparition de la maladie qui varie de 32 à 50 ans. Plusieurs études tendent à montrer un rôle pour la protéine PS-1 dans le métabolisme de l'APP.

I- 2- 2- 3- Chromosome 1

Un troisième gène a été impliqué dans des formes familiales de la maladie d'Alzheimer à début précoce. Ce gène, STM2 puis PS-2, présente 67% d'homologie avec le gène de la PS-1 (Levy-Lahad *et al.*, 1995) et code pour une protéine appelée préséniline 2 (PS-2). Comme PS-1, cette protéine PS-2 a été localisée au niveau du Golgi et du réticulum endoplasmique (Kovacs *et al.*, 1996). Seules, deux mutations ont été découvertes sur ce gène. Une mutation au codon 141 a été décrite dans 7 familles dites "des Allemands de la Volga" tandis que la seconde, mise en évidence dans une famille d'origine italienne, est localisée au codon 239 (Levy-Lahad *et al.*, 1995; Rogaeв *et al.*, 1995). Ces mutations modifieraient le métabolisme de l'APP et conduiraient à la production importante du peptide Aβ1-42 (Citron *et al.*, 1997; Tomita *et al.*, 1997; Xia *et al.*, 1997a).

I- 2- 2- 4- Chromosome 12

Ce chromosome pourrait être impliqué dans 15 à 30% des formes familiales à début tardif mais n'expliquerait pas toutes les formes tardives de la maladie suggérant donc la présence d'autres gènes impliqués (Stephenson 1997) lesquels sont en cours d'étude.

I- 2- 2- 5- Conclusion

Les formes sporadiques et familiales à début tardif représentent respectivement 45% et 30% des patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Les formes familiales et sporadiques à début précoce, moins fréquentes, concernent néanmoins respectivement 15% et 10% des cas. Les mutations du gène PS-1 représentent la cause majeure de ces formes familiales à début précoce. En effet, elles sont responsables d'environ 50 à 70% de ces cas. Les mutations de l'APP seraient retrouvées dans 5 à 10% des cas tandis que les mutations de PS-2 sont plus rares (environ 2%). Ainsi, des réponses commencent à être données au sujet des formes familiales à début précoce alors que d'éventuels gènes impliqués dans les formes tardives restent à identifier.

I- 3- Les facteurs de risque

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

Des études génétiques ont mis en évidence d'autres facteurs de risque. Ainsi un gène, susceptible d'être impliqué dans les formes familiales de la MA à début tardif, avait été localisé sur le chromosome 19 (Pericak-Vance *et al.*, 1991). Mais la liaison génétique mise en évidence est faible et non significative. Parallèlement, l'apolipoprotéine E (apo E) a été localisée sur le chromosome 19 dans la région q13.2. Ce gène APO E code pour une protéine de 34 kDa impliquée dans le transport et le métabolisme du cholestérol et de phospholipides (Mahley, 1988; Weisgraber *et al.*, 1994). Cette protéine comporte 3 isoformes majeures E2, E3 et E4 qui sont respectivement les produits de 3 allèles ϵ_2 , ϵ_3 et ϵ_4 (Davignon *et al.*, 1988). Ces isoformes diffèrent au niveau des acides aminés 112 et

158 par la présence d'une arginine ou d'une cystéine (E2 correspond à: Cys112 et Cys 158, E3 à: Cys112 et Arg 158 et E4: Arg112 et Arg158). Bien que la fréquence de ces 3 isoformes varie selon les populations étudiées, l'isoforme E3 semble être la plus souvent retrouvée. Par contre, dans les populations de patients atteints de formes sporadiques et familiales tardives, la fréquence de l'allèle $\epsilon 4$ augmente de manière significative suggérant qu'il agirait comme un facteur de risque (Saunders *et al.*, 1993; Corder *et al.*, 1993; Mayeux *et al.*, 1993; Poirier *et al.*, 1993b). Plus récemment cette augmentation a été également retrouvée chez des patients de la MA à début précoce présentant une mutation sur le gène de l'APP (Pérez-Tur *et al.*, 1995). De plus, il existe un effet dose dépendant de l'allèle $\epsilon 4$. Ainsi, le risque de développer la maladie est augmenté de 3 à 6 fois pour les porteurs d'un seul allèle $\epsilon 4$, et de 6 à 12 fois pour les porteurs des deux allèles $\epsilon 4$ (pour revue, Chartier-Harlin et Perez-Tur, 1995). Par contre, la fréquence de l'allèle $\epsilon 2$ est diminuée dans certaines populations atteintes de MA tardives, suggérant un rôle protecteur de cet allèle (Chartier-Harlin *et al.*, 1994; Corder *et al.*, 1994). De plus, la densité des dépôts de peptide amyloïde trouvée dans le cerveau de patients Alzheimer dont le début de la maladie est tardif, semble corrélérer avec la présence de l'allèle $\epsilon 4$ de l'apo E (Rebeck *et al.*, 1993; Schmechel *et al.*, 1993). Enfin, cette isoforme apparaît spécifiquement associée à une augmentation du nombre de plaques contenant la forme 1-40 du peptide A β tandis que le nombre de plaques contenant la forme 1-42 ne semble pas augmenter ou diminuer en fonction de l'isoforme d'apo E (Gearing *et al.*, 1996).

D'autres gènes pourraient également potentialiser l'effet de l'apo E. C'est le cas de l'isoforme A/A de l' α -1-antichymotrypsine qui augmente le risque associé à l'homozygotie pour l'allèle $\epsilon 4$ de l'apo E (Kamboh *et al.*, 1995; DeKosky *et al.*, 1996). Par contre, la forme T/T de l' α -1-antichymotrypsine aurait l'effet inverse (DeKosky *et al.*, 1996). De même le variant K de la butyrylcholinestérase (Lehman *et al.*, 1997), la fréquence des allèles 5 et 8 du récepteur des VLDL (Okuizumi *et al.*, 1995) ainsi que le polymorphisme décrit au niveau de la région en amont du gène codant pour le récepteur

LRP de l'apo E (Wavrant-De Vrieze *et al.*, 1997) pourraient moduler l'effet de l'apo E. Enfin, l'AMPC interviendrait dans la régulation de l'expression de l'apo E (Andreani-Mangency *et al.*, 1996). Une augmentation ou une diminution de ce second messenger pourraient également potentialiser l'effet de l'apo E.

I- 4- Description des altérations présentes dans la maladie d'Alzheimer

I- 4- 1- Altération au niveau neuropathologique

I- 4- 1- 1- L'atrophie cérébrale

I- 4- 1- 1- 1- Aspect macroscopique

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

I- 4- 1- 1- 2- Aspect microscopique

Bien que, dans le vieillissement, un "rabougrissement" des neurones soit observé, une véritable perte des grands neurones, de l'ordre de 22 à 26%, a été décrite dans la MA (Terry *et al.*, 1981; Mountjoy *et al.*, 1983). Selon Duyckaerts et collaborateurs (1985), cette atrophie est consécutive à une perte de neurones en colonne réduisant ainsi la

longueur du ruban cortical. Par contre, une autre étude a montré que la perte neuronale était plutôt laminaire et affectait les neurones pyramidaux possédant de longues projections cortico-corticales dans le néocortex (Lewis *et al.*, 1987). En plus de la perte neuronale, une perte des synapses et une dilatation des boutons présynaptiques ont été montrées grâce à des études immunohistochimiques et immunocytochimiques utilisant des sondes contre la synaptophysine (marqueur des terminaisons présynaptiques; Masliah *et al.*, 1991). Cette perte synaptique créerait alors des disconnections entre les différentes aires néocorticales impliquées dans les processus cognitifs (Terry *et al.*, 1991).

I- 4- 1- 2- Les lésions histologiques

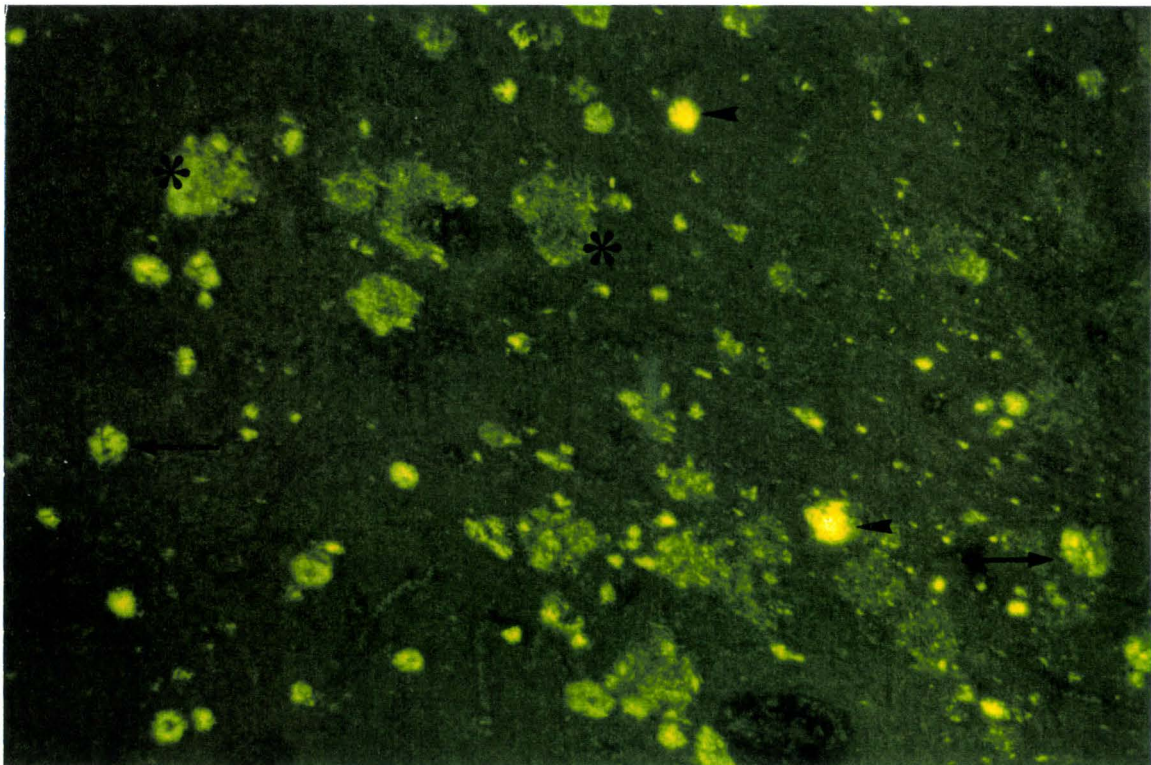
La MA est essentiellement caractérisée sur le plan histologique par deux types de lésions: les plaques séniles et la dégénérescence neurofibrillaire mais, également, par une nouvelle structure très récemment décrite, les plaques AMY. Tandis que les deux premières lésions sont colorées par l'argent ou la thioflavine S, la troisième ne l'est pas.

I- 4- 1- 2- 1- Les plaques séniles..

I- 4- 1- 2- 1- 1- Description

Les plaques séniles sont des dépôts extracellulaires de substance amyloïde situés dans le domaine extracellulaire (**FIGURE 1**). Cette substance amyloïde, de forme arrondie et compacte, peut également s'accumuler au sein des vaisseaux, on parle alors d'angiopathie amyloïde. La structure en feuillets β -plissés de cette substance lui confère certaines propriétés: une diffraction aux rayons X (Glennner, 1980), la coloration par certains colorants comme le rouge congo et la thioflavine S.

FIGURE 1



Mise en évidence des dépôts amyloïdes accumulés dans le cortex temporal de patient atteint de la maladie d'Alzheimer colorés par la thioflavine S. En fluorescence cette coloration permet de différencier les dépôts amyloïdes compacts (pointes de flèches), classiques (flèches) et diffus (étoiles). Cette observation est réalisée au faible grossissement.

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

I- 4- 1- 2- 1- 2- Composition

En 1984, Glenner et Wong ont isolé biochimiquement le constituant principal de ces dépôts amyloïdes. Il s'agit d'un peptide appelé peptide A4 ou peptide A β . Ce peptide A β résulte du clivage aberrant de son précurseur appelé APP (pour Amyloid Protein Precursor) qui a la structure d'un récepteur membranaire (Kang *et al.*, 1987). La taille de ce peptide varie de 39 à 43 acides aminés. En utilisant un immunsérum dirigé contre le peptide A β , il est alors possible de marquer les plaques séniles et l'angiopathie amyloïde. Des anticorps monoclonaux et polyclonaux ont permis de distinguer les peptides A β de 40 acides aminés des peptides A β de 42 acides aminés (Mak *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1994; Iwatsubo *et al.*, 1994; Yamaguchi *et al.*, 1995). Deux types de plaques séniles ont été identifiées: des plaques diffuses et des plaques compactes. Les plaques diffuses, moins bien colorées par la thioflavine S, se transformeraient au fur et à mesure en plaques séniles compactes contenant des fibrilles.

De nombreux autres constituants ont été détectés au sein des plaques séniles: l' α -1 antichymotrypsine, les apolipoprotéines B et E, des protéines du complément (C1q, C3d et C4d), des protéines de la matrice extracellulaire, comme la fibronectine ou la laminine, des immunoglobulines, des protéoglycannes, des thrombospondines (pour revue: Fraser *et al.*, 1993). Certaines de ces protéines, telles que l' α -1 antichymotrypsine, l'apolipoprotéine E et les protéoglycannes participeraient à la formation des dépôts amyloïdes et sont considérées comme des cofacteurs de l'amyloïdogénèse.

I- 4- 1- 2- 1- 3- Distribution topographique

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

Braak et Braak ont pu déterminer trois stades pour les dépôts amyloïdes, les stades A, B et C (Braak et Braak, 1991):

- Au stade A, les dépôts amyloïdes sont trouvés en quantité faible dans les régions basales du cortex frontal, temporal et occipital; la formation hippocampique est épargnée.

- Au stade B, les dépôts amyloïdes affectent les aires associatives de presque l'ensemble de l'isocortex, avec une densité modérée; la formation hippocampique est légèrement touchée.

- Au stade C, l'ensemble de l'isocortex (y compris les aires isocorticales primaires) est atteint. A ce stade, certains noyaux sous-corticaux peuvent être également envahis; la formation hippocampique reste modérément touchée.

Les premières études, utilisant les colorations à l'argent ou à la thioflavine, montraient que les dépôts amyloïdes étaient préférentiellement localisés au niveau des couches III et V du néocortex (Rogers et Morrison, 1985; Lewis *et al.*, 1987). Des techniques immunohistochimiques, utilisant des anticorps spécifiques du peptide A β , ont révélé que les dépôts possédaient une distribution laminaire beaucoup moins restreinte et étaient retrouvés dans toutes les couches du cortex (Braak et Braak, 1991; Delaère *et al.*, 1991).

Les plaques diffuses seraient plus abondantes dans les aires corticales supérieures tandis que les dépôts denses seraient plus abondants dans les couches inférieures (pour revue, Dickson *et al.*, 1997).

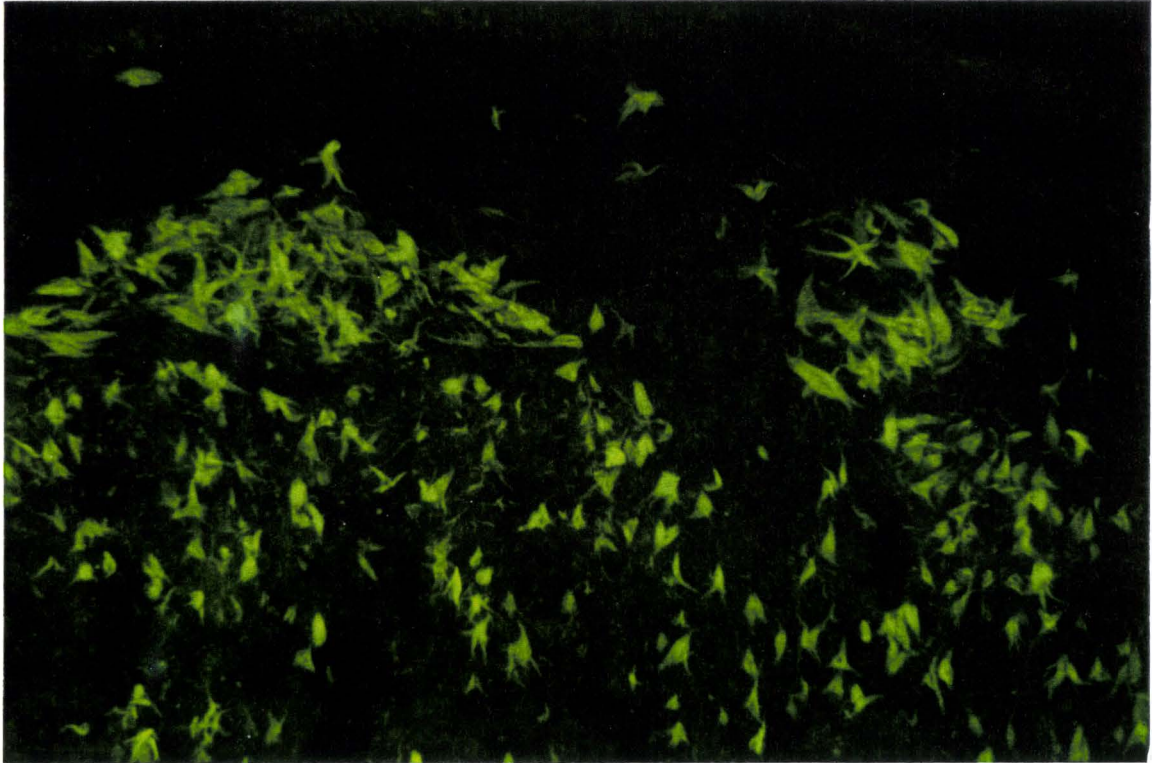
I- 4- 1- 2- 2- La dégénérescence neurofibrillaire...

I- 4- 1- 2- 2- 1- Description

La dégénérescence neurofibrillaire (DNF) est caractérisée par l'accumulation intracellulaire d'un matériel fibrillaire anormal. Grâce à leurs propriétés agyrophiles, les neurones, en dégénérescence, sont facilement mis en évidence par des techniques d'imprégnation argentique (Gallyas, 1971; Campbell *et al.*, 1987). Ces colorations permettent de distinguer les corps cellulaires des neurones ainsi que les neurites en dégénérescence (dystrophiques). Certains colorants, utilisés pour la détection de la substance amyloïde, comme la thioflavine S, colorent certains neurones et neurites dystrophiques suggérant que les neurones s'altérant, acquièrent au cours du temps, une structure en feuillets β -plissés (Défossez et Delacourte, 1987) (**FIGURE 2**).

L'analyse structurale a révélé que ce matériel fibrillaire était composé de deux filaments individuels s'enroulant l'un autour de l'autre de manière hélicale (Kidd, 1963). Ces structures sont couramment appelées PHF (pour le terme anglais, *paired helical filaments*) (Kidd, 1963). Les filaments ont un diamètre de 20 nm et sont pourvus de constriction régulières tous les 80 nm. Kidd a suggéré que chaque filament était constitué de deux brins de 10 nm s'enroulant l'un autour de l'autre de manière hélicoïdale. Ces PHF sont disposés dans le cytoplasme, autour du noyau des neurones en dégénérescence (Kidd, 1964).

FIGURE 2



Mise en évidence des neurones en dégénérescence neurofibrillaire dans la couche II du cortex entorhinal de patient atteint de la maladie d'Alzheimer colorés par la thioflavine S et observés en fluorescence. Cette observation est réalisée à un fort grossissement.

Les enchevêtrements neurofibrillaires sont également vus dans le vieillissement normal, mais à partir de l'âge de 75 ans, et sont limités à l'hippocampe (Bouras *et al.*, 1994). Le nombre de DNF dans le cortex est en corrélation avec la sévérité de la démence (Wilcock et Esiri, 1982; Arriagada *et al.*, 1992).

I- 4- 1- 2- 2- 2- Composition

En combinant l'utilisation des sondes immunologiques contre les protéines tau et les techniques immunohistochimiques, de nombreuses équipes ont pu montrer que les constituants majeurs des PHF étaient les protéines tau, des protéines du cytosquelette associées aux microtubules (MAP pour *microtubule-associated proteins*) (Brion *et al.*, 1985; Delacourte et Défossez, 1986; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986a; Kosik *et al.*, 1986; Nukina et Ihara, 1986; Wood *et al.*, 1986). Inversement, en produisant des sondes immunologiques contre les PHF, il fut possible de détecter les protéines tau, notamment avec la technique des immunoempreintes. D'autres sondes immunologiques ont permis de détecter différents constituants tels que l'ubiquitine (Baner *et al.*, 1991) qui servirait de signal pour l'élimination de telles structures insolubles, MAP2 (Kosik *et al.*, 1984; Hasegawa *et al.*, 1990) et des neurofilaments (Nukina *et al.*, 1987; Lee *et al.* 1988b). Cependant, la détection des protéines MAP2 et des neurofilaments pourrait résulter de réactions croisées avec les protéines tau avec lesquelles elles partagent certaines homologies. Des études biochimiques ont, en effet, montré que des anticorps anti-neurofilaments reconnaissaient les protéines tau de la MA (Lichtenberg-Kraag *et al.*, 1992). D'autres auteurs ont également montré que la présence de neurofilaments permettait d'identifier certaines populations neuronales particulièrement vulnérables à la DNF (Hof *et al.*, 1990a,b; Vickers *et al.*, 1994).

I- 4- 1- 2- 2- 3- Distribution topographique

Des analyses immunohistochimiques et biochimiques ont montré que les régions les plus fortement touchées par la DNF sont les régions hippocampique incluant le subiculum et le CA1; le cortex entorhinal, le noyau basal accessoire de l'amygdale et l'amygdale sont également atteints par le processus de DNF (Arnold *et al.*, 1991). Les aires temporales isocorticales contiennent également une forte concentration de neurones en dégénérescence. Les aires limbiques et le lobe temporal sont beaucoup plus touchés par la DNF que les lobes frontal, pariétal et occipital (Arnold *et al.*, 1991). Des études biochimiques, qui quantifiaient les constituants biochimiques de la dégénérescence neurofibrillaire, montraient la même atteinte hippocampique et temporale (Vermersch *et al.*, 1992).

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

I- 4- 1- 2- 2- 4- Evolution au cours du temps

Braak et Braak, en 1991, ont effectué la cinétique d'apparition des lésions neurofibrillaires chez des patients déments et non-déments, comme ils l'avaient faite pour

les dépôts amyloïdes. Le parcours de la DNF semble très hiérarchisé et a été subdivisé en 6 stades, du stade I au stade VI.

- Le stade I correspond à l'atteinte moyenne du cortex transentorhinal, et particulièrement de la couche II. Les neurones de cette couche sont, en général, les premières cellules nerveuses à développer une DNF.

- Le stade II représente une aggravation du stade I, c'est-à-dire une atteinte plus globale de la couche II et un début d'atteinte du subiculum. Les stades I et II représentent donc les "stades transentorhinaux", avec une faible atteinte de l'hippocampe (CA1) sans aucun changement dans l'isocortex.

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

- Au stade IV, l'atteinte de la couche II est très sévère et le DNF est présente dans les couches plus profondes comme les couches III et IV. Le CA1 est très touché, l'isocortex modérément. Quelques structures sous-corticales peuvent également être atteintes mais plus légèrement. L'évènement le plus frappant des stades III et IV est donc l'atteinte des cortex entorhinal, transentorhinal et de l'hippocampe sans réelle implication des aires isocorticales. Ils sont, par conséquent, appelés "stades limbiques".

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

I- 4- 1- 2- 2- 5- Conclusion

L'étendue de la DNF semble liée à l'importance de la démence et non les dépôts amyloïdes (Wilcock et Esiri, 1982; Arriagada *et al.*, 1992). Dans les cas où la DNF est sévère, de nombreux dépôts amyloïdes sont alors retrouvés. Ces dépôts ne sont pas forcément localisés au niveau des mêmes régions. Par contre, dans le cas où les dépôts amyloïdes sont très nombreux, on ne retrouve pas forcément un grand nombre de neurones en dégénérescence. Quelles sont alors les relations entre les dépôts amyloïdes et la DNF? En 1988, Mann suggérait que dans le cerveau de personnes atteintes du syndrome de Down (trisomie 21), des changements neuropathologiques, semblables à ceux observés dans la MA, se produisaient. Les dépôts amyloïdes apparaissent vers 20 ans et la DNF vers 35 ans (Mann *et al.*, 1989a; Mann, 1989b). Ces auteurs suggéraient donc que le syndrome de Down pourrait servir de modèle de la MA pour des études sur la formation et l'évolution des lésions pathologiques. Pour certains auteurs, la substance amyloïde apparaît donc avant la DNF (Hardy et Higgins, 1992; Selkoe, 1992). Pour d'autres, la pathologie neuronale précède les dépôts amyloïdes. En effet, les plaques diffuses sont considérées comme étant un évènement précoce de la maladie d'Alzheimer (Masliah *et al.*, 1990; Perry *et al.*, 1992). Or, il existe des plaques diffuses sans composante neuritique contenant des PHFs (Masliah *et al.*, 1990) alors que le peptide A β est trouvé dans tous les enchevêtrements neurofibrillaires extracellulaires et dans certains enchevêtrements intracellulaires (Perry *et al.*, 1992).

I- 4- 1- 2- 3- Les plaques AMY...

En établissant de nouveaux anticorps contre des extraits de protéines tau-PHF issues de tissu cérébral de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, Schmidt et collaborateurs (1997) ont produit 4 anticorps qui ne reconnaissent ni les tau-PHF, ni les NFTs. Par immunohistochimie, les auteurs montrent que ces anticorps marquent des dépôts diffus extracellulaires ressemblant aux plaques séniles mais qui ne leur sont pas identiques. En effet, ces dépôts diffus ne sont reconnus ni par des anticorps dirigés contre le peptide A β , ni par les techniques classiques de coloration utilisant l'argent ou la thioflavine S. Ces nouveaux anticorps reconnaissent une protéine de 110 kDa au sein de ces dépôts. Ces plaques semblent spécifiques des cerveaux Alzheimer puisqu'elles ne sont que très rarement détectées dans les cerveaux de témoins. Ces nouvelles lésions, jamais identifiées, ne sont jamais colocalisées avec des dépôts amyloïdes et sont appelées des plaques AMY.

I- 4- 2- La réaction gliale

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

I- 4- 3- La réaction immunitaire

La participation du système immunitaire est clairement établie dans la maladie d'Alzheimer (McRae *et al.*, 1988, 1991). Dans le cerveau de patients Alzheimer, la présence de marqueurs de l'inflammation tels que les cytokines, comme l'IL1 ou l'IL6 (Griffin *et al.*, 1989; Mattiace *et al.*, 1990; Strauss *et al.*, 1992), les récepteurs aux cytokines (Rogers *et al.*, 1992; McGeer *et al.*, 1987), l' α -1- antichymotrypsine (Abraham *et al.*, 1988), l' α 2 macroglobuline (Strauss *et al.*, 1992), ainsi que des protéines du complément, comme C1q a été mise en évidence. L'ensemble de ces facteurs est soit uniquement retrouvé, soit en quantité significativement élevée dans le cerveau de patients Alzheimer par rapport aux personnes âgées non-démentes. De plus, le composant C1q de la cascade classique du complément est capable de se lier au peptide amyloïde. La plupart des protéines de l'inflammation sont synthétisées par les astrocytes et la microglie mais également par les neurones. Ces protéines peuvent contribuer à la mort des neurones. Des études épidémiologiques suggèrent que le traitement de patients par des drogues, ayant un rôle anti-inflammatoire, diminuerait le risque de développer la maladie d'Alzheimer (pour revue, McGeer et McGeer, 1995).

I- 4- 4- Anomalies vasculaires

Une altération vasculaire a été suggérée pour expliquer la formation des lésions neuropathologiques de la MA (Scheibel *et al.*, 1986). Ainsi, dans le vieillissement et la MA, une augmentation du diamètre des capillaires et une diminution de la densité vasculaire ont été décrites (Bell and Ball, 1981; Buée *et al.*, 1994). Pourtant, les données actuelles ne permettent pas de conclure sur le rôle de la vascularisation dans la MA (Buée *et al.*, 1994). De fait, les résultats comparatifs entre patients atteints de la MA et témoins âgés diffèrent selon les auteurs. Certains n'observent pas de différence significative entre

les deux populations quant au diamètre des capillaires et la densité vasculaire, ni même au niveau des régions présentant un grand nombre de lésions neuropathologiques de type Alzheimer (Bell and Ball, 1981). D'autres auteurs voient non seulement une diminution de la densité vasculaire mais aussi la présence d'anomalies vasculaires particulières (vaisseaux en boucle et/ou tortueux) (Scheibel *et al.*, 1986; Buée *et al.*, 1994).

I- 4- 5- Altération neurochimique

Dans la maladie d'Alzheimer, les grandes voies de neurotransmission sont touchées par la maladie, qu'il s'agisse des voies cholinergiques, dopaminergiques, noradrénergiques ou sérotoninergiques (**Tableau I**).

Dans la maladie d'Alzheimer, une altération du système cholinergique a été mise en évidence (Bowen *et al.*, 1982, 1983). Une diminution de la choline acétyltransférase, enzyme de synthèse de l'acétylcholine, est observée et semblerait plus importante dans le cortex temporal et l'hippocampe que dans les autres aires (Rossor *et al.*, 1982). L'activité de cet enzyme est diminuée dans toutes les couches corticales mais plus particulièrement dans les couches II et IV (Perry *et al.*, 1984). Cette diminution serait plus importante dans les formes à début précoce par rapport aux formes à début tardif de la maladie d'Alzheimer (Bird *et al.*, 1983; Rossor *et al.*, 1982). Par contre, les récepteurs sur lesquels agit l'acétylcholine sont intacts voire même augmentés. L'intensité du déficit en choline acétyltransférase est corrélée au déficit cognitif (Perry *et al.*, 1978; Ruberg *et al.*, 1990) ainsi qu'à la densité des plaques séniles et à la dégénérescence neurofibrillaire (Perry *et al.*, 1978; Wilcock *et al.*, 1982). L'isoforme E4 de l'apolipoprotéine E, qui peut être considérée comme un facteur de risque dans la maladie d'Alzheimer, pourrait être liée à des déficits cholinergiques plus importants (Poirier *et al.*, 1995). En effet, Beffert et Poirier (1996) rapportaient une corrélation inverse entre le nombre d'allèle $\epsilon 4$ et l'activité de la choline acétyltransférase, responsable de la synthèse de l'acétylcholine, dans le

TRANSMETTEURS D'ALZHEIMER	CHANGEMENTS OBSERVÉS DANS LA MALADIE
Acétylcholine	Diminution importante dans le cortex et l'hippocampe (études post-mortem et biopsies). Diminution modérée des récepteurs nicotinique et muscarinique M2, mais pas M1 dans les aires corticales et l'hippocampe en post-mortem. Effet plus précoce chez les patients APOE4.
Somatostatine	Diminution nette dans le cortex et l'hippocampe en post-mortem mais pas en biopsie. Diminution modérée des récepteurs SRIF- I dans les aires corticales et l'hippocampe en post-mortem.
Galanine	Augmentation modérée de l'immunoréactivité dans le noyau basal de Meynert et ses aires corticales de projection
Sérotonine	Diminution, dans un sous-groupe de patients, dans le cortex et l'hippocampe en post-mortem et biopsies. Diminution importante des récepteurs 5-HT ₁ and 5-HT ₂ dans les aires corticales et l'hippocampe en post-mortem.
Noradréline	Diminution, dans un sous-groupe de patients, dans le cortex et l'hippocampe en post-mortem et biopsies. Diminution des récepteurs α2A dans le cortex, l'hypothalamus et le cervelet en post-mortem.
Dopamine	Diminution modérée, corticale et striatale, observée dans quelques cas ; généralement non affectée.
CRF Substance P	Diminution possible des peptides et de leurs récepteurs corticaux dans des études isolées.
Neuropeptide Y et acides aminés excitateurs	Pas de consensus jusqu'à ce jour : des augmentations et des diminutions ont été décrites, ainsi que la présence de dégénérescences neurofibrillaires dans les neurones corticaux.
CCK, Neurotensine Peptides opioïdes, VIP	Pas de modification nette.
GABA, Glycine Taurine	Pas de modification nette.

Tableau I: Résumé des modifications neurochimiques observées dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Les neurotransmetteurs et les neuropeptides sont présentés dans l'ordre croissant d'importance de l'atteinte. Ce tableau est tiré de l'article Epelbaum et collaborateurs (1996).

cortex temporal. Enfin, des souris déficientes en apolipoprotéine E présentent également une diminution de l'activité de cet enzyme dans le cortex temporal et l'hippocampe par rapport aux souris témoins (Gordon *et al.*, 1995). Il semble donc exister une relation entre l'apolipoprotéine E et ces déficits cholinergiques.

A tous les niveaux du système cholinergique, qu'il s'agisse de la synthèse de l'acétylcholine, de sa libération synaptique, de son action sur les récepteurs pré- ou post-synaptiques ou de sa recapture, on peut essayer d'agir pour bloquer ou faciliter ce système. La tacrine est un produit actuellement utilisé dans le traitement de certains malades. Ce composé est un inhibiteur de l'acétylcholine estérase, enzyme responsable de la dégradation de l'acétylcholine. La tacrine agit donc en limitant la dégradation de l'acétylcholine. Par contre, il favoriserait la formation de fragments amyloïdes (Lahiri *et al.*, 1994).

D'autres études ont mis en évidence l'existence d'une atteinte importante du système non cholinergique, le système somatostatinergique (pour revue, Beal *et al.*, 1986; Epelbaum, 1986; Epelbaum *et al.*, 1994). Des diminutions, variant de 5 à 80%, ont été décrites dans l'hippocampe (Ferrier *et al.*, 1983; Davies *et al.*, 1980; Rossor *et al.*, 1980; Arai *et al.*, 1984a). Par contre, une étude réalisée sur les biopsies de cortex frontal et temporal ne décrit aucun changement des concentrations en somatostatine suggérant une altération tardive de ce système (Francis *et al.*, 1987).

Des déficits monoaminergiques ont été également décrits.

- Noradrénaline: Une baisse de 30 à 40% de noradrénaline et /ou de l'activité de la dopamine β hydroxylase, son enzyme de synthèse, dans les structures corticales et hippocampiques (Mann *et al.*, 1982; Arai *et al.*, 1984b; Palmer *et al.*, 1987) et sous corticales (Mann *et al.*, 1982; Yates *et al.*, 1981; Arai *et al.*, 1984b).

- Sérotonine: une baisse des concentrations de sérotonine et/ ou de ses métabolites a été décrite dans les structures corticales et sous-corticales (Cross *et al.*, 1983; Arai *et al.*, 1984b; D'Amato *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987; Baker et Reynolds, 1989; Sparks *et al.*, 1992).

- Dopamine: l'existence d'un déficit de ce système est controversée.

Conclusion:

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative décrite comme une détérioration intellectuelle globale. Elle est très hétérogène tant du point de vue génétique que clinique. Plusieurs gènes ont pu être impliqués directement dans les formes familiales à début précoce de la MA (APP, PS-1, PS-2, gène sur le chromosome 12) ou indirectement, comme l'allèle $\epsilon 4$ de l'apo E, dans les cas tardifs de la MA. Malgré cette hétérogénéité, cette maladie se caractérise sur le plan neuropathologique par la présence de 2 types de lésions: les plaques séniles et la dégénérescence neurofibrillaire. Les plaques séniles sont des dépôts extracellulaires dont le composant majeur est le peptide amyloïde. Par contre, la dégénérescence neurofibrillaire correspond à l'accumulation intraneuronale de filaments appariés en hélice dont le composant majeur sont les protéines microtubulaires tau.

II- ETUDE DU PEPTIDE AMYLOÏDE, PRINCIPAL CONSTITUANT DES PLAQUES SÉNILES

II- 1- Description du peptide A β

Le peptide A β est le constituant majeur de la substance amyloïde retrouvée sur la paroi des vaisseaux sanguins cérébraux (Glennner et Wong, 1984) et dans les plaques séniles (Masters *et al.*, 1985). Sa longueur varie de 39 à 42 (43) acides aminés (Prelli *et al.*, 1988; Miller *et al.*, 1993).

II- 1- 1- Modification de la région carboxy-terminale

Des peptides correspondant aux fragments 1-39, 1-40 et 1-42 du peptide A β ont été décrits dans les dépôts amyloïdes (Masters *et al.*, 1985; Prelli *et al.*, 1988; Joachim *et al.*, 1988; Roher *et al.*, 1993a, b, c; Miller *et al.*, 1993). Des anticorps monoclonaux et polyclonaux ont permis de distinguer les peptides A β 1-40 des peptides A β 1-42 (Mak *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1994; Iwatsubo *et al.*, 1994; Yamaguchi *et al.*, 1995). Le peptide A β sous sa forme 1-40 est principalement localisé au niveau des vaisseaux (Suzuki *et al.*, 1994b; Yamaguchi *et al.*, 1995). Pour d'autres, ce serait la forme 1-42 qui représenterait le composant majeur des dépôts cérébro-vasculaires (Roher *et al.*, 1993b). Par contre, au sein des plaques séniles diffuses, les formes 1-42(43) sont les seules formes du peptide amyloïde ayant été identifiées tandis que, dans les plaques séniles compactes, la forme 1-40 du peptide ainsi que de nombreux fragments A β tronqués au niveau des régions amino-ou carboxy-terminales ont pu être mis en évidence.

II- 1- 2- Modification de la région amino-terminale

Une hétérogénéité du peptide A β dans la région amino-terminale a été également mise en évidence au niveau de peptides A β au sein des dépôts amyloïdes (Masters *et al.*, 1985; Roher *et al.*, 1993a; Miller *et al.*, 1993). Cette hétérogénéité se situe au niveau des 11 premiers acides aminés. Le fragment p3 du peptide amyloïde (A β 17-42) constituerait la forme majoritaire des plaques diffuses (Gowing *et al.*, 1994).

II- 1- 3- Structure du peptide A β

Le peptide A β agrégé présente une conformation en feuillets β plissés antiparallèles (Kirschner *et al.*, 1986; Halverson *et al.*, 1990). Aux pH physiologiques, le peptide A β 1-28, correspondant à la partie amino-terminale du peptide A β , s'agrège et adopte une structure oligomérique en feuillets β (Barrow et Zagorski, 1991). Cependant, la partie C-terminale, s'étendant des acides aminés 29 à 42, est constituée d'acides aminés très hydrophobes et est capable de s'agréger indépendamment des conditions de solvant, de pH et de température (Barrow et Zagorski, 1991).

II- 2- Métabolisme de l'A β

Ce peptide amyloïde résulte du clivage aberrant d'une protéine de taille beaucoup plus importante appelée APP pour le terme anglais *Amyloid Precursor Protein* et non d'un épissage aberrant de ce précurseur de l'amyloïde (Kang *et al.*, 1987).

II- 2- 1- Structure du gène de l'APP

Ce gène est localisé sur le bras long du chromosome 21 et s'étend sur 400 kbps (Lamb *et al.*, 1993). Il comporte 19 exons numérotés de 1 à 18 avec insertion d'un exon, appelé 13a, entre les exons 13 et 14. Différents transcrits sont produits par épissage alternatif et conduisent aux isoformes appelées APP365, 563, 677, 695, 696, 714, 733, 751, 752 et 770 (FIGURE 3).

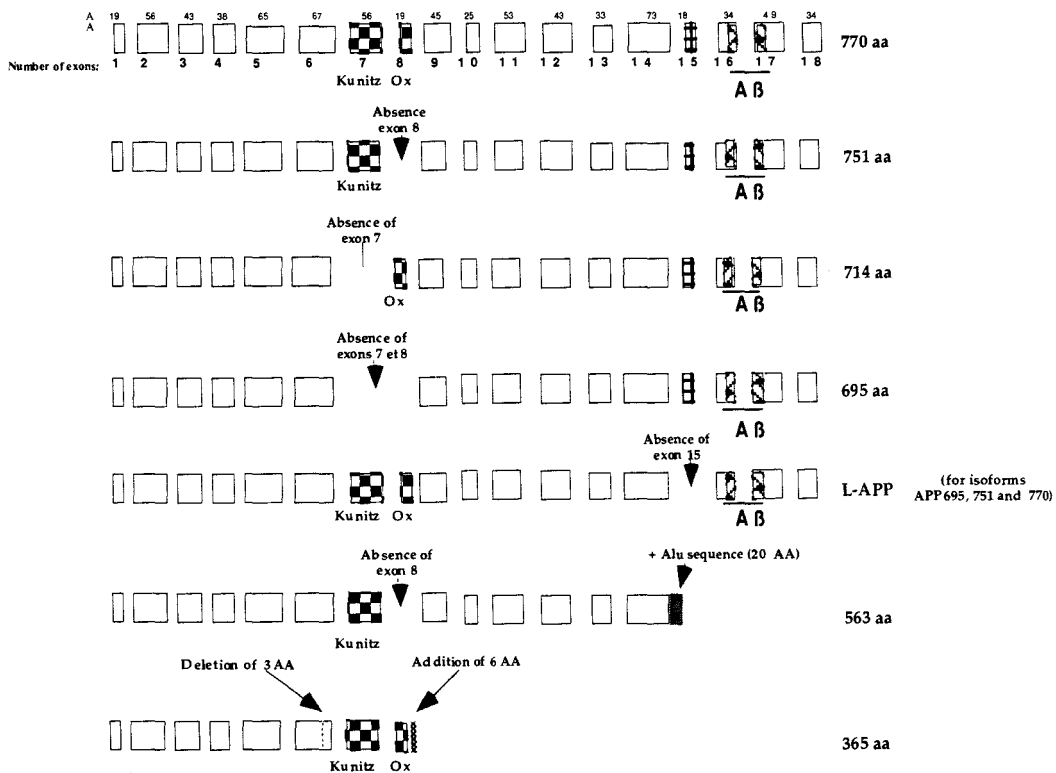


FIGURE 3

L'APP695 a été la première forme décrite du précurseur. Il est codé par 16 exons (**FIGURE 3**) (Lemaire *et al.*, 1989). Cet ARN messager conduit à une protéine de type récepteur membranaire possédant un seul domaine transmembranaire (Kang *et al.*, 1987).

Les isoformes 714, 751 et 770 présentent la même structure que l'APP695 mais résultent de transcrits plus longs, possédant un ou deux exons supplémentaires. Ainsi, la présence de l'exon 7, dans les formes APP751 et 770, conduit à l'insertion d'une région homologue aux inhibiteurs de protéases de type Kunitz (Ponte *et al.*, 1988; Tanzi *et al.*, 1988; Kitaguchi *et al.*, 1988). La présence de l'antigène OX-2 résulte, quant à elle, de l'expression de l'exon 8 (APP714 et APP770) (Kitaguchi *et al.*, 1988; Golde *et al.*, 1990). Les formes APP677, 696, 733 et 752 résultent d'un autre mode d'épissage décrit plus récemment dans les leucocytes et les cellules microgliales (König *et al.*, 1992). Ces L-APP se distinguent des APP695, 714, 751 et 770 par l'absence de l'exon 15.

Deux autres isoformes plus petites, l'APP365 et l'APP563, ont également été décrites (Jacobsen *et al.*, 1991; De Sauvage et Octave, 1989). Elles se distinguent notamment des autres formes de l'APP par l'absence des exons 16 et 17. Ces deux isoformes ne contiennent donc pas le peptide A β et ne sont pas, par conséquent, amyloïdogéniques. Il faut noter que l'APP563 est la seule isoforme contenant l'exon 13a.

II- 2- 2- Distribution tissulaire de l'APP

L'APP est une protéine ubiquitaire dont les formes 695, 751 et 770 sont les plus fréquentes et contiennent la séquence du peptide A β . L'APP695 est exprimée presque exclusivement par les neurones des systèmes nerveux central et périphérique (Golde *et al.*, 1990; Kang et Müller-Hill, 1990; Arai *et al.*, 1991; Tanaka *et al.*, 1991), alors que les isoformes APP751 et APP770 sont préférentiellement exprimées dans les tissus périphériques (Neve *et al.*, 1988; Golde *et al.*, 1990). Des études d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie ont montré que la principale source d'APP dans le système nerveux

central provient des neurones (Card *et al.*, 1988; Neve *et al.*, 1988). Néanmoins, l'APP est également exprimée par les astrocytes (Mita *et al.*, 1989; Siman *et al.*, 1989) et au niveau de la membrane basale des vaisseaux cérébraux (Haass *et al.*, 1994).

II- 2- 3- Métabolisme de l'APP

L'APP est une glycoprotéine transmembranaire. Les formes matures de l'APP nouvellement synthétisées, via le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, subissent différentes modifications post-traductionnelles: une N- et une O-glycosylation, une sulfatation sur les résidus tyrosyl, ainsi qu'une phosphorylation (Weidemann *et al.*, 1989; Oltersdorf *et al.*, 1990; Suzuki *et al.*, 1992; Knops *et al.*, 1993).

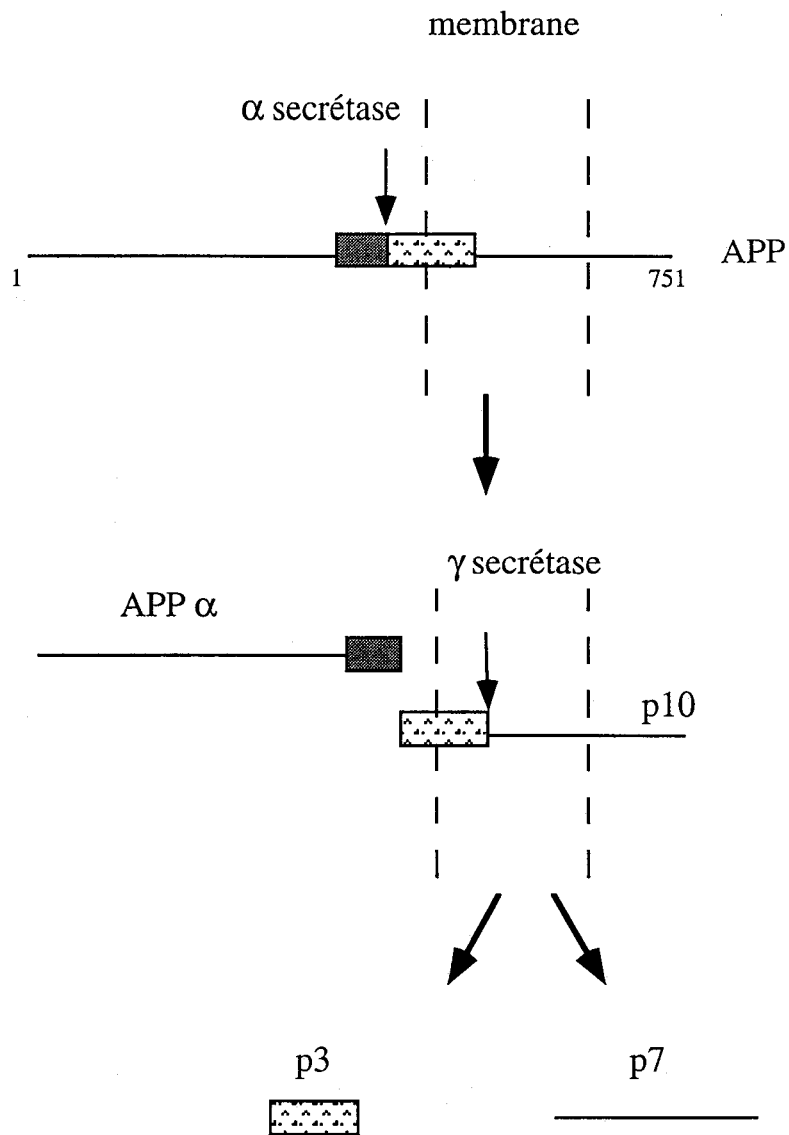
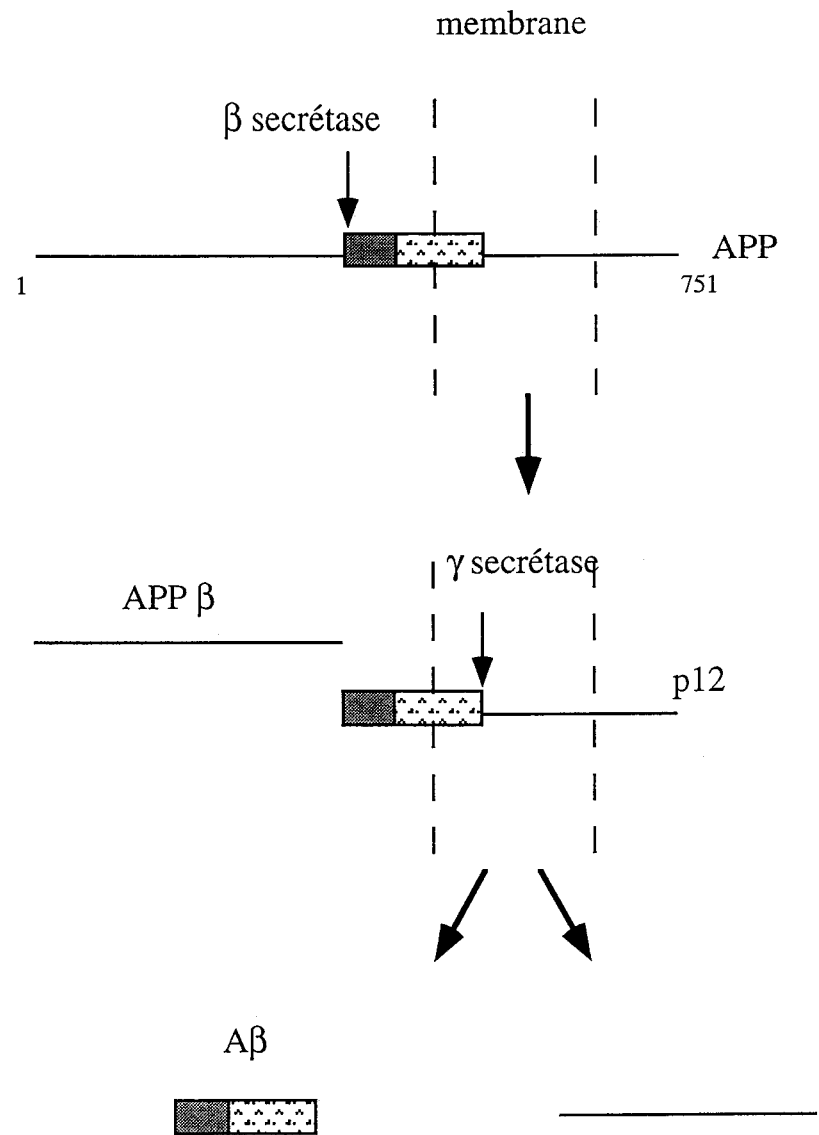
II- 2- 3- 1- Voies de synthèse de l'APP

Par la voie de synthèse classique des protéines membranaires (via le réticulum endoplasmique rugueux et l'appareil de Golgi) l'APP entier pourrait atteindre la membrane plasmique et y être intégré. Plusieurs autres voies métaboliques de l'APP existent et conduisent à différents fragments protéolytiques de cette molécule (**FIGURE 4**). Ainsi, une voie métabolique sécrétoire conduit au clivage de l'APP à l'intérieur de la région correspondant au peptide A β empêchant de ce fait la genèse du peptide amyloïde ainsi que celle de fragments contenant le peptide A β , appelés fragments amyloïdogéniques (Esch *et al.*, 1990; Sisodia *et al.*, 1990). Il s'agit d'une voie non amyloïdogénique impliquant une protéase appelée α -sécrétase. La présence au sein des cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer de dépôts de peptide A β , d'une part, et dans les cerveaux de patients témoins d'autre part, suggérait l'existence d'une autre voie métabolique de l'APP. La libération du peptide A β nécessite deux clivages respectivement localisés en amont et en

FIGURE 4: Produits générés à partir de l'APP selon les voies de synthèse amyloïdogénique ou non -amyloïdogénique.

(A) L'APP est clivé à l'intérieur du peptide amyloïde par l' α -sécrétase. Ce clivage libère un dérivé soluble de l'APP (α APP) et un fragment de 10 kDa, le fragment p10 qui reste intégré dans la membrane. Ce fragment pourra ensuite être protéolysé par un autre enzyme, la γ -sécrétase, et conduire à la genèse des fragments de 3 et 7 kDa respectivement nommés, p3 et p7.

(B) L'APP est clivé en dehors du peptide amyloïde par la β -sécrétase. Ce clivage libère un dérivé soluble de l'APP (β APP) et un fragment de 12 kDa, le fragment p12 qui reste intégré dans la membrane. Ce fragment pourra ensuite être protéolysé par un autre enzyme, la γ -sécrétase, et conduire à la genèse du peptide amyloïde.

A**Voie α secrétase****B****Voie β secrétase**

aval de ce peptide. Cette voie implique donc l'activité de deux enzymes appelées β - et γ -sécrétases.

II- 2- 3- 1- 1- Voie métabolique utilisant l' α -sécrétase...

II- 2- 3- 1- 1- 1- Principe

L'APP est transporté par l'intermédiaire de vésicules de sécrétion vers la membrane plasmique où il est intégré. Le clivage de l'APP par l' α -sécrétase se ferait entre les résidus 16 et 17 de l'A β au cours de cette maturation dans un compartiment intracellulaire tardif de la voie sécrétrice traditionnelle, au niveau du trans-Golgi (Esch *et al.*, 1990; De Strooper *et al.*, 1992, 1993; Sambamurti *et al.*, 1992; Sisodia *et al.*, 1992) (**FIGURE 4**). Elle génère un fragment amino-terminal, l' α APP, qui est rapidement sécrété dans le domaine extracellulaire. La partie C-terminale de 10 à 11 kDa, appelée également p10, demeurant intégrée dans la membrane peut être ensuite réinternalisée puis dégradée par la voie Endosome/Lysosome (Kuentzel *et al.*, 1993). Néanmoins, il semble que l'APP puisse échapper au clivage intracellulaire réalisé par l' α -sécrétase et être inséré sous sa forme complète dans la membrane plasmique (Nordstedt *et al.*, 1993; Koo et Squazzo, 1994). Dans ce cas, des fragments amino-terminaux peuvent également être sécrétés dans le milieu de culture conditionné (Haass *et al.*, 1992a; Koo et Squazzo, 1994) tandis que le fragment C-terminal peut comme dans le cas précédent être réinternalisé puis dégradé par les lysosomes (Haass *et al.*, 1992a). Ces résultats suggèrent donc la présence de l' α -sécrétase au niveau de la membrane plasmique, au moins pour certains types cellulaires.

II- 2- 3- 1- 1- 2- Enzymes candidates

A ce jour, l'identité de l' α -sécrétase n'a pas été déterminée même si sa localisation intracellulaire ou membranaire permet de proposer certaines enzymes candidates.

Ainsi, certaines enzymes sont capables d'imiter l'activité de l' α -sécrétase intracellulaire. Il s'agit de la cathepsine B (Tagawa *et al.*, 1991), du complexe protéasique multicatalytique (Kojima et Omori, 1992) et d'une métalloprotéase, isolée à partir de tissu cérébral humain, dont le poids moléculaire varie de 105 à 120 kDa (Mc-Dermott et Gibson, 1991). L'endopeptidase 3.4.24.11 (Marks *et al.*, 1994), une métalloprotéinase dépendante du calcium (Allsop *et al.*, 1991), une métallopeptidase membranaire (Roberts *et al.*, 1994) ainsi qu'une activité protéasique associée à l'acétylcholinestérase (Small *et al.*, 1991) sont autant de candidates potentielles de l'activité α -sécrétase qui serait liée à la membrane plasmique.

II- 2- 3- 1- 2- Voie métabolique utilisant la β -sécrétase ...

II- 2- 3- 1- 2- 1- Principe

Une autre voie métabolique de l'APP a été décrite. Le clivage de l'APP est réalisé par une protéase appelée β -sécrétase qui coupe l'APP juste en amont du peptide A β et non plus dans la séquence correspondant à ce peptide (Mori *et al.*, 1992; Haass *et al.*, 1992b; Seubert *et al.*, 1992) (**FIGURE 4**). Ce clivage conduit à la production d'un fragment contenant le peptide A β dont le poids moléculaire varie de 12 à 13 kDa, encore appelé P12, et d'un fragment amino-terminal appelé β APP. Cette voie est par conséquent dite amyloïdogénique.

II- 2- 3- 1- 2- 2- Enzymes candidates

De nombreuses protéases capables de mimer l'activité β -sécrétase ont été proposées: les cathepsines D et G (Sahasrabudhe *et al.*, 1993; Dreyer *et al.*, 1994; Chevallier *et al.*, 1997), la chymotrypsine et la clipsine, une protéase chymotrypsine-like, (Nelson et Siman, 1990; Sahasrabudhe *et al.*, 1993), l'endopeptidase 3.4.24.11 (McDermott *et al.*, 1992), des protéases dépendentes du calcium (Abraham *et al.*, 1991; Razzaboni *et al.*, 1992), des métalloprotéases (Schönlein, *et al.*, 1994), ainsi que l'APP lui-même (Papastoitsis *et al.*, 1994).

II- 2- 3- 1- 2- 3- Localisation cellulaire de cette activité enzymatique

Trois localisations cellulaires de l'activité β -sécrétase ont été identifiées à ce jour.

- Une voie dite Endosome/Lysosome

L'APP serait dégradé après sa réinternalisation dans les endosomes puis les lysosomes. Le fragment amyloïdogénique serait alors libéré par exocytose (Koo et Squazzo, 1994). Cette voie semble quasiment ubiquitaire puisque, à la fois, des neurones ou des cellules non neuronales, en culture primaire, ainsi que de nombreuses lignées cellulaires utilisent cette voie amyloïdogénique. Néanmoins cette voie est mineure dans la production d'A β (Haass *et al.*, 1992a,b; Koo et Squazzo, 1994; Lai *et al.*, 1995; Thinakaran *et al.*, 1996).

- Une voie β -sécrétase alternative

Le clivage de l'APP dans cette voie serait réalisé dans un compartiment acide, vraisemblablement au niveau des vésicules provenant de l'appareil de Golgi; ce serait donc une voie sécrétrice (Shoji *et al.*, 1992; Busciglio *et al.*, 1993; Haass *et al.*, 1993). De nombreux types cellulaires d'origine neuronale ou non neuronale présentent cette voie comme source de production du peptide A β (Busciglio *et al.*, 1993; Morato et Mayor, 1993; Araki *et al.*, 1994). Cette voie semble être la voie la plus importante utilisée pour la production du peptide A β par des cellules transfectées par l'APP portant les mutations suédoises puisque l'élimination du domaine C-Terminal portant le signal de réinternalisation ne diminue pas la production d'A β par ces cellules (Haass *et al.*, 1995; Essalmani *et al.*, 1996).

- Une troisième voie β -sécrétase

Le fragment amino-terminal, APP β , généré par le clivage de l'APP par la β -sécrétase, a été localisé au niveau du réticulum endoplasmique des cellules neuronales postmitotiques humaines en culture, les cellules NT2N (Chyung *et al.*, 1997). Ces résultats suggèrent donc l'existence d'une activité β -sécrétase dans ce compartiment cellulaire.

II- 2- 3- 1- 3- Clivage par la γ -sécrétase...

II- 2- 3- 1- 3- 1- Principe

La γ -sécrétase peut cliver le fragment C-terminal de 10 kDa pour produire deux fragments de 3 et 7 kDa appelés respectivement P3 et P7. La position de ce site de coupure n'est pas connue.

La γ -sécrétase peut également agir sur le fragment P12 libéré par la β sécrétase et représente la dernière étape du processus conduisant à la libération du peptide A β . La γ -sécrétase clive ce fragment à des sites différents conduisant à la formation des peptides amyloïdes de 40 et 42 acides aminés (Seubert *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1994; Turner *et al.*, 1996).

II- 2- 3- 1- 3- 2- Enzymes candidates

Peu de données existent quant à l'identité possible de la γ -sécrétase. Pourtant, une proline endopeptidase (Ishiura *et al.*, 1990), la calpaïne inhibiteur 1 (Klafki *et al.*, 1995), l'ellastase, la collagénase (Evin *et al.*, 1995) sont des candidates potentielles. Une autre enzyme candidate a été proposée: la cathépsine D (Evin *et al.*, 1995). En effet, l'activité γ -sécrétase est active à un pH acide et est inhibée par la pepstatine, deux caractéristiques de cette protéinase lysosomiale. Mais son implication en tant que γ -sécrétase est controversée par l'étude de Saftig et coll. (1996). Enfin, une étude récente a isolé une autre enzyme immunolocalisée dans le cerveau de patient Alzheimer et notamment au niveau de cellules microgliales. Elle a été cartographiée dans une région qui montre une liaison génétique avec les cas tardifs des formes familiales de la maladie d'Alzheimer (région 19q13.3). Par contre, elle n'est pas détectée chez les rongeurs. Cette enzyme a été appelée Zyme et

conduit à la production de fragments amyloïdogéniques lorsqu'elle est exprimée dans des cellules humaines (Little *et al.*, 1997).

II- 2- 3- 2- Localisation des voies de synthèse

L'importance de chacune de ces voies semble dépendre du type cellulaire étudié. Ainsi dans les cellules non neuronales, l'APP serait préférentiellement métabolisé par la voie non amyloïdogénique de l' α -sécrétase. Par contre, les cellules neuronales présentent une activité β sécrétase plus importante (Busciglio *et al.*, 1993; Wertkin *et al.*, 1993). Des cellules de neurones humains postmitotiques, les NT2N, présentent une voie β -sécrétase conduisant à la production intracellulaire de β APP, d'A β 1-40 et A β 1-42 (Turner *et al.*, 1996; Chyung *et al.*, 1997) qui semble être prédominante par rapport à la voie de l' α -sécrétase (Chyung *et al.*, 1997). Ce n'est pas le cas semble-t-il pour une autre lignée humaine de neuroblastomes, les cellules SKNSH-SY 5Y. En effet, la rétention de l'APP695 dans le réticulum endoplasmique rugueux ne conduit ni à la sécrétion de peptide A β , ni à l'établissement de la voie β -sécrétase (Peraus *et al.*, 1997). A l'heure actuelle, aucune autre lignée cellulaire ne semble produire de β APP intracellulaire lorsqu'elle exprime l'APP non muté (Seubert *et al.*, 1993; Haass *et al.*, 1995a; Thinakaran *et al.*, 1996). Néanmoins, l'expression de l'APP portant les mutations suédoises au sein de cellules de type neuronal ou non est capable de provoquer non seulement une augmentation de la sécrétion de peptide A β (Citron *et al.*, 1992, Cai *et al.*, 1993) mais également la production intracellulaire de β APP (Haass *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 1995b; Thinakaran *et al.*, 1996). Ces cellules utilisent principalement la voie endosome/lysosome ou celle utilisant des vésicules provenant du Golgi tandis que les cellules NT2N empruntent au moins une voie supplémentaire, la voie qui est localisée au niveau du réticulum endoplasmique (Chyung *et al.*, 1997).

La localisation de l'activité γ -sécrétase semble également différente selon les cellules étudiées. Dans les cellules non-neuronales, cette activité serait localisée au niveau de la membrane plasmique ou peu éloignée de celle-ci puisque les peptides A β 1-40 et A β 1-42 sont directement sécrétés après leur synthèse (Haass *et al.*, 1992, 1993; Shoji *et al.*, 1992; Hartmann *et al.*, 1997). Par contre, cette synthèse est intracellulaire dans les cellules NT2N et la genèse du peptide A β 1-42 est réalisée précocément dans la voie sécrétrice; elle a été localisée au niveau du réticulum endoplasmique (Cook *et al.*, 1997). Hartmann et collaborateurs (1997) confirment qu'au sein de cellules neuronales, le peptide A β 1-42 est produit au niveau du réticulum endoplasmique et montrent que l'A β 1-40 apparaît plus tardivement que la forme A β 1-42, au niveau du trans-Golgi.

II- 2- 3- 3- Régulation du métabolisme de l'APP

La protéine kinase C (PKC) jouerait un rôle pivot dans le contrôle du métabolisme de l'APP et au niveau de la formation du peptide A β . Ainsi il a été suggéré que la stimulation de la PKC inhibe la production du peptide amyloïde dans des cellules d'origine astrocytaire ou gliale et dans des cellules COS (Gabuzda *et al.*, 1993; Buxbaum *et al.*, 1993). La stimulation de la PKC par ces esters de phorbol n'entraîne pas la phosphorylation directe de l'APP mais agirait au niveau d'autres substrats permettant l'accélération du métabolisme vers une voie non-amyloïdogénique (Buxbaum *et al.*, 1993; Hung et Selkoe, 1994). Cette voie de transduction ferait intervenir la phospholipase C et le diacylglycérol (Gabuzda *et al.*, 1993). La stimulation des récepteurs muscariniques par des agonistes cholinergiques (acétylcholine, carbachol) favorisant la voie non amyloïdogénique de l'APP serait médiée par la phospholipase C (Nitsch *et al.*, 1992; Buxbaum *et al.*, 1994). De plus, la diminution de la production du peptide A β , observée après traitement des cellules CHO transfectées par l'APP751 par des esters de phorbol,

résulterait de la diminution de l'APP à la surface membranaire. Cette diminution d'APP membranaire proviendrait de l'augmentation de l'endocytose permettant le clivage de l'APP par l' α -sécrétase et donc la diminution du peptide amyloïde (Koo, 1997).

L'acide okadaïque, inhibiteur des protéines phosphatases 1 et 2A, induit une augmentation de la sécrétion de l'APP confirmant que le métabolisme de l'APP est dépendant des équilibres entre événements de phosphorylation et de déphosphorylation (Caporaso *et al.*, 1992).

La concentration élevée de calcium favoriserait la production et la libération du peptide A β (Querfurth et Selkoe, 1994). La voie non amyloïdogénique est effectivement favorisée par l'administration de drogues qui agissent sur la concentration intracellulaire de calcium (Buxbaum *et al.*, 1994). Les interleukines (IL-1; IL-1 β) ou les oestrogènes (17 β -oestradiol) auraient un effet similaire (Buxbaum *et al.*, 1992; Vasilakos *et al.*, 1994; Jaffé *et al.*, 1994).

Les mutations sur les gènes de l'APP, des présénilines 1 et 2, conduisent à une augmentation de la formation du peptide A β . Ainsi, la mutation 717 du gène de l'APP interférerait sur le métabolisme de l'APP en favorisant le clivage situé dans la partie carboxy-terminale du peptide A β qui conduit à la formation plus importante d'un peptide plus long (42 à 43 acides aminés). Cette augmentation conduirait à l'apparition de dépôts amyloïdes dont la quantité augmente avec l'âge (Games *et al.*, 1995). Les souris transgéniques présentent également d'autres lésions neuropathologiques retrouvées chez les patients Alzheimer: une astrocytose, des plaques neuritiques ainsi qu'une diminution du nombre de synapses. La présence de ces 2 à 3 acides aminés supplémentaires, dans sa partie carboxy-terminale, entraîne une augmentation de l'hydrophobie et de l'insolubilité du peptide A β 1-42. Cela expliquerait l'agrégation du peptide A β à faible concentration (Tamaoka *et al.*, 1994). Les mutations 670 et 671 favorisent également ce clivage et

augmentent ainsi la concentration du peptide A β libéré facilitant son agrégation (Citron *et al.*, 1992).

Cette augmentation, pour les souris transgéniques produisant l'APP695, est accompagnée d'une altération comportementale (Hsiao *et al.*, 1996). L'accumulation du peptide A β induirait la DNF. Les formes mutées des présénilines, PS1 et PS2, sont capables lorsqu'elles sont exprimées dans des lignées cellulaires après transfection (Borchelt *et al.*, 1996; Citron *et al.*, 1997; Tomita *et al.*, 1997; Xia *et al.*, 1997a), ou dans des souris transgéniques (Borchelt *et al.*, 1996; Duff *et al.*, 1996; Citron *et al.*, 1997), d'augmenter de manière significative la production d'A β 1-42. Puisque les présénilines et l'APP sont exprimés dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Kovacs *et al.*, 1996; Cook *et al.*, 1996; Walter *et al.*, 1996; De Strooper *et al.*, 1997), une interaction entre ces molécules est possible. Effectivement Xia et collaborateurs (1997b) ont montré l'existence de complexes entre les présénilines et l'APP au niveau de ces deux compartiments cellulaires et suggèrent donc que les mutations sur les présénilines pourraient altérer la conformation de l'APP favorisant son accessibilité à la γ -sécrétase qui cliverait spécifiquement au résidu 42 de l'A β .

II- 2- 4- Fonctions de l'APP

L'APP est une protéine hautement conservée au cours de l'évolution (Rosen *et al.*, 1989). De plus, sa distribution tissulaire et son abondance dans des cellules comme les neurones sont en faveur d'un (ou de) rôle(s) encore mal connu(s) pour ce précurseur.

La première fonction décrite impliquait la présence d'un domaine homologue aux inhibiteurs de protéases de type kunitz. Ce motif de type kunitz est capable de protéger la protéine d'une dégradation par certaines protéases à sérine (Kitagushi *et al.*, 1988; Oltersdorf *et al.*, 1989; Van Nostrand *et al.*, 1989). Il pourrait également intervenir en favorisant la croissance cellulaire (Saitoh *et al.*, 1989; Ninomiya *et al.*, 1993), l'adhésion

et les interactions cellulaires ou l'attachement de cellules de type neuronal par interaction avec des constituants de la matrice extracellulaire, comme la fibronectine, la laminine, les protéoglycannes, le collagène de type IV (Schubert *et al.*, 1989; Klier *et al.*, 1990; Breen *et al.*, 1991; Chen et Yankner, 1991; Milward *et al.*, 1992). Il peut aussi favoriser la croissance de neurites (Qiu *et al.*, 1995). Une fonction neuroprotectrice, en régulant négativement le niveau du calcium intracellulaire, a également été proposée (Mattson *et al.*, 1993a). Enfin, du fait de sa structure, l'APP pourrait représenter un récepteur membranaire. En effet, l'APP interagirait grâce à sa partie carboxy-terminale avec les protéines G₀ et influencerait par conséquent la transduction de signaux cellulaires (Nishimoto *et al.*, 1993) qui pourrait aboutir à l'activation de certaines kinases, les jun kinases (Nishimoto *et al.*, 1993; Okamoto, 1995, 1996). Des sites potentiels de phosphorylation ainsi qu'un signal d'internalisation (NPTY) (s'étendant des résidus Asn749 à Tyr762) ont été également découvert dans la partie carboxy-terminale (Gandy et Greengard, 1994; Haass *et al.*, 1992a) impliquant l'APP en tant que récepteur membranaire même si son ligand naturel n'a pas été identifié à ce jour.

II- 3- Fonction du peptide amyloïde

Le peptide A β est le principal composant des plaques séniles. Néanmoins, le peptide A β a été détecté dans le liquide céphalo-rachidien et le plasma de personnes saines (Seubert *et al.*, 1992; Shoji *et al.*, 1992). Il peut également être sécrété par des cellules neuronales et non neuronales mais les cellules gliales pourraient constituer la source majeure d'A β (Busciglio *et al.*, 1993). La synthèse normale du peptide A β suggère un rôle physiologique pour ce peptide.

In vitro, le peptide A β ainsi que des fragments de longueur variable (A β 1-28, A β 1-38) peuvent induire lorsqu'ils sont ajoutés en faible concentration (de 1 nM à 10 μ M) une activité trophique sur des cultures primaires de neurones de rat (Whitson *et al.*, 1989;

Yankner *et al.*, 1990). Cette action neurotrophique est caractérisée par une augmentation de la survie neuronale et de la croissance neuritique (Whitson *et al.*, 1990; Pike *et al.*, 1991). L'ajout de constituants de la matrice cellulaire, tels que la fibronectine ou la laminine, au peptide A β favorise la croissance neuritique (Koo *et al.*, 1994).

Par contre à des concentrations plus élevées (comprises entre 10 et 100 μ M), le peptide A β agrégé aurait un effet neurotoxique sur des cultures de neuroblastomes humains ou de pheochromocytomes de rat, les PC12 (Behl *et al.*, 1994; Shearman *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1994). La séquence comprise entre les résidus 25 et 35 a été identifiée comme la séquence neurotoxique (Yankner *et al.*, 1990). La conformation du peptide A β pourrait moduler son agrégation sous la forme de filaments et donc son rôle neurotoxique. En effet, la forme fibrillaire insoluble du peptide, favorisée par certaines protéines ou métaux lourds, pourrait expliquer directement le pouvoir neurotoxique du peptide amyloïde (Mattson *et al.*, 1992; Soto *et al.*, 1995). De plus, l'ajout de rouge congo, capable de se lier au peptide A β , atténuerait l'effet toxique du peptide (Li *et al.*, 1996). Cette forme agrégée serait donc plus toxique que les peptides sous leur forme soluble (pour revue: Selkoe *et al.*, 1994). Ces fibrilles pourraient interagir avec des récepteurs membranaires capable de reconnaître leur structure en feuillets β conduisant à l'activation aberrante de voies de transduction de signaux (pour revue, Yankner, 1996). Ce mécanisme fournirait une explication à la phosphorylation des protéines tau induite par ce traitement (Busciglio *et al.*, 1995). Le peptide amyloïde pourrait ainsi modifier l'homéostasie cellulaire du calcium (Busciglio *et al.*, 1993; Mattson *et al.*, 1993a), s'intégrer dans la membrane plasmique pour former un ionophore (Arispe *et al.*, 1993; Mirzabekov *et al.*, 1994), provoquer la production de radicaux libres (Goodman *et al.*, 1994; Suo *et al.*, 1997). Selon certains auteurs, la mort cellulaire résulterait d'une nécrose (Suzuki, 1997) ou d'une apoptose (Li *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1997).

Cependant la toxicité observée est induite à de très hautes doses de peptide amyloïde qui sont éloignées des conditions physiologiques. Dans certains systèmes,

d'autres facteurs, comme la différenciation cellulaire ou la fragilisation membranaire sont nécessaires pour obtenir une toxicité. En effet, l'addition au peptide A β d'autres composés, tels que la vitamine E (Behl *et al.*, 1992), le FGF (Fibroblast Growth Factor) (Mattson *et al.*, 1993c), le NGF (Yankner *et al.*, 1990), l'acide rétinoïque (Lambert *et al.*, 1994), favoriserait l'effet toxique du peptide amyloïde.

II- 4- Composés se liant au peptide A β

Différentes liaisons du peptide amyloïde avec d'autres composants ont également été décrites. Ainsi, il pourrait en interagissant avec le composé C1q de la cascade du complément activer cette cascade (Rogers *et al.*, 1992), se lier à l'héparine qui aurait un rôle dans l'adhésion cellulaire (Cardin et Weintraub, 1989), les héparanes sulfates protéoglycannes (Fraser *et al.*, 1992; Snow *et al.*, 1994), et se lier à l' α -1 antichymotrypsine *in vitro* (Potter *et al.*, 1991). L'assemblage du peptide amyloïde en fibrilles pourrait être catalysé par certains composés tels que les métaux lourds, comme le zinc et l'aluminium (Mantyh *et al.*, 1993; Bush *et al.*, 1994; Fasman *et al.*, 1995), l'apolipoprotéine E ou les protéoglycannes. Ces deux derniers seront plus spécialement étudiés.

II- 4- 1- Les protéoglycannes

Les protéoglycannes sont des macromolécules ubiquitaires constituées de chaînes glycaniques, les glycosaminoglycannes (GAGs), qui sont liées de manière covalente à un axe protéique. Leur masse s'échelonne de 25 à 2000 kDa (pour revue: Small *et al.*, 1996). Dans le système nerveux central, les protéoglycannes sont synthétisés par les neurones et les cellules gliales.

Dans la maladie d'Alzheimer, ces protéoglycannes ont été associés aux dépôts amyloïdes (Snow *et al.*, 1988). Ils sont capables de s'associer au peptide A β (Buée *et al.*, 1993) mais aussi aux isoformes majeures de l'APP (APP695, APP751, APP770) (Narindrasorasak *et al.*, 1991; Buée *et al.*, 1993). A la fois l'axe protéique et la partie glycanne semblent impliqués dans cette interaction qui est modulée par les modifications post-traductionnelles des protéoglycannes (Leveugle *et al.*, 1995).

II- 4- 2- L'apolipoprotéine E (apo E)

Un autre constituant associé au peptide A β a pu également être mis en évidence; il s'agit de l'apolipoprotéine E (Buée *et al.*, 1995; Permanne, 1996).

L'apo E avait déjà été localisée au niveau des lésions neuropathologiques, dont les plaques séniles, dans le tissu cérébral de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Namba *et al.*, 1991). Basé sur cette observation, il a été suggéré que l'apo E pourrait médier l'obtention de la conformation en feuillets β plissés du peptide A β (Wiesniewski et Frangione, 1992).

Effectivement, des études *in vitro* ont montré que l'apo E et l'A β pourraient interagir. Ils forment des complexes stables indiquant une forte liaison entre ces deux molécules (Strittmatter *et al.*, 1993; Wisniewski *et al.*, 1993; LaDu *et al.*, 1994, 1995; Zhou *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1997) (**FIGURE 5**). L'apo E influencerait *in vitro* la fibrillogénèse de l'A β en réduisant le taux de polymérisation du peptide (Evans *et al.*, 1995). Cependant, l'interaction A β -apo E semble dépendre de l'isoforme mais aussi du mode de préparation de l'apo E étudiée. En effet, l'apo E3 native, provenant de la sécrétion dans le milieu conditionné de cellules transfectées ou de plasma, est capable de former plus efficacement des complexes avec l'A β (20 fois plus) que l'isoforme apo E4 purifiée de manière similaire (La Du *et al.*, 1994, 1995). Par contre, lorsque ces protéines sont délipidées et dénaturées lors de leur purification, l'apo E4 devient alors plus efficace

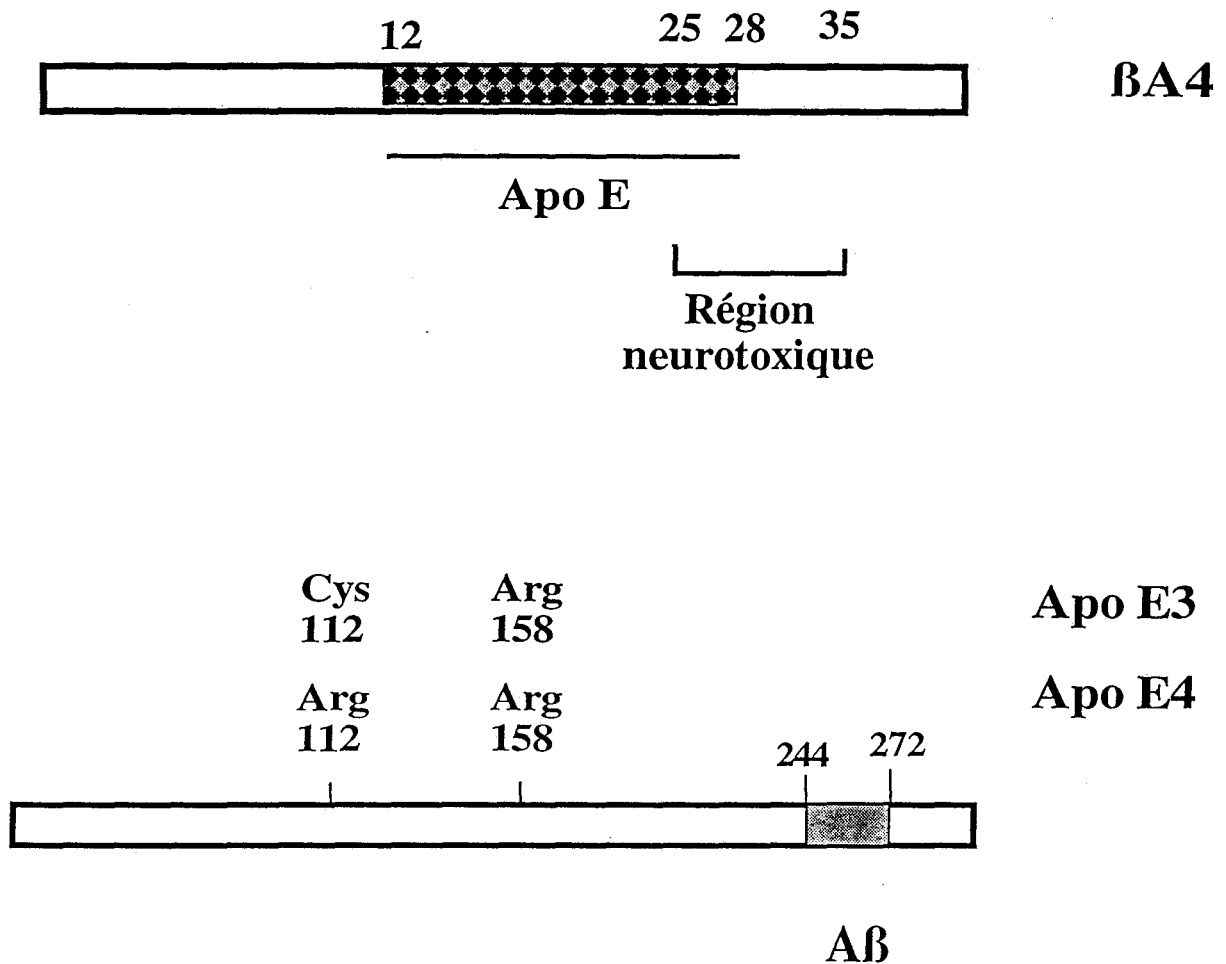


FIGURE 5: Représentation schématique de la localisation des domaines impliqués dans les interactions entre le peptide amyloïde et les isoformes E3 et E4 de l'apo E. La région responsable de l'effet toxique du peptide Aβ (s'étendant des résidus 25 à 35) est également schématisée.

dans la formation de complexes avec l'A β que l'apo E3 (Strittmatter *et al.*, 1993; La Du *et al.*, 1995). L'apo E2 semble se comporter comme l'apo E3 qu'elle soit dénaturée ou non (La Du *et al.*, 1997) et pourrait même se lier de façon plus efficace que l'apo E3 (Aleshkov *et al.*, 1997).

In vitro, l'apo E4 purifiée est capable d'induire plus efficacement la formation de fibres amyloïdes, denses et étendues, que l'apo E3 (Ma *et al.*, 1994; Sanan *et al.*, 1994; Wisniewski *et al.*, 1994). Par contre, Evans et collaborateurs (1995) montraient un effet inhibiteur de ces deux isoformes dans la formation d'agrégats de faible poids moléculaire du peptide amyloïde. La partie amino-terminale de l'apo E serait responsable de cet effet inhibiteur. Plus récemment, il a été suggéré que la nature du résidu en position 112 de l'apo E native pourrait diriger la liaison apo E-A β , avec la présence d'une cystéine favorisant cette liaison (La Du *et al.*, 1997). *In vitro*, l'apo E peut interagir avec le peptide A β au niveau de ces domaines amino- et carboxy-terminaux de manière différente et que la liaison préalable de l'apo E aux lipides, en tant que transporteur, modulerait également cette interaction. De plus, l'efficacité de liaison des apo E natives est, semble-t-il, inversement corrélée avec le risque de développer la maladie d'Alzheimer familiale ou sporadique à début tardif indiquant que l'apo E interviendrait dans la limitation ou l'inactivation du peptide A β *in vivo* (Aleshkov *et al.*, 1997). *In vitro*, l'effet neurotoxique de l'A β sur les cultures neuronales est limité en présence d'apo E (Whitson *et al.*, 1994; Miyata et Smith, 1996; Puttfarcken *et al.*, 1997).

En conclusion, selon l'isoforme l'apo E favoriserait ou non l'agrégation du peptide amyloïde. D'une part, les isoformes E2 et E3 pourraient agir comme inhibiteur de l'agrégation et de fusion du peptide amyloïde (Pillot *et al.*, 1997). L'apo E4 n'aurait pas cet effet et pourrait être considérée comme un cofacteur de l'amyloïdogénèse. D'autre part, l'apo E pourrait médier l'internalisation du peptide A β en formant un complexe avec celui-ci. Le peptide A β serait alors dégradé par la voie endosome/lysosome dans les neurones.

Beffert et Poirier (1996) rapportaient que l'apo E3 pourrait ainsi protéger les cellules de l'effet toxique du peptide amyloïde tandis que l'isoforme apo E4 aurait un effet opposé.

II- 5- Les fragments amyloïdogéniques carboxy-terminaux

La toxicité du peptide A β sur des cellules en culture et au niveau d'animaux est très variable selon les études. De plus, la dose d'A β doit toujours être très élevée. En effet, l'expression importante du peptide A β par des souris transgéniques ne provoque ni perte neuronale ni la mise en place d'un phénotype Alzheimer (Wirak *et al.*, 1991; Jucker *et al.*, 1992). Par contre, elle peut entraîner une gliose et une apoptose (LaFeria *et al.*, 1995). C'est pourquoi d'autres études sont menées sur la potentielle neurotoxicité d'autres fragments générés à partir de l'APP, les fragments terminaux.

Les fragments carboxy-terminaux d'APP proviennent du métabolisme utilisant la β -sécrétase. Ces fragments de taille variable ont été localisés au niveau des plaques séniles (Selkoe *et al.*, 1988), des paires de filaments en hélice (Caputo *et al.*, 1992), mais également au niveau des enchevêtrements et des neurites dystrophiques des plaques séniles (Ishii *et al.*, 1989; Arai *et al.*, 1990; Shoji *et al.*, 1990; Yamaguchi *et al.*, 1990). Ces fragments sont également retrouvés au niveau de cellules transfectées par l'ADNc de l'APP portant la double mutation KM-NL (Citron *et al.*, 1992; Cai *et al.*, 1993; Golde *et al.*, 1993; Felsenstein *et al.*, 1994).

Certains de ces peptides présentent une forte capacité à s'auto-assembler (Gardella *et al.*, 1993; Kim et Suh, 1996) et il a été rapporté par de nombreuses études que ces fragments amyloïdogéniques C-terminaux pouvaient être toxiques pour les neurones en culture (Yankner *et al.*, 1989; Hayashi *et al.*, 1992; Yoshikawa *et al.*, 1992; Sopher *et al.*, 1994), mais aussi pour les souris transgéniques exprimant ces fragments C-terminaux (Kammesheidt *et al.*, 1992; Arters *et al.*, 1995; Oster-Granite *et al.*, 1996) ou ayant subi

une transplantation de cellules PC12 transfectées par de tels fragments (Neve *et al.*, 1992). Ces transplantations provoquaient une atrophie corticale (Neve *et al.*, 1992; Fukuchi *et al.*, 1994) et le dépôt de peptide amyloïde (Fukuchi *et al.*, 1994). Par contre la transplantation de neurones humains sécrétant l'A β ne causait aucune lésion détectable chez les rongeurs (Mantione *et al.*, 1995).

Ces fragments pourraient provoquer la mort des neurones en formant, comme le peptide A β , des canaux ou des pores dans la membrane plasmique (Fraser *et al.*, 1996; Hartell et Suh, 1996). De plus, certaines souris transgéniques présentaient une dégénérescence neuronale dans l'aire hippocampique (Kammesheidt *et al.*, 1992; Oster-Granite *et al.*, 1996) mais aussi une altération cognitive (Arters *et al.*, 1995).

Il semble que ces fragments peuvent avoir un autre rôle que celui de précurseur de l'A β dans la pathologie de l'Alzheimer.

Conclusion:

Les plaques séniles représentent l'une des 2 lésions neuropathologiques caractéristiques de la MA. Ces plaques sont constituées majoritairement par le peptide amyloïde mais aussi par d'autres constituants tels que l'apo E, un de ses récepteurs, le LRP, des protéines du complément, des protéoglycannes. Ces protéines pourraient agir en tant que "cofacteurs" de l'amyloïdogenèse en favorisant l'accumulation extracellulaire du peptide amyloïde et/ou en favorisant le changement conformationnel du peptide amyloïde d'une structure α en structure feuillet β plissé, lui conférant toxicité et résistance aux protéases. Les mutations sur les gènes PS-1, PS-2 ou sur son précurseur, l'APP favorisent également la production du peptide AB en modifiant le métabolisme de son précurseur.

III- LES PROTÉINES TAU

En 1963, deux équipes montraient indépendamment que les enchevêtrements neurofibrillaires (NFTs) étaient composés de structures filamenteuses accumulées dans le cytoplasme des neurones en dégénérescence (Kidd, 1963; Terry, 1963). Ces structures ont été appelées paires de filaments en hélice ou PHFs (pour le terme anglais *Paired Helical Filaments*) (Kidd, 1963). Les composants antigéniques majeurs de ces PHFs sont des protéines microtubulaires, les protéines tau (Brion et al., 1985; Delacourte and Défossez, 1986; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986a; Kosik *et al.*, 1986; Nukina et Ihara, 1986; Wood *et al.*, 1986).

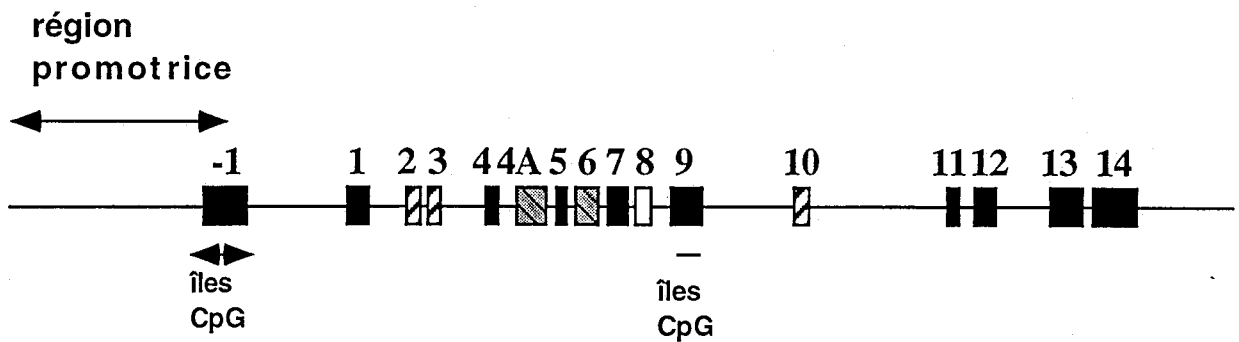
Les protéines tau ont été les premières protéines associées aux microtubules identifiées. En 1975, Weingarten et collaborateurs ont purifié ces protéines tau et ont démontré leur association avec les microtubules. *In vitro*, elles favorisent l'assemblage de ces microtubules (Weingarten *et al.*, 1975). Mais, c'est la mise en évidence des protéines tau au sein des PHFs qui a conduit de nombreuses équipes à étudier le métabolisme de ces protéines.

III- 1- Structure du gène

III- 1- 1- Promoteur

Le gène des protéines tau n'est présent qu'en une seule copie chez l'Homme, la souris, le rat et le boeuf (Drubin *et al.*, 1984; Neve *et al.*, 1986; Himmler, 1989). Chez l'Homme, ce gène a été localisé par hybridation *in situ* sur le bras long du chromosome 17, à la position 17q21 (Neve *et al.*, 1986). Il s'étend sur 100 kpb et contient 16 exons (Andreadis *et al.*, 1992) (**FIGURE 6**). L'analyse du gène des protéines tau a permis

gène



prémessager(s)

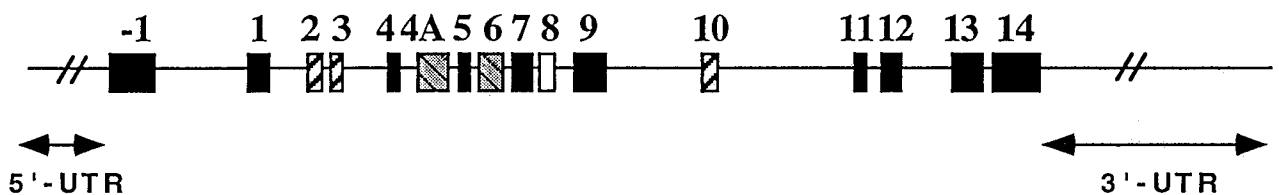


FIGURE 6: Représentation schématique du gène tau humain et de son ou ses pré-messagers. Les exons sont symbolisés par des rectangles dont la taille n'est pas proportionnelle à la taille réelle. Les exons constitutifs sont représentés par des rectangles noirs tandis que les exons retrouvés épissés de manière alternative dans le système nerveux central sont rayés. Les exons 4A et 6, spécifiques du système nerveux périphérique chez la souris, sont rayés et grisés tandis que l'exon 8, jamais mis en évidence chez l'homme, est symbolisé par un rectangle blanc. Les pré-messagers se différencient entre eux par une longueur variable de leurs régions non traduites aux extrémités 5' (5'-UTR) et 3' (3'-UTR).

d'identifier deux îles de CpG correspondant à des régions riches en nucléotides C et G. La première île est associée avec la région promotrice du gène localisée en amont de l'exon -1, et la deuxième est associée à l'exon 9 (Andreadis *et al.*, 1992). Très récemment, deux équipes ont séquencé une région qui s'étend sur plus de 300 pb en amont de l'exon -1 (Andreadis *et al.*, 1996; Sadot *et al.*, 1996b). Son analyse révélait la présence de plusieurs séquences nucléotidiques reconnues par des facteurs de transcription capables d'activer (SP1, AP2) ou d'inhiber (GCF) la transcription (Andreadis *et al.*, 1996). Les deux études montraient également l'absence de la séquence consensus TATA box, encore appelée Golberg Hogness Box, qui est généralement retrouvée de 25 à 35 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription (Andreadis *et al.*, 1996; Sadot *et al.*, 1996b). Cette séquence consensus n'est pas indispensable à l'initiation de la transcription du gène mais son absence augmente l'hétérogénéité de l'extrémité 5' des transcrits primaires ou pré-messagers. Une autre séquence, retrouvée habituellement chez les eucaryotes, la CAAT box, est également absente de la région séquencée. L'abondance des résidus C et G ainsi que l'absence de ces séquences consensus dans la région promotrice analysée sont souvent caractéristiques de gènes exprimés dans tous les tissus et appelés gènes domestiques pour le terme anglais "*Housekeeping genes*". Les travaux développés par Andreadis et collaborateurs (1996) tendraient à montrer l'implication de cette région de 300 pb dans l'expression ubiquitaire du gène tau et pourrait alors expliquer l'expression des protéines tau dans de nombreux tissus (Gu *et al.*, 1996). Par contre, Sadot et collaborateurs (1996b) suggèrent l'implication directe de cette région dans l'expression spécifique du gène tau dans les cellules de type neuronal. Un autre site d'initiation de la transcription semble également exister, ce qui impliquerait la présence de séquences promotrices supplémentaires localisées en amont de la séquence identifiée (Andreadis *et al.*, 1996). Cette nouvelle séquence restant à déterminer pourrait être responsable de l'expression spécifique de tau dans les cellules d'origine neuronale. D'autres études complémentaires seront donc nécessaires pour conclure sur ces résultats contradictoires.

III- 1- 2- Les régions codantes du gène tau

Le gène des protéines tau contient 16 exons (**FIGURE 6**) (Andreadis *et al.*, 1992). dont la numérotation a été, à l'origine, établie établie chez le boeuf (Himmler, 1989).

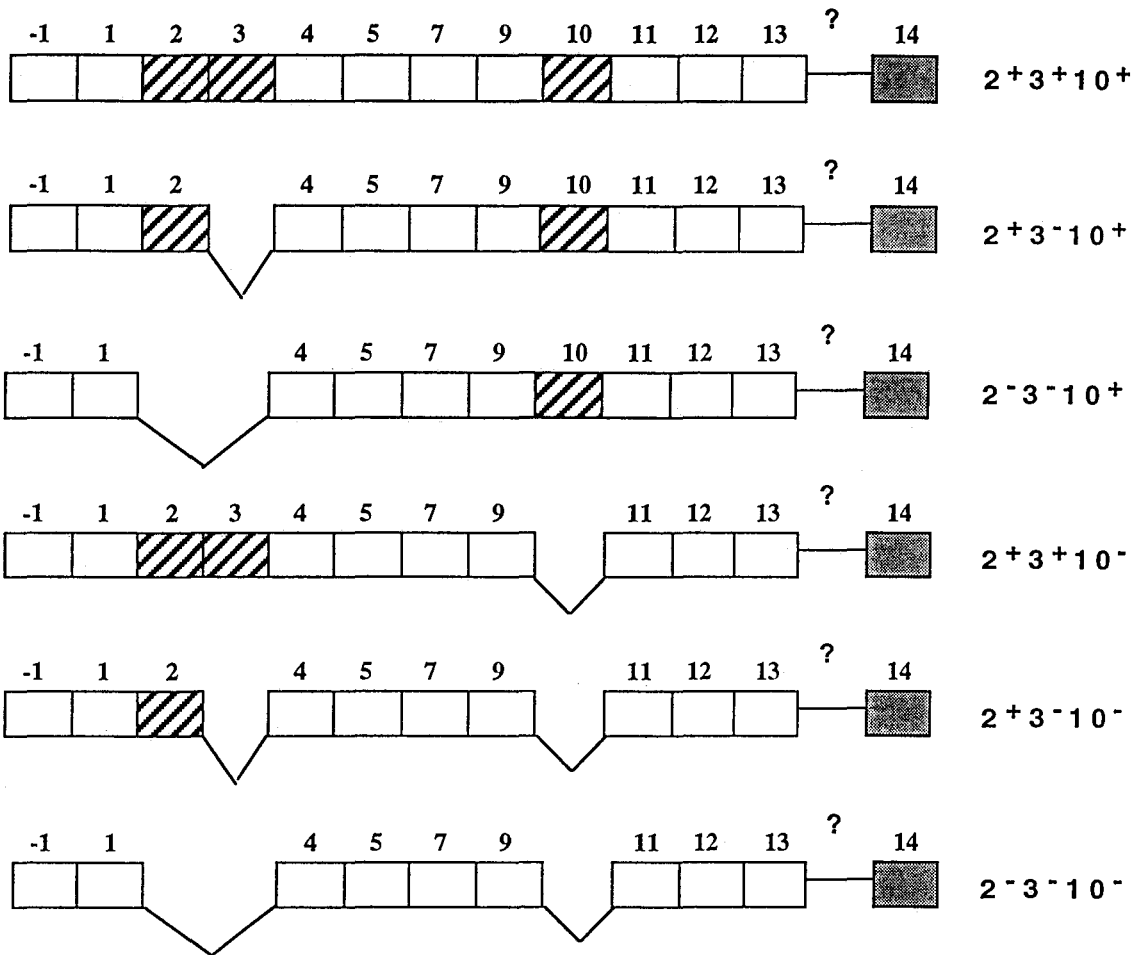
Les exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 et 13 sont exprimés de manière constitutive. Bien que l'exon -1 soit retrouvé dans les différents transcrits de tau, il n'est jamais traduit (**FIGURE 6**).

L'exon 14 est également transcrit et, dans la majorité des cas, il n'est pas traduit. En effet, la plupart des transcrits tau maintiennent l'intron situé entre les exons 13 et 14, ce qui provoque rapidement l'apparition d'un codon stop. Chez la souris, l'épissage de cet intron conduit à l'expression d'une isoforme plus longue (Lee *et al.*, 1988a). Plus récemment, une plus grande hétérogénéité des isoformes de tau dans cette région a également été mise en évidence chez le rat, l'Homme et le boeuf. Cette hétérogénéité s'explique par des combinaisons multiples entre différents sites donneurs et accepteurs d'épissage localisés respectivement dans les exons 13 et 14 (Himmler, 1989; Sawa *et al.*, 1994).

Par contre, les exons 2, 3 et 10 sont épissés de manière alternative et sont spécifiques du tissu cérébral adulte (Andreadis *et al.*, 1992) (**FIGURE 6**). L'épissage alternatif de ces 3 exons produit 6 combinaisons différentes d'ARNmessagers (ARNm): $2^-3^-10^-$, $2^+3^-10^-$, $2^+3^+10^-$, $2^+3^+10^+$, $2^+3^-10^+$, $2^-3^-10^+$ (Goedert *et al.*, 1989a,b; Himmler, 1989; Kosik *et al.*, 1989). L'épissage de l'exon 3 est particulier puisqu'il ne peut être inséré dans les transcrits de tau que lorsque l'exon 2 est présent (Andreadis *et al.*, 1995); la présence de l'exon 2 n'entraîne pas l'addition systématique de l'exon 3.

L'exon 4A a été identifié et localisé entre les exons 4 et 5 sur le gène humain des protéines tau et il présente une homologie d'environ 50% avec les exons 4A trouvés chez la souris et le rat (Goedert *et al.*, 1992a; Couchie *et al.*, 1992; Andreadis *et al.*, 1992).

A



B

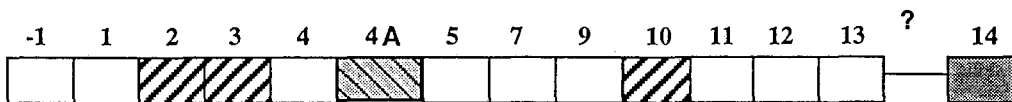


FIGURE 7: Représentation schématique des transcrits exprimés dans les systèmes nerveux central et périphériques. (A) 6 transcrits sont exprimés dans le système nerveux central. Ils résultent de la combinaison différente des différents exons épissés de manière alternative (exons 2, 3 et 10, schématisés par des rectangles rayés). L'exon 14 (grisé) est toujours présent mais n'est que faiblement traduit du fait du maintien de l'intron présent entre les exons 13 et 14 qui introduit un codon stop très rapidement. Le pourcentage de chacun des transcrits sans cet intron reste inconnu (?). (B) Un transcrit a été décrit dans le système nerveux périphérique. Il correspond au transcrit le plus long trouvé dans le système nerveux central ($2+3+10+$) avec l'addition de l'exon 4A, inséré entre les exons 4 et 5.

Seuls les exons 6 et 8, hautement conservés dans les différentes espèces, n'ont jamais été décrits dans les transcrits tau chez l'homme. Par contre, l'exon 8 est exprimé chez le singe rhésus et le boeuf (Himmler, 1989; Nelson *et al.*, 1996) et l'exon 6 a été également décrit chez le boeuf et dans une lignée de neuroblastomes de souris, les cellules N115 (Himmler, 1989; Couchie *et al.*, 1992).

III- 2- Les différents transcrits

Trois transcrits des protéines tau de 2, 6 et 8 kb ont été identifiés (Drubin *et al.*, 1988; Goedert *et al.*, 1988, 1992a; Couchie *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1993). L'ARN messenger de 2kb semble coder pour l'isoforme de tau retrouvée dans le noyau tandis que les transcrits de 6 et 8kb codent pour les isoformes cytoplasmiques et sont respectivement spécifiques des systèmes nerveux central et périphérique.

III- 2- 1- Les transcrits de 6 kb

Les transcrits de 6 kb sont trouvés en grande quantité dans le système nerveux central (Drubin *et al.*, 1984; Kosik *et al.*, 1989) et sont constitués des 6 ARNm dont les combinaisons ont été précédemment décrites (**FIGURE 7**). Seul le plus petit transcrit, correspondant à la combinaison 2⁻3⁻10⁻, est retrouvé au stade fœtal alors que les 6 transcrits sont exprimés chez l'adulte. Chez le rat, ces transcrits de 6 kb sont également retrouvés, en faible quantité, dans le système nerveux périphérique au niveau des ganglions rachidiens (Goedert *et al.*, 1992c; Georgieff *et al.*, 1993).

Les transcrits codant pour les différentes isoformes de tau sont non seulement exprimés différemment en fonction du stade de développement mais également en fonction du type cellulaire . En effet, dans le cerveau adulte, les transcrits avec ou sans l'exon 10

sont trouvés dans les soma des cellules pyramidales de toutes les couches du cortex. Par contre, dans la formation hippocampique, tandis que les transcrits sans l'exon 10 sont détectés dans les cellules granulaires et pyramidales, les transcrits avec l'exon 10 ne sont pas détectés dans les cellules granulaires (Goedert *et al.*, 1989b). La quantité de transcrits des protéines tau varie également au cours du développement (Takemura *et al.*, 1991). Chez la souris, le niveau des transcrits tau diminue au cours du développement du cerveau. Cette diminution résulterait d'un changement de la stabilité des transcrits plutôt que du taux d'expression (Charrière-Bertrand et Nunez, 1992).

III- 2- 2- Les transcrits de 2 kb

Bien que plus minoritaires que les transcrits de 6kb, les transcrits de 2 kb ont été mis en évidence dans deux lignées de neuroblastomes humains ainsi que dans le cerveau (Goedert *et al.*, 1988; Wang *et al.*, 1993). La région codante du messager de 2 kb serait identique à celle du transcrit de 6 kb trouvé dans le cerveau de fœtus, correspondant à la combinaison 2⁻3⁻10⁻. Ce transcrit de 2 kb, codant pour l'isoforme nucléaire de tau, se distinguerait de l'isoforme fœtale par la présence d'une extrémité 3' non traduite, ou 3'-UTR (pour le terme anglais: "3'-Untranslated Region"), plus courte comme cela a été suggéré chez le rat par Sadot et collaborateurs (1994). Cette région 3'-UTR pourrait intervenir dans la stabilité et le transport des ARNmessagers (Wang *et al.*, 1993; Sadot *et al.*, 1994). Ce messager diffère aussi par son extrémité 5'-UTR, suggérant différents sites d'initiation de transcription entre les transcrits de 2 kb et 6kb (Andreadis *et al.*, 1996). Cette région 3'-UTR pourrait intervenir dans la stabilité et le transport des ARNmessagers (Wang *et al.*, 1993; Sadot *et al.*, 1994).

III- 2- 3- Les transcrits de 8 kb

Les transcrits de 8 kb sont préférentiellement retrouvés dans le système nerveux périphérique, dans les cellules de pheochromocytome de rat, les PC12, ainsi que dans une lignée de neuroblastomes de souris, les cellules N115 (Couchie *et al.*, 1992; Georgieff *et al.*, 1992; Goedert *et al.*, 1992a) (**FIGURE 7**). Ils ont été également mis en évidence dans la moelle épinière et la rétine (Georgieff *et al.*, 1993). Ces transcrits de 8 kb sont à l'origine des protéines tau de haut poids moléculaire. Ils contiennent l'exon 4A, entre les exons 4 et 5, et plus rarement l'exon 6, présent entre les exons 5 et 7 (Couchie *et al.*, 1992). Comme les autres transcrits tau, ces transcrits de 8 kb semblent être soumis à un épissage alternatif conduisant à plusieurs isoformes de protéines tau de haut poids moléculaire (Gache *et al.*, 1993).

Chez l'adulte, différents transcrits des protéines tau sont exprimés dans les systèmes nerveux central et périphérique. Dans le cortex cérébral, certaines cellules pourraient être spécialisées dans l'expression de certaines isoformes (Goedert *et al.*, 1989b). La transcription des messagers des protéines tau ainsi que l'épissage alternatif conduisant aux différents transcrits précédemment décrits, semblent donc être soumis à des régulations bien précises qui varieraient selon les types cellulaires.

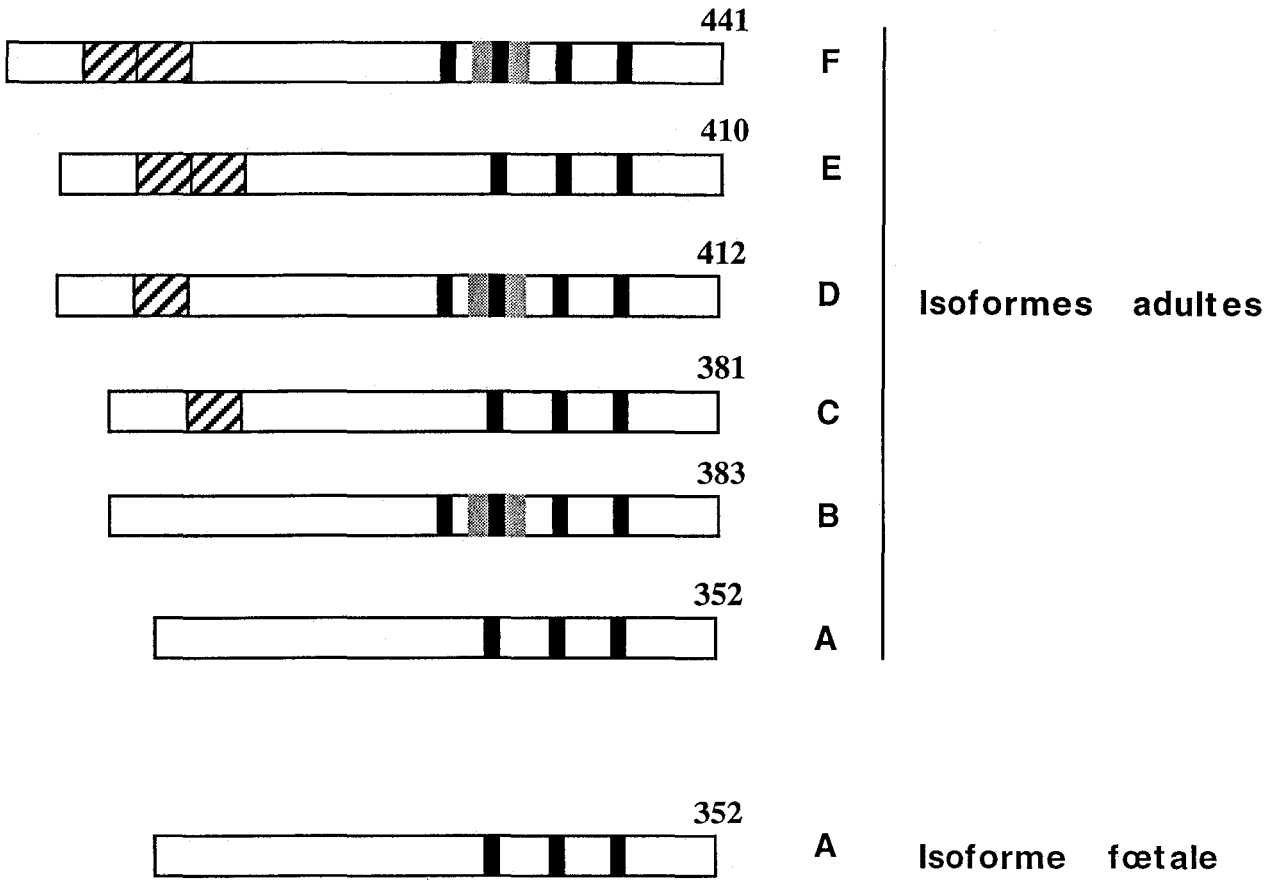
III- 3- Structure des protéines tau et leur expression

III- 3- 1- Protéines tau de bas poids moléculaire

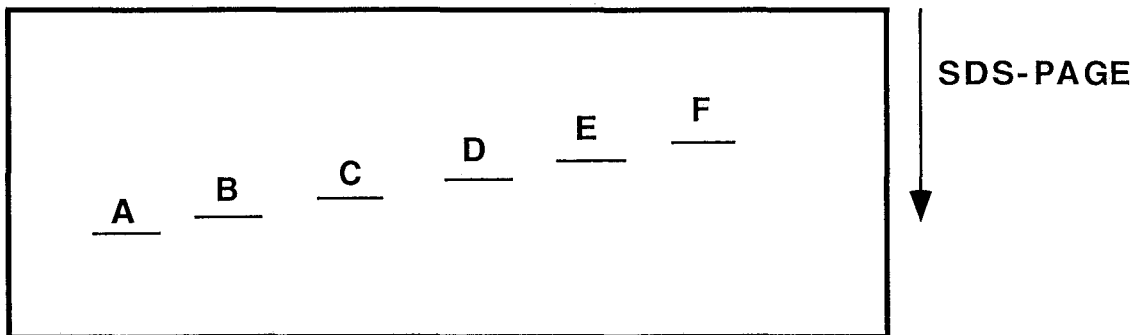
Dans le cerveau adulte humain, six isoformes des protéines tau sont exprimées (**FIGURE 8**). Ces 6 isoformes se différencient dans leur partie amino-terminale par la présence ou l'absence de 29 ou 58 acides aminés dues respectivement à l'insertion de

FIGURE 8: Représentation des 6 isoformes des protéines tau du système nerveux central et leur migration en gel SDS-PAGE. (A) Représentation schématique des 6 isoformes des protéines tau dans le cerveau adulte humain et de l'isoforme trouvée chez le fœtus. Les 3 ou 4 séquences répétées associées en tandem sont représentées par des rectangles noircis, tandis que les séquences supplémentaires qui différencient les différentes isoformes sont représentées par des rectangles grises (domaine carboxy-terminal) ou rayés (domaine amino-terminal). (B) Profil électrophorétique des 6 isoformes tau appelées A, B, C, D, E et F sur gel SDS-PAGE.

(A)



(B)



l'exon 2 seul ou des exons 2 et 3 dans les ARNm. Ces 6 isoformes se distinguent dans leur partie carboxy-terminale par la présence de trois ou quatre domaines répétés de 31 ou 32 acides aminés. La présence de ce quatrième domaine résulte de l'insertion de l'exon 10 dans les transcrits des protéines tau (Goedert *et al.*, 1989a,b). Il vient s'intercaler entre les deux premiers domaines répétés des isoformes de protéines tau contenant trois domaines répétés.

La taille de ces isoformes varie de 352 à 441 et le poids moléculaire, calculé à partir de leur séquence primaire, varie de 36,7 kDa et 45,8 kDa. Lorsque toutes ces protéines tau sont exprimées dans les bactéries de type *Escherichia coli*, elles migrent en gel SDS-PAGE comme six bandes dont le poids moléculaire apparent est supérieur et varie de 48 à 67 kDa; (Goedert et Jakes, 1990). Elles présentent donc une mobilité électrophorétique pouvant être attribuée à leur composition en acides aminés propres (Lichtenberg *et al.*, 1989; Goedert and Jakes, 1990). Pour l'addition d'un insert amino- ou carboxy-terminal, de taille équivalente (inserts amino-terminaux de 29 acides aminés chacun; insert carboxy-terminal de 31 acides aminés), la présence d'un insert amino-terminal ralentit davantage la migration électrophorétique que l'insert carboxy-terminal.

Les protéines tau sont organisées en plusieurs régions qui ont différentes propriétés chimiques et physiologiques (**FIGURE 9**).

III- 3- 1- 1- Partie amino-terminale

Cette partie a une longueur variable qui résulte de l'insertion de 29 ou 58 acides aminés selon les isoformes. Ces acides aminés supplémentaires rendent cette extrémité amino-terminale hautement acide. L'extrémité amino-terminale n'est pas associée aux microtubules et constituerait un domaine de projection qui s'oriente vers l'extérieur du

microtubule (Hirokawa *et al.*, 1988). Ce domaine déterminerait l'espace entre microtubules adjacents (Chen *et al.*, 1992).

III- 3- 1- 2- Partie centrale

Cette région est très riche en résidus prolyl et contient de nombreux sites de phosphorylation reconnus par différentes kinases. Cette région a été impliquée par des expériences de liaison *in vitro* (Gustke *et al.*, 1994) mais aussi *in vivo*, après transfection de cellules non neuronales (Kanai *et al.*, 1992; Lee et Rook, 1992). Très récemment, Goode et collaborateurs (1997) ont localisé, dans cette région, une séquence de 7 acides aminés (Lys215- Arg221) capable d'influencer très fortement la capacité de liaison et d'assemblage des protéines tau aux microtubules.

III- 3- 1- 3- Partie carboxy-terminale

Cette région est très basique. Elle est responsable de l'interaction des protéines tau avec les microtubules. Cette extrémité carboxy-terminale contient 3 ou 4 séquences de 18 acides aminés hautement homologues (Lee *et al.*, 1988; Goedert *et al.*, 1989a; Himmler, 1989). En effet, la comparaison de ces séquences répétitives montre que 11 acides aminés sont identiques dans ces 4 séquences. Chacune de ces séquences contient un motif particulier de 4 acides aminés: Pro-Gly-Gly-Gly. Enfin, ces domaines répétés, séparés les uns des autres par 13 à 14 acides aminés, beaucoup moins bien conservés, sont appelés zones de jonction (pour le terme anglais: inter-repeat) (**FIGURE 10**). Ces domaines répétés au niveau des protéines tau présentent beaucoup d'homologie avec les autres MAPs

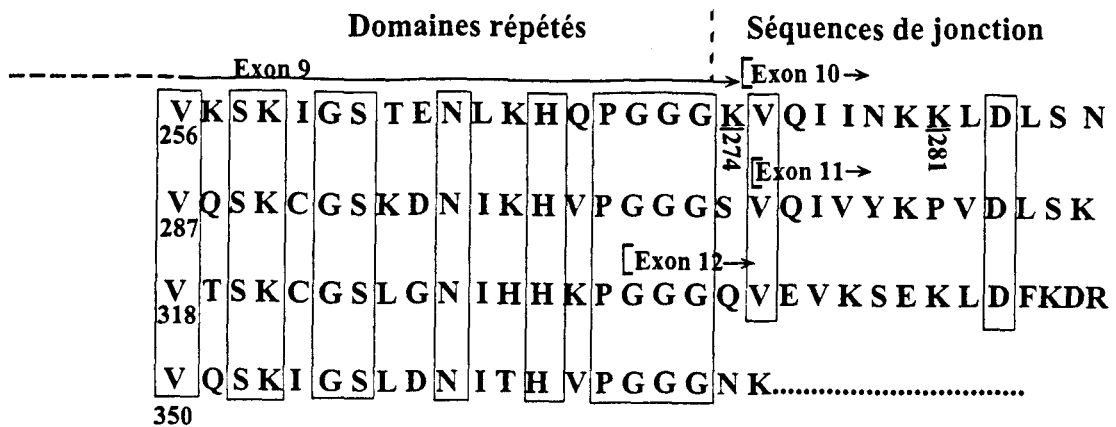


FIGURE 10: Homologie des séquences en acides aminés entre les différents domaines de liaison aux microtubules. Les acides aminés identiques entre chaque domaine répété sont encadrés.

L'expression des protéines tau est régulée au cours du développement. Ainsi, dans le système nerveux central, une seule isoforme est exprimée durant le développement embryonnaire et à la naissance; cette isoforme ne comporte aucune des insertions dans les régions amino- et carboxy-terminales décrites précédemment. C'est pourquoi cette isoforme est généralement appelée isoforme fœtale (Goedert *et al.*, 1989b; Kosik *et al.*, 1989) alors que les autres isoformes, apparaissant au cours du développement, seront toutes exprimées chez l'adulte mais en quantités inégales. Ainsi, certaines isoformes (A, B, C, D) sont dites majeures tandis que les formes les plus longues (E, F) sont retrouvées en quantités moins importantes (**FIGURE 8**) (Goedert and Jakes, 1990; Hasegawa *et al.*, 1992). Chez le rat, l'isoforme la plus courte a été également mise en évidence dans le système nerveux périphérique durant le développement embryonnaire et pendant environ 7 jours, après la naissance (Georgieff *et al.*, 1992; Oblinger *et al.*, 1991).

Elles ont un poids moléculaire apparent de 110 à 130 kDa. La taille, plus importante, de ces protéines tau de plus haut poids moléculaire, par rapport aux protéines tau trouvées dans le cerveau, résulte de l'addition de l'exon 4A, qui code pour une séquence supplémentaire de 253 acides aminés chez l'Homme (Andreadis *et al.*, 1992). La taille de cette insertion diffère selon les espèces (Andreadis *et al.*, 1992; Goedert *et al.*, 1992a; Couchie *et al.*, 1992). De plus, les protéines tau de plus haut poids moléculaire trouvées dans une lignée de neuroblastomes, les cellules N115, présentent l'insertion d'une séquence de 66 acides aminés due à l'expression de l'exon 6 (Couchie *et al.*, 1992).

III- 4- Fonctions des protéines tau

III- 4- 1- Interaction avec les microtubules

Les neurones sont les unités fonctionnelles du système nerveux. Ces cellules hautement spécialisées sont caractérisées par une structure polarisée constituée d'un prolongement cellulaire, l'axone, et d'un compartiment somato-dendritique. L'architecture neuronale de même que le transport axonal sont essentiels pour le développement normal du neurone. Les microtubules qui forment l'un des trois réseaux fibreux constituant le cytosquelette stabilisent l'architecture neuronale permettant un transport axonal efficace. Les microtubules sont des structures dynamiques constituées d'un grand nombre de molécules protéiques de 50 kDa, appelées tubuline α et β . Ces longs filaments creux, hautement instables (Walker *et al.*, 1988), sont stabilisés grâce à des protéines qui se lient le long de ces polymères de tubulines; ces protéines sont appelées protéines associées aux microtubules (MAPs). Ces MAPs demeurent associées aux microtubules après des cycles de polymérisation et de dépolymérisation des tubulines et semblent directement impliquées dans le développement de la polarité neuronale. Certaines MAPs, les protéines tau, MAP2 et MAP4, possèdent des caractéristiques communes et agissent probablement par des

mécanismes similaires. Les MAP2 et MAP4 présentent un plus haut poids moléculaire que les protéines tau. Les MAPs présentent au moins trois domaines répétés, localisés dans leur partie carboxy-terminale, flanqués de régions basiques riches en résidus prolyls. C'est grâce à ces domaines répétés, fortement homologues entre eux, que les MAPs se lient à la tubuline (Lewis *et al.*, 1988; Chapin et Bulinski, 1992). Les protéines tau et MAP2 sont exprimées de manière prépondérante dans les cellules neuronales mais avec une compartimentation différente: les tau sont principalement localisées dans les axones tandis que MAP2 est plutôt localisée dans le compartiment somato-dendritique (Binder *et al.*, 1985; Riederer et Matus, 1985). Par contre, MAP4 est retrouvée largement exprimée dans différents types cellulaires et tissulaires non-neuronaux (Bulinski et Borisy, 1980; Parysek *et al.*, 1984).

Les protéines tau présentent une structure semblable chez des mammifères appartenant à des ordres différents: celui des rongeurs pour le rat et la souris, celui des ongulés pour la chèvre et la vache et celui des primates pour l'homme et le singe Rhésus. Plus récemment, un gène codant pour une protéine possédant un nombre variable de domaines répétés et présentant une homologie avec le gène tau humain a également été décrit chez le ver *Caenorhabditis elegans* (Mc Dermott *et al.*, 1996). L'expression de ce gène *ptl-1*, dans des bactéries, mais aussi dans des cellules Sf9, conduit à la synthèse de protéines capables, comme les protéines tau, de se lier *in vitro* aux microtubules (Mc Dermott *et al.*, 1996; Goedert *et al.*, 1996). Cette conservation phylogénétique laisse présager un rôle important pour ces protéines.

III- 4- 2- Implication des protéines tau sur la polymérisation des microtubules

Initialement, les protéines tau ont été identifiées en tant que protéines capables *in vitro* de stimuler l'assemblage des microtubules (Weingarten *et al.*, 1975; Cleveland *et al.*, 1977a,b). *In vivo*, les protéines tau sont colocalisées avec les microtubules dans les neurones (Binder *et al.*, 1985; Drubin *et al.*, 1986; Kosik et Finch, 1987). Lorsqu'elles sont microinjectées ou synthétisées après transfection dans des cellules non neuronales, comme les cellules COS, les cellules CHO, cellules L, ces protéines tau stabilisent et favorisent la croissance des microtubules ainsi que la formation de faisceaux de microtubules (Drubin et Kirschner, 1986; Drubin *et al.*, 1986; Kanai *et al.*, 1989; Lee et Rook, 1992; Lewis *et al.*, 1989; Takemura *et al.*, 1992; Barlow *et al.*, 1994). Cependant, dans d'autres types cellulaires, comme les cellules 3T3, bien que la colocalisation des protéines tau avec les microtubules soit effectivement constatée, il peut n'y avoir aucune différence de morphologie cellulaire ou d'augmentation de faisceaux de microtubules (Gallo *et al.*, 1992; Lo *et al.*, 1993; Haque *et al.*, 1995). La concentration de tubuline non associée aux microtubules ainsi que des interactions entre les MAPs et la tubuline pourraient réguler l'assemblage des microtubules. La surexpression de tau peut, dans les cellules non neuronales, provoquer un plus haut niveau de tubuline (Kanai *et al.*, 1989; Montejo de Garcini *et al.*, 1994). Les protéines tau pourraient favoriser l'assemblage de la tubuline en microtubules en diminuant l'instabilité de la tubuline (Drechsel *et al.*, 1992). Les protéines tau protègent également les microtubules existants de l'action dépolymérisante de certaines toxines comme la colchicine ou le nocodazole (Lee et Rook, 1992; Lo *et al.*, 1993; Baas *et al.*, 1994). Le rôle des protéines tau dans la stabilisation des microtubules est important pour l'établissement et le maintien du transport axonal, essentiel à la vie du neurone (Drubin *et al.*, 1986; Goedert *et al.*, 1991).

L'expression des protéines tau dans des cellules non neuronales peut conduire à une redistribution des microtubules du cytosquelette en épais faisceaux de microtubules contenant les protéines tau (Lewis *et al.*, 1989; Kanai *et al.*, 1989). Alors que les microtubules semblaient originaires d'un centre organisateur et irradiaient dans la cellule à partir de ce centre, la transfection des protéines tau conduit à une réorganisation des microtubules en faisceaux à la circonférence des cellules non neuronales (Baas *et al.*, 1991; Lovestone *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1996). Cette réorganisation pourrait altérer le fuseau mitotique et aussi modifier les divisions cellulaires, provoquant la formation de cellules polynucléées (Montejo de Garcini *et al.*, 1994).

La stabilisation des microtubules, la formation de faisceaux de microtubules, ainsi que la rigidité des réseaux microtubulaires cellulaires, sont trois propriétés essentielles pour le développement de prolongements cellulaires. Les protéines tau sont capables d'induire le développement de longs prolongements dont l'organisation microtubulaire est semblable à celle observée dans un axone (Baas *et al.*, 1991; Knops *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1992). *In vivo*, la présence des protéines tau ne semble pas indispensable lors de l'axogénèse. En effet, leur absence chez des souris pourrait être compensée par l'action d'autres MAPs, comme MAP1B (Harada *et al.*, 1994; Shastri, 1994). Le développement de tels prolongements cellulaires semble directement lié au taux d'expression important des protéines tau dans les cellules d'insectes Sf9 transfectées (Baas *et al.*, 1991; Knops *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1992). Dans d'autres types cellulaires, comme les PC12, l'induction de l'expression des protéines tau, après traitement par le NGF (pour le terme anglais *Nerve Growth Factor*) des cellules ou après transfection, a également pour conséquence la croissance de neurites (Drubin *et al.*, 1985; Esmaeli-Azad *et al.*, 1994; Leger *et al.*, 1994). Cette induction semble directement liée aux protéines tau, puisque des antisens, annulant leur expression, suppriment également ces prolongements (Hanemaaijer and Ginzburg, 1991; Esmaeli-Azad *et al.*, 1994). Enfin, les protéines tau ont également un rôle dans l'établissement de la polarité neuritique de neurones cérébelleux en culture primaire

(Caceres and Kosik, 1990; Caceres *et al.*, 1991). En revanche, dans d'autres types cellulaires, l'expression des protéines tau ne semble pas suffisante pour induire de telles extensions (Langkopf *et al.*, 1995).

III- 4- 3- Régions des protéines tau impliquées dans les fonctions des protéines tau

Dans le cerveau humain, au stade foetal, où la plasticité neuronale est importante pour établir les connexions, seule l'isoforme la plus petite est exprimée. Dans le cerveau adulte, cette plasticité diminue au profit d'une stabilisation et d'une plus grande rigidité des microtubules, deux propriétés indispensables, pour maintenir les longues connexions établies. Les six isoformes de tau sont alors exprimées. C'est pourquoi une différence de fonction peut facilement s'imaginer entre l'isoforme foetale et les cinq autres isoformes. Chez l'adulte en revanche, le rôle précis de chacune des isoformes est plus délicat à interpréter. C'est pourquoi, les différentes régions constituant les protéines tau ont été largement étudiées *in vitro* mais, également, dans certaines cellules après transfection. Ces études ont permis de déterminer deux grands domaines fonctionnels sur les protéines tau: le domaine amino-terminal, représentant le domaine de projection des protéines tau, et le domaine carboxy-terminal, représentant le domaine responsable de l'activité d'assemblage des microtubules. Cette séparation fonctionnelle des protéines tau en deux domaines est réellement obtenue par un clivage limité des protéines tau par la chymotrypsine. Cette coupure se fait au niveau du résidu 198 et sépare la protéine en deux parties: le domaine amino-terminal (qui s'étend du premier résidu jusqu'à la tyrosine 197) et le domaine carboxy-terminal (s'étendant des résidus 198 à 441) (Steiner *et al.*, 1990) (**FIGURE 9**).

III- 4- 3- 1- Le domaine amino-terminal ou domaine de projection

La surexpression dans des fibroblastes après transfection d'isoformes de tau, comportant les inserts amino-terminaux acides (**FIGURE 9**), provoque la formation de réseaux de microtubules disposés en faisceaux parallèles plus efficacement que les isoformes de tau sans ces inserts (Kanai *et al.*, 1992). Cette fonction a été également confirmée par des tests de liaison *in vitro* (Gustke *et al.*, 1994). De plus, cette région amino-terminale, retrouvée projetée à partir de la surface des microtubules, détermine l'espace entre les microtubules adjacents (Hirokawa *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 1992). Dans l'axone, où les protéines tau sont localisées de manière prédominante, l'espacement entre les faisceaux est de 20 nm alors qu'il est beaucoup plus grand dans les dendrites (60 à 100 nm) où MAP2 est exprimée (Goedert *et al.*, 1991). Cet espacement est important pour le passage des vésicules de transport le long de l'axone. L'insertion de 253 acides aminés dans ce domaine amino-terminal, au niveau des protéines tau de haut poids moléculaire du système nerveux périphérique, pourrait permettre à ces protéines de maintenir un espace supérieur entre les microtubules à celui observé dans le système nerveux central (Frappier *et al.*, 1994).

Plus récemment, Brandt et collaborateurs (1995) ont rapporté l'interaction des protéines tau avec certains composants de la membrane plasmique du neurone et de certains organites comme les mitochondries, via ce domaine de projection. Ces interactions semblent intervenir dans le développement neuritique (Brandt *et al.*, 1995). Par ces interactions avec la membrane, les protéines tau pourraient réaliser la jonction entre les informations extracellulaires et les microtubules cellulaires .

Cette région pourrait avoir un autre rôle au niveau du développement puisque les protéines Eed (*embryonic ectoderm development*) se lient par cette région aux protéines tau

(Lee *et al.*, 1996). Cette protéine Eed joue un rôle important au niveau du développement de la souris (Schumacher *et al.*, 1996).

III- 4- 3- 2- Le domaine carboxy-terminal ou domaine d'assemblage

Ce domaine s'étend du résidu 198 au résidu 441 selon la numérotation des acides aminés composant la plus longue isoforme de tau.

Il peut-être divisé en 3 régions:

- une région riche en proline (région comprise entre les résidus 198 et 244),
- la région des séquences répétitives (région comprise entre les résidus 244 et 368),
- une région carboxy-terminale (région comprise entre les résidus 369 et 441)

(Gustke *et al.*, 1994) (**FIGURE 9**).

Cette dernière région comporte une séquence qui pourrait être assimilée à une cinquième séquence répétitive du fait de sa composition; elle s'étend du résidu 369 au résidu 400. Sa présence est nécessaire pour l'association de l'isoforme la plus courte avec les microtubules dans les cellules CHO (Lee et Rook, 1992). Comme nous l'avons déjà décrit, le domaine carboxy-terminal est variable et peut comprendre 3 ou 4 domaines répétés qui favorisent la liaison des protéines tau aux microtubules (Lee *et al.*, 1989). L'ordre de ces domaines répétés n'est pas important pour leur fonction (Trinczek *et al.*, 1995) et chacune de ces séquences contribue, avec une affinité variable, à la liaison des protéines tau aux microtubules (Butner and Kirschner, 1991; Lee and Rook, 1992; Goode et Feinstein, 1994; Gustke *et al.*, 1994). L'addition du quatrième domaine répété permet une polymérisation plus rapide des microtubules.

En effet, son insertion:

- 1) augmente l'épaisseur des prolongements neuritiques,
- 2) permet un assemblage plus efficace des microtubules et leur confère une plus forte stabilité (Goedert et Jakes, 1990; Scott *et al.*, 1991; Kanai *et al.*, 1992; Brandt et Lee, 1993).

Les isoformes, avec 4 domaines répétés, présentent l'addition de la zone de jonction entre les deux premières séquences répétitives, et, plus spécifiquement, le peptide KVQIINKK dont la forte affinité pour les microtubules a été récemment démontrée (Goode et Feinstein, 1994; Trinczek *et al.*, 1995). Cette zone de jonction interagirait avec la tubuline, grâce à des interactions ioniques impliquant les résidus lysyl positionnées en 274 et 281, sur l'isoforme la plus longue des protéines tau (Goode et Feinstein, 1994). De plus, un peptide, comprenant le premier domaine répété et cette zone de jonction, est capable de reproduire l'action de l'isoforme tau complète sur la polymérisation des microtubules (Panda *et al.*, 1995). L'activité de ces 3 ou 4 domaines répétés est modulée négativement par l'addition des inserts amino-terminaux (Scott *et al.*, 1991).

La région riche en proline module également l'affinité des protéines tau pour les microtubules dans des expériences *in vitro* et également *in vivo* (Lewis *et al.*, 1989; Lee et Rook, 1992; Gustke *et al.*, 1994). L'interaction des protéines tau avec la tubuline ne semble pas directe, puisque les peptides, ne comprenant que cette région, ne se lient que très faiblement aux microtubules (Butner et Kirschner, 1991; Goode et Feinstein, 1994; Gustke *et al.*, 1994). En fait, cette région agirait en modulant l'activité des domaines répétés, favoriserait la capacité de nucléation des protéines tau (Brandt et Lee, 1993) et le développement de prolongements de cellules PC12 (Leger *et al.*, 1994). La région s'étendant des résidus 154 à 173 (sur l'isoforme la plus courte) est très bien conservée phylogénétiquement mais également au niveau d'autres MAPs, telle que MAP2, suggérant

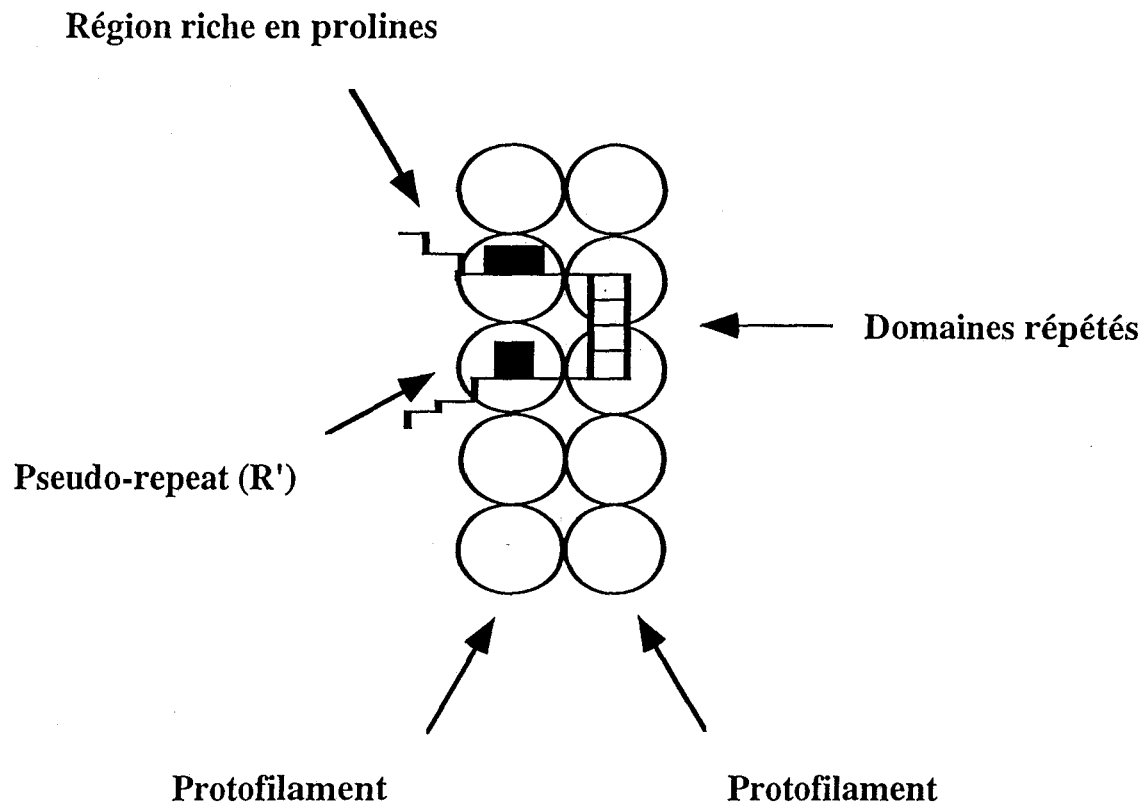


FIGURE 12: Représentation schématique du "jaw model" présenté par Mandelkow et collaborateurs (1995).

donc un rôle important de cette région dans les fonctions des protéines tau. Très récemment, l'activité de cette région, riche en proline, a été localisée entre les résidus 215 et 246 et, plus précisément, au niveau de la séquence KKVAVVR. Cette région exerce une forte influence sur les activités de liaison et d'assemblage des isoformes comportant 3 ou 4 domaines répétés (Goode *et al.*, 1997).

Par ailleurs, les protéines tau pourraient être impliquées dans l'induction de cascades liées à l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4, 5- biphosphate. En effet, la séquence riche en résidus prolyl, codée par l'exon 9, pourrait se lier à la phospholipase C γ et provoquer son activation en présence d'acide arachidonique (Hwang *et al.*, 1996).

La combinaison de la région riche en proline et du domaine R', assimilé à un domaine répété supplémentaire, favoriserait l'interaction des domaines répétés avec les microtubules en permettant l'adoption d'une conformation protéique adéquate. Ces régions seraient, elles-mêmes, capables de se lier au protofilament adjacent, renforçant ainsi la liaison des protéines tau aux microtubules. Ce modèle de liaison des protéines tau aux microtubules, appelé le "jaw model", a été proposé par l'équipe de Mandelkow (**FIGURE 12**). L'interaction des protéines tau avec les microtubules pourrait être réduite à une interaction électrostatique entre les domaines de tau chargés positivement (région riche en proline, les domaines répétés et le domaine R') et la région C-terminale acide de la tubuline. Le domaine de projection, de même que la queue C-terminale de tau (constituée par les quarante derniers acides aminés), pourraient également moduler cette interaction. L'effet est particulièrement visible pour la queue C-terminale qui est antagoniste à la liaison de tau aux microtubules (Gustke *et al.*, 1994).

III- 4- 4- Région de la tubuline impliquée dans la liaison aux protéines tau

Les interactions entre les MAPs et les microtubules traités par la subtilisine suggèreraient que les extrémités carboxy-terminales des tubulines α et β ne sont pas à l'origine de la liaison des MAPs aux microtubules. Cependant, ces interactions demeurent possibles et pourraient être impliquées dans la formation des faisceaux de microtubules induite par les MAPs (Saoudi *et al.*, 1995). En fait, la liaison des protéines tau aux tubulines α et β serait modulée par le nombre de résidus glutamyl (pouvant varier de 1 à 6) présents à l'extrémité carboxy-terminale des isotubulines. Ainsi, l'affinité des protéines tau est faible pour une tubuline non modifiée mais elle augmente lorsque l'isotubuline porte de un à trois résidus glutamyl. Cette liaison atteint une valeur optimale qui diminue progressivement lorsque la chaîne polyglutamylée s'allonge (Boucher *et al.*, 1994). L'affinité des isotubulines pour les protéines tau pourrait être modulée par des changements conformationnels, résultant du nombre de résidus glutamyl à leur extrémité C-terminale (Larcher *et al.*, 1996). Ce mécanisme a été également trouvé pour une autre protéine microtubulaire, la kinésine, soulignant donc l'importance de la tubuline dans la liaison des microtubules avec les protéines associées aux microtubules (Larcher *et al.*, 1996).

Enfin, les protéines tau favoriseraient la polymérisation de la tubuline en facilitant la liaison du GTP à la sous-unité β de la tubuline (Khatoon *et al.*, 1995).

III- 5- Rôle de la phosphorylation des protéines tau

III- 5- 1- Les protéines tau sont des protéines phosphorylées

Le taux de phosphorylation des protéines résulte des activités conjointes de kinases et de phosphatases au sein de la cellule. Elle représente une des modifications post-traductionnelles, les plus fréquentes, dans les cellules eucaryotes et permet le contrôle d'une multitude de fonctions cellulaires (Hunter, 1987; Edelman *et al.*, 1987).

En 1983, Selden et Pollard montraient que les protéines microtubulaires tau, étaient des protéines phosphorylées (Selden et Pollard, 1983). Cette phosphorylation constitue la principale modification post-traductionnelle des protéines tau (Cleveland *et al.*, 1977a,b). De plus, les protéines tau issues du cerveau fœtal sont phosphorylées sur des sites plus nombreux que les protéines tau exprimées dans le cerveau adulte suggérant une régulation de la phosphorylation au cours du développement.

L'identification des sites phosphorylés sur les protéines tau adultes et fœtales a été réalisée grâce à différentes techniques: la spectrométrie de masse et le séquençage peptidique (Hasegawa *et al.*, 1992; Watanabe *et al.*, 1993; Morishima-Kawashima *et al.*, 1995), et l'utilisation de sondes immunologiques (pour revue: Lee 1995) (**FIGURE 13**, **Tableau II**) initialement développées dans différents laboratoires pour l'étude de la phosphorylation des protéines tau-PHF. Toutes les sondes immunologiques spécifiques sont capables de distinguer des sites phosphorylés ou non sur les protéines tau (**Tableau II**). La numérotation des acides aminés, utilisée pour décrire les différents sites de phosphorylation, correspond à celle de l'isoforme la plus longue des protéines tau humaines, c'est-à-dire à l'isoforme possédant les inserts amino- et carboxy-terminaux (Goedert *et al.*, 1989b).

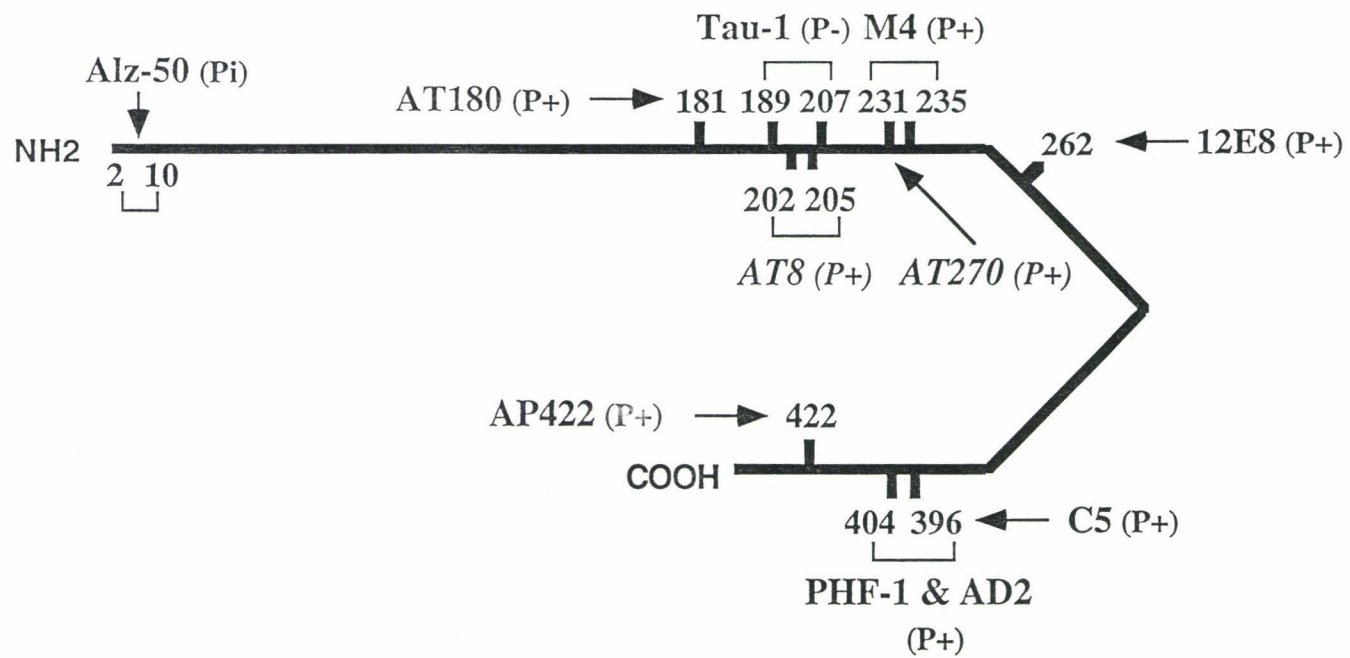


FIGURE 13: Localisation des épitopes reconnus par différents anticorps dépendant ou non de la phosphorylation.

Anti corps	Conformation	Phosphorylation	Epitop es	Références
Alz50	+	i	2-10	Goedert et al., 1991 Kosik et al., 1988 Ksiezak-Peding et al., 1995
RT 97	+	+	45-73 S46	Anderton et al., 1982 Miller et al., 1986 Brion et al., 1993
Tau-2	+	i	95-108	Watanabe et al., 1992
Tau-1		-	189-207	Binder et al., 1985
AT270		+	T181	Mercken et al., 1992 Rösner et al., 1995
AT8		+	S202;S205	Mercken et al., 1992 Goedert et al., 1995
AT10	+	+	T212-S214	Hoffmann et al., 1997 Mercken et al., 1992
AT180		+	T231	Mercken et al., 1992
M4		+	T231;S235	Hasegawa et al., 1993
PHF-27		+		Hoffmann et al., 1997
SMI33		-	S235	Sternberger et al., 1985 Lichtenberg-Kraag et al., 1992
SMI34	+	+	235-396	Sternberger et al., 1983 Lichtenberg-Kraag et al., 1992
12E8		+	S262	Seubert et al., 1995
8D8		+	S396	Hanger et al., 1992 Brion et al., 1993
C5		+		Hasegawa et al., 1993 1996
T3 P		+		Lee et al., 1991
AD2		+	S396; S404	Buée-Scherrer et al., 1996
SMI31		+		Sternberger et al., 1985
PHF-1		+		Greenberg et al., 1992
PHF-9		+	S404	Zemlan et al., 1996
AP 422		+	S422	Hazegawa et al., 1996

TABLEAU II: Tableau rappelant différents anticorps, dépendant ou non de l'état de phosphorylation des protéines tau dirigés contre les protéines tau

En 1994, Matsuo et collaborateurs ont décrit que le degré de phosphorylation des protéines tau adultes était plus important que celui couramment décrit. En fait, la phosphorylation, apparemment plus faible, des protéines tau, provenant du tissu cérébral normal autopsique, résultait des activités phosphatasiques endogènes restées très actives durant le délai post-mortem (Matsuo *et al.*, 1994; Mawal-Dewan *et al.*, 1994; Buée-Scherrer *et al.*, 1996a). Les protéines tau extraites de tissu cérébral fœtal ne sont pas soumises à cette déphosphorylation du fait de la plus faible activité des protéines phosphatases endogènes (Matsuo *et al.*, 1994; Mawal-Dewan *et al.*, 1994; Buée-Scherrer *et al.*, 1996a). Cette activité augmente après la naissance.

Ainsi, les protéines tau adultes sont retrouvées phosphorylées sur au moins 9 sites: Thr181, Ser199, Ser202, Thr205, Thr231, Ser 235, Ser262, Ser396 et la Ser404 (Watanabe *et al.*, 1993; Matsuo *et al.*, 1994; Seubert *et al.*, 1995) (**FIGURE 14**). En plus de l'ensemble de ces sites, la protéine tau fœtale peut être phosphorylée sur 5 autres résidus: Ser198, Thr217, Ser400, Ser409 et la Ser413 (**FIGURE 14**). A l'exception de la Ser262, qui est située au début du premier domaine répété, tous ces sites de phosphorylation sont localisés de part et d'autre des régions responsables de la liaison directe aux microtubules (**FIGURE 14**). Les protéines tau adultes autopsiques contiennent entre 1,9 et 2,8 moles de phosphate par mole de tau selon les études (Ksiezak-Reding *et al.*, 1992; Köpke *et al.*, 1993) tandis que les protéines tau fœtales en contiennent en moyenne 7 moles (Kenessey et Yen, 1993). De plus, la séparation des protéines tau adultes autopsiques par électrophorèse bi-dimensionnelle (2-D) révèle la présence d'une vingtaine de protéines tau dont le point isoélectrique (pI) est compris entre 6,5 et 8,5 (Cleveland *et al.*, 1977a,b). L'ensemble de ces données suggère donc que ces protéines tau sont phosphorylées de manière hétérogène: chaque molécule de tau fœtale ou de tau adulte n'est pas phosphorylée sur l'ensemble des sites précédemment cités mais seulement sur certains d'entre eux. De plus, la déphosphorylation des protéines tau, avant leur séparation en 2-D, diminue le nombre de variants, confirmant leurs différents états de

phosphorylation mais suggérant également la présence d'autres modifications post-traductionnelles (Janke *et al.*, 1996).

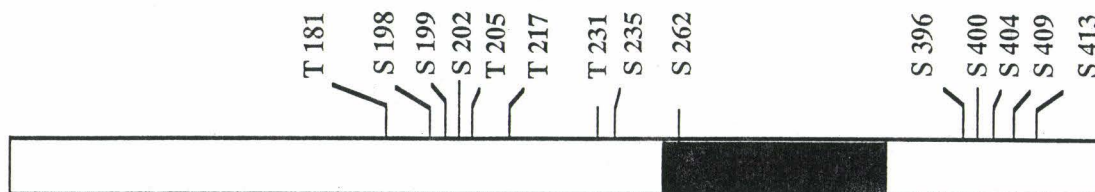
III- 5- 2- Activités kinasiques potentiellement impliquées

La plupart de ces sites de phosphorylation sont des résidus séril ou thréonil, suivis par des prolyl, suggérant l'implication de kinases spécifiques des motifs Ser-Pro ou Thr-Pro dans la phosphorylation des protéines tau. Ces kinases sont plus couramment regroupées sous le terme de PDPK (pour le terme anglais "*proline-directed protein kinase*"). La phosphorylation des protéines tau peut également se faire sur des résidus séril ou thréonil qui ne sont pas suivis par une prolyl; ces sites sont moins nombreux. Les kinases, potentiellement candidates à la phosphorylation de ces sites, sont regroupées sous le terme générique de non-PDPK (pour le terme anglais "*non-proline-directed protein kinase*"). Dans un premier temps, un grand nombre de kinases, PDPK ou non PDPK, ont été purifiées puis testées pour leur capacité à phosphoryler les protéines tau *in vitro*. Dans un deuxième temps, l'activité de certaines de ces kinases a été analysée au niveau de cellules en culture après stimulation par certaines substances ou après transfection de leur ADNc.

III- 5- 2- 1- les PDPK

La glycogène synthase kinase-3, ou GSK-3, sous sa forme GSK-3 α (Yang *et al.*, 1993a,b) ou sous sa forme GSK-3 β /TPKI (Ishiguro *et al.*, 1992; Hanger *et al.*, 1992, Singh *et al.*, 1996a), les kinases dépendantes des cyclines comprenant cdc-2, cdk2 et cdk5, (Vulliet *et al.*, 1992; Baumann *et al.*, 1993; Paudel *et al.*, 1993), la kinase activée par des mitogènes ou MAP kinase (encore appelée ERK2) (Drewes *et al.*, 1992), et plus récemment des protéines kinases activées par un stress et reliées aux MAP kinases, appelées SAP Kinases (Reynolds *et al.*, 1997a,b), font partie des kinases capables de

Sites trouvés phosphorylés chez le fœtus



Sites trouvés phosphorylés chez l'adulte

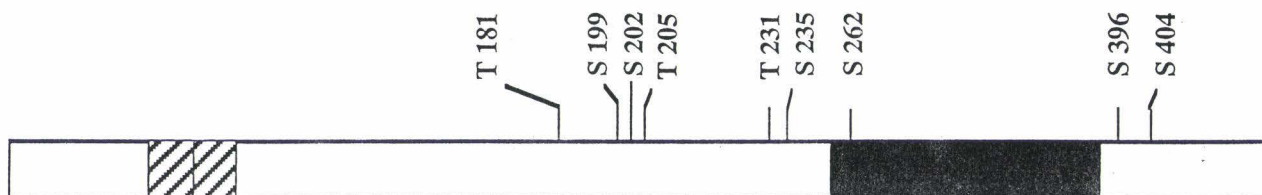


FIGURE 14: Identification des sites phosphorylés sur les protéines tau trouvées chez le fœtus et chez l'adulte. La numérotation des résidus phosphorylés correspond à celle de l'isoforme la plus longue des protéines tau.

phosphoryler *in vitro* les protéines tau sur certains de ces sites (**Tableau III**). Bien que reconnaissant les deux motifs Ser-Pro et Thr-Pro, certaines kinases, comme la kinase GSK-3, phosphorylent préférentiellement les motifs Ser-Pro. De plus, leur phosphorylation ne semble pas être limitée à la présence d'une prolyl dans la séquence cible, puisque la kinase GSK3 β peut également phosphoryler la Ser413, qui n'est pas suivie par une proline (Ishiguro *et al.*, 1992). Tous les résidus phosphorylés par ces kinases PDPK sont situés de part et d'autre des domaines de liaison aux microtubules.

III- 5- 2- 2- Les non-PDPK

Les motifs Ser/Thr, non suivis d'une prolyl, ont été également retrouvés phosphorylés sur les protéines tau *in vitro* par certaines kinases.

Différentes études ont montré que les kinases activées par un second messager:

- la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) (Litersky et Johnson, 1992; Scott *et al.*, 1993),
 - la protéine kinase dépendante du complexe Ca²⁺/calmoduline (CaMPK II) (Baudier et Cole, 1987; Steiner *et al.*, 1990; Johnson, 1992; Singh *et al.*, 1994, 1996b),
 - la PKC (Baudier *et al.*, 1987; Correas *et al.*, 1992; Singh *et al.*, 1994; Drewes *et al.*, 1995),
 - la caséine kinase I (CKI) (Singh *et al.*, 1994, 1995),
 - la caséine kinase II (CKII) (Greenwood *et al.*, 1994),
 - la phosphorylase kinase qui dépend du Ca²⁺ (Paudel *et al.*, 1997)
- sont capables de phosphoryler certains résidus sur les protéines tau (**Tableau III**).

Une autre kinase dépendante de l'ADN double brin (DNA-PK pour le terme anglais "*double-stranded DNA-stimulated protein kinase*") a été décrite par Wu et collaborateurs (1993) comme phosphorylant les protéines tau également. Certaines de ces kinases sont capables de phosphoryler, faiblement, les protéines tau sur des sites situés dans les domaines de liaison aux microtubules, et notamment sur la Ser262 (Singh et al., 1996). La phosphorylation de cette Ser262 semble importante dans la régulation de la liaison des protéines tau aux microtubules (Biernat *et al.*, 1993; Drewes *et al.*, 1995) et se ferait, *in vitro*, de manière spécifique, par une protéine de 110kDa, appelée MARK (Drewes *et al.*, 1995). Cette kinase reconnaît les résidus Sér yl localisés dans une séquence peptidique de type KIGS mais également, dans une moindre mesure, le résidu Sér yl présent dans la séquence KCGS. En effet, ces motifs sont trouvés au niveau des quatre domaines répétés des protéines tau et la MARK semble phosphoryler préférentiellement les résidus Ser262 et 356 qui appartiennent à un motif de type KIGS (Drewes *et al.*, 1995). A ce jour, hormis cette Ser262, les autres sites n'ont pas été retrouvés phosphorylés sur les protéines tau adultes et foetales.

La phosphorylation des protéines tau peut être modulée *in vitro* par:

(1) L'ajout de certaines protéines:

Ainsi, la phosphorylation des protéines tau par la PKA ou la GSK3 est stimulée par l'ajout d'héparine ou d'héparane sulfate dans le milieu réactionnel (Mawal-Dewan *et al.*, 1992; Brandt *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1994). L'addition d'héparine favorise la phosphorylation *in vitro* de tau par la GSK-3 α , en 5 sites supplémentaires: Thr212, Thr231, Ser262, Ser324 et Ser356; les 3 derniers résidus étant situés dans les domaines de liaison aux microtubules (Yang *et al.*, 1994). L'ajout de tubuline pourrait avoir également cet effet (Moreno *et al.*, 1995). Par contre, le traitement de neurones en culture

ou de cerveau de rat par du lithium, un inhibiteur de la GSK3, bloque la phosphorylation ainsi que l'hyperphosphorylation des protéines tau induite par le traitement par l'acide okadaïque, un inhibiteur des phosphatases (Munoz-Montano *et al.*, 1997). Précédemment, Baudier et Cole (1987) avaient rapporté l'effet activateur de certains phospholipides (phosphatidylsérine et la phosphatidyléthanolamine) sur l'activité kinasique de la CaMPK II vis-à-vis des protéines tau. D'autres phospholipides, comme le phosphatidylinositol, pourrait avoir l'effet inverse.

(2) La préphosphorylation par une autre kinase:

L'activité kinasique de certaines protéines kinases PDPK et non-PDPK est optimisée lorsque les protéines tau ont été préalablement phosphorylées par l'une de ces kinases (Singh *et al.*, 1995, 1996). Ainsi, la préphosphorylation des protéines tau par la kinase cdk5, d'origine neuronale, favoriserait leur phosphorylation par la GSK-3 kinase (Ishiguro *et al.*, 1992; 1995; Sengupta *et al.*, 1997). Cette phosphorylation par cdk5, sur les résidus Ser202, Thr205, Ser235 et Ser404, pourrait modifier la conformation des protéines tau, de manière à présenter à la kinase GSK-3 des résidus voisins, les Ser199, Thr231, Ser396 et Ser413, qui sont effectivement phosphorylés *in vitro* par la GSK-3. L'activité kinasique de la GSK-3 est également augmentée par la préphosphorylation des protéines tau par d'autres kinases non-PDPK, comme la PKC, la PKA ou la CK II (Singh *et al.*, 1995). A l'inverse, deux membres des kinases non-PDPK, les kinases CK-I et CaMK II, pourraient inhiber la phosphorylation des protéines tau par la GSK-3, *in vitro* (Singh *et al.*, 1995), ou encore la PKA aurait également une action inhibitrice sur l'activité de la PK40^{erk} (Blanchard *et al.*, 1994).

(3) La structure par elle-même des protéines tau:

Ainsi l'addition des inserts dans la partie amino-terminale, codés par les exons 2 et 3, semble augmenter l'extension de la phosphorylation par la GSK-3, la CK I et la CaMK II (Singh *et al.*, 1996). Par contre, la présence de l'insert carboxy-terminal, codé par l'exon 10, aurait l'effet inverse (Singh *et al.*, 1997).

Le nombre et la nature des inserts ainsi que l'état initial de phosphorylation des protéines tau semblent moduler la phosphorylation, *in vitro*, des protéines kinases. Ces enzymes pourraient donc agir en synergie pour obtenir, *in vitro*, la phosphorylation des protéines tau sur la plupart des résidus phosphorylés *in vivo*.

III- 5- 3- Activité phosphatasique potentiellement impliquée dans la déphosphorylation des protéines tau

La réversibilité de la phosphorylation des protéines est un mécanisme biochimique ubiquitaire, impliqué dans la régulation du comportement cellulaire. Ce mécanisme est appelé déphosphorylation.

Des données récentes montrent une déphosphorylation rapide des protéines tau par les phosphatases endogènes présentes dans le cerveau adulte et dans des cellules de neuroblastomes (Garver *et al.*, 1994; Matsuo *et al.*, 1994; Buée-Scherrer *et al.*, 1996a; Soulié *et al.*, 1996). A ce jour, seuls les résidus Ser et Thr sont retrouvés phosphorylés sur les protéines tau, suggérant la régulation de la phosphorylation de ces sites par des protéines phosphatases (PP) également dirigées contre des résidus Ser/Thr. Ces PP sont classées en 4 groupes selon leur spécificité envers leur substrat, leurs activateurs et inhibiteurs: PP1, PP2A, PP2B encore appelée calcineurine, et PP2C (Cohen, 1991). Toutes ces protéines phosphatases sont présentes dans le cerveau, mais peuvent être différemment exprimées au cours de la vie (Dudek et Johnson, 1995).

	T39	*S/P46	*T123	*S137	*S/P181	S195	*S198	*S/P199	*S/P202	*T/P205	*S208	*S210	*T/P212	*S214	*T/P217	*T/P231	*S/P235	S237	*S262	S285	S305	S324	S352	Ser356	T377	*S/P396	*S400	*T403	*S/P404	*S409	*S412	*S413	S416	*S422		
Tau-PHF		*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		*							*	*	*	*	*	*	*			*	
Tau fœtales					*		*	*	*	*				*	*	*	*		*							*	*		*	*		*			*	
Tau adultes					*		*	*	*	*					*	*	*		*							*	*		*	*		*			*	
PDPK																																				
GSK3α								*	*				*			*	*		*			*	*	*		*			*							
GSK3β								*								*	*		*							*						*				
CDC2						*			*	*						*	*									*			*							
Cdk5 (TPKII)						*			*	*						*	*									*			*							
MAPK (p40, p42, p44, p49)		*						*	*								*									*			*							*
JNK/SAPKB					*				*	*						*										*										*
non PDPK																																				
PKA														*					*			*	*	*						*				*		
PKC														*					*			*	*	*											*	
CaMKII																			*			*	*	*											*	
p110MARK																			*			(*)	(*)	*												
CKI															*				*							*			*							
CK II	*																																			
TTK											*	*																								

TABLEAU III: Localisation des sites phosphorylés par différentes protéines kinases impliquées dans la phosphorylation in vitro des protéines tau.

III- 5- 3- 1- Protéine phosphatase 1 ou PP1

Les protéines phosphatases de type 1 ou PP1 sont constituées par l'association d'une sous-unité catalytique et d'une sous-unité régulatrice. La diversité des protéines phosphatases de type 1 résulte de l'existence de plusieurs isoformes de cette sous-unité régulatrice (pour revue: Walter et Mumby, 1993). L'action phosphatasique de PP1 peut être bloquée par certaines toxines, extraites d'éponges marines, à des concentrations précises: l'acide okadaïque (100nM) et la calyculine A (50nM). La PP1 a été impliquée dans la déphosphorylation des protéines tau (Yamamoto *et al.*, 1988, 1995).

III- 5- 3- 2- Protéine phosphatase 2A ou PP2A

Cette enzyme est composée de trois sous-unités ayant chacune un rôle bien déterminé:

- une sous-unité structurale (la sous-unité A),
- une sous-unité catalytique (la sous-unité C)
- une sous-unité régulatrice (la sous-unité B).

Plusieurs PP2A ont été décrites résultant de l'association de différentes sous-unités régulatrices B à la forme hétérodimérique AC de la PP 2A (pour revue: Walter et Mumby, 1993). Cette sous-unité B va réguler l'activité phosphatasique et la spécificité de la PP 2A (Kamibayashi *et al.*, 1992, 1994). Cette protéine phosphatase peut être inhibée par l'acide okadaïque (concentration inhibitrice: 1-10 nM), la calyculine A (concentration inhibitrice: 1-5 nM), ou la tautomycine (produite par *Streptomyces spiroverticillatus*).

In vitro, la PP2A est capable de déphosphoryler efficacement les protéines tau recombinantes préalablement phosphorylées par certaines kinases de type PDPK (Goedert *et al.*, 1992b, 1995; Drewes *et al.*, 1993). La déphosphorylation endogène des protéines tau dans des cellules de type neuronal, provoquée ou non par des agents dépolymérisants,

comme la colchicine ou le nocadazole, pourrait être médiée par cette protéine phosphatase, la PP2A (Fleming et Johnson, 1995; Merrick *et al.*, 1996). Elle déphosphorylerait spécifiquement les protéines tau au niveau des résidus Ser202 et Thr205 (Merrick *et al.*, 1996). Cette phosphatase est retrouvée associée aux microtubules dans un grand nombre de lignées cellulaires, d'origine neuronale ou non. Cette localisation présente la phosphatase en bonne candidate pour la déphosphorylation des protéines tau *in vivo* (Sontag *et al.*, 1995). De plus, bien que cette phosphatase soit significativement moins exprimée chez l'adulte, son association avec les microtubules est augmentée dans le cerveau adulte de rat (Dudek and Johnson, 1995). Elle est impliquée dans la déphosphorylation des protéines tau au niveau de différents sites: Ser46, 199,202,396 et 404 (Gong *et al.*, 1994; Ono *et al.*, 1995).

III- 5- 3- 3 Protéine phosphatase 2B ou PP2B

Cette protéine phosphatase, encore appelée calcineurine, se trouve de manière prédominante dans le tissu nerveux. Comme pour la PP2A, il existe plusieurs isoformes de la sous-unité catalytique conduisant à plusieurs formes de la PP2B (Walter et Mumby, 1993). Cette PP2B, dépendante du calcium et de la calmoduline, peut être inhibée par des agents chélateurs du calcium, comme l'EGTA, ainsi que par des toxines comme la cyclosporine A ou l'acide okadaïque (à concentration élevée 5 μ M) (Walter et Mumby, 1993). L'expression et l'association aux microtubules de cette PP2B augmentent au cours de la vie et demeurent élevées au stade adulte (Dudek et Johnson, 1995). C'est en déphosphorylant les protéines microtubulaires tau et MAP2 que la calcineurine jouerait un rôle important au niveau des fonctions des microtubules (Goto *et al.*, 1985). En augmentant la concentration du calcium intracellulaire dans des cellules nerveuses, Fleming et Johnson constataient la déphosphorylation des protéines tau. Cette déphosphorylation était inhibée par la cyclosporine A, impliquant spécifiquement l'activité

phosphatasique de la PP2B (Fleming et Johnson, 1995). Cette protéine phosphatase est impliquée dans la déphosphorylation des protéines tau au niveau des résidus Ser46, 199, 202, 235, 396 et 404.

III- 5- 4- Régulation de la phosphorylation

L'état de phosphorylation des protéines tau résulte des activités conjointes des protéines kinases et phosphatases présentes dans les cellules.

Les protéines phosphatases 2A et 2B sont capables de déphosphoryler directement les protéines tau sur différents sites. La PP2A déphosphoryle efficacement, *in vitro*, les protéines tau préalablement phosphorylées par différentes protéines kinases (Goedert *et al.*, 1995), sur des sites communs ou non à ceux déphosphorylés par la PP2B (Ono *et al.*, 1995). Cette déphosphorylation est également observée dans des cellules ou des tranches de cerveau, où l'activité spécifique de la PP2A ou de la PP2B est analysée grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de ces deux PP (Saito *et al.*, 1995; Merrick *et al.*, 1996). Ces inhibiteurs pourraient agir directement sur les protéines phosphatases, en induisant une déméthylation ou même une protéolyse de la protéine phosphatase (Favre *et al.*, 1997). De plus, l'absence de la calcineurine A alpha dans le cerveau de souris (souris dépourvues du gène codant pour cette PP) entraîne une hyperphosphorylation des protéines tau, spécialement au niveau des résidus Ser396/404 (Kayali *et al.*, 1997). L'activité des protéines phosphatases sur la phosphorylation des protéines tau pourrait être également indirecte. En effet, cette activité pourrait s'exercer sur les protéines kinases dont l'activité est également régulée par leur état de phosphorylation. Ainsi, la PP2A purifiée déphosphoryle la protéine kinase capable de s'autophosphoryler, la CaMK II, et la sous unité α de la phosphorylase kinase (Lai *et al.*, 1986; Barnes *et al.*, 1995). Le traitement de tranches de cerveaux de rats, par les facteurs de croissance acide ou basique des fibroblastes, est capable de restaurer une partie de la phosphorylation des protéines tau au

site AT8, comme peut le faire le traitement de ces cellules par l'acide okadaïque à 1 μM (Burack et Halpain, 1996). Ces résultats suggèrent que la phosphorylation des protéines tau par ces traitements serait médiée par l'activation de certaines protéines kinases.

Comme leur expression, l'état de phosphorylation des protéines tau est régulé au cours du développement. Ainsi, les protéines tau, issues de cerveau de fœtus, sont plus hautement phosphorylées que les protéines tau exprimées dans le cerveau adulte, et l'étendue de cette phosphorylation résulte d'activités phosphatasiques plus ou moins importantes à ces différents stades du développement (Mawal-Dewan *et al.*, 1994; Rösner *et al.*, 1995). En effet, l'étude de la régulation de la phosphorylation au cours du développement montre que la transition des isoformes des protéines tau fœtales en protéines tau adultes (10 à 15 jours après la naissance chez le rat) coïncide avec une augmentation de l'activité phosphatasique, elle-même, concomitante à une diminution de l'activité kinasique (Mawal-Dewan *et al.*, 1994; Rösner *et al.*, 1995). De plus, certains sites semblent préférentiellement déphosphorylés chez l'adulte.

Les Ser396 et 404 phosphorylées sont reconnues par les anticorps monoclonaux AD2 (Buée-Scherrer *et al.*, 1996) et PHF-1 (Greenberg *et al.*, 1992). Ces résidus sont naturellement phosphorylés dans une lignée cellulaire de neuroblastomes humains, les SKNSH-SY 5Y (Martin *et al.*, 1995a). Cette phosphorylation est abondante, durant les premiers stades de différenciation induite par l'acide rétinoïque, puis diminue fortement dans des stades plus tardifs de différenciation (Martin *et al.*, 1995a). Cette diminution de phosphorylation est similaire à celle observée, *in vivo*, durant le développement axonal (Pope *et al.*, 1993), ou au niveau du développement d'extensions neuritiques dans les cellules SY 5Y (Pope *et al.*, 1994). La phosphorylation de ces protéines peut être modulée par la transduction de signaux extracellulaires. En effet, lorsque ces cellules en culture sont traitées par la fibronectine ou la laminine, deux protéines présentes naturellement dans la matrice extracellulaire, cette phosphorylation est favorisée. (Martin *et al.*, 1995a). Cette induction pourrait être médiée par les intégrines, dont la sous-unité $\beta 1$ est exprimée

par les SKNSH-SY 5Y (Rossino *et al.*, 1991), et dont l'implication comme récepteur membranaire dans l'initiation de signaux de transduction a été établie (Guan *et al.*, 1991; Hynes, 1987,1992). De plus, l'adhésion cellulaire, médiée par les intégrines, pourrait entraîner la stimulation et la translocation vers le noyau de MAP kinases (Chen *et al.*, 1994). La capacité de ces protéines kinases à phosphoryler les protéines tau a été largement montrée dans des expériences de phosphorylation réalisées *in vitro*, suggérant que cette activité kinasique pourrait être responsable ou participer à l'augmentation de l'immunomarquage des protéines tau par l'anticorps PHF-1. D'autres récepteurs membranaires, comme les récepteurs muscariniques à l'acétylcholine de type (m)1, pourraient également contrôler la phosphorylation des protéines tau. En effet, la stimulation de ces récepteurs exprimés après transfection par les cellules de phéochromocytome de rat, les PC12, conduit à une déphosphorylation des protéines tau (Sadot *et al.*, 1996a). Cette stimulation pourrait agir, en synergie, avec le Nerve Growth Factor (NGF), sur la phosphorylation des protéines tau. La régulation de la phosphorylation des protéines tau pourrait donc médier les informations provenant du système cholinergique jusqu'au cytosquelette (Sadot *et al.*, 1996a).

D'autres agents ou stress, comme les chocs thermiques, pourraient également induire des modifications de la phosphorylation des protéines tau (Papasozomenos, 1996). Ainsi, le traitement des cellules PC12 par choc thermique conduit à l'augmentation de la phosphorylation des protéines tau (Wallace *et al.*, 1993) Ainsi l'incubation, à 34 °C, de tranches de cerveaux de rats nouveau-nés, entraîne une déphosphorylation rapide des protéines tau aux sites reconnus par les anticorps Tau-1 et AT8, tandis que d'autres sites sont plus résistants, comme le site PHF-1 (Burack et Halpain, 1996). Une augmentation de la température conduit également à une déphosphorylation, révélée par une augmentation du marquage par l'anticorps Tau-1. Cette diminution du degré de phosphorylation des protéines tau est réversible (Papasozomenos et Su, 1995).

III- 5- 5- Implication de la phosphorylation sur les fonctions et le métabolisme des protéines tau

Les protéines tau sont donc retrouvées phosphorylées, *in vivo*, et cette phosphorylation a été décrite comme diminuant leur capacité à assembler les microtubules *in vitro* (Lindwall et Cole, 1984b). Au cours du cycle cellulaire, la phosphorylation des protéines tau varie. En interphase, la majorité des protéines tau, peu phosphorylées, sont trouvées associées avec les microtubules afin de maintenir l'architecture cellulaire. Par contre, au cours de la division cellulaire, la phosphorylation des protéines tau augmente (Pope *et al.*, 1994). Dans les cellules CHO transfectées par une isoforme des protéines tau, cette phosphorylation provoque la dissociation des protéines tau des microtubules, qui peuvent alors se réorganiser pour former le fuseau mitotique (Preuss *et al.*, 1995).

L'implication de la phosphorylation sur la conformation des protéines tau est visible après migration des protéines sur un gel SDS-PAGE. Sur un tel gel, les protéines tau déphosphorylées migrent plus rapidement que les mêmes espèces phosphorylées (Lindwall et Cole, 1984a,b). De même, après phosphorylation, les protéines tau recombinantes migrent moins rapidement (Gustke *et al.*, 1992; Lichtenberg-Kraag *et al.*, 1992; Mulot *et al.*, 1994).

La phosphorylation pourrait avoir un rôle protecteur vis à vis d'une dégradation enzymatique. En effet, la phosphorylation des protéines tau par la PKA diminue sa dégradation par la calpaine (Litersky et Johnson, 1992). Cette calpaine est une protéase, activée par le calcium, trouvée en forte concentration dans le cerveau (Perlmutter *et al.*, 1990). Néanmoins, les isoformes fœtales différemment phosphorylées sont efficacement dégradées par la m-calpaine, présente dans le cerveau (Mercken *et al.*, 1995).

A l'heure actuelle, il semble plus probable que, seule, la phosphorylation de certains sites interviendrait dans la capacité des protéines tau à se lier aux microtubules, ainsi que sa capacité à les polymériser.

La majorité des sites phosphorylables sur les protéines tau *in vivo* sont répartis de part et d'autres des régions répétitives. Leur phosphorylation *in vitro* par cdk-5 ou MAP Kinase diminue d'environ 20% l'interaction tau-tubuline, en entraînant des variations conformationnelles des protéines tau (Biernat *et al.*, 1993; Brandt et Lee, 1993; Trinczek *et al.*, 1995). La phosphorylation semble avoir le même effet sur les protéines tau vis-à-vis de la polymérisation des microtubules dans différentes lignées cellulaires transfectées par les protéines tau (Bramblett *et al.*, 1993; Haque *et al.*, 1995; Medina *et al.*, 1995). L'inhibition n'est donc que partielle.

Par contre, la phosphorylation des Ser262, Ser356 et, à un moindre niveau, celle des Ser293 et Ser324, localisées dans les régions impliquées dans la liaison aux microtubules, pourraient diminuer très fortement (Seubert *et al.*, 1995) voire même empêcher la liaison de tau aux microtubules (Biernat *et al.*, 1993; Drewes *et al.*, 1995; Trinczek *et al.*, 1995). La Ser262 semble de plus grand intérêt puisque c'est la seule de ces quatre Ser à être effectivement trouvée phosphorylée sur les protéines tau *in vivo* (Morishina-Kawashima *et al.*, 1995). De plus, la phosphorylation de ce résidu semble être augmentée chez les patients Alzheimer (Hasegawa *et al.*, 1992; Gross *et al.*, 1994).

La phosphorylation de la Thr231 semble intervenir dans la régulation de l'activité de nucléation des protéines tau (Wang *et al.*, 1996).

III- 6- Les autres modifications post-traductionnelles

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

La O-glycosylation, caractérisée par l'addition d'un résidu N-acétyl glucosamine sur le groupement hydroxyle d'une sérine et/ou d'une thréonine, pourrait avoir des

fonctions modulatrices similaires à la phosphorylation (Holt *et al.*, 1987; Kears *et al.*, 1991; Haltiwanger *et al.*, 1992). Cette modification post-traductionnelle a été rapportée sur des résidus des protéines tau purifiées à partir de cerveau de boeuf (Arnold *et al.*, 1996).

III- 7- Localisation des protéines tau

III- 7- 1- Dans les cellules de type neuronal

III- 7- 1- 1- Les protéines tau sont principalement localisées dans l'axone

La morphologie des neurones est caractérisée par une structure polarisée avec un compartiment axonal et un compartiment somato-dendritique. La distribution des protéines tau et MAP2 dans ces compartiments est caractéristique et pourrait jouer un rôle dans l'établissement et le maintien de la polarité neuronale (Matus *et al.*, 1981, 1994; Binder *et al.*, 1985, 1986; Peng *et al.*, 1986). *In situ*, les protéines tau sont majoritairement retrouvées dans l'axone tandis que MAP2 est localisée dans le soma et les dendrites (Bernhardt et Matus, 1984; De Camilli *et al.*, 1984; Binder *et al.*, 1985; Kowall et Kosik, 1987; Brion *et al.*, 1988; Trojanowski *et al.*, 1989). Parmi les mécanismes connus impliqués dans la compartimentation de ces MAPs, la localisation différentielle de leur ARNm semble intervenir. Garner et collaborateurs (1988) localisaient, par hybridation *in situ*, les ARNm codant pour MAP2. Plus récemment, dans des neurones différenciés, l'ARNm de tau est retrouvé concentré dans le corps cellulaire et la partie proximale de l'axone (Litman *et al.*, 1993) représentant peut-être une première étape dans l'acheminement de cet ARNm dans une région plus distale de l'axone. Dans les cellules neuronales, les microtubules pourraient participer au transport axoplasmique des ARNm

de tau, comme ils le font pour des vésicules ou des organites (Okabe et Hirokawa, 1989; Litman *et al.*, 1994). Des protéines spécifiques pourraient reconnaître certaines séquences, localisées dans la région 3'UTR des ARNm de tau, et agir, en tant que molécules chaperonnes, pour acheminer le transcrit jusqu'au site de traduction dans l'axone (Behar *et al.*, 1995). En plus de la localisation des ARNm, la compartimentation de ces MAPs peut également se produire par un taux de renouvellement différentiel local puisqu'après micro-injection dans les axones et les dendrites, les protéines tau demeureraient dans les axones alors que MAP2 se retrouvait dans le corps cellulaire et les dendrites (Hirokawa *et al.*, 1996). La structure des MAPs semble également participer à leur localisation sélective. En effet, les protéines MAP2 pourraient être empêchées, par la structure de leur domaine N-terminal, d'entrer dans l'axone, les confinant donc au niveau du soma et des dendrites (Kanai et Hirokawa, 1995).

Par leur extrémité N-terminale, les protéines tau seraient liées à des composants de la face cytosolique de la membrane plasmique des PC12, différenciées ou non. Cette association semble importante pour le développement de neurites, mais elle établirait aussi un rôle pour les protéines tau dans la médiation des interactions entre microtubules et membrane plasmique. De plus, leur structure primaire semble également leur conférer une liaison préférentielle pour les microtubules axonaux, dans le cas des protéines tau, ou pour les microtubules dendritiques ou présents dans le corps cellulaire pour MAP2 (Kanai et Hirokawa, 1995). Cette liaison des protéines tau aux microtubules axonaux a été impliquée dans le développement de la polarité neuronale. Leur répartition le long de l'axone semble significativement différente de la distribution des microtubules axonaux. En effet, tandis que les microtubules axonaux sont retrouvés plus fortement concentrés au niveau de l'axone proximal, la concentration en protéines augmente, quant à elle, vers l'axone distal avec le pic de concentration au niveau de la transition axone-cône de croissance (Kempf *et al.*, 1996) mais, aussi, au niveau du cône de croissance développé par des neurones primaires d'hippocampe de rat (Brandt *et al.*, 1995).

Bien que la fraction majoritaire des protéines tau cellulaires se situent dans le cytoplasme, Greenwood et Johnson ont montré la présence de protéines tau dans le noyau, et, plus particulièrement, au niveau du nucléole de cellules de neuroblastomes, les cellules LA-N-5 (Greenwood et Johnson, 1995). Les protéines cytosoliques et nucléaires sont approximativement phosphorylées à un degré similaire. Le transport des protéines tau du cytoplasme vers le noyau n'a pas encore été décrit mais ces protéines tau seraient phosphorylées dans le cytoplasme avant son transport vers le noyau (Greenwood et Johnson, 1995).

III- 7- 1- 2- La phosphorylation intervient dans la compartimentation des protéines tau

La localisation des protéines tau humaines est principalement axonale, mais des formes phosphorylées peuvent également être rencontrées au niveau du compartiment somato-dendritique (Papazosomenos et Binder, 1987; Delacourte *et al.*, 1990). En effet, le marquage intense des axones par l'anticorps Tau-1, un anticorps reconnaissant les protéines tau lorsqu'elles sont déphosphorylées dans une région s'étendant des résidus 189 à 207 (Szendrei *et al.*, 1993), suggérait une compartimentation axonale des protéines tau (Binder *et al.*, 1985; Papazosomenos et Binder, 1987). Cependant, lorsque le tissu était préalablement traité par la phosphatase alcaline, le corps cellulaire et les dendrites étaient également marqués par Tau-1 (Papazosomenos et Binder, 1987; Riederer et Binder, 1994). La localisation cellulaire des protéines tau dépendrait du degré de phosphorylation. Cette répartition, à la fois dans les prolongements cellulaires et le soma, a également été observée dans des fibroblastes transfectés par tau (Lo *et al.*, 1993). La phosphorylation des protéines tau pourrait également agir sur l'axogénèse qui a été particulièrement étudiée au niveau des cultures de neurones hippocampiques. Ainsi, lors des premiers stades, les protéines tau sont retrouvées dans le corps cellulaire mais également dans tous les neurites.

Néanmoins, la phosphorylation au niveau du site Tau-1 est plus faible au niveau de l'axone naissant qu'au niveau des prolongements plus petits, précurseurs des neurites, ou du corps cellulaire (Mandell et Banker, 1996). Au cours de l'élongation de l'axone, un gradient de phosphorylation proximo-distal est établi, avec une phosphorylation au site Tau-1 plus importante à la base de l'axone qu'au niveau du cône de croissance. L'estimation réalisée par Mandell et Banker (1996) propose une répartition de 80% des protéines tau phosphorylées au site Tau-1 réparties dans le soma, les prolongements mineurs et l'axone proximal et de seulement 20% de ces protéines tau phosphorylées dans l'axone distal et le cône de croissance. Cette répartition est également observée au niveau d'une culture primaire de neurones de moëlle épinière (Kanai et Hirokawa, 1995). La modulation de ce gradient de phosphorylation par des signaux transmembranaires pourrait diriger l'établissement de la polarité neuronale.

III- 7- 2- Dans des cellules non neuronales

Les protéines tau peuvent être exprimées dans les cellules gliales, principalement au cours de maladies dégénératives (Yamazaki *et al.*, 1995; Chin et Goldman, 1996). Les protéines tau ont été mise en évidence dans des oligodendrocytes au niveau du cerveau de rat, mais également dans des oligodendrocytes en culture provenant d'agneau. Leur localisation est différente. En effet, les protéines tau ne sont trouvées que dans le soma chez le rat. Par contre, les prolongements cellulaires et les structures ressemblant aux cônes de croissance sont marqués en plus dans les cultures d'oligodendrocytes d'agneau (Lopresti *et al.*, 1995).

Les transcrits tau ont été, comme les protéines, détectés dans différents tissus, tels que le coeur, le muscle, le foie, les testicules (Ashman *et al.*, 1992; Gu *et al.*, 1996; Oyama *et al.*, 1996), ou les fibroblastes (Ingelson et Lannfelt, 1996).

III- 8- Protéines tau et Maladie d'Alzheimer

III- 8- 1- Structure des PHFs et agencement des tau au sein de ces structures

III- 8- 1- 1- Ultra-Structure des PHFs

Dans la maladie d'Alzheimer, les enchevêtrements neurofibrillaires sont retrouvés dans les corps cellulaires, dans les dendrites sous la forme de fibres incurvées, et dans les neurites anormaux associés avec les plaques séniles. Ces enchevêtrements neurofibrillaires sont également retrouvés au cours du vieillissement normal mais l'étendue de ces anomalies est réduite à la région hippocampique (Bouras *et al.*, 1994). Le principal composant de ces 3 lésions neurofibrillaires est une structure inhabituelle au niveau du cytosquelette: les paires de filaments appariés en hélice (PHFs) (Kidd, 1963, 1964), mais on trouve également des filaments droits (Crowther, 1991). Le développement de techniques d'extraction a favorisé les études ultrastructurales de ces PHFs. Différentes études ont ainsi proposé une représentation schématique de la structure fine de ces PHFs. Selon Wischik et collaborateurs, les PHFs résulteraient de l'assemblage de deux rubans hélicoïdaux qui présenteraient une périodicité d'environ d'environ 80 nm et un diamètre variant de 8 à 20 nm (Wischik *et al.*, 1985). Pour Wen et Wisniewski, l'hélice est formée de protofilaments unis par des ponts tandis que Miyakawa proposait l'assimilation des PHFs à des tubules torsadés formés de 8 protofilaments hélicoïdaux (Wen et Wisniewski, 1987; Miyakawa, 1989). Plus récemment, Ikonomic et collaborateurs proposaient que chaque sous-unité structurale des PHFs était constituée d'au moins 4 protofilaments identiques (Ikonomic *et al.*, 1995).

Les PHFs peuvent être isolées soit sous la forme de fragments enchevêtrés (Kondo *et al.*, 1988; Wischik *et al.*, 1988a), soit sous la forme de filaments dispersés (Greenberg et Davies, 1990; Lee *et al.*, 1991). Ces deux types de PHFs présentent des séquences communes, mais diffèrent dans leurs propriétés. En effet, tandis que la plupart des PHFs, sous la forme de filaments dispersés, sont solubles en guanidine ou en SDS, la plupart des PHFs, sous la forme de fragments enchevêtrés, sont insolubles dans ces réactifs. De plus, ils présentent une sensibilité différente aux protéases. Le traitement par la pronase de préparations d'enchevêtrements libère le contour des PHFs mais ne dégrade pas le "cœur", le centre de ces PHFs. Par contre, les PHFs, sous la forme de filaments dispersés, sont complètement dégradés lorsqu'ils subissent le même traitement (Goedert *et al.*, 1992c) (**FIGURE 15**).

III- 8- 1- 2- Agencement des tau au sein des PHFs

De nombreuses études biochimiques ont rapporté que les protéines tau représentent un composant majeur de ces PHFs (Goedert *et al.*, 1988; Wischik *et al.*, 1988a,b; Kondo *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 1991). Selon certains auteurs, les protéines tau formeraient un axe protéique résistant au sein des PHFs. La digestion des PHFs par la pronase ou la trypsine, ainsi que l'utilisation d'anticorps dirigés contre différentes régions de la molécule de tau, ont révélé que les parties amino- et carboxy-terminales de tau se trouvaient à l'extérieur, tandis que les régions répétitives formaient le cœur de la structure et étaient associées à de l'ubiquitine, élément important dans le système de dégradation des protéines cytosoliques dépendant de l'ATP (**FIGURE 15**) (Mori *et al.*, 1987; Wischik *et al.*, 1988a,b; Kondo *et al.*, 1988; Goedert *et al.*, 1992c). L'extrémité carboxy-terminale est beaucoup moins sensible que l'extrémité amino-terminale à l'activité protéasique. En effet, la région des domaines répétés dans la moitié carboxy-terminale formant l'axe des PHFs sont donc beaucoup moins accessibles aux protéases que les extrémités amino-terminales, plus

éloignées de l'axe (Jakes *et al.*, 1991). Que les isoformes aient 3 ou 4 séquences répétitives, c'est toujours une zone d'une longueur égale à 3 séquences répétitives qui est protégée des dégradations (Jakes *et al.*, 1991). Ces résultats suggèrent donc que les protéines tau pourraient s'associer entre elles par leur domaine de liaison aux microtubules et ainsi conduire à la formation de PHFs.

Une classe de PHFs, isolée sous la forme de filaments dispersés et solubles en SDS, est constituée de protéines tau complètes et hyperphosphorylées; ces protéines ont été appelées protéines tau-PHF ou A68 (Greenberg et Davies, 1990; Lee *et al.*, 1991). De telles structures représenteraient les premiers stades de formation de PHFs. Ainsi, ces tau-PHF s'accumuleraient sous forme de PHFs, subiraient un clivage au niveau de sa moitié amino-terminale qui serait suivi d'une ubiquitination (Morishima-Kawashima *et al.*, 1993).

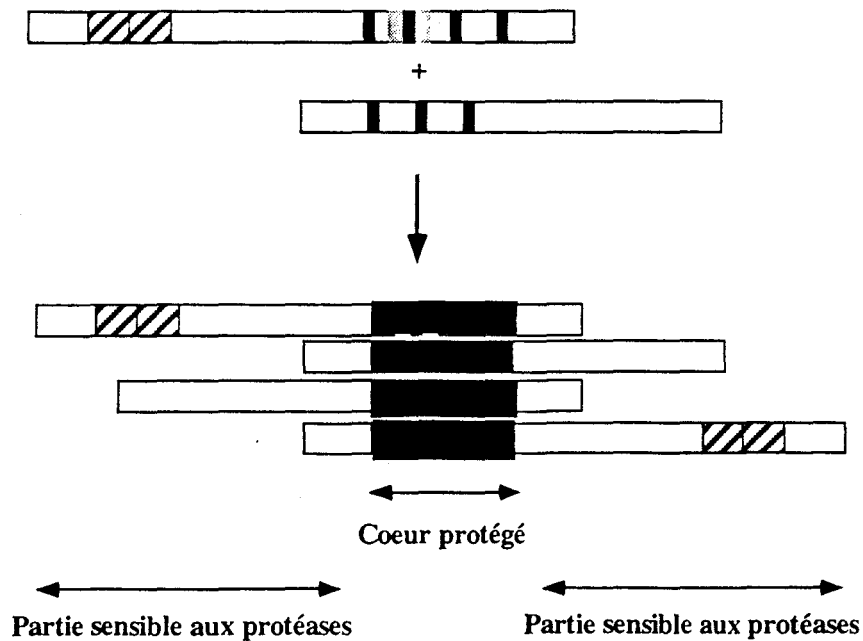


FIGURE 15: Agencement des protéines tau au sein des PHFs

III- 7- 1- 3- Présence de tels enchevêtrements dans d'autres démences

Une des caractéristiques principales d'un grand nombre de maladies neurodégénératives est la présence d'enchevêtrements neurofibrillaires au niveau des neurones. L'analyse par la microscopie électronique permet d'analyser la structure des enchevêtrements et de différencier les maladies en deux catégories: celles dont les enchevêtrements sont constitués de filaments droits, comme la dégénérescence cortico basale ou la paralysie supranucléaire progressive, et celles dont ces enchevêtrements sont faits de PHFs (pour revue, voir Delacourte et Buée, 1997). Néanmoins, les pathologies se distinguent également par une distribution différente de la dégénérescence neurofibrillaire dans les couches et les aires du cerveau (Hof et Morrison, 1994).

III- 8- 2- **Phosphorylation des protéines tau-PHF**

III- 8- 2- 1- Analyse de la phosphorylation des protéines tau-PHF

En 1994, Matsuo et collaborateurs montraient que la phosphorylation des tau-PHF ne semblait pas anormale puisque la plupart des sites supposés anormalement phosphorylés sur les protéines étaient également retrouvés sur les protéines tau provenant de biopsies de tissu cérébral normal adulte. Ce matériel se différenciait des préparations préalablement étudiées par un délai post-mortem court (Matsuo *et al.*, 1994). La phosphorylation apparemment plus faible des protéines tau provenant de tissu cérébral normal autopsique résultait des activités phosphatasiques endogènes restées très actives durant le délai post-mortem (Matsuo *et al.*, 1994; Mawal-Dewan *et al.*, 1994; Buée-Scherrer *et al.*, 1996a).

Par contre, quelle que soit la durée du délai post-mortem, les protéines tau-PHF demeuraient hyperphosphorylées, suggérant qu'une diminution ou une dérégulation des activités phosphatasiques dans le cerveau de patients pourrait contribuer à cette hyperphosphorylation des protéines tau (Matsuo *et al.*, 1994; Iqbal *et al.*, 1994b).

Les protéines tau extraites de ces PHF, appelées PHF-tau, présentent une mobilité ralentie en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) et un point isoélectrique, compris entre 5,5 et 6,5, plus acide que celui des protéines tau autopsiques (Flament *et al.*, 1989; Ksiezak-Reding *et al.*, 1992). La migration en gel SDS-PAGE de ces protéines tau-PHF montrent que les bandes sont également accompagnées d'une traînée qui vraisemblablement représente le matériel insoluble dans le SDS des PHF. Cette traînée est différemment reconnue par les anticorps dépendants de la phosphorylation (Sergeant *et al.*, 1997). La caractérisation biochimique de ces tau-PHF par la technique des immunoempreintes, révéla la présence d'un triplet de protéines, tau55, tau64 et tau69 (selon leur poids moléculaire apparent), également appelées A68 ou tau-PHF, uniquement dans les homogénats de cerveaux de patients atteints de la MA et pas dans les homogénats de cerveaux de témoins autopsiés (Flament *et al.*, 1989; Flament et Delacourte, 1989; Delacourte *et al.*, 1990; Greenberg et Davies, 1990; Ksiezak-Reding *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1991; Greenberg *et al.*, 1992). Plus récemment, une bande de plus haut poids moléculaire, appelée tau74, a également été décrite (Delacourte *et al.*, 1996; Sergeant *et al.*, 1997). Plusieurs équipes ont montré qu'une phosphorylation de ces protéines était responsable de ces modifications (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986b; Flament *et al.*, 1989; Delacourte *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1991; Goedert *et al.*, 1992c).

III- 8- 2- 2- Correspondance entre les bandes du triplet et les six isoformes des protéines tau

Selon Goedert et collaborateurs (1992c), chaque bande du triplet de tau-PHF résulterait de l'hyperphosphorylation de deux isoformes des protéines tau; la bande appelée tau55 corespondrait aux isoformes $2^{-3}10^{-}$ et $2^{-3}10^{+}$ hyperphosphorylés, la bande tau64 aux isoformes $2^{+3}10^{-}$ et $2^{+3}10^{+}$ et la bande tau69 aux isoformes $2^{+3}10^{-}$ et $2^{+3}10^{+}$. (Goedert *et al.*, 1992c). Plus récemment, Mulot et collaborateurs proposaient que l'addition d'un insert du côté amino- ou carboxy-terminal conduisait à une augmentation du poids moléculaire prenant ainsi en compte l'existence de la bande de 74 kDa (Mulot *et al.*, 1994). Selon leurs résultats, la bande tau55 correspondrait à l'isoforme la plus courte ($2^{-3}10^{-}$) hyperphosphorylée, tau64 aux isoformes avec un seul insert ($2^{+3}10^{-}$ et $2^{-3}10^{+}$), tau69 aux isoformes avec deux inserts ($2^{+3}10^{+}$, $2^{+3}10^{-}$) et enfin tau74 à l'isoforme la plus longue ($2^{+3}10^{+}$).

III- 8- 2- 3- Altération des fonctions des protéines tau-PHF

Ces protéines tau-PHF sont également caractérisées par la perte de leur capacité à se lier aux microtubules (Iqbal *et al.*, 1986). L'hyperphosphorylation des tau-PHF et leur incapacité à se lier aux microtubules sont restaurées après déphosphorylation. En effet, après déphosphorylation, les tau-PHF migrent au même niveau que les protéines tau extraites de cerveaux adultes témoins autopsiés, suggérant que les protéines tau-PHF sont hyperphosphorylées (Goedert *et al.*, 1992c; Gong *et al.*, 1994). De la même manière, la déphosphorylation de ces tau-PHF restaure leur capacité à se lier aux microtubules (Bramblett *et al.*, 1993; Iqbal *et al.*, 1994a; Wang *et al.*, 1995, 1996b).

L'hyperphosphorylation des protéines tau modifierait leur conformation, conduisant à la perte de leur liaison aux microtubules ainsi qu'à leur accumulation sous

forme de PHF. L'accumulation des protéines tau agrégées destabiliserait les microtubules et perturberait ainsi le transport axonal, conduisant à la dégénérescence du neurone. C'est pourquoi de nombreuses équipes ont cherché à élucider la nature de cette phosphorylation.

III- 8- 2- 4- Analyse des sites phosphorylés sur les protéines tau-PHF

La spectrométrie de masse et le séquençage peptidique (Watanabe *et al.*, 1993; Morishima-Kawashima *et al.*, 1995), ainsi que l'utilisation de sondes immunologiques dépendantes de la phosphorylation (**FIGURE 13, Tableau II**) (pour revue, Lee *et al.*, 1995), ont permis d'identifier les sites phosphorylés, *in vivo*, sur ces protéines tau-PHF. Les numéros d'acides aminés, utilisés pour décrire les différents sites de phosphorylation, correspondent à la numérotation de l'isoforme la plus longue des protéines tau humaines. Au total, 19 sites de phosphorylation ont été décrits par spectrométrie de masse (Morishima-Kawashima *et al.*, 1995): Ser 198, 199, 202, 208, 210, Thr 212, Ser 214, Thr 217, 231, Ser 235, 262, 396, 400, 403, 404, 412, 413 et 422. Cinq autres sites ont été également décrits comme étant phosphorylés sur les protéines tau-PHF dans d'autres études: Ser 46, Thr 123, Ser 137, Thr 181, Thr 205 (Crowther *et al.*, 1994; Brion *et al.*, 1991; Hasegawa *et al.*, 1993; Woodgett *et al.*, 1990; Goedert *et al.*, 1994,1995) (**FIGURE 16**).

Sur ces 21 sites, seulement 12 sont de type Ser/Thr-Pro. De plus, excepté la Ser 262, tous ces sites de phosphorylation sont localisés en dehors des domaines de liaison aux microtubules et sont concentrés pour la plupart dans deux régions, s'étendant des résidus 181 à 235 et des résidus 396 à 422.

Les protéines tau-PHF sont-elles phosphorylées anormalement ou hyperphosphorylées sur certains résidus?

Sites trouvés phosphorylés sur les protéines tau-PHF dans le cerveau de patient Alzheimer

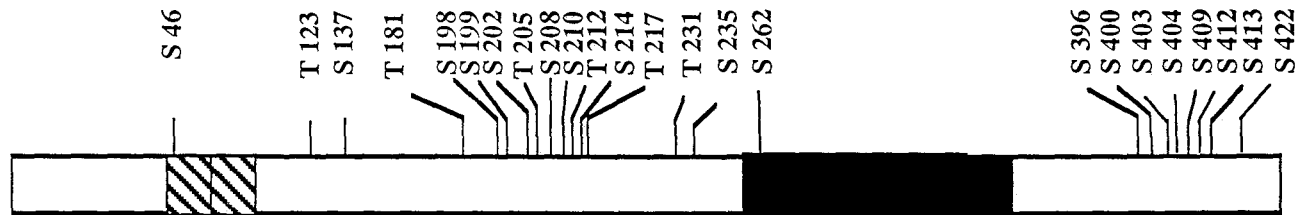


FIGURE 16: Identification des sites phosphorylés sur les protéines tau-PHF trouvées dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. La numérotation des résidus phosphorylés correspond à celle de l'isoforme la plus longue des protéines tau.

Une phosphorylation anormale de site signifie que certains résidus sont trouvés phosphorylés sur les tau-PHF et non sur les protéines tau extraites de tissu cérébral normal. Une hyperphosphorylation signifie que, pour un site donné, une plus grande proportion de molécules de tau-PHF soit trouvée phosphorylées que les protéines tau normales.

Bien que 14 de ces sites soient également trouvés phosphorylés sur les protéines tau fœtales, les protéines tau-PHF demeurent, comparées aux protéines tau normales biopsiques, à la fois anormalement phosphorylées et hyperphosphorylées. En effet, les nombreux anticorps dépendants de la phosphorylation détectent de manière plus forte les protéines tau-PHF que les protéines tau issues de tissu cérébral fœtal ou adulte biopsique (Matsuo *et al.*, 1994; Mawal-Dewan *et al.*, 1994; Buée-Scherrer *et al.*, 1996a). Les protéines tau-PHF sont également caractérisées par l'absence de détection par l'anticorps Tau-1. Enfin, les anticorps monoclonaux, AP422 (Hasegawa *et al.*, 1996), AT10 et PHF-27 (Hoffmann *et al.*, 1997) sont capables de détecter spécifiquement les tau-PHF. De plus, la spectrométrie de masse a permis d'identifier 7 sites uniquement phosphorylés sur les protéines tau-PHF. L'hyperphosphorylation des tau-PHF se traduit par une valeur de point isoélectrique, comprise entre 5,5 et 6,5, plus acide que les protéines tau normales autopsiques et biopsiques (Flament *et al.*, 1989; Ksiezak-Reding *et al.*, 1992; Sergeant *et al.*, 1995; 1997), ainsi que par un taux moyen de phosphate supérieur à celui trouvé pour les protéines tau biopsiques (5 à 9 moles de Phosphate par mole de tau) (Ksiezak-Reding *et al.*, 1992; Köpke *et al.*, 1993). Néanmoins, la migration complexe des tau-PHF, en électrophorèse bidimensionnelle, suggère qu'elles ne soient pas toutes phosphorylées aux mêmes sites (Sergeant *et al.*, 1997).

III- 8- 2- 5- Recherche des kinases impliquées dans la phosphorylation des protéines tau-PHF

A l'heure actuelle, les protéines kinases impliquées dans l'hyperphosphorylation de tau dans le cerveau atteint de la maladie d'Alzheimer n'ont pas été identifiées de manière certaine. Cependant, il existe de fortes "présomptions" impliquant certaines kinases dirigées contre des sites Ser/Thr-Pro, encore appelées les MAPKs. Trois familles de kinases ont été ainsi caractérisées: les MAPK, GSK3 et CDC-2 like kinases (Cdk2 et Cdk5). Ces kinases sont capables de modifier des protéines tau qui présentent alors des caractéristiques communes aux protéines tau-PHF: une réduction de leur mobilité électrophorétique accompagnée d'une plus forte immunoréactivité aux différents anticorps dépendants de la phosphorylation. De plus, pour la majorité d'entre elles, ces kinases ont été localisées au niveau des microtubules ainsi qu'au niveau des neurones présentant des PHF (Arendt *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1995; Yamaguchi *et al.*, 1996; Pei *et al.*, 1997).

Ainsi, plusieurs membres de la famille des MAPK, comme les formes p42, p44, p40 erk2 ainsi qu'une nouvelle protéine kinase appelée p49 ^{3F12}, sont capables de phosphoryler les protéines tau sur de nombreux sites présents sur les tau-PHF (Arendt *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 1993; Roder *et al.*, 1993, 1995; Mohit *et al.*, 1995). Parmi ces sites, on trouve la Ser 422 qui est un des sites caractéristiques des protéines tau-PHF. A ce jour, seule la MAPK est capable de phosphoryler les protéines tau, *in vitro*, sur ce site, suggérant donc qu'un membre de cette famille de protéines kinases pourrait être impliqué dans la phosphorylation anormale des protéines tau dans la M.A (Hasegawa *et al.*, 1996). Le traitement de cellules PC12 par des formes secrétées de l'APP peut stimuler l'activité des MAPKs (Greenberg *et al.*, 1994). Il en résulte une augmentation de la phosphorylation des protéines tau au niveau du site reconnu par l'anticorps AT8 (Greenberg et Kosik, 1995). De plus, les MAPKs ont été localisées au niveau de neurones portant des PHFs. Néanmoins, l'activité des MAPKs, stimulée par des agents inducteurs,

tels que des dérivés d'ester de phorbol, ou par transfection de leur ADN complémentaire dans des cellules non-neuronales, ne semble pas suffisante pour phosphoryler les protéines tau sur des sites caractéristiques des protéines tau-PHF (Sygowski *et al.*, 1993; Lovestone *et al.*, 1994; Latimer *et al.*, 1995; Baum *et al.*, 1995). La translocation vers le noyau des MAPK activées pourrait peut-être expliquer cette incapacité relative à phosphoryler les protéines tau (Lovestone *et al.*, 1994). Néanmoins, la diminution de l'activité des protéines phosphatases constatée dans la MA pourrait favoriser la phosphorylation des protéines tau par les MAP kinases comme cela a été observé au niveau de cellules traitées par certains inhibiteurs de phosphatase (Medina *et al.*, 1996; Garver *et al.*, 1995).

Par contre, la famille des GSK3 présenterait de meilleures candidates. En effet, les deux formes GSK3 α et β sont capables de phosphoryler les protéines tau dans de tels systèmes cellulaires et de modifier leur affinité pour les microtubules en phosphorylant efficacement certains sites trouvés sur les tau-PHF (Sperber *et al.*, 1995; Latimer *et al.*, 1995; Lovestone *et al.*, 1994, 1996; Wagner *et al.*, 1996). *In vitro*, la GSK3 α phosphoryle les protéines tau à de nombreux sites localisés sur les protéines tau-PHF, et l'ajout de tubuline ou d'héparine permet la phosphorylation sur des sites supplémentaires, localisés au niveau des domaines répétés ou en dehors de ces domaines (Moreno *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1994). La Thr212, ainsi phosphorylée par la GSK3 α , est l'un des deux sites reconnus par AT10, l'anticorps capable de distinguer les tau-PHF des tau biopsiques et foetales (Hoffman *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1994). De plus, les protéines tau humaines issues de cerveaux d'adultes contrôles migrent de manière similaire aux protéines tau-PHF après phosphorylation *in vitro* par la GSK3 β (Mulot *et al.*, 1994). Enfin, le traitement de culture primaire de neurones d'hippocampe de rat par le peptide amyloïde 25-35 provoque une accumulation cytoplasmique de dérivés d'APP ainsi qu'une diminution de formes sécrétées dans le milieu. Le traitement par des antisens limitant la synthèse de la GSK3 β bloque cette accumulation intraneuronale et empêche la mort des neurones suggérant que la

neurotoxicité du peptide serait médiée par cette kinase (Takashima *et al.*, 1995). Effectivement, le traitement de ces cellules en culture primaire par le peptide amyloïde est capable de stimuler la GSK3 β conduisant à une phosphorylation des protéines tau présentant certaines caractéristiques des tau-PHF mais aussi à une dislocation du transport axonal et finalement à la mort du neurone (Hoshi *et al.*, 1996; Takashima *et al.*, 1996; Imahori et Uchida, 1997). La GSK3 β , activée par le peptide A β , inactiverait la pyruvate déshydrogénase et modifierait ainsi le métabolisme du glucose et celui de l'acétylcholine. Ces altérations sont caractéristiques de la MA et pourraient conduire à la mort de neurones cholinergiques (Imahori et Uchida, 1997).

Les cdc-2 like kinases peuvent également phosphoryler les protéines tau (Mawal-Dewan *et al.*, 1992; Arioka *et al.*, 1993; Paudel *et al.*, 1993; Hisanaga *et al.*, 1993; Baumann *et al.*, 1993). Une protéine kinase appelée tau protéine kinase II (TPK II) est un complexe formé de deux sous-unités, une sous-unité catalytique de 30kDa identique à cdk5 (Kobayashi *et al.*, 1993) et d'une sous-unité régulatrice de 23kDa dérivant d'un précurseur plus long de 35kDa (Ishiguro *et al.*, 1994; Uchida *et al.*, 1994; Imahori et Uchida, 1997). TPK II semble également être une bonne candidate car cette kinase est effectivement fortement enrichie dans le cerveau adulte (Tsai *et al.*, 1993; Lew et Wang, 1995) et sa sous-unité régulatrice est spécifique du neurone (Tsai *et al.*, 1994; Lew *et al.*, 1994). *In vitro*, la préphosphorylation des protéines tau par TPK II favorise la phosphorylation de tau par GSK3 β (Ishiguro *et al.*, 1995; Sengupta *et al.*, 1997) qui peut alors reconnaître d'autres résidus sérine qui ne sont pas suivis de proline (Kemp et Pearson, 1990). Ces deux kinases ont été localisées au niveau des neurones mais cdk5 a été retrouvée particulièrement colocalisée avec les enchevêtrements neurofibrillaires accumulés au sein des neurones (Yamaguchi *et al.*, 1996). Enfin, une autre kinase pourrait être impliquée dans la phosphorylation de tau dans la maladie d'Alzheimer, il s'agit de la p110^{MARK} (Drewes *et al.*, 1995). Cette kinase est capable de phosphoryler plusieurs sérines localisées dans les domaines répétés des protéines tau (Drewes *et al.*, 1995;

Trinczek *et al.*, 1995), et principalement la Ser262 qui a été impliquée directement dans la régulation de la liaison des protéines tau aux microtubules. Néanmoins, la phosphorylation de ce site a été trouvée sur les protéines tau-PHF mais également sur les protéines tau foetales et biopsiques (Sperber *et al.*, 1995; Liu et Yen, 1996). De plus, l'inhibition de la liaison de tau aux microtubules observée *in vitro* après phosphorylation au site Ser262 (Biernat *et al.*, 1993) n'est pas retrouvée *in vivo* (Loverstone *et al.*, 1996). D'autres sites, comme les résidus Ser396/404 localisés dans la partie carboxy-terminale des protéines tau, modifieraient de manière plus efficace cette affinité lorsqu'ils sont phosphorylés (Bramblett *et al.*, 1993; Loverstone *et al.*, 1996).

III- 8- 2- 6- Recherche des protéines phosphatases impliquées dans l'hyperphosphorylation des protéines tau-PHF

L'hyperphosphorylation des protéines tau pourrait donc résulter:

- soit de l'activité accrue de certaines kinases suite à certains signaux extracellulaires, d'une compartimentalisation cellulaire différente des kinases mettant en contact les protéines tau et ces kinases,
- soit d'une activité phosphatasique déficiente dans certaines populations neuronales ou dans certains compartiments cellulaires,
- soit d'une incapacité des protéines phosphatases à déphosphoryler les protéines tau-PHF du fait de leur structure agrégée.

L'inhibition des activités phosphatasiques de type PP2A, et à un moindre niveau celle de PP1, par traitement de coupes de cerveau par l'acide okadaïque (Harris *et al.*, 1993; Garver *et al.*, 1995), de cellules en cultures (Vandermeeren *et al.*, 1993; Sautière *et al.*, 1994; Caillet-Boudin et Delacourte, 1996) et de neurones corticaux (Arias *et al.*, 1993) entraîne une hyperphosphorylation des protéines tau. Cette hyperphosphorylation est visualisée par une augmentation de leur poids moléculaire et de l'immunomarquage des

protéines tau par certains anticorps capables de reconnaître des épitopes spécifiques ou hautement phosphorylés sur les tau-PHF. Additionnellement, l'inhibition de ces deux PP, dans des cultures de neurones hippocampiques de rat fœtal, conduit à une modification de l'arborisation neuritique, la perte de prolongements neuronaux ainsi qu'à une diminution du nombre de synapses (Malchiodi-Alkedi *et al.*, 1997). Toutes ces modifications sont dans la maladie Alzheimer. La calcineurine (PP2B) a été également impliquée dans la déphosphorylation des protéines tau au niveau de coupes de cerveau (Garver *et al.*, 1995).

Ces résultats suggèrent un rôle potentiel de ces PP dans l'hyperphosphorylation des protéines tau. Effectivement, l'activité de ces protéines phosphatases, PP2A et PP2B et, dans une moindre mesure, PP1, diminue chez les patients Alzheimer (Gong *et al.*, 1993, 1995). De plus, une réduction de l'activité et/ou de la présence de PP2B a été corrélée avec les caractéristiques neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer (Pei *et al.*, 1994; Ladner *et al.*, 1996). Certains sites, comme les Thr212 et Ser214 qui sont spécifiquement phosphorylés sur les protéines tau-PHF sont des sites potentiels de déphosphorylation par PP2B (Blumenthal *et al.*, 1986). Une diminution de son activité au niveau du cerveau pourrait donc favoriser la phosphorylation de ces deux sites ou l'un de ces 14 autres sites potentiels répartis sur l'isoforme la plus longue de tau (Billingsley *et al.*, 1997).

In vitro, les protéines tau-PHF représentent des substrats plus résistants à ces 3 PP par rapport aux protéines tau fœtales. Cette déphosphorylation était optimisée lorsque les tau-PHF étaient préalablement solubilisées par du chlorure de guanidine (Watanabe *et al.*, 1993; Yamamoto *et al.*, 1995). Les protéines tau, hyperphosphorylées après traitement des cellules par l'acide okadaïque, résistent plus à l'activité des phosphatases cellulaires que les protéines tau phosphorylées normalement par les cellules (Soulié *et al.*, 1996). De plus, la déphosphorylation des protéines tau-PHF par PP2A et/ou PP2B diminue leur

résistance à la protéolyse par des protéases présentes dans le cerveau et activées par le calcium (Wang *et al.*, 1995). Ces résultats suggèrent donc que, *in vivo*, lorsque les protéines tau sont phosphorylées par les kinases cellulaires, elles ne sont que partiellement déphosphorylées, elles se dissocient progressivement des microtubules puis s'agrègent. Sous cette forme agrégée, elles ne seraient plus accessibles aux protéases et s'accumuleraient au sein des neurones conduisant à leur mort.

III- 8- 3- Autres modifications

III- 8- 3- 1- Glycosylation

Comme les protéines tau trouvées chez le boeuf, les protéines tau présentes dans le cerveau de patients de la MA sont glycosylées. Par contre aucun glycanne n'a été détecté sur les protéines tau normales (Wang *et al.*, 1996a). Les glycanes semblent nécessaires pour le maintien de la structure des protéines tau sous forme de PHFs et n'aurait aucun effet sur la capacité des protéines tau à promouvoir la formation des microtubules (Wang *et al.*, 1996a).

III- 8- 3- 2- Glycation

La glycation correspond à l'addition d'un sucre réducteur à une protéine, conduisant initialement à la formation de bases de Schiff, puis à celle de produits Amadori; cette réaction ne nécessite pas d'activité enzymatique. D'autres réarrangements moléculaires peuvent se produire, après une longue incubation, et conduire à la formation irréversible de produits présentant une glycation importante; ces produits sont appelés AGEs pour le terme anglais *Advanced Glycation End products*. Les protéines contenant un grand nombre de groupements amines libres, et donc de résidus lysyl, ainsi que les

protéines ayant une longue durée de vie, sont plus aisément glycatés (Lee et Cerami, 1992).

Les protéines tau, présentes au sein des PHFs, sont de bonnes candidates pour subir la glycation car elles sont effectivement stabilisées dans ces structures et sont riches en résidus Lysyl (44 résidus pour l'isoforme de tau la plus longue) (Goedert *et al.*, 1989a,b). Effectivement, les PHFs et leur composant principal, les protéines tau-PHF, issues du cortex temporal de patients atteints de la MA, étaient glycatées alors que les protéines tau normales, ou les protéines tau solubles, issues de cerveaux de malades, ne l'étaient pas (Ledesma *et al.*, 1994; Yan *et al.*, 1994). Des protéines tau présentant des AGEs, appelées tau-AGEs, ont été également localisées au niveau des PHFs au sein des enchevêtrements neurofibrillaires (Yan *et al.*, 1994). Il semblerait que les lysines, localisées au niveau des motifs de liaison à la tubuline, et plus particulièrement celles situées entre les acides aminés 318 et 336 (numérotation selon les a.a. constituant la plus longue isoforme), soient glycatées (Ledesma *et al.*, 1995). Très récemment, Nacharaju et collaborateurs (1997) ont caractérisé différents sites de glycation *in vitro* sur les protéines tau. Les formes qui présentent uniquement l'insertion du quatrième domaine répété sont plus rapidement glycatées que les formes fœtales. Les sites identifiés sont les résidus lysyl en position 87, 132, 150, 163, 174, 225, 234, 259, 280, 281, 347, 353 et 369 (selon la numérotation des résidus sur l'isoforme la plus longue des protéines tau). La localisation de la plupart de ces résidus glycatés, dans le domaine de liaison aux microtubules des protéines tau, pourrait expliquer la réduction plus importante de liaison aux microtubules, pour les protéines tau-PHF hyperphosphorylées et glycatées, par rapport aux protéines tau solubles, issues de cerveaux de patients atteints de la MA, qui ne sont pas glycatées (Ledesma *et al.*, 1994). L'introduction de protéines tau recombinantes, préalablement glycatées, dans des cellules de neuroblastomes humains, les cellules SKNSH-SY 5Y, conduit effectivement à un état oxydatif des cellules (Yan *et al.*, 1994). Le stress oxydatif, généré par la présence de tau-AGEs, pourrait provoquer l'activation de la transcription,

l'augmentation du précurseur du peptide A β , l'APP, et, finalement, la libération de peptides amyloïdes de 4kDa potentiellement toxiques (Yan *et al.*, 1995). Cette modification non enzymatique pourrait contribuer ainsi au développement de la pathologie de la maladie d'Alzheimer (Yan *et al.*, 1995).

III- 8- 3- 3- Ubiquitination

L'ubiquitine appartient à la famille des protéines de choc thermique ou hsp (pour le terme anglais *heat shock protein*). C'est un polypeptide de 76 a.a. qui se lie à une lysine de la protéine cible qui sera ensuite rapidement dégradée. Mori et collaborateurs ont mis en évidence l'association d'ubiquitine avec les PHFs insolubles en SDS (Mori *et al.*, 1987). Cette protéine semble avoir une importance dans la pathologie puisque son niveau est trouvé augmenté dans le cortex de patients Alzheimer et est également trouvé corrélé avec l'étendue de la pathologie neurofibrillaire dans le cortex (Wang *et al.*, 1991). La protéine cible de l'ubiquitine sur les PHFs est bien la protéine tau, dont 4 de ces résidus lysyls constituent des sites accepteurs d'ubiquitine; ces lysines sont situées dans le domaine de liaison aux microtubules (Morishima-Kawashima *et al.*, 1993). Néanmoins, l'ubiquitination des protéines tau semble être un événement tardif dans le développement de la MA et il est fort probable que cette ubiquitination ne survienne que lorsque les formes complètes et hyperphosphorylées de tau se sont accumulées, sous la forme de PHFs, et que leurs parties amino-terminales aient été dégradées (Baner *et al.*, 1991; Morishima-Kawashima *et al.*, 1993). De plus, la plupart des protéines tau-PHF ne sont que mono-ubiquitinées (Morishima-Kawashima *et al.*, 1993), ce qui ne représente pas un signal fort pour une dégradation cellulaire médiée par l'ubiquitine (Chau *et al.*, 1989; Gregori *et al.*, 1990).

III- 8- 4- Les protéines associées aux PHFs

III- 8- 4- 1- L'apolipoprotéine E

L'apolipoprotéine E (Apo E) est l'apolipoprotéine la plus abondante dans le cerveau humain, où elle est synthétisée et sécrétée par les astrocytes (Boyles *et al.*, 1985; Pitas *et al.*, 1987; Diedrich *et al.*, 1991; Poirier *et al.*, 1991, 1993). Elle jouerait un rôle dans la croissance et la réparation des prolongements neuritiques durant le développement et après une lésion (Boyles *et al.*, 1989; Ignatius *et al.*, 1986; Poirier *et al.*, 1993). Trois isoformes majeures de l'apolipoprotéine E existent et diffèrent entre elles par la présence d'un résidu cystéyl ou arginyl, aux positions 112 et 158 de la protéine (Weisgraber *et al.*, 1981). Ces isoformes sont appelées E2, E3 et E4 et correspondent respectivement aux combinaisons: Cys₁₁₂-Cys₁₅₈, Cys₁₁₂-Arg₁₅₈, et Arg₁₁₂-Arg₁₅₈. L'apo E a été localisée au niveau des deux lésions neuropathologiques de la MA, les dépôts extracellulaires d'amyloïde et les enchevêtrements neurofibrillaires intracellulaires (Namba *et al.*, 1991; Strittmatter *et al.*, 1993; Benzinger et Mufson, 1995; Richey *et al.*, 1995). Des études *in vitro* ont montré l'existence d'interactions entre l'apo E et les protéines tau qui étaient dépendantes de l'isoforme d'apo E; l'apo E3 se lie aux protéines tau mais pas l'isoforme apo E4 (Strittmatter *et al.*, 1994a; Huang *et al.*, 1995; Fleming *et al.*, 1996; Ledesma *et al.*, 1996) (**FIGURE 17**).

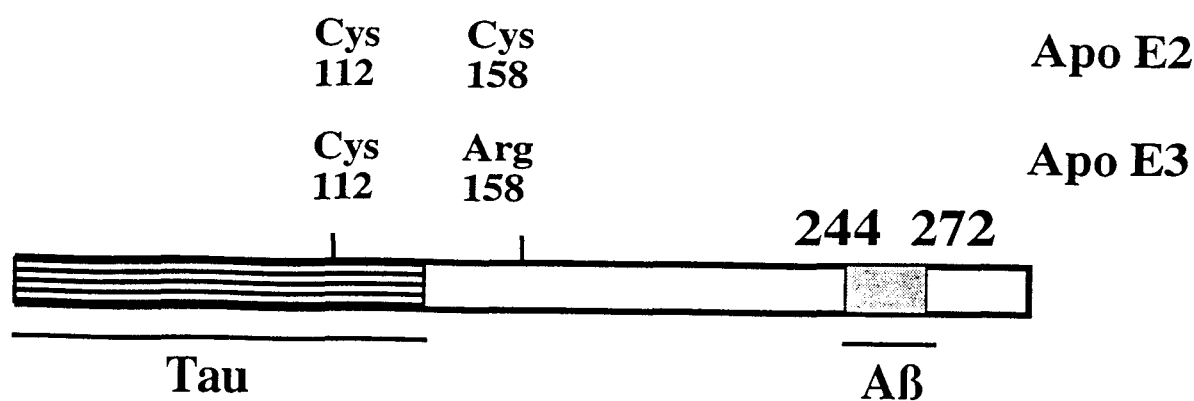


FIGURE 17: Localisation sur les isoformes d'apo E de la région responsable de la liaison aux protéines tau.

C'est par son extrémité amino-terminale, correspondant à son domaine de liaison avec les récepteurs membranaires, que l'apo E3 se lie à tau (Strittmatter *et al.*, 1994b), alors que les protéines tau possèdent plusieurs régions capables de se lier à l'apo E3. En effet, chaque domaine de liaison à la tubuline est capable de se lier à l'apo E3 avec une affinité supérieure pour les deux domaines répétés contenant une Cys, suggérant la création possible de ponts disulfures entre les deux molécules stabilisant le complexe tau-apo E, et également une séquence dans la moitié amino-terminale présentant une homologie avec les séquences répétitives (Huang *et al.*, 1995; Ledesma *et al.*, 1996). La phosphorylation des protéines tau, notamment au niveau de la Ser262, diminue fortement cette interaction (Huang *et al.*, 1995). Ces auteurs suggèrent qu'en se liant aux protéines tau, l'apo E3 pourrait protéger ces protéines des modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation ou la glycation (Strittmatter *et al.*, 1994b, Ledesma *et al.*,

1996). L'apo E4, par son incapacité à se lier aux protéines tau, ne protégerait pas ces protéines contre l'hyperphosphorylation observée dans la MA.

Cependant, pour que ces deux protéines interagissent, elles doivent se trouver dans le même compartiment cellulaire. Des études immunocytochimiques ont permis de montrer la présence d'apo E dans les neurones, présentant ou non des enchevêtrements neurofibrillaires (Han *et al.*, 1994 a, b; Benzing et Mufson, 1995; Schmechel *et al.*, 1993; Metzger *et al.*, 1996). Cette localisation neuronale de l'apo E pourrait être spécifique des primates et plus particulièrement de l'espèce humaine (Schmechel *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1996).

La présence cytoplasmique de l'apo E au sein des neurones pourrait résulter de son internalisation, médiée par différents récepteurs membranaires possibles:

- le récepteur au LDL (pour le terme anglais *low density lipoprotein*) (Mahley, 1988),
- la protéine reliée au récepteur au LDL, le LRP (Beisiegel *et al.*, 1989),
- le récepteur au VLDL (pour le terme anglais *very low density lipoprotein*) (Takahashi *et al.*, 1992),
- et probablement à travers l'apoER2 nouvellement décrit par Kim et collaborateurs (Kim *et al.*, 1996). Tous ces récepteurs ont été identifiés dans le cerveau (Pitas *et al.*, 1987; Swanson *et al.*, 1988; Wolf *et al.*, 1992; Rebeck *et al.*, 1993; Gafvels *et al.*, 1994; Christie *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1996). Avant sa dégradation au cours de l'endocytose médiée par le LRP, l'apo E pourrait pénétrer dans le cytoplasme comme cela se passe pour certaines exotoxines (pour revue, Krieger et Herz, 1994). La synthèse de l'apo E, directement par les neurones, représenterait une alternative qui n'a cependant jamais été mise en évidence par hybridation *in situ* dans le cerveau (Driedrich *et al.*, 1991; Poirier *et al.*, 1991).

III- 8- 4- 2- Les protéines de choc thermique ou hsp:

Outre l'ubiquitine, d'autres protéines hsp peuvent se lier aux protéines tau. En effet, des études *in vitro* montrent, qu'à la suite d'un choc thermique, les protéines hsp forment un complexe avec les protéines tau nouvellement synthétisées (Wallace *et al.*, 1993; Kirby *et al.*, 1994). Cette association, provoquée en réponse à un stress, préviendrait la phosphorylation des protéines tau (Papazosomenos et Su, 1991).

III- 8- 4- 3- l'héparine et les glycosaminoglycannes:

Les glycosaminoglycannes sont associés à la DNF. Les protéines tau présentent de nombreux sites de liaison pour l'héparine, un glycosaminoglycanne fortement sulfaté, répartis sur toute la molécule (Goedert *et al.*, 1996). Cette molécule a été montrée comme favorisant la phosphorylation des protéines tau, en modifiant leur conformation (Mawal-Dewan *et al.*, 1992; Brandt *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1994). Elle a été également retrouvée associée aux enchevêtrements neurofibrillaires au sein des neurones, mais également dans des neurones sans enchevêtrement, suggérant que l'accumulation de l'héparane sulfate pourrait précéder l'hyperphosphorylation des protéines tau (Goedert *et al.*, 1996).

III- 8- 4- 4- L'aluminium:

Les sels d'aluminium sont immunodétectés au niveau des plaques séniles et de la DNF. Shin et collaborateurs ont suggéré que l'aluminium se lierait aux protéines tau-PHF *in vitro*, provoquerait leur agrégation et retarderait également leur protéolyse (Shin *et al.*, 1994).

III- 8- 4- 5- Glycolipides:

Des études immunohistochimiques ont permis de détecter des gangliosides au niveau des NFTs sur coupe de cerveaux et associés avec des PHFs isolés (Emory *et al.*,

1987; Clements *et al.*, 1990). Les gangliosides sont des hétérolipides azotés, principalement trouvés au niveau des membranes plasmiques des neurones, et représentent des composants importants des divers sites récepteurs situés sur la surface de ces membranes, notamment, au niveau des terminaisons nerveuses. Sparkman et collaborateurs ont suggéré que, seulement, 5% du corps des PHFs, résistants aux protéases, était constitué de protéines (Sparkman *et al.*, 1991; 1993). Un glycolipide serait associé avec le cœur des PHFs (Sparkman *et al.*, 1991) dont la structure est similaire aux amphiphiles (Goux *et al.*, 1996).

III- 8- 4- 5- La transglutaminase tissulaire :

Cette enzyme a été localisée dans les neurones par immunocytochimie (Miller et Anderton, 1986) et est particulièrement abondante au niveau des terminaisons nerveuses (Gilad et Varon, 1985; Facchiano *et al.*, 1993). Les transglutaminases sont des enzymes activées par le calcium et sont capables de créer des pontages entre des molécules, conduisant à la formation de complexes de haut poids moléculaire, résistants à la protéolyse et insolubles, notamment dans les détergents (Folk et Finlayson, 1977; Selkoe *et al.*, 1982b), similaires aux enchevêtrements neurofibrillaires (Selkoe *et al.*, 1982a,b). La présence de transglutaminase et de la DNF a été récemment décrite par immunofluorescence dans les neurones en dégénérescence (Appelt *et al.*, 1996). En fait, cette transglutaminase est associée aux protéines tau au sein des PHFs (Appelt et Balin, 1997). *In vitro*, la transglutaminase crée des pontages entre les molécules de tau, qui représentent un très bon substrat pour cette enzyme (Dudek et Johnson, 1993), et conduit ainsi au développement de structures filamenteuses fortement insolubles (Miller et Johnson, 1995; Appelt et Balin, 1997). L'isoforme la plus longue semble constituer un meilleur substrat pour cette enzyme que l'isoforme la plus courte (Miller et Johnson, 1995). Les sites modifiés par la transglutaminase, lysyl et glutamyl, sont localisés dans la partie carboxy-terminale des protéines tau (Miller et Johnson, 1995).

III- 8- 5- Assemblage *in vitro* des protéines tau en structure ressemblant aux filaments trouvés dans la MA

Il semble de plus en plus improbable que seule l'hyperphosphorylation des protéines tau soit suffisante pour conduire à la formation des PHFs *in vivo*. Il semble que des combinaisons de modifications structurales des protéines tau et de modifications environnementales au sein du neurone puissent agir synergiquement, pour conduire à l'agrégation des protéines tau sous forme de PHFs. Plusieurs études ont cherché à reconstituer de tels filaments *in vitro*.

Ainsi, différents fragments des protéines tau non phosphorylés et comprenant les domaines de liaison à la tubuline, s'associent pour former des structures ressemblant aux PHFs, tandis que les molécules complètes sont incapables de s'autoassembler (Kiezak-Reding et Yen, 1991; Crowther *et al.*, 1992; Wille *et al.*, 1992). La protéolyse des protéines tau favoriserait également la formation de tels filaments (Gonzalez *et al.*, 1992; Wischik *et al.*, 1988b). Ces résultats suggèrent que d'autres régions, présentes sur les protéines tau, pourraient empêcher les domaines de liaison aux microtubules d'interagir. La phosphorylation des protéines tau autour des séquences répétitives, ou la présence de molécules polyanioniques, pourrait conduire à un changement conformationnel de la protéine tau ou à l'annulation de ses charges positives, permettant d'aboutir à des interactions tau-tau. Malgré tout, sous des conditions drastiques (haute concentration saline, présence d'inhibiteurs de protéases) Crowther et collaborateurs ont décrit la formation plus limitée de filaments enroulés à partir de molécules complètes de tau (Crowther *et al.*, 1994).

Plus récemment, certaines équipes ont montré que la présence de glycosaminoglycannes sulfatés, dont l'héparine qui est le composant le plus sulfaté, facilitait la phosphorylation des protéines tau par certaines protéines kinases (Brandt *et al.*, 1994; Moreno *et al.*, 1995). Cette phosphorylation était généralement accompagnée par la

formation d'agrégats de tau présentant de hauts poids moléculaires. L'analyse en microscopie électronique révélait la présence de filaments qui apparaissaient sous différentes morphologies selon le nombre, trois ou quatre, de séquences répétitives sur les molécules de tau. En effet, les isoformes, comprenant 3 séquences répétitives, s'assemblaient sous la forme de filaments appariés en hélice, tandis que les formes avec 4 séquences répétitives se présentaient sous la forme de filaments droits (Goedert *et al.*, 1996). Ces filaments, ressemblant aux PHFs, présentaient également un coeur protéique inaccessible aux anticorps, ainsi que des dimensions ultrastructurales proches de celles des PHFs trouvés dans la MA. Bien que Goedert et collaborateurs suggèrent que la formation des filaments ne résulte pas d'une seule interaction de charge, Kampers et collaborateurs (1996) montrent que des structures filamenteuses apparaissent également en présence d'ARN, une autre molécule polyanionique.

Dans cette étude, la phosphorylation ne semble ni favoriser, ni inhiber la formation des filaments (Goedert *et al.*, 1996). Pourtant, la fraction soluble des protéines tau hyperphosphorylées, extraite de cerveaux de patients atteints de la MA, appelée AD P-tau (Köpke *et al.*, 1993), s'associe à des protéines tau normales pour former de larges enchevêtrements de filaments (Alonso *et al.*, 1996). Le traitement préalable de ces AD P-tau par la phosphatase alcaline inhibe cette agrégation, suggérant donc un rôle direct de la phosphorylation dans l'agrégation des protéines tau. Ces protéines tau hyperphosphorylées agiraient comme un centre de nucléation pour les protéines tau normales, et concurrenceraient alors la tubuline et les microtubules dans leur liaison aux protéines tau normalement phosphorylées. Cette association AD P-tau-tau normales pourrait se réaliser au sein d'un neurone affecté et provoquerait alors la dissociation des microtubules assemblés à partir des protéines tau normales et de la tubuline (Alonso *et al.*, 1996). Une association semblable a été également décrite entre AD P-tau et les MAPs de haut poids moléculaire, mais elle n'aboutit pas à la formation de filaments, même si elle perturbe la formation des microtubules (Alonso *et al.*, 1997).

Bien que la phosphorylation anormale des protéines tau puisse promouvoir l'agrégation de tau et l'inhibition de l'assemblage des microtubules, la glycosylation qui a été montrée sur les protéines tau hyperphosphorylées, pourrait être responsable du maintien de la structure en PHFs (Wang *et al.*, 1996). En effet, la déglycosylation enzymatique des PHFs entraîne un changement morphologique des filaments qui prennent alors une structure rectiligne.

L'assemblage des protéines tau, sous la forme de PHFs, pourrait également être initialisée par leur dimérisation. Ainsi, la déamidation d'une glutamine permettrait l'assemblage des protéines tau (Montejo de Garcini *et al.*, 1986). Il a été également suggéré que des ponts disulfures, résultant de l'oxydation de résidus cystéyl, pourraient être responsables de la dimérisation ou de l'oligomérisation des protéines tau (de Ancos *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1995). Un résidu est retrouvé sur les formes ayant trois séquences répétitives, alors que les formes contenant quatre séquences répétitives présentent deux résidus (Goedert *et al.*, 1989a,b). La présence de deux résidus Cys (Cys-291 et Cys-322) sur les fragments des protéines tau possédant les 4 séquences répétitives bloquerait leur assemblage sous la forme de PHF, du fait de leur interaction intramoléculaire (Schweers *et al.*, 1995). Cette réaction d'oxydation semble peu vraisemblable au sein de neurones, où les conditions intracellulaires sont habituellement réductrices. Par contre, au cours du vieillissement ou au cours de la MA, l'oxydation des protéines augmentant, la dimérisation des protéines tau pourrait alors se réaliser (Bowling *et al.*, 1993; Coyle et Puttfarcken, 1993, Yan *et al.*, 1994). Néanmoins, la création de ponts disulfures entre les protéines tau contribue à leur dimérisation, mais d'autres événements semblent également intervenir puisque les protéines tau comprenant 3 séquences répétitives (et donc un seul résidu cystéyl) sont capables de s'assembler sous la forme d'oligomères (Guttmann *et al.*, 1995; Schweers *et al.*, 1995).

Enfin, plus récemment, la glycation des protéines tau a été également observée sur les protéines tau-PHF (Ledesma *et al.*, 1994; Yan *et al.*, 1994). Cette modification peut

réduire la liaison des protéines tau-PHF aux microtubules et pourrait aussi être impliquée dans l'agrégation des PHFs (Ledesma *et al.*, 1994). En effet, des protéines, ainsi modifiées, pourraient créer des pontages entre elles, et conduire ainsi à des structures agrégées et insolubles (Smith *et al.*, 1996), qui constitueraient de potentielles sources de stress oxydatif qui semblent exister dans la maladie d'Alzheimer (Yan *et al.*, 1994). En présence d'un tel environnement, on peut imaginer que la dimérisation des protéines tau par l'intermédiaire de ponts entre résidus Cys puisse se produire et, ce, de manière indépendante ou, au contraire, en plus de l'hyperphosphorylation.

Conclusion:

Les protéines tau retrouvées dans les homogénats de cerveaux de patients Alzheimer, les protéines tau-PHF, présentent certaines caractéristiques qui les distinguent des protéines tau adultes fonctionnelles au sein des neurones issus des cerveaux de personnes témoins. Elles se caractérisent notamment par une insolubilité et une phosphorylation beaucoup plus élevées que celles observées pour les protéines tau normales. Depuis les travaux de Matsuo et collaborateurs (1994), nous savons que le taux de phosphorylation des protéines tau normales, extraites de tissu cérébral biopsique, est plus élevé que le taux déterminé préalablement pour les protéines tau adultes, extraites de tissu cérébral autopsique. Ces protéines tau sont respectivement nommées tau biopsiques et tau autopsiques. Cette différence du taux de phosphorylation entre ces deux types de protéines tau normales résulte d'une déphosphorylation lors du délai post-mortem.

Nous avons récapitulé, sous la forme d'un tableau, quelques propriétés des protéines tau qui diffèrent selon leur origine tissulaire. Un déséquilibre kinases phosphatases semble donc toujours impliqué dans la MA. D'autres modifications telles que la glycosylation ou mla glycation, sont également associées à la formation de PHFs et pourraient directement ou indirectement intervenir dans leur formation.

	Tau Fœtales	Tau Adultes		Tau- PHF
		Autopsie	Biopsie	
Nombre d'isoformes	1	6	6	6
Masse moléculaire Apparente	52-53 kDa	45-62 kDa	55, 64, 69 kDa	55, 64, 69, 74 kDa
Solubilité	+	+	+	-
Polymérisation des microtubules	±	+	±	-
pI		6,5-8,5	6,2-7,1	6-6,95
Sensibilité aux phosphatases endogènes	-	-	+	-
Degré de phosphorylation	++	±	+	+++
PHF	-	-	-	+

Bien que l'état de phosphorylation des protéines tau normales et tau-PHF soit beaucoup mieux connue à l'heure actuelle, les dysfonctionnements biochimiques à l'origine de l'hyperphosphorylation ou de l'agrégation des protéines tau sous la forme de PHF demeurent mal connus. A l'heure actuelle, il n'existe pas de modèles animaux ou cellulaires de la maladie d'Alzheimer capables de reproduire, de manière concomitante, les deux types de lésions caractéristiques de la maladie. Des modèles d'études partielles, in vivo ou in vitro, de la maladie commencent à apparaître et permettront peut-être de déterminer les mécanismes de phosphorylation normale et anormale des protéines tau. De tels modèles permettront de reproduire, à terme, l'agrégation de protéines tau sous la forme de PHF. Un tel modèle serait idéal pour pouvoir ensuite identifier des molécules capables de prévenir ces mécanismes.

RESULTATS

Le but de l'étude était de reproduire, dans un modèle cellulaire, une hyperphosphorylation des protéines tau et d'étudier l'influence de certains facteurs sur le contrôle de cette phosphorylation. Les travaux personnels sont donc développés sous la forme de deux chapitres.

Le premier chapitre envisage la caractérisation de deux types de lignées cellulaires de neuroblastomes humains, les cellules SY 5Y et les cellules Kelly, pour ce qui est de la synthèse des protéines tau et de l'apo E.

Le deuxième chapitre se rapporte à l'étude de la phosphorylation cellulaire normale et de l'hyperphosphorylation des protéines tau induite par traitement des cellules par l'acide okadaïque, un inhibiteur des protéines phosphatases 1 et 2A. L'influence de certains facteurs telles que la nature de l'isoforme exprimée ou la présence ou non de certains variants de l'apolipoprotéine E sur la phosphorylation des protéines tau a été également recherchée.

Certains résultats concernant notre étude ont conduit à la réalisation d'articles qui ont été publiés ou soumis. Les articles sont alors annexés dans la partie " annexes ". Les résultats sont alors présentés brièvement dans ce chapitre tandis que les résultats complémentaires, non publiés, seront par contre détaillés.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

A ce jour, il n'existe pas de modèle animal de la maladie d'Alzheimer. D'une part, l'expression, dans des souris transgéniques, des gènes APP, PS1 ou PS2 mutés est à l'origine de l'apparition de dépôts amyloïdes ou d'une altération comportementale mais ces modifications ne sont pas accompagnées d'une dégénérescence neurofibrillaire (DNF). D'autre part, Götz et collaborateurs (1995) ont également obtenu des souris transgéniques exprimant l'isoforme la plus longue des protéines tau (tau 441). Bien que des épitopes, trouvés hautement phosphorylés sur les protéines tau-PHF, soient également phosphorylés sur ces protéines tau, aucune DNF n'a été observée. A l'heure actuelle, aucun modèle animal ne présente à la fois une NFT et des plaques séniles. En permettant l'étude des mécanismes cellulaires conduisant aux altérations caractéristiques de la maladie d'Alzheimer, les modèles cellulaires constituent une étape intermédiaire indispensable pour la compréhension des mécanismes d'induction d'épitopes présents sur les protéines tau-PHF.

De telles études ont été réalisées soit sur des cellules de type neuronal mais provenant du rat qui ne développe pas de dégénérescence neurofibrillaire; c'est le cas des cellules PC12 ou des cultures primaires d'hippocampe. D'autres études ont été réalisées sur des cellules d'origine humaine ou non et transfectées par certaines isoformes des protéines tau, c'est le cas des cellules COS, HeLa, 3T3, CHO, mais ces cellules ne sont pas de type neuronal. La maladie d'Alzheimer étant une pathologie spécifique à l'homme et qui se caractérise par une dégénérescence neuronale, nous avons choisi de travailler sur des cellules humaines de neuroblastome en lignée continue. Cette étude a été entamée dans le laboratoire avec les cellules SY 5Y qui sont des cellules caractérisées et largement utilisées dans de nombreux laboratoires. Elles présentent également l'avantage de se différencier facilement par le NGF (Nerve Growth Factor) ou l'acide rétinolique. Les

cellules Kelly sont, par contre, beaucoup moins connues. De plus, ces cellules de neuroblastome présentent l'avantage d'être des lignées continues et sont capables de subir de nombreux passages dans les conditions de culture *in vitro* contrairement aux cultures primaires de neurones. Enfin, la mise en place d'un modèle de dégénérescence neuronale nécessite une bonne connaissance des cellules utilisées, notamment en ce qui concerne les protéines directement impliquées ou capables d'intervenir dans la maladie d'Alzheimer. C'est pourquoi, notre premier objectif a été de caractériser les isoformes des protéines tau synthétisées par les deux lignées cellulaires. De plus, l'apolipoprotéine E (apo E) pourrait intervenir *in vivo* pour protéger les protéines tau d'une hyperphosphorylation pathologique. Nous avons, par conséquent, recherché si les lignées cellulaires étaient capables ou non de synthétiser cette protéine.

RESULTATS

I- Expression de l'apolipoprotéine E par les cellules de neuroblastomes humains: les cellules SKNSH-SY 5Y (SY 5Y) et les Kelly (Annexes 1 et 2)

I- 1- Présence intracellulaire de l'apo E

Plusieurs lignes d'évidence montrent la présence d'apo E dans les cellules de neuroblastomes humains, les cellules SY 5Y et Kelly. Après migration électrophorétique sur gel d'acrylamide SDS-PAGE puis transfert sur membrane de nitrocellulose, les protéines sont incubées avec deux anticorps, monoclonal (EO1) et polyclonal, spécifiques de l'apo E. Ces anticorps détectent, dans les extraits cellulaires des deux lignées, une bande spécifique (**FIGURE 18**). La spécificité de la liaison antigène-anticorps est montrée par l'abolition de la détection de la bande lorsque l'anticorps monoclonal a été préalablement incubé avec de l'apo E4 recombinante. De plus, le profil électrophorétique bi-dimensionnel de l'apo E présente dans les cellules Kelly correspond à celui de l'apo E d'un homogénat de cerveau dont le génotype $\epsilon 3/\epsilon 4$ a été préalablement déterminé (**Annexe 1**). Cependant, le poids moléculaire apparent de l'apo E cellulaire est de 32 kDa tandis qu'il est de 34 kDa pour l'apo E de cerveau et de 35 kDa pour l'apo E de sérum humain. La présence intracellulaire de l'apo E ne provient probablement pas d'une capture d'apo E du milieu de culture. En effet, nous n'avons jamais réussi à mettre en évidence de l'apo E dans le sérum de veau fœtal ajouté au milieu de culture des cellules; ce sérum est par ailleurs connu pour être pauvre en apolipoprotéines. Par contre, l'apo E de sérum humain est facilement détectée. Enfin, la privation des cellules en sérum lors de la différenciation par le NGF (4 à 8 jours) n'altère pas non plus la détection de cette bande par les anticorps dirigés contre l'apo E.

FIGURE 18: Présence intracellulaire d'apo E dans les cellules de neuroblastomes humains, les cellules SY 5Y et Kelly.

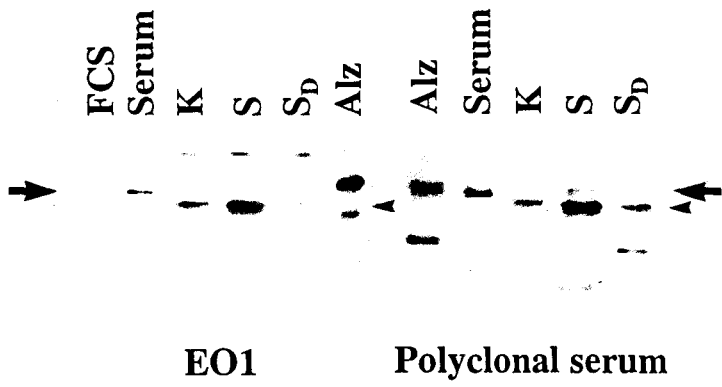
(A) La présence d'apo E, dans les cellules SY 5Y (S), les cellules SY 5Y différenciées par le NGF (SD) ainsi que dans les cellules Kelly, a été recherchée par la technique des immunoempreintes avec l'anticorps monoclonal EO1 et un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine entière. La présence d'apo E a été également analysée dans un homogénat de cerveau Alzheimer (Alz), de sérum humain (Serum) et de sérum de veau foetal (FCS) avec les mêmes anticorps. L'apo E cellulaire est indiquée avec la tête des flèches tandis que les flèches entières indiquent l'apo E détectée dans le sérum humain et dans l'homogénat de cerveau d'un patient Alzheimer.

(B) La spécificité de l'anticorps monoclonal EO1 a été vérifiée en comparant l'immunoréactivité de l'anticorps seul (K/EO1) ou préalablement incubé avec de l'apo E4 recombinante (K/EO1+E4) pour l'apo E présente dans les extraits cellulaires de Kelly. La détection de la bande disparaît lorsque l'anticorps a été saturé avec l'apo E4 recombinante.

(C) La présence d'apo E sécrétée par les cellules SY 5Y a été recherchée par Dot blot. La piste E3 correspond à 80 ng d'apo E3 recombinante, les pistes MS et MSD correspondent respectivement aux milieux de culture cellulaire délipidés des cellules SY 5Y et des cellules SY 5Y différenciées par le NGF. La détection est faible dans ces deux milieux par rapport au dépôt d'apo E3 recombinante suggérant une faible sécrétion d'apo E par les cellules.

(D) Le profil électrophorétique en électrophorèse bi-dimensionnelle de l'apo E présente dans les cellules Kelly a été comparé aux profils électrophorétiques de l'apo E présente dans des homogénats de cerveaux préalablement génotypés $\epsilon 3/\epsilon 3$ ($\epsilon 3/\epsilon 3$ brain) ou $\epsilon 3/\epsilon 4$ ($\epsilon 3/\epsilon 4$ brain) pour l'apo E. Le profil électrophorétique de l'apo E présente dans les cellules Kelly montre un profil proche de celui observé pour l'homogénat de cerveau dont le génotype est $\epsilon 3/\epsilon 4$. Seule la région d'intérêt est présentée sur cette figure. Le spot 1 correspond à l'isoforme apo E4, tandis que le spot 2, plus acide, correspond à la forme apo E3. Les spots 3, 4 et 5 correspondent aux produits sialylés de ces variants.

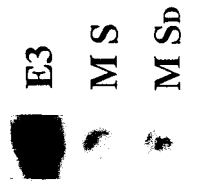
A



B

K/E01
K/E01+E4

C

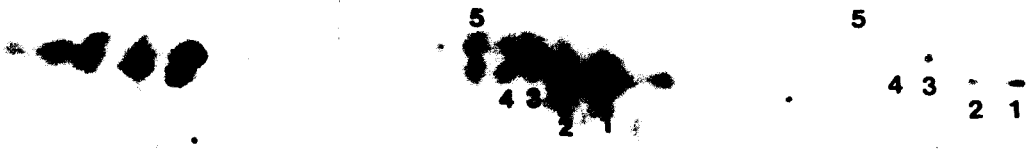


D

$\epsilon 3/\epsilon 3$ brain

$\epsilon 3/\epsilon 4$ brain

K



I- 2- Recherche des transcrits apo E dans les deux lignées cellulaires

Nous avons amplifié une bande de 244 pb correspondant à la région polymorphique de l'apo E (exon 4) par RT-PCR à partir d'ARN total extrait des deux lignées cellulaires. L'absence de produits amplifiés dans des expériences de contrôle amplifiant l'ARN total directement par PCR, sans étape de rétrotranscription, prouvait que les produits amplifiés par RT-PCR résultaient effectivement de l'amplification d'ARNm cellulaires d'apo E (**FIGURE 19**).

Les cellules SY 5Y et Kelly ont été génotypées respectivement $\epsilon 3/\epsilon 3$ et $\epsilon 3/\epsilon 4$ selon la méthode décrite par Hixson et Vernier (1990). L'analyse des produits amplifiés par RT-PCR après digestion enzymatique par l'enzyme de restriction *Cfo I* montre que les cellules SY 5Y synthétisent les transcrits apo E3 tandis que les Kelly synthétisent les transcrits apo E3 et apo E4 (**FIGURE 19**).

I- 3- Confirmation du type neuronal des deux lignées cellulaires

Dans le cerveau humain, l'apo E est principalement synthétisée et sécrétée par les astrocytes (Diedrich *et al.*, 1991; Poirier *et al.*, 1991, 1993). A ce jour, aucune synthèse d'apo E par des neurones ou des cellules de type neuronal n'a été décrite dans la littérature bien que l'apo E peut être détectée dans certains neurones. Comme nous avons trouvé que les cellules SY 5Y et Kelly étaient capables de synthétiser de l'apo E, nous avons vérifié que ces cellules avaient conservé leur caractère neuronal. Dans ce but, nous avons recherché au sein des cellules la présence des neurofilaments, reconnus comme marqueurs neuronaux ou de la protéine gliofibrillaire acide (GFAP), marqueur des cellules gliales. Les trois sous-unités des neurofilaments, NF-L, NF-M et NF-H, sont détectés dans les

FIGURE 19: Analyse des transcrits apo E des deux lignées cellulaires SY 5Y et Kelly.

(A) Représentation schématique de la région polymorphique de l'apo E (exon 4) amplifiée par RT-PCR. Les différents sites reconnus par l'enzyme de restriction *Cfo I* sont localisés sur l'exon 4 des 3 allèles $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$ de l'apo E. Les longues flèches indiquent les sites de restriction polymorphique de *Cfo I* tandis que les autres flèches indiquent les sites communs aux 3 allèles. La taille des fragments obtenus après digestion sont annotés sur le schéma.

(B) Recherche de la présence de transcrits apo E dans les cellules SY 5Y (S) et Kelly (K) par RT-PCR. Les produits amplifiés à partir de l'ARN total cellulaire sont déposés sur gel d'agarose 2%. Leur taille est comparée aux produits amplifiés par RT-PCR à partir d'ARN messagers extraits de tissu cérébral (MB). T⁻ correspond au contrôle négatif d'amplification réalisé en remplaçant l'ARN total cellulaire par de l'eau; TS⁺ et TK⁺ correspondent respectivement à l'amplification directe de l'ARN total par PCR extrait des cellules SY 5Y et Kelly. L'absence de produits amplifiés de 244 pb, au niveau de ces deux témoins, confirme l'absence d'ADN contaminant.

(C) Génotypage des cellules SY 5Y (S) et Kelly (K). L'exon 4 du gène de l'apo E, amplifié par PCR, est digéré par l'enzyme *Cfo I*. Les produits de digestion sont analysés sur un gel d'acrylamide 10%. Le profil de digestion de la bande amplifiée correspond au génotype $\epsilon 3/\epsilon 3$ pour les cellules SY 5Y et au génotype $\epsilon 3/\epsilon 4$ pour les cellules Kelly.

(D) Identification des transcrits apo E synthétisés par les cellules Kelly. Les produits amplifiés par RT-PCR (244 pb) (piste 4) sont digérés par l'enzyme *Cfo I* et leur migration sur gel d'acrylamide 10% est comparée aux marqueurs de taille $\epsilon 3/\epsilon 4$ (piste 2) et $\epsilon 3/\epsilon 3$ (piste 3). Ces marqueurs résultent respectivement de la digestion par l'enzyme *Cfo I* des produits amplifiés par RT-PCR à partir d'ARN total extrait de cerveaux humains génotypés $\epsilon 3/\epsilon 4$ et $\epsilon 3/\epsilon 3$. Cette migration est comparée au produit non digéré (piste 5) ainsi qu'au mélange d'une échelle de 100 pb et du marqueur de taille pGEM DNA (Proméga) (piste 1).

FIGURE 20: Analyse de la présence de marqueurs neuronaux et gliaux.

(A) La présence de neurofilaments, marqueurs neuronaux spécifiques, a été recherchée par la technique des immunoempreintes dans les extraits de cellules SY 5Y non différenciées (S) ou différenciées par le NGF (SD) et dans les extraits de Kelly (K). L'anticorps polyclonal 345, spécifique des 3 sous-unités (NF-L, NF-M, NF-H), et l'anticorps monoclonal SMI 31, spécifique d'un épitope phosphorylé sur les sous-unités NF-H et NF-M montrent la présence des 3 sous-unités de neurofilaments (NF) dans les extraits cellulaires. Cet immunomarquage augmente après différenciation des cellules SY 5Y par le NGF (SD). L'efficacité de la détection est vérifiée par l'utilisation d'homogénats de tissus cérébraux issus de patients Alzheimer (Alz), d'adultes contrôles (Ad) et de fœtus (F).

(B) La présence de marqueur glial a été recherchée par la technique des immunoempreintes. L'anticorps GF5 détecte la GFAP dans les homogénats de tissus cérébraux issus de patients Alzheimer (Alz), d'adultes contrôles (Ad) et de fœtus. Aucune bande n'est détectée dans les extraits de cellules SY 5Y (S) ou de cellules Kelly (K).

(C) Recherche de transcrits de la GFAP par RT-PCR. Le schéma localise, sur le transcrit de la GFAP, les amorces utilisées pour l'amplification ainsi que la taille du produit amplifiable. Aucune bande de taille attendue n'est amplifiée à partir de l'ARN total des cellules SY 5Y (S) ou Kelly (K) tandis qu'une bande de taille attendue (654 pb) est amplifiée à partir des extraits d'ARN de cerveaux (B). La piste T⁻ correspond au contrôle négatif d'amplification réalisé en remplaçant l'ARNtotal cellulaire par de l'eau.

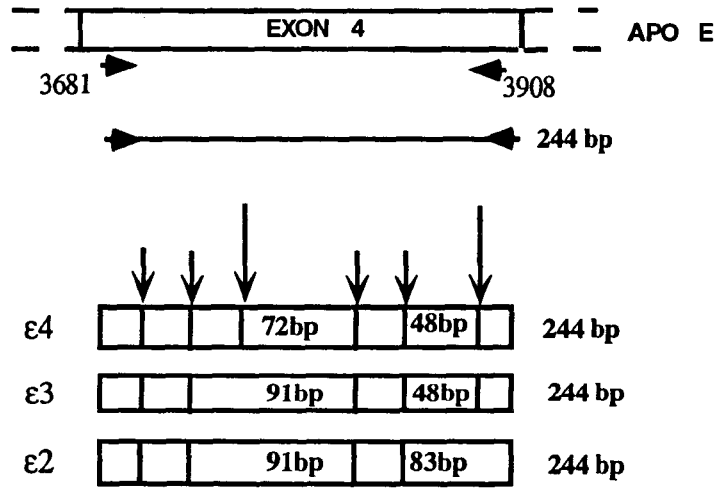
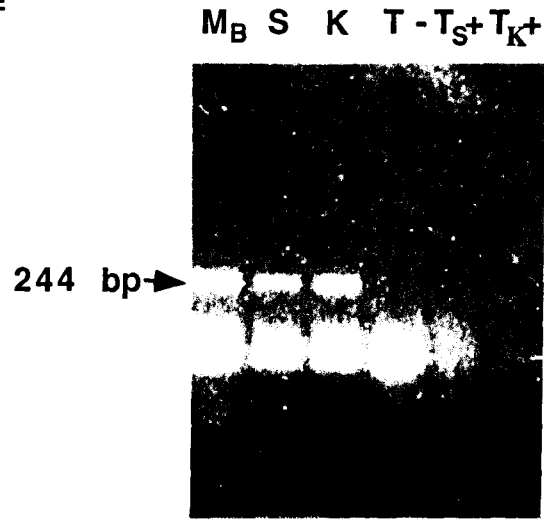
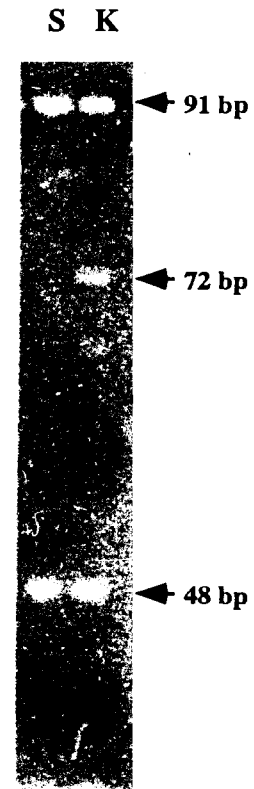
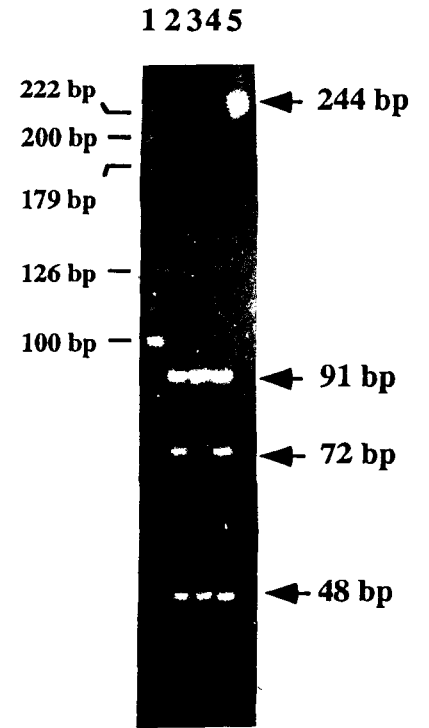
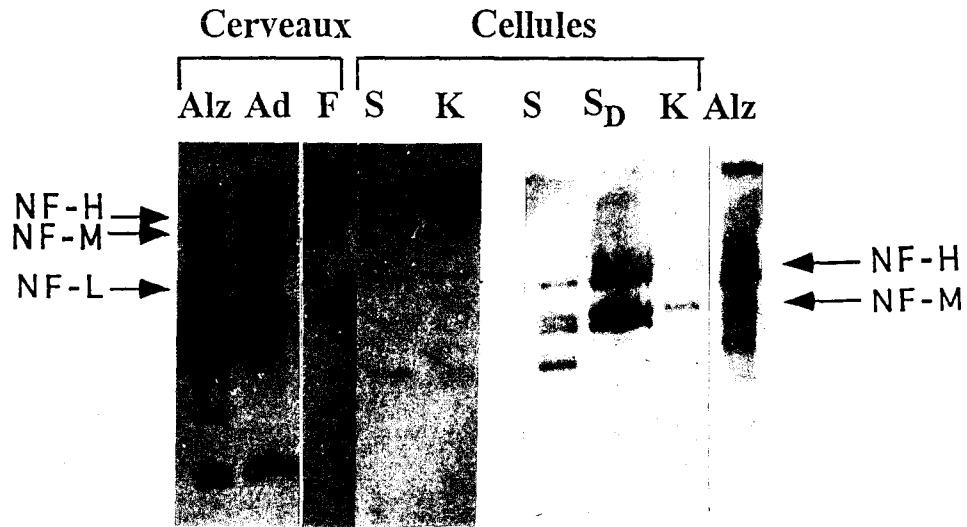
(A)**(B)****(C)****(D)**

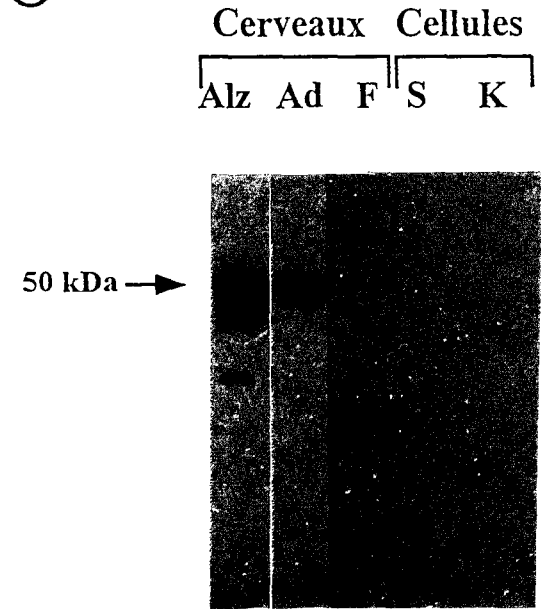
FIG. 3.

Dupont et al, 1997

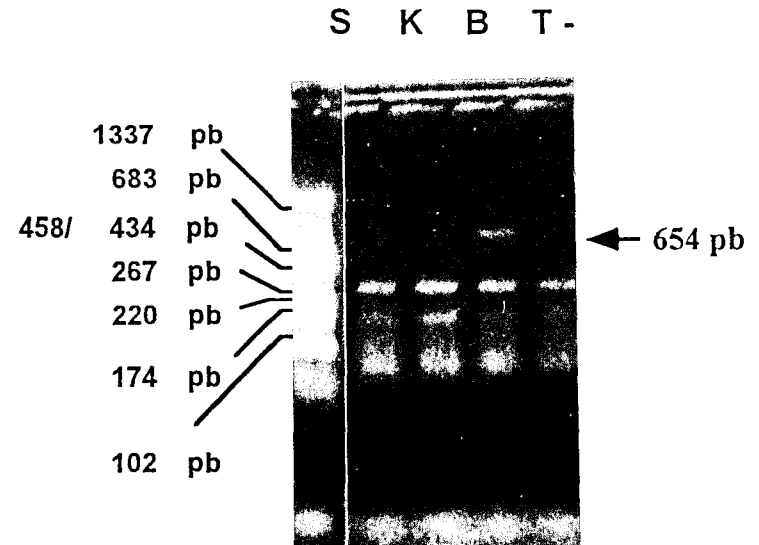
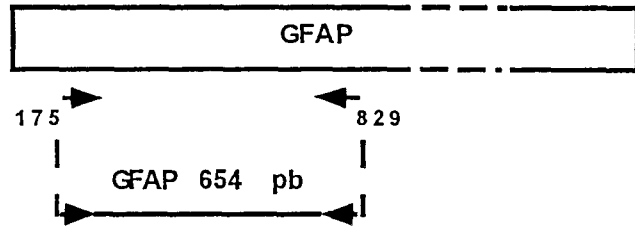
(A)



(B)



(C)



extraits cellulaires des Kelly et des SY 5Y par des anticorps polyclonal (345) et monoclonal (SMI 31) (**FIGURE 20**). L'immunomarquage des neurofilaments par l'anticorps SMI 31, qui reconnaît un épitope phosphorylé, dans le domaine carboxy-terminal des sous-unités NF-H et NF-M (Sternberger et Sternberger, 1983), augmente après traitement des cellules SY 5Y par le NGF. Par contre, nous n'avons jamais détecté ni la protéine GFAP ni les ARNm de cette protéine dans les extraits cellulaires.

II- Expression des protéines tau par ces deux lignées cellulaires (Annexes 3 et 4)

II- 1- Recherche des protéines tau cellulaires (Annexe 3)

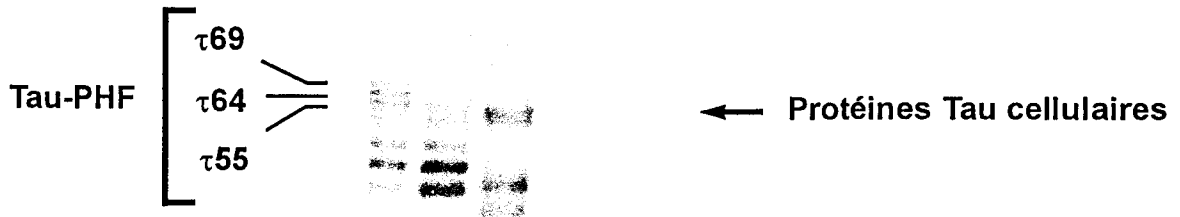
L'anticorps polyclonal M19G est spécifique des protéines tau quel que soit leur état de phosphorylation. Après transfert sur membrane de nitrocellulose, les protéines extraites des cellules SY 5Y sont incubées avec cet anticorps. M19G détecte une bande dans les extraits cellulaires qui migre de manière similaire aux protéines tau extraites d'un homogénat de cerveau fœtal. Après traitement de ces échantillons par la phosphatase alcaline, la migration similaire des protéines tau cellulaires et fœtales demeure (**Annexe 3**). Ces résultats suggèrent donc que les cellules SY 5Y synthétisent majoritairement ou uniquement l'isoforme la plus petite des protéines tau, appelée tau fœtale, que ces protéines tau cellulaires sont phosphorylées à un degré comparable à celui des protéines tau fœtales. Les protéines tau extraites des cellules Kelly migrent de manière identique à celles trouvées dans les cellules SY 5Y comme le montre l'immunomarquage par M19G (**FIGURE 21**). Ce résultat suggère donc que les deux lignées cellulaires expriment majoritairement la même isoforme de type fœtal des protéines tau.

FIGURE 21: Analyse par immunoempreintes des protéines tau exprimées dans les cellules SY 5Y et Kelly.

Après transfert des protéines sur la membrane de nitrocellulose, les protéines ont été incubées avec l'anticorps M19G qui reconnaît toutes les protéines tau quel que soit leur état de phosphorylation. L'anticorps M19G détecte une seule bande dans les extraits cellulaires de SY 5Y (S), de Kelly (K) qui migre de manière similaire à la bande majeure bande détectée dans l'homogénat de cerveau fœtal (F). La migration de ces protéines tau est comparée à celle des protéines tau provenant des homogénats de tissu cérébral Alzheimer (Alz) et de tissu cérébral autopsique (Ad).

Cerveaux Cellules

Alz Ad F S K



II- 2- Recherche des transcrits tau cellulaires

II- 2- 1 Recherche des exons épissés de manière alternative dans le système nerveux central (Annexe 4)

Par RT-PCR, nous avons analysé les régions 5' et 3' des ARNm qui sont soumises à un épissage alternatif. Du côté 5', le produit majeur d'amplification correspond à l'isoforme sans les exons 2 et 3 (appelée 2⁻3⁻) (FIGURE 22). Du côté 3', la bande de 487 pb, correspondant à l'isoforme sans l'exon 10 (10⁻), et la bande de 580 pb, correspondant à l'isoforme avec l'exon 10 (10⁺), sont amplifiées (FIGURE 23). Notons que la bande de 487 pb est toujours majoritaire par rapport à la bande de 580 pb. La combinaison de ces résultats signifie que l'isoforme cellulaire majoritaire dans les deux types cellulaires est l'isoforme sans les exons épissés alternativement, appelée 2⁻3⁻10⁻. L'isoforme 2⁻3⁻10⁺ est également présente mais probablement en quantité moindre. Parfois, du côté 5', une bande dont la taille pouvait correspondre à la forme contenant l'exon 2 (2⁺3⁻) était très faiblement amplifiée (FIGURE 22). Grâce à une amorce antisens localisée dans l'exon 2, nous avons amplifié spécifiquement cette forme 2⁺3⁻ et confirmé son existence. Deux amplifications successives sont donc nécessaires pour amplifier cette forme, suggérant qu'elle n'existe qu'en très faibles copies dans les cellules.

II- 2- 2- Recherche de l'expression éventuelle des exons spécifiques du système nerveux périphérique

Nous avons également recherché la présence éventuelle des exons 4A et 6 dans les transcrits tau exprimés par les deux lignées cellulaires SY 5Y et Kelly. Ces exons sont spécifiques du système nerveux central périphérique chez la souris. Ils sont retrouvés dans une lignée cellulaire de neuroblastome de souris, les cellules N115. Chez l'Homme, seul

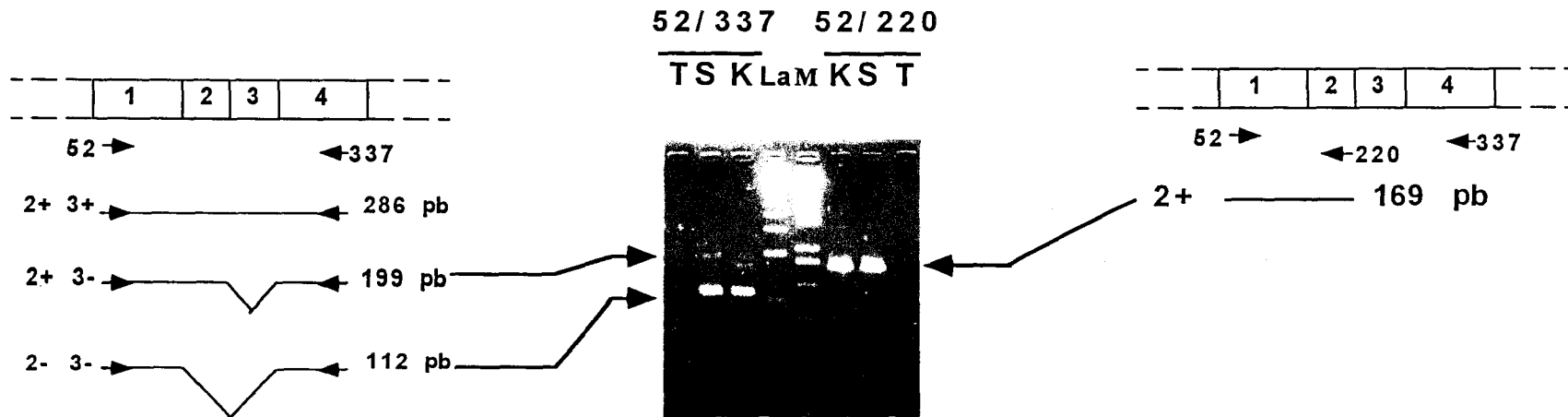
Figure 22: Analyse de la région 5' des transcrits tau exprimés par les cellules de neuroblastomes.

(A) Représentation schématique de l'extrémité 5' des transcrits tau: Sur la gauche du schéma, sont représentés les produits amplifiables par RT-PCR avec le couple d'amorces (52/337) tandis que sur la droite, est représenté le produit amplifiable avec les amorces (52/220). La taille de ces différents produits correspondant aux différentes possibilités d'épissage sont également indiqués. Pour chaque couple d'amorces 52/337 ou 52/220, 12 µl de chaque réaction d'amplification sont analysés sur un gel d'agarose 2%. La taille des fragments amplifiés est estimée par rapport à deux marqueurs de taille: un polymère de 100 pb (La) et un marqueur de taille (pGEM DNA) (Proméga). Après amplification avec les amorces 52/337, une bande de 112 pb, correspondant en taille à la forme sans les exons 2 et 3, est la bande majoritairement détectée pour les cellules SY 5Y (S) et Kelly (K). 1 µl de chacune de ces réactions d'amplification a été à nouveau amplifié par PCR avec les amorces 52 et 220. Une bande de 169 pb correspondant en taille aux formes avec l'exon 2 est alors amplifiée pour les deux types cellulaires. L'absence de ces bandes, dans les témoins négatifs correspondants (T), prouve la spécificité des réactions d'amplification.

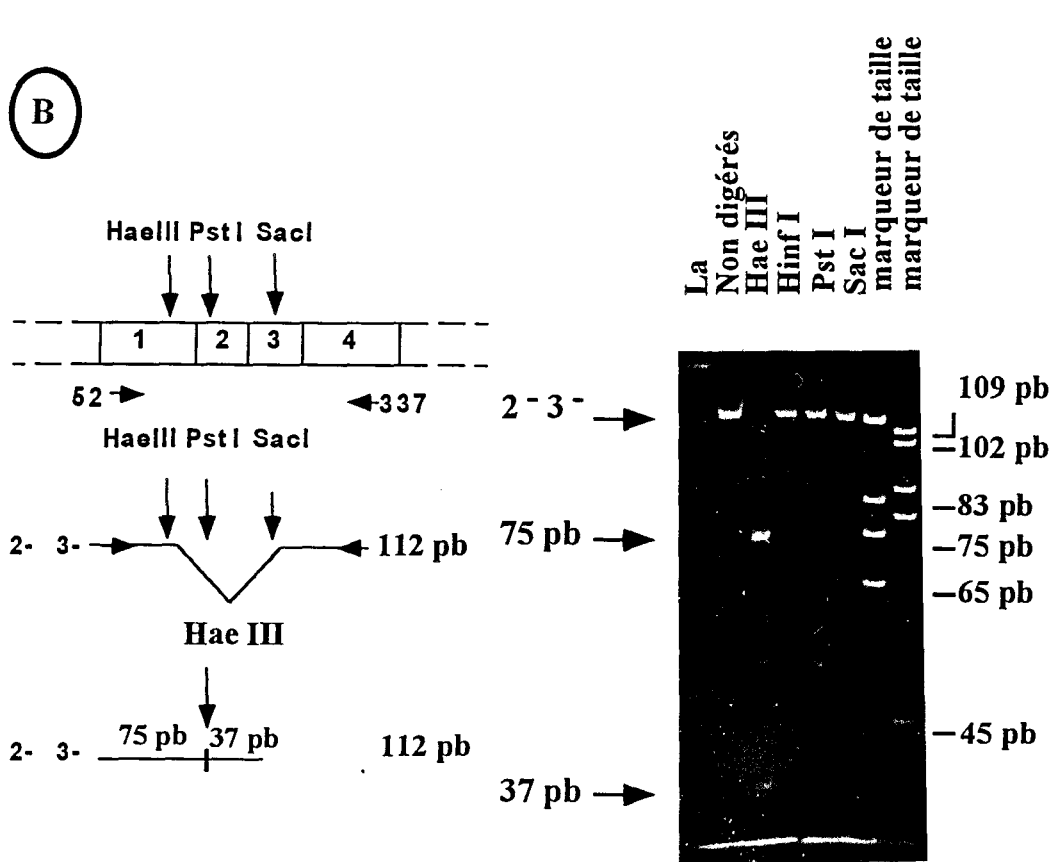
(B) L'identité de la bande de 112 pb a été vérifiée après digestion enzymatique. Les flèches indiquent la position des sites reconnus par les enzymes de restriction, *Hae III*, *Pst I* et *Sac I*, dans les exons 1, 2 et 3. Les produits digérés sont séparés et analysés après migration sur gel d'acrylamide 10%. Seule l'enzyme *Hae III*, spécifique de l'exon 1, digère la bande de 112 pb confirmant qu'il s'agit bien de la forme sans les exons 2 et 3.

(C) L'identité de la bande de 169 pb a été vérifiée après digestion enzymatique. Les flèches indiquent la position des sites reconnus par les enzymes de restriction, *Hae III*, *Pst I* et *Sac I*, sur les exons 1, 2 et 3. Les produits obtenus après digestion par les enzymes *Hae III* et *PstI* sont identiques à ceux attendus. Ce résultat démontre que cette bande de 169 pb correspond à l'isoforme avec l'exon 2.

(A)



(B)



(C)

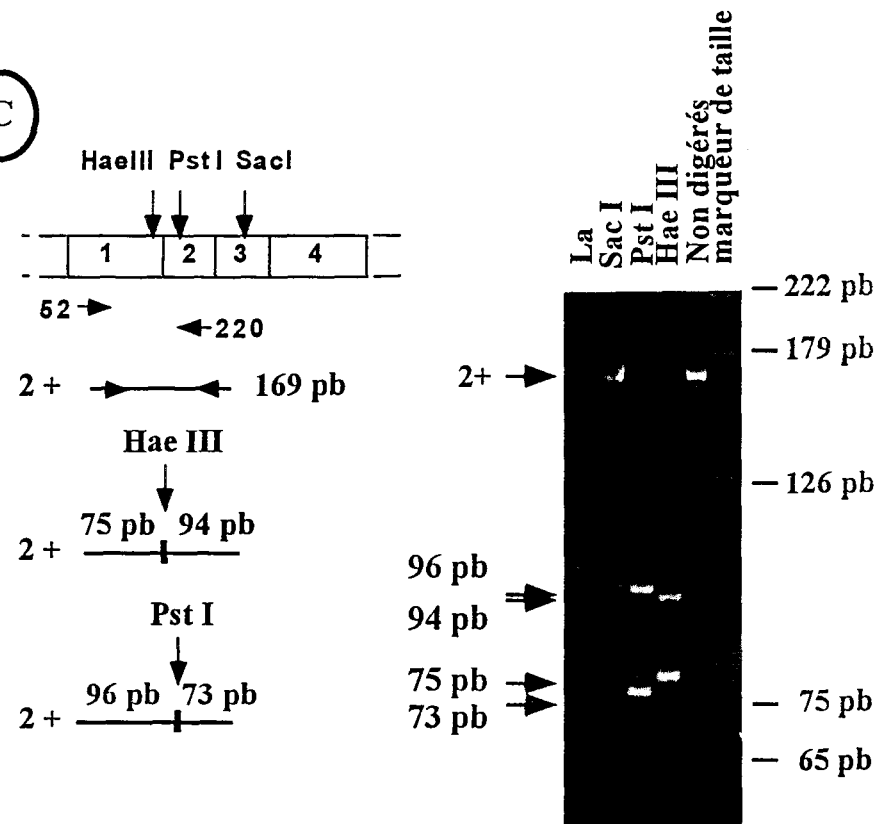
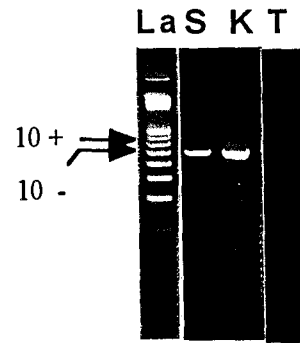
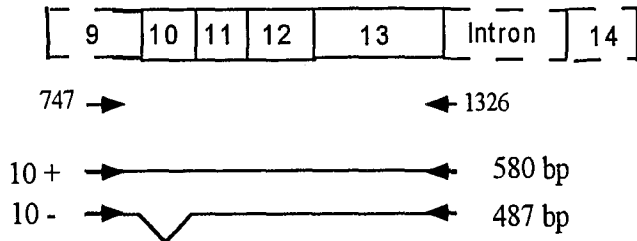


FIGURE 23: Représentation schématique de l'extrémité 3' des transcrits tau:

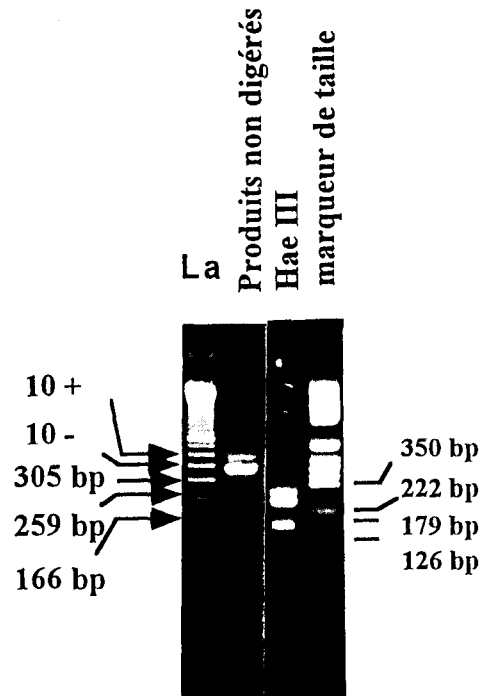
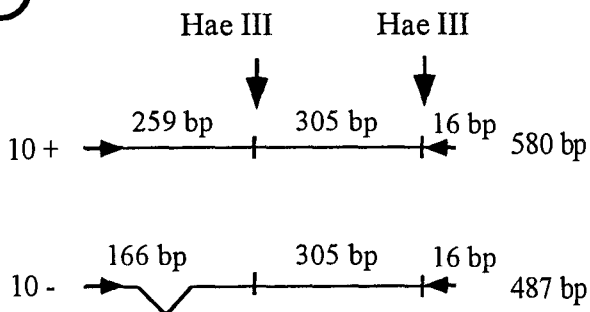
(A) Le schéma représente les deux produits amplifiables avec les amorces 747/1326 correspondant aux différentes possibilités d'épissage. La taille de ces produits est également indiquée. 12 μ l de la réaction d'amplification sont déposés sur un gel d'agarose 2% et la migration des produits amplifiés est estimée à partir d'un polymère de 100 pb (La). Deux bandes de 487 pb et 580 bp sont amplifiées à partir de l'ARN total des cellules SY 5Y (S) et Kelly (K). L'absence de ces bandes dans le témoin négatif (T) prouve la spécificité des réactions d'amplification.

(B) La localisation des deux sites de coupure de l'enzyme de restriction sur les formes avec exon 10 (10^+) ou sans exon 10 (10^-) est indiquée par des flèches. La taille des fragments de digestion attendus est également indiquée. Les produits de digestion sont analysés sur un gel d'agarose 2%. 3 fragments de 305 pb, 259 pb et 166 pb sont séparés et confirment que les cellules SY 5Y (S) et Kelly (K) synthétisent des formes avec et sans exon 10.

(A)



(B)



l'exon 4A a été mis en évidence au sein des protéines tau exprimées dans le système nerveux périphérique.

II- 2- 2- 1- L'exon 4A

Les amorces 308 et 415, localisées respectivement dans les exons 4 et 5, permettent d'identifier les exons présents dans les ARNs des cellules Kelly et SY 5Y. Comme le représente la **FIGURE 24A**, la plus petite bande amplifiable par RT-PCR a une taille de 109 pb; elle correspond à l'absence de l'exon 4A dans les transcrits. L'insertion de l'exon 4A dans les transcrits conduirait à l'amplification d'un produit de 862 pb. Après optimisation des conditions d'amplification obtenue en variant deux paramètres (quantité de magnésium, température d'hybridation des amorces), seule une bande de 109 pb est détectée pour les cellules Kelly et SY5Y. La taille de cette bande amplifiée est estimée grâce au polymère de 100 pb et correspond en taille à la forme ne présentant pas l'exon 4A. Les produits amplifiés ont été digérés par l'enzyme de restriction *Nla III*, afin de vérifier leur identité. Le site de cette enzyme est situé dans l'exon 5 (au niveau du nucléotide 485, selon la numérotation du transcrit tau le plus long trouvé dans le SNC 2⁺3⁺10⁺). (Goedert *et al.*, 1989b). Les produits de digestion obtenus sont séparés sur gel d'acrylamide 10% (**FIGURE 24A**). Deux fragments de 74 et 35 pb sont obtenus et correspondent en taille aux produits attendus. Cette digestion enzymatique confirme l'identité de la bande amplifiée et montre l'absence d'expression de transcrits tau cellulaires contenant l'exon 4A.

II- 2- 2- 2- Exon 6

La même étude a été réalisée pour rechercher l'expression de l'exon 6 dans les transcrits tau cellulaires. Les amorces 388 et 541 utilisées sont localisées respectivement

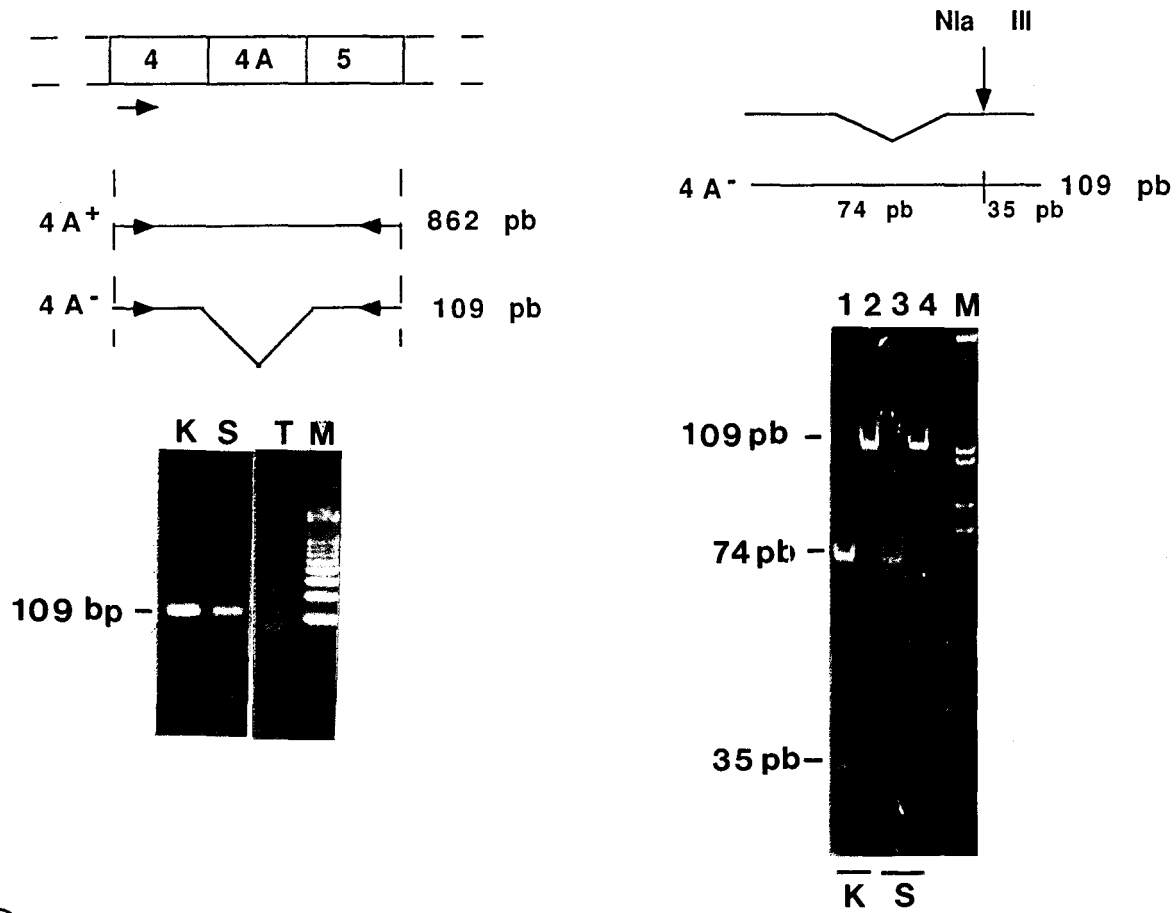
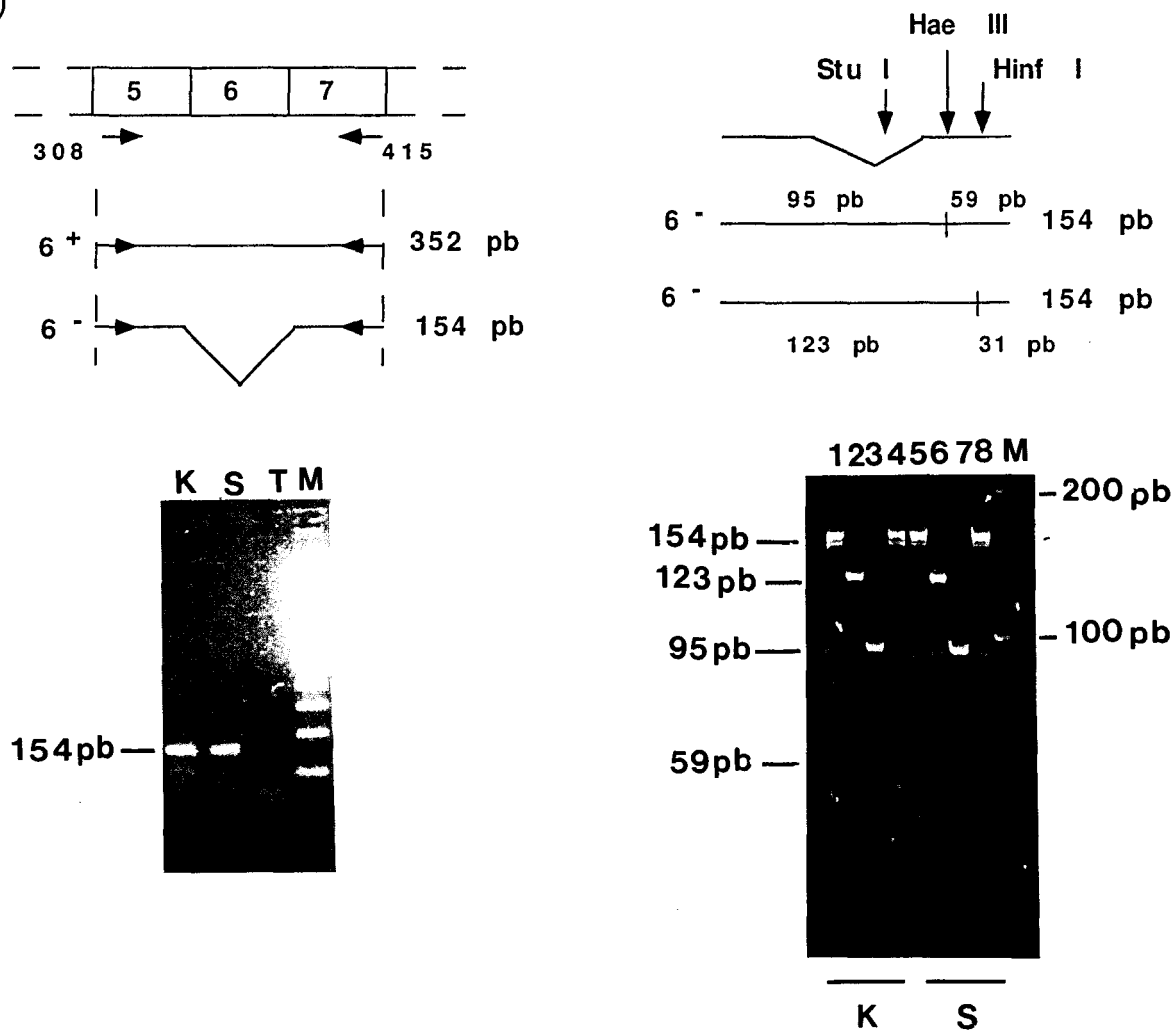
FIGURE 24: Analyse de la présence des exons 4A et 6 dans les transcrits tau exprimés par les cellules SY 5Y et Kelly.

(A) Recherche de l'exon 4A par RT-PCR.

Le schéma de la région étudiée indique la taille des différents produits amplifiables correspondant aux différentes possibilités d'épissage. Le site reconnu par l'enzyme de restriction *Nla III* est également représenté. La présence et la taille des produits amplifiés par RT-PCR pour chacune de ces lignées sont analysées après migration sur gel d'agarose 2%. Une seule bande de 109 pb est détectée. Ces produits amplifiés de 109 pb sont digérés par l'enzyme de restriction *Nla III*. Les produits de digestion sont séparés sur gel d'acrylamide de 10% et visualisés après coloration par le bromure d'éthidium (pistes 1 et 3). Leur taille est comparée à celle des produits amplifiés non digérés (pistes 2 et 4) et est estimée par rapport au marqueur de taille.

(B) Recherche de l'exon 6 par RT-PCR.

Le schéma de la région étudiée indique la taille des différents produits amplifiables correspondant aux différentes possibilités d'épissage. Les sites reconnus par les enzymes de restriction utilisées (*Hae III*, *Hinf I* et *Stu I*) sont également représentés. La présence et la taille des produits amplifiés par RT-PCR pour chacune de ces lignées sont analysées après migration sur gel d'agarose 2%. Une seule bande de 154 pb est détectée. Ces produits amplifiés de 154 pb sont digérés par les enzymes de restriction, *Hae III* (pistes 3 et 7), *Hinf I* (pistes 2 et 6) et *Stu I* (pistes 4 et 8). Les produits de digestion sont séparés sur un gel d'acrylamide de 10% et visualisés après coloration par le bromure d'éthidium. La taille des bandes est estimée par rapport au marqueur de taille (M) et est comparée à celle des produits amplifiés non digérés (pistes 1 et 5).

(A)**(B)**

dans les exons 5 et 7 (**FIGURE 24B**). Comme le présente la **FIGURE 24B**, deux produits de 154 pb et de 352 pb peuvent être amplifiés selon l'insertion ou non de l'exon 6. Seule une bande migrant entre les bandes de 100 et 200 pb du polymère de 100 pb est amplifiée et pourrait correspondre à la forme sans exon 6. Plusieurs digestions enzymatiques ont été réalisées pour révéler la présence ou non de certains sites de restriction sur les produits amplifiés afin de vérifier leur identité. Les sites des trois enzymes choisies *Hae III*, *Hinf I* et *Stu I* sont respectivement situés dans l'exon 7 (*Hae III* et *Hinf I*) et l'exon 6 (*Stu I*). Les produits amplifiés ont été efficacement digérés par *Hae III* (95+59 pb) et par *Hinf I* (31+123 pb). La similitude entre la taille des produits de digestion et celle attendue confirme que les produits amplifiés correspondent aux transcrits sans l'exon 6. Aucune autre bande n'ayant été détectée, nous pouvons penser qu'aucun transcrit tau avec l'exon 6 n'est exprimé par les cellules Kelly et SY 5Y.

II-3- Action des deux agents différenciateurs sur les cellules SY 5Y

II- 3- 1- Action du NGF et de l'acide rétinoïque sur la morphologie des cellules SY 5Y

Le NGF et l'acide rétinoïque (AR) sont deux agents capables de différencier les cellules SY5Y. Le traitement des cellules par le NGF ou l'AR pendant 4 jours, entraîne des modifications morphologiques. En effet, les cellules SY 5Y ainsi différenciées présentent de longs prolongements neuritiques (**FIGURE 25A**).

II- 3- 2- Action de ces deux agents différenciateurs sur l'expression des isoformes des protéines tau dans les cellules SY 5Y

Nous avons recherché une éventuelle influence de la différenciation cellulaire sur l'expression des transcrits tau dans les cellules SY 5Y. L'analyse des produits amplifiés

FIGURE 25: Etude de l'effet du traitement cellulaire par le NGF et l'acide rétinoïque sur la changements morphologiques des cellules SY 5Y et sur la transcription de nouveaux transcrits tau.

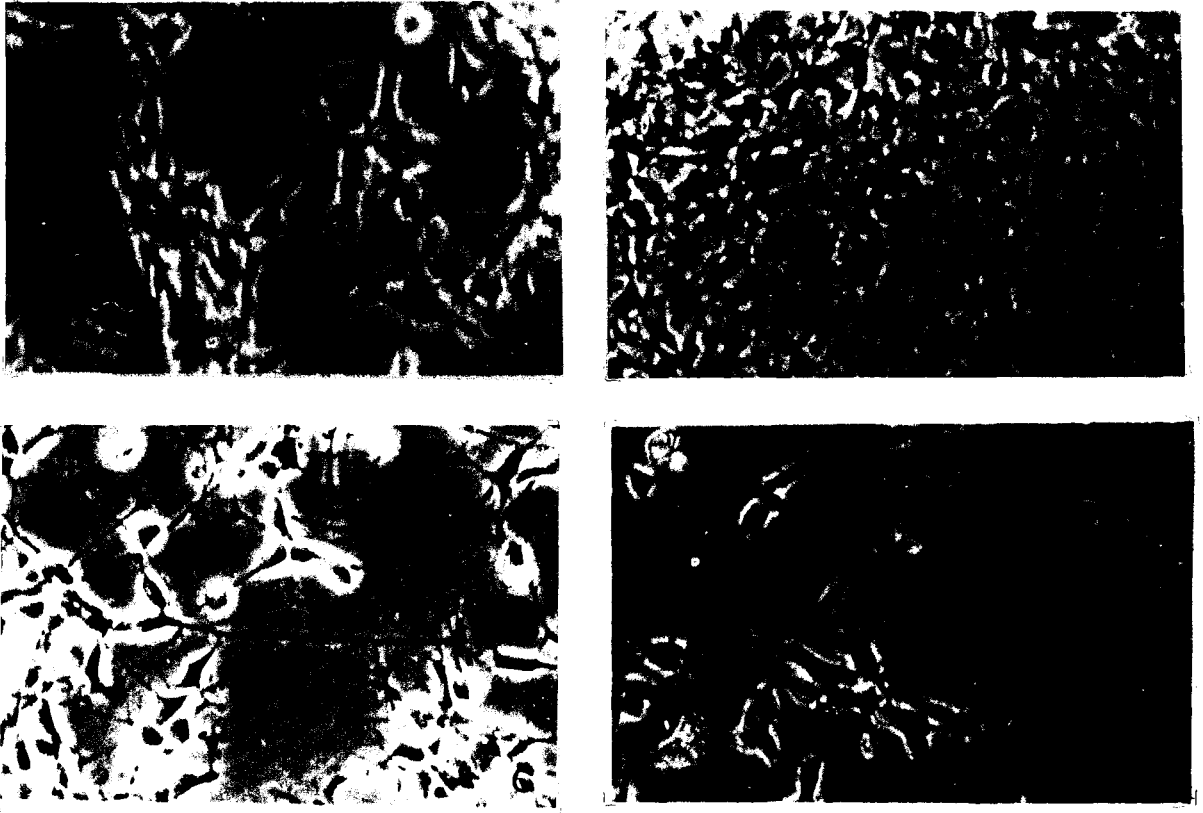
(A) Etude de l'effet du traitement cellulaire par le NGF et l'acide rétinoïque.

Les cellules au stade 30% de confluence (A) sont maintenues dans du milieu complet jusqu'à complète occupation du support (B) ou traitées par le NGF (C) ou par l'acide rétinoïque (D). Les cellules différenciées par ces agents présentent alors de longues extensions neuritiques (C et D).

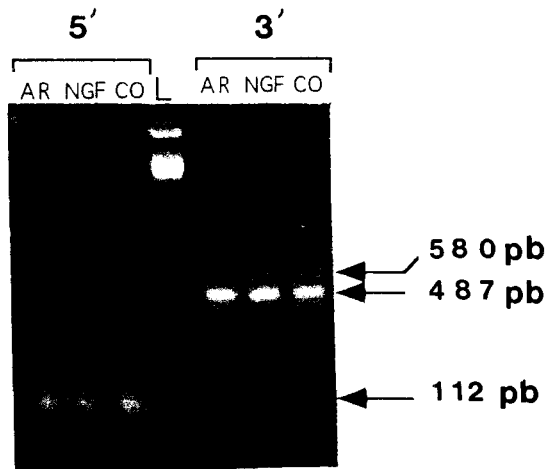
(B) Analyse des régions 5' et 3' des transcrits tau soumises à l'épissage alternatif par RT-PCR après différenciation cellulaire.

Le schéma de la région étudiée indique la taille des différents produits amplifiables correspondant aux différentes possibilités d'épissage. La présence et la taille des produits amplifiés par RT-PCR pour les cellules SY 5Y différenciées par le NGF (NGF) ou l'acide rétinoïque (AR) ou indifférenciées (Co) sont analysées après migration sur gel d'agarose 2%. Du côté 5', seule la bande de 112 pb, correspondant aux formes sans les exons 2 et 3, est détectée (cf. schéma de la FIGURE 22). Du côté 3', les bandes de 487 pb (10^-) et 580 pb (10^+) sont toujours amplifiées (cf. schéma de la FIGURE 23). On ne détecte ni l'apparition de nouveaux transcrits, ni de changements quantitatifs évidents après différenciation cellulaire.

A



B



par RT-PCR du côté 5' ne permet pas de détecter de nouveaux transcrits après différenciation des cellules (**FIGURE 25B**). Du côté 3', nous n'avons pas détecté d'augmentation sensible du rapport d'intensité entre les formes 4R et 3R amplifiées. Ces résultats suggèrent donc que la différenciation cellulaire par le NGF et l'AR ne modifient pas l'épissage alternatif des transcrits tau dans les cellules SY 5Y.

DISCUSSION

Les expériences de RT-PCR et d'immunoempreintes ont permis de montrer que les deux lignées cellulaires, SY 5Y et Kelly synthétisent majoritairement l'isoforme la plus courte des protéines tau. Cette isoforme est couramment appelée isoforme fœtale puisque c'est la seule isoforme retrouvée dans le cerveau du fœtus. Ce résultat n'est pas surprenant puisque ces cellules dérivent de tumeur chez l'enfant et sont indifférenciées. Néanmoins, ces cellules synthétisent également d'autres transcrits tau adultes comme l'isoforme $2^{-}3^{-}10^{-}$ et potentiellement les isoformes $2^{+}3^{-}10^{-}$ et/ou $2^{+}3^{-}10^{+}$, mais à un très faible taux. En effet, l'identification de la présence de transcrits contenant l'exon 2 n'a été possible qu'après deux amplifications successives. De plus, des protéines tau résultant de l'expression de ces transcrits n'ont jamais été détectées par immunoempreinte confirmant le faible taux d'expression de ces isoformes adultes.

Le traitement des cellules SY 5Y par le NGF ou l'acide rétinoïque (AR), agents inducteurs de la différenciation, conduit à l'apparition de prolongements neuritiques. Cette différenciation est accompagnée d'une augmentation de l'expression du gène précurseur du peptide amyloïde, l'APP (König *et al.*, 1990). Une modification de l'épissage alternatif du pré-messager unique de l'APP a été également observée lorsque les cellules SY 5Y sont différenciées par l'AR (König *et al.*, 1990). D'autre part, il a été rapporté, dans d'autres lignées cellulaires de type neuronal, une augmentation sensible des formes comportant 4 domaines répétés par rapport aux formes avec 3 domaines lors du développement d'extensions neuritiques (Montejo de Garcini *et al.*, 1992; Hanemaajier et Ginzburg, 1991; Pizzi *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995). Enfin, il a été suggéré que les gènes de tau et de l'APP pourraient être exprimés de manière coordonnée dans les cerveaux d'adultes âgés (Oyama *et al.*, 1992). Cependant, dans nos conditions expérimentales, ni le NGF, ni l'AR ne semblent induire de nouveaux messagers de tau. Bien que la technique de RT-PCR

employée dans notre étude ne soit pas quantitative, le rapport de l'intensité des produits amplifiés correspondant à la présence ou non de l'exon 10 ne semble pas modifié lors des expériences de différenciation. Ceci suggère l'absence d'une augmentation du taux d'expression des isoformes 10⁺ par rapport aux isoformes 10⁻. Dans les cellules SY 5Y, l'AR ne semble donc pas conduire à l'induction de messagers de tau comme cela avait été décrit par Falconer et collaborateurs (1992). Dans les cellules SY 5Y, l'absence d'induction visible des messagers de tau par cet agent différenciateur pourrait peut-être résulter de l'absence cellulaire du facteur de transcription AP2, sensible à l'AR. En effet, la présence de séquences cibles de ce facteur de transcription dans la région promotrice du gène tau (Andreadis *et al.*, 1996) pouvait suggérer l'implication de l'AP2 dans l'induction de messagers tau observée par Falconer et collaborateurs (1992). Par ailleurs, nous avons constaté que l'immunomarquage des protéines tau extraites des cellules SY 5Y par l'anticorps M19G augmente après traitement des cellules par le NGF. Cette augmentation pourrait résulter d'une plus haute stabilité des ARNm plutôt que d'une transcription accrue du gène tau.

En conclusion, dans nos conditions expérimentales, les cellules expriment, de façon majeure, l'isoforme la plus courte des protéines tau. Cette isoforme semble donc suffisante pour l'élaboration et la stabilisation des extensions neuritiques sous l'effet du NGF ou de l'AR.

Des études ont suggéré que l'apo E pourrait, selon ses isoformes, agir comme facteur de risque ou facteur de protection lors de la maladie d'Alzheimer (Chartier-Harlin *et al.*, 1994; Corder *et al.*, 1994). L'action protectrice pourrait être médiée par la liaison de ces isoformes d'apo E, les isoformes apo E2 et apo E3, aux protéines tau empêchant ainsi leur phosphorylation (Strittmatter *et al.*, 1994). C'est pourquoi nous avons recherché et montré la présence d'apo E dans les deux lignées cellulaires. Cette détection est plus faible mais demeure après différenciation des cellules SY 5Y. Par immunofluorescence,

Mademoiselle Cathia Soulié (doctorante dans le laboratoire) a montré que cette apo E cellulaire est localisée dans le cytoplasme des cellules SY 5Y ainsi que dans les prolongements cellulaires lorsque ces cellules sont différenciées par le NGF (**Annexe 2**). Cette détection résulte de l'expression par les cellules elles-mêmes de transcrits d'apo E traduits par la machinerie cellulaire comme le montre les expériences de RT-PCR. L'apo E exprimée par les cellules subit des modifications post-traductionnelles comme la sialylation visualisée en électrophorèse bi-dimensionnelle. D'autres modifications post-traductionnelles, comme l'oxydation, ou une mutation au niveau du gène APO E conduisant à la substitution d'un acide aminé pourraient entraîner des modifications de la structure de l'apo E et ainsi expliquer la différence de poids moléculaire qui existe entre l'apo E cellulaire (32 kDa) et l'apo E présente dans le tissu cérébral humain (34 kDa).

L'analyse des transcrits par RT-PCR ainsi que le génotypage des cellules pour l'apo E a permis de montrer que la présence intracellulaire d'apo E était bien due à une synthèse cellulaire et que les cellules SY 5Y et Kelly expriment différentes isoformes d'apo E. Les cellules SY 5Y expriment uniquement l'isoforme E3 tandis que les cellules Kelly expriment les isoformes E3 et E4. Cette expression a été confirmée par le profil électrophorétique identique de l'apo E synthétisée par les cellules Kelly à celui d'un cerveau génotypé $\epsilon 3/\epsilon 4$ en électrophorèse bi-dimensionnelle. Au laboratoire, une quantification a été réalisée par le doctorant Jean-Charles Lambert du groupe du Docteur. M.C. Chartier-Harlin selon la technique décrite en 1997 (Lambert *et al.*, 1997). Cette étude confirme la synthèse équivalente des deux transcrits dans les cellules Kelly. Par contre, Williams et collaborateurs (1997) ne détectent pas cette synthèse dans une autre lignée de neuroblastome, les cellules Ntera2N. Dans ce cas, la présence intracellulaire d'apo E résulte de la capture de l'apo E recombinante ajoutée dans le milieu de culture et non d'une synthèse cellulaire. La synthèse d'apo E par les cellules SY 5Y et Kelly et non par les cellules Ntera2N pourrait s'expliquer par une origine tissulaire différente. En effet, alors que les cellules SY 5Y et Kelly dérivent de neuroblastomes développés chez l'enfant,

les cellules Ntera2N sont issues de carcinome embryonnaire humain. L'expression de l'apo E par des cellules dérivées de neuroblastome ne semble pas être due à une dérive d'une lignée cellulaire. En effet, outre les cellules SY 5Y et les cellules Kelly, nous avons également testé une troisième lignée de neuroblastome, les cellules LA-N-2. Ces cellules expriment également de l'apo E et ne synthétisent que le variant $\epsilon 3$ comme les cellules SY 5Y. Cette synthèse d'apo E pourrait être due à une modification propre aux cellules de neuroblastomes. Pourtant, les cellules SY 5Y et Kelly n'ont pas perdu leur caractère neuronal comme nous l'avons confirmé par la présence des neurofilaments. Dans le laboratoire, nous avons montré également la présence d'un second marqueur spécifique des neurones, il s'agit de la NSE (Neuron Specific Enolase). Cette NSE correspond à la sous-unité γ de l'énolase; sa présence dans les deux types cellulaires a été vérifiée par la technique des immunoempreintes réalisée par Mademoiselle Cathia Soulié (doctorante).

In vivo, la synthèse d'apo E a été uniquement détectée par hybridation *in situ* dans les cellules gliales et en particulier au niveau des cellules astrocytaires (Driedrich *et al.*, 1991; Poirier *et al.*, 1991). Par contre, la présence intraneuronale de la protéine a été mise en évidence dans les cerveaux de patients Alzheimer (Han *et al.*, 1994b; Benzing et Mufson, 1995) mais aussi dans les cerveaux de personnes témoins (Metzger *et al.*, 1996). Dans cette dernière étude, la plus grande partie de l'immunoréactivité de l'apo E était préférentiellement localisée dans les neurones et non dans les cellules gliales ou astrocytaires (Metzger *et al.*, 1996). Néanmoins, tous les neurones ne sont pas immunomarqués. Chez l'Homme, cette localisation n'a été observée que dans certains neurones pyramidaux des couches III et V du cortex frontal de sujets témoins (Metzger *et al.*, 1996). Cette régionalisation intraneuronale de l'apo E a été également détectée dans les cerveaux de souris, déficientes en apo E endogène, après introduction du gène humain de l'apo E (Xu *et al.*, 1996). Notons que cette immunodétection semble directement liée à l'apo E humaine puisque aucun neurone n'est immunomarqué dans le cerveau des souris témoins exprimant l'apo E endogène (Xu *et al.*, 1996). La présence intraneuronale de

l'apo E détectée *in vivo* pourrait être due à une internalisation d'apo E présente dans le milieu extracellulaire. Cependant certaines observations ne permettent pas d'exclure totalement la possibilité d'une synthèse *in vivo* d'apo E par certains types de neurones. En effet, l'absence de détection par hybridation *in situ* de transcrits apo E pourrait provenir d'un taux d'expression trop faible de l'apo E par les neurones qui serait alors indiscernable du bruit de fond expérimental. Elle pourrait également résulter de la dégradation des transcrits apo E, peu nombreux, lors du délai post-mortem. Dans le laboratoire, nous avons montré que la synthèse d'apo E dans les cellules SY 5Y diminue lorsque ces cellules sont différenciées par le traitement au NGF. Ce résultat suggère une régulation de l'expression de l'apo E en fonction de l'état de différenciation cellulaire. Dans le cerveau adulte, les neurones corticaux représentant les cellules postmitotiques différenciées pourraient avoir perdu cette capacité à synthétiser l'apo E. Cette synthèse d'apo E pourrait alors être augmentée ou restaurée sous certaines conditions de stress ou de pathologies puisque lors de lésions neuronales, l'expression d'apo E est augmentée (Mahley, 1988; Leblanc *et al.*, 1990).

En conclusion, les cellules SY 5Y et Kelly synthétisent majoritairement l'isoforme fœtale des protéines tau mais également de l'apolipoprotéine E. L'expression de l'isoforme E3 seule dans les cellules SY 5Y, et celle des isoformes E3 et E4 dans les cellules Kelly permettent d'envisager l'étude, dans un modèle cellulaire, d'une éventuelle implication de cette protéine sur le taux de phosphorylation des protéines tau.

CHAPITRE III

INTRODUCTION

La phosphorylation est la modification post-traductionnelle majeure des protéines tau. Elle est régulée au cours du développement: les protéines tau trouvées dans le cerveau au stade fœtal sont en effet plus phosphorylées que les protéines tau trouvées chez l'adulte (Watanabe, 1993; Matsuo *et al.*, 1994; Mawal-Dewan *et al.*, 1994). Dans la maladie d'Alzheimer, la phosphorylation des tau est très augmentée et pourrait résulter soit d'une diminution des activités des phosphatases, soit d'une augmentation de l'activité de certaines kinases. Il a été suggéré que cette hyperphosphorylation des protéines tau pouvait précéder et provoquer leur agrégation sous la forme de filaments, les PHF (Brion *et al.*, 1985; Delacourte et Défossez, 1986).

Afin de comprendre les mécanismes aboutissant à la DNF, il était important d'établir un modèle cellulaire capable d'induire les épitopes trouvés sur les protéines tau-PHF. Des études préalables dans le laboratoire ont montré qu'il était possible de produire expérimentalement l'apparition d'épitopes retrouvés sur les protéines tau-PHF en traitant les cellules SY-5Y par l'acide okadaïque, puissant inhibiteur des phosphatases 1 et 2A (Sautière *et al.*, 1993; 1994). Traiter les cellules SY 5Y par cet inhibiteur entraîne un changement de phosphorylation de tau, détectable par leur changement de poids moléculaire, un changement de point isoélectrique ainsi qu'une modification de la reconnaissance d'épitopes dépendant de la phosphorylation et reconnus par les anticorps Tau-1 et l'anti-tau PHF, anticorps absorbé contre les protéines tau cérébrales d'un cerveau adulte témoin.

Dans un premier temps, nous avons étudié et comparé la phosphorylation normale et l'hyperphosphorylation induite par l'acide okadaïque, des protéines tau synthétisées par les lignées cellulaires SY 5Y et Kelly. Pour réaliser cette étude, nous avons eu recours à des anticorps dépendant de la phosphorylation nouvellement décrits dans la littérature et

dont l'épitope a été déterminé. Le but de cette étude était de vérifier l'existence ou non d'une influence des différents variants apo E exprimés par les cellules sur la phosphorylation des protéines tau. Dans un deuxième temps, nous avons recherché l'effet de la nature de l'isoforme sur la phosphorylation et l'hyperphosphorylation des protéines tau après transfection des cellules par l'ADNc de l'isoforme la plus longue des protéines tau.

Ces expériences avaient pour but:

1) de se rapprocher des conditions physiologiques trouvées dans le cerveau adulte témoin ou dans le cerveau de patients Alzheimer où les 6 isoformes sont retrouvées hyperphosphorylées;

2) de déterminer si les changements conformationnels résultant de l'insertion des inserts supplémentaires, issus de la traduction des exons épissés alternativement présents sur les ARNm correspondants, pouvaient induire des variations du taux de phosphorylation.

L'obtention de systèmes cellulaires capables d'exprimer de manière simultanée et durable les deux isoformes des protéines tau nous a permis de rechercher les effets de la phosphorylation sur la localisation cellulaire et sur la solubilité des protéines tau.

RESULTATS

I- Etude de la phosphorylation et de l'hyperphosphorylation des protéines tau cellulaires avant et après traitement des cellules par l'acide okadaïque (Annexes 3)

I- 1- Analyse par la technique des immunoempreintes

Pour étudier la phosphorylation des protéines tau, nous avons utilisé 3 types d'anticorps:

1) un anticorps spécifique d'un épitope non phosphorylé: l'anticorps Tau-1, caractéristique des protéines tau de tissu cérébral normal autopsique ou biopsique;

2) des anticorps dépendant de la phosphorylation dirigés contre des épitopes présents dans le tissu cérébral biopsique de personnes contrôles mais en faible quantité par rapport aux cerveaux Alzheimer: il s'agit des anticorps AD2, AT8, AT180, AT270;

3) un anticorps dépendant de la phosphorylation spécifiquement dirigé contre un épitope localisé sur des protéines tau extraites du tissu cérébral Alzheimer: l'anticorps AP422.

I- 1- 1- Analyse de l'état phosphorylé des protéines tau cellulaires des cellules natives

L'analyse de l'état de phosphorylation des protéines tau cellulaires, à l'aide de différents anticorps dirigés contre un épitope phosphorylé (AD2, AT8, AT180, AT270 et 12E8) montre la présence de ces épitopes phosphorylés sur les protéines tau synthétisées par les deux lignées cellulaires. L'anticorps Tau-1 spécifique d'un épitope non phosphorylé, reconnaît également les protéines tau présentes dans les cellules SY 5Y et Kelly. Par contre, l'anticorps AP422, spécifiquement dirigé contre des épitopes de type

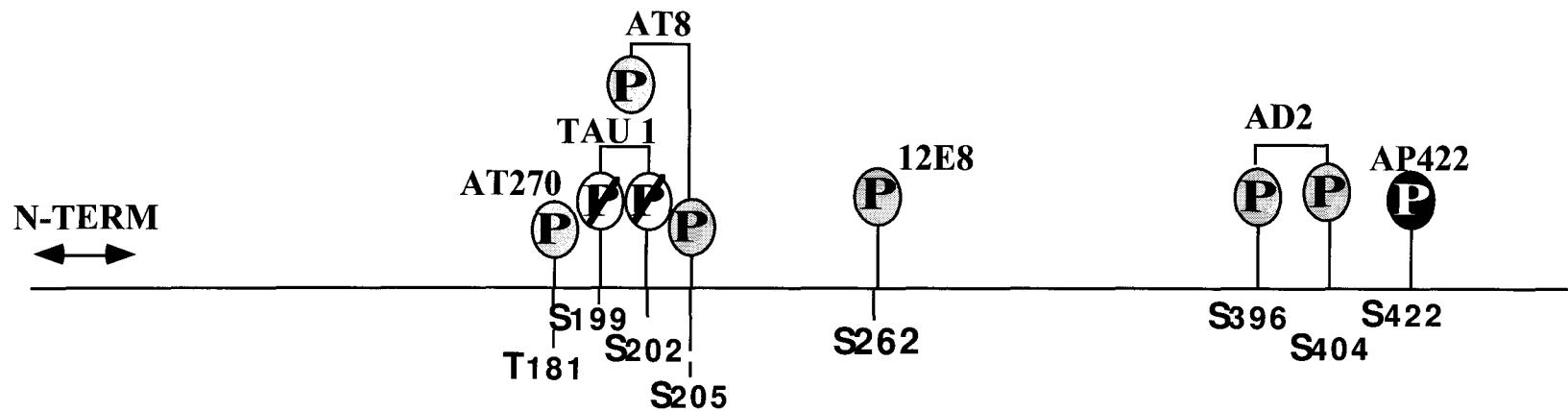
Figure 26: Analyse de l'état phosphorylé des protéines tau exprimées par les cellules SY 5Y et Kelly.

(A) Représentation schématique des épitopes reconnus par différents anticorps dépendant de la phosphorylation. La nature de l'épitope phosphorylé (P) ou non phosphorylé (Ø) est indiqué sur ce schéma sous le nom de l'anticorps correspondant. De même sont nommés les résidus reconnus par ces différents anticorps. Lorsque le cercle entourant le (P) est blanc, il s'agit d'un anticorps spécifique des protéines tau normales, lorsqu'il est grisé, l'épitope est détecté sur les protéines tau biopsiques et sur les protéines tau-PHF, enfin lorsque ce cercle est noir, il s'agit d'un épitope caractéristique des tau-PHF.

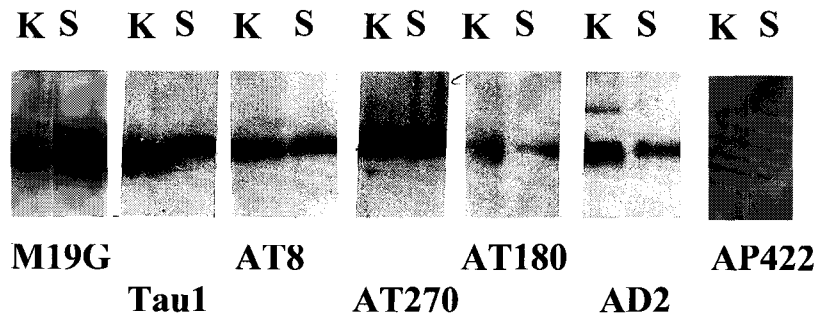
(B) L'état de phosphorylation des protéines tau synthétisées par les cellules SY 5Y (S) et Kelly (K), non traitées par l'acide okadaïque, a été analysé par immunoempreintes. Excepté l'anticorps AP422, dirigé contre la Ser422 phosphorylée, tous les autres anticorps détectent les protéines tau cellulaires.

(C) Les protéines tau sont analysées avant (-) et après (+) traitement des cellules par l'acide okadaïque (AO) pendant 6 heures (250 nM). La migration ainsi que la détection des protéines tau cellulaires sont comparées à celles d'un homogénat de cerveau de patients Alzheimer (Alz). Notons que tandis que l'immunomarquage des protéines tau par l'anticorps Tau-1 disparaît après le traitement par l'AO, ces protéines sont fortement immunodétectées par l'anticorps AP422, spécifique des protéines tau-PHF.

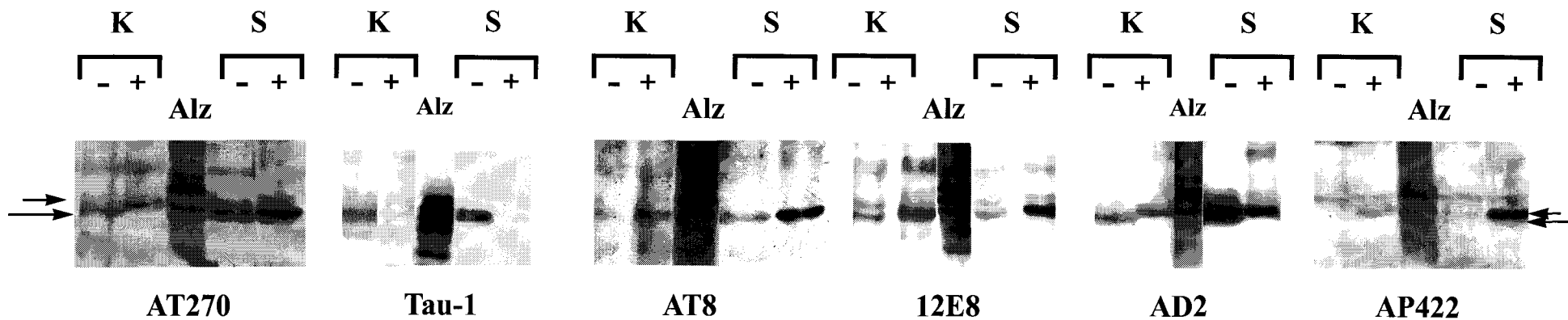
(A)



(B)



(C)



Alzheimer, ne détecte jamais ces protéines tau cellulaires. Ces résultats suggèrent donc la présence de protéines tau faiblement phosphorylées dans les deux lignées cellulaires (**FIGURE 26**) (**Annexe 3**).

Afin d'analyser plus finement l'état de phosphorylation des protéines tau, les extraits de cellules Kelly sont séparés par électrophorèse bi-dimensionnelle (**FIGURE 27**). Le profil électrophorétique des différents variants isoélectriques a été analysé à l'aide d'anticorps monoclonal (AD2) et polyclonal, M19G et 134, dirigés respectivement contre les extrémités amino- et carboxy-terminales. Ces anticorps polyclonaux détectent les protéines tau quel que soit leur état de phosphorylation. Ces deux anticorps permettent donc de visualiser les protéines tau cellulaires complètes qui sont résolues entre les valeurs de pH 6,1 et 7,4. Seul le profil obtenu avec l'anticorps M19G est présenté sur la **FIGURE 27**. Les différents variants se différencient donc par leur point isoélectrique mais également par leur poids moléculaire qui varie de 52 à 54 kDa. Ces différences résultent probablement de différents états de phosphorylation.

Pour tester cette hypothèse, nous avons incubé la membrane de nitrocellulose avec l'anticorps AD2, dirigé contre les Ser396/404 phosphorylées (Buée-Scherrer *et al.*, 1996a). Seuls les variants de plus haut poids moléculaire sont révélés par cet anticorps. L'absence de détection des autres variants résulte probablement de l'absence de phosphorylation de ces résidus plutôt que d'une protéolyse puisque tous les variants étaient révélés par les anticorps polyclonaux (**FIGURE 27**).

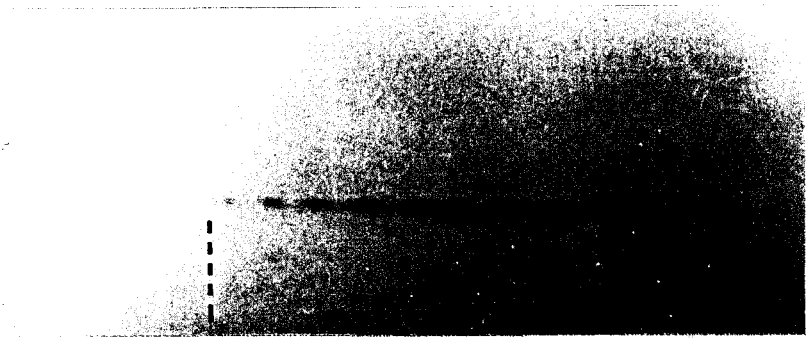
I- 1- 2- Analyse de l'état hyperphosphorylé des protéines tau cellulaires après traitement des cellules par l'acide okadaïque

Le traitement par l'AO des cellules Kelly et SY 5Y entraîne une modification du poids moléculaire apparent en gel d'acrylamide SDS-PAGE; les protéines tau cellulaires migrent alors avec le même poids moléculaire apparent que la protéine tau55 des protéines

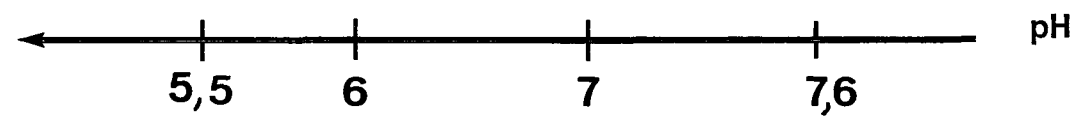
Figure 27: Analyse du profil électrophorétique des protéines tau synthétisées par les cellules Kelly par électrophorèse bi-dimensionnelle.

Les protéines tau ont été incubées avec l'anticorps monoclonal (AD2) et l'anticorps polyclonal M19G sur la même membrane de nitrocellulose. Tandis que l'anticorps (M19G) reconnaît différents variants de poids moléculaire apparent et de pI différents, l'anticorps AD2 ne détecte que les variants de plus haut poids moléculaire.

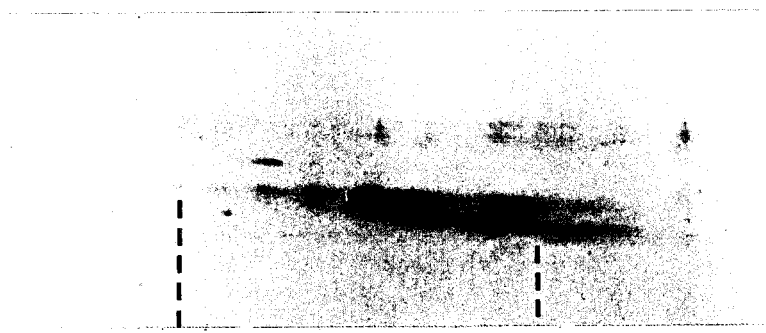
Protéines tau
cellulaires →



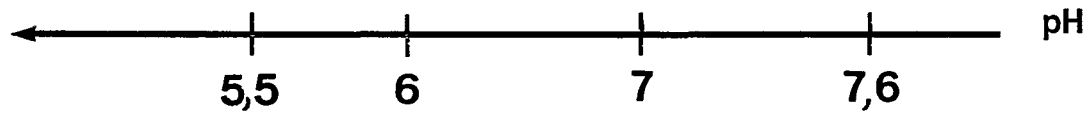
AD2



Protéines tau
cellulaires →



M19G



tau-PHF. Ce changement semble associé à une hyperphosphorylation des protéines tau qui se traduit par:

(1) une augmentation de l'immunomarquage des protéines tau par les anticorps dirigés contre des épitopes phosphorylés (AD2, AT8, AT270 et 12E8) qui sont tous trouvés fortement phosphorylés sur les protéines tau-PHF;

(2) la perte de l'immunomarquage par l'anticorps Tau-1, qui détecte spécifiquement les protéines tau normales (tau biopsiques et autopsiques);

(3) la détection par l'anticorps AP422 dirigé contre un épitope spécifique des protéines tau-PHF (**FIGURE 26**). Dans les extraits cellulaires des cellules SY 5Y traitées par l'AO, l'anticorps M19G révèle faiblement une bande qui migre de façon identique à la bande tau64 des protéines tau-PHF présentes dans l'homogénat de cerveau de patients Alzheimer. Cette bande est révélée pour des temps d'exposition plus longs et pour un marquage très intense de la bande de 55 kDa. Nous n'avons pas observé cette bande avec d'autres anticorps tel que l'anticorps AD2 (**Annexe 3**).

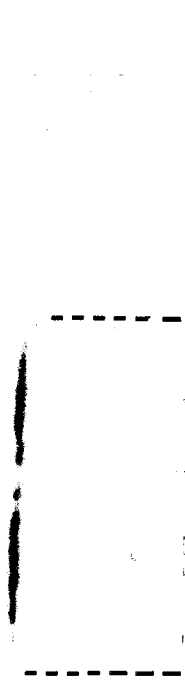
Afin d'analyser plus finement l'état de phosphorylation des protéines tau, les extraits de cellules Kelly traitées par l'AO sont séparés par électrophorèse bi-dimensionnelle (**FIGURE 28**). Le profil électrophorétique des différents variants isoélectriques a été analysé à l'aide d'anticorps monoclonal (AD2) et polyclonal, M19G et 134. Les protéines tau cellulaires sont résolues entre des valeurs de pH plus acides qu'avant traitement par l'AO, suggérant une augmentation du taux de phosphorylation de ces protéines. Elles sont résolues entre les pH 5,3 et 6,8. Seul le profil obtenu avec l'anticorps M19G est présenté sur la figure 28. Elles présentent également un poids moléculaire apparent plus élevé qu'avant traitement par l'AO, il est de 56 kDa. Tous les variants isoélectriques de ces protéines tau hyperphosphorylées migrent donc avec le même poids moléculaire mais se différencient par leur point isoélectrique. De plus, les

Figure 28: Analyse par électrophorèse bi-dimensionnelle du profil électrophorétique des protéines tau synthétisées par les cellules Kelly traitées par de l'acide okadaïque.

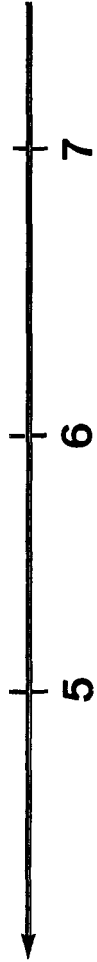
Les protéines tau ont été incubées avec l'anticorps monoclonal (AD2) et l'anticorps polyclonal M19G sur la même membrane de nitrocellulose. Tandis que l'anticorps (M19G) reconnaît différents variants de poids moléculaire apparent et de pI différents, l'anticorps AD2 ne détecte pas les variants les plus basiques. Notons l'acidification de ces variants après traitement des cellules par l'acide okadaïque (comparer avec la **FIGURE 27**).

Protéines tau
cellulaires →

AD2

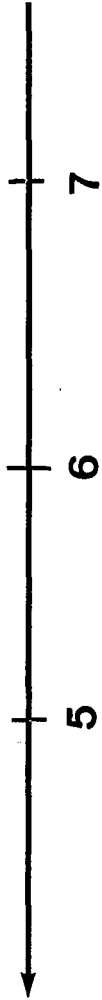


pH



protéines tau
cellulaires →

M19G



variants les plus basiques ne sont pas détectés par l'anticorps monoclonal AD2 (**FIGURE 28**).

I- 2-Recherche d'une modification de l'expression des transcrits tau synthétisés par les cellules Kelly après traitement par l'AO (Annexe 3)

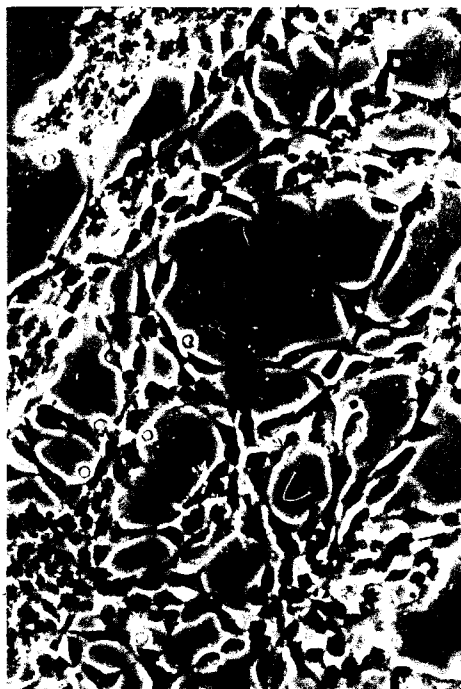
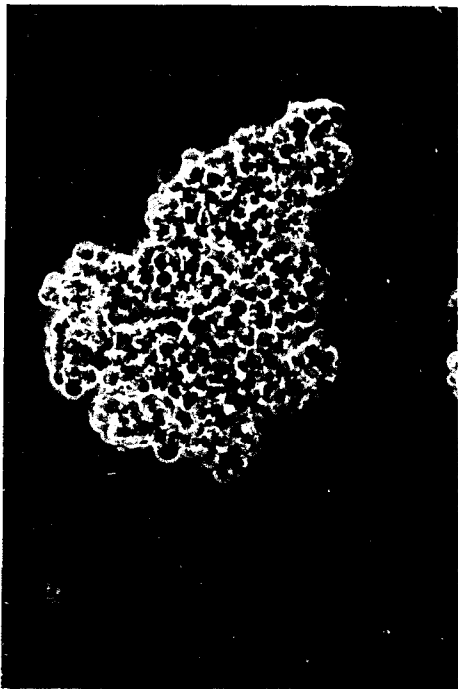
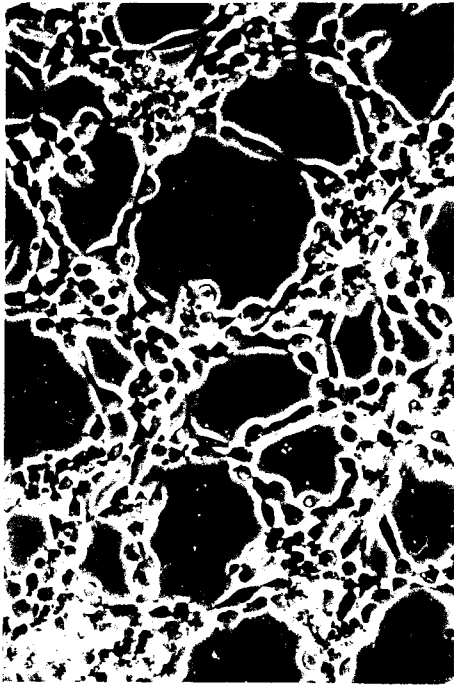
L'acide okadaïque pourrait exercer un rôle sur l'épissage des ARNm. C'est pourquoi nous avons recherché une éventuelle modification de la transcription du gène tau après traitement des cellules par l'AO. En effet, un changement au niveau de l'épissage pourrait expliquer la détection de la bande de 64 kDa. D'après les résultats de Goedert et collaborateurs (1992c), la présence de la bande de 64 kDa dans les extraits cellulaires pouvait résulter de l'expression de transcrits tau adultes contenant l'exon 2 associé ou non à l'exon 10. Nous avons donc testé cette hypothèse en analysant la région 5' des transcrits tau. Seule la bande de 112 pb (correspondant à la forme 2-3⁻) était amplifiée à partir des ARNm présents dans les cellules SY 5Y traitées par l'acide okadaïque.

I- 3- Action du traitement par l'acide okadaïque sur la morphologie des cellules SY 5Y

Les cellules sont différenciées par le NGF pendant 4 jours et sont ensuite traitées par un inhibiteur des protéines phosphatases 1 et 2A, l'acide okadaïque. En présence de cet inhibiteur (250 nM), les cellules vont finir par s'agréger et se détacher de leur support. Ces changements morphologiques ont été décrits dans la thèse de P.E. Sautière (1994). Progressivement, les neurites des cellules différenciées SY 5Y se rétractent mais maintiennent, vraisemblablement, des contacts entre elles par l'intermédiaire de leur corps cellulaire. Peu à peu, les cellules vont s'arrondir et se détacher de leur support. Au bout de

FIGURE 29: Effets de l'acide okadaïque sur la morphologie des cellules SY 5Y.

Lorsque les cellules SY 5Y différenciées par le NGF sont traitées par l'acide okadaïque (0,25 μ M), Les extensions neuritiques établies au cours de la différenciation (A) se rétractent progressivement (B). Les cellules s'arrondissent et ne maintiennent des contacts que par les corps cellulaires (C). Elles se détachent ensuite progressivement de leur support pour se regrouper en amas (D).



6 heures de traitement à 37°C, l'ensemble des cellules se sont détachées de leur support et surnagent dans le milieu de culture (**FIGURE 29**).

II- Etude de l'expression de l'isoforme tau441 après transfection transitoire dans les cellules SY 5Y et dans les cellules Kelly (Annexe 4)

Deux grandes méthodes sont généralement utilisées pour introduire une information génétique dans les cellules de mammifères. L'introduction d'un gène exogène se fait soit par infection virale, en utilisant un virus modifié, soit par transfection d'un plasmide, qui contient l'ADNc d'intérêt. Nous avons utilisé la deuxième technique pour introduire l'ADNc de l'isoforme la plus longue des protéines tau, l'isoforme tau441, dans les cellules de neuroblastomes humains: les Kelly et les SY5Y.

II- 1- Préparation du vecteur eucaryotique

Le Dr. M. Goedert (MRC, Cambridge, Grande Bretagne) nous a généreusement donné l'ADNc de l'isoforme tau441 inséré dans le plasmide procaryotique, pRK172. Ce vecteur permet, lorsqu'il est introduit dans une souche d'E. coli (BL21 (DE3)), l'expression des protéines tau441. Cette synthèse est impossible dans une cellule eucaryotique car le promoteur T7, du bactériophage T7, qui dirigeait l'expression de tau441 dans les bactéries, ne peut être reconnu par la machinerie de ces cellules. Nous avons donc été amenés à transférer l'ADNc de tau441 dans un vecteur eucaryotique, le plasmide pcDNA3 (voir Matériel et Méthodes) qui est alors sous le contrôle du promoteur viral CMV (cytomégalovirus). Ce promoteur fort conduit à un haut niveau d'expression des protéines recombinantes. La séquence complète de l'ADNcomplémentaire de tau441 inséré dans le vecteur eucaryotique a été analysée; elle est identique à celle publiée par Goedert et collaborateurs (1989b).

II- 2- Méthode de transfection employée: la lipofection

Pour transférer le plasmide pcDNA3-tau441 dans les cellules de neuroblastome, nous avons choisi d'utiliser la technique de lipofection. Cette technique demande la mise au point de certains paramètres tels que le rapport de charge entre l'ADN (négatif) et le lipide cationique (positif), la quantité d'ADN plasmidique transférée, la durée d'incubation des cellules avec le milieu de transfection ainsi que l'addition ou non de sérum de veau foetal dans ce milieu. L'ensemble de ces paramètres varie d'un type cellulaire à l'autre et nous avons donc recherché dans un premier temps les conditions optimales de transfection pour les deux lignées cellulaires, les cellules SY 5Y et Kelly.

II- 3- Optimisation des paramètres de transfection pour chacune des lignées cellulaires

II- 3- 1- Les cellules Kelly

Le lipide cationique, utilisé se nomme Tfx50; il est commercialisé par les laboratoires Promega (voir Matériel et Méthodes). Les cellules Kelly ont été cultivées dans des puits de culture de plaques 24 puits. Trois concentrations d'ADN plasmidique ont été testées (0,25; 0,5 et 1 µg d'ADN) par puits de culture ainsi que deux rapports de charge entre le lipide Tfx50 et l'ADN plasmidique (3:1 et 4:1). L'ADN plasmidique et le lipide ont été incubés une à deux heures avec les cellules dans un milieu de culture ne contenant pas de sérum avant d'être complétées par du milieu complet. Trois puits de culture sont réalisés par condition. Une série de cellules Kelly témoin ne subissant pas l'étape de transfection est également réalisée. 48 heures après le début de la transfection, les cellules sont collectées et reprises dans la solution de Laemmli puis chauffées 10 min à 100°C. Après migration sur gel SDS-PAGE (10%), les protéines sont transférées sur membrane

de nitrocellulose et analysées par immunoempreintes avec l'anticorps polyclonal M19G et les anticorps monoclonaux AD2 et Tau-1 (**FIGURE 30**). L'anticorps M19G révèle toutes les isoformes des protéines tau quel que soit leur état de phosphorylation. Dans les échantillons de cellules Kelly transfectées de manière transitoire, l'anticorps M19G détecte deux groupes de protéines de poids moléculaires différents: 3 bandes dont les poids moléculaires varient de 68 à 70 kDa et une bande de 53 kDa (**FIGURE 30**). La bande de 53 kDa est la seule détectée dans les cellules non transfectées. Elle correspond donc aux protéines tau synthétisées de manière constitutive par les cellules Kelly tandis que les autres espèces électrophorétiques de plus haut poids moléculaire correspondent aux protéines tau441. Ces protéines sont également détectées par les anticorps polyclonaux dirigés contre les inserts amino (Tau-E3, 304) ou carboxy-terminaux (Tau-E10) (**Annexe 4**). Ces 3 anticorps ne détectent pas les protéines tau endogènes, de 53 kDa. L'intensité de marquage varie selon les conditions de transfection et est directement lié à l'efficacité de transfection.

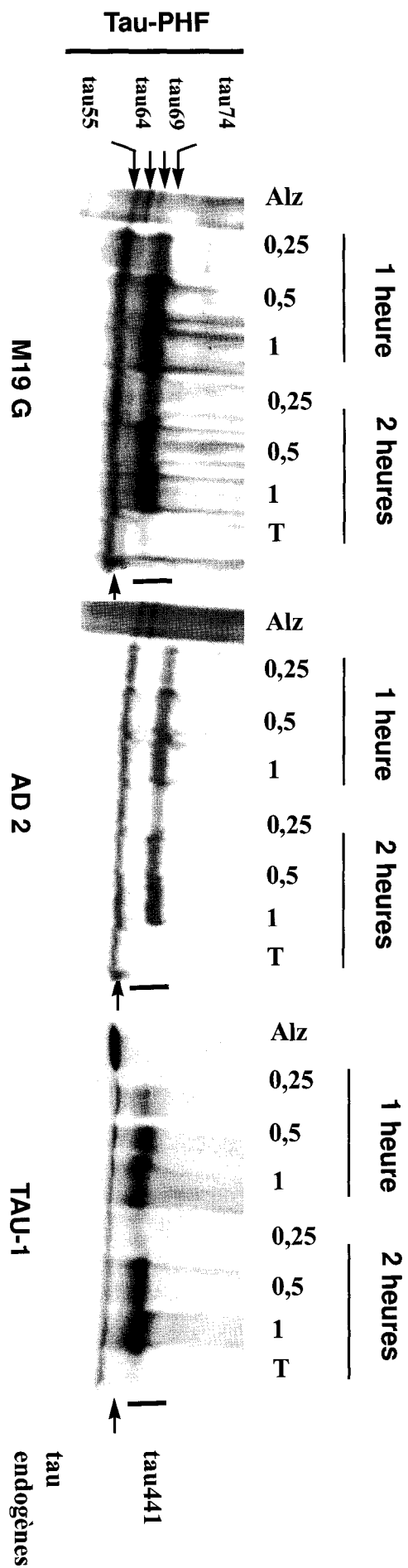
La comparaison de l'immunoréactivité des protéines tau441 par l'anticorps M19G montre que le rapport de charge 3:1 conduit à une meilleure efficacité de transfection que celui de 4:1. Dans ces conditions, la quantité d'ADN plasmidique (0,5 µg) incubée pendant une heure est suffisante pour obtenir une forte intensité d'immunomarquage par M19G. L'augmentation de la quantité d'ADN plasmidique ou de la durée de l'incubation ne semble pas amplifier l'efficacité de transfection. L'ensemble des paramètres, rapport Lipide/ADN: 3:1; quantité d'ADN plasmidique: 0,5 µg, durée d'incubation: 1 heure, représentent les conditions optimales de transfection de l'isoforme tau441 dans les cellules Kelly. Dans ces conditions, il y a surexpression des protéines tau transfectées, les protéines tau441, par rapport aux protéines tau endogènes.

L'apparition de plusieurs bandes de protéines tau441 résulte de différents états de phosphorylation. En effet, tandis que l'anticorps monoclonal AD2, dirigé contre les Ser396/404 phosphorylées, détecte uniquement la bande de plus haut poids moléculaire,

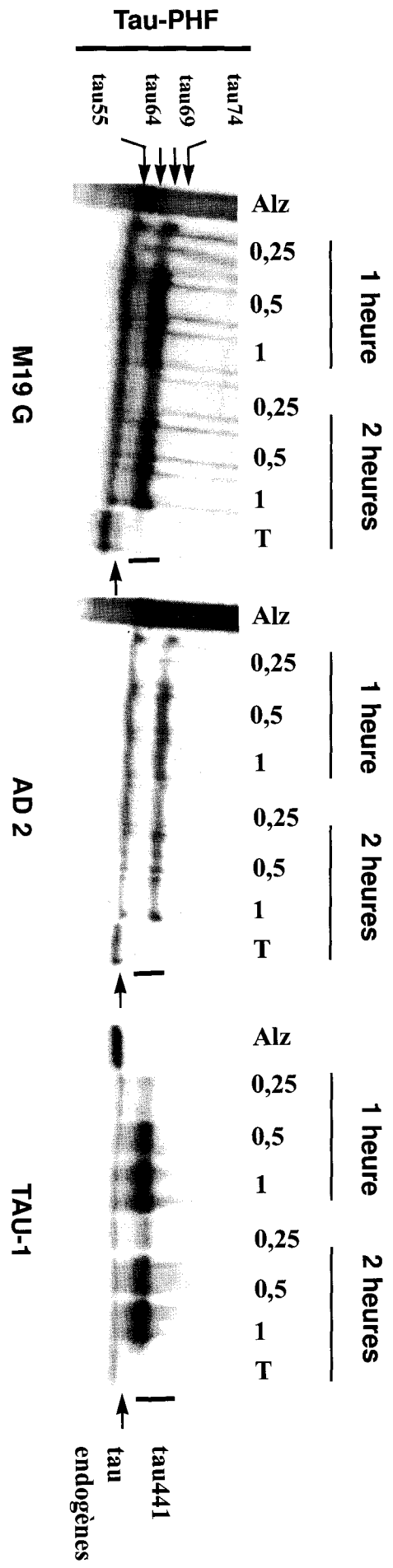
FIGURE 30: Optimisation des paramètres de transfection des cellules Kelly.

Différentes conditions de transfection sont testées pour les cellules Kelly. L'influence de la quantité d'ADN plasmidique (0,25 µg, 0,5µg, 1µg), le rapport de charge entre le lipide et l'ADN plasmidique (3:1 et 4:1), la durée de la transfection (1 heure ou 2 heures) ont été étudiés. L'équivalent d'un puits de culture est analysé après séparation sur un gel SDS-PAGE 10% (système Hoeffler) et transfert sur membrane de nitrocellulose. Les protéines tau sont révélées par 3 anticorps différents. L'anticorps M19G marque toutes les protéines tau cellulaires (les protéines tau endogènes et les protéines tau441) quelque soit leur état de phosphorylation. L'anticorps AD2, dirigé contre les Ser 396/404 phosphorylées, détecte une seule bande au niveau des protéines tau endogènes et au niveau des protéines tau441. Il y a superposition de ces bandes avec les bandes de poids moléculaire apparent le plus élevé des protéines tau441 et tau endogènes révélées par M19G. L'anticorps Tau-1, spécifique des résidus 199/202 non phosphorylés des protéines tau reconnaît les bandes inférieures des protéines tau441 tandis que les protéines tau endogènes ne sont pas présentes sur ce gel. Notons que l'intensité de l'immunomarquage des protéines tau441 par l'anticorps M19G est directement liée à l'efficacité de la transfection.

3:1



4:1



l'anticorps monoclonal Tau-1, qui reconnaît les protéines tau lorsqu'elles ne sont pas phosphorylées dans la région s'étendant des résidus 189 à 207, ne détecte que les deux bandes qui migrent plus rapidement (**FIGURE 30**).

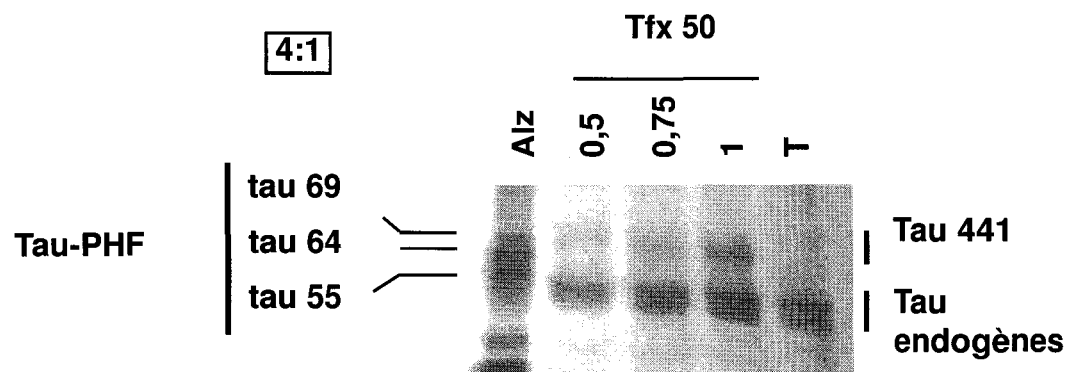
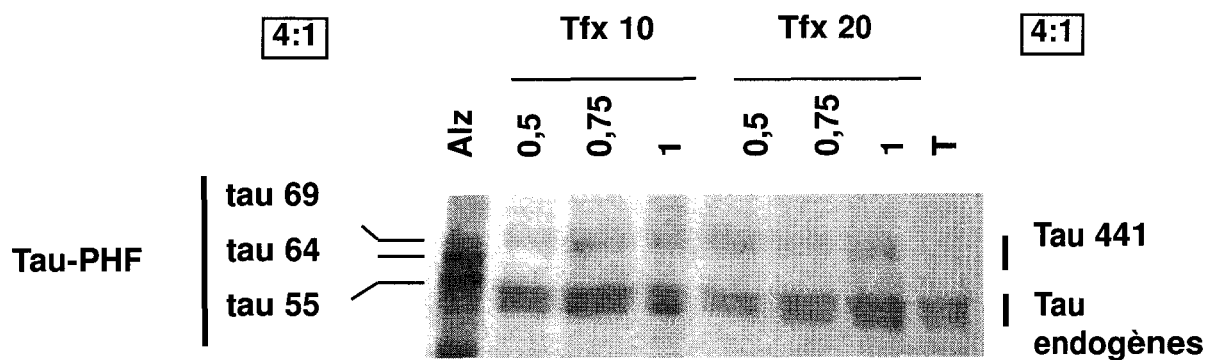
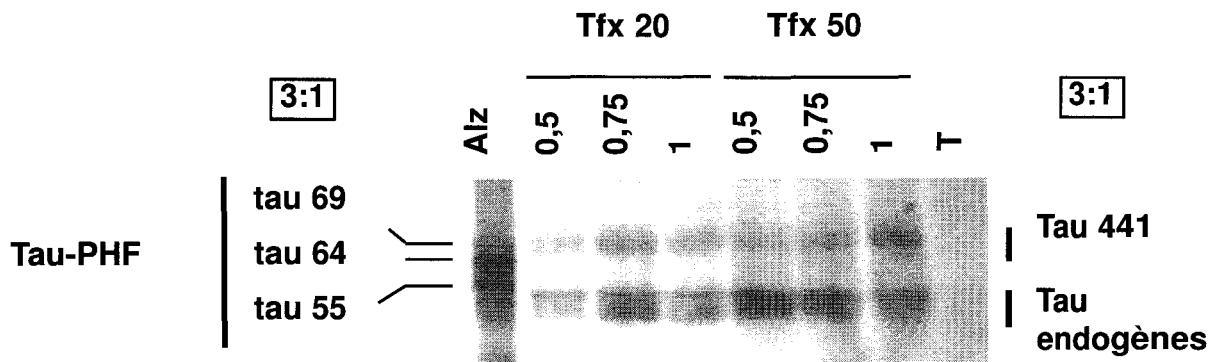
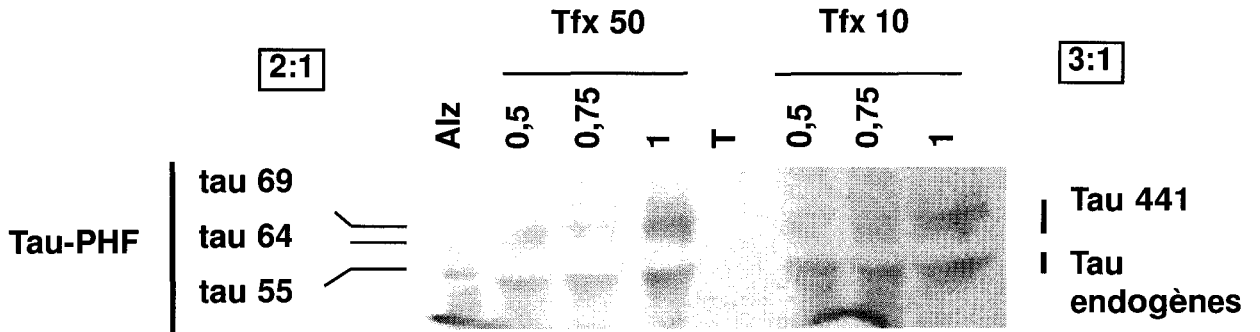
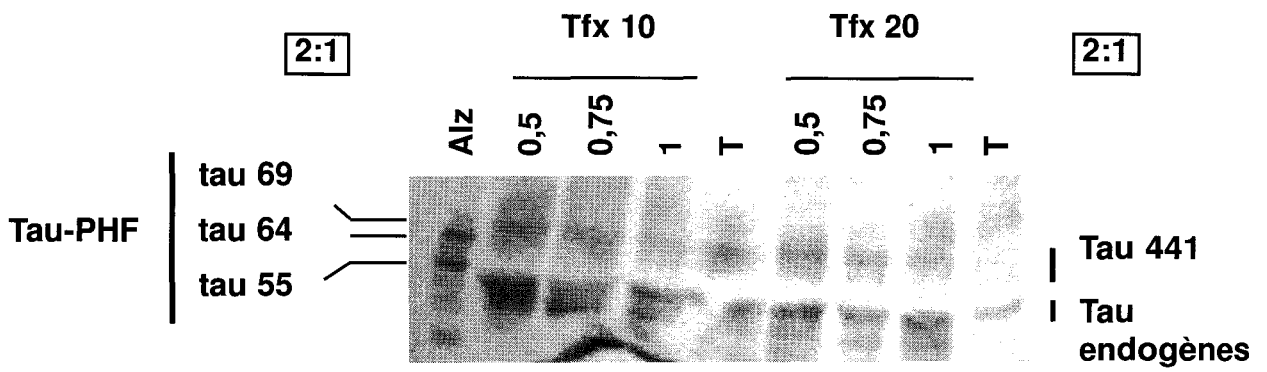
II- 3- 2- Les cellules SY5Y

La même expérience a été réalisée pour les cellules SY5Y en faisant varier de manière identique les différents paramètres (**FIGURE 31**). L'intensité de l'immunomarquage des protéines tau441 par M19G est plus faible que celui observé précédemment pour les cellules Kelly. De plus, selon les expériences, l'intensité du marquage varie, suggérant une variabilité de l'efficacité de transfection d'une expérience à l'autre. Dans le but d'augmenter l'efficacité des transfections, nous avons comparé l'efficacité de transfection obtenue avec 3 réactifs lipidiques, appelés Tfx10, Tfx20 et Tfx50. Trois quantités d'ADN plasmidique ont été testées (0,25; 0,5 et 1 µg de DNA) ainsi que trois rapports de charge entre le lipide et l'ADN plasmidique (2:1, 3:1 et 4:1) pour chacun de ces réactifs lipidiques (Tfx10, Tfx20 et Tfx50). L'incubation du mélange réactionnel avec ces cellules a duré deux heures dans un milieu ne contenant pas de sérum de veau foetal. Trois puits par condition de culture ont été réalisés. Les cellules SY 5Y, non transfectées, ont été également cultivées pendant deux heures avec du milieu sans sérum pour contrôler l'efficacité de transfection. L'intensité de marquage des protéines tau441 par l'anticorps M19G semble être la plus importante pour la condition utilisant le Tfx50, avec un rapport de charge lipide/ADN de 2:1, et une quantité d'ADN plasmidique de 1 µg par puits de culture.

Cependant, dans ces conditions, les cellules SY5Y expriment au mieux une quantité équivalente de protéines tau441 et de protéines tau natives. C'est pourquoi, nous avons choisi de poursuivre notre étude sur les cellules Kelly où l'efficacité de transfection est reproductible et l'expression de la forme transfectée plus importante.

FIGURE 31: Optimisation des paramètres de transfection pour les cellules SY 5Y.

Différentes conditions de transfection sont testées pour les cellules SY 5Y. Trois composés lipidiques sont comparés: le Tfx 10, le Tfx 20 et le Tfx 50. Nous avons également testé différents rapports de charge pour chaque lipide (2:1 et 3:1) tandis que 0,5 µg; 075 µg ou 1 µg de DNA plasmidique sont transfectés pour chaque puits de culture. La moitié des extraits cellulaires est analysée après séparation sur un gel SDS-PAGE 10% (système Hoeffer) et transfert sur membrane de nitrocellulose. Les protéines tau sont révélées par l'anticorps M19G et leur poids moléculaire apparent est estimé par rapport aux protéines tau-PHF trouvées dans le tissu cérébral Alzheimer. Dans les cellules témoin, il détecte les protéines tau endogènes tandis que dans les cellules transfectées, il détecte en plus les protéines tau441. L'intensité de l'immunomarquage des protéines tau441 par l'anticorps M19G est directement liée à l'efficacité de la transfection.



III- Etude de la phosphorylation et de l'hyperphosphorylation après traitement par l'acide okadaïque des protéines tau441 et des protéines tau natives (Annexe 4)

III- 1- Analyse par électrophorèse mono-dimensionnelle (Annexe 4)

Nous avons étudié l'état de phosphorylation des protéines tau441 et des protéines tau exprimées de manière constitutive. L'étude avec des anticorps dépendant de la phosphorylation montre que les différentes espèces électrophorétiques observées pour les protéines tau endogènes et les protéines tau441 transfectées de manière transitoire résultent d'un état de phosphorylation différent (**FIGURE 32**). Les espèces électrophorétiques de plus bas poids moléculaire, des protéines tau441 et tau natives, représentent les espèces les moins phosphorylées (reconnues par les anticorps Tau-1 et 12E8) tandis que les espèces de plus haut poids moléculaire sont détectées par les anticorps (AD2, AT8, 12E8, AT180, AT270), et représentent donc les formes les plus phosphorylées (**FIGURE 32**).

Le traitement des cellules par l'acide okadaïque conduit à une hyperphosphorylation des protéines tau441 et des protéines tau endogènes. Ces protéines migrent de manière similaire alors aux bandes tau55 et tau74 trouvées dans le tissu cérébral de patients Alzheimer (**FIGURE 32**). Cette augmentation de poids moléculaire est concomitante à l'augmentation de l'immunomarquage des anticorps dépendant de la phosphorylation (AD2, AT8, AT270, AT180, 12E8) ainsi qu'à la détection d'un épitope spécifique des protéines tau-PHF, la Ser422, (détectée par l'anticorps polyclonal AP422) (**FIGURE 32**). Parallèlement, on constate la perte de l'immunomarquage des protéines tau cellulaires par l'anticorps Tau-1. Aucune phosphorylation préférentielle sur l'une des deux isoformes n'a pu être visualisée sur les différents épitopes étudiés.

FIGURE 32: Comparaison de l'état de phosphorylation des protéines tau441 et des protéines tau endogènes avant et après traitement des cellules par l'acide okadaïque.

(A) Représentation schématique des épitopes reconnus par différents anticorps dépendant de la phosphorylation sur l'isoforme la plus longue des protéines tau. La nature de l'épitope phosphorylé (P) ou non phosphorylé (P) est indiqué sur ce schéma sous le nom de l'anticorps correspondant. De même, sont nommés les résidus reconnus par ces différents anticorps. Les anticorps polyclonaux M19G et 134, dirigés respectivement contre les 19 premiers a.a. et les 14 derniers a.a. des protéines tau, sont également représentés sur la figure et détectent toutes les protéines tau indépendamment de leur état de phosphorylation.

(B) Analyse de l'état de phosphorylation des protéines tau endogènes et transfectées (tau441) avant (-) et après (+) traitement des cellules par l'acide okadaïque (AO) (250 nM). L'état de phosphorylation des protéines tau endogènes et tau441 est analysé par la technique des immunoempreintes après séparation des protéines cellulaires sur un gel SDS-PAGE de 7,5% (système Hoeffer) grâce à différents anticorps dirigés contre des épitopes phosphorylés (AD2, AT8, AT180, AT270, 12E8, et AP422) ou non phosphorylé (Tau-1). Après traitement des cellules par l'acide okadaïque, l'immunoréactivité des anticorps dirigés contre un épitope phosphorylé augmente très sensiblement. Notons que tandis que l'immunomarquage des protéines tau par l'anticorps Tau-1 disparaît après le traitement par l'AO, ces protéines sont fortement immunodétectées par l'anticorps AP422, spécifique des protéines tau-PHF. Les anticorps polyclonaux M19G et 134 détectent toutes les protéines tau cellulaires quelque soit leur état de phosphorylation. La migration des protéines tau cellulaires sont comparées à celles d'un homogénat de cerveau de patients Alzheimer (Alz).

III- 2- Analyse par électrophorèse bi-dimensionnelle (Annexe 4)

De nombreux variants des protéines tau441 et protéines tau endogènes ont été révélés par les anticorps M19G et 134 entre les pH 5,3 et 7,4 (**FIGURE 33**). L'ensemble des variants diffèrent entre eux par leur pI ainsi que par leur poids moléculaire. Les protéines tau endogènes présentent un profil similaire à celui détecté dans les cellules Kelly avant transfection (cf **FIGURE 27**). Les protéines tau441 se répartissent en deux grands groupes de poids moléculaires différents, appelés tau A et tau B (**FIGURE 33**). Comme nous avons pu le mettre en évidence grâce à certains anticorps dépendant de la phosphorylation (AD2, Tau-1 et 12E8) (**FIGURE 34 et Annexe 4**), cette hétérogénéité est due à des variations du taux de phosphorylation des molécules ainsi qu'à la nature des sites phosphorylés: l'anticorps monoclonal AD2 marque le groupe tau A des protéines tau 441, l'anticorps monoclonal Tau-1 révèle les points possédant les pI les plus basiques tandis que l'anticorps monoclonal 12E8 détecte tous les variants révélés par l'anticorps polyclonal M19G (comparer les **FIGURES 33 et 34, Annexe 4**).

Après traitement par l'acide okadaïque, cette hétérogénéité diminue mais ne disparaît pas. Les protéines tau endogènes migrent alors comme plusieurs variants qui ne diffèrent entre eux que par leur point isoélectrique (**FIGURE 33**). Par contre, les protéines tau441 sont toujours plus hétérogènes que les protéines tau endogènes et sont toujours réparties en deux groupes, appelés tau A et tau B (**FIGURE 33**). Les protéines tau441 présentant un pI très acide ont un poids moléculaire similaire tandis qu'elles diffèrent par leur valeur de pI. Dans les pH plus basiques, elles se différencient entre elles par leur point isoélectrique mais aussi par leur poids moléculaire. Ces variants isoélectriques sont différemment marqués par les anticorps (AD2, 12E8 et AP422), suggérant là encore une phosphorylation différentielle des différentes protéines tau441 hyperphosphorylées (**FIGURE 33**).

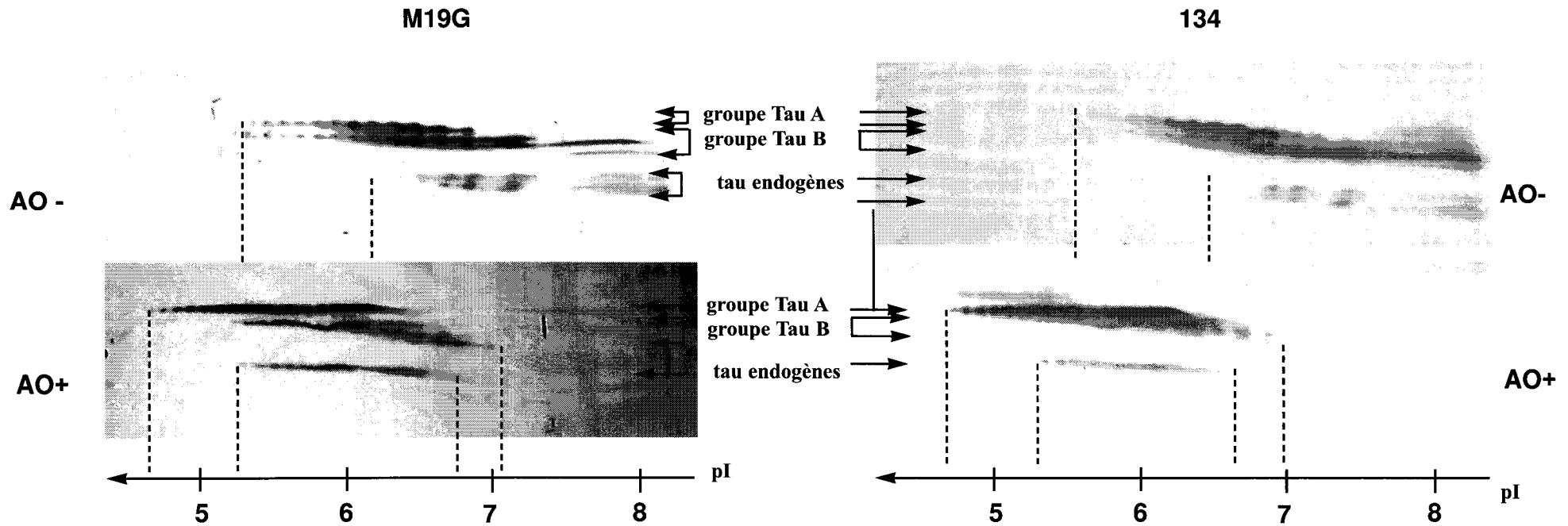


Figure 33: Comparaison des profils électrophorétiques des protéines tau extraites des cellules Kelly transfectées de manière transitoire avant et après traitement des cellules par l'acide okadaïque.

La même quantité d'homogénats de cellules Kelly transfectées de manière transitoire par l'ADNc de tau441 traitées (AO+) ou non (AO-) par l'acide okadaïque sont séparés par électrophorèse bi-dimensionnelle puis transférées sur membrane de nitrocellulose. Les variants isoélectriques des protéines tau441 et tau endogènes sont révélés par les anticorps polyclonaux M19G et 134. Seule la région où tous les variants détectés sont résolus est montrée. Les protéines tau441 sont résolues en 2 groupes de variants de point isoélectrique et de poids moléculaire différents tandis que les variants des protéines tau endogènes migrent comme une large bande. Notons l'acidification des variants tau441 et tau endogènes après le traitement des cellules par l'acide okadaïque.

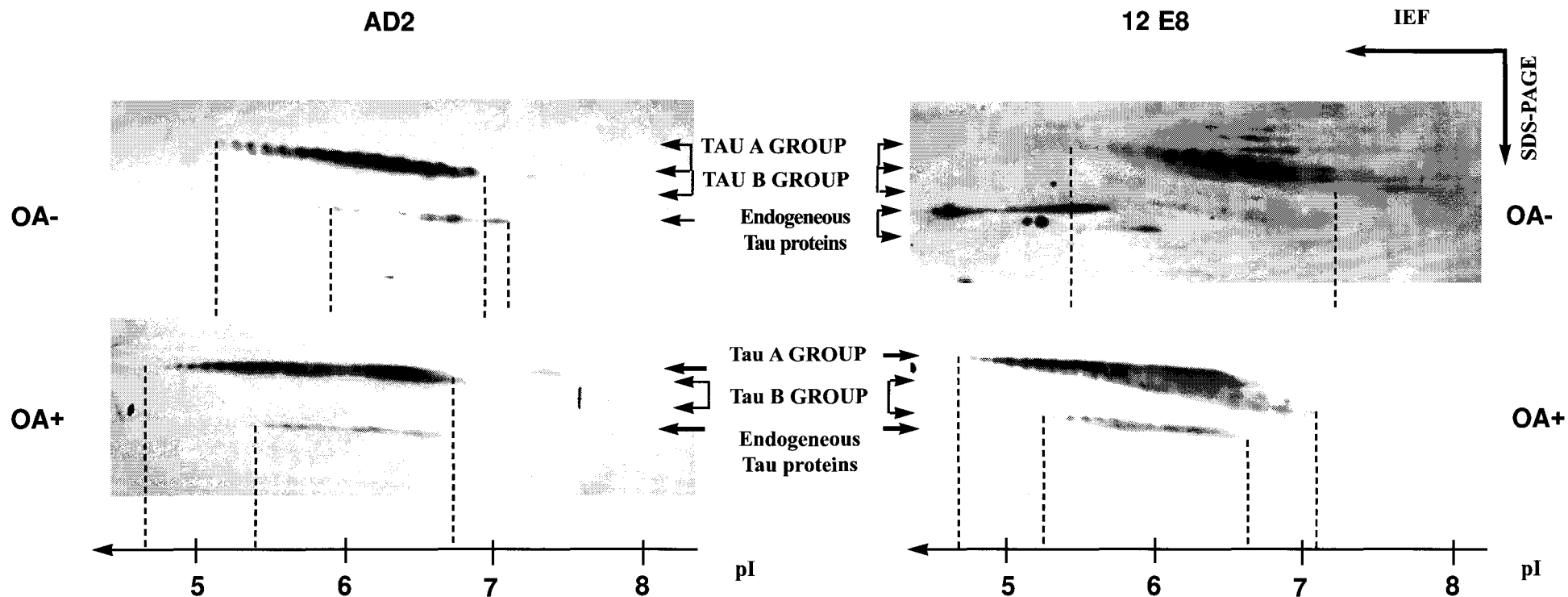


Figure 34: Comparaison des profils électrophorétiques des protéines tau extraites des cellules Kelly transfectées de manière transitoire avant et après traitement des cellules par l'acide okadaïque avec les anticorps monoclonaux AD2 et 12E8.

La même quantité d'homogénats de cellules Kelly transfectées de manière transitoire par l'ADNc de tau441 traitées (AO+) ou non (AO-) par l'acide okadaïque sont séparés par électrophorèse bi-dimensionnelle puis transférées sur membrane de nitrocellulose.

Avant traitement des cellules par l'AO (AO-), l'anticorps monoclonal AD2, dirigé contre les résidus Ser396/404 phosphorylés, ne détecte que les variants tau441 du groupe tau A et les variants de plus haut poids moléculaire des protéines tau endogènes. Après traitement des cellules par l'AO (AO+), tous les variants des protéines tau endogènes détectés par l'anticorps M19G (figure 33) sont également révélés avec AD2. Par contre, seuls les variants tau441 du groupe tau A sont révélés par l'AD2.

L'anticorps 12E8 détectait tous les variants tau441 et tau endogènes détectés par l'anticorps 134 (figure 33) avant et après traitement des cellules par l'AO.

Seule la région où tous les variants détectés sont résolus est montrée.

IV- Etude de l'isoforme tau441 exprimée de manière stable dans les cellules Kelly

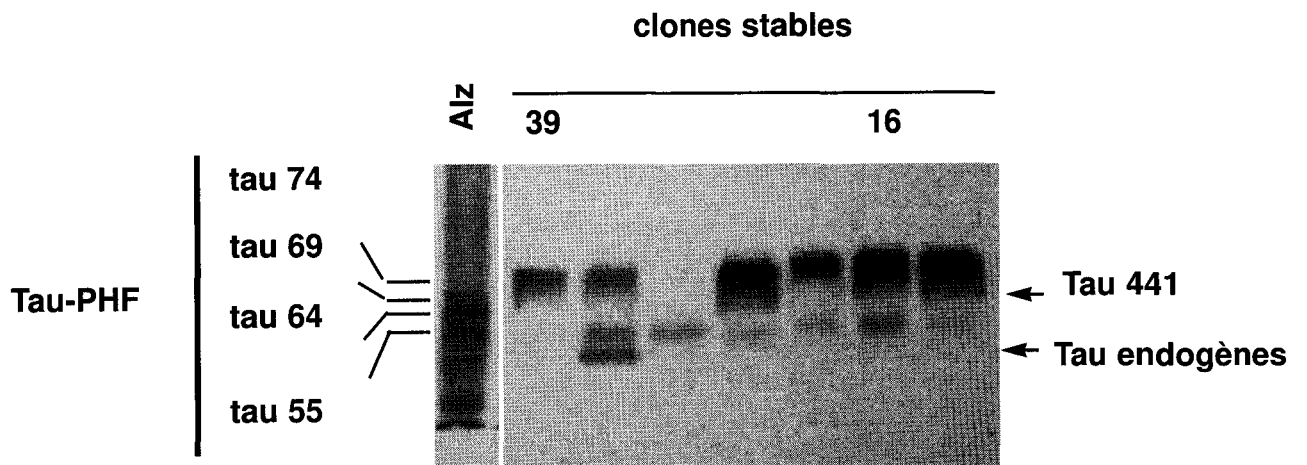
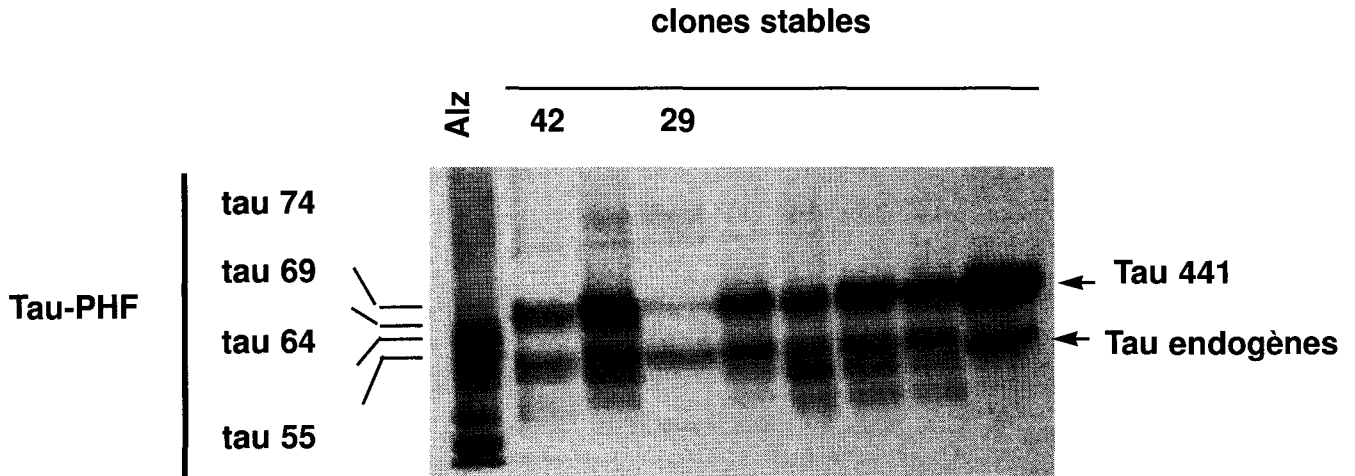
IV-1- Sélection de clones exprimant de manière stable l'isoforme la plus longue

De manière à approfondir l'étude de la phosphorylation de l'isoforme tau441 dans des cellules de type neuronal d'une part, et de rechercher, d'autre part, l'effet de la phosphorylation sur sa compartimentation cellulaire ainsi que sur sa solubilité, nous avons établi des lignées de cellules Kelly exprimant de manière stable cette isoforme.

24 heures après transfection, les cellules sont divisées au 1/4 et sont réparties dans 4 boîtes de 60 mm. A partir de cette étape, les cellules sont traitées par la Généticine à 400 µg/ml afin de sélectionner les clones résistants qui ont inséré le gène de résistance. Après 15 jours de culture dans les conditions sélectives, les premiers clones apparaissent. Cent clones ont été repiqués. Pour vérifier l'expression de la protéine tau441 dans ces clones, $6 \cdot 10^4$ cellules environ sont reprises dans une solution de Laemmli puis chauffées 10 min à 100°C. Ces échantillons sont analysés par la technique des immunoempreintes avec l'anticorps polyclonal M19G. Les protéines tau441 migrent comme une large bande de 69 à 74 kDa tandis que les protéines tau endogènes ont un poids moléculaire apparent variant de 50 à 54 kDa (**FIGURE 35**). L'intensité de l'immunomarquage des deux isoformes des protéines tau varie selon les clones et révèle le niveau d'expression de chacune de ces protéines tau dans chaque clone cellulaire. Pour certains clones (6 sur 100), l'anticorps M19G ne détecte aucune bande entre 69 et 74 kDa suggérant que ces clones n'expriment pas l'isoforme transfectée. Plusieurs hypothèses sont possibles pour expliquer l'absence de détection de protéines tau441. Elle pourrait effectivement résulter de leur trop faible expression dans ces cellules ne permettant pas sa détection par la technique

FIGURE 35: Comparaison de l'expression des protéines tau transfectées (tau441) et endogènes dans quelques clones:

Les protéines cellulaires sont analysée par SDS-PAGE et immunoempreintes. L'anticorps M19G détecte les deux types de protéines cellulaires. L'immunomarquage des protéines tau441 et des protéines tau endogènes varie selon les clones. Pour certaines clones, aucune bande correspondant aux protéines tau441 n'est détectée. Le profil de ces protéines est comparé aux protéines tau-PHF trouvées dans le tissu cérébral Alzheimer (Alz).



Clones morts	Groupe I	Groupe II	Groupe III	n'expriment pas tau441
7	14	57	16	6

Groupe I: L'intensité de l'immunoréactivité des protéines tau cellulaires (tau endogènes + tau441) est plus importante que l'immunoréactivité prévisible au vu de l'intensité de coloration des protéines cellulaires totales. Le rapport d'expression entre les deux isoformes varie selon les clones. Le clone 39 appartient à ce groupe.

Groupe II: L'intensité de l'immunoréactivité des protéines tau cellulaires (tau endogènes + tau441) est équivalente à l'immunoréactivité prévisible au vu de l'intensité de coloration des protéines cellulaires totales. Le rapport d'expression entre les deux isoformes varie selon les clones. Le clone 16 appartient à ce groupe.

Groupe III: L'intensité de l'immunoréactivité des protéines tau cellulaires (tau endogènes + tau441) est inférieure à l'immunoréactivité prévisible au vu de l'intensité de coloration des protéines cellulaires totales. Le rapport d'expression entre les deux isoformes varie selon les clones. Les clones 29 et 42 appartiennent à ce groupe.

TABLEAU IV: Tableau comparatif des clones obtenus.

des immunoempreintes. Plus probablement, l'ADNc de l'isoforme tau441 préalablement inséré dans le génome cellulaire a pu être éliminé au cours des divisions cellulaires. Enfin, seul le gène codant pour la résistance à la Généticine a été inséré dans le génome.

Les autres clones ont été classés en trois groupes (**Tableau IV**) en fonction de l'expression des protéines tau par rapport aux protéines cellulaires totales. Parmi ces clones, nous avons sélectionné 4 clones exprimant à différents taux les protéines tau441 et tau endogènes. Il s'agit des clones 16, 29, 39 et 42 (**FIGURE 36A**). La quantification de l'immunoréactivité de chacune des protéines tau synthétisées dans chacun des clones montre que les clones 16 et 39 expriment beaucoup plus de protéines tau441 que de protéines tau endogènes. Par contre, le clone 42 exprime approximativement la même quantité de chaque isoforme et le clone 29, une quantité supérieure de l'isoforme endogène par rapport à l'isoforme tau 441 (**FIGURE 36B**).

IV- 2- Comparaison du profil électrophorétique des protéines tau exprimées par les clones sélectionnés

IV- 2- 1- Avant traitement des clones par l'acide okadaïque

Pour chaque clone, la même quantité d'extraits cellulaires (20 µg) a été déposée sur un gel de 7,5% d'acrylamide en présence de SDS.

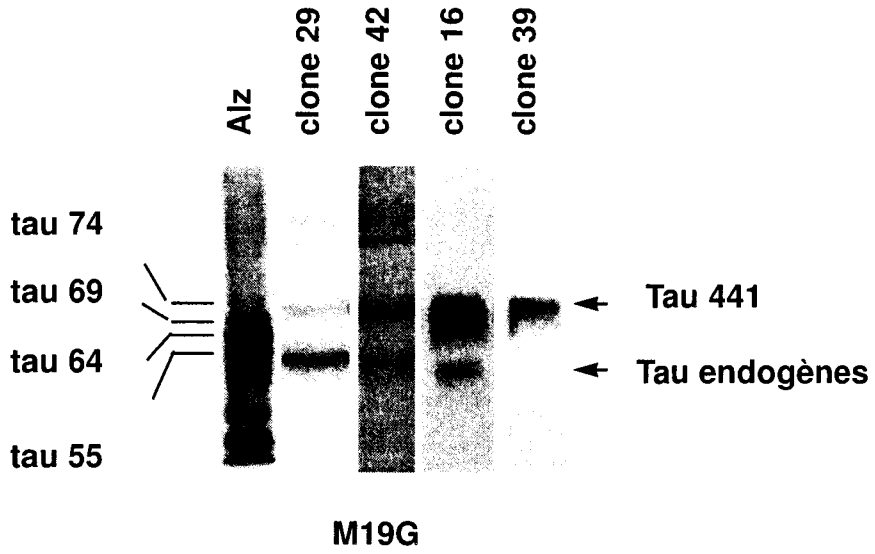
Pour chaque clone, les protéines tau endogènes migrent sous la forme d'une large bande dont le poids moléculaire varie de 50 à 53 kDa (**FIGURE 37A**). Les protéines tau transfectées, les protéines tau 441, migrent également sous la forme de plusieurs bandes dont le nombre et l'intensité varient selon les clones. Trois à cinq bandes comprises entre 62 et 72 kDa sont révélées par l'anticorps M19G. Cinq bandes sont effectivement révélées de manière intense dans les extraits cellulaires des clones 16 et 39.

FIGURE 36: Comparaison du taux d'expression de chaque isoforme des protéines tau par les clones sélectionnés.

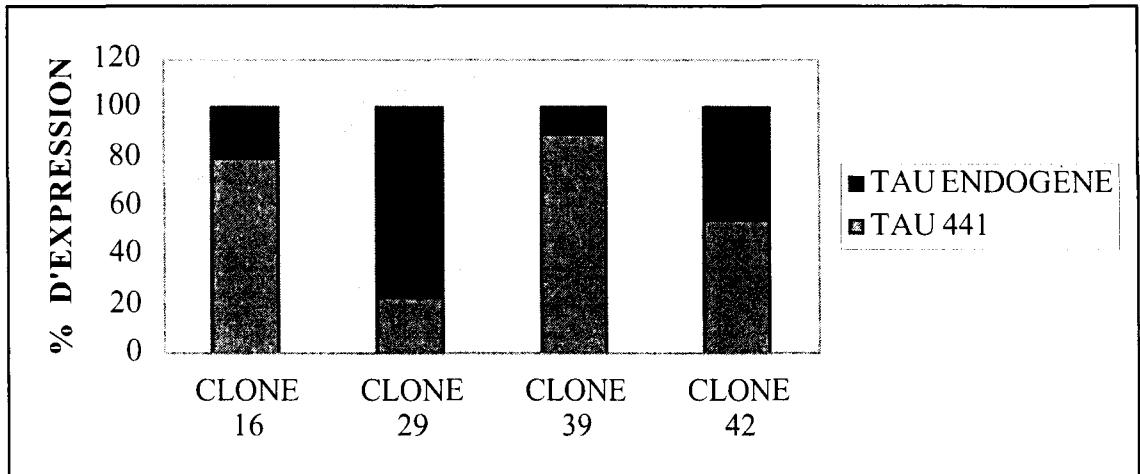
(A) Les protéines tau transfectées, Tau441, et les protéines tau endogènes sont analysées après séparation sur gel SDS-PAGE et immunoempreintes par l'anticorps M19G.

(B) L'intensité de l'immunomarquage de ces protéines cellulaires (tau441 et tau endogène) par l'anticorps M19G est mesurée par densitométrie et nous a permis d'établir un histogramme. L'histogramme représente la proportion de chaque isoforme des protéines tau cellulaires (tau441 et tau endogènes) exprimée par les clones 16, 29, 39 et 42.

A



B



Seules, les espèces électrophorétiques de plus haut poids moléculaire des protéines tau endogènes et transfectées sont révélées par l'anticorps dépendant de la phosphorylation AD2 (FIGURE 37B).

IV- 2- 2- Analyse après traitement des clones par l'acide okadaïque

Après traitement par l'acide okadaïque, l'anticorps M19G révèle toujours les protéines tau441 sous la forme de plusieurs espèces électrophorétiques dont le poids moléculaire varie de 64 à 74 kDa, dans les extraits cellulaires des clones 16 et 39, et de 69 à 74 kDa pour les clones 29 et 42. La bande de plus haut poids moléculaire présente un poids moléculaire apparent similaire à celui de la bande de 74 kDa faiblement détectée dans les échantillons de tissu cérébral de patients Alzheimer. L'anticorps AD2, qui reconnaît les Ser396/404 phosphorylées, détecte la bande de 74 kDa dans tous les clones. Il révèle également une bande de 72 kDa dans les clones 39 et 16 mais pas les autres bandes de plus bas poids moléculaire révélées par l'anticorps M19G.

Quant aux protéines tau endogènes, on observe en utilisant les anticorps M19G ou AD2, un changement de la migration électrophorétique qui se traduit par une migration similaire à celle de la bande tau55 du triplet Alzheimer. Cette bande est plus large et diffuse dans les extraits des clones 16 et 39.

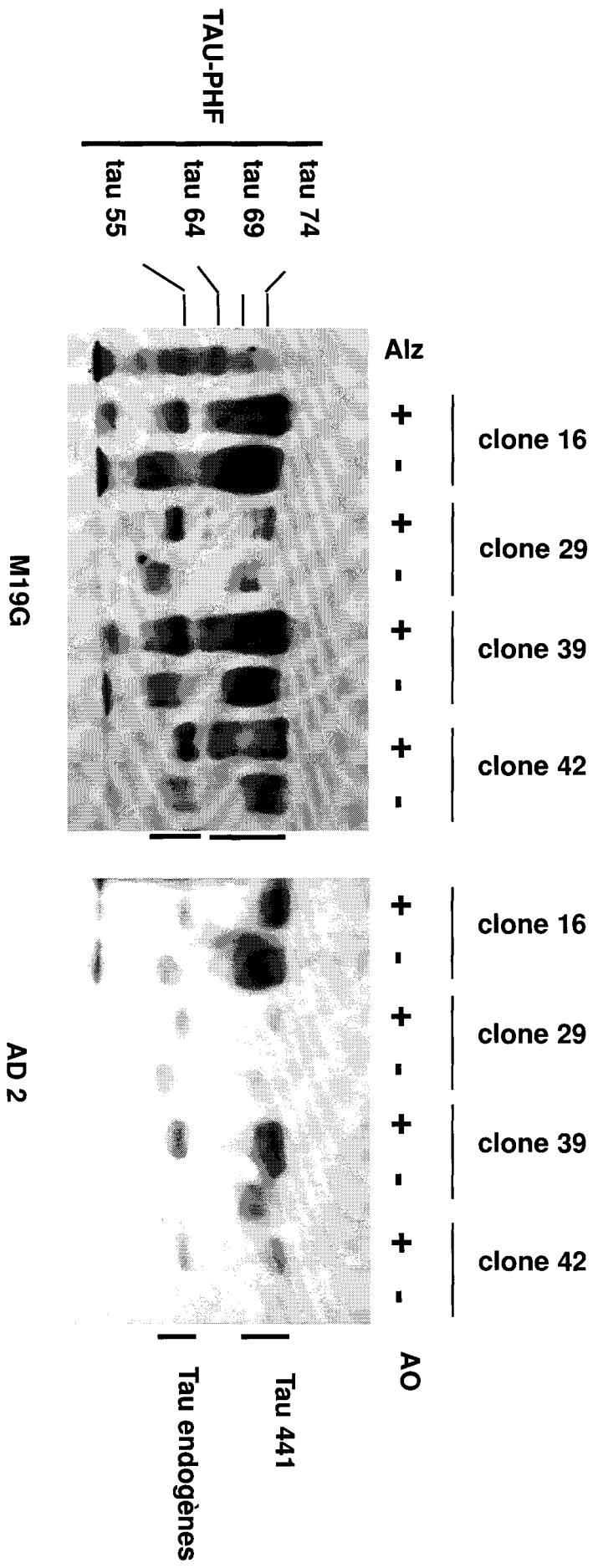
L'analyse de ces clones par immunofluorescence ainsi que par immunoempreintes au cours des divisions cellulaires a montré que l'immunomarquage spécifique des formes tau441 transfectées diminuait au cours des passages dans les clones 29, 39 et 42. C'est pourquoi nous ne présenterons ici que les résultats concernant le clone 16, qui représente le seul véritable clone stable parmi les 4 que nous avons étudiés.

FIGURE 37: Comparaison du profil électrophorétique des protéines tau exprimées dans les 4 clones sélectionnés avant et après traitement par l'acide okadaïque.

20 µg d'extraits cellulaires sont analysés pour chaque clone traité (+) ou non (-) par l'acide okadaïque (AO), après séparation électrophorétique et immunoempreintes.

(A) L'anticorps M19G détecte dans chaque extraits deux populations de protéines tau: les protéines tau441 migrent comme plusieurs bandes dont le poids moléculaire apparent varie de 62 à 72 kDa tandis que les bandes correspondant aux protéines tau endogènes ont un poids moléculaire apparent variant de 50 à 53 kDa. Après traitement par l'acide okadaïque de nombreuses bandes (de 64 à 74kDa) correspondant aux protéines tau441 ainsi qu'une bande diffuse de 55 kDa correspondant aux protéines tau endogènes sont détectées par l'anticorps M19G. Le poids moléculaire de ces protéines tau est estimé par rapport aux protéines tau-PHF extraites du cerveau de patients Alzheimer (Alz).

(B) L'anticorps AD2 ne détecte que les espèces électrophorétiques de plus haut poids moléculaire des protéines tau endogènes et des protéines tau441 avant et après traitement des cellules par l'acide okadaïque.



V- Etude des protéines tau exprimées dans le clone 16

V- 1- Analyse des sites phosphorylés sur les protéines tau endogènes et tau441 au sein du clone 16 avant et après traitement par l'acide okadaïque

V- 1- 1- Avant traitement des cellules par l'acide okadaïque (AO)

L'homogénat cellulaire du clone 16 est déposé sur toute la largeur d'un gel SDS-PAGE de 7,5% afin d'être analysé par la technique des immunoempreintes. Deux bandes sont détectées par l'anticorps M19G: un groupe de bandes, dont le poids moléculaire varie de 64 à 72 kDa, qui correspond aux protéines tau441 transfectées et une bande migrant de 50 à 53 kDa qui correspond aux protéines tau endogènes (**FIGURE 38**). Cette diffusion est due à l'existence de nombreux variants différemment phosphorylés comme le montre l'utilisation des anticorps phospho-dépendants.

En effet, pour les protéines tau441, des bandes de 72 et 69 kDa sont détectées par les anticorps AD2, AT270 et 12 E8 (**FIGURE 38A**). Par contre, les anticorps Tau-1, AT8 et AT180 révèlent les protéines tau441 qui migrent plus rapidement et qui présentent un poids moléculaire apparent variant de 66 à 69 kDa approximativement. L'anticorps Tau-1 détecte, en plus, deux autres bandes de plus bas poids moléculaire. Les anticorps, AP422 et AT10, reconnaissant spécifiquement des épitopes trouvés sur les protéines tau-PHF, ne semblent détecter aucune de ces bandes.

Pour les protéines tau endogènes, la bande de 53 kDa est faiblement immunomarquée par l'AD2 et par les anticorps AT270 et 12E8 (**FIGURE 38A**). Cette bande n'est pas détectée par l'anticorps Tau-1 qui révèle par contre les deux autres bandes

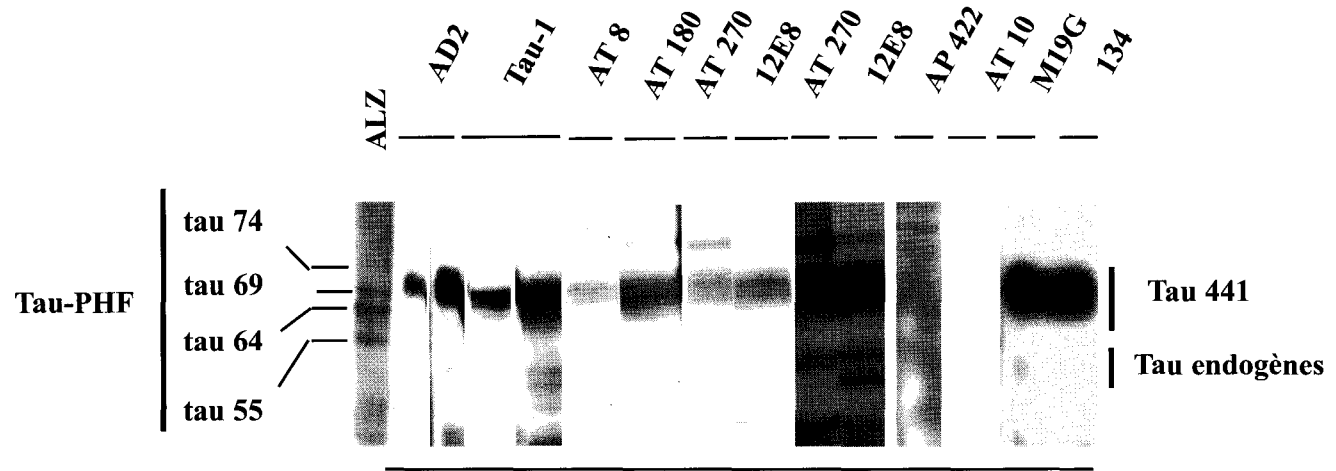
FIGURE 38: Analyse de l'état de phosphorylation et d'hyperphosphorylation des protéines tau cellulaires synthétisées par le clone 16:

130 μ g d'extraits cellulaires non traités par l'acide okadaïque (A) ou traités par l'AO (B) sont déposés sur toute la largeur d'un gel SDS-PAGE de 7,5%. Après transfert sur membrane de nitrocellulose, les protéines cellulaires sont mises en évidence par la coloration au rouge ponceau. La membrane est alors découpée en une série de dix bandelettes qui sont ensuite incubées avec les anticorps M19G et 134 respectivement dirigés contre les parties amino- et carboxy-terminales des protéines tau et avec différents anticorps dirigés contre des résidus phosphorylés (AD2, AT8, AT180, AT270, 12E8, AT10 et AP422) ou non phosphorylés (Tau-1). Un homogénat de cerveau de patient Alzheimer (Alz) sert de contrôle. Nous présentons pour certains anticorps différents temps d'exposition afin de visualiser le mieux possibles les différentes bandes reconnues pour les protéines tau441 et les protéines tau endogènes.

(A) Avant traitement des cellules par l'acide okadaïque, les anticorps M19G et 134 détectent une large bande diffuse dont le poids moléculaire varie de 62 à 72 kDa, qui correspond aux protéines tau441, ainsi qu'une bande, dont le poids moléculaire varie de 50 à 53 kDa, qui correspondent aux protéines tau endogènes. L'anticorps monoclonal AD2 détecte les espèces électrophorétiques de plus haut poids moléculaire des protéines tau441 et tau endogènes. Tau-1 marque toutes les autres espèces électrophorétiques. Les autres anticorps (AT8, AT180, AT270, 12E8) reconnaissent différemment toutes ces espèces électrophorétiques tandis que les anticorps AT10 et AP422 ne détectent aucune bande.

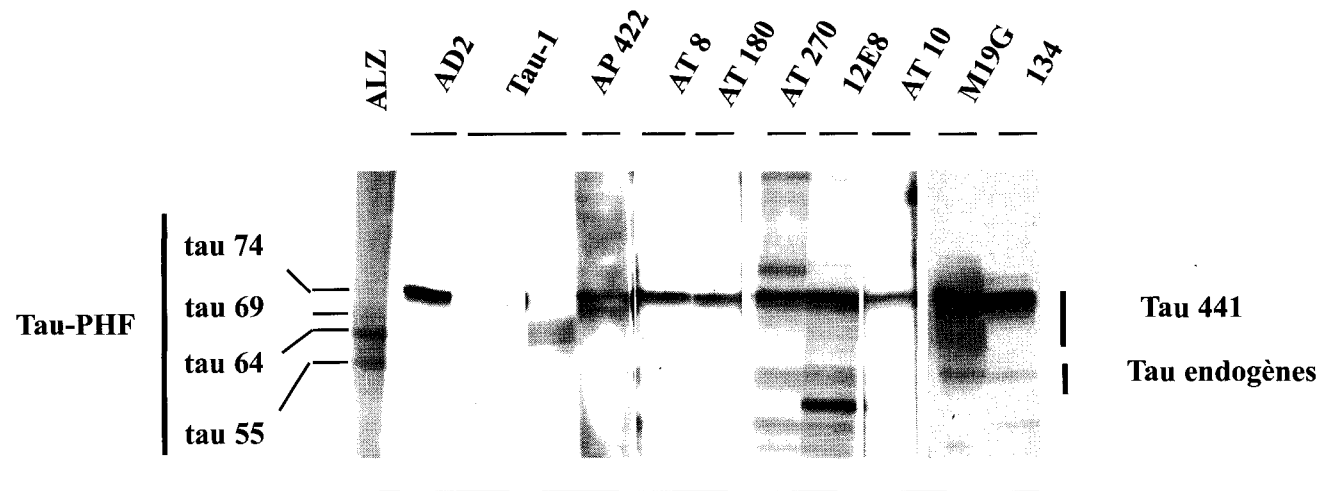
(B) Après traitement des cellules par l'acide okadaïque, les anticorps M19G et 134 reconnaissent les protéines tau441 comme des protéines de 74 kDa qui comigent avec les protéines tau-PHF. L'immunoréactivité des anticorps AD2, AT8, AT180, AT270 et 12E8 augmente. Cette bande de 74 kDa est également détectée par les anticorps AT10 et AP422. Par contre l'anticorps Tau-1 ne détecte pas ces protéines mais détecte faiblement des formes de plus bas poids moléculaire lorsque l'exposition est prolongée.

(A)



Avant traitement des cellules par l'acide okadaïque

(B)



Après traitement des cellules par l'acide okadaïque

de 50 et 52 kDa. L'anticorps 12E8, quant à lui, reconnaît également la bande de 50 kDa. Les anticorps AT8, AT180, AP422 et AT10 ne marquent aucune de ces trois bandes. L'absence de détection de ces bandes par les anticorps AT8 et AT180 pourrait résulter du faible taux d'expression des protéines tau endogènes par rapport aux protéines tau441 cumulé à la faible présence des épitopes correspondants. En effet, ces deux anticorps AT8 et AT180 sont capables de détecter faiblement les protéines tau endogènes dans les cellules Kelly non transfectées, comme nous l'avons montré précédemment. Par contre les épitopes reconnus par les anticorps AP422 et AT10 n'ont jamais été détectés dans ces cellules Kelly.

V- 1- 2- Après traitement par l'acide okadaïque

L'hyperphosphorylation des protéines tau cellulaires, induite par traitement des cellules par l'AO, se traduit par une augmentation du poids moléculaire des protéines tau endogènes et des protéines tau441. La bande de plus haut poids moléculaire de chacune des protéines tau endogènes et des protéines tau441, migre respectivement de manière identique aux bandes 55 et 74 kDa du triplet de protéines tau-PHF détectées notamment par l'AD2 dans le tissu cérébral Alzheimer (**FIGURE 38B**). Notons que le traitement des cellules par l'acide okadaïque conduit à une réduction de l'hétérogénéité dans la population des protéines tau441 et endogènes. En effet, les protéines tau441 immunodétectées par l'anticorps M19G migrent sous la forme de deux bandes et non plus sous la forme de cinq bandes. Une bande supérieure de 74 kDa qui présente un poids moléculaire apparent similaire à celui de la bande minoritaire de 74 kDa des tau-PHF et une bande mineure de 73 kDa environ, plus faiblement détectée par l'anticorps polyclonal M19G. Ces bandes sont fortement détectées par les différents anticorps, AD2, AT8, AT180, AT270 et 12E8. Notons la très nette augmentation de l'immunomarquage de ces protéines tau441 par les anticorps AT8 et AT180 qui ne marquaient que très faiblement les protéines tau441 avant

le traitement. De plus, cette étude montre la diminution très nette de l'épitope Tau-1, caractéristique des formes peu phosphorylées des cerveaux adultes biopsiques et autopsiques. L'anticorps Tau-1 ne marque plus que très légèrement des bandes de plus bas poids moléculaire, indétectables par les autres anticorps dépendant de la phosphorylation. Cette détection n'apparaît que lorsque le temps d'exposition est prolongé. Parallèlement, les anticorps AT10 et AP422, qui sont spécifiques des protéines tau-PHF, reconnaissent également les protéines tau cellulaires hyperphosphorylées.

V- 2- Etude de la déphosphorylation des protéines tau cellulaires par les protéines phosphatases endogènes

Lors du délai post-mortem, les protéines tau extraites d'un cerveau de patient adulte témoin subissent une déphosphorylation (Matsuo *et al.*, 1994). Les protéines tau sont donc sensibles à une activité phosphatasique présente dans ces cerveaux. Il a été montré une telle activité dans les extraits de cellules SY 5Y (Soulié *et al.*, 1996). C'est pourquoi nous avons voulu étudier et comparer la sensibilité des sites phosphorylés reconnus par les anticorps Tau-1, AD2 et 12E8, présents sur les deux types d'isoformes de tau, à l'activité phosphatasique endogène.

Le lysat cellulaire obtenu après homogénéisation des cellules dans un broyeur de Dounce, est placé à 37°C pendant 30 min. Des fractions sont prélevées à différents temps d'incubation variant de 0 à 30 min. L'activité des protéines phosphatases est alors stoppée par l'addition d'acide okadaïque (250 nM) avant d'être dénaturées par la solution de Laemmli à 100°C pendant 10 min. Après transfert, les protéines tau sont analysées avec les anticorps monoclonaux AD2, Tau-1 et 12E8 et polyclonaux M19G et 134.

Au temps 0, les anticorps M19G et 134 détectent les deux groupes de protéines tau correspondant aux protéines tau endogènes et aux protéines tau441 (**FIGURE 39**). Au cours de la cinétique, on observe une diminution du poids moléculaire apparent de ces

FIGURE 39: Etude cinétique de l'activité des protéines phosphatases endogènes dans les lysats cellulaires du clone 16:

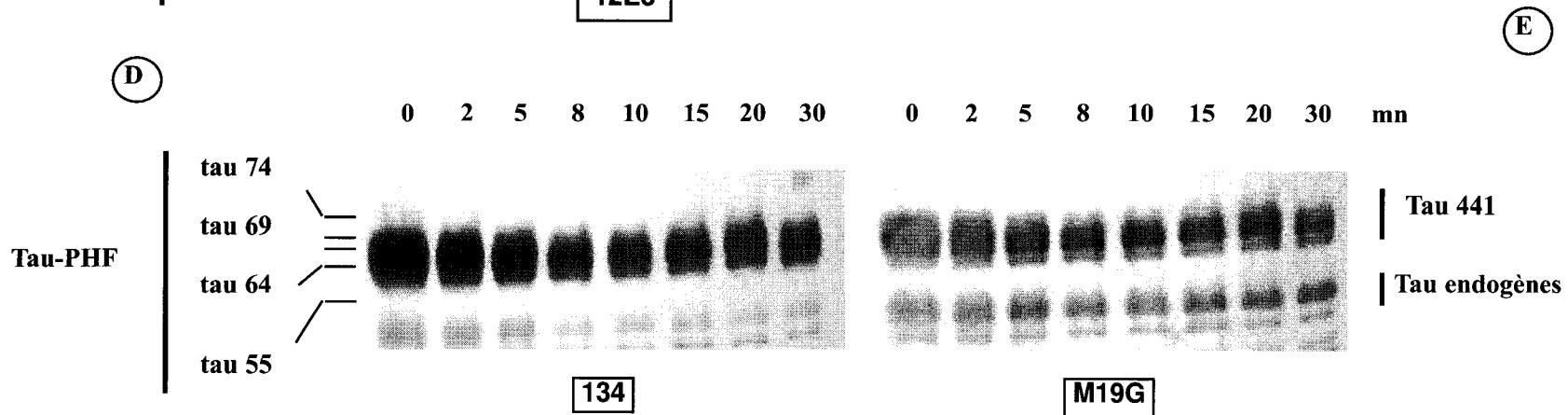
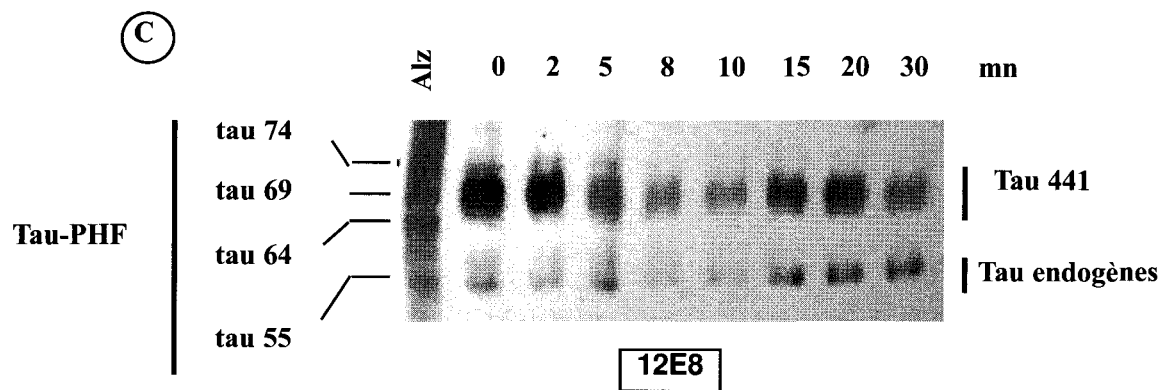
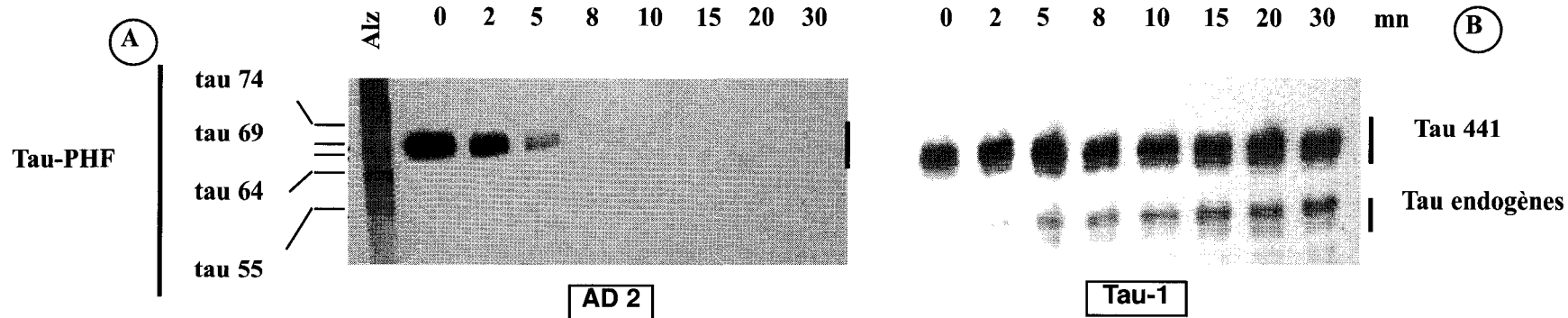
Une cinétique de déphosphorylation sur 30 mn est réalisée sur les lysats cellulaires. Pour chaque durée d'incubation, une fraction similaire de protéines est déposée sur un gel SDS-PAGE de 7,5% puis transférée sur membrane de nitrocellulose. Les protéines tau sont alors analysées par immunoempreintes grâce à différents anticorps monoclonaux et polyclonaux.

(A) Immunoempreinte par AD2. L'anticorps AD2 marque deux bandes de 72 et 69 kDa au temps 0. Cet immunomarquage disparaît après 8 min d'incubation à 37°C.

(B) L'anticorps Tau-1 détecte dès le temps 0 trois bandes de 62, 64 et 66 kDa qui correspondent aux protéines tau441. Au cours de la cinétique, l'immunoréactivité de l'anticorps Tau-1 augmente au profit des espèces électrophorétiques de plus bas poids moléculaire. Les protéines tau endogènes sont également détectées et l'immunoréactivité augmente au cours de la cinétique.

(C) L'anticorps 12E8 reconnaît les deux populations de protéines tau cellulaires. L'immunoréactivité des protéines tau441 et des protéines tau endogènes diminue rapidement mais demeure jusqu'à 30 min d'incubation.

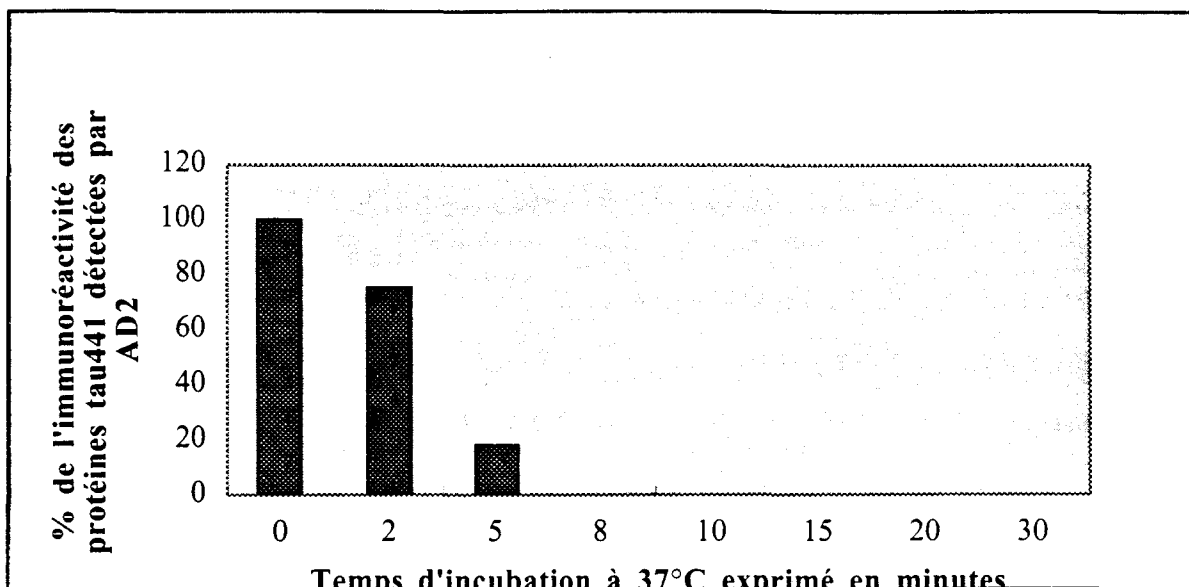
(D) et (E) Les anticorps polyclonaux M19G (D) et 134 (E) révèlent une large bande diffuse de 62 à 72 kDa qui correspond aux protéines tau441 ainsi qu'une bande de 50 à 53 kDa qui correspond aux isoformes endogènes confirmant la présence des protéines tau cellulaires. Au fur et à mesure de la cinétique, une augmentation de l'immunomarquage des espèces électrophorétiques de plus bas poids moléculaire est observée, avec les deux anticorps M19G et 134, confirmant l'existence d'une déphosphorylation et non d'une protéolyse.



deux types de protéines cellulaires. Cette modification ne semble pas être due à une protéolyse puisque ces deux anticorps polyclonaux, dirigés contre les extrémités amino- et carboxy-terminales, détectent les mêmes espèces électrophorétiques. Elle résulte plus probablement d'une déphosphorylation. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons analysé l'immunoréactivité des protéines tau à l'aide de différents anticorps dépendant de la phosphorylation: les anticorps monoclonaux AD2, Tau-1 et 12E8.

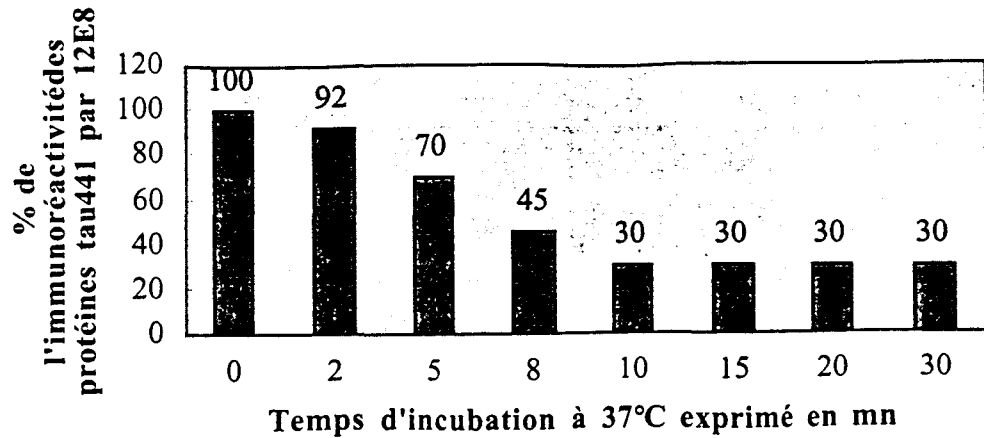
Les résultats montrent que la déphosphorylation des sites reconnus par l'AD2 sur les protéines tau441 est rapide et qu'au bout de 8 min, elle est complète. En effet, au temps 0 l'anticorps AD2 détecte deux protéines dont le poids moléculaire apparent est approximativement de 72 et 69 kDa. Ces bandes correspondent aux espèces électrophorétiques de plus haut poids moléculaire détectées par l'anticorps M19G. L'intensité de marquage de ces deux bandes diminue rapidement pendant les cinq premières minutes. Plus aucun marquage n'est détecté pour des temps plus longs (jusqu'à 30 min) (**FIGURE 39**).

Nous avons réalisé une quantification de l'immunoréactivité des protéines tau pour l'anticorps AD2 par rapport aux protéines totales cellulaires déposées qui est présentée sous la forme d'un histogramme.



Histogramme 1: Immunoréactivité des protéines tau441 vis à vis de l'anticorps AD2 lors de la cinétique de déphosphorylation.

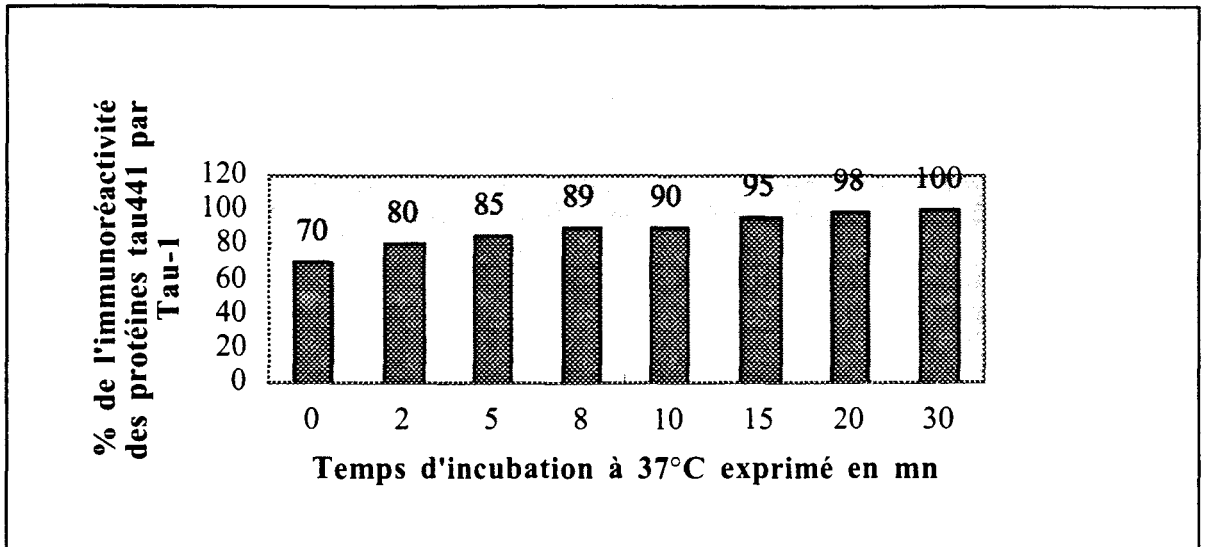
Au temps 0, l'anticorps 12E8 qui reconnaît la Ser262 lorsqu'elle est phosphorylée détecte une large bande s'étendant de 66 à 72 kDa, qui correspond aux protéines tau441 (**FIGURE 39**). Cet immunomarquage diminue rapidement durant les 8 premières minutes d'incubation. Néanmoins, pour des temps d'incubation plus longs (jusqu'à 30 min), un marquage faible pour les bandes de plus bas poids moléculaire de 66 et 69 kDa est toujours observé.



Histogramme 2: Immunoréactivité des protéines tau441 vis à vis de l'anticorps 12E8 lors de la cinétique de déphosphorylation.

Les protéines tau endogènes semblent présenter le même profil au cours de la cinétique de déphosphorylation et demeurent toujours faiblement immunomarquées par 12E8 après 30 min.

Pour confirmer que la perte d'immunoréactivité est bien liée à une déphosphorylation, les mêmes échantillons ont été incubés avec l'anticorps Tau-1. L'anticorps marque un groupe de protéines tau441 dont le poids moléculaire apparent diminue au cours de la cinétique (**FIGURE 39**). En effet, au cours du temps, l'immunoréactivité des bandes supérieures diminue tandis que celle des bandes de plus bas poids moléculaire augmente. Cette répartition différente du marquage par l'anticorps Tau-1 au profit de bandes de plus bas poids moléculaire souligne la déphosphorylation progressive des protéines tau441. L'histogramme 3 montre bien que le changement dans le profil électrophorétique s'accompagne d'une légère augmentation de l'immunoréactivité des protéines tau441 vis-à-vis de l'anticorps Tau-1.



Histogramme 3: Immunoréactivité des protéines tau441 vis à vis de l'anticorps Tau-1 lors de la cinétique de déphosphorylation.

L'augmentation du marquage par l'anticorps Tau-1 est particulièrement nette pour les protéines tau endogènes après 5 min d'incubation. Cette immunoréactivité augmente progressivement jusqu'à la fin de la cinétique.

V- 3- Analyse de la localisation cellulaire des protéines tau441 dans les cellules du clone 16

V- 3- 1- Par fractionnement cellulaire

Après fractionnement cellulaire des cellules du clone 16, nous avons recherché la localisation des protéines tau dans chacune des fractions correspondant au cytosol, au cytosquelette et au noyau/filaments intermédiaires (Matériels et Méthodes).

Nous avons alors recherché la répartition des protéines tau dans chacune des trois fractions cellulaires grâce à l'anticorps M19G (**FIGURE 40**). L'anticorps M19G détecte plus fortement les protéines tau dans la fraction cytosolique que dans les autres fractions suggérant que cette fraction cytosolique est la fraction la plus riche en protéines tau cellulaires (tau441 et tau endogènes). De plus, dans cette fraction, toutes les espèces électrophorétiques des protéines tau441 et des protéines tau endogènes sont détectées. Par contre, dans les deux autres fractions, seules les espèces de plus bas poids moléculaire des protéines tau natives et tau441 sont détectées par l'anticorps M19G tandis que les bandes de plus haut poids moléculaire (de 72 et 53 kDa) ne sont pas révélées.

La phosphorylation des protéines tau cellulaires a été analysé dans chacune de ces fractions grâce aux différents anticorps dépendant de la phosphorylation (AD2, 12E8, Tau-1). Tous les anticorps dépendant de la phosphorylation détectent les protéines tau cellulaires dans chacune des trois fractions. L'intensité de l'immunomarquage de chacun de ces anticorps est plus forte dans la fraction cytosolique que dans les deux autres fractions, comme cela a été observé avec l'anticorps M19G. Notons que seul l'anticorps Tau-1 détecte fortement les protéines tau dans la fraction correspondant aux noyaux et aux filaments intermédiaires. La phosphorylation sur les épitopes reconnus par les anticorps AD2 et 12E8 ne semble pas restreindre la répartition des protéines tau cellulaires à un compartiment cellulaire donné. Par contre, la présence de l'épitope Tau-1 semble favoriser la localisation des protéines tau441 dans le compartiment noyau/filaments intermédiaires.

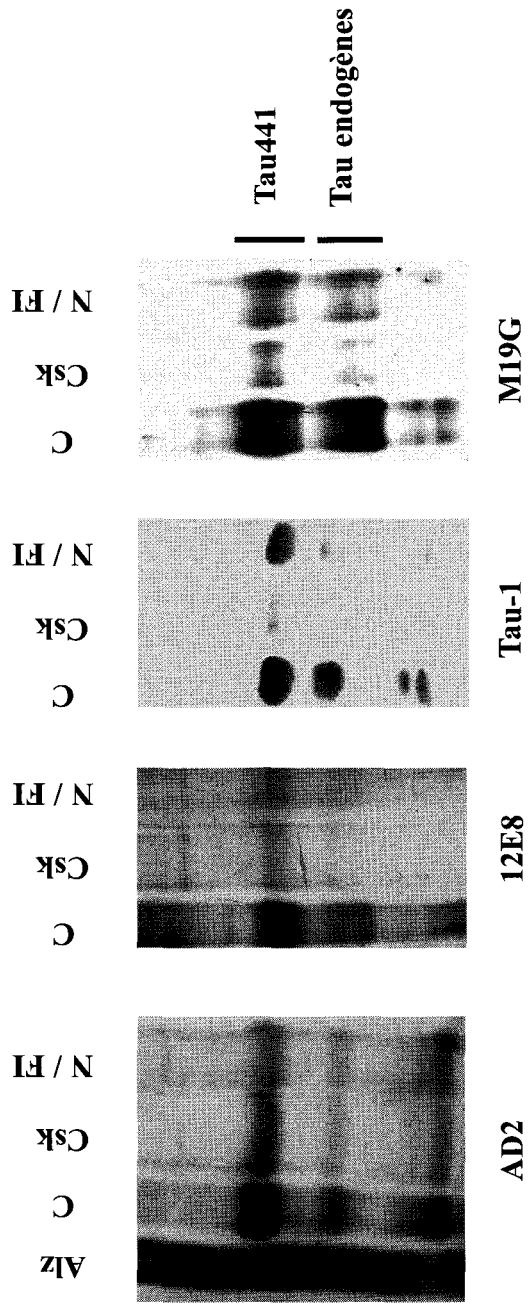
L'efficacité du fractionnement cellulaire a été vérifié en recherchant la présence de différentes protéines caractéristiques de ces fractions. La lamine B est une protéine de 70 kDa trouvée au niveau du feuillet interne de l'enveloppe nucléaire. Nous n'avons détecté cette protéine que dans la fraction nucléaire. La tubuline et l'actine sont, elles, principalement détectées dans la fraction cytosolique mais également dans les fractions correspondant au cytosquelette et au noyau/filaments intermédiaires.

FIGURE 40: Analyse de la répartition des protéines tau après fractionnement cellulaire:

Les protéines cellulaires présentes dans chaque fraction sont séparées sur un gel d'acrylamide SDS-PAGE 7,5% puis analysées par la technique des immunoempreintes après transfert sur membrane de nitrocellulose. Les protéines tau sont détectées par les anticorps M19G, AD2, 12E8, et Tau-1. L'anticorps M19G détecte toutes les protéines tau 441 (de 62 à 72 kDa) et toutes les protéines tau endogènes (de 50 à 53 kDa) dans la fraction cytosolique (C). Il détecte également des protéines tau441 et des protéines tau endogènes plus faiblement dans les fractions cytosquelettique (Csk) et noyau/ filaments intermédiaires (N/FI). Les anticorps dépendant de la phosphorylation, AD2, 12E8 et Tau-1 détectent également des protéines tau dans chacune des deux fractions; l'intensité de l'immunomarquage est la plus forte dans la fraction cytosolique. Notons une immunoréactivité élevée de l'anticorps Tau-1 dans la fraction N/FI également.

Tau-PHF

tau 74
tau 69
tau 64
tau 55



V- 3- 2- Par immunofluorescence

Par la technique d'immunofluorescence, nous avons analysé la localisation des protéines tau441 dans les cellules transfectées (clone 16).

Quand les cellules sont fixées (glutaraldéhyde 0,3%; NP40 0,5%) sans perméabilisation préalable de la membrane plasmique (Triton X-100 0,1%), toutes les protéines tau441, associées ou non aux microtubules, sont visualisées par l'anticorps Tau-E3 qui est dirigé contre l'exon 3 des protéines tau (**FIGURE 41**). Le marquage par ce sérum est très intense et relativement diffus au niveau du cytoplasme cellulaire ainsi qu'au niveau d'extensions neuritiques, lorsqu'elles existent. Par cette technique, il est difficile de clairement détecter la présence de structures précises. Après perméabilisation des membranes cellulaires par du triton (0,1%) avant l'étape de fixation, seules les protéines tau associées aux structures du cytosquelette pourront ainsi être détectées par l'anticorps Tau-E3 (**FIGURE 41**). Cet anticorps révèle très intensément un réseau de filaments épais et denses qui évoquent la présence de faisceaux de microtubules. Ces faisceaux semblent irradier à partir d'un centre, plus fluorescent, qui pourrait être localisé au centre de la cellule. Lorsque les cellules Kelly transfectées présentent un prolongement neuritique, ce centre est localisé au pôle opposé du prolongement et le réseau de filaments se poursuit alors le long de ces prolongements. Enfin, très fréquemment, des faisceaux denses et intenses sont également détectés à la périphérie des cellules et qui irradient, pour certains, du centre plus fluorescent. Ces faisceaux pourraient être associés à la membrane plasmique comme cela a pu être suggéré par Brandt et collaborateurs (1995).

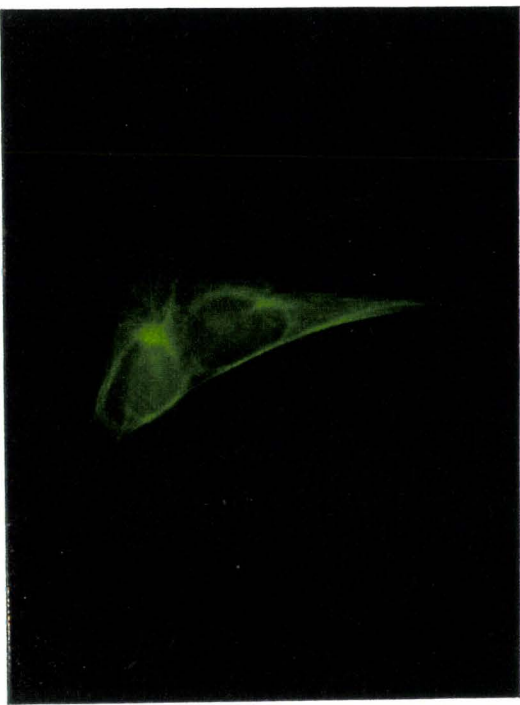
FIGURE 41: Localisation des protéines tau441 dans les cellules transfectées de manière stable, les cellules du clone 16.

Les cellules du clone 16 ont été fixées par 0,3% de Glutaraldéhyde-NP-40 0,5% (A et B) tandis que les cellules C et D ont été perméabilisées (Triton X-100, 0,1%) avant leur fixation. Les protéines tau441 sont ensuite révélées par l'anticorps Tau-E3 spécifique des isoformes possédant l'insert issu de la traduction de l'exon 3. L'immunomarquage est ensuite révélé grâce à un anticorps secondaire couplé à la fluorescéine. Les cellules sont alors examinées au microscope à fluorescence, à l'objectif x 100. Notons le marquage diffus où quelques structures se distinguent légèrement dans les cellules non perméabilisées (A et B) et l'apparition de faisceaux denses et épais après perméabilisation des cellules transfectées par le triton X-100 (C et D).

A



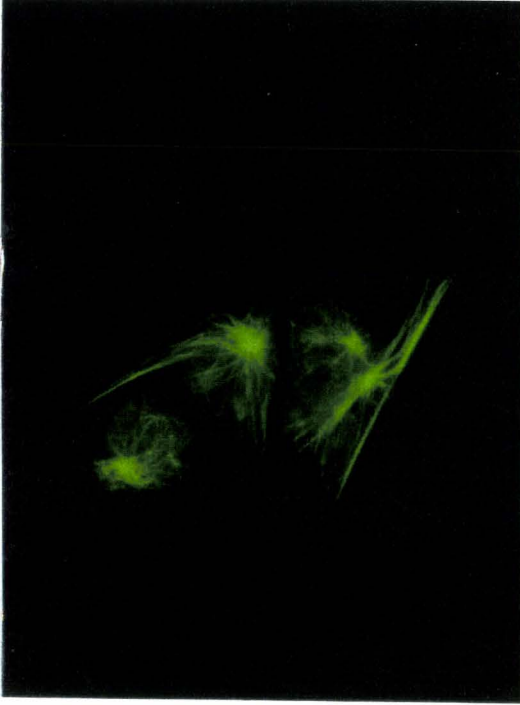
B



C



D



V- 4- Analyse de la solubilité des protéines tau avant et après traitement des cellules par l'acide okadaïque

Les cellules, traitées préalablement 6 heures par l'acide okadaïque (250 nM) ou non, sont décollées et collectées à 4°C. Le lysat cellulaire, obtenu après homogénéisation et éclatement des cellules dans un broyeur de Dounce, est centrifugé à 100 000 x g pendant 45 min. Les extraits cellulaires provenant du matériel soluble et du matériel insoluble, séparés par centrifugation, sont alors analysés sur gel SDS-PAGE 7,5%.

V- 4- 1- Analyse de la solubilité des protéines tau cellulaires avant traitement par l'acide okadaïque

Des quantités similaires de protéines cellulaires totales provenant de chaque fraction sont séparées et leur contenu en protéines tau est analysé par immunoempreinte avec l'anticorps M19G (**FIGURE 42**). Les résultats montrent que toutes les protéines tau441 et les protéines tau endogènes sont détectées par l'anticorps polyclonal M19G dans la fraction soluble. Dans la fraction insoluble, seules les espèces de plus bas poids moléculaire sont détectées par l'anticorps M19G. Ainsi, les trois bandes de 62, 64 et 66 kDa, correspondant aux protéines tau441, et les bandes de 50 et 52 kDa des protéines tau endogènes sont les seules bandes détectées par l'anticorps M19G dans la fraction insoluble. Cette fraction est constituée de l'ensemble du matériel insoluble présent dans la cellule qui comprend le noyau, les membranes ainsi que les complexes insolubles tel que le cytosquelette. La quantification de l'immunoréactivité globale des différentes protéines tau441 présentes dans chacune de ces deux fractions montre que 55% et 45% des protéines tau441 totales sont réparties respectivement dans les fractions soluble et insoluble. Cette répartition est approximativement similaire pour les protéines tau endogènes puisque 60% des protéines tau endogènes détectées par l'anticorps M19G sont

FIGURE 42: Analyse de la solubilité des protéines tau cellulaires avant et après traitement des cellules par l'acide okadaïque

L'ultracentrifugation du lysat cellulaire, permet de séparer les protéines tau insolubles (culot) des protéines tau solubles (surnageant). Le surnageant correspond au cytosol. Les protéines tau de chacune des fractions sont analysées par la technique des immunoempreintes avec les anticorps suivants: M19G, AD2, Tau-1, 12E8 et AP422. L'anticorps M19G détecte les protéines tau441 et les protéines tau endogènes dans les fractions solubles (S) et insolubles (I). Les anticorps AD2 et 12E8 détectent plus fortement les protéines tau présentes dans la fraction soluble tandis que l'anticorps Tau-1 détecte plus fortement les protéines dans la fraction insoluble. Par contre l'anticorps AP422 ne détecte aucune bande. Après traitement des cellules par l'AO (+), l'immunoréactivité des anticorps AD2 et 12E8 augmente mais la répartition des protéines immunomarquées reste similaire à celle trouvée avant le traitement. L'anticorps AP422 détecte à présent une bande de 74 kDa dans la fraction soluble. Par contre, une exposition fortement prolongée est nécessaire pour observer une immunoréactivité avec l'anticorps Tau-1. Dans ces conditions, il détecte toujours plus fortement les protéines tau dans la fraction insoluble.

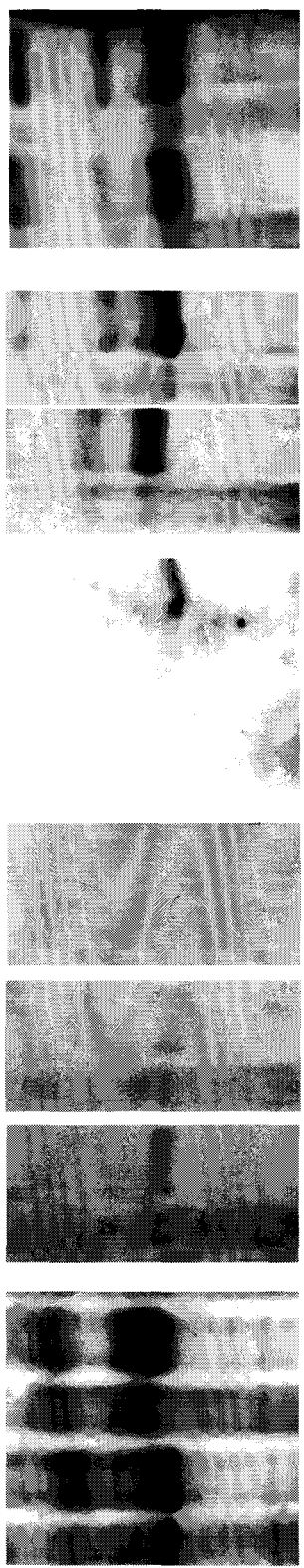
AO

+ - + - + - + - +

Alz

S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |

3u 74
3u 69
3u 64
3u 55



Tau 441

Tau endogènes

AD2

12E8

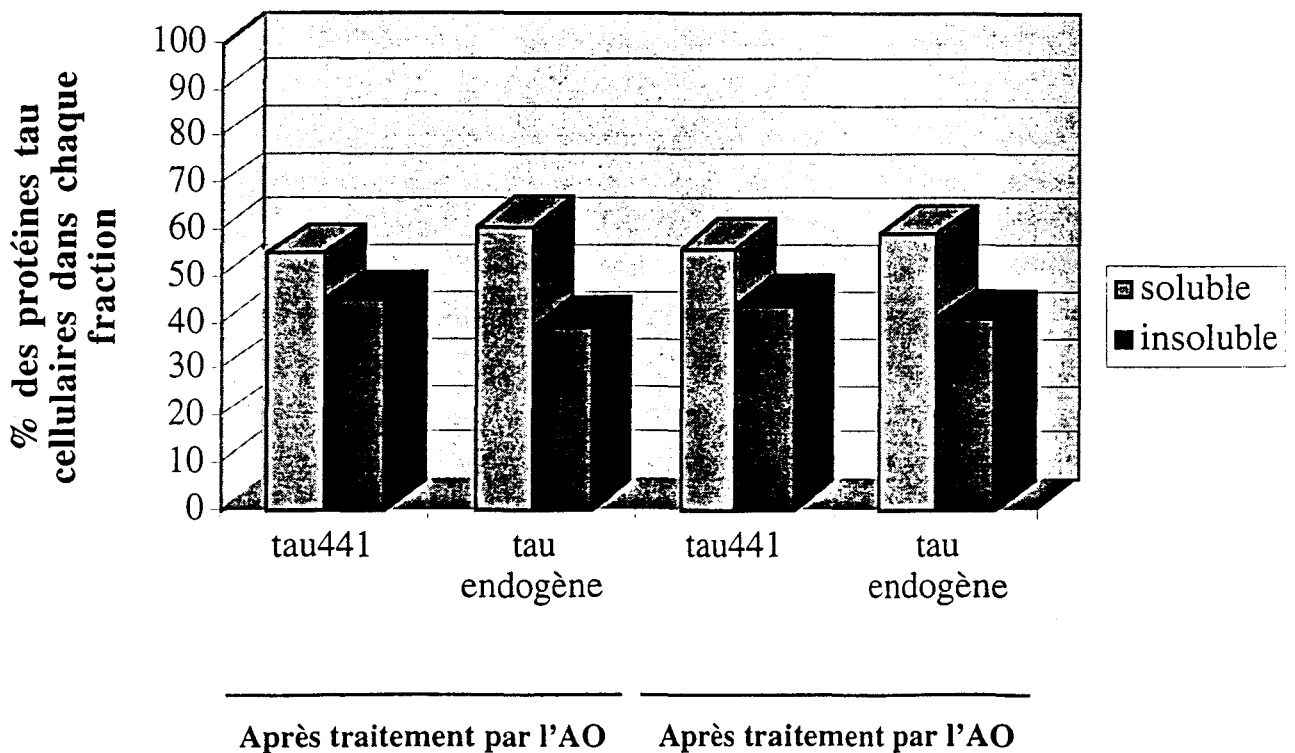
AP422

Tau-1

M19G

retrouvées dans la fraction soluble. La répartition des protéines tau441 dans ces deux fractions, en fonction de leur état de phosphorylation, a été analysée grâce à différents anticorps dépendant de la phosphorylation (AD2, Tau-1, 12E8 et AP422) (FIGURE 42).

L'étude avec les anticorps dépendant de la phosphorylation montre que les formes phosphorylées, des protéines tau441 et tau endogènes, reconnues par les anticorps 12E8 et AD2 sont majoritairement détectées dans la fraction soluble. Des bandes de poids moléculaire similaire à ces bandes sont également détectées, mais faiblement, dans la fraction insoluble. Par contre, l'anticorps Tau-1 détecte les mêmes bandes dans les deux fractions mais plus fortement les protéines tau cellulaires présentes dans la fraction insoluble (60% de l'immunoréactivité totale de Tau-1). L'anticorps AP422 ne détecte aucune bande.



Histogramme 4: Répartition des protéines tau endogènes et tau441 selon leur solubilité avant et après traitement des cellules par l'acide okadaïque.

V- 4- 2- Analyse de la solubilité des protéines tau cellulaires après traitement par l'acide okadaïque

Les cellules soumises à l'action de l'acide okadaïque sont traitées comme précédemment et les protéines sont analysées par la technique des immunoempreintes après séparation sur gel SDS-PAGE 7,5%. Le traitement par l'AO ne modifie pas la répartition des protéines tau441 et endogènes qui sont toujours majoritairement détectées par M19G dans la fraction soluble (**FIGURE 42**). De plus, bien que l'immunomarquage des protéines tau cellulaires par les anticorps AD2 et 12E8, après ce traitement, soit augmenté, ces anticorps reconnaissent toujours préférentiellement les espèces présentes dans la fraction soluble. L'anticorps AP422 détecte uniquement les espèces électrophorétiques de 74 kDa dans la fraction soluble. Ces espèces correspondent aux protéines tau441 hyperphosphorylées. Cet anticorps ne détecte aucune bande correspondant aux protéines tau endogènes. L'absence de détection de ces protéines par l'anticorps AP422 résulte probablement de la faible expression des protéines tau endogènes par rapport aux protéines tau441 surexprimées. Parallèlement, l'anticorps Tau-1 ne détecte aucune protéine tau cellulaire après traitement par l'acide okadaïque confirmant la très nette diminution de son immunomarquage. Une immunoréactivité faible des protéines tau cellulaires est néanmoins détectée lorsque l'exposition du film est prolongée durant toute une nuit. Dans ce cas, l'immunoréactivité des espèces détectées dans chaque fraction montre une répartition similaire.

DISCUSSION

Dans la maladie d'Alzheimer (MA), la phosphorylation des protéines tau est fortement augmentée. Il a été suggéré que cette hyperphosphorylation précéderait l'agrégation des protéines tau sous la forme de PHFs. L'hyperphosphorylation des protéines tau provoquerait leur dissociation des microtubules conduisant, à terme, à la perte du transport axonal puis à la mort cellulaire. A l'heure actuelle, il n'existe toujours pas de bon modèle animal de la MA. C'est pourquoi, une meilleure compréhension des évènements de phosphorylation et d'hyperphosphorylation des protéines tau dans un modèle cellulaire représente une première étape pour l'étude des mécanismes aboutissant à la dégénérescence neuronale. Bien que la présence de protéines tau phosphorylées ou non ait été observée également dans les inclusions gliales d'autres maladies neurodégénératives (Buée-Scherrer *et al.*, 1996b; Oyanagi *et al.*, 1997), ces protéines tau hyperphosphorylées sont principalement retrouvées dans les neurones. Il apparaissait donc très important, au commencement de ce travail, d'utiliser de cellules de type neuronal pour l'élaboration d'un modèle cellulaire capable de reproduire à la fois une phosphorylation de type normal des protéines tau et une hyperphosphorylation de type Alzheimer. Les cultures primaires de neurones, présentant des caractéristiques proches du système nerveux central foetal, ont été utilisées dans la littérature, notamment pour l'étude de la phosphorylation des protéines tau. Néanmoins ces cellules sont d'origine animale et non humaine alors que la maladie d'Alzheimer est une maladie spécifique à l'homme. De plus, ces cellules survivent difficilement *in vitro*. Il nous semblait donc important de travailler sur une lignée cellulaire de type neuronal et humaine capable de croître dans les conditions de culture *in vitro*. Les lignées cellulaires SY 5Y et Kelly que nous avons étudiées sont des cellules de ce type. Ce sont des cellules de neuroblastomes humains et sont donc issues de tumeur développées dans le système nerveux périphérique (SNP). Elles sont relativement indifférenciées

comme nous le confirmons par l'expression majeure des protéines tau trouvées dans le cerveau de fœtus. De plus, bien que ces cellules soient d'origine sympathique, elles n'expriment pas les protéines tau de haut poids moléculaire comme nous l'avons montré par l'absence de bandes détectées par la technique des immunoempreintes et l'absence de produits contenant les exons 4A et 6 amplifiés par RT-PCR. Ces résultats pourraient suggérer que ces 2 lignées cellulaires soient à un stade très embryonnaire ou à un stade ne permettant pas de différencier les cellules neuronales du système nerveux central des cellules du SNP. Pourtant, nous avons mis en évidence dans ces cellules SY 5Y et Kelly, la synthèse du triplet des neurofilaments (NF-L, NF-M et NF-H) qui sont plus caractéristiques de cellules neuronales différenciées puisque ces protéines n'apparaissent que tardivement dans neurogénèse, lorsque les neurones ont établi leurs synapses (Trojanowski et al., 1986; Shea et al., 1991). Avec les données dont nous disposons, il est difficile de déterminer si les cellules SY 5Y et Kelly présentent un caractère neuronal caractéristique du SNC ou du SNP ou si ces cellules sont à un stade intermédiaire de différenciation entre ces 2 systèmes nerveux. L'analyse de la présence ou non de la vimentine, caractéristique des stades précoces de la neurogénèse, et/ou de la périphérine, caractéristique du système nerveux (Portier et al., 1984), devrait nous permettre d'affiner la caractérisation de nos lignées cellulaires. Enfin, Les cellules NT2N, nouvellement décrites, pourraient représenter une alternative de choix puisque ces cellules sont d'origine humaine et présente une morphologie de neurones post-mitotiques lorsqu'elles sont différenciées.

- Passage d'une phosphorylation de type normal à une phosphorylation de type Alzheimer après traitement des cellules de neuroblastome par l'acide okadaïque (AO)

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes de phosphorylation des protéines tau, nous avons étudié l'état de phosphorylation de ces protéines au sein de deux lignées cellulaires de type neuronal. Les deux lignées cellulaires SY 5Y et Kelly étudiées proviennent de neuroblastome et donc de tissu neuronal sympathique (périphérique). Elles synthétisent la même isoforme des protéines tau qui est couramment appelée isoforme foetale. L'analyse de l'état de phosphorylation des protéines tau cellulaires par immunoempreintes n'a révélée aucune phosphorylation préférentielle au sein d'une des deux lignées cellulaires, SY 5Y et Kelly, aux sites étudiés. Il s'agit des résidus Thr181, Ser202/Thr205, Thr231, Ser262/356 et Ser 396/404 respectivement reconnus par les anticorps AT270, AT8, AT180, 12E8 et AD2 lorsqu'ils sont phosphorylés. Tous ces sites sont également phosphorylés sur les protéines tau biopsiques extraites de tissu cérébral normal et sur les protéines tau-PHF extraites de tissu cérébral Alzheimer, mais à niveau plus élevé pour ces dernières (Matsuo *et al.*, 1994; Buée-Scherrer *et al.*, 1996a). Les protéines tau cellulaires sont aussi reconnues par l'anticorps Tau-1, qui détecte la région des protéines tau s'étendant des résidus 189 à 207, lorsque ces résidus ne sont pas phosphorylés. Cet épitope est caractéristique des protéines tau normales (autopsiques et biopsiques) mais il est absent des protéines tau-PHF.

L'absence de l'expression d'isoformes adultes au sein de ces lignées cellulaires, même après différenciation, nous a conduit à transfecter les cellules Kelly par l'isoforme la plus longue des protéines tau, l'isoforme tau441. L'analyse de l'état de phosphorylation de ces protéines tau441 transfectées, au sein des cellules Kelly, montre qu'elles peuvent être phosphorylées sur les résidus Thr181 (AT270), Ser202/Thr205 (AT8), Thr231 (AT180), Ser262/356 (12E8) et Ser 396/404 (AD2) comme les protéines tau endogènes.

Ainsi, dans les cellules Kelly transfectées, les deux isoformes des protéines tau, l'isoforme fœtale (endogène) et l'isoforme tau441, ne se distinguent pas l'une de l'autre par une phosphorylation préférentielle sur l'un des sites de phosphorylation que nous avons étudié.

Comme cela avait été préalablement décrit par Sautière et collaborateurs (1993, 1994), le traitement des cellules par l'acide okadaïque se traduit par une modification morphologique radicale des cellules qui finissent par s'arrondir et se décrocher de leur support. Ces modifications morphologiques sont accompagnées d'une hyperphosphorylation des protéines tau dans les deux lignées cellulaires transfectées ou non par l'isoforme adulte. Au cours de notre étude, nous avons montré que cette hyperphosphorylation se traduit par:

(1) une réduction de la mobilité électrophorétique des protéines tau441 et des protéines tau synthétisées de manière constitutive par les deux lignées cellulaires sur gel SDS-PAGE. Ces protéines tau441 migrent alors de manière similaire à la bande de 74 kDa, faiblement détectée dans les homogénats de tissu cérébral Alzheimer; tandis que les protéines tau endogènes migrent de manière similaire à la bande de 55 kDa. La migration similaire des protéines tau endogènes et tau441 avec les protéines tau-PHF confirment la correspondance entre les différentes isoformes tau et les protéines tau-PHF proposée par d'autres auteurs (Mulot *et al.*, 1994; Sergeant *et al.*, 1997).

(2) une modification de l'antigénicité de ces protéines tau cellulaires hyperphosphorylées. Elle se traduit par: (a) une augmentation des épitopes phosphorylés détectés par les anticorps AD2, AT8, AT270, AT180 et 12E8, qui sont communs aux protéines tau trouvées dans les cerveaux de fœtus, d'adultes et d'Alzheimer; (b) la perte de la détection de ces espèces par l'anticorps Tau-1, spécifique des protéines tau normales (autopsiques et biopsiques); (c) la détection par les anticorps spécifiques des protéines tau-PHF (AT10 et AP422).

(3) une acidification des protéines cellulaires. Les protéines tau441 ainsi que les protéines tau endogènes sont séparées entre des valeurs de pH plus acides qu'avant traitement des cellules par l'AO.

L'analyse des protéines tau hyperphosphorylées dans les cellules SY 5Y non transfectées montre la présence d'une bande supplémentaire à la bande de 55 kDa. En effet, lorsque la quantité d'extraits cellulaires déposée est plus importante, le traitement des cellules SY 5Y conduit à l'apparition d'une bande supplémentaire qui présente un poids moléculaire apparent identique à celui de la bande de 64 kDa des tau-PHF. D'après les résultats de Goedert et collaborateurs (1992c), la bande de 64 kDa résulterait de l'hyperphosphorylation des protéines tau issues de transcrits comprenant l'exon 2 associé ou non à l'exon 10. Par contre, les expériences de Mulot et collaborateurs (1994) tendent à montrer que cette bande résultait de l'hyperphosphorylation d'isoformes comprenant un seul insert, que ce soit l'insert amino-terminal (issu de la traduction de l'exon 2) ou l'insert carboxy-terminal (issu de la traduction de l'exon 10). L'analyse des transcrits par RT-PCR a montré la présence très faible de transcrits tau possédant l'exon 2. Puisqu'aucune bande correspondant à cette isoforme n'est amplifiée lors de la première réaction de PCR, le traitement par l'acide okadaïque ne semble pas augmenter l'expression de cette isoforme de manière sensible. Par contre, le transcrit avec l'exon 10, bien que faiblement représenté par rapport aux transcrits sans l'exon 10, est détectable. La présence de la faible bande de 64 kDa pourrait donc résulter soit de l'hyperphosphorylation des isoformes résultant des transcrits tau contenant l'exon 10 soit d'une hyperphosphorylation des protéines tau cellulaires de 55 kDa de type fœtal.

Cette dernière hypothèse est envisageable puisque l'hyperphosphorylation des protéines tau cellulaires, induite par le traitement des cellules par l'AO, semble même supérieure à celle décrite pour les protéines tau-PHF par Sergeant et collaborateurs (1997). En effet, les espèces les plus hyperphosphorylées des protéines tau441 et des protéines tau

endogènes ont un pI plus acide que les protéines tau-PHF correspondantes (tau55: 5,8; tau74: 6,1). Cette acidification des protéines tau cellulaires hyperphosphorylées signifierait que le traitement par l'acide okadaïque induit une hyperphosphorylation supérieure à celle observée dans la maladie d'Alzheimer. Les protéines phosphatases, dont l'activité est faible dans le cerveau de patients Alzheimer (Gong *et al.*, 1993, 1995), pourraient déphosphoryler partiellement les protéines tau-PHF lors du délai post-mortem ou même au sein du cerveau avant la mort du patient. Cette déphosphorylation pourrait se produire sur les domaines des protéines tau, qui sont agrégées sous la forme de PHF, accessibles aux protéases; c'est-à-dire les extrémités amino- et carboxy-terminales. Le domaine amino-terminal plus long de l'isoforme tau441 pourrait constituer une région cible pour les protéines phosphatases. Cette déphosphorylation pourrait expliquer que la différence de pI entre les variants les plus acides des protéines tau441 hyperphosphorylées dans les cellules et les protéines tau74 les plus acides des protéines tau PHF est supérieure à celle rencontrée entre les protéines tau endogènes hyperphosphorylées et les protéines tau55 des protéines tau-PHF.

Conclusion:

Dans les cellules Kelly, les protéines tau441 transfectées et les protéines tau endogènes (l'isoforme la plus courte des protéines tau) semblent donc phosphorylées de manière similaire aux protéines tau normales. Après traitement des cellules par l'acide okadaïque, ces protéines tau cellulaire présentent des caractéristiques similaires aux protéines tau55 et tau74 trouvées dans le cerveau de patient Alzheimer.

- Les protéines tau cellulaires constituent une population hétérogène

Nous avons pu constater que l'expression d'un seul ADNc conduit à plusieurs espèces électrophorétiques, comme cela avait été observé dans différentes lignées

cellulaires d'origine non neuronale, ainsi qu'à un nombre important de variants en électrophorèse bi-dimensionnelle. En effet, par électrophorèses mono- et bi-dimensionnelle, nous avons montré que les protéines tau constituaient une famille de variants qui se distinguent entre eux par leur degré de phosphorylation et la présence ou non de différents épitopes phosphorylés. L'augmentation du nombre de phosphate par molécule s'accompagne d'une acidification de la protéine qui peut être accompagnée ou non d'un changement du poids moléculaire apparent. Les variants les moins phosphorylés ont un poids moléculaire apparent bas et sont reconnus par l'anticorps monoclonal Tau-1, qui détecte la région des protéines tau s'étendant des résidus 189 à 207 lorsque les résidus ne sont pas phosphorylés. Cet anticorps est spécifique des protéines tau normales issues de tissu cérébral autopsique ou biopsique. Par contre, les variants tau de plus haut poids moléculaire sont les seuls à être détectés par l'anticorps AD2; ces espèces semblent représenter les protéines les plus phosphorylées.

Comme cela avait été suggéré dès 1987 par Baudier et collaborateurs, deux types de phosphorylation sont rencontrés sur les protéines tau. La phosphorylation, dite de type I, conduit à un ralentissement de la mobilité électrophorétique des protéines tau probablement dû à un changement conformationnel de la molécule (Baudier et Cole, 1987) tandis que la phosphorylation, dite de type II, ne modifie pas la mobilité des protéines tau sur gel SDS-PAGE (Baudier *et al.*, 1987). Nous avons pu analyser, après électrophorèse bi-dimensionnelle, l'implication des résidus Ser396/404, Ser262 et Ser199/202 sur le ralentissement de la mobilité électrophorétique des protéines tau441. En électrophorèse bi-dimensionnelle, les protéines tau441 migrent sous la forme de deux grands groupes de variants isoélectriques de poids moléculaires différents. Dans notre étude, nous avons nommé ces deux groupes: tau A et tau B. La phosphorylation des Ser 396/404, modifiant la conformation des protéines tau, semblent directement impliquées dans le ralentissement de la mobilité électrophorétique des variants tau441. En effet, l'anticorps AD2, dirigé contre ces résidus, détecte tous les variants du groupe tau A quelque soit leur pI. Par

contre, aucun variant du groupe tau B n'est détecté même pour des valeurs de pI similaires aux variants tau A. Nous confirmons donc dans un modèle cellulaire que la phosphorylation des résidus Ser396/404 modifie effectivement la migration électrophorétique, comme cela avait été rapporté dans des études de phosphorylation *in vitro* utilisant à la fois des protéines tau et des extraits kinasiques purifiés (Gustke *et al.*, 1992; Mandelkow *et al.*, 1992; Biernat *et al.*, 1993). Ces résidus appartiendraient aux phosphorylations de type I décrits par Baudier et Cole (1987). Par contre, ces résultats diffèrent de ceux obtenus par Seubert et collaborateurs (1995) qui ne détectaient pas de modification de la mobilité des protéines tau phosphorylées sur la Ser396. La phosphorylation des résidus Ser262 ou des résidus Ser199/202 ne semble pas impliquée dans la modification de la migration électrophorétique des protéines tau441 et appartiendrait plutôt à la phosphorylation de type II, déterminée par Baudier et collaborateurs (1987).

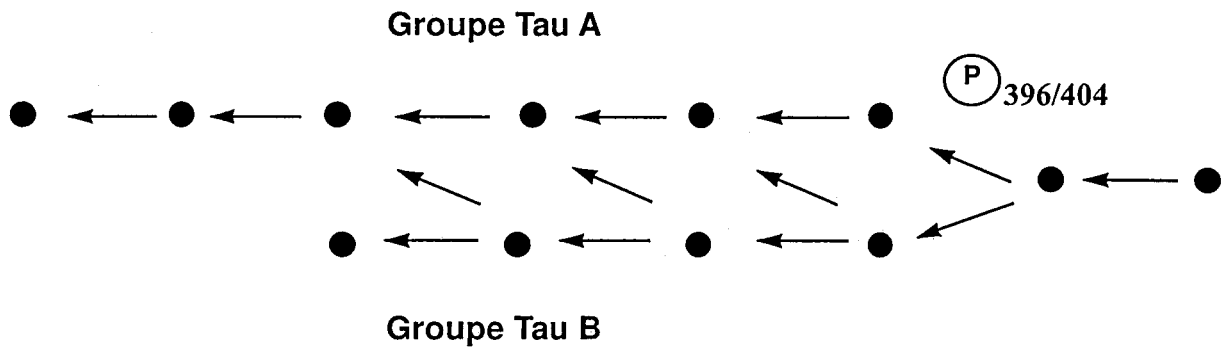
Le traitement des cellules par l'acide okadaïque a diminué mais pas éliminé l'hétérogénéité des protéines tau441, qui sont toujours séparées après électrophorèse bi-dimensionnelle en deux groupes de variants, les groupes tau A et tau B. Cette hétérogénéité résulte de différents états de phosphorylation de la même protéine. En effet, tandis que l'anticorps 12E8, dirigé contre la Ser262, reconnaît tous les spots de tau441, indépendamment de leur point isoélectrique et de leur poids moléculaire, l'anticorps AD2 ne reconnaît que les variants de plus haut poids moléculaire. Ce résultat confirme l'implication des Ser396 et/ou Ser404 dans l'augmentation du poids moléculaire des protéines tau. Par contre, l'anticorps AP422 détectait en plus des espèces détectées par l'AD2 les variants de plus haut poids moléculaire du groupe B. La détection faible par l'anticorps Tau-1 d'espèces migrant plus rapidement que les espèces de 74 kDa après électrophorèse mono-dimensionnelle, suggère que l'hétérogénéité des protéines tau441 semble également maintenue dans les cellules exprimant de manière stable l'isoforme tau441. Plusieurs hypothèses, combinées ou non entre elles, permettraient d'expliquer le

maintien de cette hétérogénéité après traitement des cellules par l'AO. Elle pourrait résulter du taux d'expression très élevé des protéines tau441 qui entraînerait la saturation des kinases cellulaires actives durant le traitement des cellules par l'AO. La présence de variants tau441 non phosphorylés sur les résidus Ser396/Ser404 pourrait résulter de l'activité de la protéine phosphatase 2B, ou calcineurine. En effet, cette protéine phosphatase déphosphoryle efficacement ces résidus dans des cultures primaires de neurones corticaux (Saito *et al.*, 1995) et n'est que très partiellement inhibée par l'acide okadaïque.

L'hétérogénéité électrophorétique des protéines tau441 phosphorylées ou hyperphosphorylées est apparemment supérieure à celle observée pour les protéines tau endogènes. Ceci pourrait être due à des modifications conformationnelles plus nombreuses sur les protéines tau441: l'ajout des inserts amino- et carboxy-terminaux pourraient être capables d'influencer la conformation de ces protéines tau. De manière alternative, d'autres résidus phosphorylés uniquement sur les protéines tau441 pourraient également être responsables de ces modifications conformationnelles, tout en n'augmentant pas le taux global de phosphorylation des protéines tau441. Dans ce cas, ces événements pourraient être localisés sur les résidus Ser ou Thr présents dans les inserts supplémentaires dont la phosphorylation a été précédemment décrite. Il s'agit de la Ser46, localisée dans le premier insert amino-terminal, ou les Ser 285 et 305 localisées dans l'insert carboxy-terminal (Brion *et al.*, 1991, 1993; Gustke *et al.*, 1992; Paudel *et al.*, 1997). D'autre part, certains résidus communs aux deux isoformes pourraient n'être accessibles aux protéines kinases cellulaires que grâce à la conformation spécifique adoptée par la protéine tau441 résultant de l'ajout des inserts.

L'analyse des variants tau441 différemment détectés par les anticorps AD2, Tau-1 et 12E8 suggère l'existence d'une cascade plus ou moins précise d'événements de

Première hypothèse:



Deuxième hypothèse:

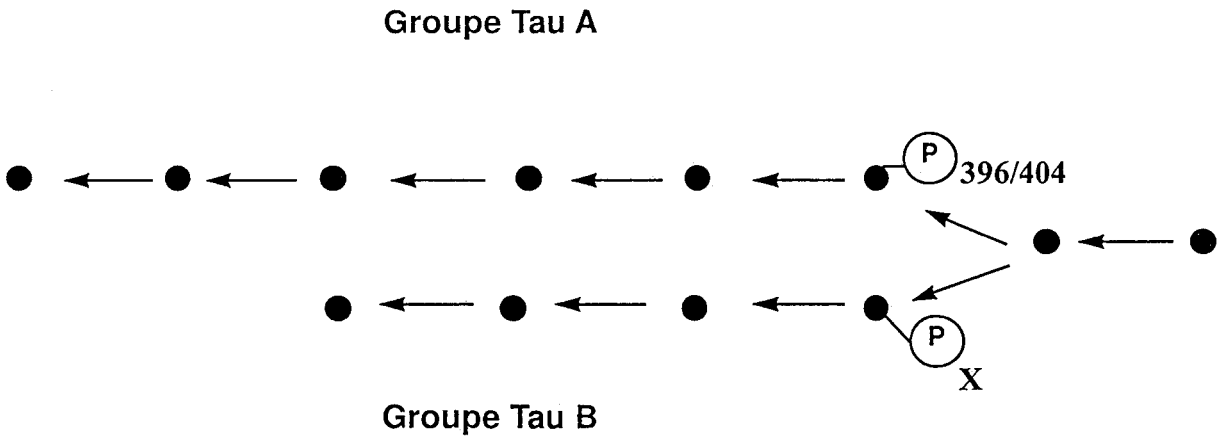


Figure 43: Représentation schématique des 2 hypothèses proposées pour expliquer la présence de 2 groupes de protéines tau.

phosphorylation. Ainsi, la reconnaissance des résidus Ser396/Ser404 par les protéines kinases cellulaires nécessiterait la phosphorylation au préalable d'autres résidus, puisque l'AD2 ne marque pas les variants isoélectriques tau441 les plus basiques révélés par les anticorps polyclonaux, mais uniquement les variants du groupe tau A. D'autre part, la perte du marquage par l'anticorps Tau-1, qui indique une phosphorylation sur la Ser199 et/ou la Ser202, des variants les plus acides et des variants de plus haut poids moléculaire des protéines tau441, suggère que pour la phosphorylation maximale des protéines tau441 exige que les résidus Ser199/202 soient phosphorylés. Contrairement à ces différents résidus seryl, la Ser262 peut être ou non rapidement phosphorylée dans les cellules Kelly puisque tous les variants sont reconnus par l'anticorps 12E8. Les différents immunomarquages obtenus avec ces anticorps dépendant de la phosphorylation suggère que la phosphorylation des résidus Ser262/356 et Ser199/202 précéderait donc la phosphorylation des Ser396/404. Néanmoins, il est difficile d'établir un ordre de phosphorylation entre les résidus Ser262/356 et Ser199/202 puisque l'anticorps Tau-1 ne détecte les variants que lorsqu'ils sont déphosphorylés.

Ainsi, la présence des deux groupes de variants, tau A et tau B, différemment reconnus par les anticorps dépendant de la phosphorylation soulève deux hypothèses concernant une éventuelle régulation de la phosphorylation cellulaire (**FIGURE 43**). Dans notre première hypothèse, chaque étape de phosphorylation conduirait à la capacité de 2, 3 ou n sites d'être phosphorylés à l'étape suivante. Dans ce cas, l'ordre de phosphorylation ne serait pas clairement établi et chaque addition de groupement phosphate conduit à une acidification de la molécule qui peut être ou non accompagnée d'une augmentation du poids moléculaire. Les étapes successives de phosphorylation conduiraient alors au passage des variants du groupe tau B vers le groupe tau A (**FIGURE 43**). Dans notre deuxième hypothèse, au moins deux voies différentes de phosphorylation pourraient coexister dans les cellules. Une première voie conduirait aux protéines tau441 du groupe tau B et une deuxième voie, à celles du groupe tau A. Dans ce

cas, la phosphorylation sur les résidus Ser396/404 représenterait un évènement clé permettant d'aiguiller la phosphorylation des protéines tau dans la voie A tandis que la phosphorylation sur un résidu non identifié, le résidu " X " conduirait à la formation du groupe tau B. Après phosphorylation des protéines tau441 sur ce résidu " X ", les protéines présenterait une modification conformationnelle telle que les résidus Ser396/404 ne pourraient plus être accessibles aux protéines kinases (**FIGURE 43**). Cette hypothèse semble plausible puisque Singh et collaborateurs (1995) montraient, par des expériences de phosphorylation *in vitro*, que la préphosphorylation des protéines tau par certaines protéines kinases inhibait l'activité d'autres protéines kinases ensuite. De plus, dans notre système cellulaire d'hyperphosphorylation, les protéines tau441 hyperphosphorylées sont toujours séparées en deux groupes de variants, les groupes tau A et tau B, par électrophorèse bi-dimensionnelle. Cette hétérogénéité pourrait résulter de l'hyperphosphorylation des protéines des groupes tau A et tau B issues des cascades différentes de phosphorylation. Dans ce cas, le traitement par l'acide okadaïque ne bouleverserait pas l'ordre de ces cascades.

Conclusion:

Les protéines tau cellulaires constituent une population hétérogène de protéines résultant de différents évènements de phosphorylation. Par séparation bi-dimensionnelle, nous montrons la présence d'un très grand nombre de variants de point isoélectrique et de poids moléculaire différents dont le profil électrophorétique suggère la présence d'une cascade de phosphorylation plus ou moins ordonnée au sein de ce modèle cellulaire. Les résidus Ser396 et/ou 404 pourraient être directement impliquée(s) dans l'augmentation du poids moléculaire apparent en gel SDS-PAGE.

- Différence de sensibilité des sites phosphorylés à l'action des phosphatases endogènes

Les cellules renferment une activité phosphatasique endogène capable de déphosphoryler les protéines tau comme les protéines phosphatases présentes dans le cerveau adulte. Les protéines phosphatases cellulaires déphosphorylent efficacement les protéines tau les résidus Ser396/Ser404 puisque ces épitopes disparaissent après 5 min d'incubation du lysat cellulaire à 37°C. Par contre, le(s) groupement(s) phosphate(s) présent(s) sur les résidus Ser262/356, reconnus par l'anticorps 12E8, semble plus résistant à l'activité phosphatasique active dans le lysat cellulaire: un immunomarquage équivalent à 30% du marquage initial persiste après 30 min d'incubation. Ce résultat diffère de l'activité phosphatasique présente dans le cerveau adulte qui déphosphoryle efficacement ces deux épitopes mais plus rapidement les résidus Ser262/356 que les résidus Ser396/404 (Matsuo *et al.*, 1994; Seubert *et al.*, 1995; Buée-Scherrer *et al.*, 1996a).

- Influence de la nature de l'isoforme sur son état de phosphorylation

Les profils électrophorétiques des protéines tau endogènes, obtenus après séparation bi-dimensionnelle, sont similaires dans les cellules Kelly natives ou transfectées. La transfection ne semble donc pas modifier le taux de phosphorylation des protéines tau endogènes, nous permettant donc de comparer les protéines tau441 aux protéines tau endogènes extraites des cellules Kelly après transfection. Dans ces cellules, les deux isoformes ne peuvent être distinguées l'une de l'autre par une phosphorylation préférentielle sur l'un des sites que nous avons étudiés (Thr181 (AT270), Ser202/Thr205 (AT8), Thr231 (AT180), Ser262/356 (12E8) et Ser396/404 (AD2)). Par contre, en électrophorèse bi-dimensionnelle, les protéines tau441 présentent des variants

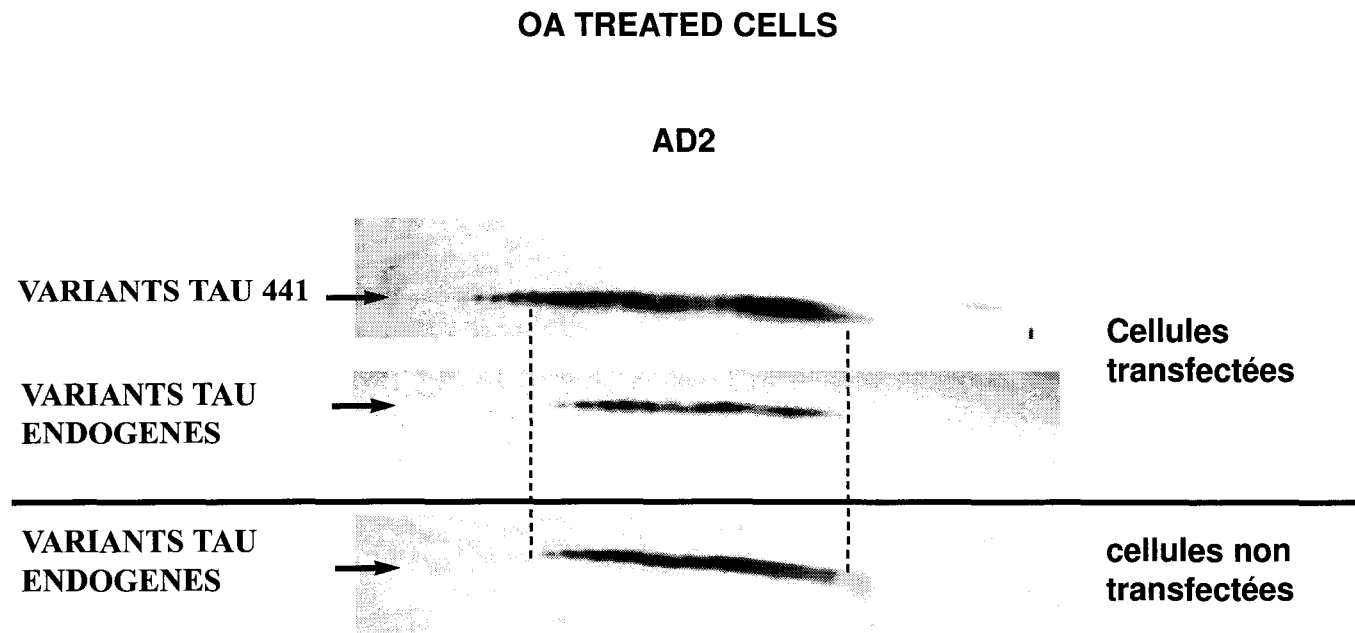


Figure 44: Comparaison des profils électrophorétiques des protéines tau441 et tau endogènes hyperphosphorylées après traitement des cellules transfectées ou non. Les profils sont alignés au niveau de leurs variants les plus basiques.

isoélectriques plus acides que les protéines tau endogènes. En effet, la différence de pI observée entre les variants les plus acides des deux isoformes, est d'approximativement une unité pH. Néanmoins, il est difficile de conclure quant au rôle exact de la phosphorylation et/ou de la présence des inserts amino-terminaux acides sur cette acidité plus élevée de l'isoforme tau441 par rapport à l'isoforme fœtale.

Après traitement des cellules par l'AO, les protéines tau441 présentent également une acidité plus importante que les protéines tau endogènes suggérant l'existence de sites de phosphorylation plus nombreux sur l'isoforme la plus longue. Afin de tester cette hypothèse, nous avons comparé le profil électrophorétique des protéines tau441 hyperphosphorylées extraites des cellules Kelly transfectées transitoirement à celui des protéines tau hyperphosphorylées synthétisées par les cellules Kelly non transfectées. L'utilisation des cellules Kelly non transfectées et traitées par l'AO permet de déposer d'avantage de protéines tau endogènes, tout en maintenant une bonne résolution, ce qui n'est pas possible avec les cellules transfectées. Ceci avait pour but de mettre en évidence les variants mineurs des protéines tau endogènes. La comparaison des profils, après l'alignement des variants les plus basiques des deux isoformes, suggère qu'il existe au moins trois événements supplémentaires de phosphorylation sur l'isoforme la plus longue par rapport à l'isoforme la plus courte des protéines tau (**FIGURE 44**). Ils pourraient être localisés sur les résidus sérine et/ou thréonine présents dans les inserts supplémentaires. Ils peuvent également être localisés en dehors de ces inserts, au niveau de résidus communs aux deux isoformes mais uniquement accessibles aux protéines kinases lorsque la conformation des protéines tau est modifiée par l'ajout des inserts. Cependant, nous ne pouvons pas, malgré tout, exclure l'absence de détection de variants mineurs plus acides des protéines tau endogènes du fait du taux d'expression moins élevé de cette isoforme par rapport à l'isoforme tau441 dans les cellules Kelly transfectées transitoirement.

Conclusion:

Les protéines tau441 et tau endogènes semblent être phosphorylées à un taux similaire dans les cellules Kelly. Par contre, les isoformes les plus longues subirait quelques évènements supplémentaires de phosphorylation après traitement des cellules par l'AO.

- Influence de l'apolipoprotéine E sur l'état de phosphorylation et d'hyperphosphorylation des protéines tau cellulaires

Les cellules SY 5Y et Kelly synthétisent différentes espèces d'apo E: seule l'isoforme apo E3 est exprimée par les cellules SY 5Y tandis que les cellules Kelly synthétisent les isoformes E3 et E4. L'hypothèse d'un rôle protecteur de l'isoforme apo E3 sur la phosphorylation des protéines tau a été émise après des études *in vitro* utilisant des protéines purifiées. Puisque les deux lignées de neuroblastomes synthétisent ces deux protéines, l'influence de l'apo E sur la phosphorylation des protéines tau peut être recherchée. L'analyse des protéines tau cellulaires phosphorylées normalement ou hyperphosphorylées après traitement des cellules par l'acide okadaïque montre une immunoréactivité des anticorps dépendant de la phosphorylation pour les protéines tau synthétisées par les deux lignées cellulaires. Par conséquent, l'apo E3 exprimée dans les cellules SY-5Y ne semble pas protéger plus efficacement les protéines tau d'une hyperphosphorylation que la combinaison des isoformes E3 et E4 dans les cellules Kelly. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Mercken et Brion (1995) qui ne décelaient pas d'augmentation du taux de phosphorylation des protéines tau chez la souris dépourvue du gène APO E. Cependant, d'autres auteurs (Genis *et al.*, 1995) montraient que des souris déficientes en apo E possédaient des protéines tau plus phosphorylées que celles synthétisées par les souris non déficientes.

- Localisation cellulaire des protéines tau et influence de la phosphorylation sur cette localisation

La combinaison de nos résultats tendent à montrer que les protéines tau sont réparties dans différents compartiments cellulaires. En effet, les protéines cellulaires ont été séparées en trois fractions qui correspondent au cytosol, au cytosquelette ou aux noyaux plus les filaments intermédiaires. Les protéines tau 441 et tau endogènes sont réparties dans les trois fractions cellulaires mais semblent, néanmoins, préférentiellement réparties dans la fraction cytosolique, comme le montre l'intensité de l'immunomarquage par l'anticorps M19G. Ces protéines cytosoliques représentent donc les protéines tau non liées aux microtubules. Ces résultats sont corroborés par les expériences de séparation des protéines en fonction de leur solubilité où les protéines tau cellulaires sont réparties à la fois dans la fraction soluble et dans la fraction insoluble. Cette dernière fraction comprend à la fois les noyaux, les membranes ainsi que des complexes formés par le cytosquelette. Cette répartition permet d'expliquer le marquage diffus obtenu par immunofluorescence dans les cellules transfectées non perméabilisées avant leur fixation, avec l'anticorps Tau-E3 qui détecte spécifiquement les protéines tau441. Dans ces conditions, les protéines tau sont présentes à la fois dans le corps et dans les prolongements cellulaires, comme cela a été montré dans les neurones (Papasozomenos et Binder, 1987; Riederer et Binder, 1994), ou dans des fibroblastes exprimant les protéines tau après transfection (Lo *et al.*, 1993).

Lorsque les cellules sont préalablement perméabilisées par le triton, seules les protéines tau441, liées au cytosquelette, sont immunomarquées. Ces expériences d'immunofluorescence nous ont permis de mettre en évidence la présence d'un réseau fibrillaire épais et dense dans les cellules transfectées. Ces filaments évoquent les faisceaux de microtubules observés dans plusieurs études (Kanai *et al.*, 1989; Lee and Rook, 1992; Lovestone *et al.*, 1996; Preuss *et al.*, 1997), même si la co-localisation de la tubuline avec ces filaments reste à montrer pour confirmer la nature de ces faisceaux. La micro-injection

de l'isoforme fœtale dans les cellules CHO provoque le développement de longs faisceaux épais de microtubules tout comme celle de l'isoforme la plus longue (Preuss *et al.*, 1997). La présence de 3 domaines répétés semble donc suffisante dans ces cellules CHO pour favoriser la formation de faisceaux de microtubules suggérant que la quantité plus que la nature de l'isoforme synthétisée exercerait un rôle sur la formation de tels faisceaux (Preuss *et al.*, 1997). Nous pouvons, par conséquent, supposer que les faisceaux obtenus dans les cellules Kelly avec l'isoforme tau441, très semblables à ceux obtenus par Preuss et collaborateurs (1997), pourraient résulter de l'expression très élevée des protéines tau441 dans ces cellules. Néanmoins, les cellules exprimant de manière constitutive les protéines tau441 ne présentent que rarement des extensions neuritiques. Quand elles existent, ces extensions sont courtes et "trapues" et contiennent également des filaments détectés par l'anticorps Tau-E3. L'expression élevée de cette isoforme n'est donc probablement pas suffisante pour assurer le développement neuritique dans toutes les cellules Kelly, comme cela avait été suggéré dans les expériences de transfection des protéines tau dans les cellules Sf9 (Baas *et al.*, 1991; Knops *et al.*, 1991). Enfin, l'immunomarquage de faisceaux à la périphérie des corps cellulaires ou des extensions neuritiques pourrait suggérer une interaction des protéines tau441 avec la membrane plasmique des cellules. Une telle interaction pourrait être médiée par la présence des inserts amino-terminaux au niveau des protéines tau441 comme cela a été proposé par Brandt et collaborateurs (1995).

Il a été suggéré que la phosphorylation des protéines tau diminuerait l'interaction avec les microtubules. La phosphorylation de certains sites, comme les Ser262/356 ou les Ser396/Ser404, localisées respectivement dans le premier domaine répété ou dans la région en aval des domaines répétés, a été impliquée dans plusieurs études dans l'inhibition de la liaison des protéines tau aux microtubules (Biernat *et al.*, 1993; Bramblett *et al.*, 1993; Drewes *et al.*, 1995; Trinczek *et al.*, 1995; Loverstone *et al.*, 1996). Dans nos expériences de fractionnement cellulaire, les anticorps AD2 et 12E8, dirigés

respectivement contre les résidus Ser396/404 et Ser262/356 détectent les protéines tau dans les 3 fractions cellulaires. Cet immunomarquage, plus faible mais présent dans la fraction correspondant au cytosquelette, suggère que la phosphorylation sur l'un de ces sites n'abolit pas complètement la liaison des protéines tau aux microtubules. De plus, dans les expériences permettant de séparer les protéines en fonction de leur solubilité, une proportion non négligeable de protéines tau phosphorylées sur l'un de ces sites sont associées à la fraction insoluble. Nos observations sont donc en accord avec les résultats de Seubert et collaborateurs (1995) qui ne détectaient pas l'abolition complète de la liaison des protéines tau aux microtubules lorsqu'elles étaient phosphorylées sur la Ser262. Nous pouvons alors imaginer que l'incapacité des protéines tau à se lier aux microtubules résulterait plutôt de la phosphorylation de ces protéines sur plusieurs sites plutôt que sur un site particulier, puisque les bandes de plus haut poids moléculaire qui correspondent aux formes les plus phosphorylées, sont préférentiellement localisées dans la fraction cytosolique.

Conclusion:

Les protéines tau441 néosynthétisées par les cellules Kelly sont fonctionnelles et sont réparties dans le corps cellulaire et les prolongements neuritiques lorsqu'ils existent. Cette répartition cellulaire est modulée par le degré de phosphorylation des protéines tau même si la phosphorylation des résidus Ser262 et/ou Ser396/404 n'abolit pas complètement la liaison des protéines tau aux microtubules, comme cela avait été suggéré dans des études préalables.

- L'hyperphosphorylation des protéines tau ne conduit pas à une augmentation de leur insolubilité

Il a été suggéré que, dans la maladie d'Alzheimer, l'hyperphosphorylation des protéines tau puisse conduire à leur dissociation des microtubules puis à leur agrégation sous la forme de filaments, les PHFs (Brion *et al.*, 1985; Delacourte et Défossez, 1986). Dans notre modèle cellulaire, les protéines tau441 deviennent hyperphosphorylées après traitement des cellules par l'acide okadaïque. Cette hyperphosphorylation ne conduit pas à l'augmentation de l'insolubilité des protéines tau441. Effectivement, la même proportion de protéines tau441 totales est répartie dans les fractions soluble et insoluble, que ce soit avant ou après traitement des cellules par l'acide okadaïque. Les protéines localisées dans la fraction insoluble correspondent plus probablement aux protéines liées aux microtubules plutôt qu'à des formes agrégées insolubles. L'augmentation de l'antigénicité des protéines tau441 aux différents anticorps utilisés dans notre étude n'est donc pas accompagnée d'une diminution de la solubilité de ces protéines. Nos résultats montrent donc que l'hyperphosphorylation des protéines tau n'est ni suffisante ni peut-être même nécessaire pour provoquer la formation de PHFs. Ce résultat est en accord avec les travaux de Goedert et collaborateurs (1996) qui ne trouvaient pas d'effet inhibiteur ou activateur de la phosphorylation sur la formation de filaments de protéines tau *in vitro*. De même, aucune augmentation d'insolubilité ne semble être trouvée lorsque les protéines tau sont phosphorylées *in vitro* par différentes protéines kinases. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer l'absence de ce matériel. En effet, la formation de filaments insolubles de protéines tau impliquerait peut-être la présence d'autres modifications post-traductionnelles telle que la glycation ou l'oxydation, qui permettent de créer des pontages entre les protéines tau (De Ancos *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1995, 1996), ou la présence de molécules, telles que l'héparine ou d'autres glycosaminoglycanes sulfatés (Goedert *et al.*, 1996). L'absence de telles protéines ou de telles modifications dans les cellules Kelly

permettrait d'expliquer nos résultats. D'autres auteurs ont également suggéré l'implication des interactions entre les protéines tau hyperphosphorylées et les protéines tau normales, liées aux microtubules (Alonso *et al.*, 1996) dans la formation de ces structures insolubles. Ainsi, la présence simultanée des protéines tau normalement phosphorylées et des protéines tau hyperphosphorylées pourraient être nécessaires à la formation des filaments de protéines tau. Cette condition n'est pas retrouvée dans les cellules traitées par l'AO où toutes les protéines tau sont hyperphosphorylées. En effet, l'hyperphosphorylation des protéines tau cellulaires est rapide et très élevée dans notre modèle d'hyperphosphorylation. Cette hyperphosphorylation, peut-être trop rapide, pourrait empêcher l'interaction des protéines tau entre elles du fait des charges négatives trop nombreuses sur les molécules de tau, empêchant leur dimérisation et ainsi l'initiation de leur assemblage sous la forme de filaments insolubles. Dans la maladie d'Alzheimer, le processus pourrait être beaucoup plus lent (puisque la maladie dure plusieurs années) et la phosphorylation progressive des protéines tau sur un certain nombre de sites pourrait conduire à leur détachement progressif des microtubules. Ces protéines tau pourraient alors former des dimères puis des complexes tau-tau stables, qui seraient secondairement hyperphosphorylés par les protéines kinases cellulaires. D'autres modifications post-traductionnelles pourraient également survenir, stabilisant ces complexes. La structure des protéines tau pourrait également intervenir en inhibant la formation de filaments, comme cela a été suggéré par des études d'autoassemblage *in vitro* (Ksiezak-Reding *et al.*, 1991; Crowther *et al.*, 1992; Wille *et al.*, 1992). En outre, la présence d'autres isoformes des protéines tau pourrait être indispensable à la dimérisation des protéines tau hyperphosphorylées puis à leur agrégation sous forme de filaments.

L'origine des cellules Kelly et SY 5Y pourrait constituer une hypothèse supplémentaire pour expliquer l'absence de filaments similaires aux PHF malgré l'obtention de protéines tau hyperphosphorylées. En effet, ces cellules sont issues du système nerveux autonome et non du système nerveux central tandis que dans la maladie

d'Alzheimer, ce sont des neurones corticaux bien spécifique (neurones des couches II, III, V et VI du néocortex) qui développent une dégénérescence neurofibrillaire la plus prononcée. Ces neurones pourraient exprimer certaines isoformes des protéines tau capables de s'autodimériser et de conduire ainsi à l'obtention de filaments de protéines tau, les PHFs. Ces neurones pourraient également contenir ou être en contact avec une ou des protéine(s) capables d'influencer cette dimérisation, telles que l'héparine d'autres glycosaminoglycannes sulfatés, présents dans l'environnement cellulaire. De tels composés ne seraient pas présents dans les cellules de neuroblastomes, les cellules SY 5Y et Kelly.

Enfin, on ne peut pas exclure que de rares filaments soient présents mais non détectables par notre technique.

Conclusion:

Bien que nous obtenions des protéines tau hyperphosphorylées présentant des épitopes spécifiques de la MA, nous n'avons pas détecté pour autant la formation de PHFs. Ces résultats suggèrent que l'hyperphosphorylation des protéines tau n'est pas suffisante pour la formation de PHF, que d'autres modifications et/ou une cascade d'évènements de phosphorylation plus lente semblent donc nécessaire à l'obtention de ces filaments.

CONCLUSION-
PERSPECTIVES

CONCLUSION- PERSPECTIVES

Nous avons donc pu montrer que deux lignées cellulaires de neuroblastomes humains, les cellules SY 5Y et Kelly, synthétisent principalement l'isoforme la plus courte des protéines tau couramment appelée protéine tau fœtale. Sans aucun traitement, la balance entre les activités kinasiques et phosphatasiques cellulaires permettent la synthèse de protéines phosphorylées de manière similaire aux protéines tau normales. Dans la littérature, il a été suggéré que, seuls, les variants E2 et E3 de l'apolipoprotéine E, transporteur de lipides, pourraient en se liant aux protéines tau, les protéger d'une phosphorylation. Nous n'avons pas pu mettre en évidence cet éventuel rôle protecteur de l'apo E au sein de ces cellules: il n'y a pas de différence majeure dans la phosphorylation des cellules SY 5Y qui synthétisent uniquement l'apo E3 et les Kelly qui synthétisent les isoformes apo E3 et apo E4. Ces lignées ont pu être transfectées par l'ADNc de l'isoforme la plus longue des protéines tau: l'isoforme tau441. Au sein des cellules Kelly, cette protéine est phosphorylée à différents degrés et l'ensemble de ces protéines tau441 sont réparties dans les trois compartiments cellulaires étudiés: le cytosol, le cytosquelette et le noyau/ filaments intermédiaires. Cette localisation varie semble-t-il selon l'état de phosphorylation de la protéine tau441. Ces résultats suggèrent que cette protéine néosynthétisée est fonctionnelle et qu'elle est prise en charge par la machinerie cellulaire. La comparaison des deux isoformes synthétisées par les cellules transfectées n'a pas permis de mettre en évidence l'existence d'une phosphorylation préférentielle sur les différents épitopes que nous avons étudiés. Par contre, il est possible que d'autres sites de phosphorylation présents sur l'isoforme la plus longue soient absents de la protéine tau endogène ce qui permettrait d'expliquer la plus grande hétérogénéité de ces protéines visualisée par électrophorèses mono- et bi-dimensionnelles.

Le traitement des cellules par l'inhibiteur des protéines phosphatases 1 et 2A, l'acide okadaïque, induit des variations au niveau de la phosphorylation des protéines tau

cellulaires qui migrent en gel SDS-PAGE comme les protéines tau-PHF appelées tau55 et tau74 et qui acquièrent une antigénicité similaire à ces protéines. Ces protéines tau cellulaires hyperphosphorylées présentent également une acidification de leur pI. Notre modèle est donc très performant puisque nous sommes capables de provoquer l'apparition d'épitopes pathologiques, spécifiques des protéines tau-PHF reconnus par les anticorps AT10 et AP422. Ces résultats nous permettent de confirmer que les cellules Kelly possèdent des activités kinasiques et phosphatasiques nécessaires à la production d'épitopes pathologiques. Pour autant, cette hyperphosphorylation ne semble pas conduire, dans notre modèle, à l'apparition de matériel insoluble comme c'est le cas pour les protéines tau-PHF.

Pour que notre étude comparative entre l'isoforme fœtale et l'isoforme tau441 transfectée et l'étude du rôle de la phosphorylation soient complètes, il faudra rechercher, dans un premier temps, les relations potentielles entre les protéines tau et le cytosquelette et la membrane plasmique. L'expression plus élevée des protéines tau441 au sein des cellules devrait nous permettre également d'identifier la présence de complexes éventuels entre les protéines tau et d'autres protéines. Un deuxième axe de recherche résiderait dans la recherche des paramètres nécessaires à l'obtention de filaments intracellulaires, ressemblant aux PHFs, au sein du modèle d'hyperphosphorylation établi.

Dans un premier temps, il sera intéressant de vérifier la colocalisation des protéines tau441 et de la tubuline au sein des cellules transfectées et de comparer la genèse de faisceaux de filaments dans les cellules exprimant l'isoforme native seule ou combinée à l'isoforme tau441. Cette étude devrait nous permettre d'envisager le rôle de chaque isoforme dans l'obtention de filaments. En effet, la nature de l'isoforme intervient-elle pour partie dans le rôle fonctionnel de la protéine étudiée? Ou est-ce la quantité plutôt que la nature de l'isoforme des protéines tau qui détermine l'efficacité de la protéine, comme

cela a été suggéré par Preuss et collaborateurs (1997)? Pour tenter de répondre à cette question, d'autres clones, parmi les 96 autres clones congelés, pourront être sélectionnés en fonction de leur stabilité, du taux d'expression des protéines tau441 et tau endogènes ainsi qu'en fonction du rapport d'expression entre chacune de ces deux isoformes. Enfin, à l'aide d'anticorps dépendant de la phosphorylation, dont nous disposons au laboratoire, il sera également possible de déterminer plus précisément les différents états de phosphorylation des protéines tau impliquées dans l'association aux microtubules par immunofluorescence. De plus, Brandt et collaborateurs (1995) suggéraient l'existence de liaisons impliquant les protéines tau et des protéines liées à la membrane plasmique. Cette interaction, médiée par le domaine amino-terminal pourrait, dans certains cas, favoriser l'extension neuritique ou même participer à l'initiation de cascades de signaux. Nous pourrions vérifier, par immunofluorescence associée à la microscopie confocale, cette liaison directe avec la membrane plasmique. Nous pourrions également rechercher les protéines membranaires impliquées dans ces interactions.

Il a été suggéré dans des études récentes que les protéines tau représenteraient plus qu'une simple MAP. En effet, ces protéines seraient capables d'interagir avec la phospholipase C γ et induire une hydrolyse avec du phosphatidylinositol 4,5- biphosphate (Hwang *et al.*, 1996). Dans notre modèle cellulaire capable de synthétiser une grande quantité de protéines tau441, il serait intéressant de rechercher la présence de cette isoforme de la phospholipase C γ et la réalisation de tels complexes. De plus, des études *in vitro* ont suggéré que les protéines tau se lieraient aux isoformes apo E2 et apo E3 de l'apolipoprotéine E (Strittmatter *et al.*, 1994). Comme les cellules Kelly expriment constitutivement les isoformes apo E3 et apo E4 de l'apolipoprotéine, il sera possible de vérifier, dans un modèle cellulaire, l'existence de complexes tau-apo E. Enfin, il sera intéressant d'isoler les kinases actives ainsi que les protéines phosphatases responsables de la phosphorylation normale et de l'hyperphosphorylation des protéines tau dans les

cellules Kelly. Leur association possible au réseau microtubulaire, d'une part, et avec les protéines tau, d'autre part, sera analysée par immunofluorescence.

Nous avons également mis en évidence l'existence d'une hétérogénéité supérieure de protéines tau441 par rapport à celle observée pour les protéines tau endogènes. Cette hétérogénéité pourrait résulter de différents événements de phosphorylation localisés sur les régions supplémentaires ou localisés sur des résidus communs à toutes les isoformes des protéines tau, capables de provoquer des changements conformationnels plus importants sur les protéines tau441. L'ajout des inserts supplémentaires pourrait être associé à la présence de ces modifications conformationnelles plus importantes. A l'aide d'anticorps dirigés contre des résidus séryl ou thréonyl présents dans les domaines supplémentaires, résultant de la traduction des exons 2, 3 et 10, tel que l'anticorps RT97 dirigé contre la Ser46 (Anderton *et al.*, 1982), nous pourrions étudier la présence d'une phosphorylation sur ces inserts et envisager son rôle dans un changement conformationnel de la molécule par électrophorèse bi-dimensionnelle. De plus, il serait intéressant de déterminer par électrophorèse bi-dimensionnelle le degré de phosphorylation ainsi que le profil électrophorétique des protéines tau441 exprimées en quantités différentes par les clones stables sélectionnés. Cette étude nous permettrait de visualiser si l'hétérogénéité des protéines tau441, observée grâce aux expériences de transfection transitoire, résulte des activités kinasiques et phosphatasiques présentes dans les cellules ou plutôt si elle est proportionnelle au taux d'expression. De plus, après avoir dosé la quantité des protéines tau441 et endogènes présentes dans les clones, nous pourrions comparer l'extension de la phosphorylation de ces deux protéines tau pour une même quantité de protéines déposée. Cette étude sera réalisée à l'aide de différents anticorps dépendant de la phosphorylation associés à la technique d'électrophorèse bi-dimensionnelle.

Le modèle cellulaire développé dans le laboratoire est donc performant puisqu'il est capable de provoquer l'apparition d'épitopes pathologiques, spécifiques des protéines tau-

PHF. Bien qu'il ait été suggéré que cette hyperphosphorylation précéderait et favoriserait l'agrégation des protéines tau, nous n'avons pas observé d'augmentation de l'insolubilité des protéines tau cellulaires hyperphosphorylées. Néanmoins, ces filaments pourraient être présents mais indétectables par la technique que nous avons utilisée. C'est pourquoi, il sera judicieux de réaliser des études de microscopie électronique sur les cellules transfectées de manière stable par l'isoforme tau441 traitées ou non par l'acide okadaïque. Des expériences similaires devront être réalisées sur les cellules Kelly témoins également traitées ou non par cet inhibiteur des protéines phosphatases 1 et 2A. Ces études nous permettront de comparer l'organisation naturelle des microtubules dans les cellules natives et transfectées et de visualiser la perturbation du cytosquelette cellulaire dans les cellules traitées par l'acide okadaïque. Par cette technique, nous pourrions peut-être découvrir la présence de filaments droits ou en hélice, accumulés dans les cellules de type neuronal indétectables par nos expériences précédentes. De plus, une cinétique de traitement devrait permettre d'étudier de manière simultanée les altérations du réseau cytosquelettique ainsi que l'augmentation de la phosphorylation des protéines tau afin de déterminer si la mort des cellules est directement ou indirectement imputable à l'augmentation de la phosphorylation des protéines tau cellulaires. Enfin, cette étude permettra également de déterminer si l'expression élevée d'une isoforme adulte, contenant les quatre domaines répétés, est capable de protéger les cellules plus longtemps.

Enfin, il a été suggéré par des expériences d'agrégation des protéines tau *in vitro*, que la phosphorylation ne serait que faiblement impliquée dans l'apparition de matériel insoluble (Goedert *et al.*, 1996). Par contre, d'autres molécules, comme l'héparine ou d'autres glycosaminoglycanes sulfatés, favoriseraient cette agrégation (Goedert *et al.*, 1996). Cette hypothèse pourrait être vérifiée dans notre modèle cellulaire par l'addition de telles molécules dans le milieu de culture des cellules ou introduites directement dans les cellules par lipofection ou micro-injection. Ces ajouts pourraient être réalisés de manière

concomittante au traitement par l'acide okadaïque ou précéder ce traitement. Enfin, l'oxydation, la glycosylation et la glycation ont été également rapportées comme pouvant favoriser la structure agrégée des PHFs (Wang *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 1994). Dans la maladie d'Alzheimer, la production de radicaux libres et la présence de stress oxydatif ont été effectivement impliqués. Les périodes de stress oxydatifs longues potentialiseraient ou initieraient la présence de produits glycatés renforçant les réarrangements moléculaires. Le traitement des cellules, par des agents capables de provoquer l'apparition de tels radicaux libres ou d'un stress oxydatif seront recherchées. Ainsi, le peptide A β ou certaines cytokines, comme l'IL1 ou la S100 β , pourraient constituer des molécules candidates. En effet, il a été suggéré que la toxicité du peptide amyloïde sur des cellules d'hippocampe de rat serait médiée par la production de radicaux libres ou d'un stress oxydatif (Manelli et Puttfarcken, 1995; Davis *et al.*, 1997). Néanmoins, ce traitement seul ne provoque pas une augmentation de la phosphorylation des protéines tau (Davis *et al.*, 1997). Nous devons vérifier ce résultat au niveau des cellules Kelly transfectées par l'isoforme tau441 et peut-être associer ce traitement à l'action de l'AO.

De plus, l'ajout d'autres isoformes pourrait être nécessaire, notamment l'isoforme 2⁺3⁻10⁺, rapportée comme représentant l'une des plus exprimées dans le cerveau adulte humain. A l'heure actuelle, l'ADNc de cette isoforme a été sous-cloné dans un vecteur eucaryotique appelé pcDNA3.1-Zéo. Ce plasmide possède les mêmes caractéristiques que le plasmide ayant permis l'obtention de clones exprimant de manière stable l'isoforme tau441, excepté le gène codant pour la résistance à l'antibiotique sélectionnant les cellules eucaryotiques exprimant de manière stable l'isoforme transfectée. Des premières expériences ont permis de montrer que cette isoforme peut être également efficacement transfectée dans les cellules Kelly par la même technique et de déterminer la dose létale de l'antibiotique pour les cellules Kelly. Nous pourrions donc élargir l'ensemble de notre

étude à cette isoforme ainsi qu'à l'établissement de cellules exprimant de manière simultanée les deux isoformes adultes.

Enfin, d'autres mécanismes sont envisageables, à beaucoup plus long terme, pour augmenter l'état de phosphorylation des protéines tau cellulaires de manière moins drastique que celle obtenue par le traitement cellulaire par l'acide okadaïque. Pour cela, l'identification des protéines kinases actives dans les cellules Kelly, précédemment réalisée, nous permettra d'entreprendre leur activation sélective par un stress chimique ou physique, par différents composés ou encore par transfection de leur ADNc dans les cellules, comme cela a été réalisé dans de nombreuses études (Latimer *et al.*, 1995; Lovestone *et al.*, 1996; Wagner *et al.*, 1996)

MATERIELS
ET
METHODES

I- BIOLOGIE MOLECULAIRE

I- 1- Analyse des transcrits de tau, apo E et GFAP, exprimés par les cellules de neuroblastomes humains, les cellules SY 5Y et les cellules Kelly:

I- 1- 1- Extraction de l'ARN total

I- 1- 1- 1- Méthode d'extraction au RNAzol B

L'ARN total des cellules de neuroblastomes a été purifié par la méthode au RNAzol B (Biogénésis LTD), composé d'un mélange d'isothiocyanate de guanidine et de phénol. Cette méthode repose sur quatre étapes:

- L'homogénéisation des cellules, par ajout de RNAzol B (0,2 ml pour 10^6 cellules).

- L'extraction de l'ARN total, par addition de chloroforme (1/10^e V). Après avoir agité vigoureusement (15 secondes) et maintenu l'homogénat à 4°C (5 min), les tubes sont centrifugés à 12000 x g, pendant 15 min, à 4°C. La phase aqueuse, incolore, contient exclusivement les ARNs.

- La précipitation de l'ARN, par un volume égal d'isopropanol. Le mélange, phase aqueuse-isopropanol, est alors placé une nuit à 4°C. Le lendemain, les culots d'ARN sont récupérés après une nouvelle centrifugation, identique à la première.

- Le lavage du précipité, ensuite repris dans de l'éthanol à 75% (3Volumes d'alcool/1Volume d'eau). Le culot, obtenu après une dernière centrifugation (8 min, à 7500 x g, à 4°C), est séché et solubilisé dans de l'eau traitée par le DEPC (Diéthypyrocarbonate).

Nom	Sequence	Orientation	Localisation	Exons recherchés
Tau 52	5'TACGGGTTGGGGGACAGGAAAGA T 3'	Sense	Exon 1	Exons 2, 3
Tau 337	5'GGGGTGTCTCCAATGCCTGCTTCT 3'	Antisense	Exon 4	Exons 2, 3
Tau 220	5'CTTCCGCTGTTGGAGTGCTCTT 3'	Antisense	Exon 2	Exon 2
Tau 747	5'CATGCCAGACCTGAAGAATGTCAA G 3'	Sense	Exon 9	Exon 10
Tau 1328	5'TCACAAACCCTGCTTGGCCA 3'	Antisense	Exon 13	Exon 10
Tau 308	5'CTGAAGAAGCAGGCATTGGAGAC ACCC 3'	Sense	Exon 4	Exon 4A
Tau 415	5'TCATCGCTTCCAGTCCCGTCTTT 3'	Antisense	Exon 5	Exon 4A
Tau 388	5'AAAAGCAAAGACGGGACTGG 3'	Sense	Exon 5	Exon 6
Tau 541	5'TCTTTGGAGCGGGCGGGGTTTTTG 3'	Antisense	Exon 7	Exon 6
Apo E	5'TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGG A 3'	sense	Exon4	Exon4
Apo E	5'ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTAC AC 3'	Antisense	Exon4	Exon4
GFAP	5'CTCAATGCTGGCTTCAAGGA 3'	sense	Exon	Exon
GFAP	5'GGAGCAGCTCCGCGTTG 3'	Antisense	Exon	Exon

TABLEAU IV: Tableau récapitulatif des différents oligonucléotides utilisés pour l'amplification sélective de certaines régions présentes sur les ARNm des gènes tau, apo E et GFAP.

I- 1- 1- 2- Stockage de l'ARN total

L'ARN est dosé, par spectrophotométrie, à 260 nm, et réparti, par fraction de 20 µg, dans des tubes en plastique de 2ml. Il est ensuite précipité par 1/10^e volume d'acétate de sodium 3 M et deux volumes et demi d'éthanol absolu. L'ensemble est ensuite placé à -80°C.

I- 1- 2- Amplification et analyse de régions spécifiques des différents ARNm par RT-PCR

I- 1- 2- 1- Séquences des oligonucléotides de synthèse

La séquence et la localisation génomique des différents oligonucléotides utilisés sont données dans le tableau IV.

I- 1- 2- 2- Obtention de l'ADN complémentaire (ADNc)

1,5 µg d'ARN total est ajouté à un milieu réactionnel contenant 20 picomoles de l'amorce en 3' de la séquence à amplifier, 1,5 µl d'une solution de déoxynucléotides triphosphates (dATP, dTTP, dGTP, dCTP, à 25 mM chacun), 2 µl de tampon Mu- MLV 5X (250 mM Tris-HCl pH 8,3; 375 mM KCl; 50 mM DTT; 15 mM MgCl₂). Cent unités de transcriptase inverse Mu- MLV (issue du Virus leucémogène murin de Moloney) sont ajoutées au milieu de réaction, après que celui-ci a été placé 5 min, à 80°C, afin de supprimer les structures secondaires des ARNm (ARNm). La transcription inverse est réalisée sur les 10 µl finaux, à 37°C, pendant 90 min.

Pour la recherche de l'expression de transcrits apo E, dans les extraits d'ARN cellulaire, nous utilisons deux amorces, situées dans le même exon. Pour être sûr que le produit amplifié corresponde bien aux ARNm, et non à de l'ADN contaminant,

nous avons traité l'ARN cellulaire par une endonucléase, la DNase de type I (Eurogentec), qui dégrade spécifiquement l'ADN double brin. Cette enzyme est ensuite inhibée par la chaleur, à 100°C, pendant 10 min. L'ARN total, ainsi traité, est ensuite rajouté au mélange réactionnel, de manière identique à la procédure précédente.

I- 1- 2- 3- Réaction de PCR

A chaque volume de réaction sont additionnés 20 picomoles de l'amorce en 5' de la région à amplifier, 10 µl de tampon PCR 10X, et une unité de Taq polymérase (*Thermus aquaticus*). Le volume est amené à 100 µl, avec de l'eau milliQ, et 100 µl d'huile sont finalement ajoutés, pour éviter toute évaporation du milieu réactionnel. Les 30 cycles de PCR sont réalisés, à l'aide d'un automate de la société Perkin Elmer, sous les paramètres suivants: déshydratation de la matrice à 94°C, pendant 1 min (10 min pour le premier cycle), hybridation des amorces à la matrice, pendant 1 min, à 65°C, pour les ADNc des gènes tau et apo E, et à 55°C pour celui de la GFAP, et élongation des amorces à 72°C, pendant 2 min. Le dernier cycle correspond à une étape d'élongation, à 72°C, pendant 10 min. Pour les contrôles négatifs, l'ADNc est remplacé par de l'eau.

Pour la recherche de transcrits apo E, nous avons réalisé un contrôle supplémentaire afin de nous assurer que la détection de produits d'amplification ne résultait pas de la présence d'ADN contaminant dans les extraits d'ARN total. Nous avons ainsi directement ajouté 1,5 µg d'ARN total cellulaire, traité par la DNase I, dans le mélange réactionnel de PCR, sans passer par l'étape de rétro-transcription. Cette étape permet d'amplifier, spécifiquement, l'ADN présent, tandis que l'ARN ne peut être amplifié par la Taq polymérase.

I- 1- 2- 4- Digestion par les enzymes de restriction

Les ampligènes sont hydrolysés par 2 ou 3 unités d'enzyme/ μg de produits amplifiés, après addition du tampon d'hydrolyse recommandé par la firme. L'incubation est effectuée à 37°C, durant 90 min. Après addition d'une solution contenant du ficoll 400 (15%) et des marqueurs de migration (bleu de bromophénol 0,25%; xylène cyanol FF 0,25%), les produits digérés sont déposés sur gel de polyacrylamide, à 10%, non dénaturant.

I- 1- 2- 5- Analyse des produits amplifiés, après électrophorèse sur gel d'agarose

20 μl du milieu réactionnel sont déposés, avec 5 μl de tampon de dépôts d'orange G (Glycérol 30%, Orange G 0,025%), sur un gel d'agarose à 2% (poids/volume), contenant du bromure d'éthidium (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et 10% (V/V) de tampon TBE 10X (EDTA 20 mM, pH 8; Tris-HCl 1M, pH 8; acide borique 0,9 M). La migration s'effectue en tampon TBE 0,5X. L'électrophorèse se déroule à 8V/cm, durant 15 à 30 min, à température ambiante. Les produits amplifiés sont visualisés sous lampe UV (à 254 nm). La taille de ces produits d'amplification est estimée grâce à différents marqueurs de taille. Selon les expériences, plusieurs marqueurs ont été utilisés: un polymère de 123 pb, de chez BRL (Bethesda Research Laboratories, Life Technologies, Inc.), le mélange d'un polymère de 100 pb et du marqueur pGEM DNA marqueur (Promega), le plasmide pblcat5, digéré séparément par les enzymes de restriction *Hae III* et *Hinf I*.

I- 1- 2- 6- Analyse des produits digérés, sur gel de polyacrylamide
10% non dénaturant

Aux 20 µl de produits d'amplification sont ajoutés 5 µl d'une solution contenant du ficoll 400 (15%) et des marqueurs de migration (bleu de bromophénol 0,25%; xylène cyanol FF 25%). Ces différents mélanges sont ensuite déposés sur un gel de polyacrylamide de 10% (acrylamide/bisacrylamide (29/1), TBE 1X; persulfate d'ammonium 0,14%; TEMED 2,2 µM). La taille de ces produits d'amplification est estimée grâce aux différents marqueurs de taille dont nous disposons. La migration s'effectue sur 4h, à 12V/cm. Après séparation électrophorétique, le gel est immergé 10 min dans un bain de TBE 1X, contenant du bromure d'éthidium (0,5 mg/ml). L'ADN est visualisé sous lampe UV (à 254 nm).

**I- 2- Construction du vecteur d'expression
eucaryotique, contenant l'ADNc de l'isoforme
tau441**

I- 2- 1- Les souches bactériennes utilisées

I- 2- 1- 1- La souche BL21 (DE3) d'E. coli

Cette souche présente les caractéristiques suivantes: souche B F⁻ ompT rB- mB- hsdS gal (lcIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7gene1).

Elle a l'avantage d'être déficiente en protéase lon, et en protéase ompT, protéines de la membrane externe qui peuvent dégrader les protéines durant la purification. Ainsi, au moins, certaines protéines cibles pourraient être plus stables dans cette souche BL 21 que dans les cellules-hôtes, qui possèdent ces protéases. C'est une souche qui est employée pour l'expression à haut niveau de gènes clonés dans des vecteurs contenant le promoteur

du bactériophage T7. Le gène de la RNA polymérase du bactériophage T7 est portée par le bactériophage λ DE3, intégré à l'intérieur du chromosome de la bactérie (Studier and Moffatt 1986).

I- 2- 1- 2- La souche JM 109 d'E. coli

Cette souche présente le génotype suivant: recA1 sup E4 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thiD(lac-proAB) F'(traD36 pro AB⁺ lacI^q lacZDM15).

C'est une souche qui ne modifiera pas les sites Bcl I et qui supportera la croissance de vecteurs portant des mutations amber.

I- 2- 1- 3- La souche TOP10F' d'E. coli

Cette souche présente le génotype suivant: F'(Tet^R) mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80 Δ lac Δ M15 Δ lac X74 deoR recA1 araD139 Δ (ara,leu) 7697 gal/U gal/K 1- rspL endA1 nupG.

Ces bactéries, efficacement transformées, sont utilisées pour le clonage et la fabrication de banques d'ADNc. L'épisome F' porte le gène de la résistance à la tétracycline, qui facilite la sélection et permet l'isolement de l'ADN de vecteurs simple brins, ayant une origine de répllication fl. Le génotype de TOP10F' est approprié pour le screening blanc/ bleu de vecteurs recombinants, par α -complémentation du gène de la β -galactosidase. De plus, les cellules TOP10F' sont recA1 afin d'augmenter la stabilité des vecteurs recombinants, hsdR pour empêcher la digestion du plasmide par les endonucléases de l'hôte, et endA1 pour optimiser la qualité de l'ADN plasmidique purifié.

I- 2- 2- Transformation bactérienne

Les bactéries sont cultivées à 37°C, sous agitation, en milieu LB (extrait de levure DIFCO 5g/l; peptone DIFCO 10 g/l; NaCl 5 g/l). Quand l'absorbance, à 580 nm, de la culture bactérienne, atteint 0,6, ces bactéries sont centrifugées 10 min à 4000 rpm, à 4°C, lavées dans du CaCl₂ 0,1 M, reprises dans du CaCl₂ 0,1 M, et placées 20 min, à 4°C, avant d'être à nouveau centrifugées (d'après Cohen *et al.*, 1972).

30 ml de culture bactérienne fournissent environ 0,7 ml de bactéries dites compétentes, qui sont ensuite réparties par fraction de 0,1 ml. Chacune de ces fractions est mise en contact avec 25 µl de solution d'ADN transformant. Après 20 min d'incubation sur la glace, on effectue 5 chocs thermiques, de 30 secondes chacun (37°C/4°C). Le mélange est à nouveau laissé 20 min dans la glace. 1,5 ml de milieu 2XTY (extrait de levure DIFCO 10 g/l; Tryptone DIFCO 16g/l; NaCl 5g/l) sont ajoutés et la suspension de bactéries est placée sous agitation, à 37°C, pendant 45min à 1 h. 0,2 à 0,8 ml de la suspension sont étalés sur boîtes de Petri, contenant du LB gélosé (15 g/l DIFCO), renfermant l'antibiotique comme marqueur de résistance. Les boîtes sont incubées à 37 °C, pendant 16 à 20 h, et les clones résistants sont isolés.

I- 2- 3- Les vecteurs de clonage

I- 2- 3- 1- Le plasmide pRK172-tau441

Le plasmide pRK172 est un plasmide dérivé du pBR322 (McLeod *et al.*, 1987). Il contient le gène du promoteur T7, qui peut être amplifié en un grand nombre de copies dans les bactéries E. coli, du fait de l'élimination de la région ROP, qui contrôle le nombre de copies de plasmides dans la bactérie. L'ADNc de l'isoforme tau441 a été inséré dans ce

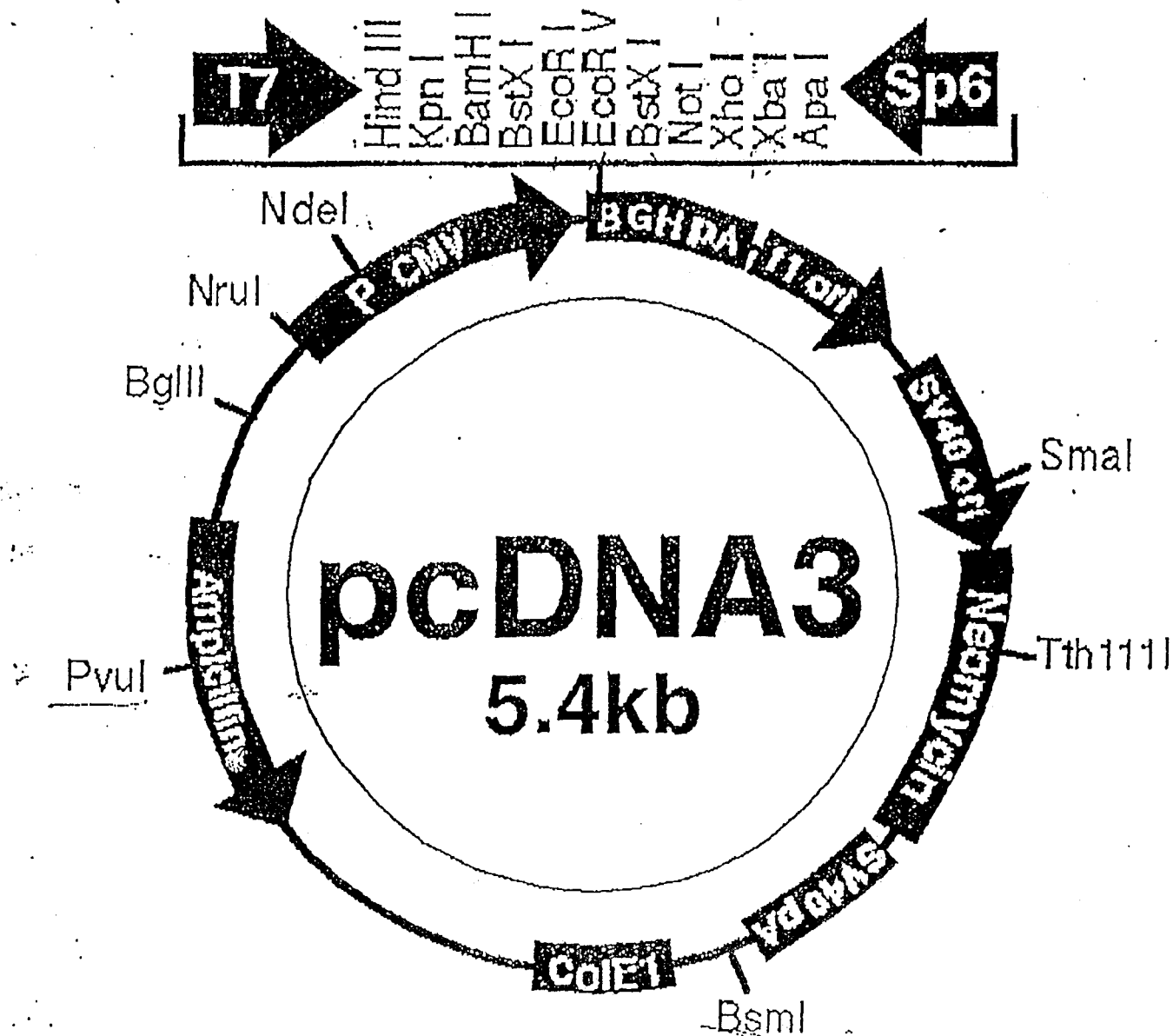


FIGURE 45: Carte du plasmide eucaryotique, le plasmide pcDNA3.

plasmide, en aval de ce promoteur T7, entre les sites de restriction, reconnus par les enzymes de restriction Nde I et EcoR I. Le plasmide obtenu est le pRK172-tau441, don du Docteur M. Goedert. Ces plasmides ont été amplifiés dans la souche d'E. coli BL21 (DE3), qui permet l'expression de protéines tau441 recombinantes par Goedert et Jakes (1990).

I- 2- 3- 2- Le plasmide eucaryotique pcDNA3

Le plasmide pcDNA3 (Invitrogen) a été utilisé, pour l'expression de l'isoforme tau441, dans les cellules de neuroblastomes humains, les cellules SY 5Y, et les cellules Kelly (**Figure 45**). Ce plasmide, de 5,4 kb, possède le promoteur CMV (cytomégalovirus humain), qui permet un haut niveau d'expression des protéines recombinantes, dont l'ADNc est inséré en aval de ce promoteur (Nelson *et al.*, 1987). En aval de la région multi-sites de clonage se trouve la séquence de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine, qui favorise les étapes de terminaison et de polyadénylation des ARNmessagers. Ce plasmide possède également une origine de répllication bactérienne (ColE1), ainsi qu'un gène codant pour la résistance à l'ampicilline, afin d'amplifier les plasmides. Un gène codant la résistance à la généticine est situé entre le promoteur et le signal de polyadénylation de SV40, présents dans le plasmide eucaryote. Ce gène code pour une aminoglycoside transférase, qui va détoxifier la généticine et, ainsi, conférer une résistance aux cellules eucaryotiques qui expriment cette enzyme. Ce vecteur contient également une origine fl, permettant la synthèse d'ADN simple brin, et une partie du promoteur T7.



I- 2- 4- Insertion de l'ADNc de l'isoforme tau441, dans le vecteur eucaryotique pcDNA3

I- 2- 4- 1- Insertion du site BamH I, en amont de l'ADNc de l'isoforme tau441

L'ADNc de l'isoforme tau441 est cloné, entre les sites Nde I et EcoR I, dans le vecteur procaryotique pRK172. Le site EcoR I est présent dans la région multi-sites de clonage du vecteur eucaryotique pcDNA3, tandis que le site Nde I ne s'y trouve pas. L'absence de ce site, dans le vecteur d'expression, nous a conduit à introduire le site de restriction, reconnu par l'enzyme BamH I, en amont de l'ADNc de tau441, dans le plasmide pRK172. Ce site de restriction, reconnu par l'enzyme BamH I, est présent dans la région multi-sites de clonage du vecteur eucaryotique pcDNA3, mais est absent du plasmide pRK172 et de l'ADNc de tau441.

L'introduction de ce site a été réalisée grâce à un oligonucléotide de synthèse (Eurogentec), dont la séquence nucléotidique comprend le site complet de l'enzyme BamH I, et le site, complémentaire du site reconnu par l'enzyme Nde I, 5' TAGGATCC 3'.

Cet oligonucléotide, resolubilisé dans du tampon TE 1X pH 8 (1 nmole/ μ l), est dénaturé à 100°C, pendant 2 min. Lorsque l'échantillon est laissé dans le bain marie jusqu'à ce que la température de celui-ci soit revenue à la température ambiante, l'amorce s'hybride sur elle-même, conduisant à la formation d'un "linker" double brins, reconnaissable par l'enzyme de restriction BamH I.

Le plasmide pRK172-tau441 (27 μ g) est linéarisé par l'enzyme de restriction Nde I, puis déphosphorylé par la phosphatase alcaline CIAP (1,85 unité, GIBCO BRL), dans un tampon réactionnel 1X (Tris-HCl 50 mM, pH 8,5; EDTA 0,1 mM, GIBCO BRL), pendant 30 min, à 37°C. Après élimination des protéines

(extraction phénol/chloroforme) et des sels (dialyse), la ligation du "linker" double brins (100 pmoles), au plasmide purifié et linéarisé (1 pmole) est effectuée par la T4 DNA ligase (1 unité, GIBCO BRL), dans le tampon réactionnel de ligation 1X (Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, polyéthylène glycol 8000 5% (poids/volume), en présence d'ATP (1 mM), pendant 16 h, à 16°C. Les bactéries de la souche JM109, rendues compétentes par le chlorure de calcium, sont transformées par ce plasmide modifié. Après sélection et purification des clones, par la méthode de mini-préparation, l'ADN plasmidique est digéré, séparément, par les enzymes de restriction BamH I et Nde I. Seuls, les plasmides digérés par BamH I subissent ensuite une digestion par EcoR I. La libération et la taille de l'insert, correspondant à l'ADNc de tau441, sont analysés sur gel d'agarose 1%.

I- 2- 4- 2- Construction du vecteur d'expression pcDNA 3-tau441

I- 2- 4- 2- 1- Purification de fragments d'ADN sur membrane de DEAE cellulose

Lorsque les fragments d'ADN, chargés négativement, sont séparés sur gels d'agarose 1%, une membrane de DEAE-cellulose (NA 45, SCLEICHER et SCHUEHLL) est placée devant la bande d'ADN que l'on veut récupérer. La migration électrophorétique est relancée pendant quelques minutes, à 8V/cm. L'ADN, accolé à la membrane, chargée positivement, en est élué, par l'addition d'une solution riche en sels (Tris-HCl 50 mM, pH 8; NaCl 1M; EDTA 10 mM, pH 8) et une incubation à 65°C, pendant 30 min. L'ADN est ensuite précipité par l'addition de 2,5 volumes d'éthanol froid à -20°C, pendant 30 min, puis récupéré, par centrifugation à 12000 x g, pendant 30 min. L'ADN est ensuite rincé, par de l'éthanol à 75%, et séché, avant d'être utilisé pour la ligation.

I- 2- 4- 2- 2- Insertion de l'ADNc de tau441, dans le plasmide eucaryotique pcDNA3

Après purification, l'ADNc de tau441 (1 pmole), digéré par les enzymes de restriction BamH I et EcoR I, est inséré dans le plasmide pcDNA3 (0,3 pmole), purifié, puis digéré par les même enzymes. Cette insertion se fait grâce à la T4 DNA ligase (2 unités) dans le tampon réactionnel 1X (Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, polyéthylène glycol 8000 5% (poids/volume)), en présence d'ATP (1 mM), pendant 16 h, à 16°C.

I- 2- 5- Sélection des clones

I- 2- 5- 1- Technique de purification du plasmide

I- 2- 5- 1- 1- Méthode de dénaturation par la chaleur

Pour chaque clone, une culture de bactéries transformées est réalisée, dans 5 ml de milieu LB+Amp (5 mg/l), pendant une nuit, à 37°C. Le culot bactérien, correspondant à 1,4 ml de culture, est obtenu par centrifugation (3 min à 12000 x g), puis lysé par 300 µl de tampon de lyse et 50 µl de lysosyme (10 mg/ ml). L'ensemble est porté à ébullition durant quarantes secondes. Après centrifugation de 1 min, à 12000 x g, le culot de débris bactériens est éliminé. L'ensemble subit alors un traitement à la RNase A bouillie (10 µg), pendant 20 min, à 37°C, puis une déprotéinisation à la protéinase K, durant 30 min, à 37°C. La solution est purifiée par deux extractions phénol/chloroforme (V/V), puis au chloroforme seul. L'ADN est précipité dans l'éthanol, par centrifugation à 15000 x g,

30 min. Le culot d'ADN est repris dans du tampon TE, puis dosé en spectrophotométrie UV, à 260 nm. Il peut, ensuite, être digéré par des enzymes de restriction.

I- 2- 5- 1- 2- Technique de "mini-préparation" (d'après Serghini *et al.*, 1989)

10 ml de culture de bactéries, ayant poussé toute la nuit, sont centrifugés, à 6000 rpm, à 4°C pendant 10 min. Le culot de bactéries est remis en suspension dans 200 µl d'une solution TNE (Tris-HCl 10 mM, pH 8; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM). Les protéines sont éliminées par une extraction phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1). Après centrifugation à 12000 x g, les 200 µl de la phase aqueuse sont précipités par l'acétate d'ammonium 2M final, avec 2 volumes d'éthanol froid, à -20°C, pendant 30 min. L'ADN est alors récupéré, après centrifugation (45 min à 12000 x g), puis lavé par l'éthanol à 70%, pour éliminer les sels. Après séchage, l'ADN est dissout dans 50 µl d'eau milliQ. Il peut ensuite être digéré par des enzymes de restriction. Les ARN sont ensuite hydrolysés par la ribonucléase A (50 µg/ml), avant les dépôts sur gel d'agarose 1,5%.

I- 2- 5- 1- 3- Purification sur colonne de silice (Wizard), commercialisée par la société Promega

Cette purification est basée sur l'isolement d'ADN plasmidique super enroulé, sur une résine de silice. 10 ml de culture de bactéries, ayant poussé toute la nuit, sont centrifugés à 6000 rpm, à 4°C, pendant 10 min. Le culot de bactéries est remis en suspension dans 200 µl d'une solution de resuspension (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; EDTA 10 mM, RNase A (100 µg/ml)). A cette suspension est ajouté le même volume d'une solution de lyse (NaOH 0,2 M; SDS 1%), qui est ensuite neutralisé par 200 µl

d'acétate de potassium (1,32 M, pH 4,8) lorsque la solution devient visqueuse. L'ADN est alors mélangé à une résine, affine pour l'ADN, et le complexe résine-ADN sera piégé sur colonne. Après rinçage de la colonne par une solution de lavage (NaCl 83 mM, Tris-HCl 8,33 mM, pH7,5; EDTA 2 mM, éthanol 55%), l'ADN est ensuite élué par 50 µl de tampon TE 1X.

I- 2- 5- 1- 4- Purification par ultracentrifugation en chlorure de césium (Sambrouck *et al.*, 1989)

Les plasmides sont amplifiés dans *E. coli* (TOP 10F'). 1 ml de cette culture est dilué dans 200 ml de milieu LB (extrait de levure DIFCO 5g/l; peptone DIFCO 10 g/l; NaCl 5 g/l), contenant 50 µg/ml d'ampiciline et incubé à 37°C, sous agitation, pendant 16 h. Les bactéries sont alors centrifugées, 10 min, à 4000 rpm, à 4°C. Le culot est remis en suspension dans 2,5 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 8; saccharose 25%. 1 ml de lysosyme (10 mg/ml de tampon Tris-HCl 50 mM, pH8), préparé extemporanément, est d'abord ajouté puis, après 10 min, 1 ml d'EDTA 0,2 M, pH 8 est encore ajouté. Au bout de 10 min, la lyse des bactéries est complétée par addition de 4,5 ml d'une solution de Tris-EDTA-Triton (Tris-HCl 50 mM; EDTA 20 mM; Triton X100 0,1%; pH8). Les parois et autres débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 35000 rpm, pendant 30 min, à 4°C, dans un rotor SW41 Beckman. 9 ml de surnageant sont mélangés à 9 g de chlorure de césium et 90 µl de bromure d'éthidium (5 mg/ml). L'ultracentrifugation, 20 h, à 55000 rpm, permet d'établir le gradient de césium. La bande d'ADN plasmidique est visualisée grâce au bromure d'éthidium.

Cette bande est récupérée, à travers le tube, à l'aide d'une aiguille et d'une seringue. Le bromure d'éthidium est éliminé par 2 à 3 extractions successives, par de l'isopropanol (V/V). Les plasmides sont alors dialysés, contre du tampon TE 1X

(Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8). La concentration de l'ADN est ensuite évaluée par la mesure de l'absorbance, à 260 nm.

I- 2- 5- 2- Séquençage de l'ADNc de tau441 inséré, dans le vecteur pcDNA3

L'ADNc de tau441, inséré dans le vecteur pcDNA3, a été séquençé, suivant la méthode de Sanger aux didéoxynucléotides (Kit Sequenase, AMERSHAM), en utilisant l'amorce T7, localisée en amont de la région contenant les différents sites de restriction uniques du plasmide pcDNA3. D'autres amorces, réparties le long de l'ADNc de tau441, ont été également nécessaires pour séquençer entièrement l'ADNc. Les dépôts sont réalisés sur un gel d'acrylamide dénaturant, à 6%, contenant 10% (V/V) de tampon TBE 10X, et de l'urée 8 M. L'électrophorèse s'effectue à 1500 volt, en tampon TBE 1X. Le gel est ensuite transféré sur Whatman 3, séché, et enfin autoradiographié, une nuit à plusieurs jours, à température ambiante.

La séquence complète de l'ADNcomplémentaire de tau441 inséré dans le vecteur eucaryotique a été analysée; elle est identique à celle publiée par Goedert et collaborateurs (1989).

II- CULTURE CELLULAIRE

Le neuroblastome appartient au groupe des tumeurs de la crête neurale; c'est l'une des tumeurs malignes les plus fréquentes chez l'enfant (Young et Miller, 1975). Les lignées cellulaires Kelly et SKNSH-SY 5Y sont des lignées de neuroblastomes humains. Toutes deux présentent une morphologie de type neuroblaste et sont commercialisées par la Collection Européenne de Cultures Cellulaires (ECACC).

II- 1- Les cellules SY 5Y

II- 1- 1- Description de la lignée

La lignée cellulaire SKNSH-SY 5Y a été établie à partir des cellules de neuroblastomes d'origine humaine, les cellules SKNSH (Biedler *et al.*, 1973, 1978). Ces cellules présentent une morphologie de type neuroblastique, avec des propriétés noradrénergiques, des activités enzymatiques spécifiques des neurones, l'internalisation de norepinéphrine, ainsi que la présence de neurofilaments (Ciccarone *et al.*, 1989). Ces cellules peuvent convertir le glutamate en neurotransmetteur GABA.

Ces cellules sont capables de se différencier, sous l'effet d'agents chimiques, en émettant de longs prolongements. Traitées par l'acide rétinoïque (AR), elles présentent une morphologie caractéristique des cellules ganglionnaires du système sympathique (Safaei *et al.*, 1992). La différenciation de ces cellules peut être, également, induite par le facteur de croissance neuronal (NGF ou Nerve Growth Factor) (Biedler *et al.*, 1978). D'autres facteurs peuvent également conduire à la différenciation des SY 5Y: il s'agit de l'insuline, l'IGF (Insulin like Growth Factor) (Recio-Pinto and Ishii, 1984), le PDGF (Platelet Derived Growth Factor), par des activateurs de la PKC, comme le TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate), ou des inhibiteurs de la PKC, comme la staurosporine (Leli *et al.*, 1992). Certains auteurs utilisent une combinaison d'agents inducteurs, tels que l'acide rétinoïque ou le NGF. Ainsi, l'association du NGF, de l'acide rétinoïque et du dibutyryl AMPc, conduit à la formation de croissances neuritiques de manière plus prononcée (Safaei *et al.*, 1992).

Le TPA augmente également le contenu en catécholamines des cellules et l'activité de la NSE (neuron-specific enolase). Il augmente également la synthèse du récepteur à l'IGF I. Par contre, la différenciation de ces cellules est accompagnée d'une diminution de

l'activité des PKC; les isoformes α , $\beta 1$, γ et ϵ des PKC sont exprimées dans les cellules non différenciées. Elles sont réparties dans le cytoplasme et au niveau de la membrane plasmique (Leli *et al.*, 1992). L'activation de PKC, dans ces cellules, conduit à la sécrétion de noradrénaline, qui est dépendante du calcium (Murphy *et al.*, 1991, 1992; Turner *et al.*, 1994). Cette sécrétion pourrait également être médiée par les annexines II et V, qui sont exprimées par les cellules SY 5Y. Elles sont respectivement localisées au niveau de la membrane plasmique (annexine II), du cytoplasme et du noyau (annexines V) (Blanchard *et al.*, 1996). Les annexines I, IV et VI sont également exprimées.

De plus, le processus de différenciation neuronale implique l'expression d'une large variété de protéines, qui sont exclusivement exprimées dans les neurones. Ces protéines comprennent les neurotransmetteurs, des récepteurs, des canaux ioniques et des composants des structures spécialisées que sont les axones ou les dendrites. La présence de facteurs de transcription spécifiques pourrait également jouer un rôle important dans la différenciation du tissu neuronal. La présence de différents transcrits des gènes HOX2 a été décrite dans les cellules SY 5Y (Safaei *et al.*, 1992). Ces gènes sont localisés en groupe, sur le chromosome 17 (Boncinelli *et al.*, 1989), et joueraient un rôle dans la différenciation neuronale chez les vertébrés. Les cellules SY 5Y expriment également le proto-oncogène bcl-2 (Reed *et al.*, 1991; Hanada *et al.*, 1993). La présence et l'expression de ce proto-oncogène seraient impliquées dans la réduction de la mort des cellules, provoquée par le composé MPP⁺ (1-méthyl-4-phényl-pyridinium) (Itano et Nomura, 1995). Au cours de la différenciation par le TPA ou l'AR, le niveau de bcl-2 est augmenté (Hanada *et al.*, 1993; Itano *et al.*, 1996). Cette expression serait régulée, positivement par la PKC, négativement par la PKA, et pourrait jouer un rôle important dans la réduction de l'apoptose cellulaire (Itano *et al.*, 1996). Lors de la différenciation par le TPA et le PDGF, l'expression des gènes codant pour la protéine GAP 43 ou le NPY est augmentée (Pahlman *et al.*, 1992). La différenciation induite par

l'IGF, quant à elle, augmente l'expression des ARNm des neurofilaments de 68 et 170 kDa, des ARNm des tubulines α et β (Wang *et al.*, 1992), et diminue celle des ARNm de l'oncogène c-myc (Sumantran et Feldman, 1983). Enfin, les cellules SY-5Y dérivent de la lignée SKNSH qui porte un gène relié aux gènes Ha- et Hi-ras (N-ras) (Shimizu *et al.*, 1983).

Les cellules expriment différents types de récepteurs: des récepteurs au facteur de croissance PDGF, des récepteurs de type α et β (Pahlman *et al.*, 1992), des récepteurs nicotiniques (Gould *et al.*, 1992), les récepteurs muscariniques m1, m2 et m3 (Steel et Buckley, 1993), des récepteurs au glutamate (Naarala *et al.*, 1993), et des récepteurs aux opioïdes de type μ et δ (Kazmi et Mishra, 1986).

Les récepteurs muscariniques, de type m3 sont couplés au métabolisme des phospholipides, et à l'entrée de calcium dans les cellules SY 5Y. Les récepteurs aux opioïdes, de type μ et δ , sont couplés à l'inhibition de l'adényl cyclase (Kazmi et Mishra, 1987; Sadée *et al.*, 1987), et aux canaux calciques dépendant du courant (Seward *et al.*, 1989).

L'activation des récepteurs nicotiniques conduit à la libération de noradrénaline (Gould *et al.*, 1992), par activation des canaux calciques de type L (Vaughant *et al.*, 1993), qui sont retrouvés à la surface des cellules (Reuveny et Narahashi, 1993).

Les cellules expriment également des récepteurs aux NMDA, AMPA et kainate, ainsi que des récepteurs couplés aux protéines G, liés au métabolisme des phospholipides (Naarala *et al.*, 1993). Les cellules expriment différentes sous-unités de protéines G : $G_{s\alpha}$, $G_{i\alpha1}$, $G_{i\alpha2}$, $G_{o\alpha}$, $G_{2\alpha}$ et G_{β} . Ce profil ressemble à celui observé dans les tissus du système nerveux central (Ammer et Schulz, 1993). Le traitement de ces cellules par l'AR permet une augmentation des sites de liaison aux opioïdes de type m, ainsi qu'une augmentation des protéines G inhibitrices, $G_{i\alpha1}$, $G_{i\alpha2}$. Ce traitement conduit également à une augmentation du nombre de sites à la prostaglandine E1, ainsi qu'à une augmentation de l'activité de l'adényl cyclase, stimulée par la prostaglandine E1 (Ammer et Schulz, 1994).

Par contre, la différenciation par le TPA ne modifie pas l'abondance des protéines G, suggérant une spécificité d'action pour l'acide rétinoïque dans ces cellules SY 5Y (Ammer et Schulz, 1994).

Enfin, ces cellules expriment les sous unités $\beta 1$ des intégrines (Rossino *et al.*, 1991), dont l'implication en tant que récepteur membranaire dans l'initiation de signaux de transduction a été établie (Guan *et al.*, 1991; Hynes *et al.*, 1987, 1992).

Ces cellules sont de plus en plus étudiées, aussi bien dans un contexte de différenciation, d'interprétation de sécrétion de neurotransmetteurs, de tolérance aux opioïdes, de toxicité par le peptide amyloïde que dans les mécanismes aboutissant à l'apoptose cellulaire.

II- 1- 2- Entretien de la lignée

Les cellules SKNSH-SY 5Y ont été maintenues dans du milieu défini DMEM (Dubelco's Modified Eagle's Medium) (GIBCO BRL) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Boehringer/ Mannheim), 2 mM de L-glutamine, 50 mg/ml de Pénicilline, 50 U/ml de Streptomycine et l'ajout d'acides aminés non essentiels. Elles sont cultivées, dans des conditions aseptiques, dans des boîtes de 25 ou 75 cm², dans une atmosphère contenant 5% de CO₂. Le milieu est renouvelé, tous les 2 à 3 jours, selon la croissance des cellules.

La différenciation des cellules a été réalisée par un traitement au NGF, dans un milieu défini. Quand les cellules sont à 30% de confluence, le milieu de MEN est éliminé et remplacé par un milieu sans sérum, composé d'un mélange de 1:1 (volume/volume) de MEM et d'Ham's-F12, complémenté avec 5 mg/ml d'Insuline, 100 mg/ml de Transferrine, 30 nM de Sélénite, 20 nM de Progestérone, 50 mg/ml de Pénicilline, 50 U/ml de Streptomycine et 10 ng/ml de NGF (Sigma, Saint-Louis, MO). Le milieu de

culture était renouvelé tous les deux jours. La différenciation par le NGF a été réalisée durant une période de huit jours.

La différenciation cellulaire par l'acide rétinoïque (Sigma) a été réalisée de manière identique, en remplaçant le NGF par l'acide rétinoïque (3 mg/ ml), durant cinq jours .

II- 2- Les cellules Kelly

II- 2- 1- Description de la lignée cellulaire

Ces cellules sont beaucoup moins décrites, dans la littérature, que les cellules SY 5Y. Cette lignée cellulaire a été décrite, pour la première fois, en 1983 (Schwab *et al.*, 1983).

Contrairement aux cellules SY 5Y, les cellules Kelly montrent une capacité limitée à développer des extensions neuritiques, même après un traitement prolongé avec différents agents associés (acide rétinoïque, NGF et le dibutyryl AMPc) (Safaei *et al.*, 1992). Bien que cette lignée cellulaire ne présente pas de modification morphologique majeure, des études ont montré la présence d'autres caractéristiques de différenciation neuronale dans ces cellules traitées par différents agents, comme l'acide rétinoïque et l'herbimycine A (Preis *et al.*, 1988; Yu *et al.*, 1990).

De plus, le processus de différenciation neuronale implique l'expression d'une large variété de protéines, exclusivement exprimées dans les neurones, comprenant le métabolisme de neurotransmetteurs, des récepteurs, des canaux ioniques et des composants des structures spécialisées que sont les axones ou les dendrites. La présence de facteurs de transcription spécifiques pourrait également jouer un rôle important dans la différenciation du tissu neuronal. La présence de différents transcrits des gènes HOX2 a été décrite dans les cellules Kelly (Safaei *et al.*, 1992). Ces gènes sont localisés en groupe,

sur le chromosome 17 (Boncinelli *et al.*, 1989), et joueraient un rôle dans la différenciation neuronale chez les vertébrés.

L'oncogène N-myc est localisé sur la partie distale du chromosome 2, et il est considéré comme un marqueur spécifique du neuroblastome (Seeger *et al.*, 1985). Les cellules Kelly présentent une amplification génomique de cet oncogène et l'expriment à un taux élevé, aussi bien au niveau des transcrits qu'au niveau des protéines (Schwab *et al.*, 1983).

Enfin, ces cellules présentent des sites de liaison aux β -endorphines (Wesphalt *et al.*, 1984).

II- 2- 2- Entretien

Les cellules Kelly ont été maintenues dans du milieu défini, élaboré par Moore et collaborateurs (1967), le RPMI-1640 (GIBCO BRL), supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Boehringer/ Mannheim), 2 mM de L-glutamine, 50 mg/ml de Pénicilline, 50 U/ml de Streptomycine. Elles sont cultivées, dans des conditions aseptiques, dans des boîtes de 25 ou 75 cm² dans une atmosphère contenant 5% de CO₂. Le milieu est renouvelé, tous les 2 à 3 jours, selon la croissance des cellules.

II- 3- Repiquage ou récupération des cellules

Après avoir éliminé le milieu des boîtes, les cellules sont rincées par une solution de PBS stérile, sans calcium ni magnésium, puis incubées pendant quelques minutes avec une solution de PBS contenant 2% de trypsine. Les cellules se décollent, puis sont récupérées et centrifugées à 1500 rpm, pendant 5 min. Le culot de cellules est remis en suspension dans du milieu complet approprié, et réparti dans de nouvelles boîtes.

Lors de la récupération des cellules pour une extraction protéique, toutes ces étapes sont réalisées sur la glace et la trypsine est remplacée par du versen. L'asepsie n'est alors pas nécessaire. Dans ce cas, le culot cellulaire est repris par la solution réductrice de Laemmli, lorsque les cellules sont tout de suite analysées sur gel, ou par un autre tampon, approprié au traitement ultérieur des cellules.

II- 4- Traitement des cellules par l'inhibiteur de protéines phosphatases, l'acide okadaïque (AO)

L'AO (250 nM) est ajouté au milieu de culture cellulaire. Les cellules sont traitées par ce milieu pendant 6 heures. Au cours du traitement, les cellules se détachent de leur support. Elles sont alors récupérées, par centrifugation, à 1500 rpm, pendant 5 min, à 4°C. Le culot cellulaire est repris dans une solution de Laemmli réductrice et chauffé, 10 min, à 100°C.

II- 5- Expériences de transfection

Les techniques les plus communément employées, pour l'introduction d'ADN dans les cellules eucaryotes, utilisent du phosphate de calcium, du DEAE-dextran, des liposomes ou encore la création de perforations dans la membrane plasmique, par électroporation. Pour transférer le plasmide pcDNA3.1-tau441 dans les cellules de neuroblastomes, nous avons choisi d'utiliser la technique de lipofection. Les lipides Tfx 10, 20 et 50 que nous avons utilisés, sont commercialisés par la société Promega. Ces lipides sont des mélanges d'une molécule synthétique lipidique, chargée positivement, et d'un L-dioleoyl phosphatidyléthanolamine (DOPE). C'est la quantité de ce DOPE qui différencie les 3 composés lipidiques Tfx10, 20 et 50.

Cette méthode de transfection consiste en la formation de complexes lipide/ADN plasmidique, qui résultent de l'association des groupes phosphates (chargés négativement) de l'acide nucléique, et la tête cationique du lipide, qui se présente sous la forme de vésicules multi-lamellaires. Cette association pourrait faciliter le transfert d'ADN dans les cellules, par fusion de ces vésicules avec la membrane plasmique.

Les cellules sontensemencées dans des plaques 24 puits, ou des boîtes de 60 mm de diamètre, de manière à obtenir environ une confluence de 80%, le jour de la transfection. La mise au point des conditions de transfection a été réalisée sur des plaques de 24 puits. Le plasmide utilisé a été purifié par ultracentrifugation en chlorure de césium (Sambrouck *et al.*, 1989). La concentration de l'ADN est ensuite évaluée, par la mesure de l'absorbance, à 260 nm. L'absence de protéines et de produits chimiques a été vérifiée par la mesure du rapport entre les absorbances de la solution d'ADN plasmidique, aux longueurs d'ondes de 260 et 280 nm. Le rapport est de 2 et permet donc l'utilisation de ce plasmide pour les expériences de transfection. Plusieurs quantités d'ADN plasmidique (0,25; 0,5; 0,75; 1 μg) sont mélangées au lipide, avec différents rapports de charge lipide: ADN plasmidique 2:1 (5,25 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ d'ADN plasmidique), 3:1 (7,9 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$) et 4:1 (10,5 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$). Selon les composés lipidiques et les lignées cellulaires, plusieurs conditions ont ainsi été testées (cf Résultats).

Les cellules sont incubées avec 200 μl de milieu, sans sérum de veau foetal, contenant l'ADN plasmidique, ainsi que le composé lipidique, pendant 1 à 2 heures. Au terme de cette incubation, 1 ml de milieu complet est rajouté par puits. Les cellules témoins sont traitées de manière similaire, mais l'addition d'ADN plasmidique est omise. Les cellules sont récupérées, à 4°C, après 48 heures de traitement. Après centrifugation, à 1500 rpm, pendant 5 min (4°C), le culot cellulaire est repris dans la solution réductrice de Laemmli, et chauffé à 100°C, pendant 10 min. Les protéines sont ensuite séparées, par électrophorèse, et analysées par la technique des immunoempreintes.

Lorsque les conditions optimales ont été ainsi déterminées, les transfections sont réalisées, dans des boîtes de 60 mm de diamètre. Dans ces boîtes, les cellules Kelly, à 80% de confluence, sont incubées avec 2 ml de milieu RPMI-1640 sans sérum, renfermant 5 µg d'ADN plasmidique et 39,4 µg de lipide Tfx 50. Après 1 heure de transfection, 4 ml de milieu complet sont rajoutés. Le lendemain de la transfection, le milieu est renouvelé, tandis que les cellules sont récupérées après 48 heures. Les cellules témoins ont été traitées de manière similaire, mais l'ADN plasmidique n'a pas été ajouté au milieu de culture. Après centrifugation à 1500 rpm, pendant 5 min (4°C); le culot cellulaire est repris dans une solution réductrice de Laemmli et chauffé, à 100°C, pendant 10 min. Les protéines sont ensuite séparées par électrophorèse et analysées par la technique des immunoempreintes.

II- 6- Etablissement de lignées stables de Kelly exprimant l'isoforme tau441

La sélection de clones, exprimant l'isoforme tau441, est basée sur la résistance de ces clones à la Généticine. La résistance à cet antibiotique est apportée aux cellules par le plasmide pcDNA3, contenant l'ADNc de l'isoforme tau441 (cf Matériels et Méthodes).

II- 6- 1- Détermination de la dose minimale létale de Généticine pour les cellules Kelly natives

Le traitement des cellules natives, par différentes concentrations de Généticine (de 100 à 800 µg/ml), a permis de déterminer la concentration de 400 µg/ml comme concentration adéquate pour empêcher la croissance des cellules Kelly natives, et provoquer leur mort. Afin d'obtenir la formation de clones stables, nous nous sommes également assurés de la capacité des cellules Kelly à croître sous la forme de clones isolés.

II- 6- 2- Sélection des clones

24 heures après la transfection, les cellules sont divisées au 1/4 et sont réparties dans 4 boîtes de 60mm. A partir de ce moment-là, les cellules sont traitées par la Généticine à 400µg/ml. Parallèlement, une boîte de cellules Kelly natives est également divisée et répartie, à la même dilution, dans 4 boîtes. Dans deux des boîtes, les cellules sont cultivées, sans l'antibiotique, permettant ainsi le contrôle de la croissance normale des cellules Kelly. Dans les deux autres boîtes, les cellules sont traitées par la Généticine, afin de contrôler l'efficacité du traitement.

Après 15 jours de culture dans les conditions sélectives, les premiers foyers de résistance apparaissent. Cent clones sont prélevés, par pipetage avec un pipetman, et sont repris dans des boîtes multi-puits de Falcon (de la taille 96 puits). Quand les cellules arrivent à confluence, elles sont réparties dans trois puits de même taille. Les cellules de ces trois puits, à confluence, sont ensuite réparties dans un puits de taille supérieure (les puits de taille 48puits), et sont cultivées ainsi jusqu'à l'obtention de trois puits de taille 24 puits. A ce stade, un puits de cellules est congelé, un puits est repris dans la solution réductrice de Laemmli, pour analyser son contenu protéique par électrophorèse, tandis que le troisième puits sert au maintien de la lignée. Une centaine de clones a ainsi pu être isolée et congelée.

III- RECHERCHE DE L'ACTIVITE PHOSPHATASIQUE ENDOGENE

Pour éviter l'activité des protéines phosphatases endogènes, les cellules sont récoltées, à 4°C, par centrifugation, puis le culot cellulaire est remis en suspension dans un tampon froid (Tris Hcl 10 mM, pH 7,4; NaCl 50 mM; CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, EDTA 0,5 mM), contenant des inhibiteurs de protéases (PMSF 1 mM; Leupeptine 2µg/ml;

aprotinine 1 µg/ml) ou des inhibiteurs de tyrosine phosphatases (orthovanadate de sodium 5 mM). Les cellules sont ensuite homogénéisées dans un broyeur de Dounce (10 coups de piston), à 4°C. Une étude de cinétique de déphosphorylation a été réalisée, en plaçant le lysat à 37°C, et en prélevant des fractions équivalentes du lysat au cours du temps. La réaction est arrêtée par l'ajout d'acide okadaïque (250 nM final), pour stopper l'activité des protéines phosphatases. Les échantillons sont ensuite mélangés à un volume égal de solution de Laemmli (2X), puis chauffés à 100°C, pendant 10 min, avant d'être déposés sur gel SDS-PAGE.

IV- LE FRACTIONNEMENT CELLULAIRE

Le fractionnement cellulaire est réalisé selon la méthode de Fey et collaborateurs (1984). Cette technique permet de séparer le cytoplasme, le cytosquelette et la fraction noyau/filaments intermédiaires. Après centrifugation, les cellules sont remises en suspension dans un tampon (Tris HCl 10 mM, pH 6,8; MgCl₂ 3 mM, NaCl 100 mM, sucrose 300 mM, Triton X-100 0,5%), ainsi que des inhibiteurs de protéases (leupeptine 2 µg/ml, aprotinine 2 µg/ml, PMSF 5mM), à 4°C, et sont maintenues sur la glace, pendant 10 min. Après centrifugation, à 4°C, et à 1500 rpm, pendant 10 min, le surnageant, qui correspond à la fraction cytosolique, est prélevé et mélangé à un volume égal de solution de Laemmli (2X). Le culot est remis en suspension dans un tampon (Tris HCl 10 mM, pH 6,8; MgCl₂ 3 mM, SO₄(NH₄)₂ 250 mM, sucrose 300 mM, Triton X-100 0,5%), et maintenu, à 4°C, pendant 10 min. L'échantillon est ensuite centrifugé (1500 rpm, 4°C). Le surnageant correspond alors à la fraction cytosquelettique, tandis que le culot contient les filaments intermédiaires et les noyaux. Ces fractions sont homogénéisées avec un volume égal de solution de Laemmli (2X).

Les trois fractions sont ensuite dénaturées par la chaleur (100°C), pendant 10 min, et analysées par la technique des immunoempreintes.

V- ANALYSE DE LA SOLUBILITE DES PROTEINES

Les cellules, traitées préalablement par l'acide okadaïque (250 nM), ou non, pendant 6 heures, sont décollées et collectées, à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot cellulaire est repris dans un tampon hypotonique, contenant des inhibiteurs de protéases (PMSF 1 mM; Leupeptine 2µg/ml; aprotinine 1µg/ml), de tyrosine phosphatases (orthovanadate de sodium 5 mM) ou de Thr/Ser phosphatases (acide okadaïque 250 nM, EGTA 1 mM), afin de maintenir l'échantillon dans son état initial. Le lysat cellulaire, obtenu après éclatement des cellules dans un homogénéisateur de Dounce (10 coups de piston), est ensuite soumis à une ultracentrifugation à, 100 000 x g, pendant 45 min. Toutes ces étapes sont réalisées à 4°C.

Le surnageant est mélangé à la solution de Laemmli (1/3; v/v), tandis que le culot est directement repris dans cette solution; ces échantillons sont alors chauffés 10 min, à 100°C.

VI-ANALYSE DES PROTEINES

VI- 1- Solution réductrice de Laemmli (Laemmli, 1970)

Les échantillons sont homogénéisés dans la solution de Laemmli 1 X (Tris HCl, 50 mM, pH 6,8; SDS, 5% (P/V); EDTA, 4 mM; Glycérol, 10% (V/V)). Cette solution est stockée à -20°C. Puis, du Bleu de bromophénol (traces) ainsi que du Dithiothreitol (DTT) (0,25% (P/V)), sont rajoutés extemporanément.

VI- 2- Séparation des protéines par électrophorèse

VI- 2- 1- Electrophorèse monodimensionnelle en gel SDS

Cette technique permet de séparer les protéines selon leur masse moléculaire.

VI- 2- 1- 1- Gel de séparation à pourcentage d'acrylamide/bis acrylamide constant

pH8,8	Solution d'acrylamide 7,5%	Solution d'acrylamide 10%
Tris HCl	0,3 M	0,3M
Acrylamide	7,5% (P/V)	10% (P/V)
Bisacrylamide	0,200% (P/V)	0,200% (P/V)
H ₂ O	qsp 10 ml	qsp 10 ml

Le SDS 0,1% est ajouté extemporanément. La polymérisation des gels est amorcée par l'addition de 100 µl de persulfate d'ammonium (100 mg/ml), 10 ml de solution d'acrylamide et 10 µl de TEMED. Ces gels sont réalisés sur les mini-cuves Hoeffer, dont les dimensions varient selon les analyses. trois systèmes ont ainsi été utilisés: 100 x 100 x 1 mm, 105 x 100 x 0,75 mm et 120 x 100 x 1 mm. La séparation des protéines est réalisée, pendant environ 1 heure, à 20 mA constant.

VI- 2- 1- 2- Gels de séparation en gradients

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

pH 8,8	Solution d'acrylamide 10%	Solution d'acrylamide 20%
Tris HCl	0,3 M	0,3M
Acrylamide	10% (P/V)	20% (P/V)
Bis acrylamide	0,266% (P/V)	0,532% (P/V)
SDS	0,1% (P/V)	0,1% (P/V)
Temed	300 µl	300 µl
Glycérol		200 ml
H ₂ O	qsp 1000 ml	qsp 1000 ml

La polymérisation des gels est amorcée par l'addition de 200 µl de persulfate d'ammonium (100 mg/ml) par 27 ml de solution d'acrylamide. La dimension des plaques est de 140 x 140 x 1,5mm, lorsque ces gels sont réalisés. La séparation des protéines est généralement réalisée pendant la nuit, à 70V constant.

point isoélectrique (pI). La deuxième dimension permet de séparer ensuite les protéines en fonction de leur masse moléculaire, sur un gel d'acrylamide, dont le gradient varie de 10 à 20% (SDS-PAGE). Les protéines, ainsi séparées, sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose et analysées selon la technique des immunoempreintes. Cette technique a été mise au point, dans le laboratoire, par le doctorant Nicolas Sergeant, dirigé par le Docteur André Delacourte. La première dimension a été décrite dans plusieurs articles (Sergeant *et al.*, 1997a,b), ainsi que dans nos annexes 1 et 4.

VI- 3- Electrotransfert

Après électrophorèse, les protéines sont transférées sur des membranes de nitrocellulose (0,45 µm de Schleicher et Schuell), pendant 55 min, pour un gel de dimension 12 x 10 cm (avec un courant de 0,8 mA/cm²), en milieu semi-liquide, sur Multiphor II Nova Blot (LKB), selon les instructions du fabricant (tampon "anode" (Tris 0,3M, pH 10,4; méthanol 20% (V/V)) et tampon "cathode" (acide 6 -amino-n-hexanoïque 40 mM, pH 7,6; méthanol 20% (V/V)).

Une coloration réversible des protéines par le rouge ponceau (acide trichloroacétique 3% (P/V); rouge ponceau 0,2% (P/V)), permet de contrôler l'efficacité du transfert, ainsi que la charge protéique.

VI- 4- Techniques immunologiques

VI- 4- 1- Techniques des immunoempreintes

La technique des immunoempreintes est réalisée selon une modification de la méthode de Towbin et collaborateurs (1979). La saturation est réalisée par un tampon TNT

(Tris-HCl 15 mM, pH 8; NaCl 0,3 M; Tween-20 0,05% (P/V)), contenant 5% (P/V) de lait délipidé, pendant 45 min.

Les différents anticorps primaires sont dilués dans le tampon TNT, avec ou sans lait, et l'incubation réalisée pendant 90 à 120 min à température ambiante, ou pendant toute la nuit, à 4°C.

Les anticorps secondaires sont des immunoglobulines anti-souris ou anti-lapin (selon l'anticorps primaire), obtenues chez la chèvre. Ces anticorps sont marqués à la peroxydase (Sigma). Ils sont également dilués au 1/4000 dans du tampon TNT, avec ou sans lait. L'incubation dure de 45 à 60 min à température ambiante.

La détection des complexes "antigènes-anticorps primaire-anticorps secondaire marqué à la peroxydase" se fait par le kit de détection ECL (Enhanced chemiluminescence), commercialisé par la société Amersham. Le principe de cette méthode est l'émission d'une lumière libérée par une substance se trouvant dans un "état excité". Dans ce cas, il s'agit de l'oxydation du luminol (dérivé cyclique), en présence d'eau oxygénée et de peroxydase. Pour revenir à un état stable, le luminol émet une lumière, dont l'intensité est fortement augmentée par des résidus phénoliques. Cette émission de lumière impressionne alors un film (Hyperfilm, Amersham). Le signal obtenu sur le film permet de visualiser les protéines identifiées par l'anticorps.

Une même membrane de nitrocellulose peut être incubée, successivement, par différents anticorps. Les premiers anticorps sont éliminés, par lavage de la membrane, une nuit, à température ambiante, avec une solution dénaturante (chlorhydrate de guanidine 3M, Dithioerythrol 50 mM), afin d'éliminer les anticorps précédents, fixés aux protéines. L'efficacité de la technique est vérifiée par incubation de la membrane avec l'anticorps secondaire. L'absence d'immunomarquage avec le kit ECL (Amersham) confirme la perte de l'immunomarquage précédent. La membrane peut donc être utilisée pour un nouvel anticorps.

VI- 4- 2- Les différents anticorps utilisés

VI- 4- 2- 1- Les anticorps monoclonaux

VI- 4- 2- 1- 1- Anticorps dirigés contre les protéines tau

L'état de phosphorylation des protéines tau a été analysé, grâce à différents anticorps dépendant de la phosphorylation.

VI- 4- 2- 1- 1- 1- Anticorps détectant un épitope lorsqu'il est phosphorylé

L'anticorps AT8 (Innogenetics, Gand, Belgique; Mercken *et al.*, 1992; Goedert *et al.*, 1993, 1995) est dirigé contre les résidus Ser202 et 205 phosphorylés. Il a été utilisé à la dilution de 1/100^e. Les anticorps AT180 (1/2000^e) et AT 270 (1/500^e) (Innogenetics, Gand, Belgique; Mercken *et al.*, 1992; Rösner *et al.*, 1995), AD2 (1/8000^e) (Buée-Scherrer *et al.*, 1996) et 12E8 (1/2000^e) (Seubert *et al.*, 1995), sont tous des anticorps monoclonaux, dirigés respectivement contre les résidus Thr231, Thr181, Ser396/404, Ser262/356, lorsqu'ils sont phosphorylés (FIGURE 46). Ces sites sont hautement phosphorylés sur les protéines tau-PHF, et beaucoup plus faiblement sur les protéines tau biopsiques.

L'anticorps AT10 (Mercken *et al.*, 1992; Hoffmann *et al.*, 1997) est spécifique des protéines tau-PHF et marque les Thr212 et Ser214, lorsqu'elles sont phosphorylées; cet anticorps a été utilisé à la dilution 1/500^e.

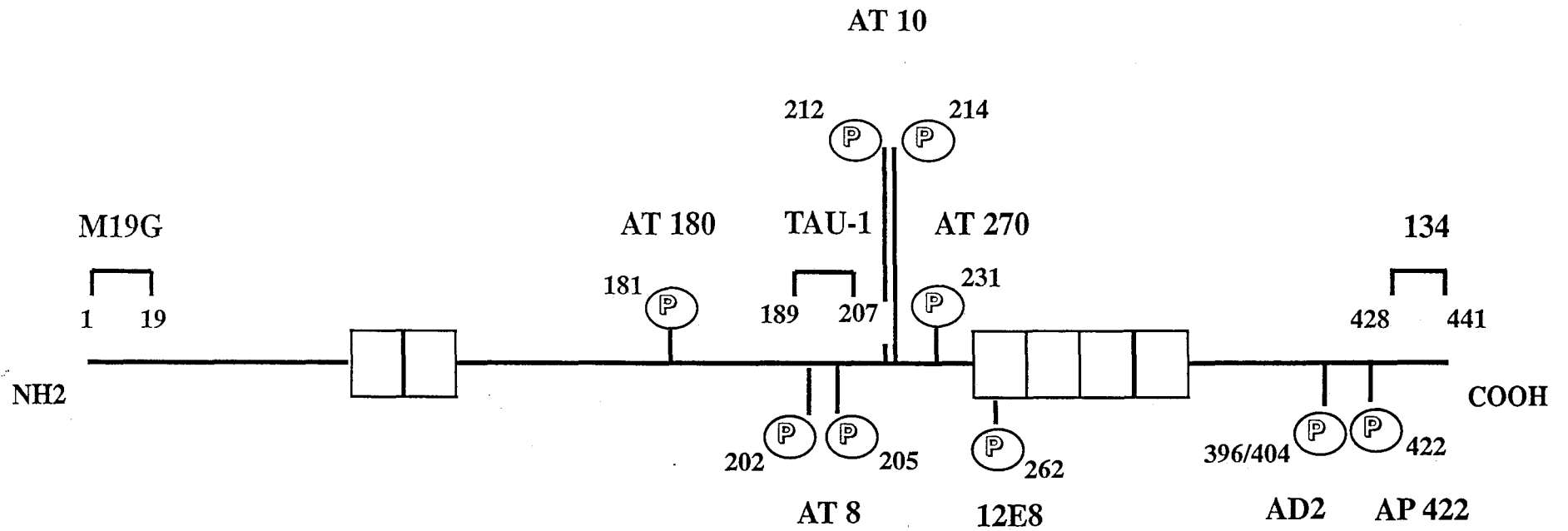


Figure 46: Localisation des épitopes sur l'isoforme la plus longue des protéines tau reconnus par les différents anticorps dépendant de la phosphorylation que nous avons utilisés dans notre étude.

VI- 4- 2- 1- 1- 2- Anticorps détectant un épitope lorsqu'il n'est pas phosphorylé

L'anticorps Tau-1 (Boehringer Mannheim) est dirigé contre la région s'étendant des résidus 189 à 207 de la protéine tau441 humaine. La phosphorylation d'un résidu séryl, dans cette région, empêche la reconnaissance par l'anticorps (Szendrei *et al.*, 1993). Il est utilisé à la dilution 1/1000^e.

VI- 4- 2- 1- 2- Anticorps monoclonal dirigé contre les neurofilaments

L'anticorps monoclonal SMI 31 reconnaît un épitope phosphorylé dans le domaine carboxy-terminal des sous unités NF-M et NF-H des neurofilaments (Sternberger et Sternberger, 1983). L'anticorps a été utilisé à la dilution 1/2500^e ou 1/5000^e.

VI- 4- 2- 1- 3- Anticorps monoclonal dirigé contre l'apo E

L'anticorps monoclonal EO-1 est dirigé contre un épitope localisé sur la partie amino-terminale de l'apo E (Leroy *et al.*, 1988). Cet anticorps a été utilisé, dans certaines études (Gracia *et al.*, 1994; Buée *et al.*, 1996; Lefranc *et al.*, 1996), et nous l'avons utilisé à la dilution 1/2500^e. Cet anticorps nous a été généreusement donné par le Dr. J.C. Fruchart.

VI- 4- 2- 1- 4- Anticorps monoclonal dirigé contre la ... protéine gliale acide fibrillaire (GFAP)...

Un anticorps monoclonal, développé dans le laboratoire (David *et al.*, 1994), l'anticorps GF5, est spécifique de cette protéines GFAP.

VI- 4- 2- 2- Les anticorps polyclonaux

VI- 4- 2- 2- 1- Les anticorps polyclonaux dirigés contre ... les protéines tau

L'anticorps M19G est un anticorps obtenu chez le lapin, après immunisation avec un peptide correspondant aux 19 premiers acides aminés de la protéine tau humaine (Sautière *et al.*, 1994).

L'anticorps 134 est un anticorps, également développé chez le lapin, dirigé contre les 14 derniers acides aminés des protéines tau (Goedert *et al.*, 1992c).

La présence des inserts amino- et carboxy-terminaux a été recherchée, à l'aide d'anticorps spécifiques de ces régions: l'anticorps 304 dirigé contre l'insert issu de la traduction de l'exon 2 (Goedert *et al.*, 1992c); les anticorps Tau-E3 et Tau-E10, développés dans le laboratoire, dirigés respectivement contre les inserts provenant de la traduction de l'exon 3 et de l'exon 10.

Ces anticorps ont été utilisés à la dilution 1/1000^e.

VI- 4- 2- 2- 2- Anticorps polyclonal dirigé contre les neurofilaments

L'anticorps polyclonal 345, reconnaît les trois sous unités des neurofilaments NF-L, NF-M, NF-H, quelque soit leur état de phosphorylation. Cet anticorps est utilisé à la dilution 1/1000^e.

VI- 4- 2- 2- 3- Anticorps dirigé contre l'apo E

L'anticorps polyclonal est dirigé contre la totalité de la protéine apo E et a été utilisé à la dilution de 1/2500^e. Cet anticorps nous a généreusement été donné par le Docteur J.C. Fruchart.

VI- 4- 3- Le dosage colorimétrique des protéines

La méthode utilisée est le dosage à l'acide bicinchoninique (Smith *et al.*, 1985). Il s'agit d'une variante de la réaction du Biuret. Les protéines réagissent avec les ions cuivriques pour former des ions cuivreux. Ces derniers se complexent avec l'acide bicinchoninique. Ce complexe présente une forte absorbance à 562 nm. Cette technique permet donc une quantification des protéines solubilisées en solution aqueuse. La limite de détection de cette méthode est de l'ordre de 50 µg/ml, dans les meilleures conditions.

VI- 4- 4- Quantifications

Les films ECL ont été digitalisés sur Compact Prolinea 4/33, à l'aide d'un scanner Sharp JX-325, et avec une résolution de 127 x 127 pixels. Ces images numérisés sont

enregistrées sous format TIFF, pour être analysées avec le logiciel Image Master (IM1D), de Phamacia Biotech., élaboré par W. Rasband (National institute of Health, USA).

VI- 4- 5- Techniques d'immunofluorescence

VI- 4- 5- 1- Perméabilisation des cellules avant fixation

(protocole adapté de l'étude de Lee et Rook, 1992)

Par cette technique, seules les protéines tau liées au cytosquelette sont visualisées. Les cellules Kelly natives, ou transfectées de manière stable, sont cultivées sur des lames, préalablement traitées par de la poly-L-lysine (Sigma). Les cellules sont rincées par le tampon PEM (PIPES 80 mM; EGTA 5 mM; MgCl₂ 1 mM; pH 6,8). Ces cellules sont ensuite incubées, pendant 30 secondes, dans un tampon de perméabilisation (tampon PEM, Triton X-100 0,1%; GTP 1mM; Glycérol 30%). Les cellules sont alors fixées pendant 10 min par de la glutaraldéhyde 0,3%, en présence de NP-40 (0,5%). Elles sont ensuite rapidement rincées par du tampon phosphate (NaH₂PO₄, 2H₂O 10 mM; Na₂HPO₄ 50 mM), puis les fonctions aldéhydes libres sont saturées par le traitement successif des cellules par de l'acide borohydrique (10 mg/ml), pendant 5 min, et par de la glycine, pendant 20 min. Les sites de liaison non spécifiques sont bloqués par l'incubation des cellules avec du sérum non-immun d'âne (5% dans le tampon phosphate 0,1 M, Triton X-100 0,25%). Après un rinçage rapide par le tampon phosphate (0,1M), les cellules sont incubées, pendant 90 min, avec l'anticorps polyclonal M19G (1/2500^e), ou l'anticorps Tau-E3 (1/10000^e), dirigé contre l'insert amino-terminal issu de la traduction de l'exon 3, diluées dans le tampon phosphate 0,1 M contenant 0,25% de triton X-100. Au terme de cette incubation, les cellules sont rincées et incubées avec l'anticorps secondaire, dirigé contre les immunoglobulines de lapin (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.), et couplé à la fluoréscéine (dilution 1/400^e). Après rinçage avec du tampon phosphate (0,1

M), les lames sont montées dans du vectaschield (Vector laboratories) avant d'être examinés au microscope à fluorescence Axiophot Zeiss, équipé d'un filtre fluoréscéine (495/15 nm).

VI- 4- 5- 2- Protocole ne comportant pas d'étape de perméabilisation

Par cette technique, toutes les protéines tau , solubles et liées au cytosquelette, sont visualisées.

Les cellules Kelly, natives ou transfectées de manière stable, sont cultivées sur des lames préalablement traitées par de la poly-L-lysine (Sigma). Les cellules sont rincées par le tampon PEM (PIPES 80 mM; EGTA 5 mM; MgCl₂ 1 mM; pH 6,8), puis directement fixées, pendant 10 min, par de la glutaraldéhyde 0,3%, en présence de NP-40 (0,5%). Les cellules sont ensuite traitées de façon identique au protocole précédemment décrit.

