

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE**

**UFR DE BIOLOGIE**

**Année : 1998**

**Numéro d'ordre :**

**THESE**

**Présentée à l'université de Lille I  
pour l'obtention du grade de  
Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé  
(Option Neurosciences)**

par

**Thierry BUSSIERE**

**DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX ANTICORPS CARACTERISANT  
LA DEGENERESCENCE NEUROFIBRILLAIRE DE TYPE ALZHEIMER.**

**APPLICATION AU DOSAGE DES PROTEINES TAU**

**DANS LE LIQUIDE CEPHALO-RACHIDIEN.**

Présentée le 18 Décembre 1998 devant le jury composé de :

**Rapporteurs :            Monsieur le Docteur Dominique CAMPION  
                                 Monsieur le Professeur Jean-Jacques HAUW**

**Examineurs :            Madame le Professeur Geneviève SPIK  
                                 Monsieur le Docteur Jean-Claude BEAUVILLAIN  
                                 Monsieur le Docteur Eric ROUVIER**

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



A Madame Jeanne Gilbert

A mes parents,

A mes frères et sœur,  
Jean-Philippe, Marie-Aude et Loïc,

A Monsieur Henri Bussière,  
A Madame Eliane Cesenni,

A mes filleuls et leurs parents,

Anaïs, Pierre et Sophie-Amely,

Laurent et Véronique,

Daniel et Aline,

Didier et Anne-Laure,

Ce travail a été réalisé dans l'unité 422 de l'INSERM (Directeur : Monsieur le Docteur Jean-Claude Beauvillain), au sein du groupe « Vieillesse Cérébrale et Dégénérescence Neuronale », sous la direction du Docteur André Delacourte.

Ce travail a bénéficié du soutien financier du Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille (Délégation à la Recherche) et de la Région Nord Pas-de-Calais.

J'exprime mes sincères remerciements à :

Madame le Professeur Geneviève Spik. Je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté sans aucune hésitation de juger ce travail. Soyez ici remerciée pour votre gentillesse et les encouragements que vous avez toujours manifesté lors de nos quelques échanges.

Monsieur le Docteur Dominique Champion. Votre connaissance de la maladie d'Alzheimer et des maladies neurodégénératives, et plus particulièrement des aspects génétiques et épidémiologiques, me rendent votre avis très précieux. Je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté de juger ce travail

Monsieur le Professeur Jean-Jacques Hauw. Je suis particulièrement honoré de votre présence parmi les membres de ce jury. Vos critiques et commentaires en tant que rapporteur m'ont été très utiles. Je retiendrai en particulier votre attachement au respect de l'éthique, qui doit toujours être considéré dans tout travail de recherche médicale. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude pour votre disponibilité et vos encouragements.

Monsieur le Docteur Jean-Claude Beauvillain. Ces quatre années passées au sein de votre unité m'ont permis d'apprécier votre gentillesse et votre disponibilité vis-à-vis de vos étudiants. Soyez assuré de ma profonde et sincère reconnaissance.

Monsieur le Docteur Eric Rouvier. Les quelques mois de travail en commun m'ont permis d'apprécier votre efficacité discrète et vos compétences techniques dans tous les domaines abordés. Je garderai de notre collaboration le souvenir d'un travail enrichissant, dans une ambiance toujours détendue basée sur la confiance réciproque. Je vous exprime ici mes très sincères remerciements amicaux pour votre aide et vos conseils.

Monsieur le Docteur André Delacourte. Soyez ici remercié de la confiance que vous m'avez accordée en m'acceptant dans votre équipe, sous votre tutelle, et en me confiant un projet dans lequel vous placiez de grands espoirs.

J'exprime également mes remerciements à :

Madame le Professeur Hélène Cailla. Vous avez dès le début manifesté un intérêt bienveillant à l'égard du projet de collaboration entre l'INSERM et la société Immunotech. Je vous remercie pour m'avoir accueilli au sein du département Immunoanalyses, et pour avoir permis le bon déroulement du projet.

Monsieur Frédéric Jean. En initiant la collaboration, vous nous avez permis de réaliser une grande partie de ce travail. Je vous suis très reconnaissant pour la confiance que vous m'avez toujours accordé, et l'intérêt constant que vous avez manifesté pour le projet malgré vos occupations. Votre accueil du « nordiste » dans la « ville de la Bonne Mère » et de la planche à voile (!) a toujours été sans faille, et restera pour moi un exemple du genre. Avec mes remerciements amicaux.

A Monsieur Christophe Barrande. Les quelques clones issus de la collaboration sont aussi les tiens. Merci pour les nombreuses heures passées devant ta hotte de culture ou les yeux rivés sur le microscope pour surveiller la croissance des précieuses cellules. Merci pour ton accueil chaleureux, sans oublier les repas à Luminy !

A Mademoiselle Béatrice Bourcier. Tes compétences techniques variées et ta disponibilité pour les faire partager sont pour moi un très bon souvenir, et un exemple. Je ne suis pas près d'oublier ta bonne humeur constante et les quelques conversations téléphoniques animées entre nord et sud. Merci encore !

A toutes les personnes de la société Immunotech, et en particulier Corinne, Emmanuel et Emmanuel (!), Claire, Jacques, Gilles, Jean-Philippe, Christophe et tous les autres !

A Monsieur le Docteur Patrick Hof. J'ai grandement apprécié votre promptitude pour répondre aux questions et la précision de vos corrections lors de la rédaction de l'article. Votre aide pour tester les nouveaux anticorps a également été d'une efficacité exemplaire. Je vous exprime ici mes sincères remerciements, en attendant de rejoindre prochainement votre laboratoire.

Aux Professeurs J.P. Brion, M.B. Delisle, C. Duyckaerts, A. Laquerrière, M.M. Ruchoux, aux Docteurs F. Chapon, C.A. Maurage, R. Mena et M. Mohr pour leur participation au travail de caractérisation des anticorps.

Je souhaiterais également remercier :

Le Docteur Luc Buée. Vos conseils et votre avis m'ont toujours été d'une grande utilité. Merci surtout pour la patience avec laquelle vous avez toujours répondu à mes questions ! Merci aussi pour votre amitié à laquelle j'associe Madame le Docteur Valérie Buée-Scherrer.

Mesdames les Docteurs Marie-Laure Caillet-Boudin et Marie-Christine Chartier-Harlin.

Le Docteur Didier Lefranc. Merci pour ton aide scientifique au cours des trois années communes au labo et des quelques nocturnes ! Merci également pour ton amitié et ta confiance.

Je ne voudrais pas oublier :

Madame Marie-Joëlle Dupire,  
Mademoiselle Stéphanie Ferreira  
Mademoiselle Christel Mailliot,  
Madame le Docteur Valérie Podevin-Dimster  
Madame Annick Wattez.

Ainsi que :

Cathia, Christine, Jean-Charles, Joëlle, Laetitia, Laurence, Nicolas, Yannick, et bien sur Claude, Sébastien et Vincent.

## - LISTE DES PUBLICATIONS -

1998

- **Bussière T.**, Hof PR., Mailliot C., Brown CD., Caillet-Boudin ML., Perl DP., Buée L., Delacourte A. *Phosphorylated serine422 on tau proteins is a pathologic epitope found in several diseases with neurofibrillary degeneration.* Acta Neuropathologica (sous presse).
- Mailliot C., **Bussière T.**, Caillet-Boudin M.L., Delacourte A., Buée L. *Alzheimer-specific epitope of AT100 in transfected cell lines with tau: toward an efficient cell model of tau abnormal phosphorylation.* Neurosci. Lett. 255(1) : 13-16.
- Mailliot C., Sergeant N., **Bussière T.**, Caillet-Boudin M.L., Delacourte A., Buée L. *Phosphorylation of specific sets of tau isoforms reflects different neurofibrillary degeneration processes.* FEBS Lett. 433 : 201-204.

1995

- Sergeant N., **Bussière T.**, Vermersch P., Lejeune JP., Delacourte A. *Isoelectric point differentiates PHF-Tau from biopsy-derived human brain Tau proteins.* Neuroreport. 6 : 2217-2220.

## - OUVRAGES -

- Delacourte A., Sergeant N., Robitaille Y., Buée-Scherrer V., Buée L., David JP., **Bussière T.**, Vermersch P., Hof PR., Gauvreau D., Wattez A. *Pathological Tau proteins are biochemical markers that differentiate several types of neurofibrillary degeneration* Alzheimer's disease : Biology, Diagnosis and Therapeutics. Eds Iqbal K., Winblad B. Nishimura T., Takeda M., Wisniewski HM. / John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK (1997) pp. 202-212.

## - LISTE DES COMMUNICATIONS -

1998

- Mailliot C., Sergeant N., **Bussière T.**, Delacourte A., Buée L. *Different sets of phosphorylated tau isoforms aggregate into filaments in neurodegenerative disorders*

allowing a differential biochemical diagnosis - Soc. Neurosci.Abstr., Los Angeles, CA, USA. 7 au 12 novembre 1998.

- **Bussièrè T.**, David JP., Sergeant N., Buée L., Watzèz A., Pasquier F., Lebert F., Ghozali F., Fallet-Bianco C., DiMenza C., Delacourte A. *The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer disease.* -6<sup>th</sup> International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders - Amsterdam - 18 , 23 juillet 1998.

- Buée L., **Bussièrè T.**, Mailliot C. , Sergeant N., Watzèz A., Delacourte A. *Les isoformes de protéines tau sont des marqueurs de sous-populations neuronales vulnérables dans les maladies neurodégénératives.* - Revue Neurologique (1998) ; 154, suppl. 1, E5.

#### 1997

- Perl DP., Soulié C., **Bussièrè T.**, Brown C., Valloton T., Hof PR., Delacourte A. *Presence of phosphorylated Serine 422 on Tau protein is common feature among neurodegenerative disorders.*- Soc. Neurosci.Abstr., New Orleans, LA, USA. 25 au 30 novembre 1997.

- Buée L., David JP., Podevin-Dimster V., **Bussièrè T.**, Permanne B., Buée-Scherrer V., Sergeant N., Ghozali F., Vermersch P., Lebert F., Pasquier F., DiMenza C., Delacourte A. *Diagnostic de la maladie d'Alzheimer : Etablissement de critères biochimiques* - 4<sup>ième</sup> Réunion Francophone sur le maladie d'Alzheimer et les syndromes apparentés, Montpellier, France, 2 au 4 octobre 1997.

- Hof PR., **Bussièrè T.**, Soulié C., Perl DP., Delacourte A. *Phosphorylation of Tau proteins on serine 422 in neurodegenerative disorders.* Brain Pathology (1997) ; vol.7, p.1109 - International Society of Neuropathology, Australia, August 1997.

#### 1995

- Delacourte A., Mourton-Gilles C., Buée-Scherrer V., Sergeant N., **Bussièrè T.**, Vermersch P., Robitaille Y., Gauvreau D. *AD2, a mab that differentiates by western-blotting between normal aging, Alzheimer's disease, progressive supranuclear palsy, Pick's disease and a subtype of frontal lobe degeneration.* Soc. Neurosci.Abstr., San Diego, CA, USA. 11 au 16 novembre 1995.



- **Bussière T.**, Sergeant N., Vermersch P., Lejeune J.P., Delacourte A. *Protéines Tau-PHF dans la maladie d'Alzheimer et protéines Tau normales biopsiques : analyse comparative en électrophorèse monodimensionnelle et bidimensionnelle.* 3<sup>ième</sup> Réunion Francophone sur la maladie d'Alzheimer et les syndromes apparentés, Lille, France, 13 et 14 octobre 1995.

- Delacourte A., Sergeant N., Mourton-Gilles C., Buée-Scherrer V., Buée L., Watzte A., David J.P., **Bussière T.**, Vermersch P., Pasquier F., Lebert F., Ruchoux M.M., Destée A., Leys D., Petit H., Robitaille Y., Gauvreau D., Tranchant C., Mohr M., Warter J.M., Ledoze F., Chapon F., Lechevallier B. *L'analyse qualitative et quantitative des protéines Tau pathologiques cérébrales permet de différencier sept types de processus dégénératifs.* 3<sup>ième</sup> Réunion Francophone sur le maladie d'Alzheimer et les syndromes apparentés, Lille, France, 13 et 14 octobre 1995.

- Sergeant N., **Bussière T.**, Vermersch P., Lejeune J.P., Delacourte A. *Les protéines Tau-PHF se différencient des protéines Tau issues de biopsies de cerveaux humains par leur point isoélectrique.* Congrès de la Société de Biologie du Vieillissement, Paris, le 09 juin 1995.

# TABLE DES MATIERES

**GENERALITES ..... 10**
**I- LES PROTEINES MICROTUBULAIRES TAU..... 10**
***I-1- INTRODUCTION ..... 10***
***I-1-1- Le cytosquelette neuronal..... 10***
***I-1-2- Les protéines associées aux microtubules (MAP) :..... 11***
***I-2- DU GÈNE AUX PROTÉINES TAU ..... 12***
***I-2-1- Localisation chromosomique ..... 12***
***I-2-2- Transcription du gène ..... 12***
***I-2-2-1- Epissage alternatif ..... 12***
***I-2-2-2- Expression différentielle au cours du développement ..... 13***
***I-2-2-3- Expression différentielle selon le type cellulaire ..... 13***
***I-3- ASPECTS MOLÉCULAIRES..... 14***
***I-3-1- Domaine amino-terminal..... 14***
***I-3-2- Domaine carboxy-terminal..... 15***
***I-4- ASPECTS FONCTIONNELS ..... 15***
***I-5- REPARTITION CELLULAIRE..... 16***
***I-6- LES PROTÉINES TAU, PHOSPHOPROTÉINES ..... 17***
***I-6-1- La phosphorylation, modification post-traductionnelle..... 17***
***I-6-2- Les enzymes de la phosphorylation ..... 17***
***I-6-2-1- Les protéines kinases ..... 18***
***I-6-2-2- Les protéines phosphatases ..... 19***
***I-7- LA PHOSPHORYLATION DES PROTÉINES TAU, PATHOLOGIE OU PHYSIOLOGIE? ..... 20***
***I-7-1- La phosphorylation, pathologie ..... 20***

<b>I-7-2- La phosphorylation, physiologie .....</b>	<b>21</b>
<b>I-7-3- Les sites de phosphorylation.....</b>	<b>24</b>
<b><u>II- DES PROTEINES TAU AUX PATHOLOGIES NEURODEGENERATIVES.....</u></b>	<b>28</b>
<b><i>II-1- DES PROTÉINES TAU AUX ANOMALIES DU CYTOSQUELETTE NEURONAL ET GLIAL.....</i></b>	<b>28</b>
<b>II-1-1- Les PHF de la dégénérescence neurofibrillaire.....</b>	<b>28</b>
II-1-1-1- Analyse ultrastructurale des PHF	28
II-1-1-2- Analyse moléculaire des PHF	29
II-1-1-3- Les PHF dans la maladie d'Alzheimer	31
<b>II-1-2- Les filaments droits de la dégénérescence neurofibrillaire .....</b>	<b>34</b>
II-1-2-1- Les filaments droits de la paralysie supranucléaire progressive	34
II-1-2-2- Les filaments droits de la dégénérescence corticobasale	34
<b>II-1-3- Les filaments torsadés des corps de Pick.....</b>	<b>35</b>
<b><i>II-2- DES ANOMALIES DU CYTOSQUELETTE AUX PATHOLOGIES NEURODEGENERATIVES.....</i></b>	<b>37</b>
<b>II-2-1- Maladie d'Alzheimer et démences apparentées.....</b>	<b>38</b>
II-2-1-1- La maladie d'Alzheimer	38
II-2-1-1-1- Aspects cliniques	39
a- Les symptômes	39
a-1- Troubles des fonctions cognitives	39
a-2- Troubles de la vie affective et comportementale	41
b- Le diagnostic	42
b-1- Le diagnostic de démence	42
b-2- Le diagnostic de maladie d'Alzheimer	45
II-2-1-1-2- Aspects neuropathologiques	46
a- L'atrophie corticale	46

	3
b- Les lésions histologiques	47
b-1- Les dépôts amyloïdes	47
b-2- La dégénérescence neurofibrillaire	49
II-2-1-2- Aspects épidémiologiques et génétiques	52
II-2-1-2-1- Epidémiologie descriptive	52
II-2-1-2-2- Etiologie	53
a- Facteurs génétiques impliqués dans les formes précoces de MA	54
a-1- Le gène de l'APP	54
a-2- Les gènes PS1 et PS2	55
b- Facteurs génétiques impliqués dans les formes tardives de MA	56
b-1- L'apolipoprotéine E	56
b-2- Les autres facteurs génétiques	58
<b>II-2-1-3- Le syndrome de Down ou trisomie 21</b>	<b>59</b>
II-2-1-3-1- Aspects cliniques	59
II-2-1-3-2- Aspects neuropathologiques	59
II-2-1-3-3- Aspects biochimiques	60
<b>II-2-2- Les syndromes parkinsoniens.....</b>	<b>60</b>
<b>II-2-2-1- Le syndrome de l'île de Guam</b>	<b>60</b>
II-2-2-1-1- Aspects cliniques	61
II-2-2-1-2- Aspects neuropathologiques	61
II-2-2-1-3- Aspects biochimiques	63
II-2-2-1-4- Aspects génétiques	63
<b>II-2-2-2- Le Parkinson post-encéphalitique</b>	<b>64</b>
II-2-2-2-1- Aspects cliniques	64

	4
II-2-2-2- Aspects neuropathologiques	64
II-2-2-3- Aspects biochimiques	65
<b>II-2-2-3- La maladie de Steele-Richardson-Olszewski</b>	<b>66</b>
II-2-2-3-1- Aspects cliniques	66
II-2-2-3-2- Aspects neuropathologiques	67
II-2-2-3-3- Aspects biochimiques	68
II-2-2-3-4- Aspects génétiques	68
<b>II-2-2-4- La dégénérescence corticobasale</b>	<b>69</b>
II-2-2-4-1- Aspects cliniques	69
II-2-2-4-2- Aspects neuropathologiques	70
II-2-2-4-3- Aspects biochimiques	72
<b>II-2-3- Les démences fronto-temporales.....</b>	<b>72</b>
<b>II-2-3-1- La maladie de Pick</b>	<b>73</b>
II-2-3-1-1- Aspects cliniques	74
II-2-3-1-2- Aspects neuropathologiques	74
II-2-3-1-3- Aspects biochimiques	77
<b>II-2-3-2- Les démences fronto-temporales non-Alzheimer non-Pick</b>	<b>78</b>
II-2-3-2-1- Aspects cliniques	79
II-2-3-2-2- Aspects neuropathologiques	79
II-2-3-2-3- Aspects biochimiques	80
II-2-3-2-4- Aspects génétiques	80
<b>II-2-3-3- Les DFTP-17</b>	<b>81</b>
II-2-3-3-1- Aspects cliniques	81
II-2-3-3-2- Aspects neuropathologiques	82

	5
II-2-3-3-3- Aspects génétiques	82
II-2-3-3-4- Aspects biochimiques	84
<b>II-2-4- Les maladies neurodégénératives : récapitulatif</b> .....	<b>85</b>
<b><u>III- DES MALADIES NEURODEGENERATIVES AU LIQUIDE CEPHALO-RACHIDIEN</u></b> .....	<b>89</b>
<b><i>III-1- LE LIQUIDE CEPHALO-RACHIDIEN (LCR)</i></b> .....	<b>89</b>
<b>III-1-1- Anatomie</b> .....	<b>89</b>
<b>III-1-2- Physiologie du LCR</b> .....	<b>89</b>
III-1-2-1- Production du LCR:	89
III-1-2-2- Rôles physiologiques du LCR:	90
<b>III-1-3- Biochimie du LCR</b> .....	<b>91</b>
<b><i>III-2- LES PROTEINES TAU DANS LE LCR, MARQUEUR PERIPHERIQUE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER?</i></b> .....	<b>91</b>
<b>III-2-1- Les protéines tau dans le LCR, marqueur sensible et spécifique de la MA?</b> 92	
<b>III-2-2- Les protéines tau dans le LCR, marqueur précoce de la MA?</b> .....	<b>94</b>
<b>III-2-3- Les protéines tau dans le LCR, marqueur informatif pour l'évolution de la MA?</b> .....	<b>95</b>
<b>III-2-4- Conclusions</b> .....	<b>97</b>
<b>OBJECTIFS</b> .....	<b>98</b>
<b>RESULTATS - DISCUSSION</b> .....	<b>100</b>
<b><u>I- ANALYSE DES PROTEINES TAU NATIVES</u></b> .....	<b>100</b>
<b><i>I-1- ANALYSE BIOCHIMIQUE COMPARATIVE DES PROTEINES TAU-PHF ET DES PROTEINES TAU NATIVES : ARTICLE N°1</i></b> .....	<b>100</b>
<b><i>I-2- DISCUSSION</i></b> .....	<b>105</b>

<b>II- PRODUCTION ET CARACTERISATION D'ANTICORPS.....</b>	<b>109</b>
<b><i>II-1- IMMUNISATION AVEC DES PEPTIDES CARBOXY-TERMINAUX .....</i></b>	<b>109</b>
<b>II-1-1- Epitope sérine 422 phosphorylée.....</b>	<b>109</b>
II-1-1-1- Analyse biochimique et immunohistochimique de l'épitope dans les pathologies neurodégénératives : article n°2	109
II-1-1-2- Discussion	120
<b>II-1-2- Epitope sérine433/sérine435 phosphorylées .....</b>	<b>122</b>
II-1-2-1- Immunisation des souris et caractérisation des sérums:	123
II-1-2-2- Fusion et criblage des clones	124
II-1-2-3- Caractérisation des anticorps	127
II-1-2-3-1- Caractérisation sur homogénats de cellules transfectées	128
II-1-2-3-2- Caractérisation sur prélèvements cérébraux	128
II-1-2-4- Conclusion	128
<b><i>II-2- IMMUNISATION AVEC DES PROTÉINES TAU-PHF.....</i></b>	<b>130</b>
<b>II-2-1- Antigène .....</b>	<b>130</b>
<b>II-2-2- Anticorps monoclonaux .....</b>	<b>132</b>
II-2-2-1- Production des anticorps	132
II-2-2-1-1- Immunisation des souris	132
II-2-2-1-2- Fusion et criblage des clones	133
II-2-2-2- Caractérisation des anticorps	137
<b>II-2-2-2-1- Classe 1: anticorps 61, 85, 299 et 385</b>	<b>137</b>
a- Caractérisation sur homogénats de cellules transfectées	137
b- Caractérisation sur prélèvements cérébraux	140
c- Conclusions	142



<b>II-2-2-2- Classe 2: anticorps 294</b>	<b>143</b>
a- Caractérisation sur homogénats de cellules transfectées	143
b- Caractérisation sur prélèvements cérébraux	143
c- Conclusions	144
<b>II-2-2-2-3- Classe 3 : anticorps 343</b>	<b>145</b>
<b>II-2-2-2-4- Classe 4 : anticorps 92</b>	<b>146</b>
a- Caractérisation biochimique	146
b- Caractérisation immunohistochimique	147
II-2-2-2-5- Conclusion	149
<b><u>III- APPLICATION DES ANTICORPS : DOSAGE ELISA DES PROTEINES TAU</u></b>	<b><u>152</u></b>
<b><i>III-1- PROTEINES TAU DANS LE LCR : QUELLES FORMES DOSER?</i></b>	<b><i>152</i></b>
<b>III-1-1- Etat du sujet</b>	<b>152</b>
<b>III-1-2- Protocoles de dosage</b>	<b>153</b>
III-1-2-1- Protocole avec anticorps de phase spécifique des extrémités des protéines tau	154
III-1-2-2- Protocole avec anticorps de phase spécifique de la partie médiane des protéines tau	155
III-1-2-3- Protocole de dosage avec anticorps de phase spécifique d'un site phosphorylé des protéines tau	156
<b><i>III-2- RESULTATS</i></b>	<b><i>158</i></b>
<b>III-2-1- Cartographie épitopique par le <i>BIAcore</i><sup>TM</sup></b>	<b>158</b>
<b>III-2-2- Détermination des paires d'anticorps par le <i>BIAcore</i><sup>TM</sup></b>	<b>160</b>
<b><i>III-3- CONCLUSIONS</i></b>	<b><i>162</i></b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>163</b>

**PERSPECTIVES ..... 166**

**MATERIELS ET METHODES ..... 170**

**I- PRODUCTION DES ANTICORPS..... 170**

***I-1- ANTIGÈNES ..... 170***

**I-1-1- Peptides de synthèse..... 170**

**I-1-2- Extrait protéique..... 171**

***I-2- ANTICORPS ..... 171***

**I-2-1- Anticorps polyclonaux ..... 171**

**I-2-2- Anticorps monoclonaux ..... 172**

I-2-2-1- Protocole d'immunisation 172

I-2-2-2- Fusion 173

I-2-2-3- Criblage des clones 173

I-2-2-4- Expansion des hybridomes *in-vivo* 174

I-2-2-5- Isotypage et purification des anticorps 175

**II- CARACTÉRISATION DES ANTICORPS..... 176**

***II-1- MATÉRIEL BIOLOGIQUE ..... 176***

**II-1-1- Cerveaux..... 176**

II-1-1-1- Matériel autopsique 176

II-1-1-2- Matériel biopsique 176

**II-1-2- Liquide céphalo-rachidien..... 177**

***II-2- TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE..... 177***

**II-2-1- Protéines tau recombinantes ..... 177**

II-2-2- Protéines tau et constructions de protéines tau obtenues par transfection.....	178
<b>II-3- TECHNIQUES DE BIOCHIMIE.....</b>	<b>180</b>
II-3-1- Electrophorèse en gel de polyacrylamide, en présence de SDS (SDS-PAGE) .....	180
II-3-2- Technique de l'immuno-empreinte.....	182
<b>II-4- TECHNIQUES D'IMMUNOHISTOCHEMIE.....</b>	<b>183</b>
II-4-1-1- Coupes en congélation	183
II-4-1-1-1- Préparation des coupes	183
II-4-1-1-2- Protocole d'immunomarquage	184
II-4-1-2- Coupes en paraffine	184
<b>II-5- TECHNOLOGIE DU BIACORE™.....</b>	<b>185</b>
II-5-1- Principe.....	185
II-5-2- Protocoles.....	185
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>187</b>

# **GENERALITES**

## GENERALITES

### I- LES PROTEINES MICROTUBULAIRES TAU

#### I-1- INTRODUCTION

##### I-1-1- Le cytosquelette neuronal

La morphologie des neurones, caractérisée par l'arborescence de projections dendritiques et axonales à partir d'un corps cellulaire, est en relation directe avec leur fonction. En effet, les cellules nerveuses n'ont de raison d'être que par les contacts qu'elles vont établir avec les cellules voisines, nerveuses ou non, afin de propager un signal. Cette morphologie particulière est rendue possible par l'existence d'un cytosquelette et autorise l'établissement et le développement de réseaux neuronaux, ainsi que leur modification en fonction des conditions physiologiques ou pathologiques environnantes.

Le cytosquelette neuronal est donc un système dynamique dont les constituants de base sont les microtubules et les neurofilaments (Wuerker and Palay, 1969).

Les microtubules, en tant qu'éléments du cytosquelette, sont décrits dans toutes les cellules eukaryotes. Ils participent à la formation du fuseau mitotique, et sont donc impliqués dans la division cellulaire.

Mais les microtubules sont plus particulièrement abondants dans les neurones (on parle parfois de neurotubules) où ils constituent le réseau microtubulaire des axones. Ce système cellulaire est impliqué, lors du développement, dans la mobilité des cônes de croissance axoniques dont la finalité est l'établissement des contacts synaptiques. Les faisceaux de microtubules sont particulièrement importants pour le processus de transport axonal rapide,

antérograde et rétrograde. Le transport axonal antérograde est utilisé pour le transfert de protéines cytosolubles ou de protéines de structure contenues dans des vésicules, depuis l'appareil de Golgi vers l'extrémité axonale. Le transport axonal rétrograde est utilisé pour le transport de vésicules de plus grande taille, issues des terminaisons axonales par endocytose.

L'entité moléculaire élémentaire des microtubules est la tubuline, protéine globulaire de 120 kDa. Les monomères de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$  polymérisés en dimères forment des protofilaments, l'assemblage de 13 protofilaments constituant un microtubule de 20 à 25 nm de diamètre. Dans les conditions physiologiques, un microtubule est une structure dynamique en renouvellement permanent avec une extrémité négative, où se produit une dissociation des monomères de tubuline, et une extrémité positive, où la polymérisation prédomine.

Finalement, les polymères de tubuline sont stabilisés par des protéines associées aux microtubules, les MAP.

### **I-1-2- Les protéines associées aux microtubules (MAP) :**

Les MAP constituent un groupe complexe de protéines dont les fonctions connues sont de promouvoir la polymérisation des monomères de tubuline et de stabiliser les faisceaux de microtubules.

Comparativement à d'autres tissus, le cerveau est riche en microtubules et possède un système de MAP qui lui est propre. Ainsi, les MAP du système nerveux sont classifiées en protéines de haut poids moléculaire et protéines de bas poids moléculaire :

- les MAP de haut poids moléculaire (>200 kDa) sont désignées MAP1A, 1B, 1C, MAP2, MAP3 et MAP4 (Bloom *et al.*, 1985; Avila *et al.*, 1994).

- les MAP de bas poids moléculaire (<70 kDa) sont représentées par les protéines tau (Weingarten *et al.*, 1975).

Weingarten et collaborateurs décrivent en 1975 une protéine thermostable copurifiée avec la tubuline, à partir du cerveau de porc. Ils démontrent que ce facteur protéique est associé aux microtubules et qu'il est capable d'induire la formation de microtubules *in-vitro*. Cette protéine est appelée "facteur Tau" (Weingarten *et al.*, 1975).

## **I-2- DU GENE AUX PROTEINES TAU**

### **I-2-1- Localisation chromosomique**

Il existe chez l'homme un seul gène codant pour les protéines tau. D'une longueur de 100 kb, ce gène est situé sur le bras long du chromosome 17, en position 17q21 (Neve *et al.*, 1986).

### **I-2-2- Transcription du gène**

#### **I-2-2-1- Epissage alternatif**

16 exons sont décrits sur le gène humain des protéines tau et sont retrouvés au niveau du transcrit primaire nucléaire (figure 1A). L'exon -1, qui fait partie du promoteur du gène, est transcrit mais n'est pas traduit. Il en est de même pour l'exon 14, qui n'est que rarement traduit. Les exons 1, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13 sont exprimés constitutivement. Les exons 2, 3 et 10 subissent un phénomène régulé d'épissage alternatif, et sont spécifiques du tissu cérébral humain adulte (Andréadis *et al.*, 1992). La transcription de l'exon 3 ne peut se faire indépendamment de celle de l'exon 2 (Andréadis *et al.*, 1995).

Par le jeu de cet épissage alternatif, 6 ARNm cytoplasmiques sont générés. Ils sont à l'origine des 6 isoformes de protéines tau présentes dans le système nerveux central et notées 2-3-10-, 2+3-10-, 2+3-10+, 2+3+10+, 2+3+10-, 2-3-10+ (figure 1B).

Une isoforme supplémentaire de 130 kDa appelée " Big tau " est décrite dans le système nerveux périphérique, essentiellement au niveau de la moelle épinière et des ganglions rachidiens (Georgieff *et al.*, 1993). Elle contient une séquence peptidique supplémentaire de 253 acides aminés traduite à partir de l'exon 4A.

#### I-2-2-2- Expression différentielle au cours du développement

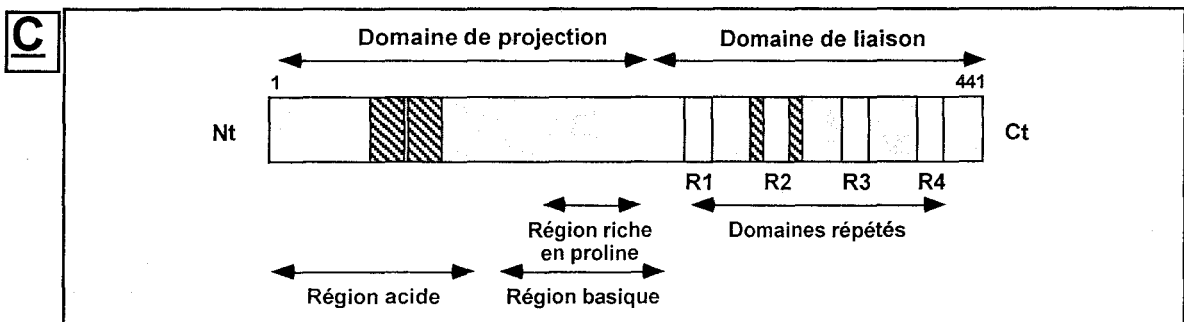
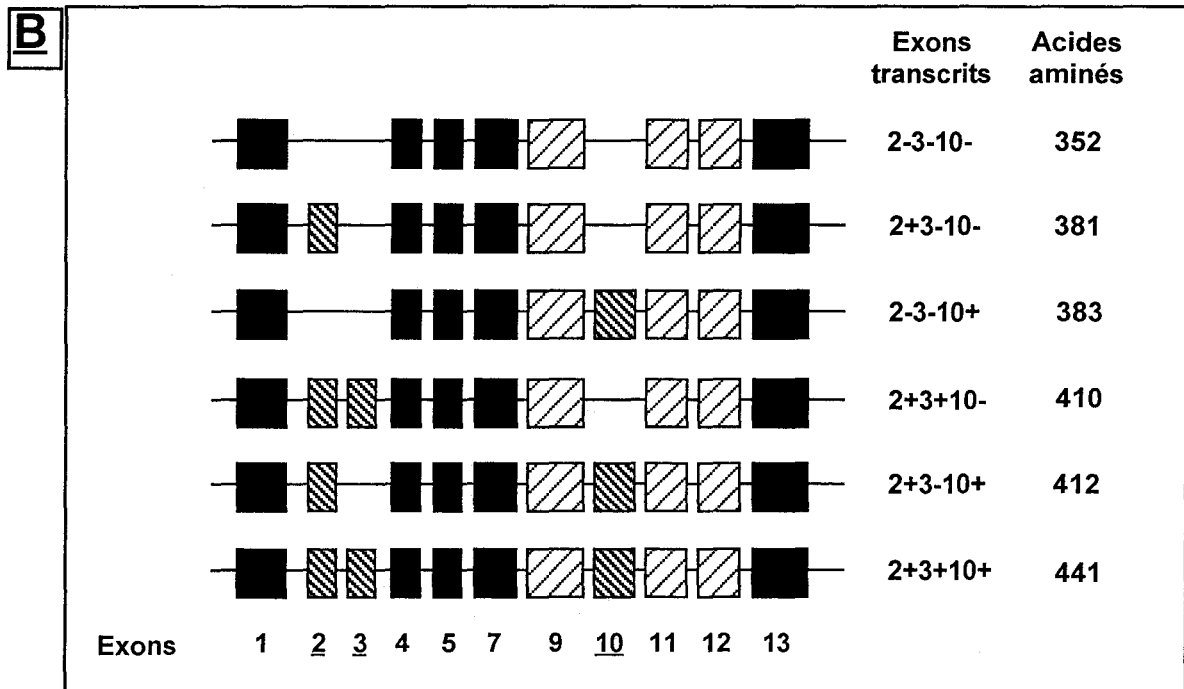
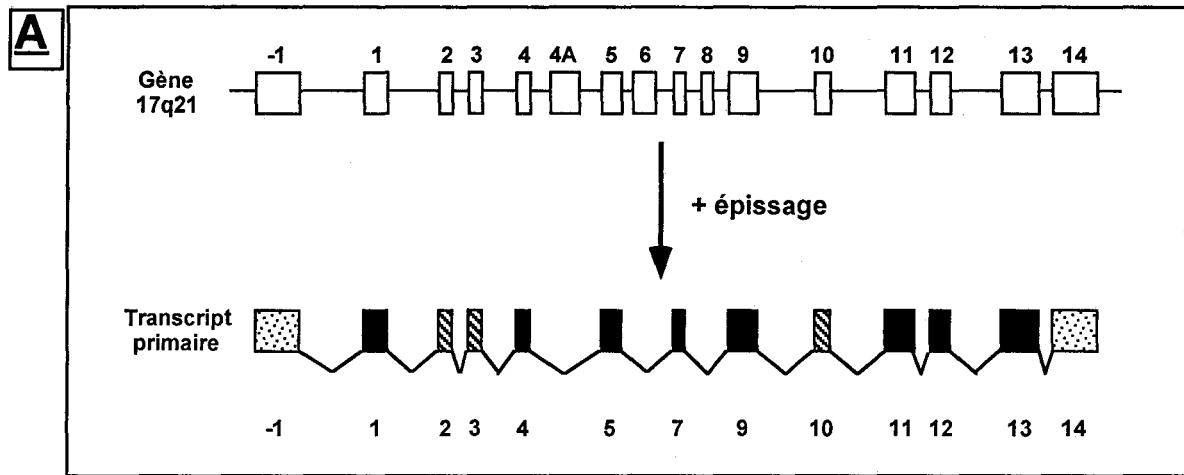
En 1977, Cleveland et collaborateurs montrent que la protéine tau extraite du cerveau de cochon adulte est résolue en gel dénaturant sous forme de plusieurs bandes de poids moléculaire apparent compris entre 55 et 65 kDa (Cleveland *et al.*, 1977). A l'inverse, la protéine tau extraite d'un cerveau immature de rongeur apparaît sous la forme d'une bande unique de 55 kDa, mettant en évidence une expression différentielle de la protéine selon le stade de développement.

L'expression des protéines tau est également régulée au cours du développement chez l'homme, les ARNm étant épissés différemment chez le fœtus et chez l'adulte. L'ARNm unique transcrit chez le fœtus ne contient pas les exons 2, 3 et 10 et génère une isoforme courte, dite " isoforme foetale ". Ce même transcrit est retrouvé chez l'adulte, mais alors associé aux 5 autres ARNm qui apparaissent au cours du développement et qui sont issus de l'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 (Goedert *et al.*, 1989; Kosik *et al.*, 1989).

#### I-2-2-3- Expression différentielle selon le type cellulaire

En 1989, Goedert et collaborateurs mettent en évidence par hybridation *in-situ*, dans les cellules pyramidales du cortex cérébral et dans les cellules pyramidales et granulaires du *gyrus dentatus*, un ARNm de type I correspondant aux isoformes tau 10-. Un ARNm de type II,





**Figure 1: Du gène aux protéines tau.**

(A) Le gène des protéines tau humaines est localisé sur le chromosome 17, en 17q21. Il est constitué de 16 exons, dont 8 sont constitutifs (1, 4, 5, 7, 9, 11, 12, 13), 3 sont épissés alternativement (2, 3, 10) et 3 ne sont pas traduits dans le cerveau humain (4A, 6, 8). L'exon -1 fait partie du promoteur du gène, il est transcrit mais pas traduit, de même que l'exon 14.

(B) Aspects moléculaires des protéines tau du système nerveux central humain.

6 isoformes sont produites par épissage alternatif des exons 2, 3 et 10. L'isoforme sans exon 2 est appelée « isoforme foetale ». Les isoformes adultes contiennent les séquences traduites à partir des exons 2 et/ou 3 et/ou 10. Leur séquence peptidique comprend de 352 à 441 acides aminés.

(C) Domaines fonctionnels des protéines tau. La partie amino-terminale constituant le domaine de projection déterminerait l'espacement entre les microtubules et interagirait avec la membrane plasmique. La partie carboxy-terminale constitue le domaine de liaison aux microtubules. Les parties hachurées représentent les exons 2, 3 et 10.

correspondant aux isoformes 10+, est retrouvé également dans les cellules pyramidales du cortex cérébral et de la formation hippocampique, mais pas dans les cellules granulaires. Pour la première fois, une expression différentielle des isoformes de protéine tau, en fonction du type cellulaire, est ainsi démontrée (Goedert *et al.*, 1989).

### **I-3- ASPECTS MOLECULAIRES**

Six isoformes de protéines tau sont donc décrites dans le cerveau humain adulte. La longueur de leur séquence peptidique varie de 352 à 441 acides aminés. Sur électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, les 6 isoformes sont visualisées sous forme de 6 bandes de poids moléculaire apparent compris entre 45 et 62 kDa. En fonction des particularités physico-chimiques et fonctionnelles, deux domaines principaux sont décrits au sein de ces protéines: un domaine amino-terminal comprenant une région acide prolongée par une région riche en résidus proline, et un domaine carboxy-terminal basique (figure 1C).

#### **I-3-1- Domaine amino-terminal**

Le domaine amino-terminal est caractérisé par l'absence ou la présence de 1 ou 2 inserts, équivalant respectivement à une séquence de 29 ou 58 acides aminés. Ces insertions sont codées par l'exon 2 (1 insert) ou les exons 2 et 3 (2 inserts). Le domaine N-terminal est très acide, avec un point isoélectrique de l'ordre de 4.

Sur le plan fonctionnel, la partie N-terminale associée à la moitié de la région riche en proline est définie comme étant le domaine de projection, c'est-à-dire qu'il détermine l'espacement entre les microtubules adjacents (Steiner *et al.*, 1990). Cette partie de la protéine interagirait également avec la membrane plasmique (Brandt *et al.*, 1995). Enfin, des travaux récents mettent en évidence une liaison des protéines tau, par leur domaine amino-terminal, au domaine SH3 des tyrosine-kinases *fyn* et *src*. Ces résultats suggèrent une implication des

protéines tau dans la voie de transduction du signal comprenant les tyrosine kinases de la famille *src* (Lee *et al.*, 1998).

### **I-3-2- Domaine carboxy-terminal**

La partie carboxy-terminale des protéines tau se caractérise par la présence de 3 ou 4 domaines de 31 ou 32 acides aminés (notés R1, R2, R3, R4), codés par les exons 9 à 12. Ces domaines contiennent un motif répété de 18 acides aminés et se terminent par un motif Pro-Gly-Gly-Gly. Ils sont séparés par des séquences de 13 à 14 acides aminés dénommées "inter-repeat" ou "zones de jonction" (Lee *et al.*, 1988; Goedert *et al.*, 1989; Himmler *et al.*, 1989).

Le domaine carboxy-terminal est basique, avec un point isoélectrique de l'ordre de 10. Il constitue le domaine de liaison aux microtubules (Aizawa *et al.*, 1989; Ennulat *et al.*, 1989).

Les isoformes à 3 ou 4 domaines répétés sans insert amino-terminal ou avec un seul insert représentent les isoformes majeures du système nerveux central. Les isoformes à 3 ou 4 domaines répétés avec 2 inserts sont en plus faible quantité dans le SNC (Goedert et Jakes, 1990).

### **I-4- ASPECTS FONCTIONNELS**

Les protéines tau furent initialement décrites comme des promoteurs de la polymérisation des monomères de tubuline, *in-vitro* (Weingarten *et al.*, 1975; Cleveland *et al.*, 1977). Par la suite, Drubin et collaborateurs réalisent des microinjections de protéines tau dans des fibroblastes RAT1 n'exprimant pas constitutivement les protéines tau. Ils décrivent alors par immunofluorescence une liaison spécifique des protéines tau sur les microtubules et une augmentation de la quantité de tubuline polymérisée. Ils observent également une

résistance accrue des microtubules aux agents dépolymérisants, et attribuent donc aux protéines tau un rôle de stabilisation des microtubules déjà formés (Drubin et Kirschner, 1986).

Les isoformes de protéines tau avec 4 domaines répétés (4R) se lient plus facilement aux microtubules et sont des promoteurs plus efficaces de la polymérisation que les isoformes de type foetal à 3 domaines répétés (3R) (Goedert and Jakes, 1990). Ainsi, une affinité 40 fois supérieure a été décrite pour les isoformes de tau 4R vis-à-vis des microtubules, par rapport aux isoformes 3R (Goode et Feinstein, 1994). Cette propriété est bien adaptée aux contraintes du cytosquelette neuronal adulte qui doit être stable. Réciproquement, les isoformes de type foetal 3R, d'affinité moindre pour les microtubules, sont plus adaptées au cytosquelette des neurones foetaux en développement.

### **I-5- REPARTITION CELLULAIRE**

Les premières expérimentations visant à déterminer la répartition cellulaire des protéines tau montrent, par immunohistochimie avec l'anticorps monoclonal Tau-1, une localisation exclusivement neuronale et confinée au compartiment axonal (Binder *et al.*, 1985). Par la suite, ce même anticorps est utilisé en microscopie optique et en microscopie électronique, sur des coupes de tissu préalablement traitées à la phosphatase alcaline. Un immunomarquage est alors observé dans le compartiment somato-dendritique des neurones, en plus du marquage axonal déjà décrit. De plus, un marquage intense est obtenu au niveau des astrocytes et des cellules gliales péri-neuronales (Papasozomenos et Binder, 1987).

Dans une étude publiée en 1989, Kosik et collaborateurs mettent en évidence une discordance entre les résultats d'immunohistochimie, montrant une localisation axonale préférentielle, et les résultats d'hybridation *in situ*, montrant une compartimentation somato-dendritique des ARNm des protéines tau (Kosik *et al.*, 1989). Ils émettent alors deux hypothèses pour tenter d'expliquer ce paradoxe: soit les protéines, en entrant dans l'axone

subissent une modification de leur structure secondaire et deviennent alors reconnaissables par l'anticorps. Soit les protéines tau sont synthétisées dans le domaine somato-dendritique et sont rapidement exportées vers l'axone, de telle façon que leur taux au niveau du corps cellulaire est toujours inférieur au seuil d'immunodétection.

## **I-6- LES PROTEINES TAU, PHOSPHOPROTEINES**

### **I-6-1- La phosphorylation, modification post-traductionnelle**

La phosphorylation est la principale modification post-traductionnelle que subissent les protéines tau (Cleveland *et al.*, 1977). Cette modification est importante d'un point de vue fonctionnel, puisqu'elle régulerait la capacité de liaison des protéines tau aux microtubules, et donc leur rôle de promoteur de la polymérisation des monomères de tubuline.

Ainsi, en 1980, Jameson et collaborateurs suggèrent qu'une phosphorylation accrue des protéines associées aux microtubules réduit leur capacité à promouvoir la polymérisation des microtubules (Jameson *et al.*, 1980). Par la suite, Lindwall et Cole démontrent que des protéines tau bovines déphosphorylées permettent une polymérisation des microtubules plus rapide et plus importante que des protéines tau phosphorylées (Lindwall et Cole, 1984).

La phosphorylation serait également responsable d'un changement de conformation des protéines tau (Hagestedt *et al.*, 1989).

### **I-6-2- Les enzymes de la phosphorylation**

L'étude des sites de phosphorylation des protéines tau est réalisée soit *in-vitro*, sur protéines recombinantes ou sur protéines purifiées extraites de cerveau, soit *in-vivo*, dans des lignées cellulaires transfectées avec l'ADNc des protéines tau et/ou de certaines kinases.

Cependant, ces deux modèles sont forcément restrictifs car ils ne prennent en compte qu'une partie du système de transduction conduisant à la phosphorylation des protéines tau, soustrayant entre autres un certain nombre de régulations externes. Les résultats obtenus doivent donc être considérés dans ce contexte particulier, de l'action d'une ou plusieurs kinases ou phosphatases vis-à-vis d'un site de phosphorylation, et en l'absence de toute régulation.

#### I-6-2-1- Les protéines kinases

Les sites de phosphorylation des protéines tau, et par voie de conséquence les protéines kinases impliquées dans leur phosphorylation, peuvent être classés en deux catégories: les sites constitués d'un motif Ser-Pro ou Thr-Pro (Gustke *et al.*, 1992), phosphorylés par les kinases de type PDPK (pour Proline-Directed Protein Kinase), et les sites non Ser-Pro ou non Thr-Pro (Morishima-Kawashima *et al.*, 1995), phosphorylés par les kinases de type "non-PDPK".

##### \* Les PDPK phosphorylant les protéines tau:

Cette classe de kinases comprend la famille des kinases activées par des facteurs mitogènes ou MAP kinases (pour "Mitogen Activated Proteins Kinases") (Drewes *et al.*, 1992; Goedert *et al.*, 1992), les kinases impliquées dans le cycle de division cellulaire appelées cdc2 et cdk5 (Kobayashi *et al.*, 1993; Paudel *et al.*, 1993; Scott *et al.*, 1993a) et la glycogène synthase kinase 3 appelée GSK3 (Hanger *et al.*, 1992; Lovestone *et al.*, 1994; Mandelkow *et al.*, 1992).

Récemment, les SAP kinases (pour "Stress Activated Proteins Kinases") ont été impliquées dans la phosphorylation des protéines tau (Cuenda *et al.*, 1997; Goedert *et al.*, 1997 a-b; Lawler *et al.*, 1997; Reynolds *et al.*, 1997). Ces kinases, appartenant à la famille des MAP kinases, peuvent être activées par un stress cellulaire (choc osmotique ou thermique, UV...), par des lipopolysaccharides bactériens, par des interleukines pro-

inflammatoires telles que IL-1 ou par le TNF (pour revue: Cohen, 1996; Kyriakis et Avruch, 1996).

\* Les non-PDPK phosphorylant les protéines tau:

Cette classe de protéines kinases comprend:

- la protéine kinase dépendante de l'AMPc, désignée PKA (Lidersky et Johnson, 1992; Scott *et al.*, 1993 a-b).
- la protéine kinase calcium/calmoduline dépendante de type II, désignée CaMPK II (Baudier et Cole, 1987; Johnson, 1992).
- la protéine kinase C, désignée PKC (Baudier *et al.*, 1987; Correias *et al.*, 1992; Scott *et al.*, 1993).
- les caséine kinases I et II, désignée CKI et CKII (Singh *et al.*, 1995; Greenwood *et al.*, 1994).
- la protéine kinase dépendante de l'ADN double brin, désignée DNA-PK (Wu *et al.*, 1993).
- la protéine kinase p110mark (Drewes *et al.*, 1995-1997).

I-6-2-2- Les protéines phosphatases

Les protéines phosphatases (PP) décrites dans le cerveau sont au nombre de 4. Il s'agit de PP-1, PP-2A, PP-2B ou calcineurine, et PP-2C (pour revue: Cohen et Cohen, 1996). Elles se différencient principalement sur la base de leur spécificité vis-à-vis du substrat et de leur sensibilité à certains inhibiteurs spécifiques.

Plusieurs études semblent indiquer que l'activité de PP-2A et PP-2B est majoritaire dans le cerveau. Ainsi, Drewes et collaborateurs ont démontré une action importante de PP-2A et PP-2B sur les protéines tau recombinantes préalablement phosphorylées par les MAP kinases ou la GSK-3 (Drewes *et al.*, 1993). Par la suite, les travaux de Goedert et collaborateurs ont montré que PP-2A était la principale enzyme présente dans le cerveau pour déphosphoryler

les protéines tau préalablement phosphorylées par les MAP kinases ou la GSK-3, mais également par cdc2 ou CaMPK II (Goedert *et al.*, 1995).

## **I-7- LA PHOSPHORYLATION DES PROTEINES TAU, PATHOLOGIE OU PHYSIOLOGIE?**

### **I-7-1- La phosphorylation, pathologie**

En 1985 et 1986, plusieurs équipes décrivent simultanément les protéines tau associées aux microtubules comme étant les constituants majeurs des lésions présentes dans les neurones en dégénérescence de la maladie d'Alzheimer (MA). Ces lésions sont formées de paires de filaments appariées en hélice (PHF), et les protéines tau constitutives sont donc dénommées protéines tau-PHF (Brion *et al.*, 1985; Delacourte et Défossez, 1986; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986; Kosik *et al.*, 1986).

L'étude biochimique des protéines tau-PHF met en évidence leur migration électrophorétique réduite par rapport aux protéines tau normales, sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (Flament et Delacourte, 1989; Ksiezak-Reding *et al.*, 1992). Ces protéines sont détectées par la technique des immunoempreintes sous la forme d'un triplet de bandes désignées en fonction de leur poids moléculaire apparent tau 55, tau 64 et tau 69 (ou triplet tau-PHF ou A68) (Delacourte *et al.*, 1990; Flament *et al.*, 1989; Flament et Delacourte, 1989; Greenberg et Davies, 1990; Greenberg *et al.*, 1992; Ksiezak-Reding *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1991;). Après déphosphorylation, les 3 bandes des protéines tau-PHF s'alignent sur les 6 bandes des protéines tau recombinantes suggérant:

- qu'une phosphorylation anormale se produit sur les 6 isoformes dans les PHF. La migration électrophorétique réduite rend compte de cette modification des protéines tau dans les PHF (Goedert *et al.*, 1992).



- que les 6 isoformes de protéine tau sont incorporées dans les PHF. La proportion relative des 6 isoformes est la même dans les PHF que celle décrite dans le cerveau humain normal.

Sur le plan fonctionnel, les protéines tau anormalement phosphorylées perdraient leur capacité de liaison aux microtubules (Iqbal *et al.*, 1986) et s'agrègeraient entre elles pour former les PHF. Une déphosphorylation par la phosphatase alcaline permet aux protéines tau-PHF de retrouver les propriétés des protéines tau normales, et donc de se lier aux microtubules (Bramblett *et al.*, 1993).

En comparaison, l'analyse biochimique des protéines tau normales extraites d'un cerveau de sujet témoin (désignées ci-dessous "protéines tau autopsiques") révèle leur faible degré de phosphorylation, de l'ordre de 2 moles de phosphate par mole de tau comparé aux 8 moles des tau-PHF (Ksiezak-Reding *et al.*, 1992). Ces protéines sont alors détectées sur immunoempreinte avec des anticorps indépendants de la phosphorylation sous la forme des 6 bandes caractéristiques déjà décrites.

A ce stade de notre exposé, nous pouvons dire qu'une phosphorylation anormale des protéines tau au cours de la MA provoque leur agrégation sous forme de PHF et par voie de conséquence leur perte de fonction. Cette modification constitue un processus pathologique caractéristique de la MA, puisqu'il n'est pas décrit pour les protéines tau normales autopsiques.

### 1-7-2- La phosphorylation, physiologie

Le règne des protéines tau-PHF anormalement phosphorylées aura duré 9 ans. A partir de 1994, ce concept classiquement admis est remis en cause.

Matsuo et collaborateurs démontrent en effet à cette époque que les protéines tau humaines normales, extraites sans délai post-opératoire d'un prélèvement biopsique de cerveau (désignées ci-dessous protéines tau "biopsiques" ou "natives"), sont phosphorylées sur des sites communs avec les tau-PHF (Matsuo *et al.*, 1994). L'analyse par immunoempreintes, avec des anticorps dépendants de la phosphorylation, montre un co-migration des protéines tau natives et des protéines tau-PHF qui sont détectées sous forme d'un triplet de bandes migrant entre 55 et 69 kDa. Après déphosphorylation, les protéines tau biopsiques présentent une mobilité électrophorétique accrue et s'alignent avec les protéines tau normales autopsiques, démontrant ainsi qu'elles sont phosphorylées.

L'analyse quantitative de la phosphorylation de ces sites démontre cependant une différence entre les protéines tau-PHF et les protéines tau natives, aux dépens de cette dernière catégorie. De même, une phosphorylation moindre des isoformes à 3 domaines de liaison est mise en évidence pour les protéines tau natives par rapport aux protéines tau-PHF. La notion d'hyperphosphorylation des protéines tau-PHF dans la MA est donc toujours valable.

En étudiant l'évolution de l'état de phosphorylation des protéines tau biopsiques en fonction du délai post-opératoire, Matsuo et collaborateurs apportent des résultats qui permettent de mieux comprendre la raison pour laquelle ces sites phosphorylés ne sont pas détectés dans les protéines tau autopsiques. Ils décrivent ainsi une déphosphorylation rapide des protéines tau natives au cours du délai post-opératoire, comme le démontre l'augmentation de leur mobilité électrophorétique. Au-delà de 4 heures de délai post-opératoire, les protéines tau natives sont totalement déphosphorylées et comigrent avec les protéines tau normales autopsiques. Les protéines phosphatases PP-2A et PP-2B sont directement responsables de cette déphosphorylation. Elles peuvent agir séparément ou conjointement, selon le site de phosphorylation considéré. Ainsi, le site Ser202 est déphosphorylé par la PP-2A seule, alors que le site Ser396 est déphosphorylé par l'action conjointe de PP-2A et PP-2B (Matsuo *et al.*, 1994).

Les protéines tau natives sont donc physiologiquement phosphorylées, mais restent apparemment compétentes pour se lier aux microtubules. Quelle est donc la différence par rapport aux protéines tau-PHF qui sont également phosphorylées mais qui s'agrègent alors?

Garver et collaborateurs démontrent chez l'homme, le rat et le singe, que les protéines tau existent sous plusieurs états plus ou moins phosphorylés, une partie des protéines étant même fortement phosphorylées (Garver *et al.*, 1994). Ils montrent également qu'une déphosphorylation des protéines tau peut se produire sur une période de 2 heures, vraisemblablement due à une activité phosphatasique neuronale. Les protéines tau passent alors d'une forme à mobilité électrophorétique réduite (66-68 kDa) à une forme à mobilité plus importante (42-54 kDa), le pourcentage de cette dernière forme augmentant lorsque la première diminue.

Ces données confirment donc qu'une partie des protéines tau du cerveau humain normal sont fortement phosphorylées (approximativement 25%). Elles suggèrent d'autre part que ces protéines sont rapidement déphosphorylées par des phosphatases neuronales (Garver *et al.*, 1994).

Par la suite, Garver et collaborateurs comparent la capacité qu'ont des protéines tau humaines biopsiques entièrement déphosphorylées, des protéines tau biopsiques non modifiées ou des protéines tau-PHF extraites de cerveau Alzheimer, à promouvoir l'assemblage de microtubules. Ils démontrent que les protéines tau-PHF sont incapables d'exercer cette fonction, en accord avec les nombreuses études préalables. Concernant les protéines tau biopsiques, ils décrivent une capacité accrue des formes déphosphorylées par rapport aux formes non modifiées pour promouvoir l'assemblage des microtubules (Garver *et al.*, 1996).

Les travaux de Matsuo et Garver indiquent qu'il existe une phosphorylation physiologique des protéines tau adultes, qui ne se traduit pas par leur agrégation et leur perte de fonction. Les protéines tau normales pourraient donc être plus ou moins phosphorylées et il y aurait un équilibre dynamique entre les formes déphosphorylées et les formes phosphorylées. Cet équilibre, directement responsable de l'état du réseau axonal de microtubules, serait sous l'influence des systèmes de kinases et de phosphatases agissant sur les sites de phosphorylation des protéines tau.

L'isoforme la plus courte de protéine tau, c'est-à-dire l'isoforme foetale, se révèle être davantage phosphorylée que les protéines tau adultes, de façon physiologique. Treize sites de phosphorylation au total seraient impliqués (Morishima-kawashima *et al.*, 1995), avec en moyenne 7 moles de phosphate par mole de tau (Kenessey et Yen, 1993). Une activité phosphatasique très réduite dans le cerveau foetal expliquerait ce degré élevé de phosphorylation (Matsuo *et al.*, 1994; Mawal-Dewan *et al.*, 1994; Buée-Scherrer *et al.*, 1996). La naissance serait marquée par la "mise en route" de cette activité phosphatasique. Ainsi, Pope et collaborateurs ont montré que l'épitope phosphorylé de l'anticorps PHF-1 était présent dans des cellules ganglionnaires de rétine de poulet du stade embryonnaire jusqu'à la naissance. L'immunoréactivité PHF-1 disparaît après la naissance (Pope *et al.*, 1993).

### I-7-3- Les sites de phosphorylation

La plupart des sites de phosphorylation des protéines tau-PHF ont été déterminés par spectrométrie de masse et grâce à l'utilisation d'anticorps dépendants de la phosphorylation dirigés contre les protéines tau-PHF (Hasegawa *et al.*, 1992; Morishima-Kawashima *et al.*, 1995; pour revue: Goedert *et al.*, 1995).

A l'exception du résidu de sérine 262, tous les sites de phosphorylation sont situés de part et d'autre du domaine de liaison des protéines tau aux microtubules (Seubert *et al.*, 1995). Alors que les premiers sites décrits étaient tous de type sérine-proline ou thréonine-proline, Morishima-Kawashima et collaborateurs ont déterminé l'existence de sites phosphorylés non-Ser/Pro ou non-Thr/Pro (Morishima-Kawashima *et al.*, 1995). A ce jour, 25 sites de phosphorylation ont pu être mis en évidence sur les protéines tau-PHF (tableau 1)(Hanger *et al.*, 1998). Mais la plupart de ces sites sont également décrits dans les protéines tau natives, et ne sont donc pas spécifiques des protéines tau-PHF comme cela était classiquement admis jusqu'en 1994.

Un grand nombre d'anticorps dépendants de la phosphorylation, essentiellement monoclonaux, ont été utilisés pour décrire ces sites (tableau 1). La plupart des anticorps ont été obtenus par immunisation de souris avec des protéines tau-PHF extraites de cerveaux Alzheimer, alors que les anticorps 12E8 et AP422 ont été réalisés en prenant un peptide de synthèse comme antigène d'immunisation.

Site de phosphorylation	Anticorps	Kinases	Références
T175		MAPK, GSK-3, JNK, p38K	
T181	AT270 (P+)	MAPK, GSK-3, JNK, p38K	Mercken, 1992 / Rösner, 1995
S184/S185		p38K (S185)	
S198			
S199		MAPK, GSK-3	
Seq[189-207]	Tau-1 (P-)	MAPK, GSK-3, cdc2, cdk5	Binder, 1985 / Biernat, 1992
S202-S205	AT8 (P+)	MAPK, GSK-3, cdc2, cdk5, JNK, p38K	Mercken, 1992 / Goedert 1995
S208			
S210			
[T212-S214] (PHF)	AT100 (P+)	GSK-3, pKA	Mercken, 1992 / Hoffmann, 1997 Zheng-Fischöffer, 1998
T217		MAPK, GSK-3, JNK, p38K	
T231	AT180 (P+) TG3 (P+)	cdc2, GSK-3, JNK	Mercken, 1992 / Rösner, 1995 Jicha, 1997 a-b
T231-S235	M4 (P+)	MAPK, GSK-3, cdc2, cdk5	Hasegawa, 1993
[T231-S235] (PHF)	PHF-27 (P+)		Hoffmann, 1997
S237		PK, JNK, p38K	
S238			
[S262-S356]	12E8 (P+)	GSK-3, pKC, pKA, JNK, p38K, p110K	Seubert, 1995
S396	C5 (P+)	MAPK, GSK-3, JNK, p38K	Hasegawa, 1993
[S396-S404]	AD2 (P+) PHF-1 (P+)	MAPK, GSK-3, cdk5	Buée-Scherrer, 1996 Greenberg, 1992 / Otvos, 1994
S400		GSK-3	
T403			
S404	PHF-9 (P+)	MAPK, GSK-3, cdk5, p38K	Zemlan, 1996
S409		pKA	Jicha, 1998
S412			
S413		GSK-3	
S422 (PHF)	AP422 (P+)	MAPK, JNK	Hasegawa, 1996

Tableau 1: Sites de phosphorylation des protéines tau et principaux anticorps monoclonaux.

Tous les sites notés ont été décrits dans les protéines tau-PHF de la MA (Hanger *et al.*, 1998).

Les résidus notés [X-Y] indiquent que la reconnaissance de l'épitope par l'anticorps correspondant nécessite la phosphorylation des 2 résidus. (PHF): sites non-phosphorylés dans les protéines tau natives, spécifiques des protéines tau-PHF. (P-): anticorps indépendant de la phosphorylation; (P+): anticorps dépendant de la phosphorylation.

#### Conclusion:

Six isoformes de protéines tau sont traduites dans le système nerveux central humain adulte, et se distinguent par la présence ou l'absence d'insertions amino- et carboxy-terminales. Ces protéines ont pour fonction de favoriser la polymérisation des monomères de tubuline et d'assurer la stabilisation des microtubules ainsi formés.

La phosphorylation est la principale modification post-traductionnelle que subissent les protéines tau à l'état physiologique. Dans certaines conditions pathologiques cependant, une hyperphosphorylation peut être mise en évidence, conduisant à la perte de fonction des protéines tau qui s'agrègent sous forme d'inclusions fibrillaires intra-cytoplasmiques. Des altérations du cytosquelette neuronal et/ou glial seront la conséquence ultime de cette hyperphosphorylation des protéines tau.

## **II- DES PROTEINES TAU AUX PATHOLOGIES NEURODEGENERATIVES**

### **II-1- DES PROTEINES TAU AUX ANOMALIES DU CYTOSQUELETTE NEURONAL ET**

#### **GLIAL**

Les protéines tau hyperphosphorylées sont les principaux constituants de plusieurs types d'inclusions neuronales ou gliales décrites dans certaines pathologies neurodégénératives. Ces inclusions fibrillaires peuvent se différencier, entre autres, par leurs caractéristiques ultrastructurales définies en microscopie électronique.

Les protéines tau agrégées au sein des paires de filaments appariées en hélice (PHF) sont décrites dans la maladie d'Alzheimer, le syndrome de l'île de Guam ou le syndrome de Down (trisomie 21). Les protéines tau peuvent être agrégées sous forme de filaments droits, retrouvés principalement dans la paralysie supranucléaire progressive ou la dégénérescence corticobasale. Enfin, les filaments torsadés sont décrits dans les corps de Pick de la maladie de Pick. Cependant, chaque pathologie n'est pas caractérisée par un type unique de structures fibrillaires anormales et la coexistence de filaments droits et de PHF, ou de filaments droits et de filaments torsadés est décrite selon les maladies.

#### **II-1-1- Les PHF de la dégénérescence neurofibrillaire**

##### **II-1-1-1- Analyse ultrastructurale des PHF**

L'analyse ultrastructurale du matériel fibrillaire anormal décrit dès 1907 par A. Alzheimer a montré qu'il était composé principalement de paires de filaments appariées en hélice, ou PHF



(Paired Helical Filaments en anglais) (Kidd, 1963). Les filaments ont un diamètre de 20 nm, et présentent des constriction avec une périodicité de 80 nm. Chaque filament serait constitué de 2 brins de 10 nm de diamètre s'enroulant l'un autour de l'autre de façon hélicoïdale.

#### II-1-1-2- Analyse moléculaire des PHF

Les PHF peuvent être isolées sous forme de fragments d'enchevêtrements neurofibrillaires (Kondo *et al.*, 1988; Wischik *et al.*, 1988 a-b), ou sous forme de filaments dispersés (Greenberg et Davies, 1990; Lee *et al.*, 1991). Ces deux types de PHF se différencient essentiellement par leur solubilité et par leur résistance aux protéases, même si certaines particularités morphologiques, telles qu'une longueur réduite des filaments dispersés par rapport aux filaments enchevêtrés, sont également décrites.

##### \* Solubilité des PHF:

Les PHF sous forme de filaments dispersés sont solubilisées par des agents chaotropiques tel que le chlorure de guanidium ou des détergents tel que le SDS. A l'inverse, les PHF sous forme de filaments enchevêtrés ne sont pas solubilisées par ces réactifs.

##### \* Sensibilité aux protéases:

Le traitement par la pronase de PHF sous forme de filaments dispersés provoque une dégradation complète.

Le même traitement appliqué sur une préparation de filaments enchevêtrés met en évidence un axe protéique résistant aux protéases, entouré d'une "gaine filamenteuse" pouvant être digérée par la pronase (Wischik *et al.*, 1988a). L'immunomarquage des PHF avec des anticorps spécifiques des protéines tau disparaissant lors du traitement à la pronase, les auteurs suggèrent initialement une localisation des épitopes tau au niveau de la gaine filamenteuse.

Ils démontrent ensuite que la sonication dans l'acide formique de l'axe protéique résistant aux protéases libèrent plusieurs fragments peptidiques, dont un fragment de 12 kDa et un fragment de 9.5 kDa (Wischik *et al.*, 1988b). Une partie de la séquence de ce dernier est utilisée pour isoler un ADNc correspondant aux résidus 211-297 de la séquence des protéines tau humaines, c'est-à-dire la partie comprenant les domaines répétés (Goedert *et al.*, 1988).

Les protéines tau constituent l'axe protéique, ainsi que la gaine filamenteuse des PHF.

Les données de biologie moléculaire sont en accord avec la démonstration biochimique de la présence des protéines tau dans les PHF, décrites quelques années auparavant (Brion *et al.*, 1985; Delacourte et Défossez, 1986; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986; Kosik *et al.*, 1986).

En 1991, Jakes et collaborateurs, décrivant la caractérisation biochimique du fragment de 12 kDa, montrent qu'il est constitué de peptides issus des isoformes de tau à 3 ou 4 domaines répétés. Cependant, la région des protéines tau protégée dans l'axe protéique résistant aux protéases est restreinte à une longueur de 3 domaines répétés (Jakes *et al.*, 1991).

L'organisation spatiale des protéines tau au sein des PHF a été mise en évidence en réalisant des protéolyses partielles sur des préparations de PHF SDS-solubles. L'utilisation conjointe des techniques de western-blot et de microscopie électronique permet d'identifier les fragments protéolytiques de protéines tau-PHF, tout en précisant leur agencement au sein des filaments (Ksiezak-Reding et Yen, 1991).

Le modèle proposé par Ksiezak-Reding et collaborateurs décrit une association des protéines tau-PHF par l'intermédiaire de leur domaine de liaison aux microtubules, pour former l'axe protéique des PHF résistant aux protéases. Les molécules de tau-PHF étant agencées

de façon antiparallèle, les extrémités amino- et carboxy-terminales projettent vers l'extérieur des filaments formés, et sont donc facilement accessibles pour les enzymes protéolytiques.

La protéolyse rapide d'un fragment amino-terminal d'environ 200 résidus d'acides aminés, mise en évidence par la perte d'immunoréactivité d'un anticorps spécifique de la partie N-terminale des protéines tau, est en faveur d'une telle organisation spatiale des PHF (Ksiezak-Reding et Yen, 1991). De plus, la protéolyse d'un fragment carboxy-terminal de 80-90 acides aminés conduirait à l'obtention du corps protéique résistant aux protéases. Cette dernière partie des PHF est détectée spécifiquement en western-blot et en microscopie électronique par l'anticorps 6.423 (Bondareff *et al.*, 1990; Wischik *et al.*, 1988 a-b).

Ces données ont été confirmées et complétées par Goedert et collaborateurs qui montrent par microscopie électronique que les préparations de PHF solubles contiennent des formes complètes non-dégradées de protéines tau. Les filaments dispersés sont alors décorés par des anticorps anti-tau spécifiques des extrémités amino- et carboxy-terminales. Cependant, un anticorps carboxy-terminal détecte 95% des filaments de la préparation, alors qu'un anticorps amino-terminal n'en détecte que la moitié, suggérant une nouvelle fois la dégradation préférentielle de l'extrémité amino-terminale.

Parallèlement à cette protéolyse séquentielle, les PHF passent d'un état soluble (protéines tau complètes) à un état insoluble (dégradation des 2 extrémités et agrégation des domaines de liaison aux microtubules dans l'axe protéique) (Goedert *et al.*, 1992).

### II-1-1-3- Les PHF dans la maladie d'Alzheimer

*In-vitro*, la digestion par la pronase de la gaine filamenteuse des PHF est associée à la transition d'une forme soluble vers une forme insoluble. Ce type de modification protéolytique est également décrite *in-vivo* dans la MA, et se trouve alors associé à la transformation des DNF intra-cellulaires en DNF extra-cellulaires (Bondareff *et al.*, 1990).

Bondareff et collaborateurs effectuent une étude immunohistochimique sur des coupes de cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer, avec des anticorps dirigés contre les régions amino- et carboxy-terminales des protéines tau, et contre la région correspondant au domaine de liaison aux microtubules. Ils différencient deux populations de DNF, exclusives l'une de l'autre:

- les DNF du compartiment intra-cellulaire marquées par des anticorps anti-tau amino- et carboxy-terminaux, et qui possèdent donc les antigènes de la gaine filamenteuse. Ces DNF intra-cellulaires ne sont pas marquées par l'anticorps 6.423 dirigé contre la région des domaines répétés des protéines tau, qui est spécifique de l'axe protéique.

- les DNF du compartiment extra-cellulaire détectées uniquement par l'anticorps 6.423 dont l'épitope est exposé après la protéolyse de la gaine filamenteuse.

Les DNF intra-cellulaires sont généralement associées à une morphologie neuronale bien respectée, avec un noyau et un corps cellulaire parfaitement délimités. Ce type de DNF présente un aspect de "flammèche" similaire à ce qui est obtenu avec les colorations argentiques classiques, en particulier au niveau des neurones pyramidaux de l'hippocampe (CA2 et CA3) et du cortex cérébral.

La localisation exclusive des PHF marquées par l'anticorps amino-terminal au compartiment intra-cellulaire est confirmée par l'analyse en microscopie confocale.

A l'inverse, les DNF extra-cellulaires ne sont pas associées à une architecture neuronale classique, avec noyau et membrane plasmique. Elles apparaissent plus larges et compactes, avec un aspect fibrillaire, ou semblent se disperser dans le neuropile entourant le neurone dégénéré. Ce dernier type de morphologie est observé en particulier au niveau de l'hippocampe (CA1) et du cortex entorhinal.

Les DNF extra-cellulaires peuvent être visualisées par une coloration au rouge Congo, spécifique de la structure en feuillets  $\beta$ -plissés des filaments agrégés.

Finalement, une association de l'ubiquitine aux PHF de la DNF intra- et extra-cellulaire est mise en évidence, en accord avec des résultats préalables décrivant l'ubiquitine comme un des composants des lésions de DNF (Mori *et al.*, 1987). Cette association PHF-ubiquitine suggère que le processus de dégénérescence neurofibrillaire requiert une ubiquitination, c'est-à-dire la dégradation de protéines conjuguées à l'ubiquitine par un système protéolytique non-lysosomal.

En conclusion:

- Les paires de filaments appariées en hélice (PHF) sont constituées de protéines tau (protéines tau-PHF).
- Les PHF ont une structure composée d'un axe protéique résistant aux protéases, entouré d'une gaine filamenteuse.
- L'axe protéique des PHF est formé par l'agrégation des domaines de liaison aux microtubules et la gaine filamenteuse est constituée par les extrémités amino- et carboxy-terminale des protéines tau.
- Les PHF subissent une dégradation séquentielle, par les extrémités amino puis carboxy-terminales, et passent alors d'une forme soluble à une forme insoluble.
- Les PHF constituent les lésions de dégénérescence neurofibrillaire (DNF) décrites dans la MA.
- Les DNF sont intra-cellulaires (protéines tau-PHF non-dégradées solubles), puis extra-cellulaires (protéines tau-PHF dégradées par leurs extrémités, agrégées et insolubles).

### II-1-2- Les filaments droits de la dégénérescence neurofibrillaire

La première description des filaments droits est attribuée à Tellez-Nagel et Wisniewski, en 1973. Ces filaments anormaux sont alors caractérisés dans le cadre d'une maladie avec dégénérescence neurofibrillaire appelée "paralysie supranucléaire progressive" (PSP).

Ces structures ont aussi été décrites dans la dégénérescence corticobasale (DCB), où ils constituent la majorité des agrégations fibrillaires intra-cytoplasmiques (Ksiezak-Reding *et al.*, 1996). Enfin, les filaments droits sont retrouvés dans la MA, où ils sont minoritaires par rapport aux PHF (Crowther, 1991; Perry *et al.*, 1987).

#### II-1-2-1- Les filaments droits de la paralysie supranucléaire progressive

Les structures fibrillaires anormales de la PSP sont essentiellement composées de filaments droits présentant un diamètre régulier de 12-15 nm (Powell *et al.*, 1974; Tellez-Nagel et Wisniewski, 1973). Mais certains auteurs décrivent également la coexistence de PHF, différentes de celles de la MA, avec une largeur de 22-24 nm et une périodicité de 150-300 nm (Tableau 2)(Oyanagi *et al.*, 1991; Tabaton *et al.*, 1988; Takauchi *et al.*, 1983).

#### II-1-2-2- Les filaments droits de la dégénérescence corticobasale

En 1994, Wakabayashi et collaborateurs mettent en évidence des filaments droits de 15 nm de diamètre au sein des DNF de la substance noire et du *locus coeruleus*, et au sein des inclusions gliales tau positives, chez trois patients atteints de DCB (Tableau 2)(Wakabayashi *et al.*, 1994).

Par la suite, Ksiezak-Reding et collaborateurs décrivent dans la DCB des filaments enroulés ressemblant aux PHF de la MA. Ces filaments présentent un diamètre maximal de 26-

28 nm et un diamètre minimal de 13-14 nm, pour une périodicité de 169 à 202 nm. Ces filaments sont plus courts, d'une longueur ne dépassant pas 2 périodes (400 nm), et sont moins agrégés que dans les PHF de la MA (Ksiezak-Reding *et al.*, 1994).

En 1996, les mêmes auteurs décrivent ces PHF de la DCB comme étant une population hétérogène, formée de filaments simple brin et de filaments double brin. Les filaments simple brin seraient trois fois plus abondants, avec un diamètre de 15 nm. Les filaments double brin présenteraient un diamètre maximal de 29 nm, et pourraient être observés sous forme de 2 filaments simple brin séparés selon le grand axe des PHF. Une différence de stabilité pourrait donc différencier les PHF de la DCB des PHF de la MA (Ksiezak-Reding *et al.*, 1996).

### **II-1-3- Les filaments torsadés des corps de Pick**

La neuropathologie de la maladie de Pick est dominée par la présence d'inclusions neuronales argentophiles appelées "corps de Pick". Au plan ultrastructural, les corps de Pick sont constitués par l'agrégation de deux types de filaments anormaux dispersés de façon aléatoire: des filaments droits, d'un diamètre moyen de 15 nm, coexistent avec des filaments torsadés plus larges, d'un diamètre maximal de 30 nm. La périodicité des constriction est alors de 120 à 160 nm, définissant une ultrastructure plus proche de celle des PHF de la PSP que des PHF de la MA (Tableau 2)(Kato et Nakamura, 1990; Murayama *et al.*, 1990).

Pathologie	Anomalie du cytosquelette	Ultrastructure	Remarques
Maladie d'Alzheimer Trisomie 21 Syndrome de Guam	DNF	PHF $\varnothing = 20 \text{ nm}$ P = 80 nm	- PHF intracellulaires solubles - PHF extracellulaires insolubles + filaments droits
PSP	DNF	Filaments droits $\varnothing = 15 \text{ nm}$	+ PHF 22 nm $< \varnothing < 24 \text{ nm}$ 150 nm $< P < 300 \text{ nm}$
DCB	DNF	Filaments droits $\varnothing = 15 \text{ nm}$	+ PHF 14 nm $< \varnothing < 27 \text{ nm}$ 169 nm $< P < 202 \text{ nm}$
Maladie de Pick	Corps de Pick	Filaments droits $\varnothing = 15 \text{ nm}$ + Filaments torsadés $\varnothing = 30 \text{ nm}$ 120 nm $< P < 160 \text{ nm}$	

**Tableau 2: Anomalies du cytosquelette dans les pathologies neurodégénératives.**

L'agrégation intra-cytoplasmique des protéines tau hyperphosphorylées se traduit par la formation d'anomalies fibrillaires du cytosquelette neuronal. L'analyse ultrastructurale des lésions de dégénérescence neurofibrillaire (DNF) permet de distinguer les paires de filaments appariées en hélice (PHF) et les filaments droits. Les corps de Pick sont constitués de filaments droits et de filaments torsadés ( $\varnothing$ : diamètre des structures fibrillaires; P: période des structures fibrillaires enroulées).



**En conclusion:**

Certaines pathologies neurodégénératives sont caractérisées par l'existence d'inclusions fibrillaires intracytoplasmiques résultant de l'altération du cytosquelette neuronal. Ces inclusions présentent des caractéristiques ultrastructurales particulières qui permettent de différencier les paires de filaments appariés en hélice, les filaments droits de la dégénérescence neurofibrillaire, et les filaments torsadés des corps de Pick.

**II-2- DES ANOMALIES DU CYTOSQUELETTE AUX PATHOLOGIES****NEURODEGENERATIVES**

La fonction des cellules nerveuses est conditionnée en partie par leur morphologie particulière qui permet l'organisation de réseaux neuronaux fonctionnels. Les altérations du cytosquelette neuronal telle que la dégénérescence neurofibrillaire, vont avoir pour conséquence une modification morphologique des neurones, et donc une modification des connections synaptiques normalement établies, avec perte de fonctionnalité. Le dysfonctionnement du neurone va finalement provoquer sa mort. L'apparition de symptômes neurologiques caractérisant une pathologie est la conséquence ultime de ces modifications impliquant au niveau moléculaire les protéines tau.

Une partie de notre exposé sera consacrée à la description de certaines maladies neurologiques, dont la composante moléculaire est dominée par l'implication des protéines microtubulaires tau. Les aspects cliniques, histopathologiques et génétiques seront également étudiés. Cette présentation sera volontairement limitée aux pathologies utilisées dans notre

projet de recherche, c'est-à-dire les démences de type Alzheimer, les syndromes parkinsoniens atypiques et les démences de type frontal.

## **II-2-1- Maladie d'Alzheimer et démences apparentées**

### **II-2-1-1- La maladie d'Alzheimer**

Le neuropathologiste allemand Aloïs Alzheimer présente en 1907 l'étude histologique du cerveau d'une patiente âgée de 51 ans qui souffrait d'une dégradation progressive de ses facultés cognitives, d'hallucinations, de confusion mentale et d'une inaptitude psychosociale. Les changements histopathologiques observés sont décrits ainsi: " au centre d'une cellule apparemment normale se dressent une ou plusieurs fibrilles caractérisées par leur épaisseur et leur imprégnabilité particulière " à un colorant argenté. " De nombreux et petits foyers miliaires se trouvent dans les couches supérieures. Ils sont caractérisés par l'accumulation d'une substance particulière dans le cortex. " (Alzheimer, 1907).

Ces observations sont en fait la première description des anomalies histologiques de ce qui allait être ensuite appelé " maladie d'Alzheimer " (MA). Les enchevêtrements fibrillaires, aujourd'hui désignés par le terme de dégénérescence neurofibrillaire (DNF), et les " foyers miliaires " correspondant aux plaques séniles, constituent les lésions neurologiques caractéristiques de la MA.

La maladie d'Alzheimer est une démence, c'est-à-dire qu'elle se caractérise par une perturbation des fonctions cognitives du sujet, avec une répercussion marquée sur la vie quotidienne.

La définition de la MA est anatomo-clinique, le diagnostic clinique étant un diagnostic de probabilité et d'exclusion.

## II-2-1-1-1- Aspects cliniques

### a- Les symptômes

La maladie d'Alzheimer se caractérise sur le plan clinique par une hétérogénéité des symptômes qui sont rarement exprimés de façon similaire d'un patient à un autre. Les malades peuvent présenter un ou plusieurs signes cliniques dont la gravité sera variable d'un sujet à l'autre.

Les premiers symptômes révélant la pathologie sont généralement des troubles de la mémoire à long terme (mémoire sémantique<sup>1</sup> et mémoire épisodique<sup>2</sup>) auxquels s'ajoutent par la suite des troubles de la mémoire à court terme (mémoire de travail<sup>3</sup>). Cependant, l'amnésie pathologique doit être distinguée de la plainte mnésique<sup>4</sup> "banale" fréquente chez les sujets de plus de 50 ans.

Les troubles de la mémoire s'accompagnent plus ou moins rapidement de troubles cognitifs qui vont affecter des fonctions spécifiques, ainsi que la vie affective et comportementale.

#### a-1- Troubles des fonctions cognitives

##### *\* Troubles du langage*

Les troubles du langage parlé, vraisemblablement liés aux déficits de la mémoire sémantique, évoluent progressivement et peuvent être précoces. En début d'évolution, ils sont caractérisés par un "manque du mot", le sujet s'exprimant par périphrase et paraphrase afin de pallier à cette déficience. Pour un stade plus évolué de la maladie, la production du langage

---

<sup>1</sup> **Mémoire sémantique**: ensemble des connaissances générales sur le monde et le langage.

<sup>2</sup> **Mémoire épisodique**: système impliqué dans le souvenir des faits autobiographiques et des événements personnels.

<sup>3</sup> **Mémoire de travail**: mémoire de courte durée qui permet de garder présentes à l'esprit les informations nécessaires pour raisonner, comprendre une phrase ou la construire, calculer de tête.

<sup>4</sup> **Plainte mnésique**: diminution des capacités de mémorisation dans les situations de la vie quotidienne.

oral est caractérisée par une dyssyntaxie<sup>5</sup> et une paraphasie<sup>6</sup>. Enfin, au stade de démence sévère, une aphasie totale peut être décrite.

Des troubles du langage écrit peuvent apparaître très tôt, avec une dysorthographe, une simplification des mots et une perte de ponctuation. Une déstructuration de l'écriture peut également être décrite.

#### \* Troubles praxiques

Les troubles praxiques, ou apraxie, sont définis comme une incapacité à réaliser une activité gestuelle malgré des fonctions motrices et sensorielles intactes. Différents types d'apraxie peuvent être mis en évidence lors de l'examen neurologique. L'apraxie réflexive (trouble de l'imitation des gestes dépourvus de signification) est en général le signe le plus précoce observé dans la MA. L'apraxie constructive (perturbation du dessin de figures géométriques spontanées ou copiées) est également un signe précoce. Vient ensuite l'apraxie idéomotrice, touchant d'abord les gestes symboliques puis le mime d'utilisation. L'apraxie idéatoire (perturbation gestuelle dans l'utilisation d'un objet courant) est constatée dans les stades ultimes de la MA, ainsi qu'une apraxie de l'habillement.

#### \* Troubles gnosiques

L'agnosie est définie comme une incapacité à reconnaître ou à identifier des objets malgré des fonctions sensorielles intactes. Cette catégorie de troubles touche essentiellement la fonction visuelle, avec une perturbation de la reconnaissance des visages familiers (prosopagnosie) et des objets, et plus rarement la fonction auditive.

#### \* Troubles des fonctions exécutives

Le patient présente une perturbation de ses capacités à penser de façon abstraite, à planifier, initier, organiser dans le temps, contrôler et arrêter un comportement complexe.

---

<sup>5</sup> **Dyssyntaxie**: trouble du langage oral caractérisé par la disparition de l'ordre logique des mots dans le discours.

<sup>6</sup> **Paraphasie**: trouble du langage oral caractérisé par l'altération des syllabes et des mots.

### \* Troubles visuo-spatiaux

Les perturbations visuo-spatiales sont fréquemment observées au cours de l'évolution de la MA. Elles sont décrites comme une désorientation visuelle (incapacité à localiser un point dans l'espace par la vue), une apraxie du regard (incapacité à porter son regard sur une cible visuelle), une adhérence ou une paralysie psychique du regard, un rétrécissement du champ de l'attention et même parfois une ataxie optique (incapacité de pointer le doigt sur une cible sous le seul contrôle de la vue).

## a-2- Troubles de la vie affective et comportementale

### \* Troubles thymiques et affectifs

En début de maladie, le patient, conscient de l'apparition des troubles, peut être dépressif, anxieux et présenter des réactions de catastrophe lors des échecs. Ces réactions exagérées contrastent avec une insouciance, une apathie et une indifférence qui vont croître en même temps que la sévérité de la démence.

### \* Troubles psychotiques

Il s'agit généralement d'idées délirantes de persécution ou de préjudices. Des hallucinations visuelles peuvent également être décrites.

### \* Troubles comportementaux

Les troubles comportementaux apparaissent assez tardivement et se manifestent par des activités motrices stériles et incontrôlées (déambulation diurne ou nocturne, carphologie<sup>7</sup>, grognements, machonnements). La perte du contrôle génésique (désinhibition sexuelle) et sphinctérien (incontinence urinaire et anale) peut également être décrite, ainsi qu'une perturbation de l'alimentation.

---

<sup>7</sup> Carphologie: Activité stérile de coupage et de pliage.

## b- Le diagnostic

Le diagnostic de MA repose sur l'examen clinique qui doit, dans un premier temps, établir l'existence d'une démence, puis doit ensuite préciser si il s'agit ou non d'une démence de type Alzheimer. En l'absence de marqueur biologique fiable et facilement détectable, la confirmation du diagnostic est ensuite apportée par l'examen neuropathologique du cerveau.

### b-1- Le diagnostic de démence

Les critères diagnostiques les plus usités pour définir une démence sont ceux du DSM-III-R (Diagnostic and Statistical manual of Mental disorders, 3<sup>ième</sup> édition révisée, The American Psychiatric Association, Washington DC, 1987), progressivement remplacé par le DSM IV. Selon ces critères, le syndrome démentiel se caractérise par la réduction des capacités intellectuelles, avec des répercussions sur la vie sociale et professionnelle. Les troubles mnésiques constituent l'élément central et indispensable de ce diagnostic, auxquels doit être associé au moins un des symptômes déjà décrits, à savoir une aphasie, une apraxie, une agnosie ou une perturbation des fonctions exécutives.

Il est important de noter que d'autres critères diagnostiques existent pour définir une démence. Ce sont par exemple les critères de la classification internationale des maladies de l'OMS (International Classification of Diseases ou ICD), 9<sup>ième</sup> et 10<sup>ième</sup> version (ICD-9 ou ICD-10), ou le "Cambridge Examination for mental disorders of the elderly" (CAMDEX).

Selon une étude récente portant sur 1879 sujets âgés de 65 ans et plus, la proportion des sujets reconnus déments peut varier de 3.1% avec les critères de l'ICD-10 à 29.1% avec les critères du DSM-III. Seulement 20 sujets sont classés parmi les malades déments avec les 6 systèmes de critères diagnostiques comparés dans l'étude (Erkinjuntti *et al.*, 1997). Ce

travail rend compte de la difficulté de porter un diagnostic de démence, alors que plusieurs types de critères sont disponibles.

Plusieurs tests psychométriques, questionnaires ou échelles d'évaluation peuvent être utilisés pour apprécier les fonctions cognitives du sujet. Des examens paracliniques et biologiques peuvent être réalisés pour étayer le diagnostic.

#### b-1-1- L'examen neuropsychométrique

##### \* Les tests psychométriques

Réalisés par des évaluateurs spécialisés, les tests psychométriques permettent d'explorer les capacités intellectuelles, mnésiques ou symboliques (échelle d'intelligence pour adulte de Wechsler ou WAIS-R; Wechsler, 1989). Le principe de ces tests est quantitatif: tout résultat inférieur de deux déviations standard aux résultats obtenus chez les patients de même âge et de même niveau culturel est considéré comme potentiellement révélateur d'un dysfonctionnement cérébral.

##### \* Les questionnaires

Ils correspondent à des tests simplifiés qui peuvent être utilisés rapidement par des évaluateurs non-spécialisés. Le plus utilisé est le Mini Mental State Examination de Folstein ou MMSE (Folstein *et al.*, 1975). Le score au MMSE, noté de 0 à 30, renseigne sur la sévérité de la détérioration intellectuelle et mnésique. Schématiquement, un score compris entre 20 et 24 est associé à une démence légère, un score compris entre 10 et 20 est associé à une démence d'intensité modérée ou moyenne, et un score inférieur à 10 est synonyme de démence sévère.

Ce type d'épreuve permet au clinicien de faire un diagnostic différentiel rapide puisque l'échec à quelques items est un signe pathologique. Le questionnaire doit alors être complété par un bilan psychométrique détaillé précisant les modalités cognitives affectées. Cependant, la probabilité de détecter des faux-positifs n'est pas négligeable, en raison des variations des

performances normales en fonction de l'âge ou du niveau socio-éducatif. Il existe également des faux négatifs, l'examen étant peu sensible aux déficits discrets.

\* Les échelles d'évaluation

Ce type d'évaluation est basé sur l'observation directe ou indirecte des sujets par le biais des familles ou de l'entourage, et ne nécessite donc pas la participation directe du malade. Ces échelles évaluent le comportement quotidien, les habitudes (échelle de démence de Blessed; Blessed *et al.*, 1968), l'humeur (échelle de dépression de Hamilton) ou la sévérité de l'atteinte (échelle de Reisberg; Reisberg *et al.*, 1982). Ainsi, l'échelle globale de détérioration intellectuelle de Reisberg permet de définir 7 stades allant du sujet normal (Stade 1, pas de déficit cognitif) au sujet grabataire incapable d'assurer ses fonctions vitales (Stade 7, déficit cognitif très sévère).

b-1-2- Les examens paracliniques

Les examens paracliniques ne permettent pas au clinicien de poser un diagnostic de MA, mais ils constituent plutôt une aide au diagnostic et participent à l'établissement du diagnostic différentiel.

\* Les examens biologiques

Les examens biologiques tels que l'analyse de sang ou de LCR permettent au clinicien de dépister certaines pathologies hématologiques (leucémie ou lymphome à localisation intracérébrale), infectieuses (syphilis, méningite, démence secondaire à une infection par le VIH), inflammatoires (sclérose en plaques) ou métaboliques (avitaminose B1 ou B12, troubles thyroïdiens) pouvant avoir une répercussion sur les fonctions intellectuelles.

\* L'imagerie morphologique et fonctionnelle

Les examens morphologiques à l'aide du Scanner ou de l'Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire (IRMN) permettent d'écarter certaines affections non dégénératives tels



que les processus expansifs cérébraux, l'hydrocéphalie à pression normale ou les accidents vasculaires cérébraux. L'IRM est particulièrement utile pour différencier une démence vasculaire d'une MA.

Par ailleurs, les méthodes d'imagerie fonctionnelle tels que le PETscan (Tomographie par émission de positons) ou le SPECTscan (Tomographie par émission de photons) permettent une analyse dynamique du métabolisme cérébral. Le PETscan, évaluant de manière quantitative le métabolisme du glucose, la consommation d'oxygène et le débit sanguin cérébral, met en évidence un hypométabolisme au niveau des régions pariétales et temporales chez les patients atteints de MA. Le SPECTscan, en évaluant la perfusion sanguine cérébrale, donne une idée de l'activité neuronale. Chez les patients Alzheimer, une diminution globale de la perfusion dans les régions pariéto-temporales peut être mise en évidence.

#### b-2- Le diagnostic de maladie d'Alzheimer

Les critères diagnostiques utilisés pour caractériser plus spécifiquement la maladie d'Alzheimer sont ceux du "National Institute of Neurological Disorders and Stroke" et de "l'Alzheimer's Disease and Related Disorders Association" (critères du NINCDS-ADRDA) (Mc Khann *et al.*, 1984).

Les critères du NINCDS-ADRDA s'appuient sur l'établissement préalable d'un diagnostic de démence, fondé sur un examen clinique et documenté par une évaluation de type MMSE. Ils prennent en compte l'âge de survenue de la maladie et l'absence d'autres pathologies systémiques ou cérébrales qui pourraient être responsables, directement ou indirectement, d'altérations mnésiques ou de troubles cognitifs (diagnostic différentiel). Ils considèrent également les résultats des examens paracliniques précédemment cités, et définissent les éléments qui sont en défaveur du diagnostic de MA. Enfin, les critères du NINCDS-ADRDA distinguent trois degrés de probabilité dans le diagnostic de MA:

- "maladie d'Alzheimer possible",

- "maladie d'Alzheimer probable",

- "maladie d'Alzheimer certaine". L'établissement de ce diagnostic de certitude suppose la vérification des critères de "MA probable" et la mise en évidence d'altérations histopathologiques caractéristiques obtenues par biopsie ou autopsie.

#### II-2-1-1-2- Aspects neuropathologiques

L'examen neuropathologique doit décrire les lésions cérébrales caractéristiques que sont les plaques séniles et la dégénérescence neurofibrillaire (Mc Khann *et al.*, 1984; Khachaturian, 1985). Une atrophie corticale diffuse ainsi qu'une gliose réactionnelle peuvent également être décrites.

##### a- L'atrophie corticale

L'atrophie corticale est surtout importante pour les lobes temporal et pariétal, le lobe occipital étant épargné. Elle se traduit par un rétrécissement des circonvolutions et un élargissement des sillons. L'atrophie corticale est associée à une dilatation des ventricules latéraux. La diminution du poids du cerveau consécutive à l'atrophie est significative à l'échelle d'une population, mais ne l'est pas pour un individu donné. Ce dernier paramètre n'a donc pas de valeur diagnostique.

Selon Duyckaerts et collaborateurs, l'atrophie aurait pour substrat histologique une réduction de la longueur du ruban cortical consécutive à une perte de neurones en colonnes, plus qu'une diminution de son épaisseur (Duyckaerts *et al.*, 1985). Néanmoins, l'épaisseur peut aussi être affectée pour les cas sévères, et pour certains auteurs, la perte neuronale de l'ordre de 22 à 26% décrite dans la MA (Mountjoy *et al.*, 1983; Terry *et al.*, 1981) serait plutôt laminaire. Elle affecterait alors les neurones pyramidaux possédant de longues projections cortico-corticales dans le néocortex (Lewis *et al.*, 1987).

## b- Les lésions histologiques

### b-1- Les dépôts amyloïdes

Les dépôts amyloïdes sont localisés soit dans le parenchyme cérébral et constituent alors les plaques séniles (PS)(figure 2A), soit dans la paroi de certains vaisseaux cérébraux constituant une anomalie dénommée "angiopathie amyloïde".

Les dépôts amyloïdes localisés dans le domaine extra-cellulaire peuvent être classés en cinq catégories, selon la classification de Delaère et collaborateurs (1991):

- les dépôts stellaires sont de petits granules de 2 à 20  $\mu\text{m}$  de diamètre, avec des processus fibrillaires.
- les dépôts diffus ou préamyloïdes sont des structures de 10 à 200  $\mu\text{m}$  de diamètre, avec un contour irrégulier.

Ces deux premiers types de dépôts amyloïdes ne sont pas visualisés avec des colorants tels que le rouge Congo, spécifique des structures en feuillet  $\beta$ -plissés.

- les plaques primitives se présentent sous forme de dépôts sphériques de 20 à 60  $\mu\text{m}$  de diamètre, sans coeur dense et avec un contour bien défini. Une couronne de neurites dystrophiques peut être observée.
- les plaques classiques sont des structures de 20 à 60  $\mu\text{m}$  de diamètre, avec un coeur dense de nature fibrillaire, et une couronne de neurites dystrophiques.
- les plaques compactes (ou « burned-out plaques ») présentent un diamètre de 5 à 15  $\mu\text{m}$ , avec un cœur dense, mais ne sont pas entourées de neurites dystrophiques.

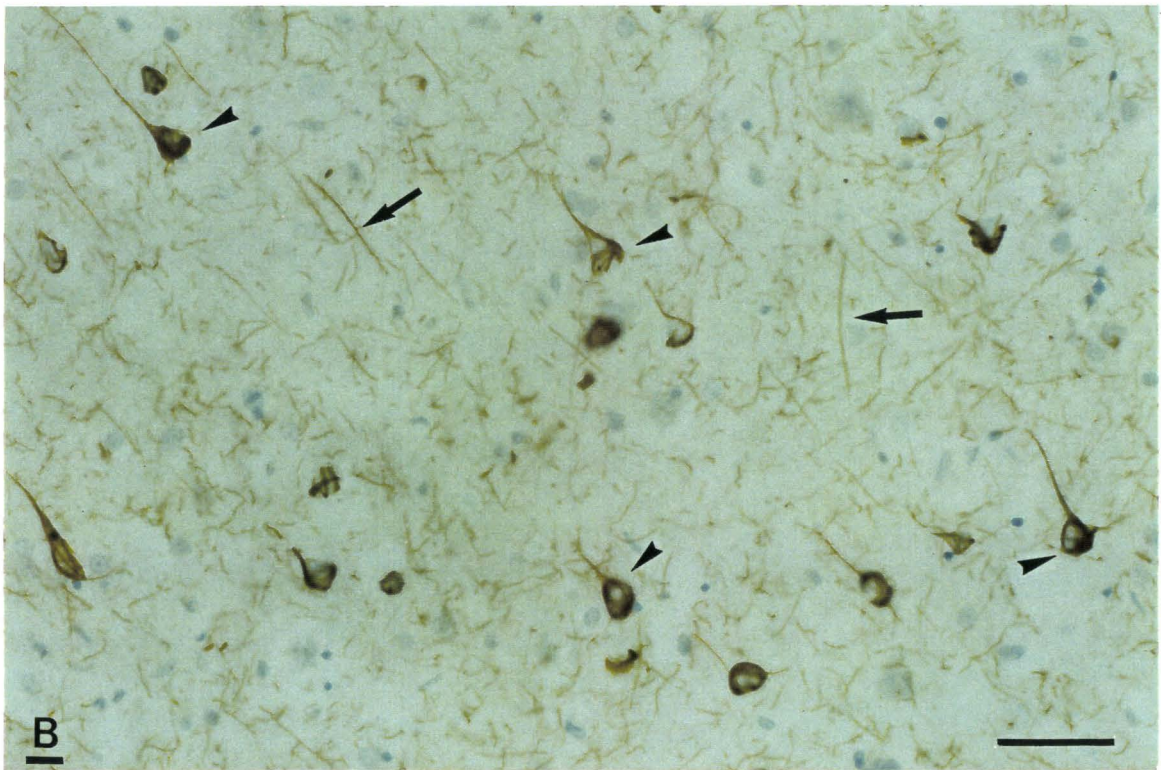
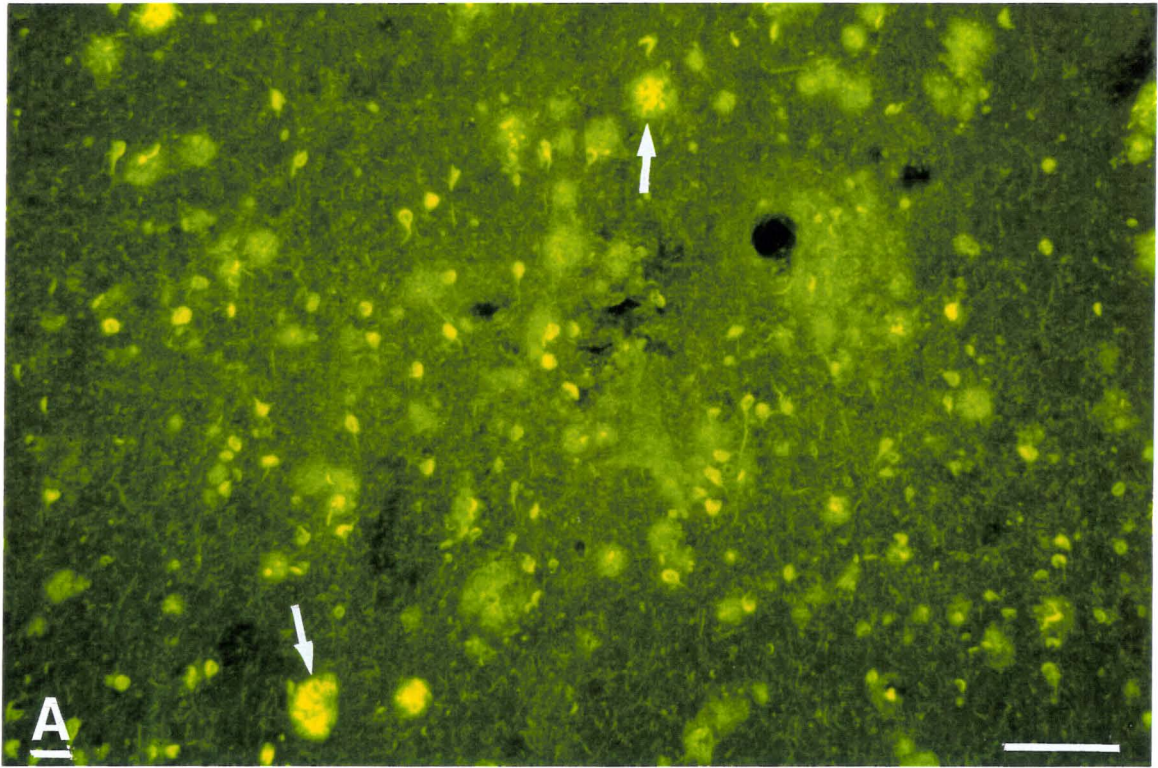
#### \* Distribution régionale et laminaire:

Les PS sont réparties préférentiellement dans les aires néocorticales, les régions temporales et occipitales étant les plus touchées, comparativement aux aires pariétales et

**Figure 2:**

**(A)** Coloration par la thioflavine S d'une coupe de cortex temporal de cerveau de patient Alzheimer. Les dépôts amyloïdes compacts visualisés en fluorescence sont indiqués par les flèches. Echelle: 50  $\mu\text{m}$ .

**(B)** Immunomarquage obtenu avec un anticorps polyclonal (988) spécifique d'un site phosphorylé des protéines tau, sur coupe en congélation de cortex temporal de cerveau de patient Alzheimer. Les neurones avec dégénérescence neurofibrillaire sont indiqués par des pointes de flèche, les neurites dystrophiques par des flèches. Révélation à la DAB et contre-coloration à l'Hemalun de Mayer. Echelle: 25  $\mu\text{m}$ .



frontales. Le cortex entorhinal, l'hippocampe et le noyau basal de Meynert ne sont pas ou peu touchés (Arnold *et al.*, 1991; Price *et al.*, 1991).

Les dépôts amyloïdes ont une distribution laminaire large, mais sont préférentiellement retrouvés dans les couches corticales II et III (Braak et Braak, 1991; Delaère *et al.*, 1991; Duyckaerts *et al.*, 1986).

Les plaques séniles ne constituent pas un marqueur histopathologique spécifique de la MA, puisqu'elles sont trouvées au niveau de la formation hippocampique des sujets sains âgés (>75 ans) et dans d'autres pathologies neurodégénératives. Ainsi, le cerveau des patients atteints de syndrome de Down présente de nombreuses PS, avec une distribution similaire à celle observée dans le cerveau de patients Alzheimer (Mann et Esiri, 1989; Mann *et al.*, 1990).

#### \* Cinétique d'apparition des dépôts amyloïdes:

En 1991, Braak et Braak ont défini 3 stades d'évolution des dépôts amyloïdes au cours de la MA. Pour le stade A, les dépôts sont en faible quantité dans les régions basales des cortex frontal, temporal et occipital, la formation hippocampique étant épargnée. Pour le stade B, les dépôts amyloïdes affectent modérément presque toutes les aires associatives et très modérément la formation hippocampique (couche pyramidale du subiculum et du CA1). Seules les aires sensitives et motrices primaires sont épargnées. Au stade C, l'ensemble de l'isocortex est affecté, certains noyaux sous-corticaux peuvent être touchés (striatum, thalamus, hypothalamus) et la formation hippocampique reste modérément affectée. Des dépôts diffus peuvent être observés dans la couche moléculaire du cervelet.

#### \* Analyse ultrastructurale:

L'analyse ultrastructurale de la substance amyloïde révèle des filaments de 6 à 9 nm de diamètre (Merz *et al.*, 1983), adoptant une structure en feuillets  $\beta$  plissés au sein des dépôts (Glennner, 1980). Cette conformation particulière du peptide amyloïde est à l'origine de son insolubilité, et autorise sa mise en évidence par certains colorants comme le rouge Congo ou

la thioflavine S. Cependant, le peptide amyloïde existe aussi dans le tissu cérébral sous forme soluble. Il s'accumule alors en dépôts diffus, non détectables avec les colorants précédemment cités.

\* Analyse biochimique:

En 1984, un peptide de 39 à 43 acides aminés est décrit par Glenner et Wong comme le principal constituant des dépôts amyloïdes présents dans la paroi des vaisseaux méningés de patients atteints de MA (Glenner et Wong, 1984). Ce peptide d'environ 4 kDa, appelé peptide A $\beta$  ou peptide A4, fut ensuite décrit comme constituant des dépôts amyloïdes (Masters *et al.*, 1985; Selkoe *et al.*, 1986). Le peptide A $\beta$  dérive par clivage enzymatique d'un précurseur de grande taille appelé APP (pour Amyloid Precursor Protein).

Par la suite, de nombreux autres constituants des plaques séniles ont pu être mis en évidence par des études immunohistochimiques. Il s'agit des apolipoprotéines B et E, de l' $\alpha$ 1-antichymotrypsine, des protéines du complément (Rogers *et al.*, 1988), des protéoglycannes, de l'ubiquitine, des immunoglobulines, de la ferritine, des thrombospondines... (Abraham *et al.*, 1988; Buée *et al.*, 1992; Namba *et al.*, 1991; Perlmutter *et al.*, 1991;). Certains de ces facteurs, comme l' $\alpha$ 1-antichymotrypsine (Abraham *et al.*, 1988), l'apolipoprotéine E (Namba *et al.*, 1991) ou les protéoglycannes (Buée *et al.*, 1993 a-b) agiraient comme des co-facteurs de l'amyloïdogénèse en favorisant l'accumulation du peptide amyloïde.

## b-2- La dégénérescence neurofibrillaire

Les neurones avec dégénérescence neurofibrillaire (DNF) présentent au sein de leur cytoplasme des structures fibrillaires anormales. Ces neurones possèdent des propriétés argyrophiles et peuvent être mis en évidence avec des techniques d'imprégnation argentique (Gallyas, 1971). Ils prennent alors l'aspect de flammes. Les lésions de DNF sont également constituées par les neurites dystrophiques, qui prennent l'aspect de virgules dispersées dans

tout le neuropile, et les plaques neuritiques, qui correspondent à l'accumulation de ces neurites dystrophiques autour des plaques séniles (figure 2B).

\* Distribution régionale et laminaire:

Les neurones avec DNF observés dans la MA montrent une distribution préférentielle au niveau de la formation hippocampique (CA1 et subiculum), des cortex transentorhinal (aire 35 de Brodmann) et entorhinal (aire 38 de Brodmann) et de l'amygdale. Le lobe temporal présente également une forte densité de DNF, en tout cas supérieure à celle observée dans les lobes frontal et pariétal. Le lobe occipital n'est atteint que dans les formes sévères de la MA (Arnold *et al.*, 1991).

Les couches supragranulaires (II et III) et infragranulaires (V et VI) sont les plus atteintes par la DNF dans la MA (Arnold *et al.*, 1991; Delaère *et al.*, 1989 ; Hof *et al.*, 1990; Lewis *et al.*, 1987). Dans les aires corticales associatives, les couches infragranulaires sont plus touchées que les couches supragranulaires (Hof *et al.*, 1990). Le cortex occipital, lorsqu'il présente des neurones avec DNF, montre une distribution laminaire inversée.

\* Cinétique d'apparition de la DNF:

Au cours de la MA, la formation des lésions de DNF suit une progression hiérarchisée et stéréotypée au travers des différentes aires et structures cérébrales. Cette progression, étudiée par Braak et Braak, est utilisée pour définir 6 stades neuropathologiques de la MA (Braak et Braak , 1991):

- *Stade I:* correspond à une atteinte modérée du cortex transentorhinal, et en particulier de la couche II (couche pré- $\alpha$  selon Braak et Braak). Les neurones de cette couche sont généralement les premiers à développer une dégénérescence neurofibrillaire.

- *Stade II:* correspond à une aggravation du stade I, avec une extension des lésions au niveau de la couche II. Quelques lésions de DNF peuvent être observées au niveau du subiculum.



Les stades I et II sont donc caractérisés par l'atteinte préférentielle de la région transentorhinale, la région hippocampique étant très faiblement atteinte et l'isocortex épargné. Les stades I et II sont donc appelés « *stades transentorhinaux* ».

- *Stade III*: correspond à une atteinte sévère des cortex transentorhinaux et entorhinaux, avec de nombreux neurones dégénérés et une densité élevée de neurites dystrophiques. Les premières figures de DNF extra-cellulaires sont visibles à ce stade dans le cortex transentorhinal. Au niveau de la formation hippocampique, le CA1 est légèrement atteint, alors que les secteurs CA2, CA3 et CA4 sont épargnés. Le subiculum présente des lésions de DNF. Enfin, l'isocortex n'est pas ou peu affecté.

-*Stade IV*: les cortex transentorhinal et entorhinal sont très sévèrement affectés, avec un grand nombre de lésions de DNF extra-cellulaires à ce niveau. Les couches III et IV sont aussi sévèrement affectées. Au niveau de l'hippocampe, le secteur CA1 est très touché et le subiculum modérément. L'isocortex demeure peu touché par la progression de la dégénérescence. Certaines structures sous-corticales peuvent être touchées (amygdale, *claustrum*, *putamen*).

Les stades III et IV, caractérisés par l'atteinte de la formation hippocampique, sont appelés « *stades limbiques* ».

- *stade V*: un grand nombre de lésions de DNF extra-cellulaires sont observées dans la couche II (pré- $\alpha$ ). Toutes les composantes de la formation hippocampique sont atteintes. Les aires associatives isocorticales sont sévèrement touchées et les aires sensorielles primaires présentent quelques plaques neuritiques au niveau de la couche III. Le cortex moteur primaire est généralement la dernière région affectée.

- *stade VI*: une perte neuronale et un nombre élevé de DNF extra-cellulaires sont observés dans les cortex transentorhinal et entorhinal. Les lésions de DNF sont extrêmement importantes au niveau de la formation hippocampique et les aires isocorticales sont sévèrement atteintes. Seul le cortex moteur primaire paraît être épargné. Les noyaux sous-corticaux sont également atteints.

Les stades V et VI sont appelés « *stades isocorticaux* », du fait de l'atteinte massive de l'isocortex.

## II-2-1-2- Aspects épidémiologiques et génétiques

### II-2-1-2-1- Epidémiologie descriptive

La baisse de la fécondité et l'allongement de l'espérance de vie se traduisent actuellement par un vieillissement de la population des pays industrialisés. Ainsi, le pourcentage de sujets âgés de 65 ans et plus est passé de 8% en 1950 à 14,3% en 1992, alors que la proportion de sujets âgés de 80 ans et plus est passée de 1 à 4% durant la même période.

Si l'on considère que 2% des personnes entre 65 et 69 ans et plus de 30% des personnes au-delà de 90 ans présentent des critères cliniques de démence (étude européenne EURODEM), et que 70% environ des cas sont une MA, une prévalence<sup>8</sup> importante de cette pathologie est facilement envisageable. Ainsi, les chiffres de l'étude EURODEM attribuent à la MA une prévalence de 0,02% pour la population européenne entre 30 et 60 ans, 0,3% entre 60 et 70 ans, 3,2% entre 70 et 80 ans et 10,8% après 80 ans (Rocca *et al.*, 1991). Certaines études donnent même une prévalence de l'ordre de 50% pour les sujets de plus de 85 ans (Evans *et al.*, 1989; Mölsa *et al.*, 1982; O'Connor *et al.*, 1989 a-b; Sulvaka *et al.*, 1985).

L'incidence<sup>9</sup> annuelle des démences de type Alzheimer est difficile à évaluer car tous les nouveaux cas ne sont pas forcément recensés. Plusieurs études européennes récentes sont en faveur d'une incidence exponentielle des cas de démence en fonction de l'âge, avec un effet accentué chez les hommes avant 75 ans et un effet accentué chez les femmes au-

---

<sup>8</sup> **Prévalence**: proportion d'une population qui, à un moment donné, est atteinte de la maladie considérée.

delà. En tenant compte de la proportion relative de maladie d'Alzheimer par rapport aux démences vasculaires et aux autres démences, l'étude de Rotterdam attribue respectivement à ces pathologies une incidence annuelle de 7.7, 1.5 et 1.3 nouveaux cas pour 1000 personnes (Alewijn *et al.*, 1997). En France, l'étude de la cohorte PAQUID a permis d'estimer l'incidence annuelle des démences à 15.9 pour 1000, et l'incidence de la MA à 11.7 pour 1000 (Letenneur *et al.*, 1994). Concrètement, si les résultats de cette étude régionale sont extrapolés à la France métropolitaine, en tenant compte des données démographiques de 1992, on peut estimer qu'il y aurait chaque année 91700 nouveaux cas de MA, dont 2700 entre 65 et 69 ans, 4900 entre 70 et 74 ans, 18700 entre 75 et 79 ans, 26500 entre 80 et 84 ans, 21900 entre 85 et 89 ans et 17000 au-delà de 90 ans.

Les différences de prévalence et d'incidence observées en fonction de l'âge ont abouti à la définition arbitraire de deux groupes de patients, par rapport à l'âge de survenue de la maladie. On distingue ainsi les formes précoces ou préséniles, survenant avant 65 ans, des formes tardives ou séniles, survenant après 65 ans. Il n'existe pas de différences phénotypiques majeures entre ces deux groupes de patients, même si les cas précoces semblent évoluer plus rapidement et présentent des caractéristiques cliniques et pathologiques plus prononcées. La proportion des formes précoces et des formes tardives est estimée respectivement à 25 et 75% du total des cas de MA (Van Broeckhoven *et al.*, 1995).

#### II-2-1-2-2- Etiologie

L'étiologie de la MA reste encore inconnue pour la majorité des cas dits "sporadiques", mais également pour un certain nombre de cas familiaux. Par contre, l'implication directe d'un facteur génétique a été démontrée dans environ 10% des cas précoces, et à ce jour, 3 gènes

---

<sup>9</sup> **Incidence:** nombre de nouveaux cas d'une maladie dans une population donnée et pour un intervalle de temps donné.

à transmission autosomique dominante<sup>10</sup> sont associés à ces formes de la maladie. Il s'agit du gène du précurseur APP du peptide amyloïde situé sur le chromosome 21 et des gènes codant pour les protéines PS1 et PS2 (présénilines 1 et 2) situés respectivement sur les chromosomes 14 et 1. Un quatrième gène, codant pour l'apolipoprotéine E qui agirait comme facteur de risque, serait préférentiellement associé aux formes tardives de la maladie. Il est situé sur le chromosome 19.

Plus récemment, l'implication potentielle d'un gène localisé sur le chromosome 12 (12p11-12) dans les formes tardives de MA fut décrite par Pericak-Vance et collaborateurs (Pericak-Vance *et al.*, 1997). A ce niveau se trouvent le gène du récepteur aux LDL (LRP), qui interagit avec l'apolipoprotéine E, et le gène de l' $\alpha$ -2 macroglobuline ( $\alpha$ -2M), protéine qui utilise ce LRP comme récepteur. Une association entre ces gènes et la MA est mise en évidence par certaines équipes, mais reste actuellement très controversée, en particulier pour l' $\alpha$ -2M.

#### a- Facteurs génétiques impliqués dans les formes précoces de MA

##### a-1- Le gène de l'APP

Le gène codant pour le précurseur APP (Amyloid Precursor Protein) du peptide amyloïde, situé sur le chromosome 21 en 21q21, a été le premier gène à être associé à la MA, en 1991 (Goate *et al.*, 1991).

Les protéines APP sont des glycoprotéines membranaires qui existent sous forme de 6 variants majeurs, dont la séquence comprend de 365 à 770 acides aminés (APP<sub>365</sub>, APP<sub>563</sub>, APP<sub>695</sub>, APP<sub>714</sub>, APP<sub>751</sub>, APP<sub>770</sub>)(Kang *et al.*, 1987; Lemaire *et al.*, 1989). 4 des 6 isoformes contiennent dans leur séquence le peptide amyloïde, ou peptide A $\beta$ , constituant majeur des plaques séniles. Le métabolisme de l'APP met en jeu des enzymes appelées "sécrétases" et

---

<sup>10</sup> **Transmission autosomique dominante:** transmission d'une mutation située sur un chromosome non-sexuel (autosomal) qui touche donc indifféremment hommes et femmes. La présence du gène muté en un seul exemplaire suffit à provoquer la maladie (forme dominante).

va aboutir soit à la sécrétion de la forme amyloïdogénique du peptide (A $\beta$ 1-42), soit à la sécrétion d'une forme non-amyloïdogénique (A $\beta$ 1-40).

Sept mutations sont décrites sur le gène de l'APP: une mutation au codon 716 (Eckman *et al.*, 1997), 3 mutations au codon 717 (Goate *et al.*, 1991; Chartier-Harlin *et al.*, 1991; Murrell *et al.*, 1991), une double mutation au codon 670-671 dite "mutation suédoise" (Mullan *et al.*, 1992), une mutation au codon 713 (Carter *et al.*, 1992), et une mutation au codon 665 (Peacock *et al.*, 1994). Ces mutations induisent une augmentation du peptide A $\beta$  1-42 dans le plasma et/ou dans le tissu cérébral, favorisant ainsi la formation des dépôts amyloïdes.

Ces mutations concernent de 1 à 3% des cas familiaux (Selkoe, 1996), avec un âge de survenue de la maladie compris entre 39 et 67 ans.

#### a-2- Les gènes PS1 et PS2

En 1995, des études de liaison génétique ont permis d'identifier le gène PS1, situé sur le chromosome 14 en 14q24.3, et de l'associer à certaines formes familiales précoces de MA (Sherrington *et al.*, 1995). En même temps, un autre gène situé sur le chromosome 1 en 1q31-42, également associé à la MA, est isolé de par son homologie de séquence avec PS1, et nommé PS2 (Levy-Lahad *et al.*, 1995 a-b).

A ce jour, 45 mutations ont été décrites sur le gène PS1 et 2 mutations sur le gène PS2 (Hutton et Hardy, 1997). Ces mutations sont à transmission autosomique dominante et à pénétrance complète, à l'exception d'une seule mutation PS1 qui présente une pénétrance incomplète (Rossor *et al.*, 1996). Environ 70% des mutations sont des mutations privées, et sont donc propres à un individu ou à une famille uniquement. Les patients porteurs de mutations sur les gènes des présénilines développent des formes très précoces de la maladie, en particulier avec PS1 (Campion *et al.*, 1996). Ainsi, l'âge moyen de survenue de la maladie est de 45 ans pour PS1 (32 à 56 ans) et de 52 ans pour PS2 (40 à 85 ans pour la famille allemande de la Volga).

Selon certains auteurs, les gènes PS1 et PS2 seraient responsables d'environ 50% des cas précoces de MA (Blacker et Tanzi, 1998). Néanmoins, cette valeur ne fait pas l'objet d'un consensus, et un pourcentage de 70% est plus souvent admis.

Le rôle des présénilines dans la pathogénie de la MA n'est pas encore connu. Cependant, leur implication dans le métabolisme de l'APP est souvent évoquée, et conduirait à une augmentation de la production du peptide amyloïde A $\beta$  1-42. D'autre part, les présénilines pourraient promouvoir la mort cellulaire par apoptose (Kim et Tanzi, 1997).

Enfin, une implication directe de PS1 dans la régulation de la phosphorylation des protéines tau pourrait exister, par l'intermédiaire d'une liaison entre PS1, les protéines tau et la GSK-3 $\beta$  (Takashima *et al.*, 1998). PS1 fixerait la protéine kinase et son substrat dans la même région, et faciliterait ainsi leurs interactions. La présence de mutations dans le gène de PS1 aurait pour conséquence une augmentation de la capacité de liaison entre PS1 et la GSK-3 $\beta$ , et donc une augmentation de l'activité kinasique. Les mutations sur le gène de PS1 auraient donc pour effet d'augmenter la phosphorylation des protéines tau.

## b- Facteurs génétiques impliqués dans les formes tardives de MA

### b-1- L'apolipoprotéine E

En 1991, Pericak-Vance et collaborateurs décrivent une association entre des cas de MA séniles et une région du chromosome 19. Ce résultat est confirmé par la suite et un locus situé en 19q13.2, contenant le gène de l'apolipoprotéine E (ApoE), est retenu. Ce gène présente 3 allèles notés  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 et  $\epsilon$ 4 à partir desquels sont produites les 3 isoformes ApoE2, ApoE3 et ApoE4. Dans la population générale, l'allèle  $\epsilon$ 3 est le plus fréquemment exprimé. Par contre, une surexpression de l'allèle  $\epsilon$ 4 est décrite dans les formes sporadiques ou familiales, tardives ou précoces de la MA, avec une relation dose-effet sur le risque de développer la maladie et sur l'âge de survenue de la maladie, en fonction du nombre d'allèle  $\epsilon$ 4 exprimé (Corder *et al.*, 1993). Ainsi, les sujets homozygotes  $\epsilon$ 4/ $\epsilon$ 4 ont 91% de risque d'être affectés, avec un âge moyen d'apparition de la maladie de 68.4 ans; les sujets hétérozygotes  $\epsilon$ 4/ $\epsilon$ 2 ou

$\epsilon 4/\epsilon 3$  ont un risque de 47% et un âge moyen de 75.5 ans; les sujets n'exprimant aucun allèle  $\epsilon 4$  ont un risque de 20% avec un âge moyen de survenue de la maladie de 84.3 ans (Saunders *et al.*, 1993; Strittmatter *et al.*, 1993; Chartier-Harlin *et al.*, 1994; Van Duijn *et al.*, 1994; Roses *et al.*, 1995; Perez-Tur *et al.*, 1995). La présence d'au moins un allèle  $\epsilon 4$  constituerait donc un facteur de risque pour la MA, et agirait en abaissant l'âge de survenue de la maladie. A l'opposé, la présence d'un allèle  $\epsilon 2$  aurait un effet protecteur vis-à-vis de la maladie (Corder *et al.*, 1994). Mais ces résultats sont à considérer avec précaution, car variables selon l'ethnie considérée.

Le rôle potentiel de l'ApoE dans la pathogénie de la MA est à rapprocher des interactions qu'elle réalise avec certains autres composants des lésions caractéristiques de la maladie, à savoir les protéines tau et le peptide amyloïde.

Les études immunohistochimiques des lésions cérébrales montrent un marquage spécifique de l'ApoE au sein des DNF (Namba *et al.*, 1991). De plus, une interaction préférentielle de l'ApoE3 recombinante avec des protéines tau recombinantes a été démontrée, et serait inhibée par la phosphorylation des protéines tau (Strittmatter *et al.*, 1994). Ainsi, les apolipoprotéines E2 et E3, en se liant aux protéines tau, empêcheraient leur phosphorylation et préviendraient donc la formation des PHF et l'apparition des lésions de DNF. On retrouverait donc le rôle protecteur des ApoE2 et ApoE3 observés au niveau génétique. A l'inverse, en ne formant pas de complexe avec les protéines tau, l'ApoE4 n'empêcherait pas leur phosphorylation et ne s'opposerait donc pas à la formation des lésions de type DNF.

La nature des interactions qui existent entre les différentes isoformes de l'ApoE et le peptide amyloïde n'est pas connue avec certitude et reste controversée. Ainsi, certains travaux montrent une affinité préférentielle de l'ApoE4 recombinante pour le peptide amyloïde, favorisant l'agrégation du peptide amyloïde et la formation des fibrilles amyloïdes (Ma *et al.*, 1994). A l'inverse, certaines études, utilisant des ApoE sécrétées non-purifiées et associées à des lipoparticules, décrivent une affinité supérieure de l'ApoE2 pour le peptide amyloïde par rapport aux ApoE3 et ApoE4. Selon Ladu et collaborateurs, l'ApoE2 se lierait au peptide

amyloïde afin d'inhiber sa nucléation et/ou activer son transport pour son élimination (Ladu *et al.*, 1997).

## b-2- Les autres facteurs génétiques

### \* L' $\alpha$ -2macroglobuline:

L' $\alpha$ -2macroglobuline est un inhibiteur de protéase qui, en se liant au peptide  $\beta$ -amyloïde, diminuerait sa capacité à former des fibrilles, et favoriserait sa dégradation et son élimination.

Blacker et collaborateurs décrivent une association entre une délétion A2M-2 sur le gène de l' $\alpha$ -2macroglobuline et les formes tardives de la MA. Cette association serait au moins aussi puissante que celle de l'ApoE, mais à la différence de cette dernière, n'influencerait pas la date de survenue de la maladie (Blacker *et al.*, 1998).

Il faut cependant noter que ces résultats sont actuellement controversés. Selon les études, cette association est faible ou inexistante, mais aucune équipe ne semble être en mesure de reproduire les résultats de Blacker et collaborateurs démontrant une association aussi forte que pour l'ApoE.

### \* Le LRP:

Le LRP (LDL receptor-related protein) est un récepteur membranaire localisé majoritairement sur les neurones du cerveau. Il est impliqué dans le métabolisme de l'apoE, ainsi que dans le métabolisme du précurseur APP du peptide amyloïde.

Une association génétique a été décrite entre les formes tardives de MA et un polymorphisme situé en amont du gène du LRP. Ce polymorphisme, impliquant la répétition d'un tetranucléotide, donne naissance à 4 allèles de 95, 91, 87 et 83 pb. Lendon et collaborateurs rapportent une augmentation significative de la fréquence de l'allèle de 87 pb dans une population américaine de patients Alzheimer à début tardif (Lendon *et al.*, 1997). Cependant, ce résultat n'a pu être reproduit pour une population française. Une diminution de la fréquence de l'allèle de 87 pb est alors décrite (Wavrant-De Vrièze *et al.*, 1997).



Si la nature du gène impliqué n'est donc pas définie, l'existence d'une association entre un locus situé sur le chromosome 12 et les formes tardives de MA est cependant admise.

### II-2-1-3- Le syndrome de Down ou trisomie 21

#### II-2-1-3-1- Aspects cliniques

La trisomie 21 est la forme la plus commune de syndrome associé à un retard mental, puisqu'elle concerne 1 naissance sur 1000.

Les patients ayant une trisomie 21 présentent un phénotype typique avec des anomalies cardiaques, un déficit de croissance et de maturation du cerveau responsable du retard mental plus ou moins sévère, et des changements pathologiques habituellement liés à l'âge mais qui apparaissent alors plus précocement. Une large proportion de sujets trisomiques, au-delà de 45 ans, développent une démence qui évolue rapidement.

#### II-2-1-3-2- Aspects neuropathologiques

L'examen macroscopique du cerveau de patient trisomique révèle une diminution du poids du cerveau, un rétrécissement selon l'axe rostro-caudal, une hypoplasie variable du lobe frontal et une atrophie du gyrus temporal supérieur (Hof *et al.*, 1995).

L'examen microscopique permet de décrire:

- une **perte neuronale** importante au niveau de l'hippocampe, du néocortex et de certaines structures sous-corticales (Mann *et al.*, 1987; Ross *et al.*, 1984).

- une **dégénérescence neurofibrillaire** affectant surtout la couche II du cortex entorhinal et l'hippocampe. Le néocortex peut être touché chez les sujets de plus de 40 ans (Mann *et al.*, 1989; Hof *et al.*, 1995).

- l'existence de **plaques séniles** selon une densité importante, qui peut être supérieure à celle qui est généralement observée dans la MA. Les plaques séniles apparaissent plus tôt que la DNF, après l'âge de 15 ans (Bertrand et Koffas, 1946; Mann *et al.*, 1989; Hof *et al.*, 1995).

#### II-2-1-3-3- Aspects biochimiques

L'analyse biochimique démontre que les protéines tau extraites de cerveau de patient trisomique sont hyperphosphorylées et présentent les mêmes caractéristiques que les protéines tau-PHF de la MA. Elles sont donc résolues en électrophorèse sous forme d'un triplet tau55, tau64, tau69. Un marquage diffus de l'ensemble de la piste de migration révèle le caractère insoluble de ces protéines (Flament *et al.*, 1990; Hanger *et al.*, 1991).

### II-2-2- Les syndromes parkinsoniens

#### II-2-2-1- Le syndrome de l'île de Guam

Le syndrome de l'île de Guam est une maladie neurodégénérative chronique avec une prévalence élevée dans la population Chamorro vivant sur l'île de Guam, dans l'océan Pacifique (Hirano *et al.*, 1961). L'étiopathogénie de la maladie reste inconnue, même si l'implication de facteurs environnementaux est souvent citée (neurotoxine trouvée dans certaines plantes, aluminium).

### II-2-2-1-1- Aspects cliniques

Le syndrome de l'île de Guam associe fréquemment une sclérose latérale amyotrophique (ou ALS pour Amyotrophic Lateral Sclerosis) et un syndrome parkinsonien avec démence (ou PDC pour Parkinsonism Dementia Complex). Ce syndrome est donc souvent dénommé ALS/PDC (Elizan *et al.*, 1966), ou encore "lytico-bodig" selon l'appellation de la population locale. Ces deux entités pathologiques peuvent cependant être observées séparément.

L'ALS du syndrome de l'île de Guam n'est pas différente des formes sporadiques de la maladie décrites par ailleurs, et se traduit essentiellement par des troubles moteurs au niveau des membres supérieurs et inférieurs. Le syndrome parkinsonien avec démence est caractérisé par des signes extra-pyramidaux et une altération progressive des fonctions intellectuelles (Hirano *et al.*, 1961; Chen et Chase, 1986).

### II-2-2-1-2- Aspects neuropathologiques

L'examen neuropathologique du cerveau d'un patient atteint du syndrome de l'île de Guam révèle:

- une **atrophie corticale** sévère;
- une **perte neuronale** importante dans le néocortex, l'hippocampe et le noyau basal de Meynert (NBM);
- une **dépigmentation de la substance noire** et du *locus coeruleus*;
- l'absence de plaques séniles et de plaques neuritiques ;
- une **dégénérescence neurofibrillaire** (DNF) importante dans le néocortex, l'hippocampe et certaines structures sous-corticales.

Notre exposé sera volontairement limité aux lésions de DNF, dont les constituants majeurs sont les protéines tau.

\* La DNF néocorticale:

Les lésions de DNF sont en nombre important dans les cortex temporaux moyen et inférieur et dans le cortex frontal supérieur. Le cortex pariétal présente souvent peu de DNF, le cortex moteur primaire peut avoir quelques DNF, alors que le cortex occipital en est généralement dépourvu. Quelques cas ont été décrits avec de rares DNF au niveau de la corne antérieure de la moelle épinière cervicale, thoracique et lombaire (Hof *et al.*, 1994).

Une distribution laminaire préférentielle dans les couches supragranulaires II et III est décrite, se différenciant en cela de celle observée dans la MA où les couches infragranulaires V et VI sont préférentiellement affectées. Ainsi, Hof et collaborateurs ont pu déterminer qu'il y avait approximativement 4 fois plus de DNF dans la couche II et le tiers supérieur de la couche III, par rapport aux couches V et VI, dans le syndrome de Guam. A l'inverse, ils dénombrent environ 2 fois plus de DNF dans les couches V et VI par rapport aux couches II et III dans la MA (Hof *et al.*, 1994).

\* La DNF hippocampique:

Dans le syndrome de l'île de Guam, la plus forte densité de DNF est déterminée au niveau de la formation hippocampique. Les lésions de DNF sont décrites dans toute la couche pyramidale de la corne d'Ammon, avec une densité importante au niveau du secteur CA1. Le subiculum et le cortex entorhinal sont aussi particulièrement affectés. Ce modèle de distribution est identique à celui retrouvé dans la MA, mais avec un nombre de lésions de DNF plus important dans le syndrome de Guam par rapport à la MA (Hof *et al.*, 1991-1994)

\* La DNF des structures sous-corticales:

La présence de lésions neurofibrillaires a été décrite dans l'amygdale, le *nucleus reuniens* du thalamus, le noyau caudé et la substance noire (Buée-Scherrer *et al.*, 1995).

### II-2-2-1-3- Aspects biochimiques

L'analyse biochimique des protéines tau-PHF, dans le syndrome de l'île de Guam, a permis de déterminer leur état d'hyperphosphorylation, comparable à celui des protéines tau-PHF de la MA (Buée-Scherrer *et al.*, 1995). Ces protéines sont détectées par immunoempreintes, avec des anticorps anti-tau dépendants de la phosphorylation, sous forme d'un triplet. Ainsi, un certain nombre de sites de phosphorylation caractérisés dans les protéines tau-PHF de la MA sont retrouvés dans le syndrome de l'île de Guam (Mawal-Dewan *et al.*, 1996). Le triplet est visualisé dans toutes les aires corticales et les structures sous-corticales affectées par la DNF.

L'analyse biochimique des protéines tau-PHF du syndrome de Guam met en évidence une hétérogénéité de la maladie. Si le profil électrophorétique sous forme de triplet est constamment retrouvé, une différence quantitative peut être observée en fonction des patients. Chez certains sujets, l'ensemble des aires corticales, à l'exception des aires visuelles, et des structures sous-corticales sont atteintes. Chez d'autres, le triplet sera pas ou peu détecté dans certaines aires corticales ou structures sous-corticales. Chez d'autres enfin, la détection du triplet sera limitée à la formation hippocampique et à l'amygdale, sans atteinte néocorticale. Dans tous les cas, les données de l'analyse biochimique sont en parfaite corrélation avec les observations de l'examen neuropathologique (Buée-Scherrer *et al.*, 1995).

### II-2-2-1-4- Aspects génétiques

Aucune liaison génétique entre le gène des protéines tau et le syndrome de l'île de Guam n'a pu être mise en évidence. En particulier, le polymorphisme intronique décrit par Conrad et collaborateurs pour la PSP n'a pas été retrouvé (Conrad *et al.*, 1997). De plus,

aucune modification pouvant avoir un rôle pathogénique n'a été détecté lors du séquençage du gène des protéines tau.

Les études génétiques écartent donc pour l'instant les protéines tau comme cause primaire du syndrome de l'île de Guam, mais n'excluent pas leur implication dans le processus pathogénique.

### **II-2-2-2- Le Parkinson post-encéphalitique**

#### **II-2-2-2-1- Aspects cliniques**

Le Parkinson post-encéphalitique (PPE) est une pathologie développée spécifiquement par les personnes ayant été infectées lors de la pandémie de grippe des années 1915-1930.

Le tableau clinique est dominé par les symptômes extra-pyramidaux (tremblements de repos, rigidité akinétique). Les déficits cognitifs sont souvent peu importants et certains patients ne présentent ni aphasie, ni apraxie. Une démence peut être décrite mais n'est pas un trait commun à tous les patients atteints de PPE (Buée-Scherrer *et al.*, 1997 ; Geddes *et al.*, 1993 ; Hof *et al.*, 1992).

#### **II-2-2-2-2- Aspects neuropathologiques**

La dégénérescence neurofibrillaire affectant l'hippocampe, les structures sous-corticales et le néocortex est l'élément essentiel du diagnostic neuropathologique du PPE. Une perte neuronale au niveau de la substance noire et la présence de plaques séniles font également partie de ce diagnostic (Ischii et Nakamura, 1981; Hof *et al.*, 1992; Geddes *et al.*, 1993 ; Buée-Scherrer *et al.*, 1997).

Une densité importante de lésions de DNF est présente au niveau de la couche pyramidale de l'hippocampe (CA1 et subiculum), la densité la plus élevée étant décrite au niveau des couches II et III du cortex entorhinal.

Les structures sous-corticales affectées par la DNF sont localisées dans le tronc cérébral. Il s'agit de la formation réticulée, de la substance noire, du *locus coeruleus*, des noyaux du raphe, des ganglions de la base et du noyau basal de Meynert.

Dans le néocortex, les couches supragranulaires II et III du cortex temporal inférieur (Aire 20) sont préférentiellement touchées, les cortex préfrontal (Aire 9) et moteur primaire (Aire 4) étant moins atteints.

Des enchevêtrements fibrillaires gliaux sont observés dans certaines régions corticales présentant une dégénérescence importante (Ikeda *et al.*, 1993).

Une perte neuronale importante et une gliose sont décrites au niveau de la substance noire. L'atteinte des cellules du *locus coeruleus* est généralement moins sévère (Geddes *et al.*, 1993).

Des plaques séniles en nombre limité sont décrites au niveau de la corne d'Ammon de l'hippocampe et des couches supragranulaires du néocortex temporal et préfrontal.

#### II-2-2-2-3- Aspects biochimiques

L'analyse immunochimique d'homogénats de cerveaux de PPE, avec des anticorps anti-tau, met en évidence le triplet des protéines tau hyperphosphorylées, comparable à celui des protéines tau-PHF de la MA (Buée-Scherrer *et al.*, 1997). Ce triplet est visualisé dans toutes les aires corticales et structures sous-corticales touchées par la dégénérescence, à la différence de la MA pour laquelle le triplet n'est détecté que dans les aires néocorticales associatives et l'hippocampe. Dans le PPE, le triplet est également visualisé dans le cortex moteur primaire et les ganglions de la base. Mais la distribution régionale du triplet tau55,

tau64, tau69 peut être différente selon les cas, suggérant une hétérogénéité du processus neurodégénératif.

### **II-2-2-3- La maladie de Steele-Richardson-Olszewski**

Décrite pour la première fois en 1964 par Steele et collaborateurs, la maladie de Steele-Richardson-Olszewski, ou paralysie supranucléaire progressive (PSP), est un des syndromes parkinsoniens des plus courants, avec une prévalence estimée de 1,39/100000 personnes dans la population américaine (Steele *et al.*, 1964; Golbe *et al.*, 1988).

La PSP est une maladie insidieuse<sup>11</sup>, apparaissant entre 55 et 70 ans, avec quelques cas avant 45 ans.

#### **II-2-2-3-1- Aspects cliniques**

Les premiers symptômes de la PSP sont des troubles de la marche, avec une instabilité posturale et des chutes. La dysarthrie<sup>12</sup> est le second symptôme le plus commun, suivi par une bradykinésie<sup>13</sup> bilatérale. Une rigidité du tronc et du cou est décrite, consécutive à une dystonie<sup>14</sup> des muscles du tronc, de la face, du cou et de la nuque.

Les perturbations visuelles sont aussi des symptômes précoces (diplopie, vision trouble, sensibilité à la lumière, anomalies de convergence et des mouvements de poursuite). Mais le principal dysfonctionnement est la paralysie verticale du regard, d'origine supranucléaire, qui peut être décrite dès le début de la maladie, ou peut apparaître plus tard.

---

<sup>11</sup> **Maladie insidieuse**: maladie d'apparence bénigne et qui s'avère grave dans son évolution.

<sup>12</sup> **Dysarthrie**: difficulté pour articuler les mots, due à une paralysie ou une ataxie des centres nerveux.

<sup>13</sup> **Bradykinésie**: ralentissement des mouvements.

<sup>14</sup> **Dystonie**: contraction parasite affectant de façon régulière un ou plusieurs muscles ou membres et l'axe corporel.



Enfin, des atteintes cognitives ou comportementales peuvent être diagnostiquées durant la première année, mais rarement dès le début de la maladie. Un ralentissement de l'activité mentale similaire à un état démentiel peut être observé (Albert *et al.*, 1974; Hauw *et al.*, 1994; pour revue: Litvan *et al.*, 1996).

#### II-2-2-3-2- Aspects neuropathologiques

L'observation macroscopique d'un cerveau de patient atteint de PSP peut mettre en évidence une atrophie de structures sous-corticales telles que le *Globus Pallidus*, le noyau subthalamique et le tronc cérébral. Une atrophie modérée de l'aire motrice primaire (aire 4), ainsi qu'une hypopigmentation de la substance noire et du *locus coeruleus* peuvent être observées. Cependant, l'examen macroscopique, dans le cadre d'un diagnostic de PSP, n'est pas pathognomonique (Hauw *et al.*, 1994).

Le diagnostic neuropathologique est dominé par l'importance des lésions de DNF. Une perte neuronale et une gliose astrocytaire sont observées dans les régions sévèrement affectées par la DNF. Les dépôts amyloïdes sont absents ou très rares.

##### \* Les lésions de DNF:

La DNF est constituée par des inclusions neuronales et gliales tau-positives, et par des neurites dystrophiques. Les plaques neuritiques sont absentes ou en nombre très restreint. Les lésions sont décrites essentiellement au niveau des structures sous-corticales, et avec une densité moindre au niveau du néocortex.

Dans un cas typique de PSP, les lésions de DNF sont nombreuses au niveau de structures sous-corticales comme le *Globus Pallidus*, le noyau subthalamique, le *striatum*, le noyau basal de Meynert, le tronc cérébral et le noyau dentelé du cervelet (Hauw *et al.*, 1994).

Les premières observations neuropathologiques de cas de PSP ne décrivaient pas de DNF corticale, et cette pathologie fut longtemps qualifiée de "démence sous-corticale".

Cependant, plusieurs études ont montré par la suite la présence d'une DNF hippocampique et néocorticale (Hauw *et al.*, 1990; Hof *et al.*, 1992).

Les couches supragranulaires (II-III) des cortex perirhinal, temporal et prefrontal sont affectées par la DNF, ainsi que les couches infragranulaires (V-VI) du cortex moteur primaire. Les couches II et V du cortex entorhinal présentent également des lésions, alors que le cortex occipital est épargné (Hauw *et al.*, 1990).

Au niveau hippocampique, la DNF touche essentiellement les cellules granulaires du gyrus denté, le CA1 et le subiculum. Aucune DNF n'est décrite au niveau du CA3-CA4 (Hof *et al.*, 1992).

#### II-2-2-3-3- Aspects biochimiques

Les protéines tau constitutives des lésions de DNF de la PSP sont révélées en électrophorèse mono-dimensionnelle sous forme d'un doublet de bandes tau64, tau69 (Flament *et al.*, 1991; Vermersch *et al.*, 1994). Ce profil électrophorétique particulier est retrouvé dans les aires corticales et certaines structures sous-corticales. Au niveau de l'hippocampe et du cortex entorhinal, un triplet de bandes similaire à celui des protéines tau-PHF de la MA est décrit chez les patients âgés (Vermersch *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 1996). Les épitopes phosphorylés [Ser212-Thr214], spécifiques des protéines tau-PHF de la MA, sont également décrits dans les protéines tau hyperphosphorylées de la PSP (Schmidt *et al.*, 1996).

#### II-2-2-3-4- Aspects génétiques

La majorité des cas de PSP sont des cas sporadiques. Cependant, une transmission autosomique dominante a pu être démontrée dans un petit nombre de familles (De Yebenes *et al.*, 1995).

Conrad et collaborateurs décrivent en 1997 un polymorphisme au niveau du gène des protéines tau, dans la séquence intronique comprise entre les exons 9 et 10 (Conrad *et al.*,

1997). Ce polymorphisme est caractérisé par la présence d'un dinucléotide répété de 11 fois (allèle A0) à 15 fois (allèle A4). Les auteurs démontrent une surreprésentation des sujets homozygotes A0/A0 dans la population PSP (95.5%) par rapport à une population contrôle (57%). Cependant, ce polymorphisme décrit pour une population caucasienne n'a pas été confirmé pour une population japonaise (Conrad *et al.*, 1998). Cette discordance peut être expliquée de deux façons:

- le génotype A0/A0 est pathogénique pour la PSP uniquement dans la population caucasienne.

- l'allèle A0 n'est pas directement impliqué dans la pathogénie de la PSP, mais constitue un marqueur pour un facteur de risque génétique situé à proximité ou dans le gène des protéines tau sur le chromosome 17.

#### **II-2-2-4- La dégénérescence corticobasale**

##### II-2-2-4-1- Aspects cliniques

La dégénérescence corticobasale (DCB) fut décrite pour la première fois par Rebeiz et collaborateurs en 1968, sous la dénomination de "dégénérescence corticodendatonigrale avec achromatie neuronale" (Rebeiz *et al.*, 1968).

La DCB est une maladie neurodégénérative rare, sporadique, à début tardif. Son évolution est fatale, après une durée moyenne d'évolution de 6 à 8 ans.

Peu différente de la PSP sur le plan clinique, la DCB se caractérise par des déficits cognitifs tels qu'une aphasie et une apraxie, et par un syndrome moteur extrapyramidal. Ce dernier se traduit par une rigidité, une dystonie des membres et un tremblement lors des mouvements (Feany *et al.*, 1996; Gibb *et al.*, 1989; Paulus et Selim, 1990; Rebeiz *et al.*, 1968).

Une démence modérée peut être décrite tardivement au cours de l'évolution de la maladie (Rinne *et al.*, 1994).

#### II-2-2-4-2- Aspects neuropathologiques

Les caractéristiques de la DCB observées à l'examen neuropathologique sont:

- une atrophie corticale fronto-pariétale,
- une pathologie neuronale importante,
- une pathologie gliale importante.

Les nombreuses modifications pathologiques du cytosquelette sont un trait spécifique de la DCB. Les inclusions formées à partir de protéines tau sont retrouvées dans la substance blanche et la substance grise, dans les cellules neuronales et gliales, et dans différents compartiments de ces cellules.

##### \* L'atrophie corticale:

L'atrophie corticale affectant les lobes frontal et pariétal est un des éléments essentiels du diagnostic neuropathologique de la DCB. Elle est généralement associée à une perte neuronale et une vacuolisation, affectant préférentiellement les couches III, V et VI (Wakabayashi *et al.*, 1994).

Une dégénérescence de certaines structures sous-corticales est également observée, avec en particulier une dépigmentation de la substance noire. Il faut cependant noter que seule la dégénérescence de la substance noire est un trait constant, les modifications des autres structures sous-corticales étant variable dans leur distribution et leur étendue (Wakabayashi *et al.*, 1994).

\* La pathologie neuronale:

Des neurones ballonnés achromatiques sont visualisés au niveau du cortex, du tronc cérébral et des ganglions de la base. Ces neurones sont immunoréactifs vis-à-vis d'anticorps dirigés contre les neurofilaments phosphorylés et avec certains anticorps anti-tau dépendants de la phosphorylation (Feany *et al.*, 1995; Dickson *et al.*, 1986; Wakabayashi *et al.*, 1994).

D'autre part, une densité importante de neurites dystrophiques tau-positifs est décrite dans le cortex, de même que des inclusions granulaires tau-positives sont visualisées dans les cellules pyramidales et non-pyramidales de la substance grise.

La mise en évidence des lésions de DNF n'est pas une constante et varie d'un patient à un autre. Ainsi, Gibb et collaborateurs décrivent des inclusions neuronales peu différentes des lésions de DNF de la PSP dans la substance noire de 3 patients (Gibb *et al.*, 1989), Mori et collaborateurs décrivent un cas avec DNF dans le tronc cérébral et le noyau dentelé (Mori *et al.*, 1994), Buée-Scherrer et collaborateurs décrivent des lésions de DNF en grand nombre dans la formation hippocampique et en nombre plus réduit dans le cortex et les structures sous-corticales (Buée-Scherrer *et al.*, 1996).

\* La pathologie gliale:

La pathologie gliale de la DCB est dominée par la description des plaques astrocytiques qui prennent l'aspect de plaques séniles, mais sans coeur amyloïde dense, sans microglie et sans couronne de neurites dystrophiques. Ces structures histopathologiques caractéristiques correspondraient à des astrocytes activés avec des inclusions tau-positives dans leurs prolongements distaux (Feany *et al.*, 1995-1996; Mattiace *et al.*, 1991).

De nombreuses inclusions tau-positives sont aussi observées dans la substance blanche, au niveau des cortex frontal et pariétal. Ces inclusions seraient localisées dans les oligodendroglies.

Les plaques séniles sont généralement absentes dans la DCB (Gibb *et al.*, 1989). Cependant, Buée-Scherrer et collaborateurs ont pu décrire un cas de DCB avec de nombreuses plaques séniles dans les cortex entorhinal et perirhinal, et une angiopathie amyloïde. Mais la présence de ces lésions est vraisemblablement en rapport avec l'âge du patient et constitue sans doute un cas particulier (Buée-Scherrer *et al.*, 1996).

#### II-2-2-4-3- Aspects biochimiques

L'analyse biochimique des protéines tau de la DCB permet de décrire un doublet tau64 - tau69 comparable à celui de la PSP (Buée-Scherrer *et al.*, 1996; Ksiezak-Reding *et al.*, 1994-1996). Ces protéines tau sont hyperphosphorylées, comme le démontre leur détection par des anticorps dépendants de la phosphorylation tels que AT8, PHF-1 ou AD2.

A la différence de la PSP, un anticorps spécifique de l'exon 3 ne reconnaît pas les protéines tau de la DCB, dévoilant ainsi l'absence d'isoformes à 2 insertions amino-terminales (Ksiezak-Reding *et al.*, 1994-1996). Ce résultat est confirmé par la faible immunoréactivité des lésions de DNF observés en immunohistochimie, avec un anticorps de même spécificité (Feany *et al.*, 1995).

#### **II-2-3- Les démences fronto-temporales**

A la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, Arnold Pick décrit pour la première fois les conséquences cliniques d'une atrophie cérébrale fronto-temporale (Pick, 1892). A la suite de ses travaux, la plupart des démences liées à une atrophie du lobe frontal sont diagnostiquées "maladie de Pick", et une classification de cette dernière en 3 types est établie par Constantinidis (Constantinidis, 1985). Cette pathologie, avec ses critères histopathologiques particuliers, est

cependant rare, et la proportion des démences fronto-temporales non-Alzheimer non-Pick est importante.

Un consensus est établi et conduit à la publication en 1994 des "critères cliniques et neuropathologiques des démences fronto-temporales" (DFT), communément appelés "critères de Lund et Manchester" (Brun *et al.*, 1994). Malgré la définition de ces critères, une classification précise des différentes pathologies constituant le groupe des démences fronto-temporales demeure à ce jour difficile à établir. De plus, des études génétiques récentes ont conduit à la définition d'une nouvelle catégorie de DFT, liées au chromosome 17 (DFT-17).

Dans un objectif de clarté, nous avons choisi arbitrairement de distinguer quatre types de DFT:

- la maladie de Pick,
- les démences fronto-temporales non-Alzheimer non-Pick,
- les démences fronto-temporales avec syndrome parkinsonien liées au chromosome 17, notées DFTP-17,
- les démences avec dégénérescence des motoneurones (cette pathologie ne sera pas abordée dans cet exposé).

### **II-2-3-1- La maladie de Pick**

La maladie de Pick est une maladie neurodégénérative rare, 10 fois moins fréquente que la MA. Elle fut décrite pour la première fois en 1892, par Arnold Pick, chez une femme présentant une atrophie cérébrale et souffrant d'une démence présénile avec dysphasie (Pick, 1892).

Cette maladie affecte plus fréquemment les sujets de moins de 65 ans, avec un pic de prévalence dans les 5<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> décades. Cependant, des cas plus jeunes sont décrits

(Brion *et al.*, 1991; Constantinidis *et al.*, 1985). La durée de la maladie est variable, de 2 à 17 ans.

#### II-2-3-1-1- Aspects cliniques

La maladie de Pick se caractérise par les signes d'une désinhibition frontale, avec des troubles de l'humeur, une irritabilité, un comportement social inapproprié, une boulimie, une hyperoralité et des troubles du langage. Un appauvrissement sévère et progressif du langage est souvent décrit, pouvant conduire à une apathie et un mutisme. Les capacités visuelles sont généralement préservées.

L'absence de troubles mnésiques importants et la conservation d'une bonne orientation peuvent aider à différencier une maladie de Pick d'une MA à début précoce (Brion *et al.*, 1991; Dickson *et al.*, 1998; Mendez *et al.*, 1993; Neary *et al.*, 1993).

#### II-2-3-1-2- Aspects neuropathologiques

Les caractéristiques neuropathologiques principales de la maladie de Pick sont:

- une atrophie fronto-temporale;
- la présence de corps de Pick;
- la présence de neurones ballonnés, ou cellules de Pick;
- une perte neuronale et une gliose astrocytaire.

##### \* L'atrophie corticale:

L'atrophie corticale est une caractéristique essentielle des démences de type frontales, et de la maladie de Pick en particulier. Fréquemment asymétrique, elle prédomine dans les lobes temporaux antérieur et moyen et les lobes frontal et orbitofrontal. Les lobes pariétaux et occipitaux sont peu ou pas touchés. Une atrophie importante est décrite au niveau de la formation hippocampique (Mann et South, 1993).



L'atrophie affecte à la fois la substance grise et la substance blanche sous-corticale.

\* Les corps de Pick:

Les corps de Pick sont des inclusions neuronales sphériques argentophiles, constituées de filaments torsadés et de filaments droits (Murayama *et al.*, 1990).

La densité des corps de Pick est plus élevée dans la formation hippocampique que dans les aires corticales. En particulier, la densité de ces lésions est la plus importante dans la couche des cellules granulaires du gyrus denté. Les corps de Pick sont aussi retrouvés dans le CA1, le subiculum et le cortex entorhinal.

La distribution des corps de Pick dans les aires néocorticales touche essentiellement les couches II et VI des lobes temporal et frontal, les lobes pariétal et occipital étant épargnés. Des structures sous-corticales tels que les ganglions de la base, l'amygdale, le noyau basal de Meynert, la substance noire et le *locus coeruleus* peuvent également présenter ce type de lésions (Hof *et al.*, 1994; Love *et al.*, 1988; Munoz-Garcia *et al.*, 1984; Probst *et al.*, 1996; Ulrich *et al.*, 1987).

Une hétérogénéité de la maladie de Pick peut être décrite si l'on considère la densité des corps de Pick: si la présence des corps de Pick dans au moins une aire corticale ou une structure sous-corticale est à la base du diagnostic neuropathologique, leur densité pourra être très variable d'un patient à un autre (Hof *et al.*, 1994).

Les études immunocytochimiques montrent que les corps de Pick possèdent des composants antigéniques communs avec les lésions de DNF de la MA. Les corps de Pick sont ainsi marqués par des anticorps spécifiques des neurofilaments phosphorylés, par des anticorps spécifiques de certains sites de phosphorylation des protéines tau, et par des anticorps dirigés contre l'ubiquitine.

Les corps de Pick ne sont pas immunoréactifs vis-à-vis d'anticorps anti- $\alpha$ -synucléine, les différenciant ainsi des corps de Lewy (Spillantini *et al.*, 1997).

\* Les neurones ballonés:

Les neurones ballonnés, ou cellules de Pick, ne sont pas spécifiques de la maladie de Pick. Ils sont également décrits dans la dégénérescence corticobasale, la maladie de Creutzfeldt-Jacob et moins fréquemment dans la MA (Dickson *et al.*, 1986; Lowe *et al.*, 1992).

Des études immunohistochimiques ont mis en évidence un marquage des cellules de Pick avec des anticorps dirigés contre l'alphaB-crystalline, protéine de choc thermique (Kato *et al.*, 1992; Lowe *et al.*, 1992). L'alphaB-crystalline, en tant que protéine chaperonne vis-à-vis des filaments intermédiaires, pourrait jouer un rôle dans le réarrangement du cytosquelette neuronal qui se produit en réponse à un stress (Quinlan et Nicholl, 1994).

#### \* Perte neuronale et gliose:

La perte neuronale concerne plus particulièrement les gros neurones pyramidaux des couches III et V des lobes frontaux et temporaux. Corrélativement, une dégénérescence des synapses est mise en évidence par une diminution du marquage de la synaptophysine, protéine présynaptique.

Le cortex atrophié présente une gliose astrocytaire affectant toutes les couches de la substance grise, mais plus particulièrement les couches II et VI. La substance blanche peut également être altérée dans la maladie de Pick, avec une gliose précoce et une perte axonale et myélinique plus ou moins importante (pour revue: Cooper *et al.*, 1996).

#### \* Lésions de dégénérescence neurofibrillaire et plaques séniles:

Dans une étude portant sur 16 cas de maladie de Pick, Hof et collaborateurs décrivent la présence de DNF chez tous les sujets, ainsi que des plaques séniles chez quelques sujets (Hof *et al.*, 1994).

La densité des lésions est moins élevée que dans la MA, avec une distribution plus importante dans la formation hippocampique (CA1, subiculum et cortex entorhinal) par rapport aux aires corticales. Les lésions de DNF sont préférentiellement localisées dans les couches I et III, et ne sont jamais colocalisées avec un corps de Pick au sein d'un même neurone. Les lésions de DNF de la maladie de Pick ne sont pas marquées par la thioflavine S.

Quelques cas présentent des dépôts amyloïdes diffus et des plaques séniles dans certaines régions corticales. Leur distribution est alors comparable à celle observée dans la MA, avec une densité supérieure dans les aires néocorticales et la formation hippocampique. Les couches supragranulaires sont les plus affectées.

Il est important de noter que les lésions de DNF et les plaques séniles, observées uniquement dans quelques cas, ne sont pas actuellement considérées comme un élément caractéristique du diagnostic neuropathologique de la maladie de Pick.

La présence de processus neuritiques anormaux a pu être démontrée dans plusieurs études (Hof *et al.*, 1994; Probst *et al.*, 1996; Sinha *et al.*, 1993). Ces neurites, immunomarqués par certains anticorps spécifiques d'épitopes phosphorylés des protéines tau, sont nombreux au niveau du CA1 et du subiculum et forment un réseau dense dans la plupart des aires riches en neurones avec corps de Pick.

La description des processus neuritiques pourrait donc constituer un élément supplémentaire pour le diagnostic neuropathologique de la maladie de Pick (Probst *et al.*, 1996).

La présence d'un petit nombre de cellules gliales tau-positives est décrite dans quelques cas de maladie de Pick (Probst *et al.*, 1996).

#### II-2-3-1-3- Aspects biochimiques

Les protéines tau phosphorylées, déterminées comme étant un des constituants antigéniques des corps de Pick, sont résolues en électrophorèse mono-dimensionnelle sous forme d'un doublet tau55 et tau64, avec une composante mineure tau69. La présence de ce profil biochimique particulier est parfaitement corrélée avec la présence des corps de Pick (Buée-Scherrer *et al.*, 1996; Delacourte *et al.*, 1996).

L'analyse en électrophorèse bi-dimensionnelle des protéines tau55 et tau64 de la maladie de Pick définit un point isoélectrique (pI) moins acide que celui de leurs composantes

équivalentes dans la MA. Cette différence de pI est associée à une phosphorylation moins importante des protéines tau dans la maladie de Pick (Delacourte *et al.*, 1996).

L'utilisation d'anticorps anti-tau dépendants de la phosphorylation pour des études biochimiques ou immunohistochimiques a permis de montrer une phosphorylation des protéines tau de la maladie de Pick sur un certain nombre de sites. Par contre, la maladie de Pick se différencie de la MA par la non-phosphorylation du résidu de sérine 262 (Delacourte *et al.*, 1998; Mailliot *et al.*, 1998; Probst *et al.*, 1996). Il faut cependant noter qu'une étude neuropathologique récente sur un cas de maladie de Pick ne retrouvait pas cette spécificité (Liebermann *et al.*, 1998).

L'analyse des lésions et de leurs constituants avec des anticorps spécifiques des exons des protéines tau (anti-E2, anti-E3, anti-E10) met en évidence l'absence d'immunomarquage du doublet tau55, tau64 ou des corps de Pick avec un anticorps spécifique de l'exon 10 (Delacourte *et al.*, 1996-1998; Sergeant *et al.*, 1997). Les protéines tau agrégées dans les lésions de la maladie de Pick contiennent donc uniquement les isoformes pour lesquelles l'exon 10 n'est pas traduit, c'est-à-dire les isoformes à 3 domaines de liaison aux microtubules.

Les protéines tau phosphorylées des corps de Pick se différencient donc des protéines tau-PHF de la MA à la fois par leur état de phosphorylation et par les isoformes qui les composent.

### **II-2-3-2- Les démences fronto-temporales non-Alzheimer non-Pick**

Les démences fronto-temporales non-Alzheimer non-Pick (notées démences fronto-temporales ou DFT) représentent la forme la plus commune de démence présénile, après la

MA (Gustafson, 1993). La maladie peut débuter entre 45 et 60 ans en moyenne (21 à 80 ans), et la durée moyenne d'évolution est de 8 ans (2 à 20 ans).

#### II-2-3-2-1- Aspects cliniques

Les démences fronto-temporales sont indifférenciables sur le plan clinique de la maladie de Pick. Les troubles du comportement et des conduites sociales inadaptées dominent au début le tableau clinique (désinhibition, comportements stéréotypés, hyperoralité, négligence personnelle). Des signes d'anxiété et de dépression peuvent apparaître précocement, de même qu'une apathie<sup>15</sup> et un apragmatisme<sup>16</sup>. Contrairement à la MA, les troubles cognitifs ne sont pas majeurs dans la définition de la maladie, et l'orientation est longtemps préservée (Gustafson, 1987; Neary et Snowden, 1988).

#### II-2-3-2-2- Aspects neuropathologiques

En l'absence de lésions spécifiques tels que les corps de Pick, les neurones ballonnés ou les neurones avec DNF, les démences fronto-temporales se caractérisent par:

\* une atrophie corticale:

Comme dans la maladie de Pick, l'atrophie corticale est circonscrite aux lobes frontal et temporal. Les structures sous-corticales tels que le thalamus, l'hippocampe et l'amygdale sont également affectées.

\* une perte neuronale:

La perte neuronale affecte plus particulièrement les couches superficielles (couches I et III) dans les lobes frontal et temporal, et se traduit par une microvacuolisation de la substance grise.

---

<sup>15</sup> **Apathie:** état d'une personne qui ne réagit pas, qui paraît sans volonté et sans énergie.

<sup>16</sup> **Apragmatisme:** trouble d'origine psychique se traduisant par l'incapacité de réaliser une action.

### \* une gliose:

La réaction gliale est généralement peu importante dans les DFT. Cependant, une réaction astrocytaire superficielle est parfois décrite, de même qu'une gliose modérée au niveau de la jonction substance grise-substance blanche. A l'inverse de la maladie de Pick, la gliose concerne surtout la substance blanche, où une démyélinisation importante peut se produire.

#### II-2-3-2-3- Aspects biochimiques

L'analyse biochimique du cerveau de patients atteints de DFT met en évidence la présence de protéines tau pathologiques, alors qu'aucune lésion de DNF n'est décrite à l'examen neuropathologique.

Les protéines tau sont détectées en immunoempreinte sous forme d'un triplet comparable à celui des protéines tau-PHF de la MA. Ce triplet est visualisé uniquement dans les aires temporales et frontales, où la perte neuronale est la plus importante. La région hippocampique ne contient pas de protéines tau-PHF (Vermersch *et al.*, 1995).

Dans les DFT, les protéines tau pathologiques s'agrègeraient donc sous forme de petits agrégats détectables par les techniques biochimiques, mais non-visualisables en microscopie optique.

#### II-2-3-2-4- Aspects génétiques

L'ensemble des cas de maladie de Pick étudiés à ce jour semblent être des cas sporadiques. Par contre, si un certain nombre de cas de DFT sont également sporadiques, plusieurs études récentes ont décrit des formes autosomales dominantes liées au chromosome 17.

En 1994, Wilhelmsen et collaborateurs décrivent une première famille dont plusieurs membres présentent une démence, en liaison génétique avec le locus 17q21-22. Une désinhibition comportementale est un symptôme précoce retrouvé chez la plupart des malades de cette famille, et la pathologie se développe ensuite sous forme de démence de type frontale associée à un syndrome parkinsonien. Cette première famille est communément appelée "DDPAC" (pour le terme anglais "Disinhibition-Dementia-Parkinsonism-Amyotrophy Complex")(Lynch *et al.*, 1994; Wilhelmsen *et al.*, 1994).

Plusieurs autres familles présentant des formes familiales de DFT liées au chromosome 17q21-22 ont depuis été étudiées, et 16 familles sont maintenant connues (pour revue: Spillantini *et al.*, 1998). Malgré une hétérogénéité des signes cliniques et des caractéristiques neuropathologiques au sein même de ces familles et entre ces familles, tous les membres atteints présentent les signes d'une démence fronto-temporale et un syndrome parkinsonien. En conséquence, l'ensemble des pathologies affectant ces familles est maintenant regroupé sous la dénomination de "démence fronto-temporale avec Parkinson liée au chromosome 17" (DFTP-17)(Foster *et al.*, 1997).

### **II-2-3-3- Les DFTP-17**

#### **II-2-3-3-1- Aspects cliniques**

Au sein du groupe des DFTP-17, les caractéristiques cliniques sont variables d'une pathologie à l'autre, mais il existe un ensemble de données assez similaires qui permettent l'identification de la maladie.

Les symptômes sont comportementaux, cognitifs et moteurs. Les premiers signes apparaissent vers 40-50 ans et la progression de la maladie est généralement lente, en moyenne 10 à 12 ans.

Les troubles comportementaux tels qu'une désinhibition sont souvent les premiers symptômes qui apparaissent.

Les déficits cognitifs affectent les capacités de jugement, de planification, de raisonnement, sans perte de mémoire et de l'orientation en début d'évolution. L'aggravation progressive sur plusieurs années peut conduire à l'apparition d'une démence sévère.

Les déficits moteurs, souvent peu visibles dans les premiers stades, se traduisent par une bradykinésie avec rigidité axiale et des membres, puis une instabilité posturale caractéristique du syndrome parkinsonien.

#### II-2-3-3-2- Aspects neuropathologiques

Sans tenir compte des particularités de chaque pathologie, les DFTP-17 sont caractérisées sur le plan neuropathologique par:

- une **atrophie corticale** fronto-temporale et une atrophie de certaines structures **sous-corticales**, avec en particulier les noyaux de la base et la substance noire, l'amygdale et l'hippocampe.

- une **perte neuronale** au niveau des couches corticales superficielles et de la substance noire essentiellement.

- une **gliose** au niveau de la substance grise et de la substance blanche.

- des **inclusions argentophiles tau-positives intraneuronales**, au niveau du néocortex et de certaines structures sous-corticales, et **intragliales**. Toutes les familles ne présentent pas ce type d'inclusions, ou leur distribution selon le type cellulaire peut être différente.

- une absence de dépôts amyloïdes.

#### II-2-3-3-3- Aspects génétiques



Le locus impliqué dans les démences fronto-temporales avec Parkinson liées au chromosome 17 est localisé dans la même région que le gène des protéines tau. De plus, certaines DFTP-17 présentent des inclusions intra-cytoplasmiques constituées de protéines tau. La recherche d'anomalies génétiques pouvant avoir un rôle pathogénique a donc été entreprise au niveau du gène des protéines tau.

A ce jour, 10 mutations retrouvées dans une ou plusieurs familles de DFTP-17 sont décrites:

- 5 mutations par substitution localisées dans la partie codante du gène (G272V, N279K, P301L, V337M, R406W), affectant 9 familles.
- 4 mutations introniques (+3, +13, +14, +16), affectant 7 familles.
- 1 mutation par déletion ( $\Delta$ K280).

\* Mutations dans la partie codante:

Les mutations G272V, P301L, V337M et R406W sont localisées respectivement dans les exons 9, 10, 12 et 13. Ces 4 mutations ségréguent avec la maladie, et ne sont retrouvées chez aucun témoin, indiquant leur nature vraisemblablement pathogénique (Hutton *et al.*, 1998; Dumanchin *et al.*, 1998; Poorkaj *et al.*, 1998; Spillantini *et al.*, 1998). Les mutations G272V, V337M et R406W affectent les 6 isoformes de protéines tau et leur existence se répercute sur la capacité de liaison des protéines tau aux microtubules. La proportion des isoformes 10+ et 10- reste cependant équivalente.

La mutation P301L est localisée au niveau de l'exon 10 et n'affecte donc que les isoformes 10+. Elle aurait pour conséquence une augmentation de la proportion des isoformes de protéines tau avec 4 domaines répétés (tau4R) par rapport aux isoformes avec 3 domaines répétés (tau3R).

Sur le plan ultrastructural, les anomalies du cytosquelette décrites sont des filaments droits pour la mutation P301L, et des PHF pour les 3 autres mutations exoniques.

#### \* Mutations introniques:

Les 4 mutations introniques sont situées du côté 3' par rapport à l'exon 10, en position +3, +13, +14, +16. Comme pour les mutations de la partie codante du gène, les mutations introniques ségréguent avec la maladie et ne sont pas retrouvées chez les témoins. La présence de ces mutations aurait pour conséquence un usage plus fréquent du site d'épissage GT situé au niveau de cet intron, et donc une augmentation de la proportion de transcrits avec exon 10 par rapport aux transcrits sans exon 10 (de 2 à 6 fois). En conséquence, la proportion d'isoformes tau4R serait augmentée par rapport aux isoformes tau3R (Hutton *et al.*, 1998; Spillantini *et al.*, 1998).

Les anomalies du cytosquelette résultantes de ces mutations sont des filaments droits.

Dans le cas de la famille avec DFTP-17 dénommée MSTD (pour "Multiple System Tauopathy with Presenile Dementia"), Spillantini et collaborateurs proposent un mécanisme pathogénique potentiel prenant en compte la mutation intronique +3 (Spillantini *et al.*, 1998).

La mutation par transition (G→A) du nucléotide suivant le site d'épissage GT provoquerait la dislocation de la structure en épingle à cheveux existant à ce niveau. L'utilisation plus fréquente du site d'épissage, consécutive à ce changement de structure, entraînerait une transcription plus fréquente de l'exon 10, et donc une production accrue d'isoformes tau4R par rapport aux isoformes tau3R, la quantité totale de protéines tau solubles restant la même. La variation anormale du rapport tau4R/tau3R provoquerait l'agrégation des isoformes tau4R sous forme de filaments droits, et donc un dysfonctionnement et une dégénérescence des cellules nerveuses et gliales affectées. Cette dégénérescence serait finalement le substrat morphologique de la pathologie observée.

#### II-2-3-3-4- Aspects biochimiques

Dans les DFTP-17, l'analyse biochimique par immunoempreintes des protéines tau avec des anticorps dépendants de la phosphorylation, met en évidence plusieurs types de profils électrophorétiques, selon la mutation impliquée.

Les protéines tau pathologiques décrites dans les familles présentant la mutation exonique P301L, affectant l'exon 10, sont visualisées sous forme d'un doublet tau64, tau69. Pour les autres mutations exoniques, affectant les 6 isoformes, les protéines tau sont détectées sous forme d'un triplet tau55, tau64 et tau69 comparable à celui des protéines tau-PHF de la MA.

Dans les familles avec mutations introniques, la signature biochimique des protéines tau est un doublet tau64, tau69.

#### **II-2-4- Les maladies neurodégénératives : récapitulatif**

PATHOLOGIE	ASPECTS CLINIQUES	ASPECTS NEUROPATHOLOGIQUES	ASPECTS MOLÉCULAIRES	ASPECTS GÉNÉTIQUES
<b>Maladie d'Alzheimer et démences apparentées</b>				
<b>MALADIE D'ALZHEIMER (MA)</b>	Troubles mnésiques + Troubles cognitifs = Syndrome démentiel	<ul style="list-style-type: none"> <li>* <b>Atrophie corticale:</b> temporal + pariétal</li> <li>* <b>Gliose réactionnelle</b></li> <li>* <b>Plaques séniles:</b> temp. + occ. &gt; fr. + par. &gt; ento.-hippo - NBM toutes les couches corticales</li> <li>* <b>DNF:</b> ento. + transento. + hippo. + amygdale + temp. couches corticales II-III et V-VI</li> </ul>	= <b>protéines tau phosphorylées</b> triplet $\tau_{55}$ , $\tau_{64}$ , $\tau_{69}$ (tau-PHF) Agrégation des 6 isoformes	<b>Formes familiales</b> * <b>précoces:</b> chr. 21 = gène APP chr. 14 = gène PS1 chr. 1 = gène PS2 * <b>tardives:</b> chr. 19 = gène ApoE (risque) chr. 12 = gène $\alpha$ -2M (?) chr. 12 = gène LRP (?)
<b>SYNDROME DE DOWN (DS)</b>	* Retard mental * <b>Syndrome démentiel (+/-)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* <b>Rétrécissement cérébral</b> rostro-caudal</li> <li>* Hypoplasie du lobe frontal</li> <li>* <b>Atrophie</b> du gyrus temporal supérieur</li> <li>* <b>Perte neuronale</b></li> <li>* <b>Plaques séniles (&gt; MA)</b></li> <li>* <b>DNF:</b> cortex entorhinal + hippocampe couche corticale II</li> </ul>	= <b>protéines tau phosphorylées</b> triplet $\tau_{55}$ , $\tau_{64}$ , $\tau_{69}$ (tau-PHF) Agrégation des 6 isoformes	<b>Trisomie 21</b>
<b>Syndromes parkinsoniens</b>				
<b>SYNDROME DE L'ÎLE DE GUAM (ALS/PDC)</b>	* <b>Sclérose latérale amyotrophique:</b> troubles moteurs des membres supérieurs et inférieurs. * <b>Syndrome parkinsonien avec démence</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* <b>Atrophie corticale</b></li> <li>* <b>Perte neuronale</b></li> <li>* <b>Dépigmentation subst. noire et locus coer.</b></li> <li>* <b>DNF:</b>     <b>dans le neocortex:</b> importante dans le temp. moyen et inférieur + frontal supérieur peu dans le pariétal et le cortex moteur primaire surtout les couches corticales II-III           <b>dans l'hippocampe:</b> couche pyramid. de la corne d'Ammon (CA1) + subiculum et cortex entorhinal</li> </ul>	= <b>protéines tau phosphorylées</b> triplet $\tau_{55}$ , $\tau_{64}$ , $\tau_{69}$ (tau-PHF) hétérogénéité selon les patients Agrégation des 6 isoformes	Pas de liaison génétique avec une modification du gène de tau

PATHOLOGIE	ASPECTS CLINIQUES	ASPECTS NEUROPATHOLOGIQUES	ASPECTS MOLÉCULAIRES	ASPECTS GÉNÉTIQUES
PARKINSON POST-ENCEPHALITIQUE (PPE)	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Symptômes extra-pyramidaux</li> <li>* Déficits cognitifs +/-</li> <li>* Syndrome démentiel (+/-)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* DNF: dans l'hippocampe: couche pyramid.de la corne d'Ammon (CA1) + subiculum + cortex entorhinal couches corticales II-III</li> <li>  <b>dans les structures sous-corticales dans le neocortex:</b> temporal inférieur, couches corticales II-III préfrontal et moteur primaire (+/-)</li> <li>* Enchevêtrements fibrillaires gliaux</li> <li>* Dépigmentation substance noire</li> <li>* Plaques séniles (+/-)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>= protéines tau phosphorylées triplet <math>\tau</math>55, <math>\tau</math>64, <math>\tau</math>69 (tau-PHF)</li> <li>Agrégation des 6 isoformes</li> </ul>	
MALADIE DE STEELE-RICHARDSON-OLSZEWSKI (PSP)	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Instabilité posturale</li> <li>* Dysarthrie</li> <li>* Bradykinésie bilatérale</li> <li>* Dystonie</li> <li>* Perturbations visuelles: paralysie verticale du regard</li> <li>* Syndrome démentiel (+/-)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* DNF: dans les structures sous-corticales: importante</li> <li>  <b>dans le neocortex:</b> périrhinal, temporal et préfrontal, couches II-III moteur primaire, couches V-VI</li> <li>  entorhinal, couches II et V ⇒</li> <li>  <b>dans l'hippocampe:</b> cellules granulaires du gyrus dentatus + CA1 et subiculum</li> <li>* Perte neuronale</li> <li>* Gliose astrocytaire</li> <li>* Plaques séniles: absentes ou rares</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>= protéines tau phosphorylées doublet <math>\tau</math>64, <math>\tau</math>69</li> <li>Agrégation des isoformes 10+</li> <li>= protéines tau phosphorylées triplet <math>\tau</math>55, <math>\tau</math>64, <math>\tau</math>69</li> <li>Agrégation des 6 isoformes</li> </ul>	Polymorphisme intronique (9-10) dans le gène des protéines tau (?)
DEGENERESCENCE CORTICOBASALE (DCB)	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Déficits cognitifs: aphasie et apraxie</li> <li>* Syndrome moteur extrapyramidal</li> <li>* Syndrome démentiel (+/-)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Atrophie corticale: importante pour les lobes frontal et pariétal, avec perte neuronale et vacuolisation (couches III, V, VI)</li> <li>* Dépigmentation substance noire</li> <li>* Pathologie neuronale: Neurones ballonnés achromatiques tau positifs, dans cortex, tronc cérébral, ganglions de la base. Neurites dystrophiques. Lésions de DNF (+/-).</li> <li>* Pathologie gliale: Plaques astrocytiques. Inclusions tau+ dans la substance blanche.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>= protéines tau phosphorylées doublet <math>\tau</math>64, <math>\tau</math>69</li> <li>Pas d'isoformes E3+</li> <li>Agrégation des isoformes 10+</li> </ul>	Pas de liaison génétique avec une modification du gène de tau

PATHOLOGIE	ASPECTS CLINIQUES	ASPECTS NEUROPATHOLOGIQUES	ASPECTS MOLÉCULAIRES	ASPECTS GÉNÉTIQUES
<b>Démences fronto-temporales</b>				
MALADIE DE PICK	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Désinhibition frontale</li> <li>* Appauvrissement sévère et progressif du langage</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* <b>Atrophie fronto-temporale:</b> temporal antérieur et moyen + frontal et orbito-frontal + formation hippocampique</li> <li>* <b>Corps de Pick:</b>                    <b>dans l'hippocampe:</b> cellules granulaires du gyrus dentatus + CA1 – subiculum – entorhinal <b>dans le neocortex:</b> temporal et frontal couches corticales II et VI <b>dans les structures sous-corticales</b></li> <li>* <b>Neurones ballonnés</b></li> <li>* Perte neuronale</li> <li>* Gliose astrocytaire: couches II et VI de la SG + SB</li> <li>* DNF et Plaques séniles (+/-)</li> <li>* Neurites dystrophiques tau positifs</li> </ul>	<p>= <b>protéines tau phosphorylées</b> doublet <math>\tau</math>55, <math>\tau</math>64 (<math>\tau</math>69) Pas d'isoformes E10+ Ser262 non-phosphorylée</p>	
DEMENCE FRONTO-TEMPORALE NON-ALZHEIMER NON-PICK (DFT)		<ul style="list-style-type: none"> <li>* <b>Atrophie corticale et sous-corticale</b></li> <li>* Perte neuronale: couches corticales superficielles II et III avec microvacuolisation de la SG</li> <li>* Gliose</li> </ul>	<p>= <b>protéines tau phosphorylées</b> triplet <math>\tau</math>55, <math>\tau</math>64, <math>\tau</math>69 uniquement dans le temporal et le frontal Agrégation des 6 isoformes</p>	
DEMENCE FRONTO-TEMPORALE AVEC SYNDROME PARKINSONNIEN (DFTP-17)	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Troubles comportementaux</li> <li>* Déficits cognitifs:</li> <li>* Déficits moteurs: Bradykinésie + rigidité + instabilité posturale = syndrome parkinsonien</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* <b>Atrophie corticale et sous-corticale</b></li> <li>* Perte neuronale: couches corticales superficielles II et III</li> <li>* Gliose</li> <li>* <b>Inclusions argentophiles tau positives intraneuronales et intragliales (+/-)</b></li> <li>* Pas de dépôts amyloïdes</li> </ul>	<p>Hétérogénéité selon les familles = <b>protéines tau phosphorylées</b> doublet <math>\tau</math>64, <math>\tau</math>69 ou triplet <math>\tau</math>55, <math>\tau</math>64, <math>\tau</math>69</p>	<p>Mutations sur le gène de tau: * 5 mutations exoniques * 4 mutations introniques * 1 mutation par délétion</p>

### **III- DES MALADIES NEURODEGENERATIVES AU LIQUIDE CEPHALO-**

#### **RACHIDIEN**

##### **III-1- LE LIQUIDE CEPHALO-RACHIDIEN (LCR)**

###### **III-1-1- Anatomie**

Le LCR est réparti à l'intérieur de deux compartiments:

- un compartiment central, formé par les deux ventricules cérébraux latéraux et par les 3<sup>ième</sup> et 4<sup>ième</sup> ventricules. Chaque ventricule latéral est en relation avec le 3<sup>ième</sup> ventricule par l'intermédiaire du trou de Monro (droit et gauche), le 3<sup>ième</sup> ventricule étant en communication avec le 4<sup>ième</sup> ventricule par l'aqueduc de Sylvius.

- un compartiment périphérique, formé par les espaces sous-arachnoïdiens péri-cérébral et intra-cisternal et par le canal médullaire. L'espace sous-arachnoïdien est compris entre la pie-mère vers l'intérieur, et l'arachnoïde vers l'extérieur. Cet espace enveloppe l'ensemble du système nerveux central (cerveau et moelle épinière).

Les compartiments central et périphérique sont en communication par l'intermédiaire de 3 orifices situés à la base du 4<sup>ième</sup> ventricule. Il s'agit du trou de Magendie (en position médiane) et des trous de Luschka droit et gauche.

###### **III-1-2- Physiologie du LCR**

###### **III-1-2-1- Production du LCR:**

Le volume total de LCR chez un adulte est en moyenne de 140 ml, répartis pour environ 35-40 ml dans le compartiment central et 100-105 ml dans le compartiment périphérique.

Environ 70% du volume de LCR est produit par les plexus choroïdes, structures richement vascularisées organisées pour sécréter, filtrer et absorber. Ces entités fonctionnelles sont formées par des cellules épithéliales choroïdiennes, associées entre elles par des jonctions serrées, et assurant l'interface entre les compartiments vasculaire et ventriculaire. Les plexus choroïdes sont localisés au niveau de la paroi des ventricules latéraux et du toit des 3<sup>ième</sup> et 4<sup>ième</sup> ventricules. Les 30% restant du volume de LCR sont produits à partir des liquides extra-cellulaires cérébraux.

La production du LCR met en jeu des mécanismes actifs tels qu'une pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase pour le transport du  $\text{Na}^+$  vers le LCR, ou des transporteurs spécifiques pour les protéines, les vitamines ou les nutriments. Les protéines peuvent également passer du sérum vers le LCR par pinocytose. Les composés lipophiles et les métabolites physiologiques tels que  $\text{H}^+$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$  passent par diffusion simple ou en empruntant des canaux membranaires.

Le LCR est renouvelé en permanence par les plexus choroïdes, avec un débit approximatif de  $0,35 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . La totalité du volume du LCR est ainsi remplacée en 5 à 7 heures.

Depuis les plexus choroïdes, le LCR circule dans les ventricules latéraux, puis dans les 3<sup>ième</sup> et 4<sup>ième</sup> ventricules, puis dans l'espace sous-arachnoïdien vers le sinus sagittal supérieur. C'est à ce niveau que se produit la plus grande partie de la résorption du LCR, par l'intermédiaire de structures histologiques appelées "granulations de Pacchioni".

### III-1-2-2- Rôles physiologiques du LCR:

Le LCR assure un rôle de protection mécanique du système nerveux central (SNC), en réalisant une "suspension hydraulique" du cerveau et de la moelle épinière à l'intérieur de la boîte crânienne et de la colonne vertébrale. Le renouvellement permanent du volume du LCR permet de maintenir une pression intracrânienne constante.



Le LCR assure des fonctions biologiques comme le transport d'organites ou de biomolécules, l'élimination de métabolites produits par le SNC (lactates, CO<sub>2</sub>), la protection contre des agents potentiellement pathogènes.

### **III-1-3- Biochimie du LCR**

Le LCR est un liquide limpide et incolore, qualifié "d'eau de roche". Un LCR visqueux, pigmenté, sanglant ou purulent est obligatoirement associé à un état pathologique.

Le LCR est composé à 99% d'eau (contre 93% pour le sérum), avec une osmolarité comparable à celle du sérum (295 mOsm/l) et une concentration en protéines totales de l'ordre de 0,4 g/l (contre 70 g/l pour le sérum). Environ 80% des protéines du LCR proviennent du plasma, et les 20% restants résultent d'une synthèse intrathécale. L'ensemble des protéines spécifiques du SNC, comme la GFAP ou les protéines tau, ne représentent que 1 à 2% des protéines totales d'un LCR normal.

Un changement dans la composition biochimique du LCR est généralement la conséquence d'une activité métabolique altérée, d'une mort neuronale ou d'une réaction immunologique ou inflammatoire (pour revue: Watson et Scott, 1995).

### **III-2- LES PROTEINES TAU DANS LE LCR, MARQUEUR PERIPHERIQUE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER?**

A l'heure actuelle, le diagnostic clinique de MA est toujours un diagnostic de probabilité et seul l'examen neuropathologique du cerveau permet de porter un diagnostic de certitude. La mise en évidence d'un marqueur biologique de la pathologie serait d'une grande utilité, à condition que:

- le marqueur soit sensible<sup>17</sup>, et spécifique<sup>18</sup> de la MA,
- le marqueur permette un diagnostic précoce de la MA,
- le marqueur soit informatif quant à l'évolution de la maladie.

Parmi les deux types de lésions neuropathologiques de la MA, seule la dégénérescence neurofibrillaire semble être corrélée à la sévérité de la démence. Logiquement, les protéines tau constitutives de ces lésions ont donc été considérées comme un marqueur potentiel de la pathologie, et leur détection dans les liquides périphériques est devenue un enjeu important.

Les études portant sur la présence éventuelle de protéines tau dans le sérum n'ont donné aucun résultat positif (Arai *et al.*, 1995 ; Blennow *et al.*, 1995), alors que l'analyse des protéines tau dans le LCR semble être plus prometteuse.

Plusieurs protocoles expérimentaux utilisant des anticorps monoclonaux et polyclonaux ont été décrits pour le dosage des protéines tau dans le LCR (Mori *et al.*, 1995; Munroe *et al.*, 1995; Vandermeeren *et al.*, 1993; Vigo-Pelfrey *et al.*, 1995). Cependant, seul le test développé par Innogenetics est couramment utilisé aujourd'hui. Les résultats des différentes études menées avec ce kit ELISA sont homogènes pour un certain nombre d'items, mais restent très hétérogènes pour certains autres.

### **III-2-1- Les protéines tau dans le LCR, marqueur sensible et spécifique de la MA?**

Une augmentation significative de la concentration des protéines tau dans le LCR des patients atteints de MA, par rapport aux sujets témoins, est décrite dans toutes les études

---

<sup>17</sup> **Sensibilité**: pourcentage de cas avec une pathologie donnée qui sont correctement diagnostiqués par le test utilisé.

<sup>18</sup> **Spécificité**: pourcentage de cas "non-malades" pour la pathologie considérée, correctement identifiés comme "non-malades" par le test utilisé.

(Andreasen *et al.*, 1998; Arai *et al.*, 1995, 1997, 1998; Blennow *et al.*, 1995, 1998; Galasko *et al.*, 1997; Hock *et al.*, 1995; Isoe *et al.*, 1996; Jensen *et al.*, 1995; Mori *et al.*, 1995; Motter *et al.*, 1995; Munroe *et al.*, 1995; Riemenschneider *et al.*, 1996; Rösler *et al.*, 1996; Skoog *et al.*, 1995; Tato *et al.*, 1995; Vandermeeren *et al.*, 1993; Van de Voorde *et al.*, 1995; Vigo-Pelfrey *et al.*, 1995 a-b). Cependant, les valeurs moyennes obtenues varient considérablement d'une étude à l'autre, de 40 pg/ml à 820 pg/ml pour les populations Alzheimer, et de 27 pg/ml à 380 pg/ml pour les populations témoins. Il semble néanmoins qu'une concentration de 200 pg/ml puisse être considérée comme valeur seuil pour différencier les patients Alzheimer des sujets témoins.

Des facteurs tels que l'âge, le sexe, l'appartenance ethnique ou le polymorphisme du gène PS1 n'influencent pas la valeur de la concentration des protéines tau dans le LCR (Arai *et al.*, 1998; Galasko *et al.*, 1997).

Le dosage des protéines tau dans le LCR serait donc un marqueur sensible de la MA. Cependant, la sensibilité n'est pas absolue, puisqu'une certaine proportion de sujets Alzheimer ne présentent pas d'augmentation de la concentration intrathécalle des protéines tau (Trojanowski *et al.*, 1996). En conséquence, une valeur de concentration équivalente à celle des sujets témoins ne permet pas d'exclure un diagnostic de MA (Galasko *et al.*, 1997).

L'augmentation de la concentration intrathécalle des protéines tau chez les sujets Alzheimer est significativement différente par rapport aux patients parkinsoniens (Blennow *et al.*, 1995; Arai *et al.*, 1995, 1998), aux patients avec démence fronto-temporale (Blennow *et al.*, 1995; Arai *et al.*, 1997), aux patients avec dépression (Blennow *et al.*, 1995; Rösler *et al.*, 1996).

L'augmentation n'est plus significativement différente si l'on considère les patients avec démence vasculaire (DVasc) (Blennow *et al.*, 1995; Skoog *et al.*, 1995). Andreasen et

collaborateurs différencient cependant les démences vasculaires avec leucoaraïose<sup>19</sup>, qui présentent une concentration normale de protéines tau dans le LCR, des démences vasculaires sans leucoaraïose, qui ont une concentration élevée (Andreasen *et al.*, 1998). Les auteurs émettent l'hypothèse selon laquelle les patients avec leucoaraïose développeraient une démence vasculaire "pure", alors que les patients sans leucoaraïose pourraient développer une démence mixte MA/DVasc. Cette hypothèse est soutenue par le fait que 40 à 80% des démences vasculaires seraient en fait des démences mixtes MA/DVasc (Jellinger *et al.*, 1996).

### **III-2-2- Les protéines tau dans le LCR, marqueur précoce de la MA?**

Le développement des lésions cérébrales de la MA débute bien avant que n'apparaissent les premiers signes cliniques de la maladie. C'est cependant à ce stade infra-clinique que l'efficacité des traitements serait la plus importante. Par conséquent, pour être fiable, un marqueur biologique précoce doit pouvoir révéler la formation des premières lésions asymptomatiques.

L'augmentation de la concentration intrathécale des protéines tau a été décrite chez des patients présentant des déficits cognitifs très modérés (Galasko *et al.*, 1997; Riemenschneider *et al.*, 1996). Par ailleurs, Terajima et collaborateurs ont décrit une concentration élevée chez 2 patients avec déficits cognitifs modérés, mais qui ont ensuite évolué vers une MA (Terajima *et al.*, 1996). Ces données partielles indiquent donc que les protéines tau seraient déjà présentes dans le LCR à l'apparition des premiers symptômes cliniques.

---

<sup>19</sup> **Leucoaraïose**: terme de neuroradiologie désignant la raréfaction de la substance blanche hémisphérique cérébrale, quelle qu'en soit la cause.

Par ailleurs, Jensen et collaborateurs montrent que la concentration intrathécale des protéines tau est supérieure chez les patients Alzheimer porteurs de la mutation 670/671 sur le gène de l'APP, par rapport aux sujets non-mutés (Jensen *et al.*, 1995). Ils montrent également que les porteurs sains de la mutation ont une concentration intrathécale équivalente à celle des sujets malades. Ce résultat indiquerait donc que l'augmentation de la concentration des protéines tau dans le LCR se produirait avant l'apparition des signes cliniques de la maladie.

### **III-2-3- Les protéines tau dans le LCR, marqueur informatif pour l'évolution de la MA?**

A ce jour, plusieurs traitements symptomatiques avec un effet bénéfique potentiel débutent leur phase d'essais. L'évaluation de leur efficacité clinique est basée principalement sur les examens cliniques et paracliniques qui déterminent le statut cognitif du patient. Cependant, ces examens, essentiellement des tests neuropsychométriques, restent largement tributaires du praticien qui les réalise et ne sont pas fiables à 100%. Le diagnostic de certitude de la MA n'est donc porté qu'après examen neuropathologique du cerveau. L'utilité d'un marqueur biologique fiable, permettant de certifier le diagnostic, puis de suivre réellement l'évolution de la pathologie, est donc importante.

Plusieurs études ont tenté d'établir une corrélation entre la concentration intrathécale des protéines tau du patient Alzheimer et son statut cognitif au moment de la ponction, généralement déterminé par le score au MMSE. Si une telle corrélation existe, alors elle devrait permettre de suivre l'évolution de la maladie. Les résultats obtenus ne sont pas homogènes et peuvent être répartis en deux catégories sensiblement équivalentes.

Certains travaux ne trouvent aucune corrélation entre la concentration intrathécale de protéines tau et la sévérité de la démence, et par conséquent l'évolution de la démence (Arai

*et al.*, 1998; Blennow *et al.*, 1995; Galasko *et al.*, 1997; Munroe *et al.*, 1995; Riemenschneider *et al.*, 1996; Rösler *et al.*, 1996). Selon Munroe, le manque de sensibilité du MMSE pour détecter des déficits cognitifs modérés et précoces, mais déjà accompagnés d'un relargage de protéines tau dans le LCR, expliquerait l'absence de corrélation. Dans une étude récente, Andreasen et collaborateurs réalisent une analyse longitudinale avec suivi à 1 an de 75 sujets déments, dont 43 patients diagnostiqués Alzheimer (Andreasen *et al.*, 1998). Aucune variation de la concentration des protéines tau dans le LCR ne pouvant être mesurée sur l'année de suivi, les auteurs suggèrent que la valeur augmentée de la concentration intrathécale des protéines tau est stable et ne corrèle pas avec l'évolution de la maladie (suivie par la diminution du score au MMSE).

Les études du deuxième groupe mettent en évidence une augmentation de la concentration des protéines tau dans le LCR parallèlement à la progression de la maladie d'Alzheimer (Hock *et al.*, 1995; Skoog *et al.*, 1995; Tato *et al.*, 1995). En particulier, Isoe et collaborateurs réalisent un suivi sur environ deux années de leur population de patients Alzheimer (n=7) et chaque sujet subit au moins 3 ponctions lombaires, ainsi qu'un examen clinique très approfondi. Les auteurs observent ainsi une augmentation de la concentration intrathécale des protéines tau au cours des premiers stades cliniques de la maladie, suivie d'une diminution pendant les stades avancés. Isoe conclue donc que le dosage des protéines tau dans le LCR serait utile pour suivre la progression de la pathologie, mais ne serait pas fiable en tant que marqueur précoce de la MA (Isoe *et al.*, 1995). De même, Kanai et collaborateurs, dans une étude avec un suivi sur 18 mois en moyenne d'une population de 32 sujets diagnostiqués Alzheimer, décrivent une corrélation significative entre la progression de la maladie et la concentration des protéines tau dans le LCR (Kanai *et al.*, 1998).

### III-2-4- Conclusions

L'ensemble des études réalisées à ce jour montrent que l'augmentation de la **concentration des protéines tau dans le LCR** est un **marqueur sensible** pour le diagnostic de MA. Sa **spécificité est variable**, et dépend de la population contrôle considérée: elle est ainsi élevée pour une population contrôle de sujets sains ou de sujets affectés par certaines pathologies neurologiques, mais devient faible pour une population contrôle de patients avec démence vasculaire.

La validité du dosage des protéines tau dans le LCR en tant que marqueur précoce de la maladie n'est pas clairement établie, de même que sa fiabilité en tant que marqueur informatif pour suivre l'évolution de la maladie reste discutée.

Dans la perspective d'une mise au point d'un dosage de marqueur de la MA dans le LCR, deux axes de recherche peuvent être envisagés: soit un dosage exclusif des protéines tau, soit un dosage combiné de plusieurs éléments reflétant la pathologie.

L'élaboration de protocoles dosant uniquement les protéines tau implique le développement de nouveaux anticorps. Ceux-ci devront présenter une plus grande spécificité afin de reconnaître des épitopes caractéristiques des protéines tau pathologiques de la MA.

Le dosage combiné de plusieurs marqueurs représente la seconde possibilité, avec en particulier le dosage du peptide amyloïde. Plusieurs analyses récentes montrent en effet que le dosage simultané des protéines tau et du peptide amyloïde augmente la sensibilité et la spécificité du test (Galasko *et al.*, 1998; Hock *et al.*, 1998; Kanai *et al.*, 1998). Kanai et collaborateurs, dans une étude portant sur 93 patients atteints de MA, définissent un « index Alzheimer » prenant en compte la valeur des concentrations intrathécales de protéine tau, de peptide amyloïde 1-40 et de peptide amyloïde 1-42. Ils déterminent alors une sensibilité de 71% pour une spécificité de 83%, comparativement à une sensibilité de 40% et une spécificité de 86% pour le dosage exclusif des protéines tau.

# **OBJECTIFS**



## OBJECTIFS

La maladie d'Alzheimer est définie sur le plan clinique comme une démence sénile neurodégénérative. Son diagnostic est un diagnostic de probabilité, porté après exclusion d'autres pathologies neurologiques. Il n'existe en effet aucun examen biologique ou clinique permettant d'établir un diagnostic de certitude de la maladie, hormis l'examen neuropathologique post-mortem. Les lésions cérébrales alors observées sont des dépôts amyloïdes extra-cellulaires et des neurones avec dégénérescence neurofibrillaire.

Au niveau moléculaire, la phosphorylation anormale des protéines tau-PHF constitutive des lésions de dégénérescence neurofibrillaire fut longtemps considérée comme l'élément central du processus pathologique. Un certain nombre de sites phosphorylés ont ainsi été décrits sur ces protéines, grâce notamment à l'utilisation d'anticorps spécifiques. Cependant, ces mêmes anticorps ont permis de montrer que les protéines tau normales biopsiques étaient également phosphorylées sur plusieurs sites communs avec les protéines tau-PHF pathologiques. Néanmoins, la distinction entre les deux catégories de protéines restait toujours possible, en particulier avec l'anticorps AT100.

Dans ce contexte, l'objectif de notre projet de recherche était double :

**- Développer de nouveaux anticorps monoclonaux et polyclonaux spécifiques des protéines tau.** Les anticorps produits doivent permettre de poursuivre la caractérisation des protéines tau-PHF, afin notamment de déterminer des sites de phosphorylation qui leur soient spécifiques. L'utilisation des nouveaux anticorps, associée aux techniques de transfections que nous possédons au laboratoire, devrait également nous permettre d'étudier les kinases impliquées dans la phosphorylation des protéines tau-PHF.

Les anticorps sont produits par immunisation de souris ou de lapins avec des protéines tau-PHF extraites de cerveaux de patients Alzheimer, ou avec des peptides synthétiques reprenant des séquences peptidiques de la molécule de protéine tau. La caractérisation des anticorps met en œuvre des techniques de biochimie (ELISA, Western-blot, BIAcore™), de

biologie moléculaire (protéines recombinantes, protéines exprimées par des cellules transfectées) et d'immunohistochimie.

- **Développer un protocole de dosage des protéines tau.** La libération dans le liquide céphalo-rachidien d'antigènes lésionnels en rapport avec la dégénérescence neurofibrillaire a pu être mise en évidence. En particulier, le dosage de différentes formes de protéines tau est réalisable à l'aide de kits ELISA, mais la sensibilité et la spécificité de ces dosages ne sont pas cependant suffisantes pour une utilisation clinique.

La mise au point d'un protocole ELISA utilisant les anticorps produits dans la première partie de notre projet constitue un objectif à court terme. Elle nécessite de déterminer le type de dosage qui sera utilisé, en fonction des formes de protéines tau qui doivent être analysées et des anticorps disponibles.

La validation du protocole établi, en tant que dosage biologique d'aide au diagnostic, représente un objectif à moyen ou long terme.

**RESULTATS**

**DISCUSSION**

## **RESULTATS - DISCUSSION**

### **I- ANALYSE DES PROTEINES TAU NATIVES**

Le concept de phosphorylation anormale des protéines tau-PHF a évolué en 1994, avec la publication des travaux de Matsuo et collaborateurs démontrant la phosphorylation des protéines tau normales dites "biopsiques" ou "natives" (Matsuo *et al.*, 1994).

Au moment où nous débutons notre projet de recherche, cette notion de protéines tau natives phosphorylées était nouvelle, et il nous est alors paru intéressant de compléter l'analyse de cette catégorie de protéines. Cette partie de notre travail a été réalisée en collaboration avec les services de la clinique neurochirurgicale du Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille (Professeurs Christiaens et Lejeune), pour l'obtention des prélèvements cérébraux biopsiques, et avec Nicolas Sergeant, étudiant en thèse au laboratoire, pour l'analyse en électrophorèse bidimensionnelle.

Nous avons réalisé une étude comparative des protéines tau-PHF et des protéines tau natives en utilisant les techniques biochimiques de l'électrophorèse mono- et bi-dimensionnelle, couplées à la technique des immunoempreintes. L'ensemble de nos résultats ont été publiés (Sergeant *et al.*, 1995), ou présentés lors de la 3<sup>ième</sup> réunion francophone sur la maladie d'Alzheimer (Lille, Octobre 1995).

#### **I-1- ANALYSE BIOCHIMIQUE COMPARATIVE DES PROTEINES TAU-PHF ET DES**

##### **PROTEINES TAU NATIVES : ARTICLE N°1**

« Isoelectric point differentiates PHF-tau from biopsy-derived human brain tau proteins ».

N. Sergeant, T. Bussière, P. Vermersch, J.P. Lejeune, A. Delacourte

Neuroreport (1995) 6 : 2217-2220

In the present study, Tau proteins were detected by two monoclonal antibodies AD2 and Tau-1 raised against PHF-tau and normal Tau proteins respectively using single- and two-dimensional immunoblotting. We demonstrate here the presence of a Tau triplet in brain homogenates from patients with Alzheimer's disease (AD) processed human brain biopsies from controls. However PHF-tau proteins have a slight but significantly higher mol. wt and a much more acidic isoelectric point. Therefore, Tau proteins are more phosphorylated in AD.

**Key words:** Alzheimer's disease; PHF-tau; Neurofibrillary degeneration; Phosphorylation; Monoclonal antibodies; Western blots; Two-dimensional gel electrophoresis

## Isoelectric point differentiates PHF-tau from biopsy-derived human brain tau proteins

N. Sergeant, T. Bussière, P. Vermersch, J. P. Lejeune<sup>1</sup> and A. Delacourte<sup>CA</sup>

Unité INSERM 422, Place de Verdun, F-59045, Lille Cedex; <sup>1</sup>Clinique neurochirurgicale, CH&U de Lille, 59037 Lille Cedex, France

<sup>CA</sup>Corresponding Author

### Introduction

Neurofibrillary tangles (NFT) and senile plaques are the two main neurological lesions described in Alzheimer's disease (AD). The distribution and the density of NFT are well correlated with cognitive impairment.<sup>1,2</sup> NFT result from the intraneuronal accumulation of paired helical filaments (PHF). Microtubule associated Tau proteins are the major components of PHF, the so-called PHF-tau,<sup>3,4</sup> which are different from autopsy derived normal Tau. We coined the term 'pathological Tau' in 1989 to reflect biochemical differences between PHF-tau and normal Tau.<sup>5</sup> These results were reinforced by the fact that identification of pathological Tau proteins can differentiate between different neurodegenerative disorders.<sup>6-8</sup> It has been suggested that PHF-tau were the result of hyperphosphorylation or abnormal phosphorylation, mainly because PHF-tau are specifically labelled by phosphorylation-dependent Tau monoclonal antibodies (mAb).<sup>9-12</sup> Recently, it has been shown that biopsy derived normal Tau proteins have many of the phosphorylated sites of PHF-tau.<sup>13</sup> These results demonstrate that normal Tau are 'hyperphosphorylated'. Taking these new results into account, we have compared Tau proteins from Alzheimer brains with biopsy derived tissue, using one-dimensional (1DE) and two-dimensional gel electrophoresis (2DE) and immunolabelling with a panel of well-characterized anti-tau mAb. This approach allowed us to demonstrate similarities and differences between tau-PHF and normal Tau.

### Materials and Methods

**Patients:** The 10 most representative Alzheimer

patients, according to the NINCDS-ADRDA criteria, were chosen from 50 in our brain bank. Post-mortem delays were between 8 and 24 h in all cases. The mapping of neurofibrillary degeneration has already been reported for these patients.<sup>14</sup> Biopsies were also obtained from five patients aged 30-55 years who underwent frontal-or temporal lobectomy for brain tumour resection. The samples were resected from the normal brain region close to the tumour. Immediately after excision, samples were rinsed in cold physiological serum (4°C), in order to eliminate blood contaminants, and then snap frozen in liquid nitrogen. Both biopsy samples and AD autopsy samples were homogenized in SDS-Laemmli sample buffer 1:10 (w/v) and heat treated.<sup>15</sup> All samples were stored at -80°C until use. The different autopsy cases were obtained according to the French Caillavet Law n°76-1181 (December 22, 1976) and in accordance to the ethics committee of the CH&U de Lille (October 19, 1994).

**Single and two-dimensional gel electrophoresis:** For one-dimensional gels, 15 µl of each homogenate were loaded onto 10-20% SDS-PAGE. Two-dimensional gel electrophoresis was performed according to the method of O'Farrell's.<sup>16</sup> Isofocusing gel contained 4% acrylamide and 2.5% bis-acrylamide as cross-linker, 9.5 M urea, 2% Triton X-100, 4% pH3-10 Pharmalytes and 1% pH4-6.5 Pharmalytes (Pharmacia). Brain homogenate (15 µl) heat treated (100°C for 5 min) and then centrifuged (10 000 r.p.m. for 10 min). The supernatant was added with 15 µl of a solution containing 8 M urea and 4% Triton X-100. Isoelectrofocusing was performed at 10 500 Vh on 12 cm long and 3 mm i.d. capillary tubes. The second

dimension was performed as for one-dimensional gels, on 10–20% SDS-PAGE. To determine isoelectric points (pI), pH gradient was calibrated using the Carbamylite™ calibration kit (Pharmacia). Creatine phosphokinase (5  $\mu$ l, CPK: 40 kDa, pI 4.9–7.1) was applied just before isoelectrofocusing, in accordance with the manufacturer's instructions.

**Western blot analysis:** The 1DE and 2DE proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (0.45  $\mu$ m pore size, Schleicher-Schuell) for 90 min (current: 0.8 mA cm<sup>-2</sup>) using an LKB Multiphor II Nova Blot. Proteins were stained with Ponceau red (2 mg ml<sup>-1</sup>) in order to control the quality of the gels and to spot the internal markers. Membranes were scanned or photographed. Blocking was carried out with TBS containing 5% (w/v) dry milk and 0.05% (w/v) Tween 20.

**Antibodies:** Nitrocellulose membranes with blotted proteins were probed with two mAb for 2 h at room temperature. AD2 is a protein A purified mAb which specifically recognizes a phosphorylated site located on the carboxy-terminal part of pathological Tau proteins. AD2 detects NFT and PHF on brain slices<sup>17</sup> and an abnormal Tau triplet in total AD brain homogenates.<sup>18</sup> AD2 was used at a final concentration of 0.3  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> in TBS. The mAb Tau-1 (Boehringer Mannheim GmbH, Germany) was raised against the non-phosphorylated epitope localized between amino acids 192–204 of the highest Tau isoform.<sup>19</sup> Tau-1 was used 1/1000. Replicas were also probed with the M19G polyclonal antibody (1/1000) raised against the amino-terminal sequence 1–19 of all Tau isoforms. AD2 and Tau-1 were revealed with horseradish peroxidase-labelled sheep anti-mouse immunoglobulins adsorbed with human serum proteins (SIGMA Immuno Chemicals). The polyclonal antibody M19G was revealed with horseradish peroxidase-labelled goat anti-rabbit immunoglobulins adsorbed with human serum proteins (SIGMA Immuno Chemicals). All were detected by chemiluminescence with ECL Western blotting system (Amersham).

## Results

**One-dimensional immunoblot analysis:** Homogenates from the frontal cortex of AD patients were compared with biopsies from control cases. AD2 revealed three major bands in rapidly processed biopsy samples at the same apparent mol. wt as the pathological Tau triplet 55, 64 and 69 kDa named PHF-tau, but differences were observed. Biopsy samples counterpart of the 55 kDa PHF-tau band was more extended towards the lowest mol. wt (Fig. 1, AD2), and appeared as two bands. These results were confirmed

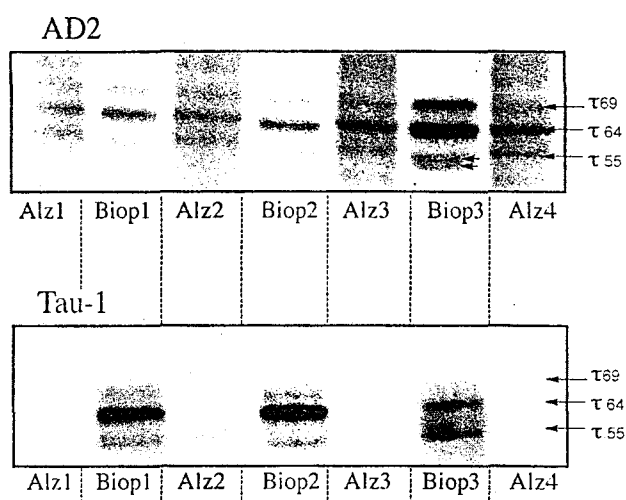


FIG. 1. One-dimensional immunoblot analysis of the Tau profile from AD brain extracts vs rapidly processed control biopsies. Three representative biopsy derived brain extracts (Biop1 to Biop3) were compared with four representative AD brain extracts (Alz1 to Alz4). Brain homogenate (15  $\mu$ l) was loaded on 10–20% SDS-PAGE. (A) AD2 immunodetection. Note the smears in AD samples. The three major bands of AD specific triplet are indicated by arrows. The two 'sub-bands' of the 55 kDa component from biopsy samples are indicated by small arrows. (B) Tau-1 immunodetection. Note the weak detection of 69 kDa Tau variant.

when the polyclonal antibody M19G was applied onto the same nitrocellulose replica (data not shown). Moreover, smears were detected in all AD samples while none could be detected in biopsy samples. Tau-1 essentially immunodetected the 64 kDa component and weakly the 69 and 55 kDa components. No detection, or a very faint one, was observed in Alzheimer brain extracts (Fig. 1, Tau-1).

**Two-dimensional immunoblot analysis:** All samples were tested twice at least and the isoelectric points of Tau proteins from AD and control brain homogenates were determined with three internal standard proteins common to both homogenates (Fig. 2A) and pH gradient was determined with CPK from the Carbamylites™ calibration kit. On Coomassie blue staining 34 spots were detected for the CPK Carbamylites within the brain homogenate spots (Fig. 2A) and the distribution of those 34 spots was linear between pI 4.9 to 7.1. CPK spots could also be detected by Ponceau red staining onto the nitrocellulose membrane after transfer (data not shown). The 2DE immunoblot analyses for all five human brain biopsy samples were similar. In AD brain extracts, AD2 immunodetected the triplet of pathological Tau with pI ranging from 6 to 6.85 for the 69 kDa component, 6.05–6.95 for both 64 and 55 kDa components (Fig. 2B). In biopsies, the immunodetected Tau triplet had a less acidic pI than PHF-tau. The isoelectric point of normal Tau proteins ranged

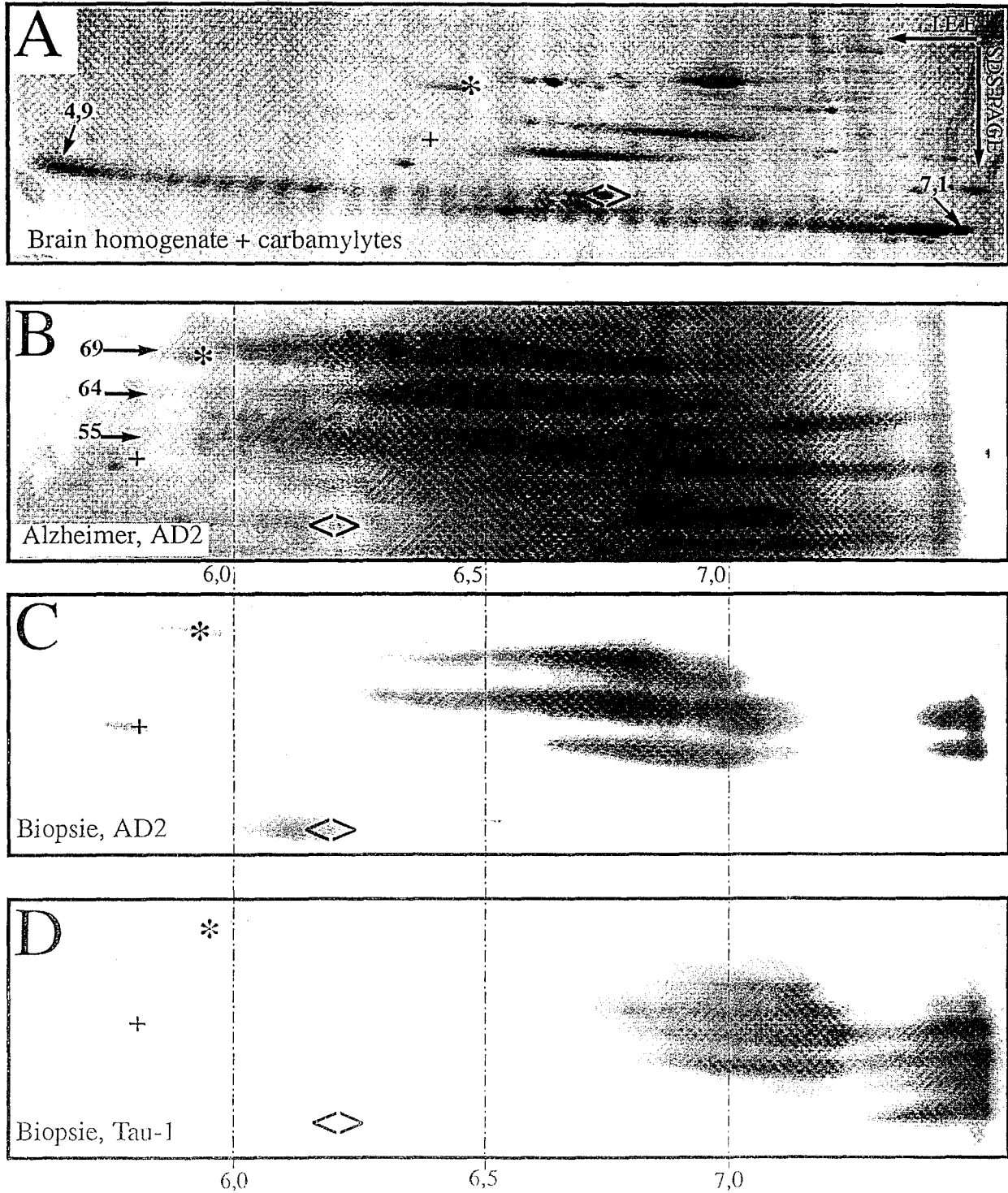


FIG. 2. Two-dimensional immunoblot analysis of Tau profile from AD brain extracts vs rapidly processed control biopsies. (A) Coomassie blue staining of a 2DE gel. Creatine phosphokinase Carbamylate™ treatment revealed 34 spots with a linear pH gradient ranging from pI 7.1–4.9. Three internal standards (\*, +, <>) were used to compare each profile after immunolabelling. The two spots marked by \* (69 kDa, pI 5.94) and + (54 kDa, pI 5.81) were detected by AD2 and never showed differences in MW or pI. <> corresponds to the GFAP (60 kDa, pI 6.22), as verified with a specific mAb anti-GFAP (GF5; data not shown). (B) AD2 immunolabelling of an Alzheimer brain extract, showing the PHF-tau triplet. Note that the variants of Tau 69 are very close to \*. The acidic end of each PHF-tau component is marked by an arrow. (C) AD2 immunolabelling of a biopsy homogenate from a control case, showing that the Tau triplet has a less acidic isoelectric point. Note also that the lowest (52–55 kDa) component is less acidic compared to the 64 and 69 kDa components. (D) Tau-1 immunolabelling of a biopsy homogenate from a control case, showing that it detects the more basic region of normal Tau proteins which have also a lower MW. Note that the 69 kDa component is weakly detected.

from 6.33 to 7.03 for the 69 kDa component, 6.25 to 7.16 for the 64 kDa and 6.6 to 7.15 for the 52–55 kDa components (Fig. 2C). Tau-1 detected the non-phosphorylated Tau proteins from biopsy extracts. They had a less acidic pI, with an acidic ending at pH 6.75, and a lower mol. wt (Fig. 2D). The two highest mol. wt components represent the basic part of the 64 and 55 kDa immunodetected by AD2 and the 69 kDa was only weakly detected. In AD brain extracts, the immunodetection was very weak or absent. All Tau isoforms were also labelled with polyclonal antibody M19G, corroborating results obtained with AD2 and Tau-1 (data not shown).

## Discussion

The single- and two-dimensional Tau profiles from the frontal or temporal cortex of 10 patients with AD *vs* five controls were compared. Alzheimer patients were chosen from our brain bank because of their clear-cut clinical and neuropathological record in favour of the diagnosis. Most controls were younger than 55, in order to avoid working on Tau proteins affected by ageing.<sup>20</sup> For this study, we used a mAb named AD2, which is able to distinguish within normal and pathological Tau proteins from autopsy tissue. Due to its specificity and sensitivity, this mAb was able to directly detect phosphorylated Tau proteins from homogenates on one- and two-dimensional gels. Furthermore, we preferred to directly work on homogenates, in order to avoid biochemical modifications of Tau that can be generated during the purification process.

Using one-dimensional immunoblots, we observed, as reported by Matsuo *et al.*<sup>13</sup> that normal Tau and PHF-tau proteins shared similarities since both constitute a triplet (Tau 55, 64 and 69 kDa). We demonstrate here that they are also different: (1) the '55 kDa' component showed a slight but significant lower mol. wt in biopsy control cases and was detected as a doublet with AD2 probe. (2) AD2 constantly detected smears in AD brain extracts. This is a common feature to all AD brain extracts with neurofibrillary degeneration.<sup>12</sup> Smears were not detected in biopsy control samples. (3) PHF-tau proteins were constantly more acidic. Moreover in AD, each band of the Tau triplet was in same range of pI while normal biopsy Tau proteins showed heterogeneity between each component. The '55 kDa' component showed the lowest range of pI and had a less acidic ending when compared with the 64 and 69 kDa biopsy Tau components. (4) Tau-1 strongly detected the dephosphorylated Tau components in biopsy homogenates, while these were almost absent from AD brain extracts.

## Conclusion

AD2 and Tau-1 are phosphorylation-dependent mAbs. Since additional phosphorylation of Tau proteins increases acidity and mol. wt,<sup>21</sup> we can conclude the PHF-tau proteins are more phosphorylated than biopsy derived normal Tau proteins. A change of conformation associated with the aberrant phosphorylation generated during AD could also contribute to these biochemical differences. They might reflect the dysregulation between phosphorylation and dephosphorylation involved in AD. Together, our results demonstrate that the concept of 'pathological Tau' is still valid, since it is now possible to clearly differentiate the normal nervous tissue (autopsy and biopsy) from AD nervous tissue (autopsy).

The challenge is now to elaborate a new generation of immunological probes that unambiguously distinguish between normal and pathological Tau, in order to bring new developments in the fields of diagnosis and experimental models of neurofibrillary degeneration.

## References

- Nagy Z, Esiri MM, Jobst KA *et al.* *Dementia* 6, 21–31 (1995).
- Bierer LM, Hof PR, Purohit DP *et al.* *Arch Neurol* 52, 81–88 (1995).
- Goedert M. *Trends Neurosci* 16, 460–465 (1993).
- Delacourte A. *Biomed Pharmacother* 48, 287–295 (1994).
- Flament S, Delacourte A, Hemon B *et al.* *J Neurol Sci* 92, 133–141 (1989).
- Vermersch P, Robitaille Y, Bernier L *et al.* *Acta Neuropathol* 87, 572–577 (1994).
- Ksiezak-reding H, Morgan K, Mattiace LA *et al.* *Am J Pathol* 145, 1496–1508 (1994).
- Delacourte A, Robitaille Y, Sergeant N *et al.* *J Neuropathol Exp Neurol* 54, 447 (1995).
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung Y-C *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 4913–4917 (1986).
- Mercenck M, Vandermeeren M, Lubke U *et al.* *Acta Neuropathol* 84, 265–272 (1992).
- Otvos L, Feiner L, Lang E *et al.* *J Neurosci Res* 39, 669–673 (1994).
- Buée-Scherrer V, Buée L, Hof PR *et al.* *Am J Pathol* 68, (1995).
- Matsuo ES, Shin R-W, Billingsley ML *et al.* *Neuron* 13, 989–1002 (1994).
- Vermersch P, Frigard B and Delacourte A. *Acta Neuropathol* 85, 48–54 (1992).
- Laemmli UK. *Nature* 227, 680–685 (1970).
- O'Farrell PH. *J Biol Chem* 250, 4007–4021 (1975).
- Reig S, Buée-Scherrer V, Défossez A *et al.* *Acta Neuropathol* (In press) (1995).
- Condamines O, Buée-Scherrer V, Boissier L *et al.* *Neurosci Lett* 192, 1–4 (1995).
- Szendrei GI, Lee VM-Y and Otvos J Jr. *Neurosci Res* 34, 243–249 (1993).
- Vermersch P, David J-P, Frigard B *et al.* *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. (In press) (1995).
- Butler M and Shelanski ML. *J Neurochem* 47, 1517–1522 (1986).

ACKNOWLEDGEMENTS: AD2 and GF5 were developed through a collaboration between UMR 9921 (Pr B. Pau, Dr C. Mourton-Gilles, Montpellier University), Sanofi/Diagnostics Pasteur and INSERM. We thank the staff of the Neurosurgery Department (Pr. Christiaens), Hôpital B, Lille, France. We also thank H. Hondermarck (Laboratoire du développement, Université Lille I, France) for his critical advice on 2-D Electrophoresis.

Received 13 July 1995;  
accepted 14 August 1995



## **I-2- DISCUSSION**

Les résultats obtenus confirment l'existence de similitudes entre les protéines tau-PHF et les protéines tau natives, mais font également apparaître l'existence de différences. L'analyse biochimique par électrophorèse monodimensionnelle et bidimensionnelle nous permet de montrer que:

- les protéines tau natives sont détectées sous forme d'un triplet tau55, tau64, tau69 par l'anticorps monoclonal AD2 dépendant de la phosphorylation (figure 3A).

- la composante tau55 du triplet des protéines tau natives présente alors une masse moléculaire apparente plus faible que celle du triplet des protéines tau-PHF.

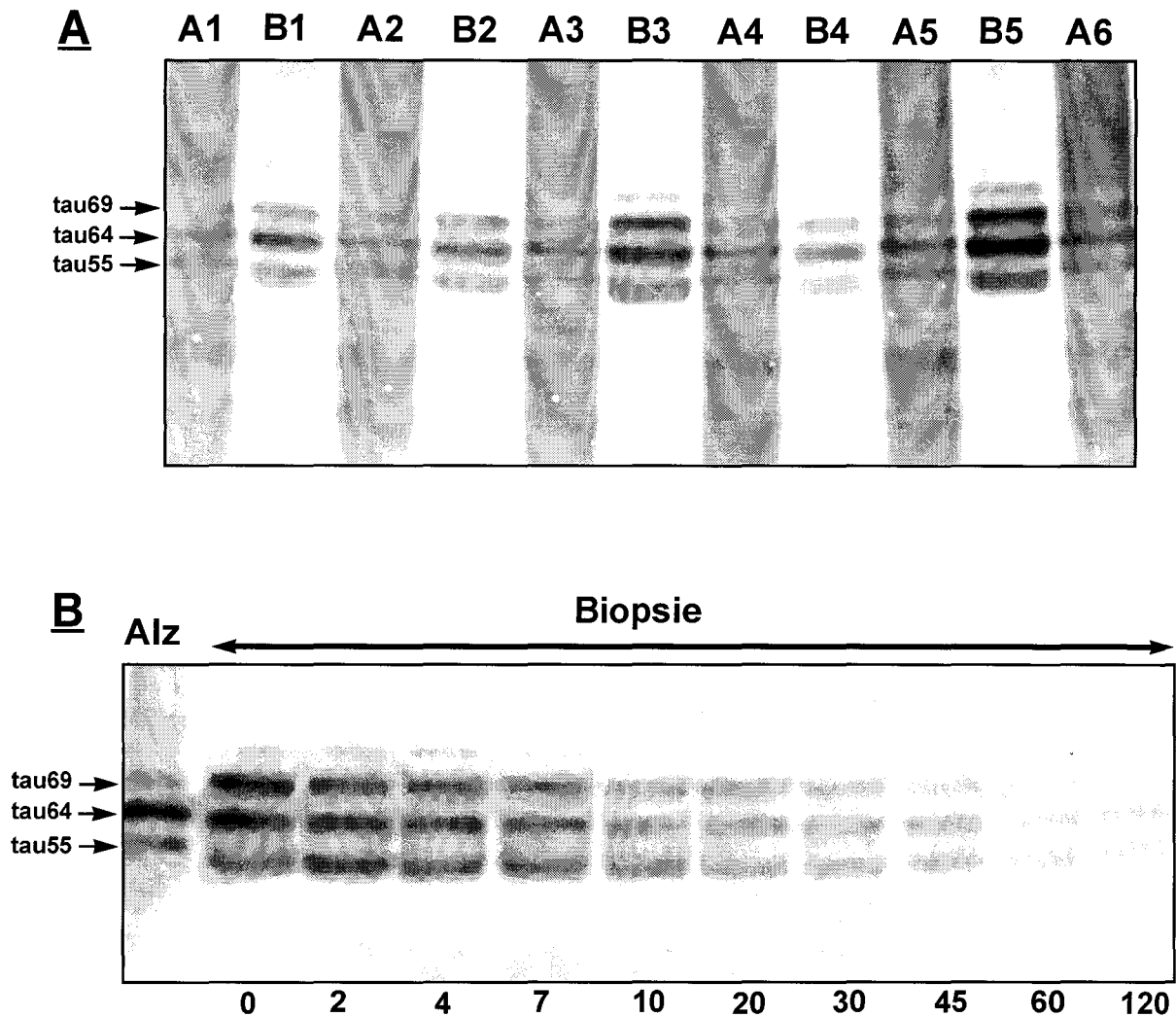
- les protéines tau-PHF ont un pI plus acide que les protéines tau natives.

- la détection des protéines tau par l'anticorps AD2 se limite au triplet dans les homogénats biopsiques. Aucune traînée verticale n'est visualisée, à la différence des homogénats Alzheimer (figure 3A).

- l'immunoréactivité de l'anticorps AD2 vis-à-vis des protéines tau natives est fonction du délai post-opératoire (figure 3B).

- les composantes tau55 et tau64 des protéines tau natives sont détectées par l'anticorps monoclonal tau-1, spécifique de l'épitope [189-207] déphosphorylé.

Ces résultats confirment donc l'état phosphorylé des protéines tau natives, en particulier au site épitopique de l'anticorps AD2 (ser396/ser404). De plus, l'absence de marquage de la traînée sur le profil électrophorétique indique la non-agrégation des protéines natives phosphorylées, qui restent sous forme soluble. Enfin, l'immunomarquage obtenu avec Tau-1 confirme qu'une partie seulement des protéines natives est phosphorylée. Ainsi, l'équivalent de la composante tau69 du triplet détecté par AD2 n'est pas détecté par l'anticorps tau-1.



**Figure 3: Analyse biochimique des protéines tau natives.**

Immunomarquage obtenu avec l'anticorps monoclonal AD2 spécifique de l'épitope ser396/ser404 phosphorylé, sur homogénats totaux de prélèvements cérébraux biopsiques.

**(A)** Comparaison du profil électrophorétique des protéines tau-PTHF d'homogénats de cerveaux Alzheimer (A1 à A6) et des protéines tau natives de prélèvements biopsiques (B1 à B5). L'anticorps AD2 détecte le triplet (tau55, tau64, tau69) et la traînée caractéristique des protéines tau-PTHF dans les homogénats Alzheimer, et uniquement le triplet des protéines tau phosphorylées dans les homogénats biopsiques.

**(B)** Cinétique de déphosphorylation d'un prélèvement cérébral biopsique. Le prélèvement est conservé à température ambiante pendant le temps indiqué (en minutes), avant d'être homogénéisé en tampon Laemmli et chauffé à 100°C. La déphosphorylation, visualisée avec l'anticorps AD2 par une diminution progressive du marquage du triplet, est importante à partir de 10 minutes de délai post-opératoire, totale au-delà de 2 heures.

L'électrophorèse bidimensionnelle, en plus de la masse moléculaire apparente, donne la valeur du point isoélectrique (pI) des protéines. Un pI acide peut être associé, dans le cas des protéines tau, à la présence de nombreux groupements phosphate. Nous démontrons donc dans notre étude que les protéines tau-PHF sont davantage phosphorylées que les protéines tau natives. Ce résultat est important car il démontre que la distinction des protéines tau-PHF et des protéines tau natives est toujours possible.

Une cinétique de déphosphorylation, mimant l'effet du délai post-mortem, est réalisée en laissant le prélèvement cérébral *ex-situ* à température ambiante, pendant des temps variables. Une déphosphorylation rapide est décrite, puisque l'immunoréactivité de l'anticorps AD2 décroît à partir de 10 minutes, et a totalement disparue au-delà de 2 heures de "délai post-mortem".

La nature des sites phosphorylés à la fois dans les protéines tau natives et les protéines tau-PHF est donnée par les anticorps monoclonaux utilisés dans les différentes études. Il s'agit des résidus thréonine 181, sérine 202, sérine 205, thréonine 231, sérine 396 et sérine 404 (Matsuo *et al.*, 1994; Sergeant *et al.*, 1995).

Dans le but de déterminer des épitopes spécifiques des protéines tau-PHF, nous avons entrepris des programmes d'immunisation à l'aide de peptides synthétiques, ainsi qu'avec une préparation de protéines extraite d'un cerveau de patient Alzheimer.

En effet, il existe actuellement peu d'anticorps qui soient spécifiques des protéines tau-PHF. Ainsi, l'anticorps monoclonal AT100 détecte uniquement les protéines tau-PHF et ne détecte pas les protéines tau natives (Matsuo *et al.*, 1994). Son épitope est constitué des résidus thréonine 212 et sérine 214 phosphorylés (Hoffmann *et al.*, 1997). Zheng-Fischöffer et collaborateurs ont récemment démontré que cet épitope était généré par la phosphorylation des résidus de sérine 199, sérine 202 et thréonine 205, suivie de la phosphorylation du résidu de thréonine 212 par la GSK3 $\beta$  et finalement du résidu de sérine 214 par la pKA. De plus, cette phosphorylation séquentielle requiert une conformation spécifique de l'épitope, induite par les polyanions (Zheng-Fischöffer *et al.*, 1998).

Hoffmann et collaborateurs décrivent, en même temps que l'épitope de AT100, un deuxième site phosphorylé spécifique des protéines tau-PHF. Il s'agit du double site thr231/ser235, détecté par l'anticorps monoclonal PHF-27 (Hoffmann *et al.*, 1997). Comme pour le site thr212/ser214, une phosphorylation séquentielle a été mise en évidence, *in-vitro*, pour cet épitope. Ainsi, la phosphorylation initiale du résidu sérine 235 par la MAP kinase est nécessaire pour que se produise la phosphorylation du résidu thréonine 231 par la GSK3 $\beta$  (Goedert *et al.*, 1994).

En conclusion de son travail, Hoffmann suggère que, pour être spécifique des protéines tau-PHF, un épitope doit être constitué par au moins deux résidus d'acide aminé phosphorylés et proches l'un de l'autre. Par ailleurs, la phosphorylation de ces sites doubles serait réalisée par au moins deux kinases différentes, activées selon une séquence temporelle définie.

Cependant, cette théorie ne prend pas en compte le résidu simple sérine422, dont la phosphorylation a été démontrée comme étant également caractéristique des protéines tau-PHF (Caillet-Boudin et Delacourte, 1996; Hasegawa *et al.*, 1996). Afin de compléter l'analyse de ce site, nous avons développé un nouvel anticorps polyclonal dirigé contre la sérine 422 phosphorylée. Dans un premier temps, nous démontrons la spécificité de cette nouvelle sonde immunologique, et nous confirmons à l'aide de celle-ci la spécificité du site. Nous complétons également sa caractérisation, en étudiant son implication dans les pathologies neurodégénératives avec inclusions intra-cytoplasmiques tau-positives.

Nous avons également tenté de produire des anticorps monoclonaux spécifiques des sites phosphorylés sérine 433 et sérine 435, toujours par immunisation de souris avec des peptides.

L'utilisation de peptides synthétiques reprenant certaines parties de la séquence des protéines tau permet d'obtenir des anticorps dirigés contre des sites particuliers de la protéine, autres que les sites immuno-dominants. En effet, une immunogénicité plus importante de certains résidus de phosphosérine ou phosphothréonine a été démontrée au sein des préparations de protéines tau-PHF. Il s'agit essentiellement des acides aminés sérine 214,

thréonine 231 et sérine 396 (Hoffmann *et al.*, 1997). En conséquence, plusieurs anticorps monoclonaux de même spécificité ont été obtenus et décrits par des équipes différentes utilisant des préparations de protéines tau-PHF comme antigène d'imunisation. Il existe ainsi au moins 5 anticorps dirigés contre le résidu sérine 396, 5 anticorps dirigés contre le résidu thréonine 231 et 2 anticorps contre le résidu sérine 214.

## II- PRODUCTION ET CARACTERISATION D'ANTICORPS

### II-1- IMMUNISATION AVEC DES PEPTIDES CARBOXY-TERMINAUX

#### II-1-1- Epitope sérine 422 phosphorylée

##### II-1-1-1- Analyse biochimique et immunohistochimique de l'épitope dans les pathologies neurodégénératives : article n°2

« Phosphorylated sérine 422 on tau proteins is a pathologic epitope found in several diseases with neurofibrillary degeneration » .

T. Bussièrre, P.R. Hof, C. Mailliot, C. Brown, D.P. Perl, L. Buée, A. Delacourte

Acta Neuropathologica (sous presse)

## REGULAR PAPER

T. Bussière · P. R. Hof · C. Mailliot · C. D. Brown  
M. L. Caillet-Boudin · D. P. Perl · L. Bu e  
A. Delacourte

## Phosphorylated serine422 on tau proteins is a pathological epitope found in several diseases with neurofibrillary degeneration

Received: 24 July 1998 / Revised: 8 September 1998 / Accepted: 14 September 1998

**Abstract** Neuronal inclusions with bundles of abnormal filaments made of tau polymers are found in numerous diseases with neurofibrillary degeneration. Tau proteins are the basic components of paired helical filaments (PHF) in Alzheimer's disease (AD), and are abnormally phosphorylated. A disease-specific phosphorylation site at serine422 was demonstrated on PHF, but not on tau proteins from biopsy-derived brain samples. In the present study, we report the characterization of a polyclonal antibody (988) against the serine422 phosphorylation site. By using biochemical and immunohistochemical methods, we confirmed that it is not found on tau proteins from biopsy- or autopsy-derived control samples, and we investigated the presence of this epitope on tau proteins in several neurodegenerative disorders, including AD, Down syndrome (DS), Guamanian amyotrophic lateral sclerosis/Parkinsonism-dementia complex (ALS/PDC), corticobasal degeneration (CBD), progressive supranuclear palsy (PSP), postencephalitic parkinsonism (PEP) and Pick's disease (PiD). By Western blotting, antibody 988 labeled the characteristic tau triplet (tau 55, 64, 69) in AD, DS, Guamanian ALS/PDC and PEP. PSP and CBD exhibited their typical tau doublet (tau 64, 69), whereas the doublet tau 55 and 64 was detected in PiD. In all of these neurodegenerative disorders, antibody 988 clearly labeled NFT

and dystrophic neurites, as well as Pick bodies in PiD cases, whereas no staining was observed in control cases. These data indicate that phosphorylation of serine422 on tau proteins is a common feature among neurodegenerative disorders and is therefore not specific of AD. Moreover, phosphorylation of this epitope permits the distinction between normal tau proteins and pathological tau proteins.

**Key words** Neurodegenerative disorders · Neurofibrillary tangles · Phosphorylation · Serine422 · Tau protein

### Introduction

Microtubule-associated tau proteins aggregated into paired helical filaments (tau-PHF) or straight filaments are the major constituent of intraneuronal neurofibrillary tangles (NFT) [15], a neuropathological lesion described in Alzheimer's disease (AD) [8], Down syndrome (DS) [27], and other neurodegenerative disorders such as progressive supranuclear palsy (PSP, Steele-Richardson-Olszewski syndrome) [18], corticobasal degeneration (CBD) [10,11], Guamanian amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex (ALS/PDC) [3, 17, 20] and postencephalitic parkinsonism (PEP) [6, 19]. Pathological tau proteins are also found aggregated in the Pick bodies, the characteristic hallmarks of Pick's disease (PiD) [9, 21].

Tau proteins exist as six isoforms ranging in length from 352 to 441 amino acids in the adult human brain. These isoforms are generated through alternative mRNA splicing from a single gene located on chromosome 17 [1]. They differ by the presence or absence of an amino terminal insert of 29 (exon 2 translated) or 58 (exons 2 and 3 translated) amino acids and the presence of three (without exon 10) or four (exon 10 translated) repeat sequences in the carboxy terminal half of the protein. This later part constitutes the microtubule-binding domain [12].

Several immunochemical and biochemical studies have suggested that hyperphosphorylation or abnormal

T. Bussière · C. Mailliot · M. L. Caillet-Boudin · L. Bu e  
A. Delacourte  
INSERM U 422, Place de Verdun, F-59045 Lille cedex, France

P. R. Hof · C. D. Brown  
Neurobiology of Aging Laboratories  
and Fishberg Research Center for Neurobiology,  
and Department of Geriatrics and Adult Development,  
Mount Sinai School of Medicine, New York, NY 10029, USA

D. P. Perl  
Department of Pathology (Neuropathology),  
Mount Sinai School of Medicine, New York, NY 10029, USA

André Delacourte (✉)  
INSERM U422, Place de Verdun, F-59045 Lille cedex, France  
e-mail: delacourte@lille.inserm.fr,  
Tel.: +33-320 622071, Fax: +33-320 62207

phosphorylation of tau proteins is responsible for their loss of physiological function and consecutive aggregation into PHF [13, for review]. Hyperphosphorylation occurs on approximately 25 identified amino acids, half of which being serine/threonine-proline sites flanking the microtubule-binding domain of tau [31]. However, Matsuo and colleagues have demonstrated that most of the sites phosphorylated on PHF-tau are shared with normal tau proteins from human brain biopsies [28], but are phosphorylated to a lesser extent [34].

Recently, a new generation of phosphorylation-dependent antibodies has been produced that led to the characterization of PHF-tau specific sites. Among these antibodies, several exhibit a complex conformational specificity [24, 25, 33], while others present a single phosphorylation-dependent specificity [16]. These PHF-tau specific sites might have the ability to differentiate pathological tau proteins in AD from those in related disorders. For instance, several phosphorylation-dependent antibodies labeling the typical triplet of bands (tau 55, 64, 69) in AD could discriminate it from the tau 64, 69 doublet of PSP and CBD, or the tau 55, 64 doublet of PiD.

We have developed a new polyclonal antibody (referred to as 988) raised against the serine422 phosphorylation site (according to the numbering of the longest tau isoform, 441 amino acids). This site has been previously described to be strongly phosphorylated in PHF-tau but not in normal tau proteins from human brain biopsies [7, 16]. Using immunohistochemical and biochemical methods, we investigated the existence of this epitope in several neurodegenerative disorders. The immunoreactivity obtained with antibody 988 was compared to that of the well-characterized monoclonal antibody AD2 that recognizes the phosphorylated serine396/serine404 [4].

## Material and methods

### Patients

The brains from 15 AD cases, 3 aged DS cases, 5 Guamanian ALS/PDC, 5 PSP, 3 CBD, 3 PEP, and 4 PiD patients cases were available for analysis (Table 1). Five age-matched controls obtained from autopsy-derived materials and 3 samples from normal brain obtained from biopsy were also available. Fetal tau isoform was

**Table 1** Case description

Cases	Number of cases	Age range (years)	References
Control	5	75–85	[3, 4]
Fetal	1	0	[4]
Biopsy	3	49–72	[34]
AD	15	60–81	[3, 4]
DS	3	44–74	[22]
PSP	5	64–74	[18]
CBD	3	65–73	[5]
PiD	4	57–71	[5, 8, 21]
ALS/PDC	5	75–78	[3, 17, 20]
PEP	3	59–83	[6, 19]

obtained from a human brain fetus. Except two new CBD cases, detailed description of these cases has been previously reported in related studies (Table 1). In all of the cases, one hemisphere was frozen at autopsy for biochemical studies, and one hemisphere was fixed in 4% paraformaldehyde for immunohistochemical studies, except for biopsy-derived materials which are processed as previously described. For biochemical analysis, the brain extracts were homogenized in Laemmli sample buffer (1/10 w/v) and heat-treated (100°C for 10 minutes) [26].

### Recombinant and transfected tau proteins

Recombinant human tau protein corresponding to the longest isoform (441 amino acids (aa); 2+3+10+) [12] and cDNA of the four human tau isoforms used in transfection (441 aa, 2+3+10+; 381 aa, 2+3–10–; 352 aa, 2–3–10–; 412 aa, 2+3–10+), and cloned in pSG5 vector (Stratagene, Cambridge, UK), were kindly provided by Dr M. Goedert (MRC, Cambridge, UK) [14]. For transfections studies, COS-7 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle Medium (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) with 10% fetal calf serum (Boehringer Mannheim, Meylan, France) in a 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. cDNA of tau isoforms were transiently transfected in COS cells using the DEAE-dextran method. Following 42 hours transfection, cells were treated or not by okadaic acid (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) for 6 hours in serum-free medium. This treatment permits the generation of phosphorylated epitopes in the cell model [7, 30]. Cells were harvested in Tris-EDTA solution at 4°C and centrifuged. Cell pellets were homogenized in Laemmli sample buffer.

### Immunization

Antibody 988 was obtained by immunizing rabbits (New-Zealand strain) with a synthetic phosphopeptide YGGIDMVDS(P)PQLAT, with S(P) corresponding to the specific phosphoserine 422. The peptide was coupled to keyhole limpet hemocyanin via a tyrosine residue with bis-diazobenzidine as conjugation reagent (Neosystem, Strasbourg, France).

### Antibodies

Antibody 988 was used as a net serum at a 1/1500 dilution for Western-blotting and 1/1000 for immunohistochemistry. The preimmune serum did not label any structure by immunohistochemistry. By immunoblotting, a 70 kDa band was detected. AD2 is a protein A-purified monoclonal antibody raised against a crude PHF preparation obtained from AD brain. It is a phosphorylation-dependent monoclonal antibody, which specifically recognizes the phosphorylated serine396/serine404 on human tau proteins [4]. It was used at the concentration of 0.1 µg/ml in Tris Buffer (TBS) with 0.05% Tween20 (w/v) for Western blotting, and at the concentration of 2 µg/ml for immunohistochemistry. M19G is a polyclonal phosphorylation-independent antibody raised against a synthetic peptide corresponding to the first 19 amino acids of human tau (according to the numbering of the longest isoform) [4]. It was used at a final dilution of 1/6000 in TBS with 0.05% Tween20 for Western blotting.

### Polyacrylamide gel electrophoresis

The amount of each homogenate loaded onto 10% SDS-PAGE (Mighty small SE245, Pharmacia Biotech, Orsay, France) is approximately adjusted to have an equal staining of all homogenates with the phosphorylation-independent polyclonal antibody M19G. This approach allowed to standardize all samples, including those from COS cells with different transfection efficiencies.



### Western-blot analysis

By using a semi-dry blotting device (LKB Pharmacia, Saint-Quentin-en-Yvelines, France), electrophoretically resolved proteins were transferred onto Hybond-PVDF or nitrocellulose (0.45  $\mu$ m pore size, Amersham, Les Ulis, France) for immunolabeling with antibody 988 or antibodies AD2 and M19G, respectively. After blocking, immunolabeling was done by incubation with the primary antibody 90 minutes at room temperature. After washing, an anti-rabbit or an anti-mouse secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (Sigma) was used to reveal antigens specifically detected by polyclonal or monoclonal antibodies, respectively. Reaction product was detected with the ECL Western blotting system (Amersham).

### Alkaline phosphatase treatment

Immunoblotted PHF-tau were incubated overnight at room temperature with calf intestinal alkaline phosphatase (75 U/ml, Life Technologies). After washing, Western blotting was performed as described above.

### Immunohistochemistry

Samples were obtained from the hippocampus and several neocortical regions, including Brodmann's areas 9, 4, 17, 18, and 20. Tissues were washed in graded sucrose solutions (12%, 16% and 18%) in cold phosphate-buffered saline (PBS), frozen and cut at 40  $\mu$ m on a cryostat. Tissues were then processed for immunohistochemistry using either the monoclonal antibody AD2 or the polyclonal antibody 988 [23]. Free-floating sections were then rinsed in PBS and placed into a biotinylated anti-rabbit IgG or a anti-mouse Ig(G+M) secondary antibody solution (Vector Labora-

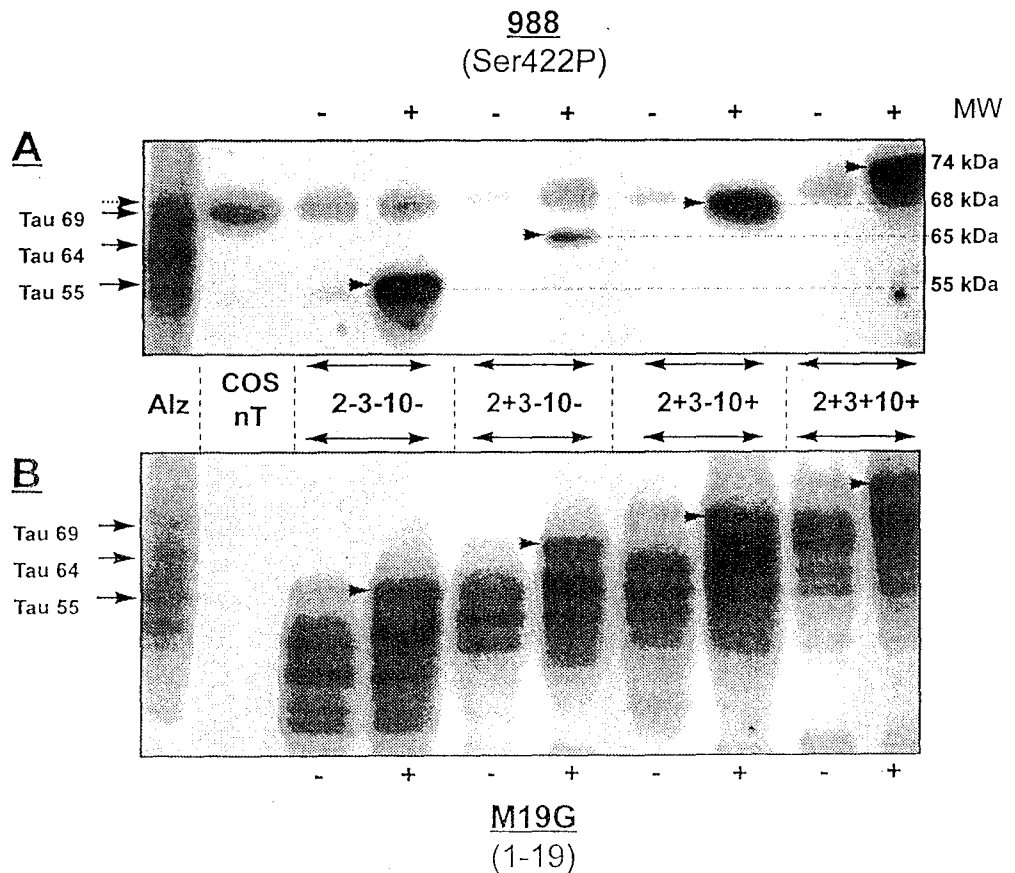
tories, Burlingame, CA; 1:200) for 1 hour. For brightfield microscopy, the sections were processed with the avidin-biotin method using a Vectastain ABC kit (Vector Laboratories) and 3,3'-diaminobenzidine (DAB) as a chromogen, rinsed, mounted onto chrom-alum coated slides, air dried, and immersed in 0.067% OsO<sub>4</sub> for 8 minutes to intensify the DAB reaction product. Sections analyzed by fluorescence microscopy were placed into a solution containing FITC-avidin D (1:200) for 2 hours. For sections that were incubated in both AD2 and 988 antibodies, rhodamine-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody (Boehringer Mannheim, Germany; 1:100) was added to the biotinylated anti-mouse IgG secondary antibody. Prior to visualization the sections were coverslipped with Vectashield mounting medium. A Zeiss Axio-phot photomicroscope equipped with the appropriate filters to visualize FITC and rhodamine was used for brightfield and epifluorescence microscopy.

## Results

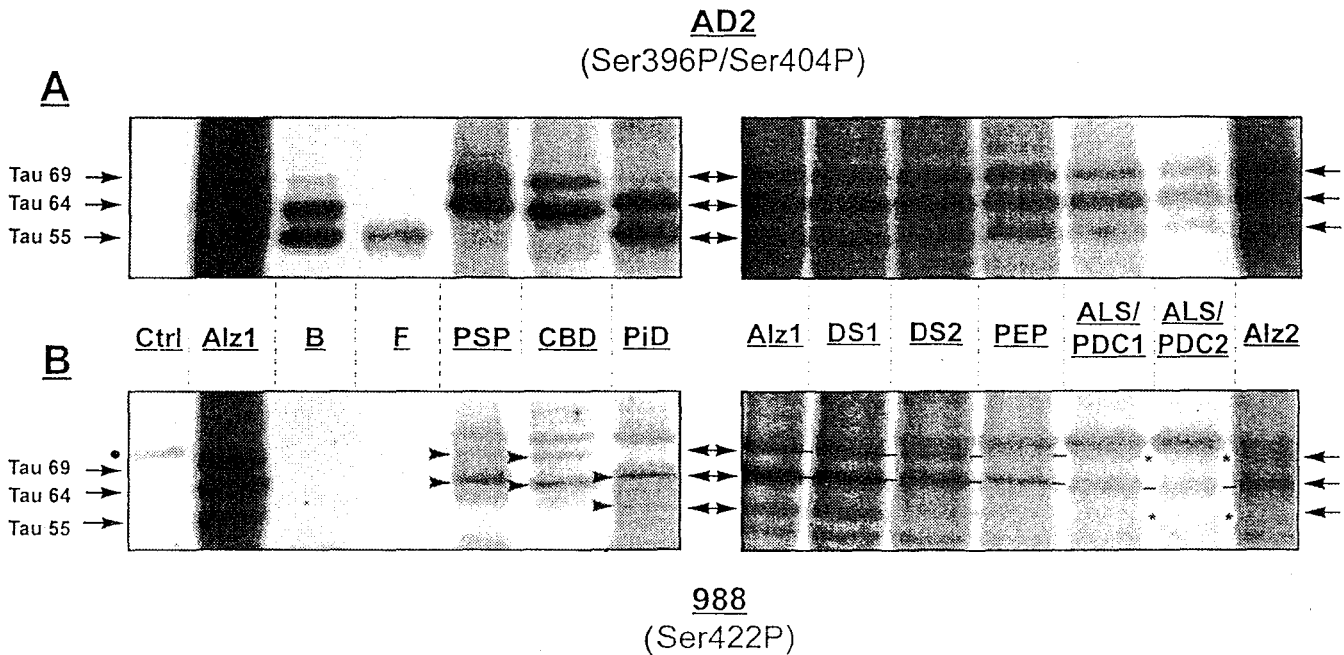
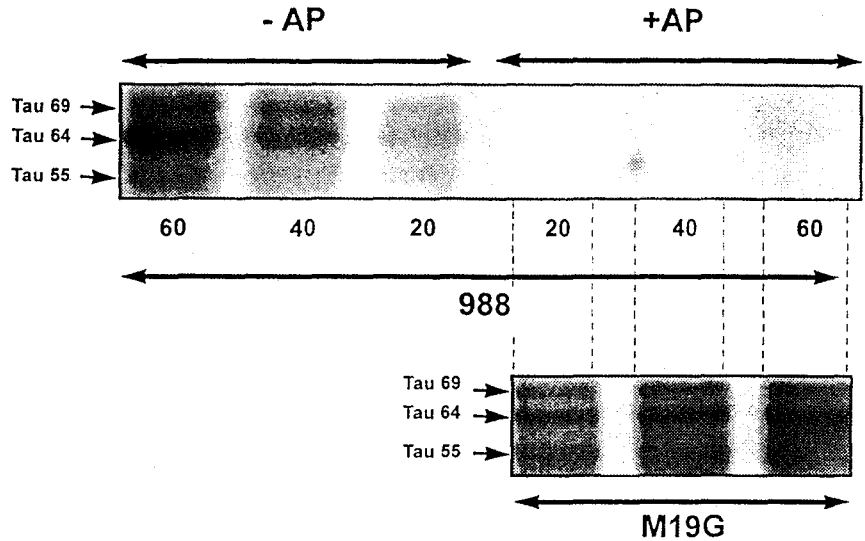
### Characterization of antibody 988

The phosphorylation-dependence of antibody 988 was ascertained by the fact that non phosphorylated recombinant isoform 2+3+10+ purified from E.Coli [12] was not labeled. Similarly, hyperphosphorylated tau isoforms obtained after transfection of tau isoforms 2-3-10-, 2+3-10, 2+3-10+, and 2+3+10+ cDNAs, and COS cells treatment by okadaic acid, were labeled with antibody 988. No staining was obtained in non-okadaic acid-treated transfected cells, with the exception of a 70 kDa band also detected with the preimmune serum (Fig. 1).

**Fig. 1 A, B** Immunoblotting of tau protein isoforms expressed in transfected COS-7 cells. (A) Detection of hyperphosphorylated tau isoforms using the phosphorylation-dependent polyclonal antibody 988. (B) Detection of tau isoforms using the phosphorylation-independent polyclonal antibody M19G. Transfected COS-7 cells were treated (+) or not (-) with okadaic acid. Different amounts of proteins were loaded to correct differences in transfection efficiencies. Arrowheads indicate hyperphosphorylated tau isoforms detected in treated COS-7 cells. Note that the 70 kDa band recognized by the preimmune serum is found in all samples. Abbreviations: Alz, Alzheimer's disease brain homogenate; COSnT, non-transfected COS-7 cells; 2-3-10-, isoform without exons 2, 3 and 10; 2+3-10-, isoform with exon 2; 2+3-10+, isoform with exons 2 and 10; 2+3+10+, isoform with exons 2, 3 and 10



**Fig. 2** Demonstration of the phosphatase sensitivity of 988 epitope. Different amounts of total brain proteins from one AD case (60, 40 and 20  $\mu$ g) were loaded on SDS-PAGE and transferred onto PVDF sheet. Blots were incubated overnight with (+AP), or without (-AP) alkaline phosphatase and then with antibody 988. The immunoblot was subsequently incubated with antibody M19G to control that lack of labeling is not due to protein catabolism



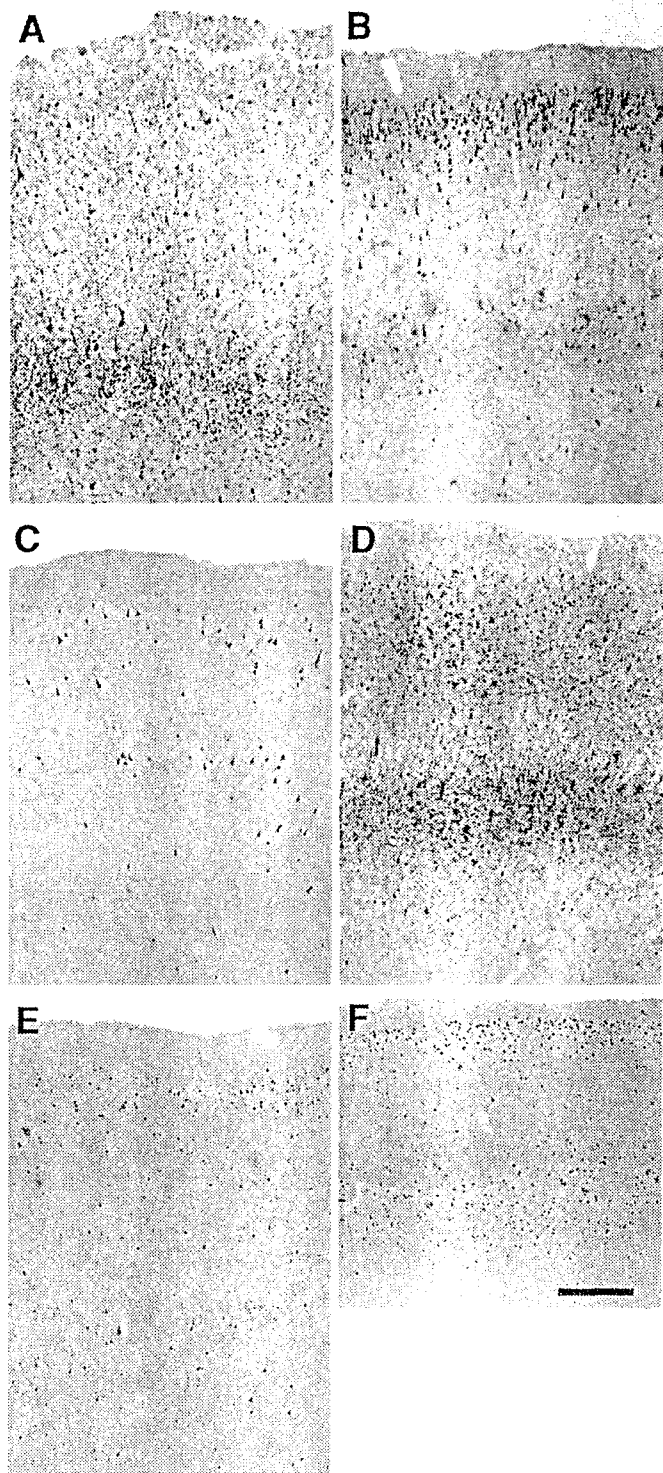
**Fig. 3A, B** Immunoblotting using phosphorylation-dependent antibodies AD2 and 988 on tau proteins in total brain homogenates from various disorders with neurofibrillary degeneration. (A) Detection of phosphorylated Ser396 and 404 using monoclonal antibody AD2. (B) Detection of phosphorylated Ser422 using polyclonal antibody 988. Arrowheads indicate pathological tau bands (55, 64, 69); asterisks indicate the faintly labeling of tau 64 and 55 variants in a Guamanian ALS/PDC homogenate; point indicates the 70 kDa band, also reacting with the preimmune serum. Abbreviations: Ctrl, control; Alz, Alzheimer's disease; B, biopsy; F, fetal; PSP, Progressive supranuclear palsy; CBD, Corticobasal degeneration; PiD, Pick's disease; DS, Down syndrome; PEP, Postencephalitic parkinsonism; ALS/PDC, Guamanian amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex

Consecutive immunoblotting with the phosphorylation-independent polyclonal antibody M19G revealed all the tau isoforms and the absence of protein degradation during the alkaline phosphatase treatment. Normal tau proteins from autopsy or biopsy-derived materials were not detected by antibody 988, whereas fetal tau isoform from fetus brain was very faintly stained (Fig. 3). In comparison, antibody AD2 strongly labeled a triplet of electrophoretic variants in biopsy, with tau 55 and tau 64 as major bands and tau 69 as a minor band. Fetal tau isoform was also strongly immunostained by antibody AD2 (Fig. 3).

The specificity of antibody 988 for PHF-tau was further investigated by Western blotting. Dephosphorylation of an immunoblotted AD brain homogenate with alkaline phosphatase totally abolished PHF-tau detection (Fig. 2).

**Antibody 988 in AD and other neurodegenerative disorders**

The typical pathological tau triplet (tau 55, tau 64, tau 69) associated with a characteristic vertical smear was mainly



**Fig. 4** Examples of lesions distribution in Brodmann's area 20 using antibody 988 in AD (A), Guamanian ALS/PDC (B), PSP (C, D), CBD (E) and PiD (F). Note the higher lesion density in the Guamanian case compared to the AD case and the differential laminar patterns in NFT distribution between these cases. In C and D, antibodies AD2 (C) and 988 (D) are compared. High densities of dystrophic neurites are visible in the CBD case (E), and in PiD, the Pick bodies as well as some swollen neurons are intensely stained (F). Scale bar = 100  $\mu$ m

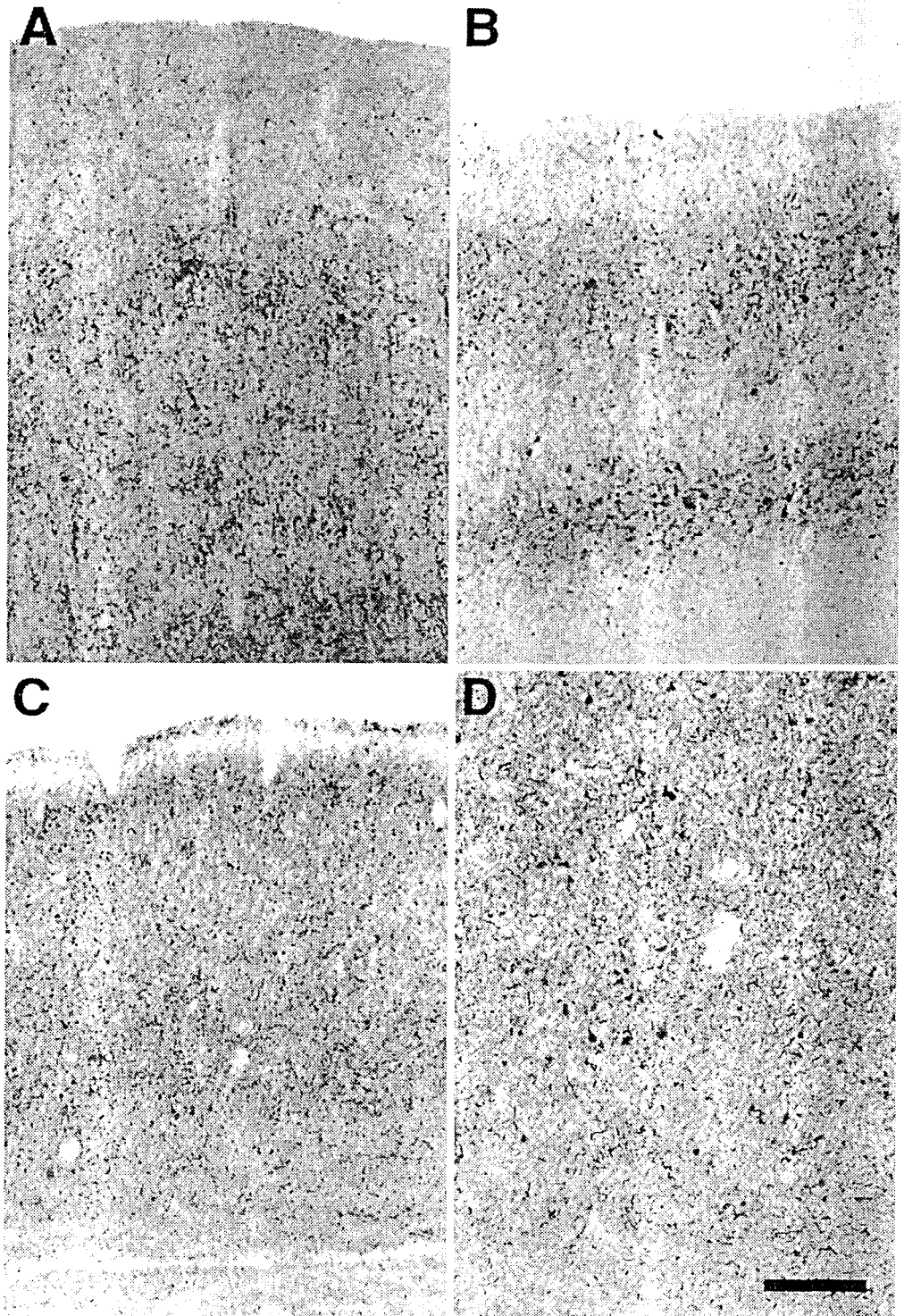
detected by antibody 988 in AD and DS brain homogenates. Immunoreactivity obtained with antibody AD2 was comparable. A pathological 69 and 64 kDa tau doublet was visualized by antibody 988 in PSP and CBD brain homogenates, and a tau 55 and 64 doublet was detected in PiD. The pattern of immunolabeling obtained with antibody AD2 was comparable but more intense. In PEP and Guamanian ALS/PDC, antibody 988 moderately detected the tau triplet, which was strongly labeled by antibody AD2. The tau 64 band was strongly labeled, in contrast to the weak labeling of tau 55 and tau 69 (Fig. 3).

#### Immunohistochemistry

In all of the neurodegenerative diseases analyzed, antibody 988 labeled NFT and dystrophic neurites (Figs. 4–5). In AD and DS, antibody 988 revealed the characteristic regional patterns of lesion distribution, with high densities of NFT in the hippocampus and in areas 9 and 20, and low densities in Brodmann's areas 17, 18, and 4. The laminar pattern of NFT was similar to that previously observed with antibody AD2, with a slightly higher localization in layers V and VI of association neocortical areas (Fig. 4A). The analysis of Guamanian ALS/PDC cases revealed a comparable pattern to that described with antibody AD2, with the typical preferential localization of NFT in layers II and III (Fig. 4B). PSP and PEP cases also showed NFT distribution patterns comparable to those seen with antibody AD2, with more stained NFT in supragranular layers than in infragranular layers (Figs. 4C–D). In PiD, Pick bodies were also strongly labeled in layers II and VI of the neocortex, and in the dentate gyrus, the pyramidal neurons of the CA1 field and subiculum, and in the entorhinal cortex (Fig. 4F). In both CBD (Fig. 4E) and PiD, some swollen neurons displayed a relatively faint immunoreactivity compared to the staining of dendrites and NFT. CBD and PSP cases had very high densities of dystrophic neurites in all of the layers of Brodmann's area 4 (Fig. 5), and swollen neurons were also encountered in this area. No labeling was obtained with antibody 988 in brains from control cases (data not shown).

While the patterns observed with antibody 988 corresponded generally to those previously described with antibody AD2 [6, 7, 9, 20, 21, 32], there were marked differences in the staining intensity of the lesions as well as in the numbers of labeled neurites and NFT in most cases. Qualitatively, antibody 988 yielded a considerably more intense staining of these lesions than antibody AD2, and overall, more lesions were labeled by antibody 988 than by antibody AD2. In fact, a qualitative survey of double labeling experiments revealed that in most cases, antibody 988 labeled a larger population of degenerative changes than did antibody AD2 (Fig. 6). In particular, NFT, neurites, and swollen neurons were always more intensely labeled with antibody 988 than with antibody AD2. Also, depending on the brain region, there were usually more NFT labeled with antibody 988 than antibody AD2, and dystrophic neurites were better identified with antibody

**Fig.5** Staining pattern in Brodmann's area 4 in PSP (A, B) and CBD (C, D). In PSP, antibody AD2 labels a population of dystrophic neurites (A), whereas antibody 988 intensely labels dystrophic neurites and NFT (B) with a distinct laminar pattern. In CBD, antibody 988 strongly labels NFT, swollen neurons and dystrophic neurites. Scale bar = 100  $\mu$ m (A-C) and 50  $\mu$ m (D)

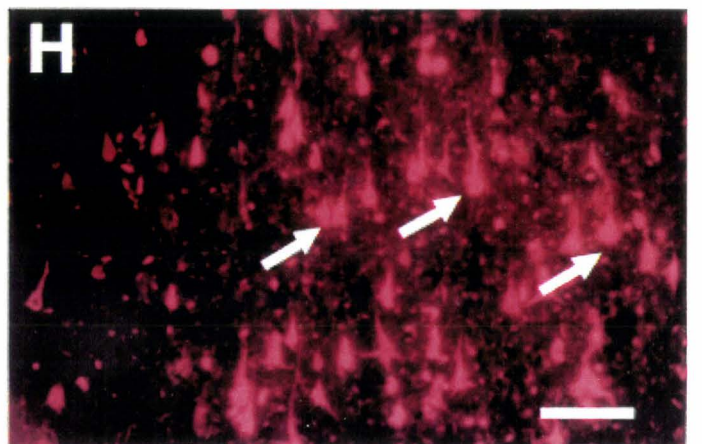
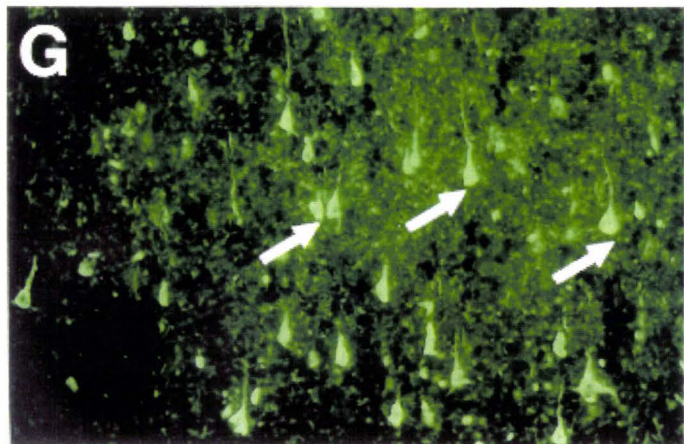
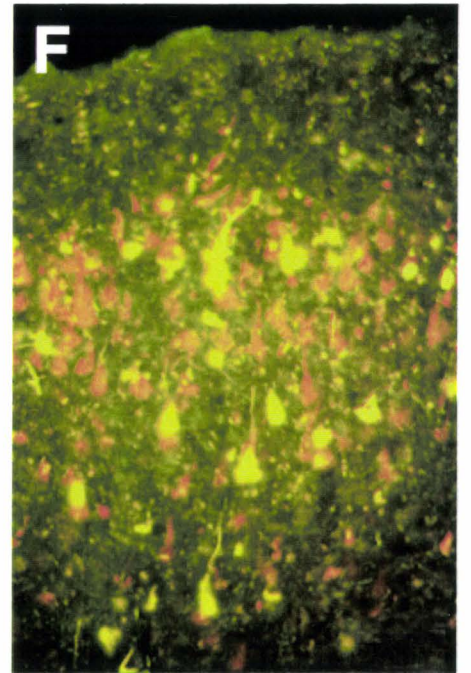
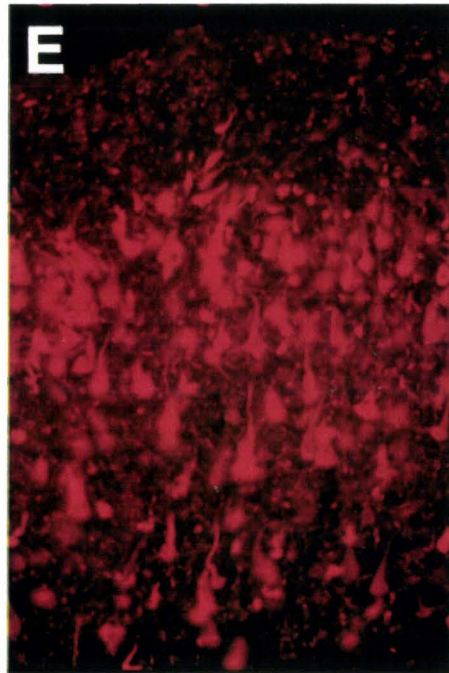
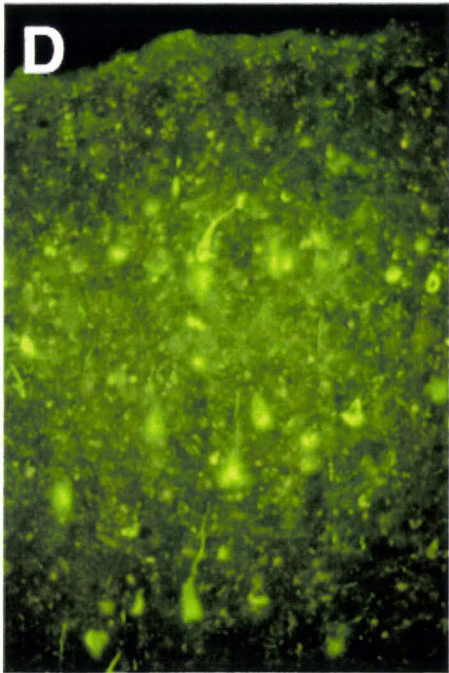
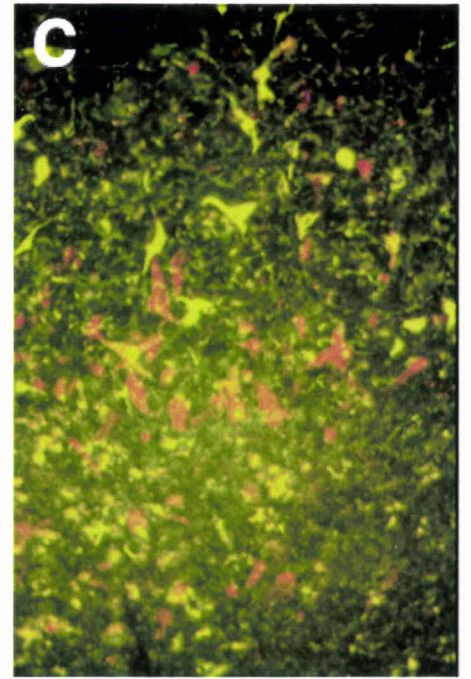
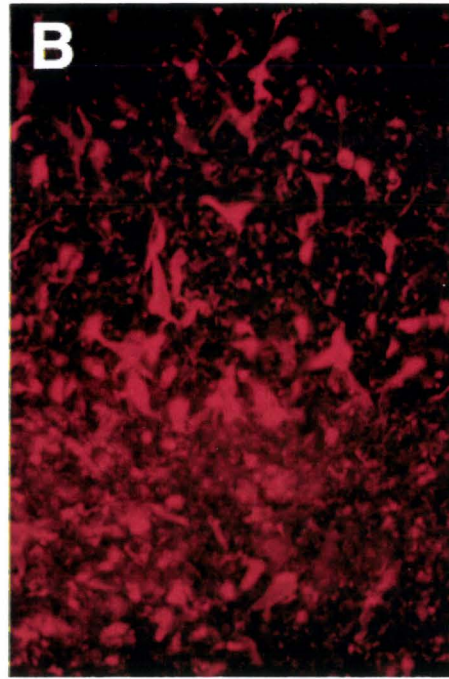
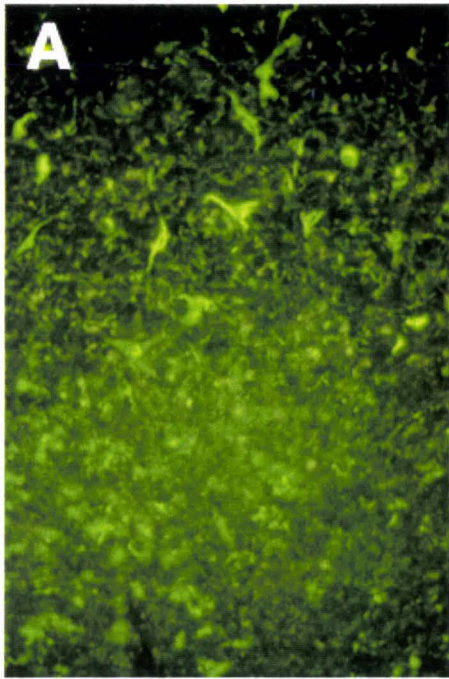


988. This was particularly visible in AD (Figs. 6A-C), Guamanian ALS/PDC (Figs. 6D-F), and PSP cases (Figs. 6H-I). In contrast, Pick bodies were labeled to a comparable degree by either antibodies.

### Discussion

In AD, phosphoserine 422 was demonstrated to be one of the most specific epitope of pathological PHF-tau pro-

**Fig.6** Double labeling with antibody AD2 (green fluorescence) and antibody 988 (red fluorescence) in layers II and III of the entorhinal cortex in a severe AD case (A-C), in layers II and III of Brodmann's area 20 in a Guamanian ALS/PDC case (D-F) and in layer III of Brodmann's area 20 of a PSP case (G-I). In all cases, there are usually slightly more NFT stained with antibody 988 than with antibody AD2, and a much higher density of dystrophic neurites are seen with antibody 988. This is particularly visible in panels C and F that are double exposure of the same photographic field (colocalization of antibody AD2 and antibody 988 appears yellow). In panels G and H, the arrows point to double labeled structures. Scale bar = 100  $\mu$ m



teins, when compared to normal brain tau proteins [6, 15]. However, this epitope has not been investigated in other neurodegenerative disorders with neuronal inclusions made of aggregated tau proteins. Using a new polyclonal antibody, we have analyzed biochemically and immunohistochemically the phosphorylation state of serine422 in AD, DS, PSP, CBD, PiD, Guamanian ALS/PDC and PEP, to validate the reliability of this biochemical marker of neurofibrillary degeneration.

The phosphorylation-dependence of antibody 988 has been first ascertained by checking that it does not bind to human non-phosphorylated recombinant tau isoform 2+3+10+. The specificity of antibody 988 was also investigated by using tau protein isoforms transiently transfected in COS cells and treated with okadaic acid. Previous studies have demonstrated that such tau proteins acquire some of the features of tau from PHF, as hyperphosphorylation and presence of AD-type phosphorylated epitopes [7, 30]. Thus, our results clearly demonstrate that okadaic acid treatment generates, in all exon-specific isoforms transfected in COS-7 cells, the formation of an epitope detected by 988 that corresponds to the phosphorylation of serine422. This epitope was not detected in non-treated transfected cells. Furthermore, treatment of immunoblotted AD brain homogenates by alkaline phosphatase and consecutive disappearance of labeling clearly demonstrates that antibody 988 specifically recognizes the phosphorylated epitope.

The specificity of antibody 988 was tested against tau proteins from normal brain obtained at autopsy. Considering that these proteins are dephosphorylated during the post-mortem delay, no detection of such proteins with antibody 988 was expected. The labeling of a small fraction of fetal tau isoform or the absence of labeling of normal brain tau from biopsy-derived materials was in agreement with data previously described about this site [7, 16]. Since the amount of proteins loaded for these two later kinds of homogenates is sufficient for a strong immunodetection with monoclonal antibody AD2, we can ascertain that serine422 and serine396/serine404 are not phosphorylated to the same extent. This is particularly the case for tau proteins from biopsy homogenates which are not detected by antibody 988, while a tau triplet is strongly detected by antibody AD2. Our results indicate that serine422 is very weakly or not at all phosphorylated in native tau from the human brain, or is phosphorylated to an extent undetectable by Western blotting with the available antibodies.

The phosphorylated serine422 site was then investigated biochemically and immunohistochemically in AD, DS, PEP, Guamanian ALS/PDC, PSP, CBD, PiD, and compared to the well-described phosphorylated epitope serine396/serine404. Consequently, serine422 was found to be phosphorylated in all neurological disorders studied, and so, is not an exclusive marker of AD PHF-tau. Thus, pathological tau proteins are detected in total brain homogenates with antibody 988 as several bands ranging from 55 to 69 kDa in AD, DS, PEP, Guamanian ALS/PDC, and specific doublets in either CBD, PSP or PiD. A vertical

smear is detected by antibody AD2 and faintly labeled by antibody 988. Considering that highly insoluble and aggregated forms of PHF-tau are major constituents of the smear, whereas well-defined bands are constituted by less aggregated components, we can suggest that phosphorylated serine422 is more largely distributed in less aggregated components of tau-PHF.

Furthermore, NFT and numerous dystrophic neurites were revealed immunohistochemically by antibody 988, in all cases analyzed. Neuritic staining was particularly intense in AD, Guamanian ALS/PDC and PSP when compared to NFT. The laminar distribution patterns of 988-immunoreactive lesions differ among neurodegenerative diseases. For instance, neuronal populations in layers V and VI are preferentially marked in AD, and a typical preferential localization of NFT within layers II and III is present in Guamanian ALS/PDC. According to these patterns, our results suggest that tau protein isoforms phosphorylated on serine422 are expressed in different neuronal subpopulations, as previously described for other phosphorylated sites [3, 29]. The polyclonal antibody 988 is more efficient than the monoclonal antibody AD2 in staining the lesions of neurofibrillary degeneration on tissue sections. Conversely, a reversed ratio is described in Western blotting with a stronger detection of pathological tau proteins by AD2. It could be argued that the AD2 epitope, involving two distinct residues, became more easily detectable in immunoblotted denatured tau proteins when compared to tau proteins aggregated into PHF. The labeling of Pick bodies by antibody 988 is of particular interest since these lesions are not stained by all phosphorylation-dependent anti-tau antibodies. For instance, tau proteins aggregated in Pick bodies can not be visualized by the monoclonal antibody 12E8 directed against the phosphorylated serine262 residue [9, 32]. Thus, our present results reveal the phosphorylation of the serine422 residue in Pick bodies. Finally, electrophoretic profiles obtained from total brain homogenates with antibody 988, indicate that the different tau protein isoforms are phosphorylated on serine422, independently of the disease. Therefore, phosphorylation of the serine422 residue alone seems to be sufficient to generate the tau-PHF specific epitope recognized by antibody 988. In this way, this site is different from other phosphorylated epitopes, which usually require phosphorylation of at least two proximal amino acids. For example, the PHF-tau specific epitope recognized by AT100 requires a complex, sequential phosphorylation of several sites by two kinases. Zheng-Fischhöfer and colleagues have recently demonstrated that the AT100 epitope is generated by a primary phosphorylation of serine199, serine202 and threonine205, followed by phosphorylation of threonine212 by glycogen synthase kinase  $\beta$ , and finally of serine214 by protein kinase A [35]. In addition, the generation of the AT100 epitope requires a specific conformation of tau induced by polyanions such as heparin or RNA. Nevertheless, the AT100 epitope is also observed in Guamanian ALS/PDC [29] and PSP [33], suggesting that the phosphorylation and conformation modifications described above are a common feature of

pathological PHF-tau and are not specific of AD PHF-tau. Conversely, serine422 is a single phosphorylation site. Protein kinases involved in its phosphorylation are MAP kinases. Stress-activated protein kinases (SAPKs) SAPK1 $\gamma$ , SAPK2a, SAPK2b, SAPK3 and SAPK4 are more particularly involved, since they could phosphorylate recombinant tau at serine422, as demonstrated by Goedert and colleagues [14]. Our present observations and previous data demonstrate that a similar phosphorylation process occurs on tau protein isoforms in all neurodegenerative disorders.

In conclusion, the present results indicate that phosphorylated serine422 is not a specific marker for AD PHF-tau. Phosphorylation of serine422 residue is a common biochemical modification of tau proteins aggregated into PHF, straight or random coiled filaments, that are the molecular components of neuronal inclusions described in several neurodegenerative disorders. Finally, phosphorylated serine422 is a useful marker that differentiates pathological tau proteins from normal tau proteins.

**Acknowledgements** This work was supported by INSERM, CNRS and NIH grant AG05138. T.B. is the recipient of a fellowship from the Conseil Régional du Nord-Pas de Calais and the Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille. C.M. is the recipient of a fellowship from the French Research Ministry. We thank Ms C. Soulié for technical assistance in the immunization procedure, and Dr M. Goedert for providing recombinant tau proteins and cDNAs clones for tau isoforms.

## References

1. Andreadis A, Brown WM, Kosik KS (1992) Structure and novel exons of the human-tau gene. *Biochemistry* 31: 10626–10633
2. Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, Van Hoesen GW (1991) The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cereb Cortex* 1: 103–116
3. Buée-Scherrer V, Buée L, Hof PR, Leveugle B, Gilles C, Loerzel AJ, Perl DP, Delacourte A (1995) Neurofibrillary degeneration in amyotrophic lateral sclerosis/ parkinsonism-dementia complex of Guam – Immunohistochemical characterization of tau proteins. *Am J Pathol* 146: 924–932
4. Buée-Scherrer V, Condamines O, Mourton-Gilles C, Jakes R, Goedert M, Pau B, Delacourte A (1996) AD2, a phosphorylation-dependent monoclonal antibody directed against tau proteins found in Alzheimer's disease. *Mol Brain Res* 39: 79–88
5. Buée-Scherrer V, Hof PR, Buée L, Leveugle B, Vermersch P, Perl DP, Olanow CW, Delacourte A (1996) Hyperphosphorylated tau proteins differentiate corticobasal degeneration and Pick's disease. *Acta Neuropathol* 91: 351–359
6. Buée-Scherrer V, Buée L, Leveugle B, Perl DP, Vermersch P, Hof PR, Delacourte A (1997) Pathological tau proteins in postencephalitic parkinsonism: comparison with Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Ann Neurol* 42: 356–359
7. Cailliet-Boudin ML, Delacourte A (1996) Induction of a specific tau Alzheimer epitope in SY-5Y neuroblastoma cells. *NeuroReport* 8: 307–310
8. Delacourte A, Flament S, Dibe EM, Hublau P, Sablonnière B, Hemon B, Scherrer V, Défossez A (1990) Pathological proteins Tau 64 and 69 are specifically expressed in the somatodendritic domain of the degenerating cortical neurons during Alzheimer's disease: demonstration with a panel of antibodies against tau proteins. *Acta Neuropathol* 80: 111–117
9. Delacourte A, Sergeant N, Watzet A, Gauvreau D, Robitaille Y (1998) Vulnerable neuronal subsets in Alzheimer's and Pick's disease are distinguished by their tau isoform distribution and phosphorylation. *Ann Neurol* 43: 193–204
10. Feany MB, Dickson DW (1995) Widespread cytoskeletal pathology characterizes corticobasal degeneration. *Am J Pathol* 146: 1388–1396
11. Feany MB, Ksiezak-Reding H, Liu WK, Vincent I, Yen SHC, Dickson DW (1995) Epitope expression and hyperphosphorylation of tau protein in corticobasal degeneration: Differentiation from progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol* 90: 37–43
12. Goedert M, Jakes R (1990) Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J* 13: 4225–4230
13. Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Crowther RA, Vanmechelen E, Probst A, Gotz J, Burki K, Cohen P (1995) Molecular dissection of the paired helical filament. *Neurobiol Aging* 16: 325–334
14. Goedert M, Hasegawa M, Jakes R, Lawler S, Cuenda A, Cohen P (1997) Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases. *FEBS Lett* 409: 57–62
15. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlin M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM (1986) Microtubule-associated protein tau, a component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 261: 6084–6089
16. Hasegawa M, Jakes R, Crowther RA, Lee VMY, Ihara Y, Goedert M (1996) Characterization of mAb AP422, a novel phosphorylation-dependent monoclonal antibody against tau protein. *FEBS Lett* 384: 25–30
17. Hof PR, Perl DP, Loerzel AJ, Morrison JH (1991) Neurofibrillary tangle distribution in the cerebral cortex of parkinsonism-dementia cases from Guam – Differences with Alzheimer's disease. *Brain Res* 564: 306–313
18. Hof PR, Delacourte A, Bouras C (1992) Distribution of cortical neurofibrillary tangles in progressive supranuclear palsy – A quantitative analysis of six cases. *Acta Neuropathol* 84: 45–51
19. Hof PR, Charpiot A, Delacourte A, Buée L, Purohit D, Perl DP, Bouras C (1992) Distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques in the cerebral cortex in postencephalitic parkinsonism. *Neurosci Lett* 139: 10–14
20. Hof PR, Nimchinsky EA, Buée-Scherrer V, Buée L, Nasrallah J, Hottinger AF, Purohit DP, Loerzel AJ, Steele JC, Delacourte A, Bouras C, Morrison JH, Perl DP (1994) Amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex of Guam: Quantitative neuropathology, immunohistochemical analysis of neuronal vulnerability, and comparison with related neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol* 88: 397–404
21. Hof PR, Bouras C, Perl DP, Morrison JH (1994) Quantitative neuropathologic analysis of Pick's disease cases – Cortical distribution of Pick bodies and coexistence with Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 87: 115–124
22. Hof PR, Bouras C, Perl DP, Sparks DL, Mehta N, Morrison JH (1995) Age-related distribution of neuropathologic changes in the cerebral cortex of patients with Down syndrome – Quantitative regional analysis and comparison with Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 52: 379–391
23. Hof PR, Bussièrè T, Soulié C, Perl DP, Delacourte A (1997) Serine 422 phosphorylation of tau proteins in neurodegenerative disorders. *Brain Pathol* 7: 1109
24. Hoffmann R, Lee VMY, Leight S, Varga I, Otvos L (1997) Unique Alzheimer's disease paired helical filament specific epitopes involve double phosphorylation at specific sites. *Biochemistry* 36: 8114–8124

25. Jicha GA, Lane E, Vincent I, Otvos L, Hoffmann R, Davies P (1997) A conformation- and phosphorylation-dependent antibody recognizing the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 69: 2087-2095
26. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
27. Mann DMA, Prinja D, Davies CA, Ihara Y, Delacourte A, Défossez A, Mayer RJ, Landon M (1989) Immunocytochemical profile of neurofibrillary tangles in Down's syndrome patients of different ages. *J Neurol Sci* 92: 247-260
28. Matsuo ES, Shin RW, Billingsley ML, Vandevoorde A, O'Connor M, Trojanowski JQ, Lee VMY (1994) Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron* 13: 989-1002
29. Mawal-Dewan M, Schmidt ML, Balin B, Perl D, Lee VMY, Trojanowski JQ (1996) Identification of phosphorylation sites in PHF-tau from patients with Guam amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex. *J Neuropath Exp Neurol* 55: 1051-1059
30. Medina M, Garciarocha M, Padilla R, Perez M, Degarcini EM, Avila J (1996) Protein kinases involved in the phosphorylation of human tau protein in transfected COS-1 cells. *Biochim Biophys Acta* 1316: 43-50
31. Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Yoshida H, Titani K, Ihara Y (1995) Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J Biol Chem* 270: 823-829
32. Probst A, Tolnay M, Langui D, Goedert M, Spillantini MG (1996) Pick's disease: hyperphosphorylated tau protein segregates to the somatoaxonal compartment. *Acta Neuropathol* 92: 588-596
33. Schmidt ML, Huang R, Martin JA, Henley J, Mawal-Dewan M, Hurtig HI, Lee VMY, Trojanowski JQ (1996) Neurofibrillary tangles in progressive supranuclear palsy contain the same tau epitopes identified in Alzheimer's disease PHF-tau. *J Neuropath Exp Neurol* 55: 534-539
34. Sergeant N, Bussièrè T, Vermersch P, Lejeune JP, Delacourte A (1995) Isoelectric point differentiates PHF-tau from biopsy-derived human brain tau proteins. *NeuroReport* 6: 2217-2220
35. Zheng-Fischhöfer Q, Biernat J, Mandelkow EM, Illenberger S, Godemann R, Mandelkow E (1998) Sequential phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase-3 beta and protein kinase A at Thr212 and Ser214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filament-like conformation. *Eur J Biochem* 252: 542-552



### II-1-1-2- Discussion

Nous décrivons la production et la caractérisation d'un anticorps polyclonal de lapin spécifique des protéines tau, dirigé contre l'épitope sérine 422 phosphorylée (anticorps 988). Par une approche biochimique et immunohistochimique, nous

- démontrons que cet anticorps est dépendant de la phosphorylation.
- confirmons que l'épitope sérine 422 phosphorylée peut être généré *in-vitro* par traitement à l'acide okadaïque de cellules COS transfectées avec l'ADNc des isoformes de protéines tau.
- confirmons que la phosphorylation de l'épitope sérine 422 permet de distinguer les protéines tau pathologiques des protéines tau normales.
- démontrons que la phosphorylation de l'épitope sérine 422 ne permet pas de différencier les protéines tau pathologiques des différentes maladies neurodégénératives étudiées.

La phospho-dépendance de l'anticorps 988 est démontrée par l'absence d'immunomarquage du triplet des protéines tau-PHF, après déphosphorylation d'un homogénat de cerveau Alzheimer par la phosphatase alcaline. Par ailleurs, l'absence de marquage des protéines tau recombinantes non-phosphorylées, exprimées dans une souche bactérienne, conduit à la même conclusion.

L'anticorps 988 détecte les protéines tau produites par transfection, uniquement après traitement des cellules COS par l'acide okadaïque. Cet inhibiteur de phosphatase, spécifique des phosphatases 1 et 2A, provoque la formation d'épitopes de type Alzheimer sur les protéines tau (Medina *et al.*, 1995). Ainsi, des anticorps dirigés contre des sites hyperphosphorylés caractérisés dans les protéines tau-PHF vont détecter les épitopes générés *in-vitro*.

Nous démontrons donc que l'épitope sérine 422 phosphorylée peut être exprimé dans les 6 isoformes de protéines tau, après transfection transitoire des ADNc correspondants dans les cellules COS et traitement de celles-ci par l'acide okadaïque.

Un autre travail réalisé au sein du laboratoire avec Mademoiselle Christel Mailliot, étudiante en thèse, montre que dans la même lignée cellulaire, l'épitope de l'anticorps AT100 peut être généré de façon similaire (Mailliot *et al.*, 1998). Ce travail décrit également la mise en évidence de cet épitope dans la lignée de neuroblastome humain SY5Y, en utilisant toujours les mêmes conditions expérimentales. Sachant que l'épitope sérine 422 avait déjà été mis en évidence dans les cellules de neuroblastome SY5Y, à l'aide de l'anticorps AP422 (Caillet-Boudin et Delacourte, 1996), nous disposons donc de deux systèmes cellulaires au sein desquels peuvent être exprimés deux des épitopes spécifiques des protéines tau-PHF.

Ces modèles sont particulièrement intéressants pour étudier les kinases impliquées dans l'hyperphosphorylation des protéines tau, une des modifications caractéristique de la dégénérescence neuronale de type Alzheimer. La mise en évidence récente de la phosphorylation séquentielle de l'épitope de AT100 par la GSK-3 $\beta$  et la pKA permet de dire que ces deux kinases sont présentes dans les systèmes cellulaires décrits. Concernant le site sérine 422, nous n'avons pu mettre en évidence de phosphorylation par la GSK-3 $\beta$ . Sachant que la phosphorylation de ce site par les SAP kinases a été démontrée *in-vitro*, il serait intéressant de confirmer ce résultat *in-vivo*, dans nos systèmes cellulaires.

L'absence d'immunomarquage observée en western-blot avec les homogénats de prélèvements cérébraux biopsiques confirme les données antérieures décrivant une phosphorylation spécifique des protéines tau pathologiques sur le résidu sérine 422. La phosphorylation sur un double site ne semble donc pas être un préalable indispensable à la formation des épitopes de type Alzheimer, contrairement à ce qui est suggéré par Hoffmann (Hoffmann *et al.*, 1997). Des données récentes iraient dans le même sens que nos résultats en attribuant au site sérine 409 la même spécificité que celle de la sérine 422 (Jicha *et al.*, 1998).

La phosphorylation de la sérine 422 est une caractéristique générale des protéines tau pathologiques. Nous retrouvons en effet ce site dans toutes les maladies neurodégénératives étudiées. Le profil électrophorétique obtenu avec l'anticorps polyclonal 988 est semblable à celui obtenu avec la plupart des anticorps anti-tau dépendants de la phosphorylation. Un triplet de bandes tau55, tau64, tau69 est visualisé dans le syndrome de Down, le syndrome de l'île de Guam et le Parkinson post-encéphalitique. Un doublet tau64, tau69 est visualisé dans la PSP et la DCB, ou un doublet tau64, tau55 dans la maladie de Pick.

La phosphorylation de la sérine 422 ne permet donc pas de distinguer les différentes pathologies neurodégénératives entre elles. Cette propriété étant retrouvée avec l'anticorps monoclonal AT100 (Mawal-Dewan *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1996), il n'existe pas actuellement de marqueurs caractérisant les protéines tau pathologiques de la MA, et uniquement celles-ci, tout en les différenciant des protéines tau normales adultes.

### **II-1-2- Epitope sérine433/sérine435 phosphorylées**

Les résultats concernant la spécificité de phosphorylation du résidu sérine 422 dans les protéines tau-PHF nous ont amené à étudier les sites phosphorylables situés plus en aval, vers l'extrémité carboxy-terminale de la molécule de protéine tau. Deux résidus de sérine sont en effet situés en position 433 et 435, selon la numérotation de l'isoforme la plus longue.

Dans ce but, nous avons entrepris la production d'anticorps monoclonaux en utilisant pour immunogène deux peptides de synthèse correspondant à la séquence 428-441 des protéines tau. L'un des peptides est phosphorylé sur le résidu de sérine 435 (ser435P) uniquement, le deuxième étant phosphorylé sur les résidus de sérine 433 et 435 simultanément (ser433P/ser435P). Ce dernier peptide, doublement phosphorylé, a été choisi

afin de vérifier l'hypothèse de Hoffmann et collaborateurs concernant la présence de deux résidus phosphorylés au sein des épitopes spécifiques des protéines tau-PHF.

Une seule fusion a été réalisée, avec la rate d'une souris immunisée avec le peptide doublement phosphorylé.

#### II-1-2-1- Immunisation des souris et caractérisation des sérums:

Pour chacun des deux peptides utilisés (ser435P et ser433P/ser435P), une série de 10 souris est injectée toutes les trois semaines avec des doses de 100µg d'équivalent peptide couplé à la KLH. Sur l'ensemble des 20 souris immunisées, trois sont sélectionnées d'après la caractérisation par biochimie et par immunohistochimie des immunosérums prélevés après la deuxième injection (saignée 1). Une des trois souris est immunisée avec le peptide simplement phosphorylé et les deux autres sont immunisées avec le peptide doublement phosphorylé. Par la suite, elles seront notées respectivement "souris ou sérum 171", "souris ou sérum 180" et "souris ou sérum 183".

Le titre des immunosérums est estimé par western-blot, et la spécificité est étudiée par ELISA.

Le sérum des trois souris est testé en western-blot contre un homogénat total de cerveau Alzheimer. Pour les faibles dilutions (1/1000 et 1/10000), les trois sérums détectent les 6 isoformes de protéine tau, mais marquent également les protéines tau pathologiques phosphorylées et l'ensemble de la piste de migration électrophorétique sous forme d'une traînée. Ce dernier marquage est conservé pour des dilutions plus fortes (1/50000 et 1/100000), ce qui indiquerait qu'il s'agit d'un marquage spécifique des structures insolubles de la DNF, et non d'un marquage aspécifique dû à un titre élevé des sérums (figure 4).

L'intensité de l'immunoréactivité des sérums en fonction de leur dilution permet de déterminer approximativement le titre en anticorps, défini comme la dilution donnant un signal

équivalent à la moitié du signal maximal. Ainsi, le titre des sérums 171 et 180 estimé à 1/10000, et celui du sérum 183 à 1/50000 (figure 4). Il convient de noter que la définition du titre du sérum ici utilisée est arbitraire, et n'a pour seul objectif que de déterminer la souris présentant la meilleure réponse immunitaire contre le peptide d'immunisation.

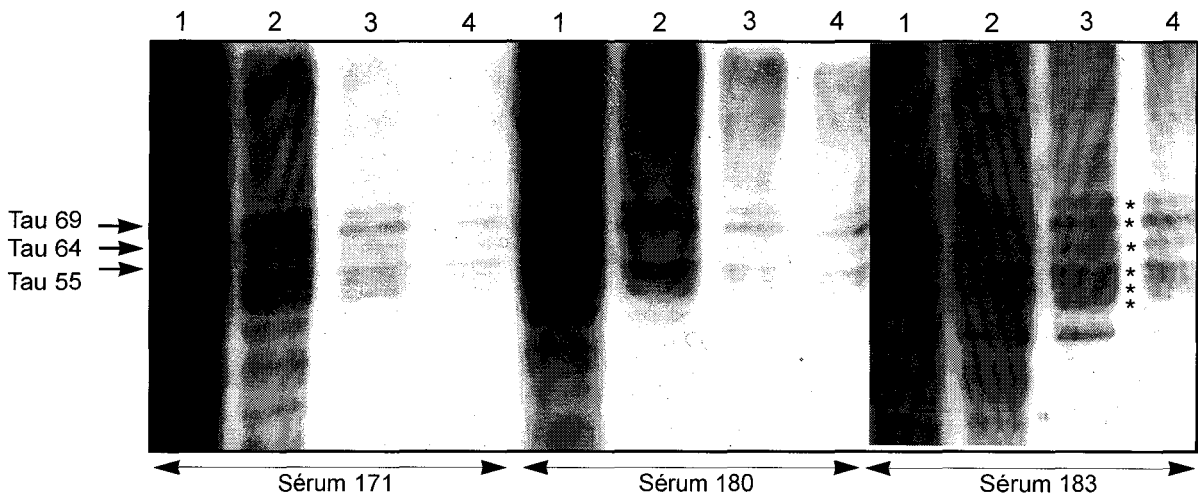
L'immunoréactivité des sérums vis-à-vis des protéines tau pathologiques d'une part, et des protéines tau normales autopsiques ou biopsiques d'autre part, permet de déterminer leur spécificité. Cette analyse est réalisée par un protocole ELISA direct dans lequel les protéines sont adsorbées sur les plaques de microtitration, à partir d'homogénats totaux de cerveaux ou de prélèvements biopsiques.

Les résultats obtenus mettent en évidence une spécificité faible ou nulle des immunosérums (saignée 3). Seul le sérum 180 (ser433P/ser435P) semble distinguer les protéines tau pathologiques des protéines tau normales, mais cette donnée doit être modérée par le niveau faible du signal détecté, comparativement aux deux autres sérums. De plus, cette spécificité n'est pas confirmée en western-blot, puisque les trois sérums, employés à la même dilution de 1/5000, détectent des quantités sensiblement équivalentes de protéines tau recombinantes non-phosphorylées (figure 5).

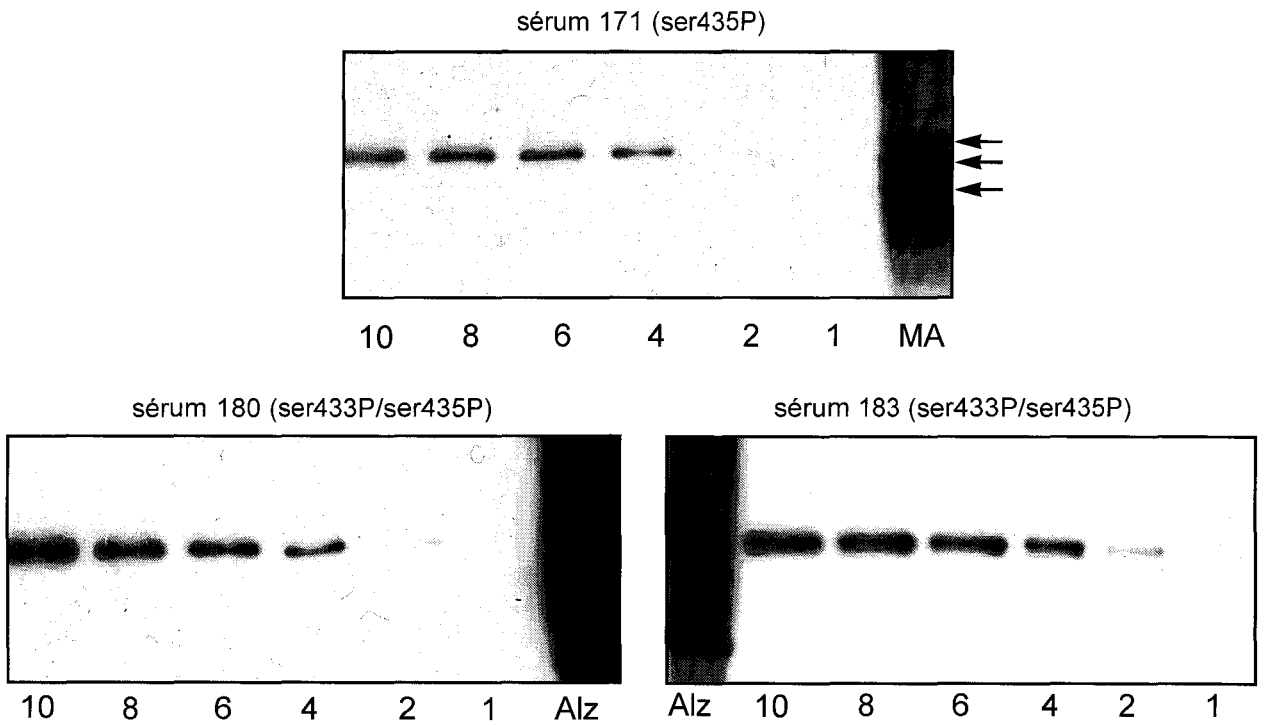
L'absence de spécificité décrite pour les trois sérums ne signifie pas que les anticorps monoclonaux obtenus après fusion ne seront pas spécifiques de l'épitope phosphorylé ser433P/ser435P. Les immunosérums étant polyclonaux, nous considérons en effet que, par définition, ils peuvent contenir plusieurs types d'anticorps, dépendants de la phosphorylation ou non.

#### II-1-2-2- Fusion et criblage des clones

Une seule fusion a été réalisée, avec la rate de la souris 180 immunisée avec le peptide doublement phosphorylé ser433P/ser435P. Les splénocytes obtenus par broyage de la rate



**Figure 4: Caractérisation des sérums des souris 171, 180, 183.**  
 (A) Caractérisation par western-blot contre un homogénat total de cerveau Alzheimer de la saignée 1 des souris 171, 180 et 183. Les sérums sont testés à des dilutions de 1/1000 (1), 1/10000 (2), 1/50000 (3) et 1/100000 (4). Les sérums 171 (immunisation ser435P), 180 et 183 (immunisation ser433P/ser435P) détectent les protéines Tau-PHF (Tau 69, 64, 55), les protéines tau normales (\*) et la traînée caractéristique des structures insolubles de la DNF.



**Figure 5: Caractérisation des sérums des souris 171, 180, 183.**  
 Les sérums dilués (1/5000) détectent les protéines tau recombinantes non-phosphorylés. Les quantités de protéines sont indiquées en ng. L'homogénat Alzheimer (Alz) est utilisé comme témoin positif pour l'immunoréactivité des sérums.

( $1,2 \cdot 10^8$  cellules) ont été fusionnés avec des cellules de myélomes X63Ag8 ( $2,5 \cdot 10^7$  cellules) et les hybridomes correspondants répartis dans 10 plaques de culture 96 puits recouvertes la veille avec des macrophages péritonéaux de souris.

550 surnageants d'hybridomes ont été criblés par un protocole ELISA avec révélation par luminescence. Les préclones positifs sont ensuite testés par western-blot et immunohistochimie.

Dans le screening par ELISA direct, les surnageants sont criblés simultanément contre un extrait de protéines tau-PHF adsorbé à  $10 \mu\text{g/ml}$ , contre le peptide d'immunisation couplé à la KLH adsorbé à  $4 \mu\text{g/ml}$ , et contre la KLH seule adsorbée à  $4 \mu\text{g/ml}$ . Cette dernière condition permet d'éliminer les clones sécrétant des anticorps spécifiques de la KLH, mais ne reconnaissant pas le peptide et donc les protéines tau. Les clones spécifiques des protéines tau pathologiques sont sélectionnés grâce à l'extrait protéique adsorbé. Les clones reconnaissant le peptide et ne détectant pas la KLH sont dirigés contre les protéines tau, sans préjuger de leur état de phosphorylation.

Les premiers essais réalisés pour valider le protocole ont montré que la quasi-totalité des surnageants donnaient un signal positif sur le peptide couplé à la KLH. Dans ces conditions, un grand nombre de préclones auraient été sélectionnés lors du screening primaire. Par contre, les préclones ayant une forte affinité pour le peptide peuvent être différenciés des autres par une dilution des surnageants correspondants d'un facteur 10. Ainsi, un signal élevé qui ne suit pas la dilution est caractéristique des clones positifs de haute affinité, alors qu'un signal qui suit la dilution et devient donc faible est caractéristique des clones de basse affinité, ou des clones non-spécifiques.

**Le screening primaire par ELISA a permis de sélectionner 25 préclones** répartis en:

- 6 préclones positifs uniquement sur le peptide phosphorylé,
- 14 préclones positifs sur le peptide et sur l'extrait de protéines tau-PHF,
- 5 préclones positifs sur le peptide, sur l'extrait protéique et sur la KLH.

Les surnageants de culture des 25 hybridomes sont ensuite testés en western-blot contre un homogénat total de cerveau Alzheimer (figure 6A), contre un homogénat total de cerveau témoin (figure 6B) et contre un homogénat total de prélèvement cérébral sain biopsique (figure 6C).

12 surnageants ne détectent aucune protéine tau, quel que soit le type d'homogénat, et parmi ceux-ci les 6 clones positifs uniquement sur le peptide en ELISA. Les 13 hybridomes restants sont positifs à la fois sur le peptide et l'extrait protéique en ELISA, ainsi que sur la KLH pour deux d'entre eux.

Un deuxième protocole en ELISA direct est utilisé pour tester les surnageants d'hybridomes contre 4 peptides :

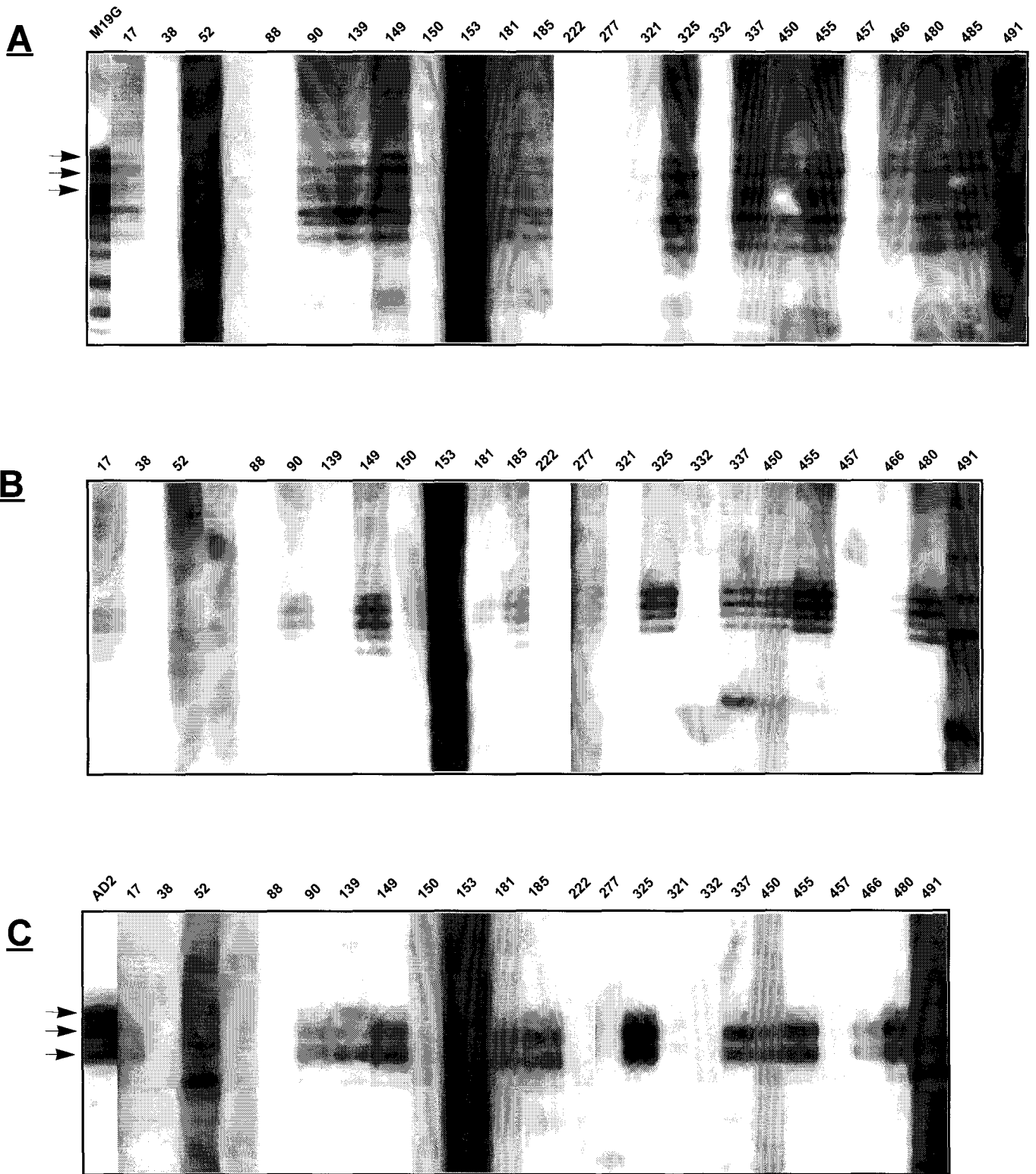
- le peptide phosphorylé sur les 2 résidus sérine 433 et sérine 435 ;
- le peptide phosphorylé uniquement sur le résidu sérine 435 ;
- le peptide phosphorylé uniquement sur le résidu sérine 433 ;
- le peptide non-phosphorylé.

Nous montrons ainsi que les 13 surnageants positifs en western-blot reconnaissent indifféremment les 4 peptides. Ces résultats indiqueraient donc que les anticorps produits sont spécifiques de la séquence peptidique 428-441, indépendamment de son état de phosphorylation.

Cette donnée est en accord avec les immunomarquages obtenus en western-blot :

- les protéines tau-PHF phosphorylées, les protéines tau natives phosphorylées ou les protéines tau normales déphosphorylées des homogénats de cerveaux sont détectées par les surnageants (figure 6A, B, C).
- l'isoforme longue 2+3+10+ des protéines tau exprimée par des cellules transfectées traitées ou non à l'acide okadaïque est détectée par les surnageants.





**Figure 6: Criblage des surnageants d'hybridomes.**  
 Les clones positifs en ELISA sont testés par western-blot contre un homogénat total de cerveau Alzheimer (A), contre un homogénat total de cerveau témoin (B), contre un homogénat total de prélèvement cérébral sain biopsique (C). Les immunomarquages avec les anticorps AD2 et M19G sont utilisés comme contrôles positifs, pour visualiser le triplet des protéines tau-PHF (A) ou des protéines tau natives phosphorylées (C) (notées par les flèches), ou les protéines tau normales. Les chiffres notés dans la partie supérieure des blots indiquent le numéro de clone.

Le marquage immunohistochimique obtenu avec les 13 surnageants d'hybridomes, sur coupes en congélation de cerveau Alzheimer, est essentiellement neuritique. De nombreuses plaques neuritiques et un réseau dense de neurites dystrophiques sont observés, alors que le nombre des neurones avec DNF marqués reste relativement limité.

**A l'issue du screening, 13 hybridomes positifs en ELISA, en western-blot et en immunohistochimie sont sélectionnés.**

Ces 13 préclones sont clonés par dilution limite, puis sont à nouveau testés selon le protocole ELISA en colorimétrie. L'expansion des clones sélectionnés est ensuite réalisée par injection en intra-péritonéal à des souris, préalablement pristanées, des hybridomes correspondants. Ceux-ci se développent sous forme de tumeur sécrétant un liquide d'ascite, caractérisé par une concentration importante de l'anticorps.

L'isotypage des anticorps, effectué à partir des surnageants de culture avec le kit d'isotypage Amersham, détermine exclusivement des immunoglobulines de classe et sous-classe G1. Les anticorps sont purifiés à partir du liquide d'ascite par chromatographie d'affinité avec la protéine A.

### II-1-2-3- Caractérisation des anticorps

L'épitope des anticorps produits est déjà connu, puisque le peptide ayant servi à l'immunisation des souris reprend à une séquence définie de la molécule de protéine tau. La caractérisation a donc pour objectif de déterminer la spécificité des anticorps vis-à-vis des différentes formes de protéines tau, phosphorylées et non-phosphorylées.

Seules les données de caractérisation de l'anticorps 149 seront illustrées car des résultats identiques ont été obtenus avec les autres anticorps.

### II-1-2-3-1- Caractérisation sur homogénats de cellules transfectées

L'isoforme 2+3+10+ des protéines tau est détectée par l'anticorps 149, sous les deux formes phosphorylée et non-phosphorylée. La détection du fragment carboxy-terminal PstI et l'absence de marquage du fragment amino-terminal BstXI sont logiquement obtenus, et permettent de valider une nouvelle fois les constructions (figure 7).

Ce résultat obtenu avec les anticorps purifiés reprend donc les données du screening obtenues avec les surnageants d'hybridomes. Il indique que la reconnaissance par ces anticorps de leur épitope est indépendante de son état de phosphorylation. Ce résultat est confirmé par la détection des protéines tau recombinantes non-phosphorylées.

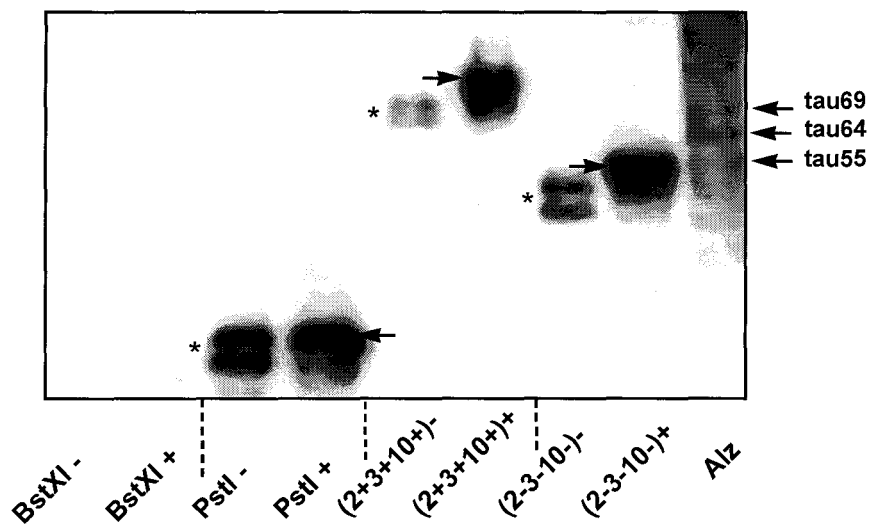
### II-1-2-3-2- Caractérisation sur prélèvements cérébraux

Aucune différence de marquage ne peut être décrite avec les anticorps purifiés par rapport aux surnageants d'hybridomes, sur les homogénats de cerveaux. L'ensemble des différentes formes phosphorylées et déphosphorylées de protéines tau sont par conséquent détectées (figure 8).

Le marquage immunohistochimique est également similaire, avec une détection préférentielle des lésions neuritiques, sur des coupes en congélation de cerveau Alzheimer (figure 9).

### II-1-2-4- Conclusion

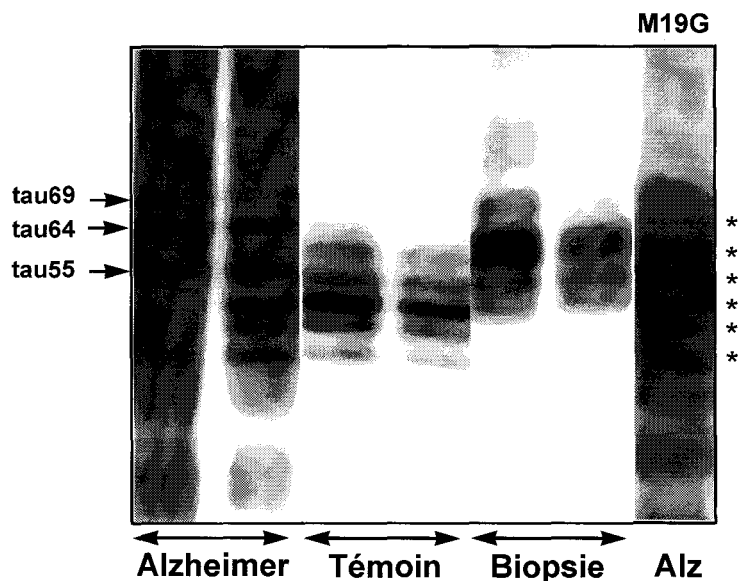
En développant de nouveaux anticorps monoclonaux spécifiques des deux résidus phosphorylés les plus carboxy-terminaux des protéines tau, nous avons pour objectif d'étudier l'implication potentielle de ces deux sites dans la transformation pathologique des protéines tau, au cours du processus neurodégénératif de la MA.



**Figure 7:** Caractérisation de l'anticorps monoclonal 149 sur homogénats de cellules transfectées.

Immunomarquage obtenu sur des homogénats de cellules COS transfectées avec les ADNc des fragments BstXI et PstI, et des isoformes de protéines tau (2+3+10+), (2-3-10-), traitées (+) ou non (-) à l'acide okadaïque.

L'anticorps 149 détecte le fragment PstI et les 2 isoformes testées, sous leur forme phosphorylée (flèche) et non-phosphorylée (\*). Le fragment BstXI, correspondant à la partie amino-terminale des protéines tau, n'est pas détecté. L'homogénat de cerveau Alzheimer (Alz) est utilisé comme témoin positif d'immunomarquage.



**Figure 8:** Caractérisation de l'anticorps monoclonal 149 sur homogénats cérébraux.

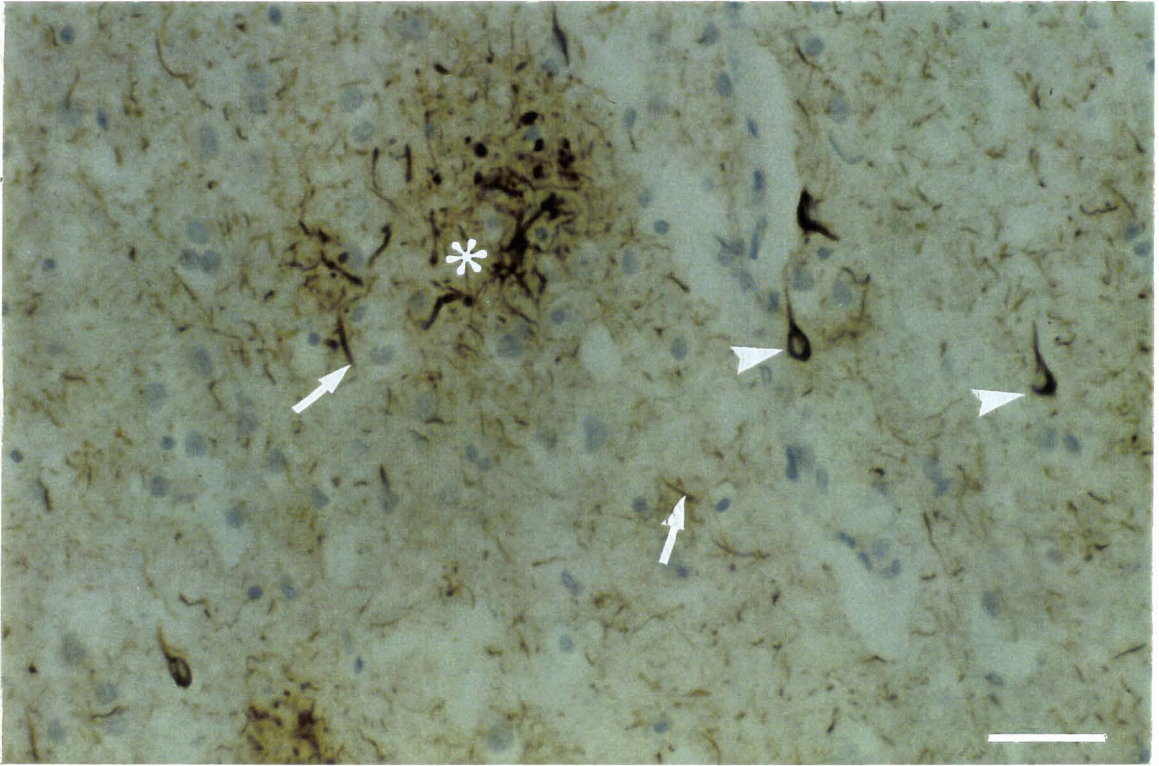
Immunomarquage obtenu sur des homogénats totaux de cerveaux de sujets Alzheimer, de sujets témoins et sur homogénats de prélèvements biopsiques.

L'anticorps 149 détecte les protéines tau indépendamment de leur état de phosphorylation. Les protéines tau phosphorylées pathologiques (triplet tau55, 64, 69) et les protéines tau normales sont détectées dans les homogénats Alzheimer. Les protéines tau phosphorylées biopsiques et les protéines tau normales déphosphorylées sont également détectées par l'anticorps. L'immunomarquage obtenu avec l'anticorps polyclonal M19G sur l'homogénat Alzheimer (Alz) permet de visualiser les protéines tau normales (\*).

**Figure 9:**

Immunomarquage obtenu avec l'anticorps monoclonal 149 sur coupe en congélation de cortex temporal de cerveau de patient Alzheimer.

Un réseau de fins neurites dystrophiques est observé (indiqué par les flèches), ainsi qu'un nombre important de plaques neuritiques (indiqué par l'astérisque). Quelques neurones avec DNF sont également marqués par l'anticorps (indiqués par les pointes de flèche). Révélation à la DAB et contre-coloration à l'Hemalun de Mayer. Echelle: 50  $\mu\text{m}$ .



Considérant les résultats obtenus, nous pouvons conclure que les 13 anticorps monoclonaux produits reconnaissent la séquence du peptide d'immunisation, indépendamment de l'état de phosphorylation des deux sites phosphorylables qu'elle contient. Ces anticorps ne nous permettent donc pas de déterminer l'état de phosphorylation des résidus de sérine 433 et 435 dans les protéines tau-PHF et/ou les protéines tau natives.

Par contre, cette absence de spécificité des anticorps pourrait être un avantage pour leur utilisation dans un protocole ELISA. Ils permettraient alors de capturer les protéines tau non-dégradées, ainsi que les fragments protéolytiques carboxy-terminaux, phosphorylés et déphosphorylés.

## **II-2- IMMUNISATION AVEC DES PROTEINES TAU-PHF**

Plusieurs protocoles expérimentaux d'extraction des protéines tau-PHF à partir d'un cerveau de patient Alzheimer ont été testés afin de préparer l'immunogène. De même, plusieurs méthodes d'immunisation et de production d'anticorps monoclonaux ont été utilisées au cours de notre projet. Cependant, certaines de ces techniques n'ayant pas donné de résultats exploitables ne seront pas développées dans notre exposé.

Nous avons en particulier employé un kit d'immunisation *in-vitro* pour deux fusions. Dans ce type de protocole, l'antigène est mis au contact de cellules présentatrices d'antigène pendant 3 à 4 jours, et n'est plus injecté à des souris. Après cette période d'incubation, les cellules présentatrices sont fusionnées avec des cellules de myélomes.

Dans les deux fusions réalisées, nous n'avons pas obtenu de clones sécrétant des anticorps contre notre antigène tau-PHF. Par contre, de très nombreux clones sécréteurs d'anticorps anti-GFAP ont été produits. Nous pensons donc que ce type de protocole peut être intéressant dans la mesure où l'antigène d'immunisation est relativement pur. Si l'antigène d'intérêt est minoritaire dans la préparation utilisée pour sensibiliser les cellules présentatrices d'antigène, nos résultats semblent montrer que la probabilité d'obtenir un clone sécrétant un anticorps spécifique de cet antigène est faible.

### **II-2-1- Antigène**

L'antigène utilisé pour immuniser les souris est préparé selon le protocole décrit par Mercken et collaborateurs (1992), modifié du protocole initial de Greenberg et Davies (1990)(figure 10A).

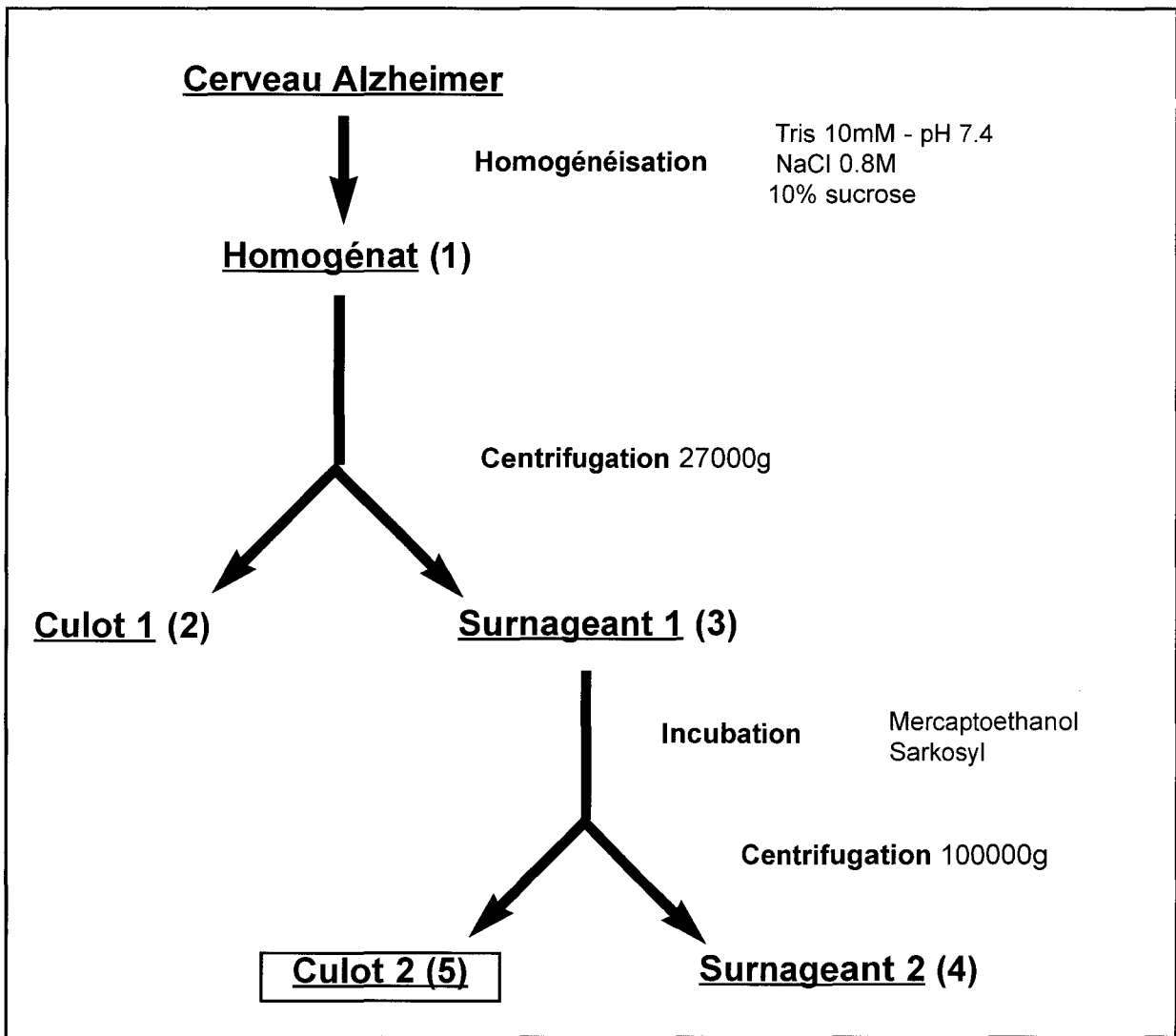
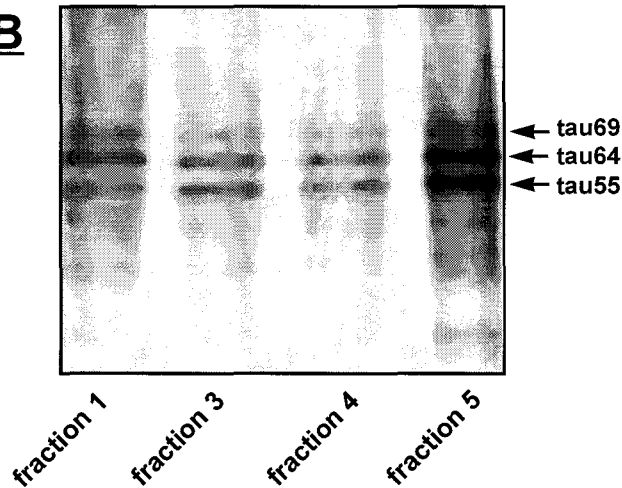


Un prélèvement de cortex frontal d'un cerveau Alzheimer, disséqué de façon à récupérer principalement la substance grise corticale, est homogénéisé dans un tampon Tris - NaCl contenant du sucrose. Une première ultracentrifugation permet d'éliminer dans le culot les principaux contaminants protéiques, et de récupérer environ 50% de l'immunoréactivité des protéines tau-PHF dans le surnageant. Celui-ci est repris dans une solution contenant un détergent et un agent réducteur. Les protéines tau-PHF étant insolubles dans un tel tampon peuvent être précipitées par ultracentrifugation. Le culot ainsi obtenu, repris en PBS, constitue la préparation antigénique injectée aux souris.

Les différentes fractions du protocole d'extraction sont déposées sur gel d'électrophorèse pour être caractérisées par immunoempreintes, avec des anticorps de référence (figure 10B). Une coloration au bleu de Coomassie permet également de vérifier que les contaminants protéiques majeurs, présents dans l'homogénat de départ, ont été éliminés de la fraction finale, puisque celle-ci n'est plus colorée par le bleu de Coomassie. Néanmoins, l'anticorps monoclonal AD2 détecte dans cette fraction une immunoréactivité constituée par le triplet des protéines tau-PHF et la traînée caractéristique des structures agrégées et insolubles (figure 10B; fraction 5). De plus, l'anticorps monoclonal M19G détecte l'ensemble des protéines tau et montre une absence de dégradation protéolytique au cours des différentes étapes de l'extraction.

La proportion des protéines tau par rapport aux protéines totales de la préparation est estimée par une méthode ELISA, sachant que la concentration en protéines totales est d'environ 2 mg/ml.

Une courbe standard est réalisée en adsorbant sur plaque de microtitration des concentrations connues de protéines tau recombinantes purifiées. L'anticorps polyclonal M19G est utilisé comme anticorps traceur, et les complexes protéines tau recombinantes / anticorps M19G formés sont détectés par chimioluminescence, grâce à un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. Le même protocole est utilisé pour la préparation antigénique, en adsorbant sur la plaque des quantités connues de protéines totales. Le signal luminescent détecté est uniquement dû aux complexes formés entre l'anticorps M19G et les

**A****B****Figure 10: Extraction des protéines tau-PHF.**

(A) Protocole d'extraction des protéines tau-PHF à partir d'un cerveau Alzheimer (les chiffres entre parenthèses indiquent les fractions qui sont ensuite caractérisées par western-blot).

(B) Immunomarquage obtenu avec l'anticorps monoclonal AD2 sur les différentes fractions issues de l'extraction. La fraction 5 est utilisée comme antigène d'immunisation.

protéines tau présentes dans la préparation adsorbée. La quantité de protéines tau, déterminée par rapport à la gamme de protéines tau recombinantes, est estimée à 0,04% des protéines totales de la préparation antigénique.

Il est important de noter que cette valeur est une estimation, et doit être considérée comme telle. Nous ne pouvons en effet affirmer que les protéines tau recombinantes et les protéines tau de la préparation s'adsorbent sur la plaque avec le même rendement. Il paraîtrait même logique que les protéines tau recombinantes purifiées s'adsorbent plus facilement que les protéines tau-PHF présentes en solution avec d'autres protéines.

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

### **II-2-2-1- Production des anticorps**

#### **II-2-2-1-1- Immunisation des souris**

Une série de 10 souris est injectée toutes les 3 semaines avec des doses d'antigène de 100 $\mu$ g de protéines totales. Une première sélection est faite d'après les caractéristiques des immunosérums prélevés après la troisième injection. Trois souris sont retenues et recevront ultérieurement deux nouvelles doses d'antigène (ces 3 souris seront désignées par la suite "souris 154", "souris 156" et "souris 158").

#### **\* Caractérisation des immunosérums par western-blot:**

Le sérum de la souris 154 testé contre un homogénat de cerveau Alzheimer présente une immunoréactivité vis-à-vis du triplet des protéines tau-PHF et des produits de dégradation des protéines tau. Il marque également la traînée associée aux agrégats insolubles. Enfin, un marquage intense de la GFAP est observé. Une augmentation du titre du sérum est observée après la 6<sup>ième</sup> injection, c'est-à-dire à la saignée 5 (figure 11A).

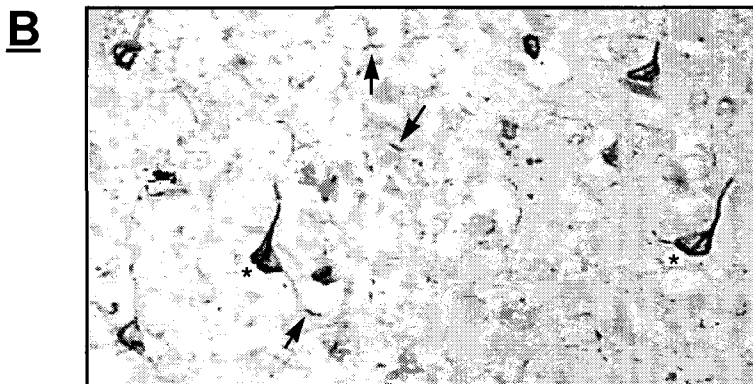
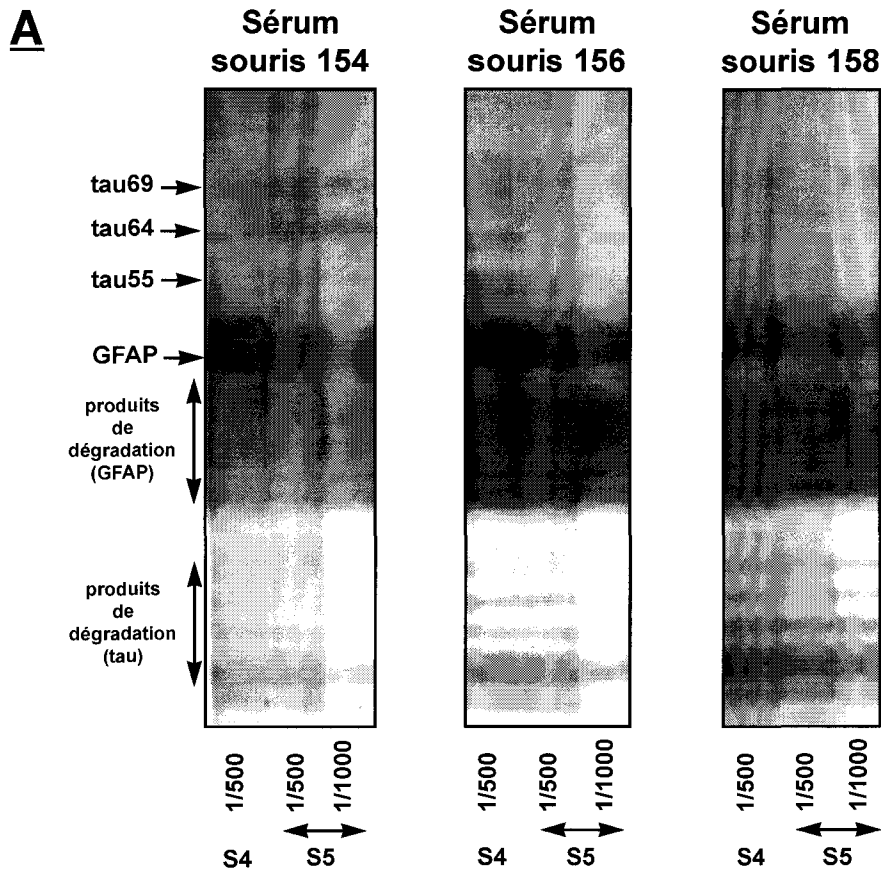
Le sérum de la souris 158 présente le même profil d'immunoréactivité, mais avec une détection moins intense du triplet et une détection plus importante des produits de dégradation des protéines tau (figure 11A).

Le sérum de la souris 156 détecte l'ensemble des protéines tau pathologiques et normales. L'immunoréactivité vis-à-vis de la GFAP est semblable à celle déjà décrite pour les autres sérums (figure 11A).

Un immunomarquage important de la GFAP est donc obtenu avec les 3 immunsérums. Ce résultat met en évidence la forte antigénicité de la GFAP, protéine dont la concentration augmente lors de la réaction gliale se produisant dans la MA (Delacourte et Buée, 1989). Ainsi, dans l'un des protocoles de préparation d'antigène que nous avons testé, l'électroélution sélective des protéines tau-PHF à partir de gels d'électrophorèse permettait d'éliminer la GFAP. Aucune immunoréactivité n'était en effet détectée dans les fractions éluées, par western-blot avec un anticorps monoclonal spécifique de la GFAP. Cependant, lors de l'injection de ces mêmes fractions aux souris, une réponse immunitaire contre la GFAP était inévitablement développée. Ceci laisse supposer que de simples traces de cette protéine au sein de la préparation injectée sont suffisantes pour déclencher la production d'anticorps spécifiques.

#### \* Caractérisation des immunsérums par immunohistochimie:

Les différentes composantes de la dégénérescence neurofibrillaire sont marquées de façon équivalente par les immunsérums des trois souris sélectionnées. Des dilutions de sérum jusqu'à 1/2000 donnent un marquage correct des neurones dégénérés, des neurites dystrophiques et des plaques neuritiques, sur des coupes en congélation de cerveau Alzheimer (figure 11B).



**Figure 11: Caractérisation des sérums des souris 154, 156, 158.**

**(A)** Caractérisation par western-blot contre un homogénat total de cerveau Alzheimer des saignées 4 (S4) et 5 (S5) des souris 154, 156 et 158. Les sérums sont testés à la dilution de 1/500 et 1/1000. L'immunomarquage des protéines tau-PHF et des produits de dégradation des protéines tau est de faible intensité, comparativement à l'immunomarquage de la GFAP.

**(B)** Immunomarquage obtenu avec le sérum de la souris 156 sur coupe en congélation de cerveau Alzheimer et révélation à la DAB. L'immunsérum marque les neurones avec DNF (\*) et les neurites dystrophiques (indiqués par une flèche).

Trois fusions ont été réalisées dans le cadre des immunisations avec les protéines tau-PHF. Une vingtaine d'anticorps monoclonaux ont été obtenus, mais tous les clones sont issus de la fusion faite avec la rate de la souris 156. Les fusions effectuées avec la rate des souris 154 et 158 n'ont donné que peu de résultats et ne seront donc pas développées.

Le boost de la souris 156 est effectué 3 jours avant la fusion par injection intraveineuse d'une dose d'antigène reprise en PBS.

La numération des splénocytes, consécutive à l'excision et au broyage de la rate, donne une valeur de  $1,2 \cdot 10^8$  cellules, fusionnées avec  $2,4 \cdot 10^7$  cellules de myélomes X63Ag8. Les hybridomes correspondants sont ensemencés dans 12 plaques de 96 puits recouvertes la veille avec des macrophages péritonéaux de souris. Le rendement de la fusion est faible, avec 450 préclones criblés par un protocole ELISA en chimioluminescence. Les clones positifs sont ensuite testés par western-blot et immunohistochimie.

Trois paramètres sont étudiés pour la validation du protocole ELISA de screening:

- *les conditions d'adsorption des protéines sur les plaques de microtitration:* l'insolubilité des protéines tau-PHF devant être adsorbées rend nécessaire l'utilisation de SDS (5%) dans le tampon d'homogénéisation des prélèvements cérébraux. Le pourcentage final de détergent n'excède pas 0,01% après dilution de l'homogénat dans le PBS. Nous avons néanmoins vérifié l'absence d'interférence du détergent avec l'adsorption des protéines tau-PHF.

- *la spécificité du signal détecté:* la non-détection des réactions antigène-anticorps aspécifiques est vérifiée en utilisant une vingtaine d'anticorps monoclonaux ou de surnageants de culture d'hybridomes irrelevants. Par ailleurs, l'existence d'une corrélation entre l'immunoréactivité mesurée et la concentration de l'anticorps AD2 utilisé comme anticorps traceur est un autre argument en faveur d'une spécificité correcte du test.

- *la sensibilité de détection du test:* les complexes antigène-anticorps formés peuvent être détectés par colorimétrie ou par luminescence, par l'intermédiaire de l'anticorps

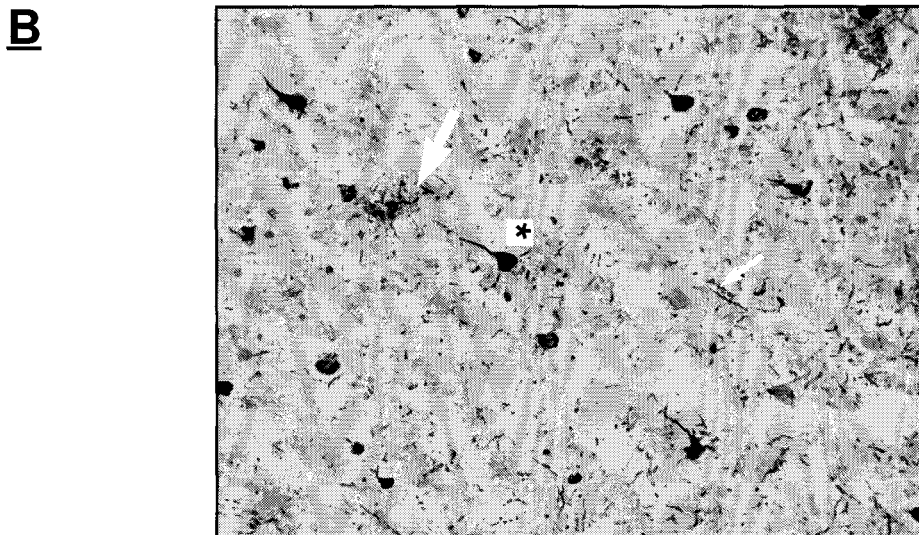
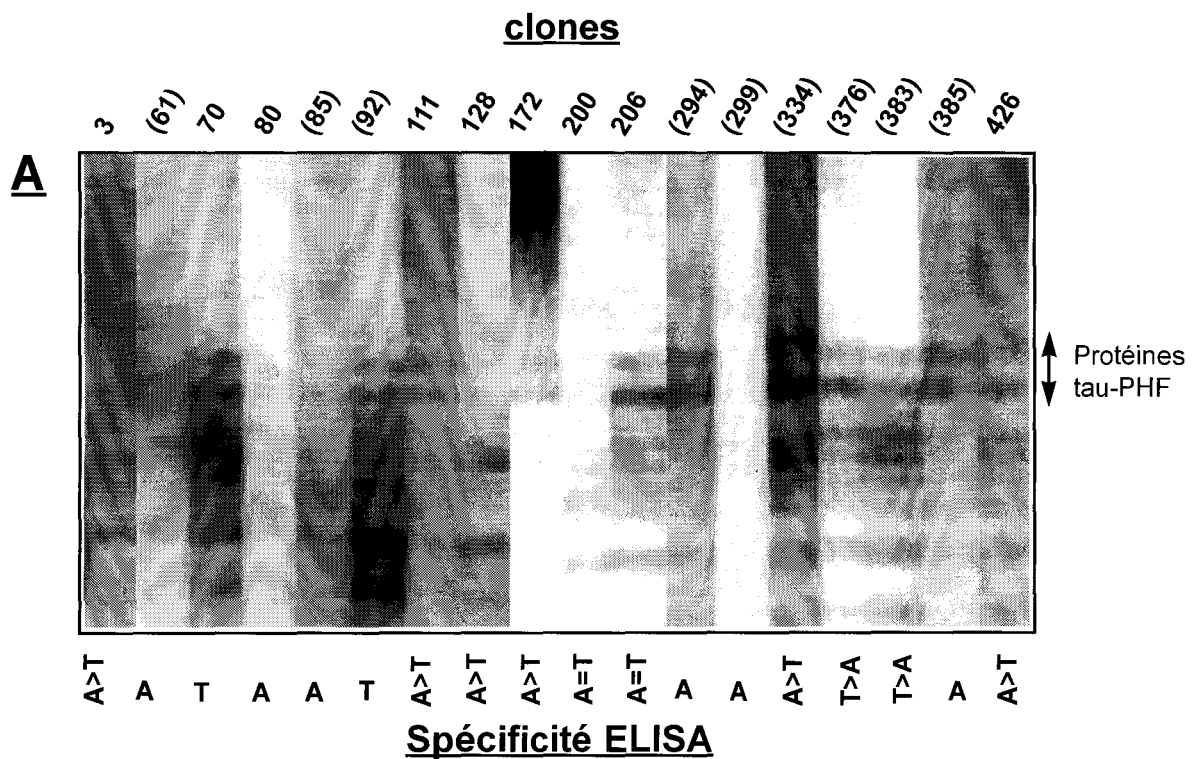
secondaire couplé à la peroxydase. Cependant, l'utilisation d'un substrat luminescent autorisant une quantification du signal sur une gamme de valeurs étendue, et la discrimination du signal s'en trouvant donc très nettement améliorée, nous avons choisi la luminescence pour le criblage des clones. Pour tester les clonages, nous utilisons la colorimétrie, puisque la réponse attendue est alors uniquement qualitative, et non quantitative.

**Le screening primaire par ELISA**, criblant les surnageants contre un homogénat Alzheimer comparativement à un homogénat témoin, **permet de sélectionner 19 préclones** dont la répartition selon la spécificité est:

- 5 préclones reconnaissent spécifiquement l'homogénat Alzheimer,
- 8 préclones reconnaissent mieux l'homogénat Alzheimer que l'homogénat témoin,
- 2 préclones reconnaissent autant l'homogénat Alzheimer que l'homogénat témoin,
- 4 préclones reconnaissent mieux l'homogénat témoin que l'homogénat Alzheimer.

**18 de ces 19 préclones** (1 clone ayant été perdu) **donnent un immunomarquage en western-blot**, lorsque les surnageants sont testés contre un homogénat Alzheimer. Plusieurs types de profils électrophorétiques sont obtenus, avec en particulier **13 préclones reconnaissant les protéines tau pathologiques**. La composante tau 69 du triplet est cependant peu ou pas détectée (figure 12A). La validité du test ELISA utilisé pour le screening primaire est donc confirmée, puisque ces 13 préclones correspondent aux deux premières catégories décrites auparavant.

**10 préclones, parmi les 18 positifs en western-blot, donnent un immunomarquage des lésions cérébrales caractéristiques de la dégénérescence neurofibrillaire** (neurones avec DNF, neurites dystrophiques et plaques neuritiques), sur coupes congelées de cerveau Alzheimer (figure 12B).



**Figure 12: Criblage des surnageants d'hybridomes de la fusion 156.**

**(A)** Criblage par western-blot contre un homogénat total de cerveau Alzheimer des clones positifs en ELISA. 13 surnageants détectent les protéines tau pathologiques, ainsi que la traînée caractéristique des structures insolubles de la DNF pour certains d'entre eux. L'absence de marquage avec le clone 299 n'a pas été confirmée par la suite et le profil obtenu est alors du même type que celui du 385. Le clone 343, positif, n'apparaît pas sur la figure. La spécificité ELISA est indiquée: «A>T»: signal supérieur sur homogénat Alzheimer; «A»: signal uniquement sur homogénat Alzheimer; «T»: signal faible sur homogénat Alzheimer; «A=T»: signal équivalent sur homogénats Alzheimer et témoin; «T>A»: signal supérieur sur homogénat témoin. Les hybridomes qui seront ensuite clonés sont notés entre parenthèses.

**(B)** Immunomarquage obtenu avec le surnageant 385 sur coupe en congélation de cerveau Alzheimer et révélation à la DAB. Les neurones avec DNF sont notés (\*), les neurites dystrophiques par une petite flèche et les plaques neuritiques par une grande flèche.



Enfin, **16 préclones sont conservés à l'issue du screening secondaire par western-blot.**

Les 16 préclones sélectionnés sont à nouveau testés en western-blot, contre deux homogénats différents de cerveaux Alzheimer, deux homogénats de cerveaux témoin et deux homogénats de prélèvements cérébraux sains biopsiques. Les préclones peuvent ainsi être classés en 4 catégories, en fonction du profil électrophorétique obtenu (figure 13).

⇒ Les clones 61, 85, 299 et 385 constituent la catégorie 1. Les anticorps qu'ils produisent détectent les homogénats Alzheimer sous forme d'une traînée et ne donnent pas de marquage spécifique sur les autres homogénats.

L'ensemble des lésions de dégénérescence neurofibrillaire sont marquées par ces 4 surnageants, sur coupes congelées de cerveau Alzheimer.

⇒ Les anticorps sécrétés par le clone 294 (catégorie 2) détectent la traînée et le triplet caractéristique des protéines tau-PHF pathologiques dans les homogénats Alzheimer. Ils détectent également le triplet des protéines phosphorylées des homogénats biopsiques.

Les lésions de DNF sont visualisées avec cet anticorps.

⇒ Les clones 343 et 376 représentent la catégorie 3, qui comprend également les clones 128, 200 et 206. Les anticorps produits détectent les protéines tau normales et donnent un marquage du triplet des protéines tau-PHF dans les homogénats Alzheimer.

Aucun marquage n'est obtenu sur coupes en congélation de cerveau Alzheimer.

⇒ Enfin, les clones 70, 92 et 383 forment le dernier groupe (catégorie 4). Ils détectent les protéines tau phosphorylées dans les homogénats biopsiques et Alzheimer, ainsi que les protéines tau déphosphorylées des homogénats témoins. Les fragments protéolytiques sont également reconnus par ces trois anticorps.

Seul l'anticorps 92 marque les lésions de DNF.

**Figure 13: Classification des anticorps monoclonaux issus du screening.**

Les surnageants d'hybridomes sont testés en western-blot sur 2 homogénats de cerveaux Alzheimer (A1 et A2), 2 homogénats de cerveaux témoin (T1 et T2) et 2 prélèvements cérébraux sains biopsiques (B1 et B2). Pour l'immunohistochimie, les surnageants sont testés sur coupes en congélation de cerveau Alzheimer.

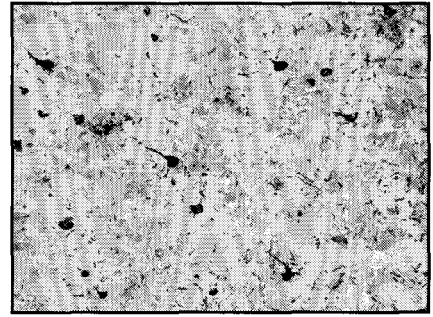
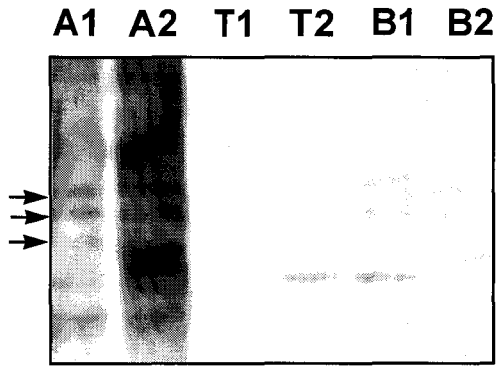
**Classe 1:** les anticorps de cette catégorie, représentés par le clone 385, détectent la traînée et le triplet des protéines tau-PHF (noté par les flèches) dans les homogénats Alzheimer. Aucun marquage n'est décrit dans les homogénats de tissu cérébral sain. Les neurones avec dégénérescence neurofibrillaire, les neurites dystrophiques et les plaques neuritiques sont marqués sur coupes congelées de cerveau Alzheimer.

**Classe 2:** l'anticorps 294 détectent parfaitement la traînée et le triplet des protéines tau-PHF dans les homogénats Alzheimer, et le triplet des protéines tau phosphorylées dans les homogénats cérébraux sains biopsiques (\*). Le marquage sur coupes congelées de cerveau Alzheimer est comparable à celui du clone 385.

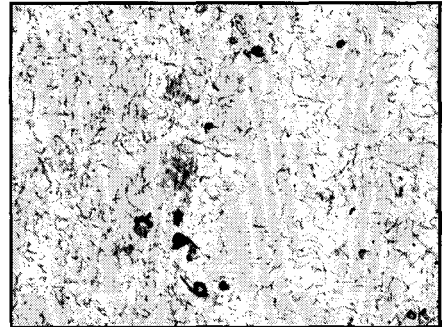
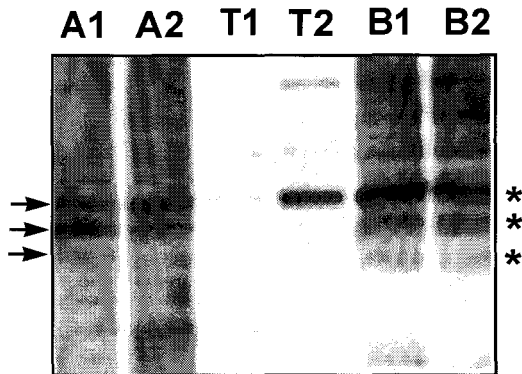
**Classe 3:** les anticorps de cette catégorie, représentés par les clones 343 et 376, détectent le triplet des protéines tau-PHF, mais pas la traînée. Les protéines tau normales sont également détectées. Aucun marquage des lésions de DNF n'est obtenu sur coupes congelées de cerveau Alzheimer.

**Classe 4:** les anticorps produits par les clones de cette catégorie détectent les protéines tau phosphorylées des homogénats Alzheimer et des homogénats cérébraux sains biopsiques. Les protéines tau déphosphorylées des homogénats de tissu sain autopsiques sont également détectées, ainsi que les produits de dégradation. L'anticorps 92 marque essentiellement des neurites dystrophiques et des plaques neuritiques, ainsi que quelques neurones avec DNF, sur coupes congelées de cerveau Alzheimer.

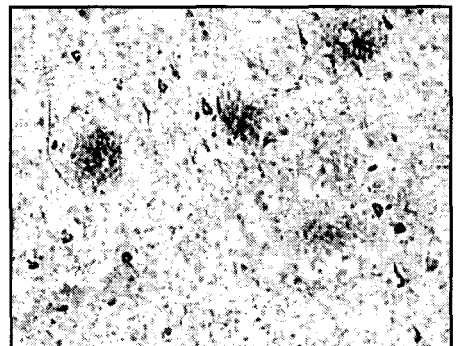
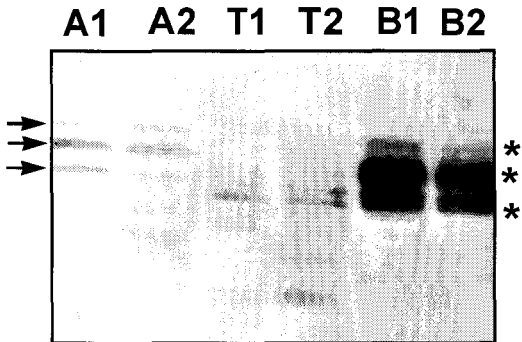
**Classe 1**  
**Clone 385**  
**(61, 85, 299)**



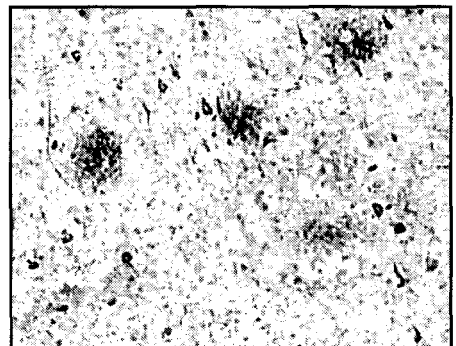
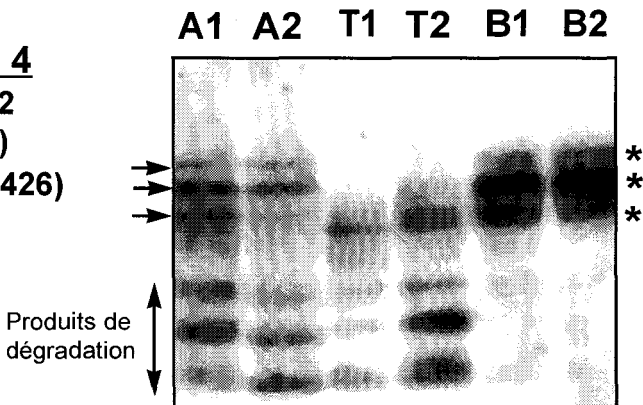
**Classe 2**  
**Clone 294**



**Classe 3**  
**Clone 343, 376**  
**(128, 200, 206)**



**Classe 4**  
**Clone 92**  
**(70, 383)**  
**(3, 334, 426)**



Les clones 3, 334 et 426 sont rattachés à cette catégorie, puisque le profil électrophorétique des anticorps qu'ils produisent est très proche de celui des autres clones de cette classe.

A ce stade de la caractérisation des surnageants, nous avons choisi de restreindre à 8 le nombre des clones étudiés. Les clones des catégories 1 et 2 sont conservés dans notre sélection, compte-tenu de leur spécificité vis-à-vis des protéines tau-PHF. Pour chacune des autres classes que nous avons définies, un ou deux anticorps seulement sont caractérisés.

**Les 8 préclones sont clonés par dilution limite**, puis sont à nouveau testés selon le protocole ELISA en colorimétrie. L'expansion des clones sélectionnés est réalisée par la technique de l'ascite précédemment décrite.

L'isotypage des anticorps, effectué à partir des surnageants de culture avec le kit d'isotypage Amersham, détermine une immunoglobuline de classe M (clone 294) et 7 immunoglobulines de classe G1. Les anticorps sont purifiés à partir du liquide d'ascite par chromatographie d'affinité avec la protéine A pour les IgG1 ou par gel filtration pour l'IgM.

#### II-2-2-2- Caractérisation des anticorps

##### **II-2-2-2-1- Classe 1: anticorps 61, 85, 299 et 385**

###### a- Caractérisation sur homogénats de cellules transfectées

Les ADNc des isoformes de protéines tau humaines 2-3-10-, 2+3-10-, 2-3-10+ et 2+3+10+ sont transfectés dans des cellules COS n'exprimant pas ces protéines de manière constitutive. Ce système cellulaire permet d'étudier la participation éventuelle des séquences

peptidiques transcrites à partir des exons 2, 3 et 10 dans la formation de l'épitope des anticorps en cours de caractérisation.

De plus, comme cela a déjà été décrit pour la caractérisation de l'anticorps polyclonal 988 dirigé contre le résidu de sérine 422, il est possible d'obtenir une hyperphosphorylation des protéines tau traduites après transfection des ADNc correspondants, et donc formation d'épitopes de type Alzheimer. Les cellules COS transfectées sont alors traitées à l'acide okadaïque (250 nM), inhibiteur des phosphatases 1 et 2A.

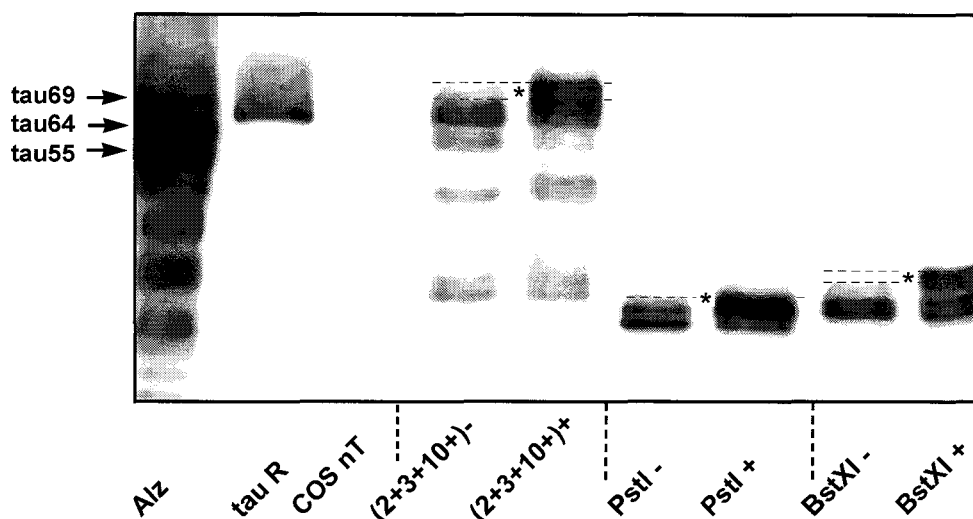
Enfin, il est possible de transférer des ADNc " tronqués ", à partir desquels ne seront traduits que des fragments de protéines tau. Les fragments PstI et BstXI que nous utilisons correspondent respectivement aux séquences peptidiques (1-49 liguée avec 246-441) et (1-224). Comme pour les isoformes entières, les cellules transfectées avec ces ADNc tronqués peuvent être traitées à l'acide okadaïque afin d'obtenir des fragments de protéines tau phosphorylées (figure 14).

Le volume déposé sur les gels d'électrophorèse est ajusté pour chacun des homogénats cellulaires, afin d'avoir une quantité équivalente de protéines tau dans tous les puits. Une telle vérification est nécessaire pour conclure qu'une différence de marquage est due à un état de phosphorylation différent des protéines tau testées, et non à une différence de quantité de protéines.

Les résultats de western-blot obtenus avec les anticorps 61, 85, 299 et 385 indiquent que:

- la reconnaissance par ces anticorps des protéines tau produites par transfection est liée au traitement préalable des cellules par l'acide okadaïque. Les protéines tau produites par des cellules non-traitées sont peu ou pas reconnues (figure 15).

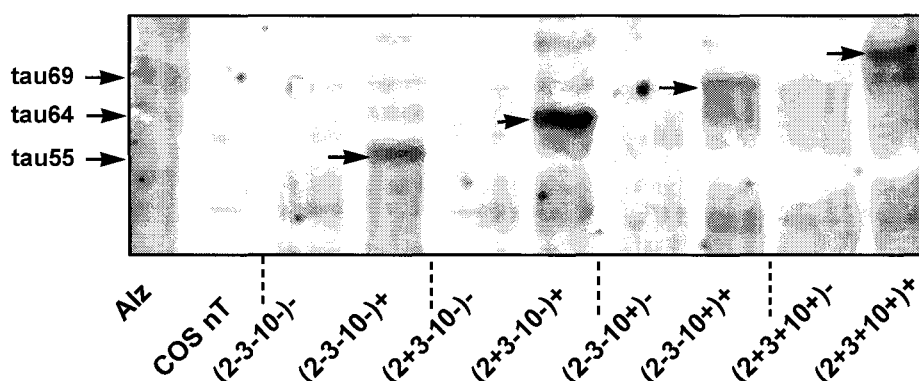
- la reconnaissance des protéines tau par ces anticorps est indépendante de la présence des exons 2, 3 et 10.



**Figure 14: Caractérisation des fragments de protéines tau PstI et BstXI.**

Les ADNc correspondant aux séquences peptidiques partielles (1-49 + 246-441) et (1-224), ou totale (1-441), et notés respectivement PstI, BstXI et (2+3+10+) sont transfectés transitoirement dans des cellules COS. Les homogénats cellulaires sont déposés sur gel d'électrophorèse 10% SDS-PAGE et l'immunomarquage est effectué avec l'anticorps polyclonal M19G spécifique de la séquence peptidique 1-19 des protéines tau.

Après traitement des cellules à l'acide okadaïque (+), les protéines tau ou les fragments de protéines tau présentent une migration électrophorétique réduite (\*) par rapport aux protéines tau ou fragments produits dans les cellules non-traitées (-). Aucun marquage n'est obtenu dans les cellules COS non transfectées (COS nT). L'immunomarquage obtenu sur l'isoforme longue recombinante (tau R) (2+3+10+) ou sur un homogénat total de cerveau Alzheimer (triplet tau-PHF) est utilisé pour contrôle.



**Figure 15: Caractérisation de l'anticorps monoclonal 385.**

Immunomarquage obtenu sur des homogénats de cellules COS transfectées avec les ADNc des isoformes de protéines tau (2-3-10-), (2+3-10-), (2-3-10+) et (2+3+10+).

Seules les protéines tau produites par les cellules traitées à l'acide okadaïque (+) sont détectées par l'anticorps 385. La spécificité du marquage est vérifiée avec un homogénat de cellules COS non-transfectées (COS nT), pour lequel l'anticorps ne détecte aucune protéine.

- seul le fragment PstI produit par des cellules traitées à l'acide okadaïque est reconnu par les anticorps 85, 299 et 385. L'anticorps 61 ne détecte aucun des deux fragments PstI ou BstXI, même lorsque les cellules transfectées sont traitées à l'acide okadaïque.

Le fait que la reconnaissance des protéines tau produites par transfection soit indépendante des séquences codées par les exons 2, 3 et 10 signifie que l'épitope des anticorps est situé en dehors de ces séquences. De plus, l'absence de détection du fragment BstXI restreint la localisation possible de l'épitope à la partie carboxy-terminale du fragment PstI, soit la séquence peptidique 246-441. Enfin, la détection des protéines produites par transfection étant conditionnée par un traitement préalable des cellules à l'acide okadaïque, les épitopes possibles sont limités aux seuls résidus phosphorylables. Ce dernier résultat est étayé d'autre part par l'absence de reconnaissance des protéines tau recombinantes non-phosphorylées.

Compte-tenu de la spécificité de détection de l'anticorps déjà mise en évidence lors du screening, nous pourrions envisager, à ce stade de la caractérisation, un épitope formé par le résidu de sérine 422.

La non-détection des fragments PstI et BstXI par l'anticorps 61 n'est pas incompatible avec une localisation carboxy-terminale de son épitope. Nous pouvons en effet supposer l'existence d'un épitope phosphorylé et conformationnel qui serait détruit lors du clivage de la protéine par les enzymes de restriction, d'où l'absence de détection du fragment PstI. Jicha et collaborateurs ont déjà décrit ce type de spécificité, liée à un épitope conformationnel, pour l'anticorps Alz50 (Jicha *et al.*, 1997). Ils démontrent en effet que l'épitope de cet anticorps monoclonal est constitué de 2 parties distinctes de la protéine, séparées par environ 300 résidus d'acides aminés. La reconnaissance de l'épitope par l'anticorps nécessite l'intégrité de la protéine et serait la conséquence de l'adoption d'une conformation particulière, vraisemblablement intramoléculaire.

**L'utilisation des cellules COS transfectées avec les ADNc des protéines tau, ou de fragments de protéines tau, nous permet donc d'envisager un épitope**

**phosphorylé carboxy-terminal pour les anticorps 85, 299 et 385, et peut-être également pour l'anticorps 61.**

#### b- Caractérisation sur prélèvements cérébraux

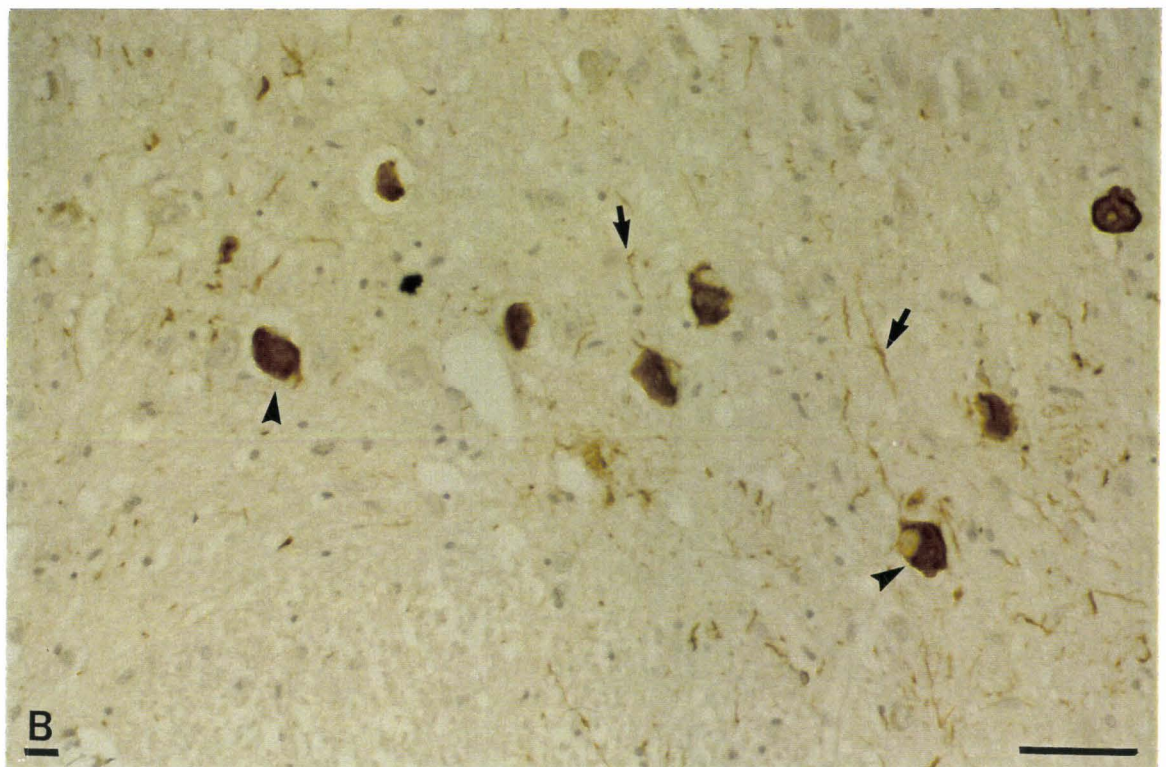
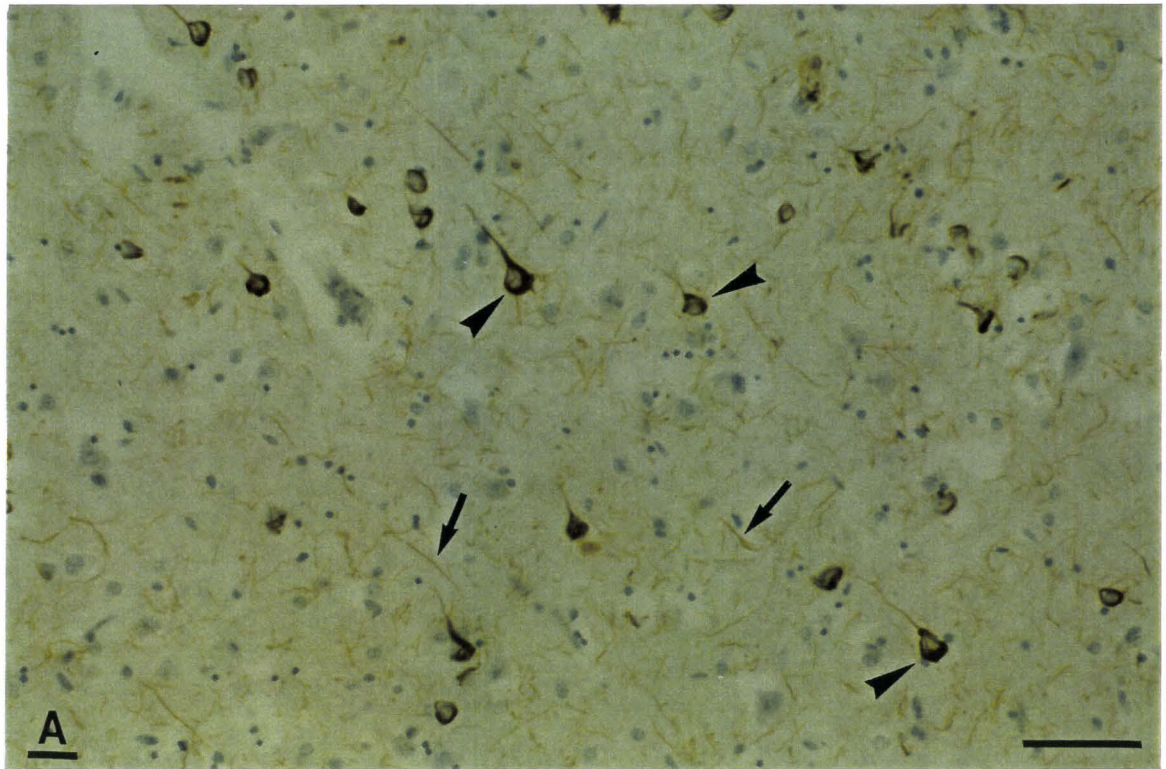
Les anticorps 61, 85, 299 et 385 sont caractérisés par la technique des immunoempreintes, après électrophorèse d'homogénats totaux de cerveaux Alzheimer, de cerveaux témoins et de prélèvements cérébraux sains biopsiques. Les anticorps détectent exclusivement le triplet des protéines tau-PHF phosphorylées et la traînée caractéristique des structures insolubles de la DNF. Les protéines tau natives phosphorylées et les protéines tau normales déphosphorylées ne sont pas visualisées. Ce premier résultat est en accord avec l'immunomarquage préférentiel des isoformes de protéines tau phosphorylées produites par transfection, et décrit auparavant.

Sur des coupes de cerveaux Alzheimer, ces anticorps marquent essentiellement les neurones avec DNF, mais également les lésions neuritiques de la DNF tels que les neurites dystrophiques et, dans une moindre mesure, les plaques neuritiques (figure 16A).

La spécificité des anticorps 61 et 385 a été plus spécialement étudiée vis-à-vis des protéines tau présentes dans d'autres pathologies neurodégénératives.

Le profil électrophorétique obtenu avec l'anticorps 385 sur les homogénats totaux de cerveaux de patients atteints de PSP, DCB ou maladie de Pick est comparable à celui de l'anticorps monoclonal AD2 dépendant de la phosphorylation (ser396/ser404). Ainsi, les protéines tau pathologiques sont visualisées sous forme d'un doublet tau64, tau69 dans la PSP et la DCB, et sous forme d'un doublet tau55, tau64 dans la maladie de Pick (figure 17).





Des immunomarquages sont réalisés avec l'anticorps 385 sur des coupes de cerveaux de patients atteints de PSP et sur des coupes de cerveau d'un patient avec DFTP-17.

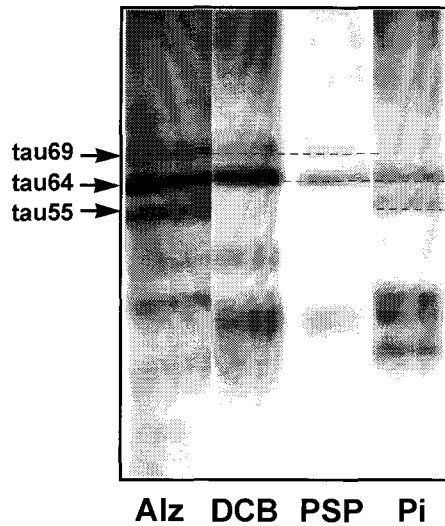
Des neurones avec DNF sont décrits dans le cas de PSP, au niveau de noyaux sous-corticaux pédonculaires en particulier. Des neurites dystrophiques et des inclusions gliales tau positives sont également visualisées grâce à cet anticorps (figure 16B).

Dans le cas de DFTP-17, l'immunomarquage obtenu est dominé par une densité très élevée de neurites dystrophiques au niveau de la substance blanche, formant un réseau caractéristique de cette famille de « tauopathie ». Les neurones marqués avec DNF sont peu nombreux voir rares dans la substance grise.

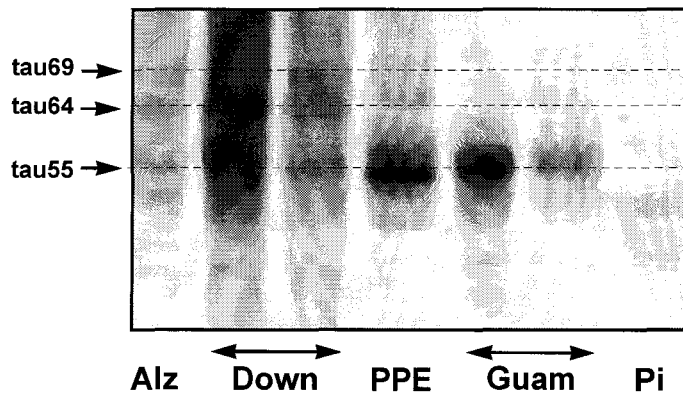
Les protéines tau pathologiques des homogénats cérébraux de PSP (5 cas), DCB (5 cas) et maladie de Pick (2 cas) ne sont pas détectées par l'anticorps 61. Par contre, les protéines tau pathologiques d'homogénats de cerveaux de patients présentant un syndrome de Down (3 cas), un Parkinson post-encéphalitique (PPE) (1 cas) ou un syndrome de l'île de Guam (3 cas) peuvent être visualisées à l'aide de cet anticorps. Un triplet tau55, tau64, tau69 comparable à celui de la MA est ainsi observé dans le syndrome de Down et dans le PPE. Les composantes tau55 et tau64 sont correctement détectées dans le syndrome de l'île de Guam alors que la composante tau69 est peu ou pas détectée selon les cas (figure 18).

Les réactions immunohistochimiques effectuées avec l'anticorps 61 donnent un marquage intense dans les cas de PPE et syndrome de Guam, avec un nombre important de neurones avec DNF et une densité élevée de neurites dystrophiques. A l'inverse, les neurones dégénérés ou les neurones ballonnés marqués par cet anticorps sont rares dans les cas de PSP et DCB étudiés, de même que les neurites dystrophiques.

Les résultats de biochimie et d'immunohistochimie s'accordent donc sur une spécificité de l'anticorps 61 vis-à-vis des protéines tau pathologiques de type Alzheimer, comparativement aux protéines tau pathologiques de « type PSP/DCB/Pick ».



**Figure 17: Caractérisation de l'anticorps monoclonal 385.**  
 Immunomarquage obtenu sur des homogénats totaux de cerveaux de patients atteints de pathologies neurodégénératives. L'anticorps 385 détecte les protéines tau pathologiques sous forme d'un triplet tau55, tau64, tau69 dans la MA (Alz), sous forme d'un doublet tau64, tau 69 dans les cas de dégénérescence cortico-basale (DCB) et de paralysie supranucléaire progressive (PSP), et sous forme d'un doublet tau55, tau64 dans la maladie de Pick (Pi).



**Figure 18: Caractérisation de l'anticorps monoclonal 61.**  
 Immunomarquage obtenu sur des homogénats totaux de cerveaux de patients atteints de pathologies neurodégénératives. L'anticorps 61 détecte les protéines tau pathologiques sous forme d'un triplet tau 55, tau64, tau 69 dans les 2 cas de syndrome de Down étudiés. Les homogénats de cerveaux de patients atteints de Parkinson post-encéphalitique (PPE) ou du syndrome de l'île de Guam sont faiblement marqués, avec une détection préférentielle des composantes tau55 et tau64 du triplet. Les protéines tau constitutives des corps de Pick ne sont pas détectées (Pi).

### c- Conclusions

**L'intérêt de l'anticorps 385 réside dans le fait qu'il distingue les protéines tau pathologiques des protéines tau normales. Par contre, il ne différencie pas les protéines tau pathologiques en fonction des maladies neurodégénératives.** Or ce type de propriété correspond à celle décrite précédemment avec l'anticorps polyclonal 988 spécifique du site de phosphorylation sérine 422. Ce dernier constitue donc un candidat potentiel pour l'épitope de l'anticorps 385, d'autant plus que nous avons démontré auparavant, à l'aide des transfections, que l'épitope était vraisemblablement un site de phosphorylation situé dans la partie carboxy-terminale de la protéine tau. Ce résultat pourrait être démontré par mutagenèse dirigée sur le résidu 422. Un autre moyen pour vérifier notre hypothèse serait d'utiliser, en ELISA, un peptide phosphorylé correspondant à cette partie de la séquence peptidique de la protéine tau. Par cette méthode, Hoffmann et collaborateurs ont ainsi pu définir l'épitope de l'anticorps AT100, démontrant également, par l'emploi de différents solvants, l'importance de la conformation de la molécule pour la reconnaissance de l'épitope (Hoffmann *et al.*, 1997).

**La caractérisation de l'anticorps 61 met en évidence une spécificité de détection des protéines tau pathologiques de type Alzheimer, retrouvées également dans les lésions neurodégénératives du syndrome de Down, du syndrome de l'île de Guam et du PPE.** Cette propriété de l'anticorps permet de différencier ces protéines tau pathologiques de celles présentes dans les maladies neurodégénératives apparentées de type PSP ou DCB. Si cette donnée est confirmée sur un nombre plus important de cas, alors la détermination de l'épitope présente un intérêt majeur, car il n'existe pas actuellement d'anticorps avec une telle spécificité. Pour la première fois, une caractéristique différentielle des protéines tau pathologiques des démences de type Alzheimer serait décrite. L'existence d'un épitope conformationnel ne pouvant être exclu, la mutagenèse dirigée serait un bon outil pour caractériser l'épitope. En effet, par cette

approche, l'acide aminé potentiellement phosphorylable constituant l'épitope peut être modifié tout en respectant l'intégrité et la conformation de la protéine.

#### **II-2-2-2- Classe 2: anticorps 294**

##### **a- Caractérisation sur homogénats de cellules transfectées**

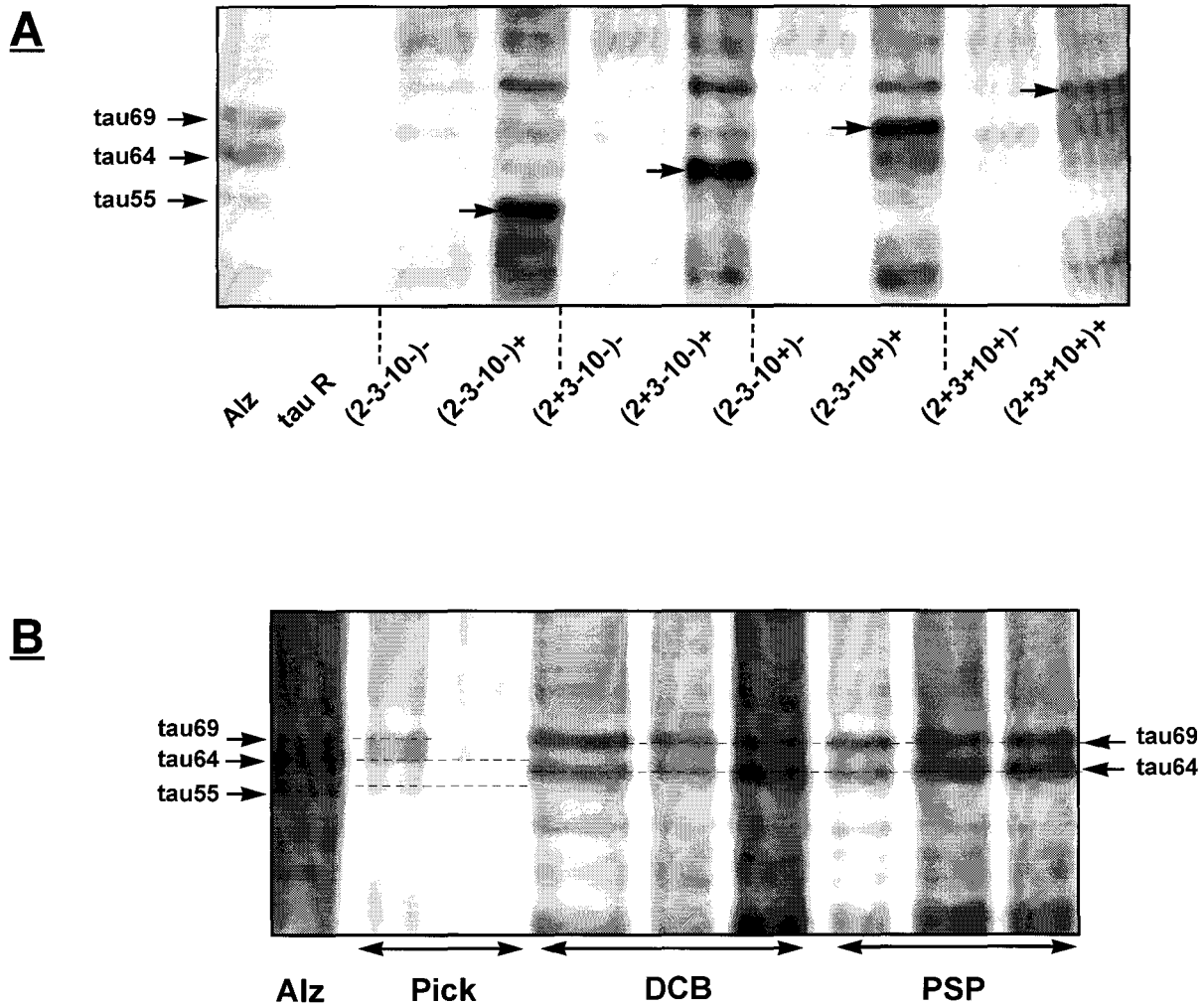
L'anticorps 294 détecte les 4 isoformes de protéines tau testées (2-3-10-, 2+3-10-, 2-3-10+, 2+3+10+) uniquement lorsqu'elles sont phosphorylées, c'est-à-dire exprimées par des cellules transfectées traitées à l'acide okadaïque. Les isoformes produites par les cellules transfectées non-traitées et les protéines tau recombinantes non-phosphorylées (isoforme longue) ne sont pas reconnues (figure 19A).

Par ailleurs, les fragments BstXI et PstI, phosphorylés ou non, ne sont pas détectés par l'anticorps, et ce quelles que soient les conditions de western-blotting utilisées.

Si l'utilisation des cellules COS transfectées permet donc de démontrer la phosphorylation de l'épitope de l'anticorps 294, il n'apporte aucune indication quant à sa localisation dans la partie amino ou dans la partie carboxy-terminale de la protéine tau.

##### **b- Caractérisation sur prélèvements cérébraux**

En plus des éléments caractéristiques détectés dans les homogénats Alzheimer et déjà décrits avec les anticorps de la classe 1 (triplet tau-PHF et traînée), l'anticorps 294 reconnaît les protéines tau natives phosphorylées des prélèvements biopsiques. Lorsqu'une cinétique de déphosphorylation d'un tel prélèvement est réalisée, une diminution de l'immunoréactivité de l'anticorps est observée en fonction du délai post-opératoire. La nature phosphorylée de



**Figure 19: Caractérisation de l'anticorps monoclonal 294.**

(A) Immunomarquage obtenu sur des homogénats de cellules COS transfectées avec les ADNc des isoformes de protéines tau (2-3-10-), (2+3-10-), (2-3-10+) et (2+3-10+). Seules les protéines tau produites par les cellules traitées à l'acide okadaïque (+) sont détectées par l'anticorps 294. Ce résultat suggère que l'épitope de l'anticorps est un site de phosphorylation, ce qui est confirmé par l'absence de détection des protéines tau recombinantes non-phosphorylées (tau R).

(B) Immunomarquage obtenu sur des homogénats totaux de cerveaux de patients atteints de pathologies neurodégénératives. L'anticorps 294 détecte les protéines tau pathologiques sous forme d'un doublet tau64, tau 69 dans les 3 cas de PSP et de DCB étudiés. Le marquage obtenu sur les homogénats de cerveaux Pick est faible, et consiste en un doublet tau55, tau64 ou un triplet identique à celui des protéines tau-PHF de la MA (Alz).

l'épitope démontrée avec les cellules COS transfectées est donc vérifiée sur les homogénats de tissu cérébral.

L'immunomarquage obtenu sur les homogénats de cerveaux de patients atteints d'autres pathologies neurodégénératives (PSP, DCB, Pick) est semblable à celui décrit avec les anticorps dépendants de la phosphorylation tels que AD2, ou nos anticorps de la classe 1 (figure 19B).

Un marquage des lésions neuropathologiques liées à la DNF semblable à celui déjà décrit pour l'anticorps 385 est observé sur des coupes de cerveaux de patients atteints de PSP ou sur des coupes de cerveaux de patients avec DFTP-17.

### c- Conclusions

**La phosphorylation de l'épitope de l'anticorps 294** est établie par l'analyse en western-blot d'homogénats de cellules transfectées avec les ADNc de certaines isoformes de protéines tau. Elle est confirmée par l'analyse selon la même technique d'homogénats cérébraux.

La localisation de l'épitope de l'anticorps 294 n'a pu être démontrée de façon directe, mais nous pouvons cependant émettre une hypothèse au regard des résultats obtenus sur les cellules COS transfectées. Les 2 fragments PstI et BstXI ne sont pas détectés par l'anticorps 294, alors que l'isoforme longue (2+3+10+) phosphorylée est reconnue. L'épitope pourrait donc être constitué par un ou plusieurs des résidus phosphorylables présents au niveau de la séquence non-reprise par les deux fragments, c'est-à-dire la séquence peptidique 224-245.

Cinq sites sont potentiellement phosphorylables au sein de cette séquence 224-245, dont 4 ont déjà été décrits dans les protéines tau-PHF. Il s'agit des résidus thr231, ser235, ser237, ser238, qui constituent donc des sites candidats pour l'épitope de l'anticorps 294.

Afin de vérifier, ou d'infirmer, cette hypothèse, nous envisageons la construction d'un nouveau fragment de protéine tau couvrant la séquence incriminée. Si celui-ci est reconnu par l'anticorps 294, alors nous pourrions restreindre l'épitope aux 4 sites phosphorylables décrits auparavant. Un protocole ELISA direct utilisant des peptides correspondant précisément à ces sites permettrait alors d'établir définitivement la nature de l'épitope. Cependant, un effet conformationnel lié à la phosphorylation d'un de ces sites ne peut être exclu, ce qui réduirait grandement la probabilité d'obtenir un résultat positif par cette démarche. Par ailleurs, la technologie *BIAcore™* pourrait être utilisée pour réaliser une étude de compétitivité entre l'anticorps 294 et l'anticorps AT180 spécifique du résidu thréonine 231 phosphorylé.

La détection des fragments protéolytiques dans les homogénats de cerveaux semblerait indiquer que l'épitope de l'anticorps n'est pas conformationnel, à la différence de l'hypothèse émise précédemment pour l'anticorps 61. Ainsi, l'absence de détection des fragments PstI et BstXI ne pourrait pas être attribuée à une conformation anormale ou à une perte de conformation des fragments consécutive au clivage par les enzymes de restriction.

### **II-2-2-2-3- Classe 3 : anticorps 343**

L'anticorps 343 détecte indifféremment les 4 isoformes de protéines tau utilisées pour la caractérisation, phosphorylées ou non-phosphorylées, de même que les fragments BstXI et PstI, phosphorylés ou non.

Ces résultats indiquent donc que la **reconnaissance de son épitope par l'anticorps 343 est indépendante de la phosphorylation**. Par ailleurs, la reconnaissance des 2 fragments implique une localisation amino-terminale, au niveau de la séquence 1-49 commune à BstXI et PstI. Mais les résidus 45 à 49 correspondant au début de l'exon 2 doivent être exclus de la séquence épitopique possible, puisque l'anticorps reconnaît



les isoformes sans exon 2. En conséquence, le site de fixation de l'anticorps 343 sur les protéines tau est constitué par tout ou partie de la séquence peptidique 1-44.

Un protocole ELISA direct est utilisé pour préciser l'épitope de l'anticorps. Le peptide M19G (séquence peptidique 1-19 des protéines tau) est adsorbé sur plaque de microtitration, à des concentrations comprises entre 4 et 1 µg/ml dans un tampon PBS. Le signal résultant de la fixation de l'anticorps sur le peptide est quantifié sur un luminomètre à plaques, le contrôle positif étant obtenu avec l'anticorps polyclonal M19G spécifique du peptide adsorbé. Une préparation de protéines tau extraites d'un cerveau de patient Alzheimer est également adsorbée sur la plaque de microtitration.

Aucune fixation spécifique de l'anticorps 343 sur le peptide ne peut être mesurée, alors que les protéines tau de l'extrait cérébral sont détectées. Ces données permettent donc de restreindre **l'épitope de l'anticorps 343 à la séquence peptidique 20-44 des protéines tau humaines.**

L'analyse par western-blot des protéines tau contenues dans les homogénats cérébraux montre que l'anticorps 343 détecte les protéines tau, indépendamment de l'état de phosphorylation. Ce résultat était attendu compte-tenu de l'épitope de l'anticorps, localisé dans la partie amino-terminale commune à toutes les isoformes de protéine tau et ne comprenant pas de site phosphorylé. Il est à noter que les fragments protéolytiques ne sont pas détectés par l'anticorps.

#### **II-2-2-2-4- Classe 4 : anticorps 92**

##### a- Caractérisation biochimique

Les 4 isoformes de protéines tau utilisées pour la caractérisation, phosphorylées ou non, sont reconnues par l'anticorps 92 (figure 20A). Les fragments BstXI et PstI sont également détectés, indépendamment de leur état de phosphorylation (figure 20B).

Il est donc possible de définir l'anticorps 92 comme étant indépendant de la phosphorylation, puisque le traitement à l'acide okadaïque des cellules transfectées n'interfère pas avec la détection des protéines tau. D'autre part, l'épitope peut être localisé au niveau de la séquence 1-44, c'est-à-dire la partie commune aux deux fragments. Comme pour l'anticorps 343, les résidus 45 à 49 (début de l'exon 2) sont soustraits de la séquence épitopique potentielle.

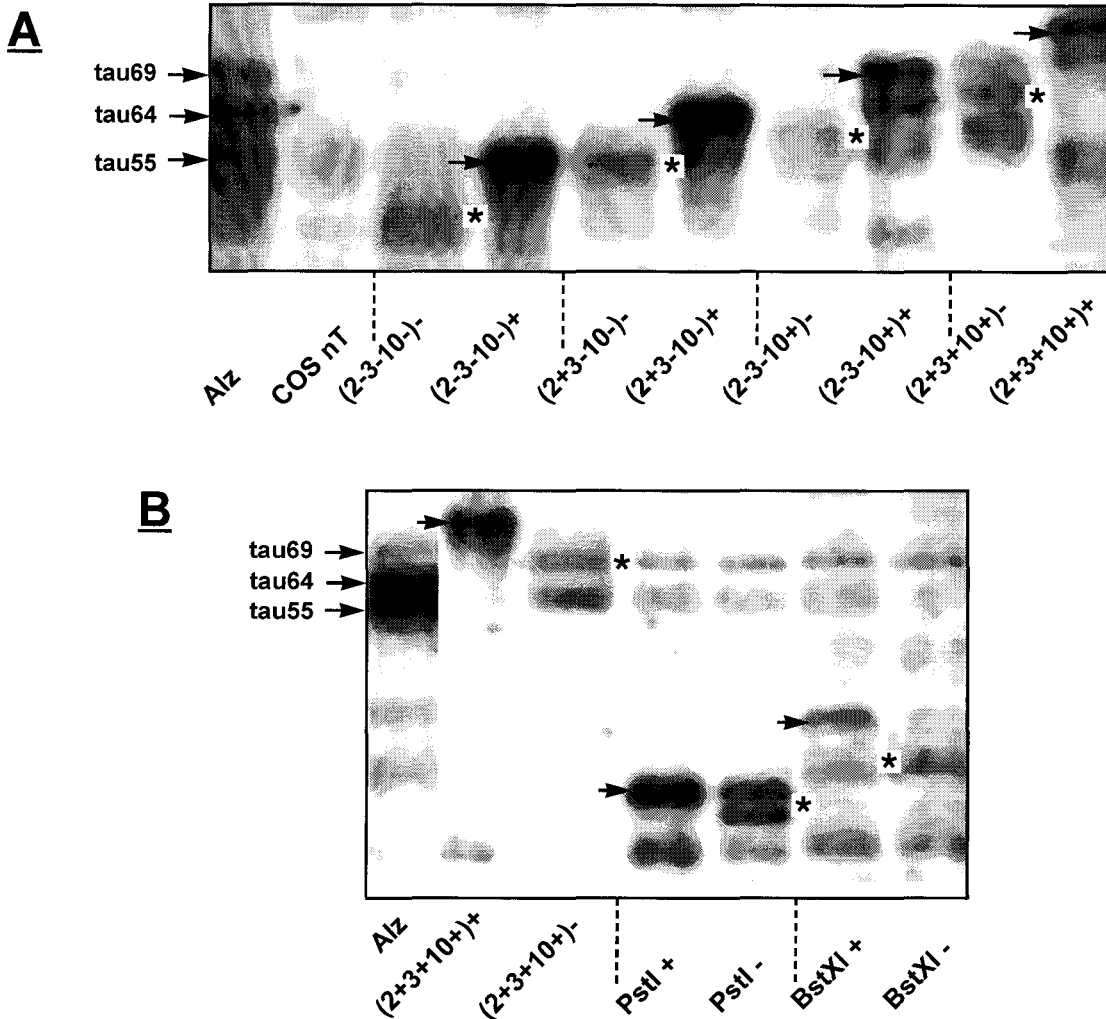
Par la suite, une localisation plus précise de l'épitope à la séquence amino-terminale 1-19 a pu être définie grâce au protocole ELISA déjà décrit pour l'anticorps 343.

Il est donc possible de décrire **l'anticorps 92** comme étant **indépendant de la phosphorylation et spécifique de la séquence 1-19 des protéines tau humaines**. De part son épitope, cet anticorps peut détecter les protéines tau normales non-phosphorylées comme les protéines tau phosphorylées natives ou pathologiques.

#### b- Caractérisation immunohistochimique

Les premiers essais d'immunohistochimie réalisés avec l'anticorps 92 sur coupes en congélation de deux cerveaux Alzheimer mettaient en évidence une prédominance du marquage des neurites dystrophiques et des plaques neuritiques. La densité des neurones avec DNF marqués était généralement faible.

Par la suite, les observations réalisées par plusieurs neuropathologistes ont confirmées la fiabilité de l'anticorps en tant que marqueur neuritique. En particulier, plusieurs cas de maladies neurodégénératives caractérisées par une pathologie neuritique ont été explorés. Un immunomarquage important des lésions neuritiques périvasculaires est par exemple obtenu dans un cas d'angiopathie amyloïde cérébrale (figure 21B). De même, un réseau dense de



**Figure 20: Caractérisation de l'anticorps monoclonal 92 .**

**(A)** Immunomarquage obtenu avec l'anticorps monoclonal 92 sur des homogénats de cellules COS transfectées avec les ADNc des isoformes de protéines tau (2-3-10-), (2+3-10-), (2-3-10+) et (2+3+10+). L'anticorps détecte les protéines tau phosphorylées (indiquées par les flèches) produites par les cellules traitées à l'acide okadaïque (+), et le triplet des protéines tau-PHF phosphorylées d'un homogénat de cerveau Alzheimer (Alz). Les protéines tau non-phosphorylées (\*) produites par les cellules non-traitées par l'acide okadaïque (-) sont également détectées. Ce résultat suggère que l'épitope de l'anticorps n'est pas un site de phosphorylation.

**(B)** Immunomarquage obtenu avec l'anticorps monoclonal 92 sur des homogénats de cellules COS transfectées avec les ADNc des fragments PstI et BstXI. L'anticorps détecte les 2 fragments produits, avec (+) ou sans (-) traitement préalable des cellules par l'acide okadaïque. Ce résultat permet de localiser l'épitope de l'anticorps au niveau de la séquence peptidique 1-49 des protéines tau humaines.

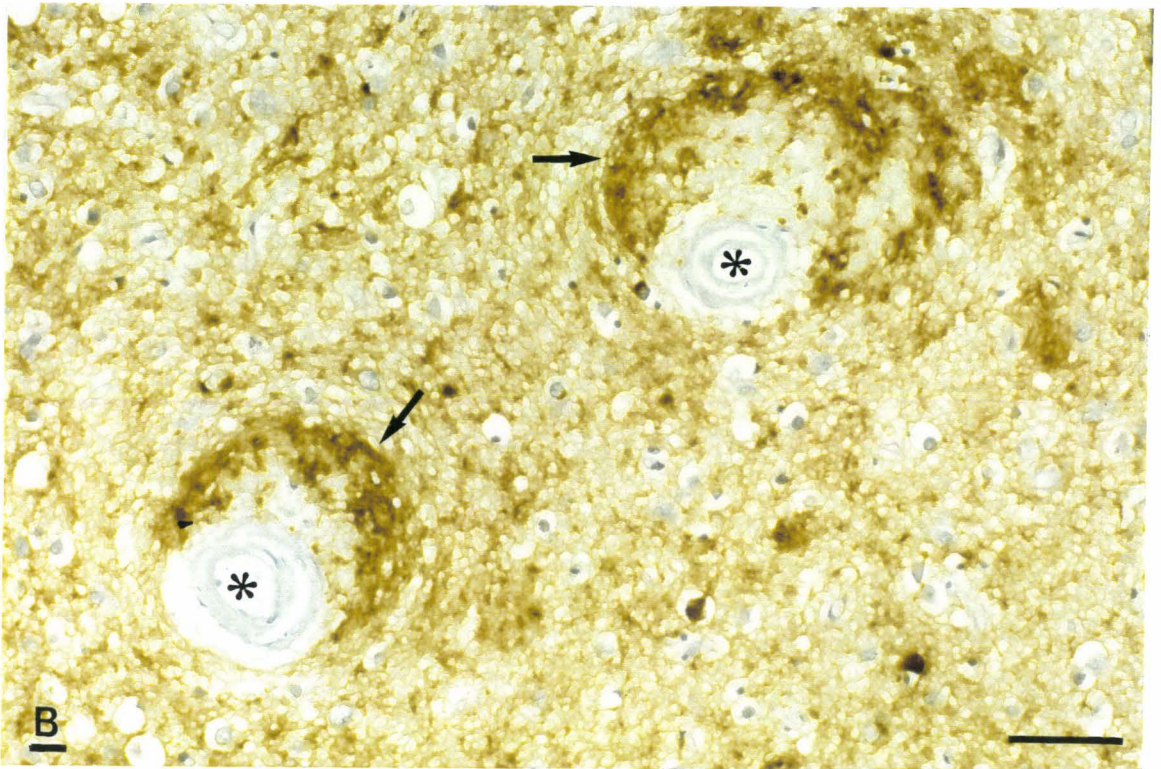
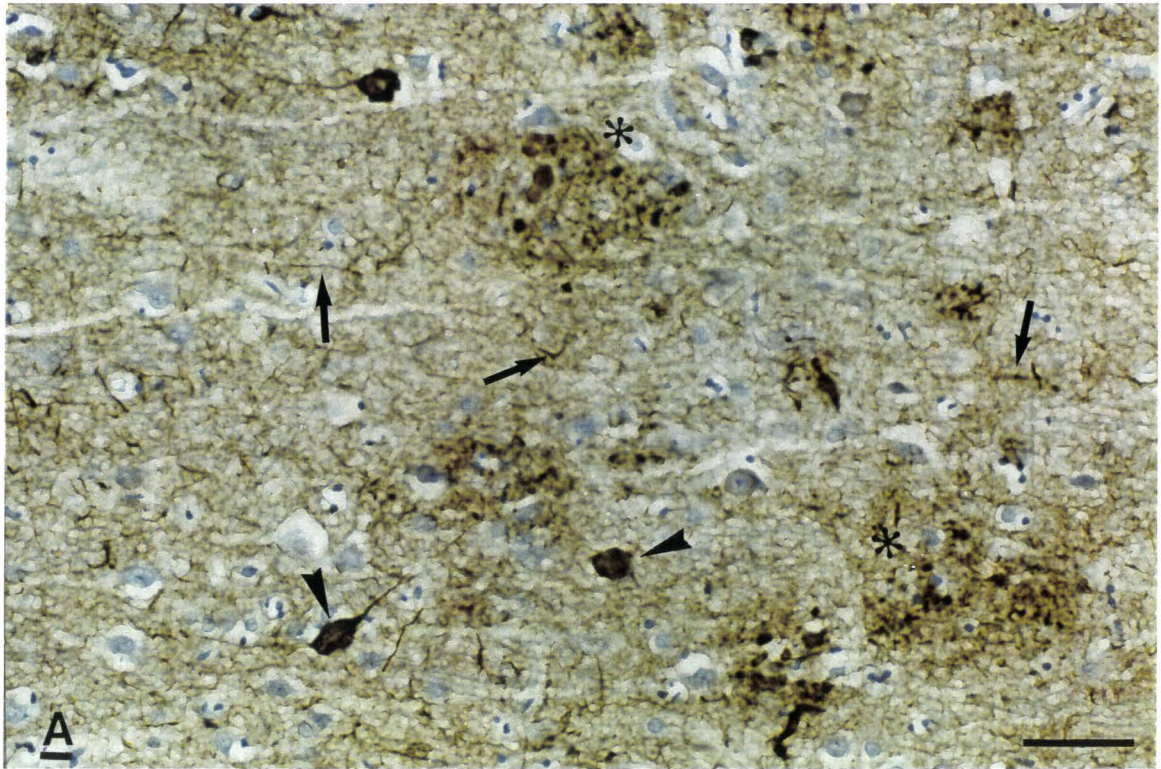
**Figure 21:**

**(A)** Immunomarquage obtenu avec l'anticorps 92 sur coupe en paraffine de cortex temporal d'un cerveau Alzheimer. De très nombreuses plaques neuritiques sont marquées (indiquées par les astérisques), ainsi qu'un réseau dense de neurites dystrophiques (indiqués par les flèches). Des neurones avec dégénérescence neurofibrillaire sont également observés (indiqués par les pointes de flèches). Echelle: 50  $\mu\text{m}$ .

Immunomarquage réalisé dans le service d'Anatomie Pathologique du CHU de Rouen – Pr. A. Laquerrière.

**(B)** Immunomarquage obtenu avec l'anticorps 92 sur coupe en paraffine d'un cerveau de patient atteint de maladie d'Alzheimer avec angiopathie amyloïde cérébrale. Un marquage des lésions neuritiques périvasculaires est observé (indiqué par les flèches), alors que le marquage des neurones avec dégénérescence neurofibrillaire est faible. Echelle: 25  $\mu\text{m}$ .

Immunomarquage réalisé à l'Institut de Pathologie de la faculté de médecine de Strasbourg – Dr. M. Mohr.



neurites dystrophiques est révélé par l'anticorps au niveau de la substance blanche dans un cas de DFTP-17. Les lésions tels que les neurones avec DNF, les neurones ballonnés ou les corps de Pick sont également visualisées grâce à cet anticorps (tableau 4)(figure 21A).

PATHOLOGIE	NEUROPATHOLOGIE
<b>Maladie d'Alzheimer</b>	Neurones avec DNF (densité variable selon les cas)  Neurites dystrophiques + plaques neuritiques
<b>Syndrome de Guam (ALS/PDC)</b>	Nombreux neurones avec DNF  Neurites dystrophiques
<b>Paralyse supra-nucléaire progressive (PSP)</b>	Quelques neurones avec DNF  Enchevêtrements fibrillaires gliaux
<b>Dégénérescence cortico- basale (DCB)</b>	Très nombreux neurites dystrophiques  Quelques neurones ballonnés
<b>Maladie de Pick</b>	Corps de Pick  Enchevêtrements fibrillaires gliaux
<b>Démence de type frontal avec angiopathie amyloïde</b>	Neurones avec DNF  Marquage neuritique périvasculaire
<b>Démence fronto-temporale avec Parkinson liée au chromosome 17 (DFTP-17)</b>	Quelques neurones avec DNF  Très nombreux neurites dystrophiques  dans la substance blanche

**Tableau 4:** Caractérisation immunohistochimique de l'anticorps monoclonal 92.

### II-2-2-5- Conclusion

Les 16 anticorps monoclonaux produits par immunisation de souris avec une préparation de protéines tau-PHF peuvent être répartis en 4 classes, selon la nature de leur épitope et leur spécificité (Tableau 5).

Des anticorps dirigés contre des sites phosphorylés carboxy-terminaux de la molécule de protéine tau sont décrits.

⇒ Parmi ceux-ci, l'anticorps 385 permet de différencier les protéines tau phosphorylées pathologiques des protéines tau phosphorylées normales. Il est utilisable sous certaines conditions dans les techniques de western-blotting, sur des homogénats cellulaires ou sur des homogénats totaux de cerveaux. Il est également utilisable en immunohistochimie pour révéler les lésions liées à la dégénérescence neurofibrillaire caractéristique de certaines pathologies neurologiques.

⇒ L'anticorps 61 est un outil particulièrement intéressant du fait de sa spécificité. En effet, cet anticorps ne reconnaît qu'une certaine catégorie de protéines tau phosphorylées pathologiques, retrouvées dans les démences de type Alzheimer (Syndrome de Down, PPE et syndrome de Guam). Les protéines tau constitutives des lésions cérébrales décrites dans la PSP, la DCB ou la maladie de Pick ne posséderaient pas l'épitope de l'anticorps 61. Cette donnée reste à confirmer sur un nombre de cas plus important.

L'anticorps est utilisable pour les techniques de western-blot et d'immunohistochimie.

⇒ Si la fixation de l'anticorps 294 sur les protéines tau est dépendante de leur état phosphorylé, la région de ces protéines impliquée dans cette fixation n'a pu être définie. Il apparaît cependant que cet anticorps présente une spécificité comparable à celle d'anticorps monoclonaux dépendants de la phosphorylation et parfaitement caractérisés tels que AD2.

⇒ Les anticorps de type 92 et 343 possédant un épitope amino-terminal ont également été obtenus lors du même protocole d'immunisation. Leur fixation sur la protéine tau étant indépendante de la phosphorylation, ces anticorps détectent indifféremment les protéines tau phosphorylées pathologiques ou natives, et les protéines tau normales déphosphorylées. Alors que les deux anticorps sont des outils performants pour le western-blot, seul l'anticorps 92 est utilisable en immunohistochimie. Il constitue un bon marqueur des lésions cérébrales de type neuritique, telles que les neurites dystrophiques et les plaques neuritiques.



Anticorps	Epitope	Caractéristiques	Utilisation
385 (85, 299)	Carboxy-terminal (P+)	Tau phosphorylées pathologiques	WB et IHC
61	Carboxy-terminal ? (P+)	Tau phosphorylées pathologiques des démences apparentées Alzheimer	WB et IHC
294	Carboxy-terminal ? (P+)	Tau phosphorylées pathologiques et natives	WB et IHC
343 (376)	[20-44] (P-)	Tau phosphorylées et non-phosphorylées	WB
92	[1-19] (P-)	Tau phosphorylées et non-phosphorylées	WB et IHC

**Tableau 5: Caractérisation des anticorps monoclonaux.**

((P+) : anticorps dépendants de la phosphorylation ; (P-) : anticorps indépendants de la phosphorylation ; [X-Y] : séquence peptidique de la protéine tau correspondant à l'épitope de l'anticorps, selon la numérotation de l'isoforme la plus longue).

### **III- APPLICATION DES ANTICORPS : DOSAGE ELISA DES PROTEINES**

#### **TAU**

*Avertissement:* L'objectif du projet de collaboration entre le groupe "Vieillessement cérébral et dégénérescence neuronale" de l'unité INSERM 422 et la société Immunotech est d'établir un protocole de dosage des protéines tau dans le liquide céphalo-rachidien, dans un but de diagnostic biologique de la maladie d'Alzheimer. La production et la caractérisation d'anticorps monoclonaux utilisables dans ce protocole constitue la première partie du projet, et les résultats obtenus ont été exposés précédemment. La mise au point et la validation du protocole représente la deuxième partie du projet, et des résultats importants ont été obtenus à ce jour. Cependant, cet aspect des recherches que nous menons en collaboration avec la société Immunotech pouvant faire l'objet d'un développement industriel, il a été convenu que des données précises ne seraient pas présentées. L'exposé sera par conséquent limité à des concepts généraux et à des résultats partiels.

#### **III-1- PROTEINES TAU DANS LE LCR : QUELLES FORMES DOSER?**

##### **III-1-1- Etat du sujet**

L'augmentation de la concentration intrathécale des protéines tau au cours de la MA est un fait établi. Cependant, les études visant à caractériser ces protéines présentent des résultats variables, et la nature des protéines tau détectées reste encore mal définie.

Vigo-Pelfrey et collaborateurs décrivent ainsi la présence d'une protéine tau de poids moléculaire compris entre 55 et 60 kDa dont l'état de phosphorylation est incertain (Vigo-Pelfrey *et al.*, 1995). Araï et collaborateurs décrivent un triplet de protéines similaire au triplet

tau-PHF observé dans les homogénats de cerveaux Alzheimer (Araï *et al.*, 1995), et attribuent cet immunomarquage à la présence de protéines tau phosphorylées dans le LCR. Blennow et collaborateurs mesurent une augmentation de la concentration intrathécale de protéines tau-PHF, parallèlement à l'augmentation de la concentration des protéines tau normales (Blennow *et al.*, 1995). Enfin, Johnson et collaborateurs démontrent l'existence de fragments protéolytiques amino-terminaux dans le LCR de patients atteints de MA (Johnson *et al.*, 1997).

Cependant, l'absence d'une activité protéolytique dirigée contre les protéines tau, dans le LCR, a pu être démontrée (Blomberg *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 1997; Lefranc D. *et al.*, 1997), suggérant que les éléments protéiques dosés seraient le reflet des processus physiopathologiques se déroulant au sein du tissu cérébral. Johnson et collaborateurs ont également montré que la détection des fragments de protéines tau précipités à partir du LCR n'était pas modifiée par un traitement à la phosphatase alcaline. Ils en concluent donc à un état non-phosphorylé des antigènes lésionnels tau présents dans le LCR (Johnson *et al.*, 1997).

Finalement, aucun consensus ne peut être dégagé des différentes études, quant à la nature des protéines tau à doser dans le LCR au cours de la MA. Nous pouvons donc considérer que toutes les formes de protéines tau sont potentiellement relarguées, constituant autant de marqueurs périphériques potentiels de la MA.

### **III-1-2- Protocoles de dosage**

Plusieurs protocoles de dosage ELISA des protéines tau dans le LCR ont été théoriquement envisagés. Pour chacun d'eux, le choix de l'anticorps de capture, ou anticorps de phase, et le choix de l'anticorps de révélation, ou anticorps traceur, détermine les formes de protéine tau qui seront dosées.

### III-1-2-1- Protocole avec anticorps de phase spécifique des extrémités des protéines

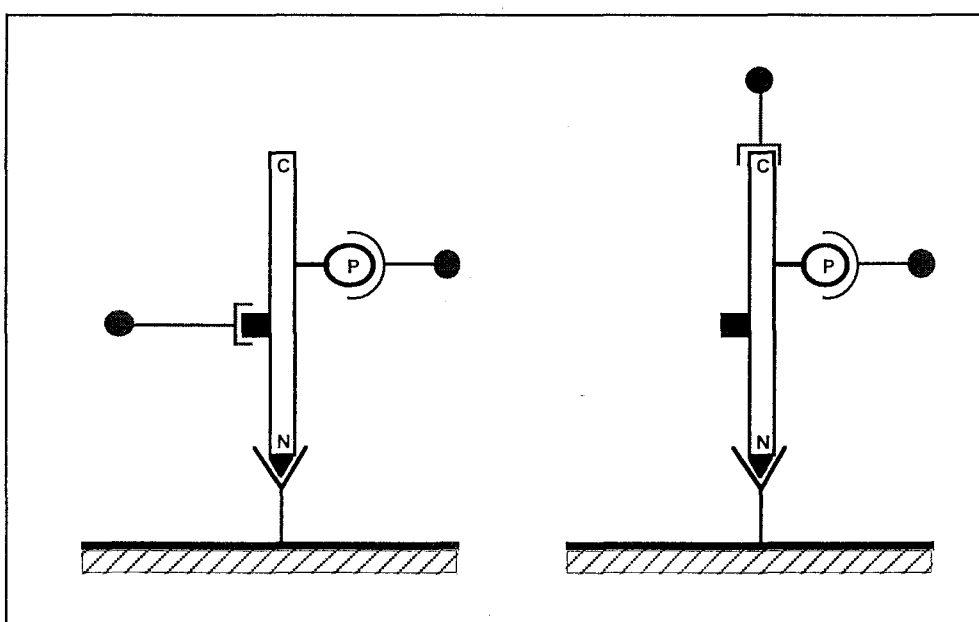
#### tau

Un anticorps indépendant de la phosphorylation et dirigé contre la partie amino-terminale est adsorbé sur la phase. Cet anticorps devrait capturer les protéines tau non-dégradées et les fragments protéolytiques amino-terminaux, sans tenir compte de leur état de phosphorylation. Seuls les fragments carboxy-terminaux ne pourraient être capturés.

De la même façon, il est possible d'envisager un anticorps de phase carboxy-terminal capturant spécifiquement les protéines tau non-dégradées et les fragments protéolytiques carboxy-terminaux.

La détection serait réalisée avec deux anticorps traceurs, dont un anticorps dépendant de la phosphorylation pour doser spécifiquement les protéines tau-PHF phosphorylées. Un deuxième anticorps traceur, indépendant de la phosphorylation et dirigé contre les extrémités ou contre la partie médiane de la molécule (région située en aval des domaines de liaison aux microtubules) serait utilisé pour doser simultanément la totalité des protéines tau (protéines tau normales et protéines tau-PHF)(figure 22).

Après dilution de l'homogénat dans le PBS



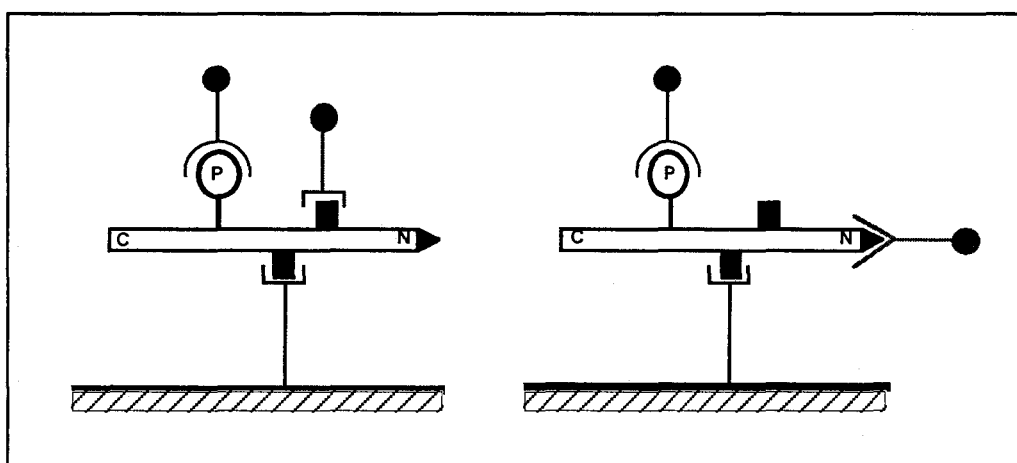
**Figure 22:** Protocole ELISA avec un anticorps de phase dirigé contre les extrémités amino- (N) ou carboxy- (C) terminales des protéines tau. La détection est réalisée avec 2 anticorps traceurs (●), dont un anticorps spécifique d'un site phosphorylé (P).

Ce type de dosage présente l'avantage de doser l'ensemble des protéines tau, phosphorylées et non-phosphorylées. De plus, l'adsorption simultanée sur la phase d'un anticorps spécifique de la partie amino-terminale et d'un anticorps spécifique de la partie carboxy-terminale autoriserait la détection des fragments protéolytiques amino- et carboxy-terminaux, en plus des formes non-dégradées.

### III-1-2-2- Protocole avec anticorps de phase spécifique de la partie médiane des protéines tau

L'anticorps adsorbé sur la phase est indépendant de la phosphorylation et dirigé contre la partie médiane de la molécule. La détection des complexes protéines tau – anticorps formés serait réalisée à l'aide de 2 anticorps traceurs, comme décrit pour le protocole précédent (figure 23).

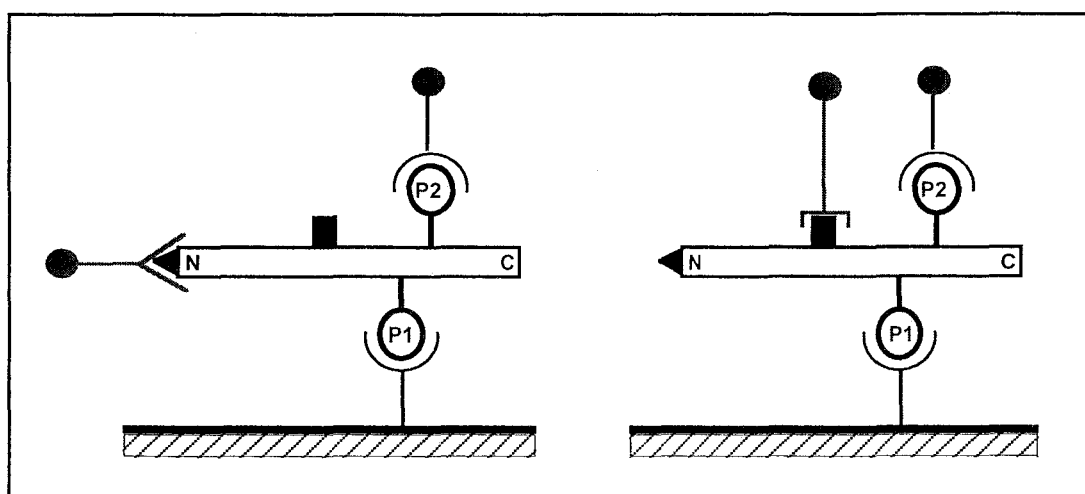
Ce schéma réactionnel, correspondant à celui du kit « Innotest »<sup>TM</sup> employé dans la majorité des études publiées à ce jour, permet de capter l'ensemble des protéines tau non-dégradées (tau normales et tau-PHF) et les fragments protéolytiques amino-terminaux. Il ne dose pas cependant les potentiels fragments protéolytiques carboxy-terminaux.



**Figure 23 :** Protocole ELISA avec un anticorps de phase dirigé contre la partie médiane des protéines tau. La détection est réalisée avec 2 anticorps traceurs (●), dont un anticorps spécifique d'un site phosphorylé (P).

### III-1-2-3- Protocole de dosage avec anticorps de phase spécifique d'un site phosphorylé des protéines tau

Un protocole peut être utilisé dans l'objectif d'un dosage exclusif des protéines tau-PHF phosphorylées. L'anticorps de phase sera alors spécifique d'un site phosphorylé, et la détection sera effectuée avec deux anticorps traceurs dont l'un au moins sera spécifique d'un site phosphorylé, différent du site épitopique de l'anticorps de phase (figure 24).



**Figure 24 :** Protocole ELISA avec un anticorps de phase dirigé contre un site phosphorylé des protéines tau (P1). La détection est réalisée avec 2 anticorps traceurs (●), dont un anticorps spécifique d'un site phosphorylé (P2).

Ce type de dosage a déjà été employé avec succès par Blennow et collaborateurs, qui adsorbent les deux anticorps spécifiques de sites phosphorylés AT180 (thr231) et AT270 (thr181) sur la phase (Blennow *et al.*, 1995). La détection est réalisée avec les anticorps AT120 et HT7, deux anticorps reconnaissant indifféremment les protéines tau phosphorylées ou non-phosphorylées au niveau de la séquence peptidique 159-231. Les auteurs décrivent alors une augmentation de la concentration intrathécale des protéines tau-PHF, parallèlement à une augmentation de la concentration intrathécale des protéines tau normales.

Cependant, plusieurs éléments nous paraissent être en défaveur d'un tel type de protocole. Tout d'abord, Johnson et collaborateurs ont démontré que les fragments de protéine tau présents dans le LCR étaient non-phosphorylés (Johnson *et al.*, 1997). En l'absence de toute autre étude contradictoire, nous considérons ces résultats comme étant fiables. De plus, le passage de protéines tau phosphorylées agrégées du cerveau vers le LCR, au travers de la barrière hémato-encéphalique, suppose l'existence d'un déficit fonctionnel de celle-ci. Or les données sur ce sujet sont une nouvelle fois contradictoires. Certaines études décrivent un tel dysfonctionnement (Blennow *et al.*, 1995 ; Claudio 1996 ; Mooradian 1988), alors que d'autres décrivent une intégrité de la barrière hémato-encéphalique dans le MA (Caserta *et al.*, 1998 ; Schlageter *et al.*, 1987). Enfin, l'importance de la conformation des protéines tau pour la formation des épitopes spécifiques des protéines tau-PHF nous semble être difficilement compatible avec un passage de ces protéines au travers de la barrière hémato-encéphalique.

## **III-2- RESULTATS**

Nous présentons dans cette partie certains résultats significatifs obtenus par la technologie *BIAcore*<sup>TM</sup>. Cette technique a été utilisée pour compléter la cartographie épitopique des anticorps, ainsi que pour déterminer les paires d'anticorps potentiellement utilisables dans un protocole ELISA de type sandwich.

### **III-2-1- Cartographie épitopique par le *BIAcore*<sup>TM</sup>**

Dans ce type d'essais, la fixation relative de deux anticorps sur un même antigène adsorbé sur la SensorChip est mesurée. Il est ainsi possible de déterminer les anticorps qui sont en compétition pour la fixation sur l'antigène, suggérant l'existence d'un épitope commun pour les deux anticorps.

Pour les deux sensorgrammes présentés dans la figure 25, le niveau de base correspond à la fixation de protéines tau recombinantes sur la surface biospécifique (signal de 20000 RU).

⇒ Dans la première série d'essais, l'anticorps 299 est étudié par rapport à l'anticorps 85, puisque ces anticorps ont été définis auparavant comme étant tous deux carboxy-terminaux.

L'anticorps 299 est injecté et sa fixation sur les protéines recombinantes est mesurée par l'amplitude du signal au point 1 (3753 RU). L'anticorps 85 est ensuite injecté, et la variation faible du signal détectée au point 2 (271 RU) indique une fixation réduite (figure 25A).

Lorsque l'anticorps 85 est injecté avant l'anticorps 299, une fixation importante est mesurée (2879 RU), alors que la fixation de l'anticorps 299 est diminuée de moitié par rapport au premier protocole (1642 RU pour 3753 RU).



La mise en œuvre de la technologie *BIAcore™* nous permet donc de vérifier et de compléter indirectement les résultats de cartographie des épitopes des anticorps obtenus précédemment, par les techniques classiques de biochimie. Nous montrons ainsi que :

- les anticorps 92 et 343 reconnaissent des sites indépendants (séquence 1-19 et séquence 20-44).
- les anticorps 92 et 383 reconnaissent vraisemblablement un site unique (séquence 1-19).
- les anticorps 85 et 299 reconnaissent vraisemblablement un site carboxy-terminal unique.

Il est important de noter que dans ce type de protocole, la fixation des anticorps sur les protéines tau recombinantes, non-phosphorylées, ne semble pas tenir compte de cet état de phosphorylation. En effet, les anticorps décrits précédemment comme étant dépendants de la phosphorylation se lient sur les protéines tau recombinantes, au même titre que les anticorps définis comme étant indépendants de la phosphorylation.

### **III-2-2- Détermination des paires d'anticorps par le *BIAcore™***

Dans ce type d'essais, un premier anticorps est adsorbé sur la « Sensor Chip » (anticorps de phase). Des protéines tau recombinantes sont ensuite injectées dans le circuit microfluidique et vont être capturées par l'anticorps de phase. Un deuxième anticorps est finalement injecté (anticorps traceur), et toute modification du signal enregistré sera associée à la formation d'un complexe anticorps de phase / protéines recombinantes / anticorps traceur (appelé « sandwich »).

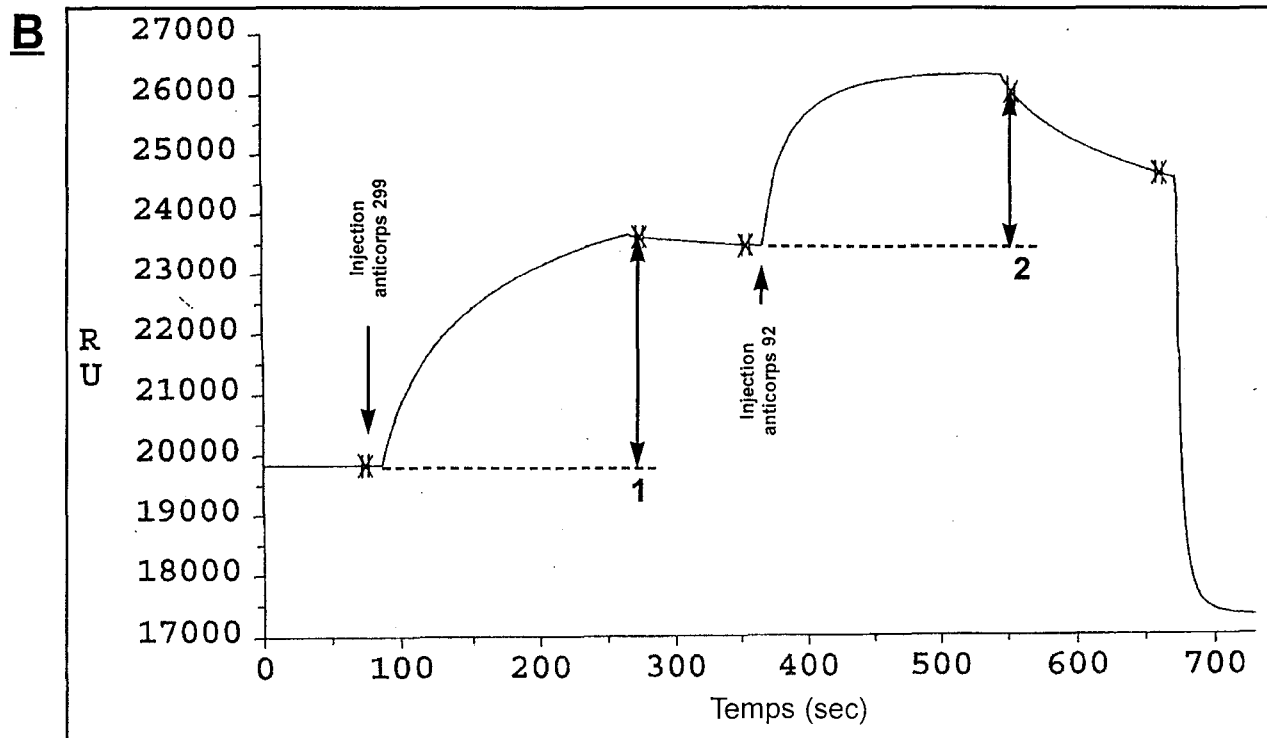
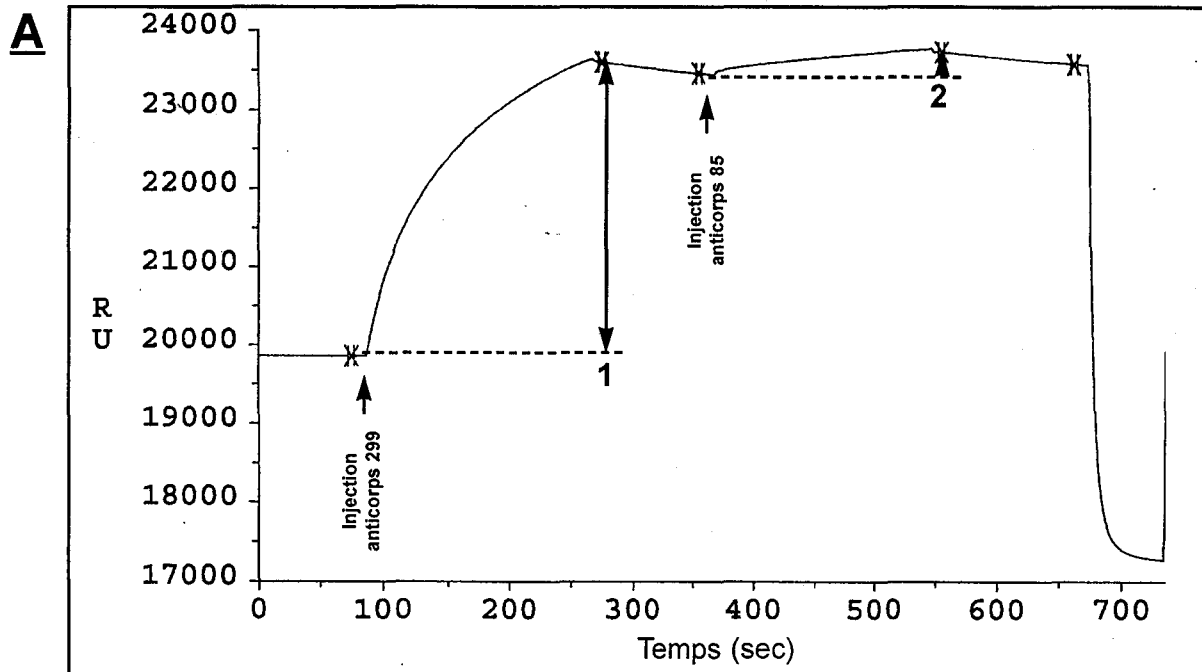
Les sensorgrammes décrits correspondent à un protocole dans lequel l'anticorps 343 est adsorbé sur la surface biospécifique (niveau de base)(figure 26A et B).

**Figure 25: Cartographie épitopique avec le *BIAcore*.**

La fixation relative de 2 anticorps sur des protéines tau recombinantes purifiées adsorbées sur la surface biospécifique est étudiée. Le niveau de base (20000 RU) correspond à l'adsorption des protéines recombinantes sur la phase.

**(A)** La fixation de l'anticorps 299 sur les protéines tau recombinantes est mesurée par l'amplitude du signal au point 1 (3753 RU). L'anticorps 85 injecté ensuite ne se fixe pas sur l'antigène (signal au point 2; 271 RU), suggérant une compétition des 2 anticorps pour la reconnaissance d'un épitope commun.

**(B)** L'anticorps 92 est injecté consécutivement à la fixation de l'anticorps 299 (3760 RU), et se fixe sur les protéines recombinantes (signal au point 2; 2531 RU). Les 2 anticorps ne sont donc pas en compétition, et reconnaissent vraisemblablement des sites différents.



La différence de résultats observée en fonction du protocole choisi peut être expliquée par deux facteurs : l'existence d'une compétition des deux anticorps vis-à-vis d'un site antigénique unique, et une affinité supérieure de l'anticorps 299 par rapport à l'anticorps 85.

Ainsi, l'anticorps 299 injecté en premier occupe la quasi-totalité des sites de fixation, et l'anticorps 85 de faible affinité ne peut déplacer l'équilibre vers une dissociation des complexes antigène/anticorps 299 déjà formés. La fixation de l'anticorps 85 est donc réduite, et le signal détecté est faible.

Lorsque l'anticorps 85 est injecté en premier, il se fixe sur les sites de fixation qui sont libres. Consécutivement à l'injection de l'anticorps 299 d'affinité supérieure, l'équilibre est déplacé vers une dissociation partielle des complexes antigène/anticorps 85, au profit de la formation de complexes antigène/anticorps 299. Le signal détecté est alors important, mais d'intensité inférieure de moitié à celle mesurée selon le premier protocole.

⇒ L'anticorps 299 est également étudié par rapport à l'anticorps 92, défini précédemment comme un anticorps amino-terminal indépendant de la phosphorylation.

L'anticorps 299 injecté en premier (3760 RU) influence peu la fixation de l'anticorps 92 sur les protéines recombinantes (2531 RU)(figure 25B). Si l'ordre d'injection des anticorps est inversé, le rapport de signal entre le premier anticorps et le deuxième anticorps fixé est conservé (3635 RU pour le 92, 2362 RU pour le 299).

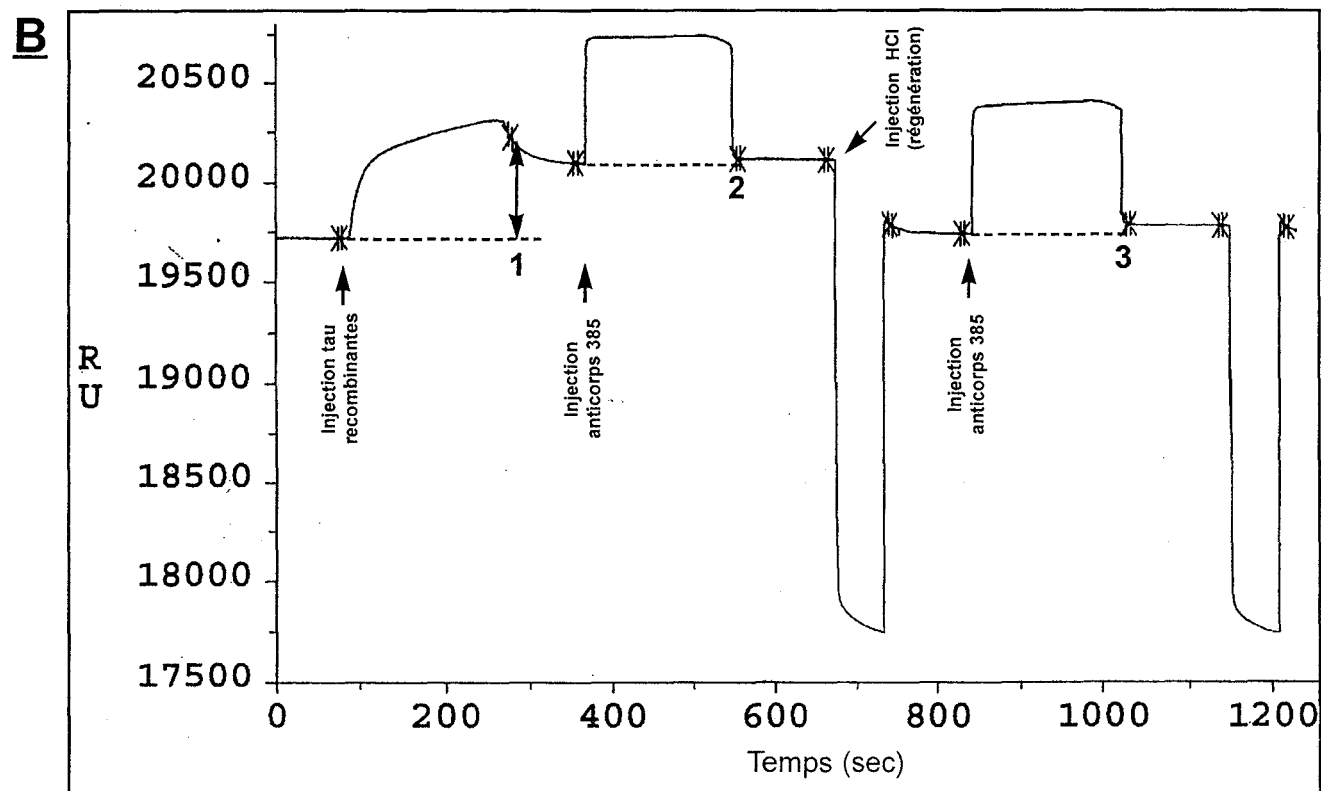
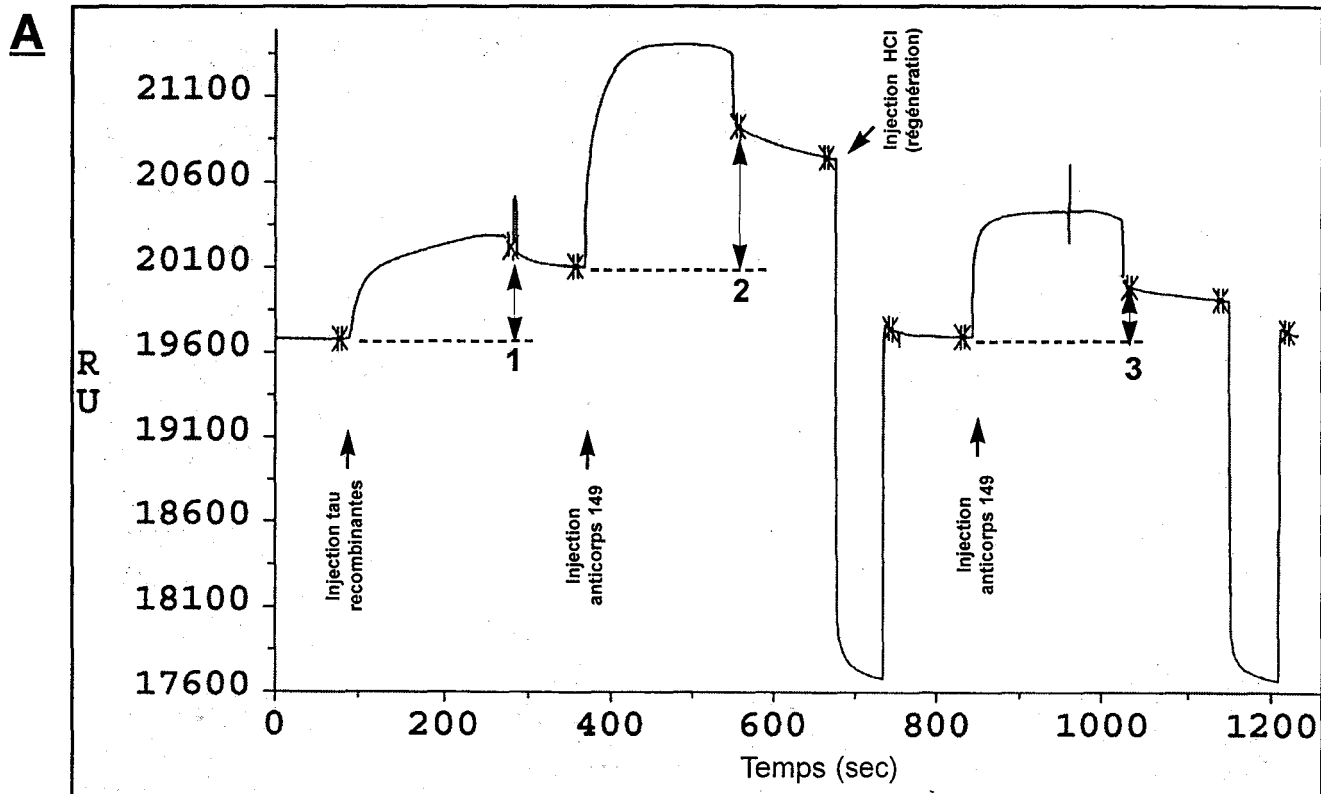
En tenant compte de l'ensemble de nos résultats de *BIACore™*, nous estimons que la variation de signal mesurée lors de l'inversion de l'ordre d'injection des anticorps 299 et/ou 92 (environ 1000 RU) ne peut être attribuée à une compétitivité au niveau de leur site de fixation. Nous considérons donc que les épitopes des anticorps 299 et 92 sont distincts, confirmant ainsi les résultats de la caractérisation biochimique décrite auparavant.

**Figure 26: Détermination des paires d'anticorps avec le *BIAcore*.**

L'anticorps 343 adsorbé sur la surface biospécifique (niveau de base; 19500 RU) est utilisé pour capturer des protéines tau recombinantes purifiées (anticorps de phase). La capacité d'un deuxième anticorps à se fixer sur l'antigène pour former un «sandwich» est étudiée.

**(A)** La capture des protéines tau recombinantes par l'anticorps de phase est mesurée par l'amplitude du signal au point 1 (544 RU). L'anticorps 149 injecté consécutivement se fixe sur l'antigène (signal au point 2; 822 RU), et l'absence de fixation de l'anticorps après régénération de la phase avec de l'acide chlorhydrique permet de vérifier la spécificité de la fixation (point 3; 292 RU). Les anticorps 343 et 149 sont donc susceptibles de constituer un «sandwich» pour un protocole ELISA.

**(B)** L'anticorps 385 ne se fixe pas sur les protéines tau recombinantes (signal au point 2; 21 RU) capturées par l'anticorps de phase (signal au point 1; 509 RU). Les anticorps 343 et 385 ne sont pas de bons candidats pour constituer un «sandwich» ELISA.



⇒ La figure 26A correspond à l'étude de la paire d'anticorps 343/ 149.

Les protéines tau recombinantes sont injectées à la concentration de 10µg/ml, et leur fixation est déterminée par l'amplitude du signal mesuré au point 1 (544 RU). L'anticorps 149 est alors injecté, et sa fixation est mesurée de la même façon, au point 2 (822 RU). Une régénération par injection de HCl est réalisée afin que ne demeure sur la surface biospécifique que l'anticorps de phase 343 covalamment fixé. Un contrôle est effectué par injection directe de l'anticorps 149, sans injection préalable de protéines recombinantes (point 3; 292 RU). Nous vérifions ainsi que le signal mesuré précédemment est bien dû à la fixation spécifique de l'anticorps 149 sur les protéines injectées, et non à une fixation aspécifique sur la surface biospécifique.

Ces résultats démontrent que certains protocoles théoriques d'ELISA définis auparavant peuvent être effectivement réalisés à l'aide des nouveaux anticorps développés. Dans le cas ici décrit, l'anticorps de phase 343 capture les protéines tau par leur extrémité amino-terminale, et l'anticorps traceur 149 les détecte par leur extrémité carboxy-terminale. Un tel protocole ELISA autorise un dosage des protéines tau totales (tau normales non-phosphorylées et tau-PHF ou tau natives phosphorylées).

⇒ Le sensorgramme de la figure 26B correspond à l'analyse de l'interaction anticorps 343/ anticorps 385.

Si dans ce cas les protéines tau recombinantes sont bien capturées par l'anticorps de phase 343 (point 1; 509 RU), l'anticorps 385 injecté en tant qu'anticorps traceur ne se fixe pas sur ces protéines (point 2; 21 RU).

Les données de caractérisation de l'anticorps 385 le définissaient comme étant spécifique d'un épitope phosphorylé. Cependant, les protéines tau recombinantes, non-phosphorylées, adsorbées sur la Sensorchip, sont détectées par l'anticorps, alors qu'elles ne le sont plus lorsqu'elles sont présentées par l'intermédiaire de l'anticorps de phase. Une des hypothèses serait donc que la conformation des protéines recombinantes puisse être

modifiées, si elles sont fixées sur un anticorps de phase ou si elles sont directement adsorbées sur la surface biospécifique

Ce deuxième type d'analyse effectué grâce à la technologie *BIAcore*<sup>TM</sup> permet donc de déterminer un certain nombre de « sandwich » possibles. Cependant, si la plupart des résultats obtenus par cette méthodologie ont ensuite été confirmés en ELISA, les données concernant les anticorps dépendants de la phosphorylation n'ont pu être toujours vérifiées.

### **III-3- CONCLUSIONS**

Actuellement, le dosage des protéines tau dans le LCR ne constitue pas un diagnostic biologique fiable de la MA. Ceci est lié au manque de spécificité des dosages immuno-enzymatiques existants, qui détectent un pourcentage non-négligeable de faux-positifs chez les sujets atteints d'autres pathologies neurodégénératives. La validation de nouveaux protocoles de dosage implique le développement en parallèle de nouvelles sondes immunologiques spécifiques des différentes formes de protéines tau potentiellement relarguées dans le LCR au cours de la MA.

Nous avons développé et caractérisé une vingtaine d'anticorps monoclonaux dirigés contre la molécule de protéines tau. Nous disposons ainsi d'anticorps spécifiques des extrémités amino- et carboxy-terminales des protéines tau, d'anticorps spécifiques de la partie médiane, et d'anticorps dirigés contre des sites phosphorylés. Les possibilités d'utiliser ces anticorps pour élaborer un immuno-dosage ont été testées, et plusieurs protocoles sont en cours de validation. En particulier, l'adaptation des conditions de dosage au milieu spécifique que représente le LCR et la comparaison des résultats obtenus avec d'autres systèmes existants sont actuellement poursuivies.



## **CONCLUSIONS**

## CONCLUSION

La maladie d'Alzheimer est une démence neurodégénérative caractérisée sur le plan neuropathologique par l'existence de dépôts amyloïdes extracellulaires et d'inclusions intraneuronales affectant exclusivement le tissu cérébral. Ces inclusions sont formées d'agrégations fibrillaires anormales, dénommées « paires de filaments appariées en hélice » (PHF), dont les constituants majeurs sont les protéines microtubulaires tau hyperphosphorylées (protéines tau-PHF).

Matsuo et collaborateurs ont cependant montré que les protéines tau natives, c'est-à-dire extraites du tissu cérébral sain sans délai post-opératoire, étaient également phosphorylées. Ils démontraient également que la distinction entre les deux catégories de protéines était toujours possible, puisque l'anticorps AT100 détectait uniquement les protéines tau-PHF (Matsuo *et al.*, 1994).

Dans ce contexte, l'objectif fixé au début de notre projet de recherche était double :

- développer de nouveaux anticorps monoclonaux et polyclonaux spécifiques des protéines tau, afin de poursuivre l'analyse moléculaire des protéines tau-PHF. La mise en évidence de caractéristiques permettant notamment de les différencier des protéines tau phosphorylées natives était espérée.
- développer un protocole d'immuno-dosage des protéines tau à partir des nouveaux anticorps, qui soit applicable au liquide céphalo-rachidien (LCR). Ce protocole devait être plus spécifique et de sensibilité au moins équivalente à celle des kits existants déjà.

A la suite des travaux de Matsuo, nous avons tout d'abord réalisé une analyse comparative des protéines tau natives et des protéines tau-PHF, en utilisant les techniques d'électrophorèse mono- et bidimensionnelles. L'anticorps monoclonal AD2, dépendant de la

phosphorylation, nous permet notamment de décrire une acidité supérieure des protéines tau-PHF par rapport aux protéines tau natives, différence qui pourrait être attribuée à une phosphorylation plus importante des protéines tau-PHF. Nous montrons également qu'une déphosphorylation totale des protéines tau natives se produit sur une période de deux heures de délai post-opératoire, délai qui peut être assimilé au délai post-mortem considéré pour les cas autopsiques.

Dans la première partie de notre projet, nous avons développé une trentaine d'anticorps monoclonaux, par immunisation de souris avec des protéines tau extraites de cerveaux Alzheimer, ou avec des peptides de synthèse. Une caractérisation complète a pu être réalisée pour un certain nombre d'entre eux, mais demeure inachevée pour d'autres. Nous décrivons ainsi :

- des anticorps indépendants de la phosphorylation spécifiques de la partie aminotermine des protéines tau.
- des anticorps indépendants de la phosphorylation spécifiques de la partie carboxyterminale des protéines tau.
- des anticorps dirigés contre la partie médiane des protéines tau.
- des anticorps dépendants de la phosphorylation, spécifiques de sites carboxyterminaux.

Dans cette dernière catégorie, plusieurs anticorps présentent une spécificité vis-à-vis des protéines tau-PHF comparativement aux protéines tau normales phosphorylées (anticorps 385 et anticorps de classe 1). Enfin, l'anticorps 61 semble posséder une spécificité particulière vis-à-vis des protéines tau-PHF de type Alzheimer uniquement.

Nous avons également développé un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre le résidu de sérine 422 phosphorylé. Cet anticorps nous a permis de compléter la caractérisation de ce site spécifique des protéines tau pathologiques, par une analyse biochimique et immunohistochimique réalisée en collaboration avec le Dr. Patrick Hof (New-York).

A ce jour, le travail de caractérisation des anticorps monoclonaux n'est pas achevé, et nous considérons donc que l'objectif fixé pour cette première partie du projet est partiellement atteint.

La deuxième partie de notre projet, visant à développer un dosage des protéines tau applicable au LCR, est réalisée essentiellement par une équipe de la société *Immunotech*, dans le cadre d'un contrat de collaboration. Les résultats obtenus à ce jour ont permis de sélectionner les anticorps les plus performants pour un protocole de type ELISA, et des paires d'anticorps définissant plusieurs types de dosage possibles ont été déterminées. La mise au point des conditions expérimentales du dosage a été réalisée en utilisant des antigènes tau autres que ceux du LCR, et la validation des protocoles choisis sur des échantillons de LCR représentent un objectif à très court terme.

# **PERSPECTIVES**

## PERSPECTIVES

Dans la séquence d'évènements conduisant à l'apparition des lésions neuropathologiques caractéristiques de la MA, la dégénérescence neurofibrillaire est souvent apparue comme une conséquence de l'amyloïdogénèse. Les travaux récents concernant les DFTP-17, caractérisées sur le plan neuropathologique par une dégénérescence neurofibrillaire mais sans dépôts amyloïdes, mettent en évidence un rôle pathogénique exclusif des protéines tau. L'analyse moléculaire de celles-ci montre que l'expression différentielle des isoformes est un élément central de la « voie tau-pathogénique », de même que la phosphorylation différentielle de certains sites sérine ou thréonine.

Ainsi, une surexpression des isoformes tau 10+ à 4 domaines répétés est décrite pour certaines formes de DFTP-17. A l'opposé, une absence d'expression de ces mêmes isoformes est mise en évidence dans la maladie de Pick. Concernant la phosphorylation, seul le résidu sérine 262 permet à ce jour de différencier une seule pathologie parmi l'ensemble des « tauopathies », de même que 4 sites phosphorylés font la distinction entre protéines tau pathologiques et protéines tau natives. Le développement de nouveaux anticorps spécifiques des protéines tau pathologiques en général, ou spécifiques des protéines tau d'une pathologie en particulier, est donc important pour analyser les mécanismes moléculaires de la dégénérescence neurofibrillaire.

Parmi les anticorps produits au cours de notre thèse, certains présentent une telle spécificité, et l'achèvement de leur caractérisation est donc un objectif prioritaire.

L'anticorps 385 (classe 1 de notre caractérisation) reconnaît un épitope phosphorylé carboxy-terminal présent uniquement dans les protéines tau pathologiques. Nous n'avons pu pour l'instant définir les résidus constituant son épitope, mais nous envisageons pour cela des expériences de mutagenèse dirigée portant sur des sites de phosphorylation. L'emploi de cette technique dans un but de cartographie épitopique a pour principal avantage d'utiliser une molécule complète de protéine tau, reproduisant ainsi au mieux un éventuel épitope conformationnel conditionné par l'intégrité de la protéine. Par ailleurs, la caractérisation des

kinases impliquées dans la phosphorylation de l'épitope est en cours et devra être poursuivie. L'utilisation des cellules COS transfectées avec l'ADNc de différentes kinases représente un outil performant pour réaliser ce travail, permettant en effet l'expression ou l'inhibition sélective des kinases. Deux hypothèses peuvent être envisagées quant à la nature de l'épitope et aux mécanismes le générant: soit l'anticorps 385 est dirigé contre un site tau-PHF spécifique déjà décrit (épitope des anticorps AT100 ou PHF-27) et pour lequel les kinases impliquées sont connues, soit l'anticorps est dirigé contre un site déjà identifié, mais pour lequel les mécanismes moléculaires sont inconnus et doivent donc être recherchés (résidu de sérine 422). Dans tous les cas de figures, l'intérêt d'une telle caractérisation est de décrire au niveau moléculaire certains des mécanismes participant à la phosphorylation pathologique des protéines tau, et donc responsables de leur agrégation sous forme de PHF.

Un travail de caractérisation semblable reste à effectuer pour l'anticorps 61 (classe 1 de notre caractérisation). La spécificité de l'anticorps est cependant différente, puisqu'une détection limitée aux protéines tau-PHF de type Alzheimer a été déterminée. L'intérêt de connaître les mécanismes impliqués dans la genèse d'un tel épitope est qu'ils sont propres, en plus de la MA, à un nombre restreint de « tauopathies », comme le syndrome de Down, le syndrome de l'île de Guam ou le Parkinson post-encéphalitique.

Dans l'optique de la mise au point du protocole de dosage des protéines tau dans le LCR, un anticorps avec un tel spectre de détection constituerait un bon outil pour obtenir un dosage de spécificité accrue. Cependant, cette hypothèse doit être modérée par l'absence de consensus actuel sur la présence ou non de formes phosphorylées de protéines tau dans le LCR.

Les perspectives offertes par les caractéristiques de l'anticorps 92 (classe 4) concernent l'analyse temporelle du processus de dégénérescence neurofibrillaire.

Les expertises réalisées par plusieurs neuropathologistes sur des coupes de cerveaux de patients atteints de « tauopathies » démontrent que l'anticorps 92 est un excellent marqueur neuritique (neurites dystrophiques et plaques neuritiques). De plus, une étude en

microscopie confocale réalisée par le Dr. Raul Mena (Mexico) montre que la majorité des éléments neuritiques marqués par l'anticorps ne sont pas colorés par le rouge de thiazine, et ne possèdent donc pas de structure secondaire en feuillets  $\beta$ -plissés. Enfin, une faible proportion de neurones avec DNF présentent les mêmes caractéristiques de comarquage. En d'autres termes, l'anticorps 92 marque essentiellement des protéines tau solubles sous forme non-agrégées et des PHF intracellulaires, et pourrait être considéré comme un marqueur des stades précoces de la DNF. Cette donnée serait intéressante à confirmer en analysant une série de patients de statut cognitif connu, afin d'établir justement cette possible corrélation entre le marquage neuritique de l'anticorps 92 et le degré d'évolution de la maladie.

Par ailleurs, le même type d'analyse en microscopie confocale est en cours avec l'anticorps 294 (classe 2) dépendant de la phosphorylation. Si notre hypothèse précédente est juste, alors les structures détectées par les deux anticorps devraient être différentes. L'anticorps 294 marquerait, en plus des structures neuritiques, un grand nombre de PHF extracellulaires.

La caractérisation de l'anticorps 294 par les techniques de western-blot et d'immunohistochimie révèle un profil semblable à celui de l'anticorps AD2, avec une reconnaissance dépendante de la phosphorylation. Néanmoins, les immunomarquages obtenus sur les fragments de protéines tau suggèrent plutôt un épitope localisé au niveau de la séquence peptidique 224-246. La détermination précise de l'épitope, en particulier grâce au *BIAcore™*, est donc un nouveau point à considérer dans les perspectives à court terme.

Les anticorps produits ont donc une application immédiate pour l'analyse moléculaire des mécanismes de formation des lésions de dégénérescence neurofibrillaire. Une seconde application est l'élaboration d'un protocole de dosage des protéines tau dans le liquide céphalo-rachidien. Les perspectives ouvertes par les résultats obtenus dans le cadre de notre collaboration avec la société *Immunotech* sont les suivantes :

- certains des anticorps produits sont utilisables pour doser les protéines tau dans un protocole ELISA de type sandwich.



- les essais réalisés, employant une source antigénique différente du LCR, permettent d'envisager différents protocoles dosant des formes phosphorylées et/ou non-phosphorylées de protéines tau.

- la calibration des dosages réalisés sur des antigènes tau comme des protéines recombinantes ou un extrait de protéines tau-PHF démontrent une sensibilité de dosage équivalente à celle du kit actuellement utilisé comme référence.

L'ensemble de résultats expérimentaux obtenus doit maintenant être validé sur des échantillons de LCR. En particulier, les conditions expérimentales du dosage définies doivent être validées en tenant compte des caractéristiques physico-chimiques du LCR.

La collecte des prélèvements de LCR est donc un problème important à prendre en compte dans la perspective de validation du dosage. La ponction lombaire est un acte médical, et son utilisation à des fins de recherche uniquement doit pouvoir être justifiée sérieusement. En particulier, le prélèvement systématique chez des sujets hospitalisés doit s'inscrire dans le cadre d'un protocole approuvé par le Comité Consultatif pour la Protection des Personnes Recherche Biomédicale local (CCPPRB). La mise en place d'un système fiable de collecte des prélèvements, ou l'utilisation d'une banque de LCR déjà existante, même si elle ne constitue pas une perspective à proprement parler, est donc à considérer pour la suite de notre projet.

En conclusion, nous pouvons dire que les perspectives ouvertes par notre travail sont, à court terme, la mise à disposition d'outils immunologiques nouveaux utiles pour l'étude moléculaire des mécanismes de la dégénérescence neurofibrillaire. A moyen terme, nous pouvons envisager la définition d'un protocole ELISA de dosage des protéines tau dans le LCR, utilisable à des fins de recherche. Enfin, à long terme, nous pouvons espérer valider ce protocole pour un usage de diagnostic clinique. L'élaboration d'un tel dosage devient aujourd'hui indispensable pour l'évaluation clinique des traitements symptomatiques de la maladie d'Alzheimer qui rentrent en phase d'essais cliniques.

**MATERIEL  
et  
METHODES**

## MATERIELS ET METHODES

### I- PRODUCTION DES ANTICORPS

#### I-1- ANTIGENES

##### I-1-1- Peptides de synthèse

Différents peptides correspondant à des portions de la séquence peptidique de la protéine Tau sont utilisés pour produire des anticorps polyclonaux et monoclonaux. Les séquences utilisées comportent un ou deux résidus de sérine phosphorylée.

Désignation du peptide	Séquence Tau correspondante *	Epitope d'intérêt	Type d'anticorps
S422P	417-427	Sérine 422 phosphorylée	Polyclonal
S435P	428-441	Sérine 435 phosphorylée	Monoclonal
S433P-S435P	428-441	Sérines 433 et 435 phosphorylées	Monoclonal

\* Selon la numérotation de l'isoforme la plus longue de protéine Tau.

La synthèse des peptides est réalisée chez *Neosystems* (Strasbourg – France), de même que le couplage au BDB (Bis diazobenzidine) sur la KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin).

### **I-1-2- Extrait protéique**

Une préparation de protéines Tau-PHF, extraites à partir d'un cerveau de patient Alzheimer confirmé (selon les critères du NINCDS-ADRDA), est injectée à des souris afin de produire des anticorps monoclonaux spécifiques des protéines Tau-PHF. Le protocole utilisé est décrit par Mercken et collaborateurs (1992).

Un prélèvement de cortex frontal est homogénéisé dans un tampon H (Tris 10mM / NaCl 0.8M / Sucrose 10% / EGTA 1mM - pH 7.4) selon un rapport 1/10 (p/v). Après une première ultracentrifugation à 27000g, le surnageant est repris et incubé pendant 2 heures, sous agitation constante, avec un détergent (N-Lauroylsarcosine 1% p/v) et un agent réducteur ( $\beta$ -mercaptoethanol 1% v/v). La suspension est une nouvelle fois centrifugée, à 108000g, et le culot contenant les protéines Tau-PHF est repris en PBS 0,1M.

La préparation obtenue est testée par western-blot, après électrophorèse d'un échantillon en gel de polyacrylamide 10% en présence de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS-PAGE), et immuno-marquage avec l'anticorps monoclonal AD2. La quantité de protéines totales de la préparation est mesurée par la méthode BCA (Kit BCA™ - Pierce).

## **I-2- ANTICORPS**

### **I-2-1- Anticorps polyclonaux**

Des lapins *New-Zealand* sont immunisés selon le protocole initialement décrit par Vaitukaitis et collaborateurs (1971). L'immunisation est faite par injection intradermique de 200 $\mu$ g d'équivalent peptide, en émulsion dans l'adjuvant complet de Freund (rapport 1/1 v/v). Un rappel est fait toutes les 3 semaines par injection en intradermique d'une dose de 100 $\mu$ g

d'équivalent peptide, en émulsion dans l'adjuvant incomplet de Freund (rapport 1/1 v/v). A partir de la troisième injection, les lapins sont saignés à l'oreille 10 jours après chaque injection.

Après coagulation à température ambiante, les sérums sont prélevés et centrifugés 20 minutes à 2200 rpm. Un petit volume de l'immunsérum obtenu est mélangé avec du glycérol (1/1 v/v) et conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour l'usage courant. Les stocks de sérum natif sont conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Les immunsérums produits sont caractérisés par western-blot, contre des homogénats totaux de cerveaux de patients atteints de MA et contre des homogénats totaux de cerveaux de sujets témoins (prélèvements autopsiques ou biopsiques). Les immunsérums sont également caractérisés par immunohistochimie, sur coupes en congélation de cerveaux de patients atteints de MA. Les saignées sont testées comparativement afin de suivre l'évolution du titre du sérum et sa spécificité.

## **I-2-2- Anticorps monoclonaux**

### **I-2-2-1- Protocole d'immunisation**

Des souris BALB/c âgées de 6 semaines sont immunisées par injection en intrapéritonéal d'une émulsion composée de  $100\mu\text{g}$  de protéines totales, ou d'équivalent peptide, et d'adjuvant complet de Freund (rapport 1/1 v/v). Quatre rappels sont faits à 3 semaines d'intervalle avec une dose d'antigène reprise en adjuvant incomplet de Freund (rapport 1/1 v/v). Les souris sont saignées au niveau de la veine caudale 10 jours après la deuxième injection. La spécificité et le titre des sérums correspondants sont testés par western-blot et immunohistochimie.

Les souris sélectionnées sont laissées au repos pendant 2 à 3 mois avant de recevoir une dernière dose d'antigène, reprise en PBS, par injection dans la veine caudale, 3 à 4 jours avant la fusion.

#### I-2-2-2- Fusion

La rate prélevée est disséquée dans une boîte de Pétri à l'aide de 2 pinces, en milieu RPMI (*Biowhittaker*). Après centrifugation du broyât de splénocytes, le culot récupéré est soumis à l'action d'un tampon de lyse (*Sigma*) afin de lyser les globules rouges.

Les splénocytes sont ensuite rincés 2 fois en milieu RPMI avant d'être mélangés aux cellules de myélome X63Ag8, selon le rapport myélomes/splénocytes de 1/5. Un rinçage est effectué avant la fusion proprement dite, qui est réalisée par addition lente de PEG (PEG 1500, *Boehringer Mannheim*), puis addition progressive de milieu RPMI. La suspension contenant les hybridomes est lavée une fois, puis le culot est resuspendu en milieu RPMI sélectif HAT (Hypoxanthine - Aminoptérine – Thymidine). Les hybridomes sont repartis à 100000 cellules / puits, dans des plaques de culture 96 puits, préparées la veille avec des macrophages péritonéaux de souris.

Les plaques de culture sont placées dans un incubateur à CO<sub>2</sub> (5%) à température constante (37°C), et la moitié du milieu de chaque puits est remplacée par du milieu frais à J+3 et J+7. Les surnageants sont prélevés à partir de J+12 pour être criblés.

#### I-2-2-3- Criblage des clones

Les surnageants de culture d'hybridomes sont criblés en première intention par une technique ELISA. Les surnageants positifs sont ensuite testés en western-blot et immunohistochimie.

Le protocole ELISA permet de tester l'immunoréactivité des surnageants d'hybridomes contre :

- le peptide d'immunisation et la préparation de protéines tau-PHF pour l'immunisation avec le peptide ser433P/ser435P.
- un homogénat de cerveau Alzheimer, comparativement à un homogénat de cerveau témoin pour l'immunisation avec l'extrait protéique.

L'antigène adsorbé provient soit d'une solution de protéines cérébrales totales à 20µg/ml, préparée à partir d'homogénats en solution de Laemmli, soit d'une solution de peptide couplé à la KLH, à la concentration de 4µg/ml. L'adsorption est réalisée sur des plaques de microtitration en polystyrène opaque (Microlite I™, Dynatech), par incubation à 4°C sur la nuit ou à 37°C pendant 3 heures, d'un volume de 50µl / puits de la solution d'antigène. Les puits sont rincés 2 fois avec une solution NaCl 150 mM / Tween20 0,05% (Laveur de plaques - Immunotech), puis saturés avec une solution PBS / BSA 0,5% pendant 2 heures à 37°C. Les surnageants d'hybridomes sont ensuite incubés 2 heures à température ambiante, et les complexes antigène-anticorps formés sont détectés grâce à un anticorps secondaire anti-souris couplé à la peroxydase (Immunotech), dilué dans un tampon PBS / BSA 0,1%. La révélation est faite par addition de 50µl / puits de substrat luminescent (ILMA™, Immunotech ou ECL™, Amersham), le signal émis étant quantifié avec un luminomètre à plaques (Liana, Immunotech).

#### I-2-2-4- Expansion des hybridomes *in-vivo*

La technique de l'ascite (Hoogenrad *et al.*, 1983) est utilisée pour l'expansion des clones d'intérêt et la production en grande quantité des anticorps correspondants.

L'injection en intra-péritonéal de 0.5 ml de pristane (tetramethylpentadecane) chez des souris BALB/c de 4 à 8 semaines a pour effet de favoriser le développement de tumeur. Ainsi, l'injection de  $5.10^6$  cellules d'un clone d'intérêt se traduit par une croissance importante des hybridomes sous forme de tumeur. Le liquide d'ascite alors produit par la tumeur est riche en anticorps caractéristique du clone injecté. Chaque souris est prélevée plusieurs fois avant d'être sacrifiée.

#### I-2-2-5- Isotypage et purification des anticorps

L'isotype des anticorps sélectionnés est effectué à l'aide du kit " Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit™ " (*Amersham*), en utilisant le surnageant de culture. L'isotype de l'anticorps détermine le choix de la méthode de purification. Tous les anticorps étudiés étant de l'isotype G1, à l'exception d'un seul, seule la purification par chromatographie d'affinité sur protéine A est décrite.

Le principe de la méthode de purification est une chromatographie d'affinité entre la protéine A (Protéine A Sepharose 4 Fast Flow™, *Pharmacia*) et les immunoglobulines G de classe 1 (IgG1). Le liquide d'ascite prélevé dans la cavité abdominale des souris est centrifugé, filtré (0,8µm) et délipidé (filtre Sep Pak™). Il est dilué au 1/2 dans un tampon de charge de forte force ionique (Glycine 0.5M / NaCl 3M - pH 8.5), puis déposé sur la colonne de protéine A avec un débit de charge de 1ml/min. Les immunoglobulines non-fixées sont éliminées de la colonne par rinçage avec le tampon de charge, puis l'élution sélective des IgG1 est effectuée avec un tampon acide (tampon Citrate 0.1M - pH 5.0). Les immunoglobulines autres sont éluées avec un tampon plus acide (tampon Citrate 0.1M - pH 3.0).

Les fractions d'élution sont recueillies au moyen d'un collecteur, après lecture de la densité optique (DO) à 280nm. Les fractions correspondant au pic d'élution sont poolées, dialysées contre un tampon Borate 20 mM / NaCl 150 mM - pH 8.5. La concentration finale de la solution d'anticorps purifié est déterminée par lecture de la DO à 280 nm ( $\epsilon$  molaire = 1.48).



## II- CARACTERISATION DES ANTICORPS

### II-1- MATERIEL BIOLOGIQUE

#### II-1-1- Cerveaux

##### II-1-1-1- Matériel autopsique

Les cerveaux de patients atteints de maladie d'Alzheimer et les cerveaux de sujets témoins proviennent :

- des services de neurologie du CHR&U de Lille (Professeurs H. Petit, P. Vermersch, A. Destée, F. Pasquier, Docteur F. Lebert),
- du service de neuropathologie du CHR&U de Lille (Professeur M-M. Ruchoux, Docteur C-A. Maurage),
- du service de Gériatrie clinique de l'hôpital Emile Roux à Limeil-Brévannes (Professeur C. Di Menza, Docteur J-P. David),

Certains cerveaux de patients atteints de pathologies neurodégénératives autres proviennent également de ces services.

La majorité des cerveaux de patients atteints de PSP, CBD, PiD ont été obtenus dans le cadre du projet Image (Docteurs Y. Robitaille, D. Gauvreau - Montréal).

Des homogénats de cerveaux proviennent également du Mount Sinai Hospital, New-York, NY (Docteur P.R Hof), et du Guam Memorial Hospital, Agana, Guam.

##### II-1-1-2- Matériel biopsique

Les pièces biopsiques sont obtenues à la clinique Neurochirurgicale du CHR&U de Lille (Professeur Christiaens). Elles proviennent de patients opérés pour des tumeurs de l'encéphale, et correspondent à du tissu " sain " péri-tumoral prélevé dans la marge de sécurité autour de la tumeur. Dès l'excision, le prélèvement est rincé dans du sérum physiologique maintenu à 4°C, puis immédiatement congelé dans l'azote liquide (-196°C).

### **II-1-2- Liquide céphalo-rachidien**

Les LCR de patients atteints de maladie d'Alzheimer ou d'autres pathologies neurodégénératives et les LCR de sujets témoins proviennent de ponctions lombaires effectuées dans les services de neurologie du CHR&U de Lille.

Les LCR sont prélevés de façon aseptique, en position assise. Ils sont immédiatement congelés dans l'azote liquide, afin de réduire les réactions de protéolyse susceptibles d'apparaître après la ponction lombaire. Le prélèvement est ensuite décongelé à 4°C, puis aliquoté en fractions de 300 à 500 µl. Les aliquots de LCR natif sont conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

## **II-2- TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE**

### **II-2-1- Protéines tau recombinantes**

Les protéines Tau recombinantes utilisées correspondent à l'isoforme la plus longue, soit l'isoforme 2+3+10+ de 441 acides aminés. La préparation nous a été fournie par le Dr. M. Goedert (MRC - Cambridge - UK). Ces protéines ne sont pas phosphorylées.

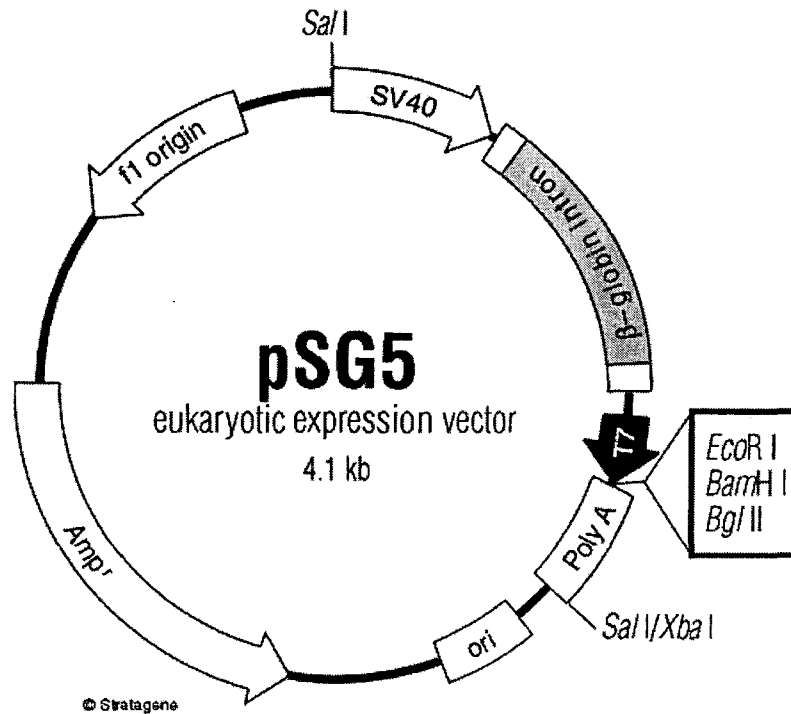
## II-2-2- Protéines tau et constructions de protéines tau obtenues par transfection

Les 6 isoformes de protéines tau sont obtenues par transfection transitoire des ADNc correspondants dans des cellules COS. De la même façon, des fragments peptidiques tronqués, correspondant aux séquences 1 à 225 (fragment BstXI) et 1 à 49 liguée avec la séquence 245 à 441 (fragment PstI), sont produits par transfection des fragments plasmidiques correspondants (figure 27).

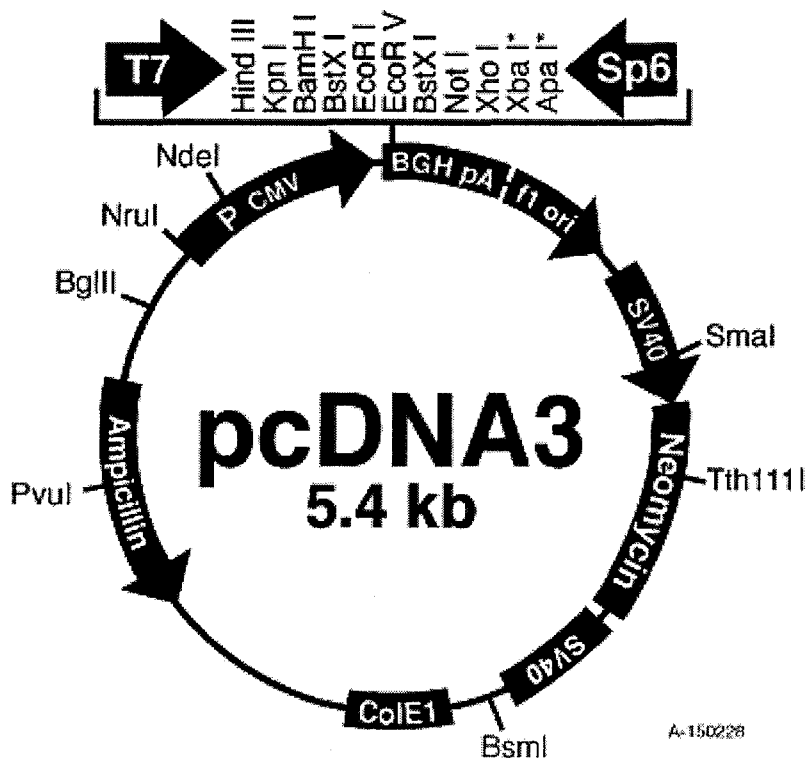
Les ADN complémentaires (ADNc) des 6 isoformes de protéines Tau insérés dans le vecteur eucaryote pSG5 (*Stratagene*)(figure 28A) nous ont été fournis par le Dr. Michel Goedert.

Pour la construction PstI, le plasmide pSG5 contenant l'ADNc de l'isoforme la plus longue de protéine tau (441 acides aminés) est digéré par l'enzyme de restriction PstI. pSG5 ne possède pas de site de restriction de cette enzyme, mais 2 sites sont présents dans l'ADNc de tau aux positions. Ainsi, le vecteur plasmidique obtenu après digestion et ligation sera amputé d'une séquence au milieu de l'ADNc de tau, mais le cadre de lecture sera respecté (figure 27).

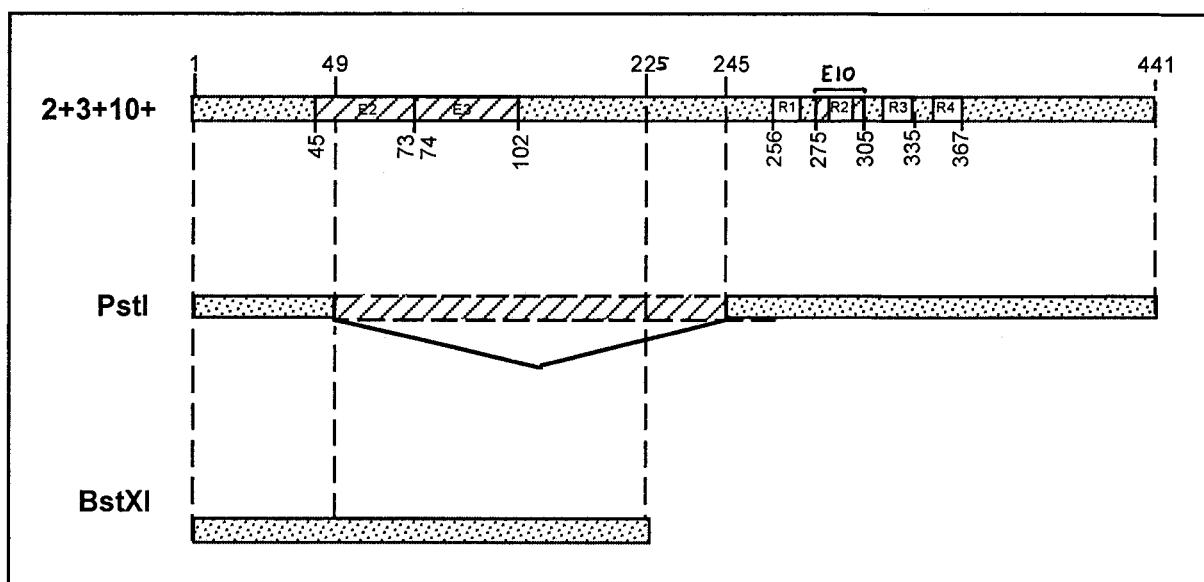
Pour la construction BstXI, l'ADNc de l'isoforme la plus longue est cloné entre les sites BamHI et EcoRI du vecteur eucaryote pcDNA3 (*InVitrogen*)(figure 28B). Ce clonage supprime l'un des 2 sites BstXI du multisite de clonage (MSC). L'enzyme de restriction BstXI est utilisée pour la digestion, car il existe encore 2 sites de restriction BstXI au sein de l'ADNc de tau et un au sein du MSC (figure 29). La digestion libère donc 2 fragments de l'ADNc de tau d'une part (séquence nucléotidique 676 à 1094 et séquence comprise entre 1094 et le site BstXI du MSC), et le vecteur avec la séquence restante de l'ADNc de tau correspondant aux nucléotides 1 à 676 d'autre part. Un codon stop est trouvé peu après dans la séquence codante de tau. Après transfection, les cellules COS expriment un fragment peptidique correspondant à la séquence 1-225 de la protéine tau, suivi d'une séquence non-spécifique (figure 27).



**Figure 28A:** Représentation schématique du vecteur eucaryote pSG5. Il contient une origine de réplication bactérienne (ori) ainsi que le gène codant la résistance à l'ampicilline afin de pouvoir amplifier le plasmide chez un hôte bactérien. Il comprend également le promoteur précoce du virus SV40, l'intron II du gène de la  $\beta$ -globine de lapin et une séquence polyA, ce qui facilite l'expression des inserts dans un système eucaryote. Le multisite de clonage est localisé juste avant la séquence polyA, et les inserts sont clonés dans le site EcoRI. Il comprend enfin le promoteur T7 et une origine f1.



**Figure 28B:** Représentation schématique du vecteur eucaryote pcDNA3. L'ADNc de tau cloné entre les sites BamHI et EcoRI est sous le contrôle du cytomégalovirus (CMV). En arrière du multisite de clonage se trouve la séquence polyA de l'hormone de croissance bovine (BGHpA), ce qui augmente la stabilité des inserts exprimés en système eucaryote. Ces vecteurs possèdent une origine de réplication bactérienne (ColE1) ainsi qu'un gène codant la résistance à l'ampicilline afin d'amplifier les plasmides avant transfection. Ils comportent également une origine SV40, le promoteur précoce SV40 et le signal de polyadénylation de SV40 entre lesquels est inséré le gène codant la résistance à la neomycine. Ces vecteurs comprennent enfin une origine f1 et le promoteur T7.

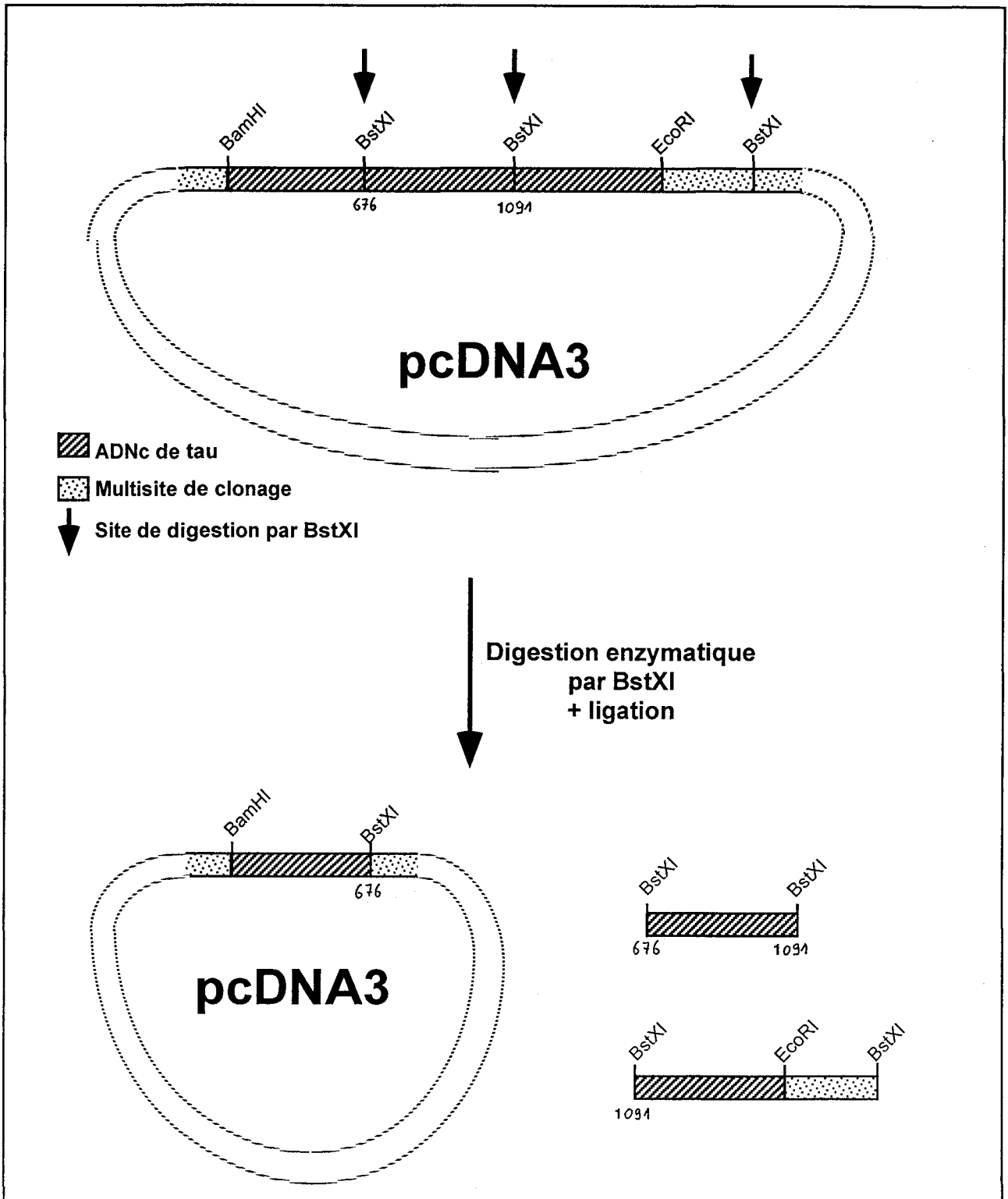


**Figure 27 :** Constructions de protéines tau réalisées à partir de l'isoforme 2+3+10+ (441 acides aminés).

Les exons 2, 3 et 10 sont notés E2, E3 et E10. Les domaines répétés constituant la région de liaison des protéines tau aux microtubules sont notés R1 à R4. Les chiffres indiquent les résidus d'acides aminés d'intérêt.

Les ADNc des six isoformes de protéines Tau ainsi que les ADNc correspondant aux constructions PstI et BstXI sont transfectés transitoirement dans des fibroblastes simiens de type COS-7 issus de cellules rénales de singe vert d'Afrique, transformées par le virus SV40. Les transfections sont réalisées par la méthode chimique au DEAE-dextran (*Pharmacia Biotech*).

Les isoformes de protéines Tau et les fragments exprimés par les cellules transfectées peuvent être hyperphosphorylées, par traitement des cellules avec l'acide okadaïque (250nM) (*Sigma*), inhibiteur des phosphatases 1 et 2A (*Sautière et al.*, 1994).



**Figure 29:** Obtention du fragment plasmidique BstXI à partir de l'ADNc de l'isoforme la plus longue de protéine tau (441 acides aminés). L'ADNc est cloné entre les sites BamHI et EcoRI du multisite de clonage du vecteur pcDNA3. 2 sites de restriction BstXI sont présents dans l'ADNc de tau et un dans le multisite de clonage. La digestion par BstXI libère donc le vecteur avec la séquence nucléotidique tau 1 à 676 d'une part, et 2 fragments d'autre part. La transfection du vecteur plasmidique dans les cellules COS permet d'obtenir un fragment de protéine tau, correspondant à la séquence peptidique 1-225.

## II-3- TECHNIQUES DE BIOCHIMIE

### II-3-1- Electrophorèse en gel de polyacrylamide, en présence de SDS (SDS-PAGE)

Les prélèvements de cerveaux ou les culots de cellules transfectées sont homogénéisés dans la solution de Laemmli – 5% SDS p/v ; 50mM Tris pH 6.8 ; 4mM EDTA ; 3mM EGTA ; 10% glycérol ; bleu de bromophénol - (rapport 1/10 p/v) en présence de dithiotréitol, agent réducteur (0.25% p/v). Les homogénats sont chauffés 10 minutes à 100°C avant d'être déposés sur le gel d'électrophorèse. Les homogénats sont conservés à -20°C.

Les électrophorèses sont effectuées :

- sur grands gels de polyacrylamide en gradient 10-20%, en présence de 0.1% de SDS (cuve " Protean®II xi cell ", *Bio-Rad*) pour les homogénats de cerveaux.
- sur mini-gels de polyacrylamide continu 10%, en présence de 0.1% de SDS (Cuve " Mighty small™ SE245", *Hoefler*) pour les homogénats de cerveaux ou les homogénats de cellules transfectées avec les isoformes de protéines Tau.

sur mini-gels de polyacrylamide continu 15%, en présence de 0.1% de SDS (Cuve " Mighty small™ SE245", *Hoefler*) pour les homogénats de constructions de protéine Tau.

Tous les types de gel d'électrophorèse utilisés sont composés d'un gel de concentration surmontant le gel de séparation.

La polymérisation des gels est initiée par addition de persulfate d'ammonium à la concentration finale de 1mg/ml.

	Gel de séparation (pH 8.8)			Gel de concentration (pH 6.8)
	Solution à 10% d'acrylamide	Solution à 15% d'acrylamide	Solution à 20% d'acrylamide	Solution à 5% d'acrylamide
<b>Tris-HCl</b>	0.3M	0.3M	0.3M	0.1M
<b>Acrylamide</b>	10% (p/v)	15% (p/v)	20% (p/v)	5% (p/v)
<b>Bis acrylamide</b>	0.266% (p/v)	0.399% (p/v)	0.532% (p/v)	0.08% (p/v)
<b>SDS</b>	0.1% (p/v)	0.1% (p/v)	0.1% (p/v)	0.1% (p/v)
<b>Temed</b>	300µl	300µl	300µl	500µl
<b>Glycérol</b>	-	-	20% (v/v)	-
<b>qsp H<sub>2</sub>O</b>	1000ml	1000ml	1000ml	1000ml

La séparation électrophorétique des protéines est réalisée sur la nuit sous un ampérage constant de 11mA / gel pour les grands gels, ou sous un ampérage de 15 mA / gel pendant 90 minutes pour les mini- gels.

Tampon d'électrophorèse Tris / Glycine (pH 8.3)	
<b>Tris-HCl</b>	25mM
<b>Glycine</b>	200mM
<b>SDS</b>	0.1 % (p/v)



### II-3-2- Technique de l'immuno-empreinte

Après séparation électrophorétique en fonction de leur poids moléculaire, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose 0.45 $\mu$ m (Hybond™ ECL™, Amersham) au moyen d'un appareil de transfert en milieu semi-liquide *LKB Multiphor II Nova Blot*, pendant 1h00 (0.8mA/cm<sup>2</sup>). Les tampons anode et cathode sont préparés selon les instructions du fabricant. L'efficacité du transfert est contrôlée par une coloration réversible des protéines au rouge Ponceau (Acide trichloroacétique 3% p/v ; rouge Ponceau 2S 2% p/v).

La technique de l'immunoempreinte est réalisée selon la méthode initialement décrite par Towbin et collaborateurs (1979).

La saturation des sites de fixation non-spécifiques est réalisée par incubation de la membrane de nitrocellulose dans du TNT contenant 5% de lait délipidé, pendant 30 minutes. Les anticorps primaires polyclonaux ou monoclonaux sont dilués dans ce même tampon TNT. Certains anticorps polyclonaux peuvent être dilués dans du TNT contenant 5% de lait afin de réduire le bruit de fond. L'incubation avec l'anticorps primaire est réalisée soit à température ambiante pendant 90 minutes, soit à 4°C sur la nuit. Les anticorps secondaires anti-espèce, utilisés à la dilution de 1/4000 dans du TNT, sont marqués à la peroxydase (*Sigma*). Ils sont adsorbés contre les protéines sériques humaines afin de réduire les marquages aspécifiques dus aux réactions croisées. L'incubation avec l'anticorps secondaire est poursuivie pendant 45 minutes à température ambiante.

La détection des complexes antigènes-anticorps formés est réalisée par chimioluminescence, à l'aide du kit ECL™ (*Amersham*). Le principe de la chimioluminescence est le suivant :

Un composé cyclique appelé luminol est oxydé par la peroxydase, en présence d'eau oxygénée, et se retrouve dans un état excité. Le luminol revient à l'état stable en dissipant l'énergie d'excitation par émission de lumière. Cette lumière impressionne alors un film

#### II-4-1-1-2- Protocole d'immunomarquage

Les coupes sont rehydratées dans un tampon Tris salin (Tris 50mM pH 8,0 ; Tween 20 0,05% ; NaCl 138 mM ; KCl 3 mM) pendant 10 minutes, à température ambiante, avant de débiter la procédure d'immunomarquage.

L'activité peroxydasique endogène est bloquée par incubation des coupes dans une solution de peroxyde d'hydrogène 3% pendant 5 minutes. Après 3 rinçages dans le TBS, les coupes sont incubées avec l'anticorps primaire pendant 1h30 à température ambiante. Les structures histologiques spécifiquement marquées par l'anticorps primaire sont révélées par un anticorps secondaire marqué à la peroxydase (*Sanofi Diagnostic Pasteur*), en utilisant la DAB (3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride) pour chromogène.

Une contre-coloration des noyaux est faite avec une solution d'Hemalun de Mayer (*Merck*), et rinçage des lames avec une solution ammoniacuée à 2.5°/°°.

Les lames sont montées à l'*Eukitt™ (Kindler GmbH)* après déshydratation par passage dans 3 bains d'alcool (35°, 50°, absolu) et 3 bains de toluène.

Le kit d'immunomarquage Streptavidine-peroxydase avec DAB (*Immunotech*) est également utilisé. Le protocole suivi est celui décrit dans la fiche technique du kit.

#### II-4-1-2- Coupes en paraffine

Le protocole d'immunomarquage décrit est celui qui est utilisé en pratique au laboratoire. Les protocoles propres à chaque laboratoire avec qui nous avons collaboré ne sont pas détaillés.

Les coupes sont déparaffinées par passage dans 3 bains successifs de toluène, puis 3 bains d'alcool (absolu, 50°, 35°). Les coupes déparaffinées sont placées dans une cuve contenant un tampon citrate 10mM pH 6.0, puis sont passées au four micro-ondes (puissance 800 watts) trois fois 5 minutes. Après refroidissement à température ambiante, les coupes

sont incubées avec l'anticorps primaire selon le protocole décrit précédemment pour les coupes en congélation.

## **II-5- TECHNOLOGIE DU BIACORE™**

La technologie BIAcore™ permet de suivre en temps réel des interactions entre biomolécules non-marquées, dans un débit continu de tampon. Elle est utilisée pour définir les paires d'anticorps qui seraient potentiellement utilisables dans un sandwich ELISA, mais également pour la cartographie épitopique des anticorps.

### **II-5-1- Principe**

Le principe physique de la technologie BIAcore™ est la résonance plasmonique de surface (SPR): un des réactifs, le ligand, est fixé de manière spécifique sur une interface appelée " Sensor Chip ". Les autres partenaires de l'interaction, les analytes, sont injectés à débit constant par un circuit microfluidique au contact de l'interface. Un module de détection SPR permet de détecter les changements d'indice de réfraction de la solution circulante. L'intensité de la réponse, exprimée en unité de résonance (ou RU), est directement liée aux changements de masse à la surface du biocapteur, dus à la formation puis à la dissociation des complexes moléculaires. Une variation de 1000 RU correspond à une fixation de protéine de 1ng/mm<sup>2</sup>.

### **II-5-2- Protocoles**

Deux types d'essais sont effectués sur un appareil BIAcore™, au centre d'immunologie de Marseille Luminy (CIML), avec la collaboration du Dr. Claude Grégoire :

- Adsorption de protéines Tau recombinantes sur l'interface biospécifique et étude de la fixation des anticorps par paires sur cet antigène.
- Adsorption d'anticorps monoclonaux purifiés sur l'interface biospécifique, puis injection de protéines recombinantes, suivie de l'injection d'un deuxième anticorps monoclonal purifié.

Les groupements carboxyles du gel de Dextran recouvrant le biocapteur (Sensor Chip CM5) sont activés en esters de succinimide par injection dans le circuit microfluidique d'une solution NHS-EDC (N-hydrosuccinimide N-ethyl-N'-(3-dimethyl-amino-propyl)-carbodiimide hydrochloride). Le ligand d'intérêt (protéines Tau recombinantes à 100µg/ml ou anticorps monoclonal purifié à 50µg/ml) étant injecté dans le système, les groupements carboxyles activés du dextran vont établir des liaisons peptidiques avec les groupements amine primaire des protéines injectées. Une injection d'éthanolamine 1M (donneur de groupements NH<sub>2</sub>) est effectuée pour désactiver les esters de succinimide n'ayant pas réagi avec les amines du ligand, et obtenir ainsi une matrice homogène. Dans un deuxième temps, sont injectés soit les protéines Tau recombinantes (anticorps monoclonal sur la phase), soit un anticorps (protéine recombinante sur la phase). Enfin, un deuxième anticorps est injecté afin d'établir une éventuelle compétition entre les anticorps pour la reconnaissance d'un même épitope. Le suivi des interactions est fait à l'aide d'un sensorgramme exprimant une variation de RU en fonction du temps.

(Hyperfilm ECL™, Amersham), permettant la visualisation des protéines détectées par l'anticorps primaire.

Une modification de la méthode décrite est utilisée pour certains anticorps spécifiques des protéines Tau-PHF.

Après électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (Hybond™ - PVDF, Amersham), préalablement rendue hydrophile par immersion dans le méthanol. La saturation de la membrane est réalisée avec du TBS-Tween20 0.5%. La suite du protocole d'immunomarquage est identique à celui précédemment décrit.

## **II-4- TECHNIQUES D'IMMUNOHISTOCHEMIE**

### **II-4-1-1- Coupes en congélation**

#### **II-4-1-1-1- Préparation des coupes**

Lors d'autopsies, des prélèvements de tissu cérébral sont effectués au niveau de l'hippocampe, des aires 10 (cortex frontal), 39 (cortex entorhinal), 17-18 (cortex occipital) et 20-21 (cortex temporal), selon la numérotation de la classification de Brodman. Les pièces autopsiques sont fixées par immersion dans un tampon phosphate contenant 4% de paraformaldehyde, pendant 12 à 24 heures. Une post-fixation est réalisée dans une solution de PBS 0.1M à 20% de sucrose. Les pièces sont incluses dans du *Tissu-Tek™* et congelées dans l'isopentane refroidi à  $-196^{\circ}\text{C}$  par de l'azote liquide. Les blocs sont conservés à  $-50^{\circ}\text{C}$ .

Des coupes sériées de  $10\mu\text{m}$  d'épaisseur sont faites au cryostat, déposées sur lames gélatinées et conservées à  $-50^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur utilisation.

# **BIBLIOGRAPHIE**

## BIBLIOGRAPHIE

### -A-

Abraham C.R., Selkoe D.J., Potter H. (1988) Immunohistochemical identification of the sérine protease inhibitor alpha-1 antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Cell*. 52: 487-501.

Albert M.S., Feldman R.G., Willis A.L. (1974) The subcortical dementia of progressive supranuclear palsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 37: 121-130.

Alzheimer A. (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *64*: 146-148.

Andreadis A., Brown W.M., Kosik K.S. (1992) Structure and novel exons of the human-tau gene. *Biochemistry*. 31: 10626-10633.

Andreadis A., Broderick J.A., Kosik K.S. (1995) Relative exon affinities and suboptimal splice site signals lead to non-equivalence of two cassette exon. *Nucleic Acids Res*. 23: 3585-3593.

Andreasen N., Vanmechelen E., Van de Voorde A., Davidsson P., Hesse C., Tarvonen S., Raiha I., Sourander L., Winblad B., Blennow K. (1998) Cerebrospinal fluid tau protein as a biochemical marker for Alzheimer's disease: a community based follow up study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 64: 298-305.

Arai H., Terajima M., Miura L., Higuchi S., Muramatsu T., Machida N., Seiki H., Takase S., Clark C.M., Lee V.M.Y., Trojanowski J.Q., Sasaki H. (1995) Tau in cerebrospinal fluid: A potential diagnostic marker in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 38: 649-652.

Arai H., Morikawa Y., Higuchi M., Matsui T., Clark C.M., Miura M., Machida N., Lee V.M.Y., Trojanowski J.Q., Sasaki H. (1997) Cerebrospinal fluid tau levels in neurodegenerative diseases with distinct tau-related pathology. *Biochem Bioph Res Co*. 236: 262-264.

Arai H., Clark C.M., Ewbank D.C., Takase S., Higuchi S., Miura M., Seki H., Higuchi M., Matsui T., Lee V.M.Y., Trojanowski J.Q., Sasaki H. (1998) Cerebrospinal fluid tau protein as a potential diagnostic marker in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. 19: 125-126.

Arnold S.E., Hyman B.T., Flory J., Damasio A.R., Van Hoesen G.W. (1991) The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cereb Cortex*. 1: 103-116.

Avila J., Ulloa L., Diez-Guerra J., Diaz-Nido J. (1994) Role of phosphorylated MAP1B in neuritogenesis. *Cell Biol Int*. 18: 309-314.

Aizawa H., Kawasaki H., Murofushi H., Kotani S., Suzuki K., Sakai H. (1989) A common amino acid sequence in 190-kDa microtubule-associated protein and Tau for the promotion of microtubule assembly. *J Biol Chem.* 264: 5885-5890.

**-B-**

Baudier J. et Cole R.D. (1987) Phosphorylation of tau proteins to a state like that in Alzheimer's brain is catalyzed by a calcium/calmodulin-dependent kinase and modulated by phospholipids. *J Biol Chem.* 262(36): 17577-17583.

Baudier J., Lee S.H., Cole R.D. (1987) Separation of the different microtubule-associated Tau protein species from bovine brain and their mode II phosphorylation by Ca<sup>++</sup>/phospholipid-dependent protein Kinase C. *J Biol Chem.* 262(36): 17584-17590.

Bertrand I. et Koffas D. (1946) Cas d'idiotie mongolienne adulte avec nombreuses plaques séniles et concrétions calcaires pallidales. *Rev. Neurol.* 78 : 445-446.

Biernat J., Mandelkow E.M., Schroter C., Lichtenbergkraag B., Steiner B.B. (1992) The switch of tau protein to an Alzheimer-like state includes the phosphorylation of two sérine-proline motifs upstream of the microtubule binding region. *EMBO J.* 11: 1593-1597.

Binder L.I., Frankfurter A., Rebhun L. (1985) The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol.* 101: 1371-1378.

Blacker D., Wilcox M.A., Laird N.M., Rodes M., Horvath S.M., Go R.C.P., Perry R., Watson B. Jr., Bassatt S.S., McInnis M.G., Albert M.S., Hyman B.T., Tanzi R.E. (1998) *Nature Genetics* 19: 357-360.

Blacker D. et Tanzi R.E. (1998) The genetics of Alzheimer disease: current status and future prospects. *Arch Neurol.* 55: 294-296.

Blennow K., Wallin A., Agren H., Spenger, C., Siegfried J., Vanmechelen E. (1995) Tau protein in cerebrospinal fluid - A biochemical marker for axonal degeneration in Alzheimer disease?. *Mol Chem Neuropathol.* 26: 231-245.

Blennow K. et Vanmechelen E. (1998) Combination of the different biological markers for increasing specificity of in vivo Alzheimer's testing. *J. Neural. Transm.* 53: 223-235

Blessed G., Tomlinson B.E., Roth M. (1968) The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Br J Psychiatry Suppl* 114: 797.

Bloom G S. et Luca F.C. (1985) Microtubule associated protein 1B: identification of a major component of neuronal cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5404-5408.



- Bondareff W., Wischik C.M., Novak M., Amos W.B., Klug A., Roth M. (1990) Molecular analysis of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease - An Immunohistochemical Study. *Am J Pathol.* 137: 711-723.
- Braak H. et Braak E. (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82: 239-259.
- Bramblett G.T., Goedert M., Jakes R., Merrick S.E., Trojanowski J.Q., Lee V.M.Y. (1993) Abnormal Tau-phosphorylation at ser(396) in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron.* 10: 1089-1099.
- Brion J.P., Passareiro H., Nunez J., Flament-Durand J. (1985) Immunological detection of tau protein in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Arch.Biol.* 95: 229-235.
- Brion S., Plas J., Jeanneau A. (1991) Pick's Disease - A clinico-pathological point of view. *Rev Neurol.* 147: 693-704.
- Brun A., Englund B., Gustafson L., Passant U., Mann D.M.A., Neary D., Snowden J.S. (1994) Clinical and neuropathological criteria for frontotemporal dementia. *J Neural Transm Suppl.* 57: 416-418.
- Buée L., Hof P.R., Delacourte A., Morrison J.H., Fillit H. (1992) Characterization of vascular and neuronal heparan sulfate proteoglycan that binds to the amyloid beta-protein. *Neurobiol Aging.* 13: S 82.
- Buée L., Ding W., Delacourte A., Fillit H. (1993) Binding of secreted human neuroblastoma proteoglycans to the alzheimer's amyloid A4 peptide. *Brain Res.* 601: 154-163.
- Buée-Scherrer V., Buée L., Hof P.R., Leveugle B., Gilles C., Loerzel A.J., Perl D.P., Delacourte A. (1995) Neurofibrillary degeneration in amyotrophic lateral sclerosis/ parkinsonism-dementia complex of Guam - Immunochemical characterization of tau proteins. *Am J Pathol.* 146: 924-932.
- Buée-Scherrer V., Condamines O., Mourton-Gilles C., Jakes R., Goedert M., Pau B., Delacourte A. (1996) AD2, a phosphorylation-dependent monoclonal antibody directed against tau proteins found in Alzheimer's disease. *Mol Brain Res.* 39: 79-88.
- Buée-Scherrer V., Hof P.R., Buée L., Leveugle B., Vermersch P., Perl D.P., Olanow C.W., Delacourte A. (1996) Hyperphosphorylated tau proteins differentiate corticobasal degeneration and Pick's disease. *Acta Neuropathol.* 91: 351-359.
- Buée-Scherrer V., Buée L., Leveugle B., Perl DP., Vermersch P., Hof PR., Delacourte A. (1997) Pathological tau proteins in postencephalitic parkinsonism: comparison with Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Ann Neurol.* 42: 356-9.

Caillet-Boudin M.L. et Delacourte A. (1996) Induction of a specific tau Alzheimer epitope in SY-5Y neuroblastoma cells. *Neuroreport*. 8: 307-310.

Campion D., Brice A., Dumanchin C., Puel M., Baulac M., De La Sayette V., Hannequin D., Duyckaerts C., Michon A., Martin C., Moreau V., Penet C., Maetez M., Clerget-Darpoux F., Agid Y., Frebourg T. (1996) A novel presenilin 1 mutation resulting in familial Alzheimer's disease with an onset age of 29 years. *Neuroreport* 7(10) : 1582-1584.

Carter D.A., Desmarais E., Bellis M., Campion D., Clerget-Darpoux F., Brice A., Agid Y., Jaillard-Serradt A., Mallet J. (1992) More missense in amyloid gene. *Nat Genet*. 2(4): 255-256.

Caserta M.T., Caccioppo D., Lapin G.D., Ragin A., Groothuis D.R. (1999) Blood-brain barrier integrity in Alzheimer's disease patients and elderly control subjects. *Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 10(1):78-84

Chartier-Harlin M.C., Crawford F., Houlden H., Warren A., Hughes D., Fidani L., Goate A., Rossor M., Roques P., Hardy J., Mullan M. (1991) Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon-717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature*. 353: 844-846.

Chartier-Harlin M.C., Parfitt M., Legrain S., Perez-Tur J., Brousseau T., Evans A., Berr C., Vidal O., Roques P., Gourlet V., Fruchart J.C., Delacourte A., Rossor M., Amouyel P., (1994) Apolipoprotein E, epsilon 4 allele as a major risk factor for sporadic early and late-onset forms of Alzheimer's disease - Analysis of the 19q13.2 chromosomal region. *Human Molecular Genetics*. 3: 569-574.

Chen K.M. et Chase T.N. (1986) Parkinsonism dementia – Extrapyrmidal disorders, *Handbook of clinical neurology* , vol.49. Edited by Vinken P.J., Bruyn G.W. and Klawans H.L. Elsevier, Amsterdam , 167-183.

Claudio L. (1996) Ultrastructural features of the blood-brain barrier in biopsy tissue from Alzheimer's disease patients. *Acta Neuropathol*. 91(1):6-14.

Cleveland D.W., Hwo S.Y., Kirschner M.W. (1977) Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J. Mol. Biol*. 116: 227-247.

Cleveland D.W., Hwo S.Y., Kirschner M.W. (1977) Purification of tau, a microtubule-associated protein that induce assembly of microtubules from purified tubulin. *J. Mol. Biol*. 116: 207-225.

Cohen P. (1996) Dissection of protein kinase cascades that mediate cellular response to cytokines and cellular stress. *Adv Pharmacol*. 36: 15-27.

Cohen P. et Cohen P.T.W. (1996) Protein phosphatases come of age. *J Biol Chem*. 264: 21435-21438.

Conrad C., Andreadis A., Trojanowski J.Q., Dickson D.W., Kang D., Chen X., Wiederholt W., Hansen L., Masliah E., Thal L.J., Katzman R., Xia Y., Saitoh T. (1997) Genetic evidence for the involvement of tau in progressive supranuclear palsy. *Ann Neurol.* 41: 277-281.

Conrad C., Amano N., Andreadis A., Xia Y., Namekataf K., Oyama F., Ikeda K., Wakabayashi K., Takahashi H., Thal L.J., Katzman R., Shackelford D.A., Matsushita M., Masliah E., Sawa A. (1998) Differences in a dinucleotide repeat polymorphism in the tau gene between Caucasian and Japanese populations: implication for progressive supranuclear palsy. *Neurosci Lett.* 250: 135-137.

Constantinidis J. (1985) Pick dementia: anatomo-clinical correlations and pathophysiological considerations. in: Rose F.C. ed. *Interdisciplinary topics in Gerontology. Modern approaches to the dementias. Part I: Etiology and pathophysiology.* Basel. Karger. 72-97.

Corder EH, Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D.E., Gaskell P.C., Small G.W., Roses A.D., Haines J.L., Pericak-Vance M.A. (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 261(5123): 921-923.

Corder E.H., Saunders A.M., Risch N.J., Strittmatter W.J., Schmechel D.E., Gaskell P.C., Rimmler J.B., Locke P.A., Conneally P.M., Schmechel K.E., Small G.W., Roses A.D., Haines J.L., Pericak-Vance M.A. (1994) Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nature Genetics.* 7: 180-184.

Corder E.H., Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D.E., Gaskell P.C., Small G.W. (1994) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 261: 921-923.

Correas I., Diaznido J., Avila J. (1992) Microtubule-associated protein Tau is phosphorylated by protein kinase-C on its tubulin binding domain. *J Biol Chem.* 267: 15721-15728.

Crowther R.A. (1991) Straight and paired helical filaments in Alzheimer disease have a common structural unit. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88: 2288-2292.

Cuenda, A. Cohen, P. Buée-Scherrer, V. Goedert, M. (1997) Activation of stress-activated protein kinase-3 (SAPK3) by cytokines and cellular stresses is mediated via SAPKK3 (MKK6); Comparison of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38). *EMBO J.* 16: 295-305.

### -D-

Delaère P., Duyckaerts C, Brion JP., Poulain V., Hauw JJ. (1989) Tau, paired helical filaments and amyloid in the néocortex : a morphometric study of 15 cases with graded intellectual status in aging and senile dementia of Alzheimer type. *Acta Neuropathol.* 77: 645-653.

Delaère P., Duyckaerts C, He Y, Piette F, Hauw JJ (1991) Subtypes and differential laminar distributions of beta A4 deposits in Alzheimer's disease: relationship with the intellectual status of 26 cases. *Acta Neuropathol.* 81(3): 328-335.

Delacourte A. et Défossez A. (1986) Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J Neurol Sci.* 76: 173-186.

Delacourte A. et Buée L. (1989) Alzheimer's disease: the glial reaction is general and severe in all areas of the central nervous system. *C R Acad Sci.* 308(13): 359-365.

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

Delacourte A., Robitaille Y., Sergeant N., Buée L., Hof P.R., Watzet A., Laroche-Cholette A., Mathieu J., Chagnon P., Gauvreau D. (1996) Specific pathological tau protein variants characterize Pick's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 55: 159-168.

Delacourte A., Sergeant N., Watzet A., Gauvreau D., Robitaille Y. (1998) Vulnerable neuronal subsets in Alzheimer's and Pick's disease are distinguished by their tau isoform distribution and phosphorylation. *Ann Neurol.* 43: 193-204.

De Yebenes J.G., Sarasa J.L., Daniel S.E., Lees A.J. (1995) Familial progressive supranuclear palsy - Description of a pedigree and review of the literature. *Brain.* 118: 1095-1103.

Dickson D.W. (1986) Pick body-like inclusions in the dentate fascia of the hippocampus in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 71(1-2): 38-45.

Dickson D.W. (1998) Pick's disease: a modern approach. *Brain Pathol.* 8: 339-54.

Drewes G., Lichtenbergkraag B., Doring F., Mandelkow E.M., Biernat J., Gori. (1992) Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms Tau protein into an Alzheimer-like state. *EMBO J.* 11: 2131-2138.

Drewes G., Mandelkow E.M., Baumann K., Goris J., Merlevede W., Mandelkow E. (1993) Dephosphorylation of tau protein and Alzheimer paired helical filaments by calcineurin and Phosphatase-2A. *FEBS Lett.* 336: 425-432.

Drewes G., Trinczek B., Illenberger S., Biernat J., Schmittulms G., Meyer H.E., Mandelkow E.M., Mandelkow E. (1995) Microtubule-associated protein microtubule affinity-regulating kinase (p110(mark)) - A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site sérine 262. *J Biol Chem.* 270: 7679-7688.

Drewes G., Ebnet A., Preuss U., Mandelkow E.M., Mandelkow E. (1997) MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell.* 89: 297-308.

Drubin D.G. et Kirschner M.W. (1986) Tau protein function in living cells. *J. Cell Biol.* 103: 2739-2746.

Dumanchin C., Camuzat A., Campion D., Verpillat P., Hannequin D., Dubois B., Saugier-veber P., Martin C., Penet C., Charbonnier F., Agid Y., Frebourg T., Brice A. (1998) Segregation of a missense mutation in the microtubule-associated protein tau gene with familial frontotemporal demantia and parkinsonism. *Human Molecular Genetics.* 7(11): 1825-1829.

Duyckaerts C., Hauw J.J., Piette F., Rainsard C., Poulain V., Berthaux P., Escourolle R. (1985) Cortical atrophy in senile dementia of the Alzheimer type is mainly due to a decrease in cortical length. *Acta Neuropathol.* 66: 72-74.

### -E-

Elizan T.S. (1966) Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of Guam. Neurological reevaluation. *Arch Neurol.* 14(4): 356-68.

Ennulat D.J., Liem R.K.H., Hashim G.A., Shelanski. M.L. (1989) Two separate 18-amino acid domains of Tau promote the polymerization of tubulin. *J. Biol. Chem.* 264: 5327-5330.

Erkinjuntti T., Ostbye T., Steenhuis R., Hachinski V. (1997) The effect of different diagnostic criteria on the prevalence of dementia. *N. Engl. J. Med.* 337: 1667-1674.

Evans D.A., Funkenstein H., Albert M.S., Scherr P.A., Cook N.R., Chown M.J., Hebert L.E., Henneken (1989) Prevalence of Alzheimers disease in a community population of older persons - Higher than previously reported. *JAMA.* 262: 2551-2556.

### -F-

Feany M.B., Ksiezak-Reding H., Liu W.K., Vincent I., Yen S.H.C., Dickson D.W. (1995) Epitope expression and hyperphosphorylation of tau protein in corticobasal degeneration: differentiation from progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol.* 90: 37-43.

Feany M.B., Mattiace L.A., Dickson D.W. (1996) Neuropathologic overlap of progressive supranuclear palsy, Pick's disease and corticobasal degeneration. *J Neuropath Exp Neur.* 55: 53-67.

Flament S. et Delacourte A. (1989) Abnormal Tau species are produced during Alzheimer's disease neurodegenerating process. *FEBS Lett.* 247: 213-216.

Flament S., Delacourte A., Hémon B., Défossez A. (1989) Démonstration d'une phosphorylation anormale des protéines microtubulaires Tau au cours de la maladie d'Alzheimer. *C. R. Acad. Sci.* 308: 77-82.

Flament S., Delacourte A., Mann D.M.A. (1990) Phosphorylation of tau proteins : a major event during the process of neurofibrillary degeneration. A comparative study between Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Brain Res.* 516: 15-19.

Flament S., Delacourte A., Verny M., Hauw J.J., Javoy-Agid F. (1991) Abnormal Tau proteins in progressive supranuclear palsy. Similarities and differences with the neurofibrillary degeneration of the Alzheimer type. *Acta Neuropathol.* 81: 591-596.

Folstein M.F., Folstein S.E., Mc Hugh P.R. (1975) "Mini Mental State". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res.* 12: 189-198.

Foster N.L., Wilhelmsen K., Sima A.A., Jones M.Z., D'Amato C.J., Gilman S. (1997) Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17: a consensus conference. Conference Participants. *Ann Neurol.* 41: 706-15.

### -G-

Galasko D., Clark C., Chang L., Miller B., Green R.C., Motter R., Seubert P. (1997) Assessment of CSF levels of tau protein in mildly demented patients with Alzheimer's disease. *Neurology.* 48: 632-635.

Galasko D., Chang L., Motter R., Clark C.M., Kaye J., Knopman D., Thomas R., Kholodenko D., Schenk D., Lieberburg I., Miller B., Green R., Basherad R., Kertiles L., Boss M.A., Seubert P. (1998) High cerebrospinal fluid tau and low amyloid beta42 levels in the clinical diagnosis of Alzheimer disease and relation to apolipoprotein E genotype. *Arch Neurol.* 55(7):937-945.

Gallyas F. (1971) Silver staining of Alzheimer's neurofibrillary changes by means of physical development. *Acta Morph. Hung.* 19: 1-8.

Garver T.D., Harris K.A., Lehman R.A.W., Lee V.M.Y., Trojanowski J.Q., Billingsley M.L. (1994) Tau phosphorylation in human, primate, and rat brain: evidence that a pool of tau is highly phosphorylated in vivo and is rapidly dephosphorylated in vitro. *J Neurochem.* 63: 2279-2287.

Garver T.D., Lehman R.A.W., Billingsley M.L. (1996) Microtubule assembly competence analysis of freshly-biopsied human Tau, dephosphorylated Tau and Alzheimer Tau. *J Neurosci Res.* 44: 12-20.

Geddes J.F., Hughes A.J., Lees A.J., Daniel S.E. (1993) Pathological overlap in cases of parkinsonism associated with neurofibrillary tangles. *Brain.* 116: 281-302.

Georgieff I.S., Liem R.K.H., Couchie D., Mavilia C., Nunez J., Shelanski M. (1993) Expression of high molecular weight tau in the central and peripheral nervous systems. *J Cell Sci.* 105: 729-737.

Gibb W.R. (1989) Corticobasal degeneration. *Brain.* 112: 1171-92.

Glennner GG. (1980) Amyloid deposits and amyloidosis: the beta-fibrilloses (first of two parts). *N Engl J Med.* 302: 1283-1292.

Glennner GG. (1980) Amyloid deposits and amyloidosis: the beta-fibrilloses (second of two parts). *N Engl J Med.* 302: 1333-1343.

Glennner G.G. et Wong C.W. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 120: 885-890.

Goate A., Chartier-Harlin M.C., Mullan M., Brown J., Crawford F., Fidani L., Giuffra L., Haynes A., Irving N., James L. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature.* 349: 704-706.

Goedert M., Wischik C.M., Crowther R.A., Walker J.E., Klug A. (1988) Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer's disease: identification as the microtubule-associated protein Tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 4051-4055.

Goedert M., Spillantini M.G., Potier M.C., Ulrich J., Crowther R.A. (1989) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein Tau containing 4 tandem repeats - Differential expression of Tau protein messenger RNAs in human brain. *EMBO J.* 8: 393-399.

Goedert M. et Jakes R. (1990) Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J.* 9: 4225-4230.

Goedert M., Cohen E.S., Jakes R., Cohen P. (1992) p42 map kinase phosphorylation sites in microtubule-associated protein tau are dephosphorylated by protein Phosphatase-2A1 - Implications for Alzheimer's disease. *FEBS Lett.* 312: 95-99.

Goedert M., Spillantini M.G., Cairns N.J., Crowther R.A. (1992) Tau-proteins of Alzheimer paired helical filaments - Abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron.* 8: 159-168.

Goedert M., Jakes R., Qi Z., Wang J.H., Cohen P. (1995) Protein phosphatase 2A is the major enzyme in brain that dephosphorylates tau protein phosphorylated by proline-directed protein kinases or cyclic AMP-Dependent protein kinase. *J Neurochem.* 65: 2804-2807.

Goedert M., Hasegawa M., Jakes R., Lawler S., Cuenda A., Cohen P. (1997) Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress- activated protein kinases. *FEBS Lett.* 409: 57-62.

Golbe L.I. (1988) Prevalence and natural history of progressive supranuclear palsy. *Neurology.* 38(7): 1031-1034.

Goode B.L. et Feinstein S.C. (1994) Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau. *J Cell Biol.* 124: 769-782.

Greenberg S.G., Davies P. (1990) A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau-proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 5827-5831.

Greenberg S.G., Davies P., Schein J.D., Binder L.I. (1992) Hydrofluoric acid-treated tau-PHF proteins display the same biochemical properties as normal tau. *J Biol Chem.* 267: 564-569.

Greenwood J.A., Scott C.W., Spreen R.C., Caputo C.B., Johnson G.V.W. (1994) Casein kinase II preferentially phosphorylates human tau isoforms containing an Amino-Terminal insert - Identification of threonine 39 as the primary phosphate acceptor. *J Biol Chem.* 269: 4373-4380.

Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Quinlan M., Tung Y.C., Zaidi M.S., Wisniewski H.M. (1986) Microtubule-associated protein tau, a component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem.* 261: 6084.

Gustafson L. (1993) Clinical picture of frontal lobe degeneration of Non-Alzheimer type. *Dementia.* 4: 143-148.

Gustke N., Steiner B., Mandelkow E.M., Biernat J., Meyer H.E., Goedert M. (1992) The Alzheimer-like phosphorylation of tau protein reduces microtubule binding and involves Ser-Pro and Thr-Pro motifs. *FEBS Lett.* 307: 199-205.

### -H-

Hagestedt ., Lichtenberg B., Wille H., Mandelkow E.M., Mandelkow M. (1989) Tau protein becomes long and stiff upon phosphorylation : correlation between paracrystalline structure and degree of phosphorylation. *J. Cell Biol.* 109: 1643-1651.

Hanger D.P., Brion J.P., Gallo J.M., Cairns N.J., Luthert P.J., Anderton B (1991) Tau in Alzheimer's disease and Down's syndrome is insoluble and abnormally phosphorylated. *Biochem J.* 275: 99-104.

Hanger D.P., Hughes K., Woodgett J.R., Brion J.P., Anderton B.H. (1992) Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau - Generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett.* 147: 58-62.

Hanger D.P., Betts J.C., Loviny T.L.F., Blackstock W.P., Anderton B.H. (1998) Application of nano-electrospray mass spectrometry to the identification of new phosphorylation sites in PHF-tau purified from Alzheimer's disease brain. *Neurobiol. Aging.* 19: S122- abstract 516.

Hasegawa M., Morishima-Kawashima M., Takio K., Suzuki M., Titani K., Ihara Y. (1992) Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in the alzheimer's disease brain. *J Biol Chem.* 267: 17047-17054.



- Hasegawa M., Watanabe A., Takio K., Suzuki M., Arai T., Titani K., Ihara Y. (1993) Characterization of 2 distinct monoclonal antibodies to paired helical filaments - Further evidence for fetal-type phosphorylation of the tau in paired helical filaments. *J Neurochem.* 60: 2068-2077.
- Hasegawa M., Jakes R., Crowther R.A., Lee V.M.Y., Ihara Y., Goedert M. (1996) Characterization of mAb AP422, a novel phosphorylation-dependent monoclonal antibody against tau protein. *FEBS Lett.* 384: 25-30.
- Hauw J.J., Verny M., DelaÈre P., Cervera P., He Y., Duyckaerts C. (1990) Constant neurofibrillary changes in the néocortex in progressive supranuclear palsy - Basic differences with Alzheimer's disease and aging. *Neurosci Lett.* 119: 182-186.
- Hauw J.J., Daniel S.E., Dickson D., Horoupian D.S., Jellinger K., Lantos P.L., Mckee A., Tabaton M., Litvan I. (1994) Preliminary NINDS neuropathologic criteria for Steele-Richardson-Olszewski syndrome (progressive supranuclear palsy). *Neurology.* 44: 2015-2019.
- Himmler A., Drechsel D., Kirschner M.W., Martin D.W. (1989) Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol Cell Biol.* 9: 1381-1388.
- Hirano A., Kurland L.T., Krooth R.S., Lessel S. (1961) Parkinsonism-dementia complex, and endemic disease on the island of Guam: I. Clinical features. *Brain.* 84: 642-661.
- Hock C., Golombowski S., Naser W., Mullerspahn F. (1995) Increased levels of tau protein in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease - Correlation with degree of cognitive impairment. *Ann Neurol.* 37: 414-415.
- Hock C., Golombowski S., Muller-Spahn F., Naser W., Beyreuther K., Monning U., Schenk D., Vigo-Pelfrey C., Bush A.M., Moir R., Tanzi R.E., Growdon J.H., Nitsch R.M. (1998) Cerebrospinal fluid levels of amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease and major depression - inverse correlation with dementia severity. *Eur Neurol.* 39(2):111-118.
- Hof P.R., Cox K., Morrison J.H. (1990) Quantitative analysis of a vulnerable subset of pyramidal neurons in Alzheimer's disease: I, Superior frontal and inferior temporal cortex. *J. Comp. Neurol.* 301: 44-54.
- Hof P.R. et Morrison J.H. (1990) Quantitative analysis of a vulnerable subset of pyramidal neurons in Alzheimer's disease: II. Primary and secondary visual cortex. *J. Comp. Neurol.* 301: 55-64.
- Hof P.R., Perl D.P., Loerzel A.J., Morrison J.H. (1991) Neurofibrillary tangle distribution in the cerebral cortex of Parkinsonism-dementia cases from Guam - Differences with Alzheimer's Disease. *Brain Res.* 564: 306-313.

Hof P.R., Charpiot A., Delacourte A., Buée L., Purohit D., Perl D.P., Bouras, C. (1992) Distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques in the cerebral cortex in postencephalitic parkinsonism. *Neurosci Lett.* 139: 10-14.

Hof P.R., Delacourte A., Bouras C. (1992) Distribution of cortical neurofibrillary tangles in progressive supranuclear palsy - A quantitative analysis of 6 cases. *Acta Neuropathol.* 84: 45-51.

Hof P.R., Bouras C., Perl D.P., Morrison J.H. (1994) Quantitative neuropathologic analysis of Pick's disease cases - Cortical distribution of Pick bodies and coexistence with alzheimers disease. *Acta Neuropathol.* 87: 115-124.

Hof P.R., Nimchinsky E.A., Buée-Scherrer V., Buée L., Nasrallah J., Hottinger A.F., Purohit D.P., Loerzel A.J., Steele J.C., Delacourte A., Bouras C., Morrison J.H., Perl D.P. (1994) Amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex of Guam: Quantitative neuropathology, immunohistochemical analysis of neuronal vulnerability, and comparison with related neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol.* 88: 397-404.

Hof P.R., Bouras C., Perl D.P., Sparks D.L., Mehta N., Morrison J.H. (1995) Age-related distribution of neuropathologic changes in the cerebral cortex of patients with Down's syndrome: Quantitative regional analysis and comparison with Alzheimer's disease. *Arch Neurol.* 52: 379-391.

Hoffmann R., Lee V.M.Y., Leight S., Varga I., Otvos L. Jr. (1997) Unique Alzheimer's disease paired helical filament specific epitopes involve double phosphorylation at specific sites. *Biochemistry.* 36: 8114-24.

Hutton M. et Hardy J. (1997) The presenilins and Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics.* 6: 1639-1646.

Hutton M., Lendon C.L., Rizzu, Baker M., Froelich S., Houlden H., Pickering-Brown S., Chakraverty S., Isaacs A., Grover A., Hackett J., Adamson J., Lincoln S., Dickson D., Davies P., Petersen R.C., Stevens M., De Graff E., Wauters E., Van Baren J., Hillebrand M., Joosse M., Kwon J.M., Nowolny P., Che L.K., Norton J., Morris J.C., Reed L.A., Trojanowski J.Q., Basun H., Lannfelt N., Neystat N., Fahn S., Dark F., Tannenberg T., Dodd P., Hayward N., Kwok J.B.J., Schofield P.R., Andreadis A., Snowden J., Craufurd D., Neary D., Owen F., Oostra B.A., Hardy J., Goate A., Van Swieten J., Mann D.M.A., Lynch Y., Heutink P. (1998) Coding and 5' splice site mutations in tau associated with inherited dementia (FTDP-17). *Nature.* 393: 702-704.

-|-

Ikeda S., Allsop D., Glenner G. (1989) Morphology and distribution of plaque and related deposits in the brains of Alzheimers disease and control cases - An immunohistochemical study using amyloid beta-protein antibody. *Lab Invest.* 60: 113-122.

Ikeda K., Akiyama H., Kondo H., Ikeda K. (1993) Anti-tau-positive glial fibrillary tangles in the brain of postencephalitic parkinsonism of economo type. *Neurosci Lett.* 162: 176-178.

Iqbal K., Grundke-Iqbal I., Zaidi T., Merz P., Wen G., Shaikh S., Wisniewski H. (1986) Defective brain microtubule assembly in Alzheimer's disease. *Lancet*. 232: 421-426.

Ischii T. et Nakamura Y. (1981) Distribution and ultrastructure of Alzheimer's neurofibrillary tangles in postencephalitic parkinsonism of Economo type. *Acta Neuropathol*. 55 : 59-62.

Isoe K., Urakami K., Shimomura T., Wakutani Y., Ji Y., Adachi Y., Takahashi K. (1996) Tau proteins in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease: A longitudinal study. *Dementia*. 7: 175-176.

**-J-**

Jakes R., Novak M., Davison M., Wischik C.M. (1991) Identification of 3-repeat and 4-repeat tau isoforms within the PHF in Alzheimer's disease. *EMBO J*. 10: 2725-2729.

Jameson L., Frey T., Zeeberg B., Dalldorf F., Caplow M. (1980) Inhibition of microtubule assembly by phosphorylation of microtubule-associated proteins. *Biochemistry*. 19: 2472-2479.

Jellinger K.A. (1996) Structural basis of dementia in neurodegenerative disorders. *J Neural Transm Suppl*. 47:1-29.

Jensen M., Basun H., Lannfelt L. (1995) Increased cerebrospinal fluid tau in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 186: 189-191.

Johnson G.V.W. (1992) Differential phosphorylation of tau by cAMP-dependent protein kinase and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II : metabolic and functional consequences. *J. Neurochem*. 1-30.

Jicha G.A., Bowser R., Kazam I.G., Davies P. (1997) Alz-50 and MC-1, a new monoclonal antibody raised to paired helical filaments, recognize conformational epitopes on recombinant tau. *J Neurosci Res*. 48: 128-132.

Jicha G.A., Lane E., Vincent I., Otvos L. Jr., Hoffmann R., Davies P. (1997) A conformation- and phosphorylation-dependent antibody recognizing the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 69: 2087-2095.

Jicha G., Weaver C., Davies P. (1998) PKA-dependent phosphorylation of tau and cAMP-regulated proteins in AD. Society for Neurosciences – Los Angeles (CA) USA. Abstract 502-1.

**-K-**

Kanai M., Matsubara E., Isoe K., Urakami K., Nakashima K., Arai H., Sasaki H., Abe K., Iwatsubo T., Kosaka T., Watanabe M., Tomidokoro Y., Shizuka M., Mizushima K., Nakamura T., Igeta Y., Ikeda Y., Amari M., Kawarabayashi T., Ishiguro K., Harigaya Y., Wakabayashi K.

- Okamoto K., Hirai S., Shoji M. (1998) Longitudinal study of cerebrospinal fluid levels of tau, A beta1-40, and A beta1-42(43) in Alzheimer's disease: a study in Japan. *Ann Neurol.* 44(1):17-26.
- Kang J., Lemaire H., Unterbeck A., Salbaum J., Masters C., Grzeschik K., Multhaup G., Beyreuther K., Muller-Hill B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature.* 325: 733-736.
- Kato S. et Nakamura H. (1990) Presence of two different fibril subtypes in the Pick body : an immunoelectron microscopic study. *Acta Neuropathol.* 81: 125-129.
- Kato S., Hirano A., Umahara T., Kato M., Herz F., Ohama E. (1992) Comparative immunohistochemical study on the expression of alpha B crystallin, ubiquitin and stress-response protein 27 in ballooned neurons in various disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 18(4):335-40.
- Kenessey A. et Yen S.H.C. (1993) The extent of phosphorylation of fetal-tau is comparable to that of PHF-tau from alzheimer paired helical filaments. *Brain Res.* 629: 40-46.
- Khachaturian Z.S. (1985) Diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch Neurol.* 42(11): 1097-1105.
- Kidd M. (1963) Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature.* 197: 192-193.
- Kim T.W. et Tanzi RE. (1997) Presenilins and Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol.* 7: 683-688.
- Kobayashi S., Ishiguro K., Omori A., Takamatsu M., Arioka M., Imahori K., Uchida T. (1993) A Cdc2-Related kinase Pssalre/Cdk5 is homologous with the 30 kDa subunit of tau protein kinase II, a Proline-Directed protein kinase associated with microtubule. *FEBS Lett.* 335: 171-175.
- Kondo J., Honda T., Mori H., Hamada Y., Miura R., Ogawara M., Ihara Y. (1988) The carboxyl third of Tau is tightly bound to paired helical filaments. *Neuron.* 1: 827-834.
- Kosik K.S., Joachim C., Selkoe D. (1986) Microtubule-associated protein tau is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 4044-4048.
- Kosik K.S., Orecchio L.D., Bakalis S., Neve R.L. (1989) Developmentally regulated expression of specific Tau sequences. *Neuron.* 2: 1389-1397.
- Kosik K.S., Crandall J.E., Mufson E.J., Neve R.L. (1989) Tau *in-situ* hybridization in normal and Alzheimer brain - Localization in the somatodendritic compartment. *Ann Neurol.* 26: 352-361.
- Ksiezak-Reding H., Binder L.I., Yen S.H. (1990) Alzheimer disease proteins (A68) share epitopes with Tau but show distinct biochemical properties. *J Neurosci Res.* 25: 420-430.

Ksiezak-Reding H. et Yen S.H. (1991) Structural stability of paired helical filaments requires microtubule-binding domains of tau: A model for self-association. *Neuron*. 6: 717-728.

Ksiezak-Reding H., Liu W.K., Yen S.H. (1992) Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. *Brain Res*. 597: 209-219.

Ksiezak-Reding H., Morgan K., Mattiace L.A., Davies P., Liu W.K., Yen S.H., Weidenheim K., Dickson D.W. (1994) Ultrastructure and biochemical composition of paired helical filaments in corticobasal degeneration. *Am J Pathol*. 145: 1496-1508.

Ksiezak-Reding H., Tracz E., Yang L.S., Dickson D.W., Simon M., Wall J.S. (1996) Ultrastructural instability of paired helical filaments from corticobasal degeneration as examined by scanning transmission electron microscopy. *Am J Pathol*. 149: 639-651.

Kyriakis J.M. et Avruch, J. (1996) Sounding the alarm: Protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J Biol Chem*. 271: 24313-24316.

**-L-**

Ladu M.J., Lukens J.R., Reardon C.A., Getz G.S. (1997) Association of human, rat, and rabbit apolipoprotein E with beta- amyloid. *J Neurosci Res*. 49: 9-18.

Lawler S., Cuenda A., Goedert M., Cohen P. (1997) SKK4, a novel activator of stress-activated protein kinase-1 (SAPK1/JNK). *FEBS Lett*. 414: 153-158.

Lee G., Cowan N., Kirschner M. (1988) The primary structure and heterogeneity of Tau protein from mouse brain. *Science*. 239: 285-289.

Lee G., Newman S.T., Gard D.L., Band H., Panchamoorthy G. (1998) Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J. Cell Biol*. 111(21): 3167-3177.

Lee V.M Y., Balin B.J., Otvos L., Trojanowski J.Q. (1991) A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau. *Science*. 251: 675-678.

Lefranc D., Sergeant N., Buée-Scherrer V., Buée L., Vermersch P., Delacourte A. (1997) A propos des protéines tau dans le liquide céphalo-rachidien. IV<sup>ième</sup> réunion francophone sur la maladie d'Alzheimer et les syndromes apparentés. Montpellier, France. 2-4 octobre 1997.

Lemaire H.G., Salbaum J., Multhaup G., Kang J., Bayney R., Unterbeck A., Beyreuther K. (1989) The Prea4-695 precursor protein of Alzheimer's disease A4-amyloid is encoded by 16 exons. *Nucleic Acids Res*. 17: 517-522.

Lendon C., Talbot C., Craddock N., Woo Han S., Wragg M., Morris J., Goate A. (1997) Genetic association studies between dementia of the Alzheimer's type and three receptor for apolipoproteinE in a Caucasian population. *Neurosci.Lett*. 222 : 187-190.

Letenneur L., Commenges D., Dartigues J.F., Barbergergateau P. (1994) Incidence of dementia and Alzheimer's disease in elderly community residents of South-Western France. *Int. J. Epidemiol.* 23: 1256-1261.

Levy-Lahad E., Wijsman E.M., Nemens E., Anderson L., Goddard K.A.B., Weber J.L., Bird T.D., Schellenberg G.D. (1995) A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science.* 269: 970-973.

Levy-Lahad E., Wasco W., Poorkaj P., Romano D.M., Oshima J., Pettingell W.H., Yu C.E., Jondro P.D., Schmidt S.D., Wang K., Crowley A.C., Fu Y.H., Guenette S.Y., Galas D., Nemens E., Wijsman E.M., Bird T.D., Schellenberg G.D., Tanzi R.E. (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science.* 269: 973-977.

Lewis D.A., Campbell M.J., Terry R.D., Morrison J. (1987) Laminar and regional distributions of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in Alzheimer's disease : a quantitative study of visual and auditory cortices. *J Neurosci Res.* 7: 1799-1808.

Liebermann A.P., Trojanowski J.Q., Lee V.M.Y., Balin B.J., Ding X.S., Greenberg J., Morrisson D., Reivich M., Grossman M. (1998) Cognitive, neuroimaging, and pathological studies in a patient with Pick's disease. *Ann. Neurol.* 43: 259-265.

Lindwall G. et Cole R.D. (1984) Phosphorylation affects the ability of Tau protein to promote microtubule assembly. *J. Biol. Chem.* 255: 5301-5305.

Litersky J.M. et Johnson G.V.W. (1992) Phosphorylation by cAMP-Dependent Protein Kinase Inhibits the Degradation of Tau by Calpain. *J Biol Chem.* 267: 1563-1568.

Litvan I., Agid Y., Jankovic J., Goetz C., Brandel J.P., Lai E.C., Wenning G., Dolhaberrague L., Verny M., Chaudhuri K.R., Mckee A., Jellinger K., Bartko J.J., Mangone C.A., Pearce R.K.B. (1996) Accuracy of clinical criteria for the diagnosis of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome). *Neurology.* 46: 922-930.

Love S., Saitoh T., Quijada S., Cole G.M., Terry R.D. (1988) Alz-50, ubiquitin and tau immunoreactivity of neurofibrillary tangles, Pick bodies and Lewy bodies. *J Neuropathol Exp Neurol.* 47: 393.

Lovestone S., Reynolds C.H., Latimer D. (1994) Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells. *Current Biology.* 4: 1077-1086.

Lynch T., Sano M., Marder K.S., Bell K.L., Foster N.L., Defendini R.F., Sima A.A.F., Keohane C., Nygaard T.G. Fahn S., Mayeux R., Rowland L.P., Wilhelmsen K.C. (1994) Clinical characteristics of a family with chromosome 17-linked disinhibition dementia parkinsonism amyotrophy complex. *Neurology.* 44: 1878-1884.

Ma J., Yee A., Brewer B., Das S., Potter H. (1994) Amyloid-associated proteins  $\alpha 1$  antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer beta-protein into filaments. *Nature*. 372: 92-94.

Mailliot C., Sergeant N., Bussièrè T., Delacourte A., Buée L. (1998) Phosphorylation of specific sets of tau isoforms reflects different neurofibrillary degeneration processes. *FEBS Lett.* 433 (3): 201-204.

Mandelkow E.M., Drewes G., Biernat J., Gustke N., Vanlint J., Vandenheede (1992) Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-Like state of Microtubule-Associated protein tau. *FEBS Lett.* 314: 315-321.

Mann D.M.A., Yates P.O., Marcyniuk B., Ravindra C.R. (1987) Loss of neurones from cortical and subcortical areas in Down's syndrome patients at middle age. Quantitative comparisons with younger Down's patients and patients with Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* 80: 79-89.

Mann D.M.A. et Esiri M. (1989) The pattern of acquisition of plaques and tangles in the brains of patients under 50 years of age with Down's syndrome. *J. Neurol. Sci.* 89: 169--179.

Mann D.M.A., Jones D., Prinja D., Purkiss M.S. (1990) The prevalence of amyloid (A4) protein deposits within the cerebral and cerebellar cortex in Down's syndrome and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 80: 318-327.

Mann D.M.A. et South P.W. (1993) The topographic distribution of brain atrophy in frontal lobe dementia. *Acta Neuropathol.* 85: 334-340.

Masters C.L., Multhaup G., Simms G., Pottgiesser J., Martins R.N., Beyreuther K. (1985) Neuronal origin of a cerebral amyloid : neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO J.* 4: 2757-2763.

Matsuo E.S., Shin R.W., Billingsley M.L., Vandevoorde A., O'connor M., Trojanowski J.Q., Lee V.M.Y. (1994) Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron.* 13: 989-1002.

Mattiace L.A., Wu E., Aronson M., Dickson D.W. (1991) A new type of neuritic plaque without amyloid in corticonigral degeneration with neuronal achromasia. *J Neuropathol Exp Neurol.* 50: 310.

Mawal-Dewan M., Henley J., Vandevoorde A., Trojanowski J.Q., Lee V.M.Y. (1994) The phosphorylation state of tau in the developing rat brain is regulated by phosphoprotein phosphatases. *J Biol Chem.* 269: 30981-30987.

Mawal-Dewan M., Schmidt M.L., Balin B., Perl D.P., Lee V.M.Y., Trojanowski J.Q. (1996) Identification of phosphorylation sites in PHF-TAU from patients with Guam amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex. *J Neuropathol Exp Neurol.* 55: 1051-1059.

- Mc Khann G.M., Drachman D., Folstein M., Katzman R., Price D., Stadlan E. (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology*. 34: 939-944.
- Medina M., Montejo de Garcini E., Avila J. (1995) The role of tau phosphorylation in transfected COS-1 cells. *Mol Cell Biochem*. 5;148(1): 79-88.
- Mendez M.F., Selwood A., Mastri A.R., Frey W.H. (1993) Pick's disease versus alzheimer's disease - a comparison of clinical characteristics. *Neurology*. 43: 289-292.
- Mercken M., Vandermeeren M., Lubke U., Six J., Boons J., Vandevoorde A.M. (1992) Monoclonal antibodies with selective specificity for Alzheimer tau are directed against phosphatase-sensitive epitopes. *Acta Neuropathol*. 84: 265-272.
- Merz P., Wisniewski H., Somerville R., Bobin S., Masters C., Iqbal K. (1983) Ultrastructural morphology of amyloid fibrils from neuritic and. 60: 113-124.
- Mölsa P.K., Marttila R.J., Rinne U.K. (1982) Epidemiology of dementia in Finnish population. 65: 541-552.
- Mooradian A.D. (1988) Effect of aging on the blood-brain barrier. *Neurobiol Aging*. 9(1):31-9.
- Mori H., Kondo J., Ihara Y. (1987) Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science*. 235: 1641-1644.
- Mori H., Nishimura M., Namba Y., Oda M. (1994) Corticobasal degeneration: A disease with widespread appearance of abnormal tau and neurofibrillary tangles, and its relation to progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol*. 88: 113-121.
- Mori H., Hosoda K., Matsubara E., Nakamoto T., Furiya Y., Endoh R., Usami M., Shoji M., Maruyama S., Hirai S., (1995) Tau in cerebrospinal fluids: Establishment of the sandwich ELISA with antibody specific to the repeat sequence in tau. *Neurosci Lett*. 186: 181-183.
- Morishima-Kawashima M., Hasegawa M., Takio K., Suzuki M., Yoshida H., Watanabe A., Titani K., Ihara Y. (1995) Hyperphosphorylation of tau in PHF. *Neurobiol Aging*. 16: 365-371.
- Morishima-Kawashima M., Hasegawa M., Takio K., Suzuki M., Yoshida H., Titani K., Ihara Y. (1995) Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J Biol Chem*. 270: 823-829.
- Motter R., Vigo-Pelfrey C., Kholodenko D., Barbour R., Johnsonwood K., Galasko D., Chang L., Miller B., Clark C., Green R., Olson D., Southwick P., Wolfert R., Munroe B., Lieberburg I., Seubert P., Schenk D. (1995) Reduction of beta-amyloid peptide(42), in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 38: 643-648.



Mountjoy C.Q., Roth M., Evans N.J.R., Evans H.M. (1983) Cortical neuronal counts in normal elderly controls and demented patients. *Neurobiol. Aging*. 4: 1-11.

Mullan M., Crawford F., Axelman K., Houlden H., Lilius L., Winblad B., Lena L., Winblad B., Lannfelt L. (1992) A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-Terminus of beta-Amyloid. *Nat Genet*. 1: 345-347.

Munoz-Garcia (1984) Classic and generalized variants of Pick's disease: a clinicopathological, ultrastructural, and immunocytochemical comparative study. *Ann Neurol*. 16(4): 467-480.

Munroe W.A., Southwick P.C., Chang L., Scharre D.W., Echols C.L., Fu P.C., Whaley J.M., Wolfert R.L. (1995) Tau protein in cerebrospinal fluid as an aid in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Annals of Clinical and Laboratory Science*. 25: 207-217.

Murayama S., Mori H., Ihara Y., Tomonaga M. (1990) Immunocytochemical and ultrastructural studies of Pick's Disease. *Ann Neurol*. 27: 394-405.

Murrell J., Farlow M., Ghetti B., Benson M.D. (1991) A Mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science*. 253: 97-98.

**-N-**

Namba Y., Tomonaga M., Kawasaki H., Otomo E., Ikeda K. (1991) Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and Kuru plaque amyloid in Creutzfeld-Jakob disease. *Brain Res*. 541: 163-166.

Neary D., Snowden J.S., Northen B., Goulding P. (1988) Dementia of frontal lobe type. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 51(3): 353-361.

Neary D., Snowden J.S., Mann D.M. (1988) The clinical pathological correlates of lobar atrophy. *Dementia*. 4(3-4): 154-159.

Neve R.L., Harris P., Kosik K., Kurnit D.M., Donlon A. (1986) Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal location of genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Mol. Brain Res*. 1: 271-280.

**-O-**

O'Connor D.W., Pollitt P.A., Hyde J.B., Fellows J.L., Miller N.D., Brook C.P., Reiss B.B., Roth M. (1989) The prevalence of dementia as measured by the Cambridge Mental Disorders of the Elderly Examination. *Acta Psychiatr Scand* 79(2):190-8

O'Connor D.W., Pollitt P.A., Hyde J.B., Fellows J.L., Miller N.D., Brook C.P., Reiss B.B. (1989) The reliability and validity of the Mini-Mental State in a British community survey. *J Psychiatr Res* 23(1):87-96

Otvos L., Feiner L., Lang E., Szendrei G.I., Goedert M., Lee V.M.Y. (1994) Monoclonal antibody PHF-1 recognizes tau protein phosphorylated at sérine residues 396 and 404. *J Neurosci. Res.* 39: 669-673.

Oyanagi K., Takahashi H., Wakabayashi K., Ikuta F. (1991) Large neurons in the neostriatum in Alzheimer's disease and progressive supranuclear palsy - A topographic, histologic and ultrastructural investigation. *Brain Res.* 544: 221-226.

**-P-**

Papasozomenos S.C. et Binder L.I. (1987) Phosphorylation determines two distinct species of Tau in the central nervous system. *Cell Motility and the Cytoskel.* 8: 210-226.

Paudel H.K., Lew J., Ali Z., Wang J.H. (1993) Brain proline-directed protein kinase phosphorylates tau on sites that are abnormally phosphorylated in tau associated with Alzheimer's paired helical filaments. *J Biol Chem.* 268: 23512-23518.

Paulus W. et Selim M. (1990) Corticonigral degeneration with neuronal achromasia and basal neurofibrillary tangles. *Acta Neuropathol.* 81: 89-94.

Peacock M.L., Murman D.L., Sima A.A., Warren J.T. Jr, Roses A.D., Fink J.K. (1994) Novel amyloid precursor protein gene mutation (codon 665Asp) in a patient with late-onset Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 35(4): 432-438.

Perez-Tur J., Campion D., Martinez M., Brice A., Tardieu S., Hannequin D., Agid Y., Delacourte A., Clerget-Darpoux F., Chartier-Harlin M.C., Bellis M., Dubois B., Goas Y., Thomasanteriorion C., Jaillarderradt A., Ledoze F., Mallet J., Michon A., Pasquier F., Puel M., Zimmerman M.A. (1995) Evidence for apolipoprotein E epsilon 4 association in early-onset Alzheimer's patients with late-onset relatives. *Am J Med Genet.* 60: 550-553.

Pericak-Vance M.A., Bass M.P., Yamaoka L.H., Gaskell P.C., Scott W.K., Terwedow H.A., Menold M.M., Conneally P.M., Small G.W., Vance J.M., Saunders A.M., Roses A.D., Haines J.L. (1997) Complete genomic screen in late-onset familial Alzheimer disease. Evidence for a new locus on chromosome 12. *JAMA.* 278(15) : 1237-1241.

Perlmutter L.S., Barron E., Saperia D., Chui H.C. (1991) Association between vascular basement membrane components and the lesions of Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* 30: 673-681.

Perry G., Mulvihill P., Manetto V., Autilio, Gambetti L., Gambetti P. (1987) Immunocytochemical properties of Alzheimer straight filaments. *J. Neurosci.* 7(11): 3736-3738.

Pick A.(1892) Über die Beziehungen der senilen Hirnatrophie zur Aphasie. Prag Med Wochenschr. 17: 165-167.

Poorkaj P., Bird T.D., Wijeman E., Nemens E., Garruto R.M., Anderson L., Andreadis A., Winderholt W.C., Raskind M., Schellenberg G.D. (1998) Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann. Neurol.* 43: 815-825.

Pope W., Enam S.A., Bawa N., Miller B.E., Ghanbari H.A., Klein W.L. (1993) Phosphorylated tau epitope of Alzheimer's disease is coupled to axon development in the avian central nervous system. *Esp. Neurol.* 120(1) : 106-113.

Powell H.C., London G.W., Lampert P.W. (1974) Neurofibrillary tangles in progressive supranuclear palsy. Electron microscopic observations. *J Neuropath Exp Neur.* 33: 1: 98-106.

Price J.L., Davis P.B., Morris J.C., White D.L. (1991) The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 12: 295-312.

Probst A., Tolnay M., Langui D., Goedert M., Spillantini M.G. (1996) Pick's disease: Hyperphosphorylated tau protein segregates to the somatoaxonal compartment. *Acta Neuropathol.* 92: 588-596.

### -Q-

Quinlan R., Hutchison C., Lane B. (1994) Intermediate filament proteins. *Protein Profile.* 1: 779-911.

### -R-

Rebeiz J.J., Kolodny E.H., Richardson E.P. Jr, (1968) Corticodentatonigral degeneration with neuronal achromasia. *Arch Neurol* 18(1): 20-33

Reisberg B. (1982) The global deterioration scale for assessment of primary degenerative dementia. *Am. J. Psychiatry.* 139: 1136-1139.

Reynolds C.H., Utton M.A., Gibb G.M., Yates A., Anderton B.H. (1997) Stress-activated protein kinase/c-jun N-terminal kinase phosphorylates tau protein. *J Neurochem.* 68: 1736-1744.

Riemenschneider M., Buch K., Schmolke M., Kurz A., Guder W.G. (1996) Cerebrospinal protein tau is elevated in early Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 212: 209-211.

Rinne J.O., Lee M.S., Thompson P.D., Marsden C.D. (1994) Corticobasal degeneration - A clinical study of 36 cases. *Brain.* 117: 1183-1196.

Rocca W.A., Hofman A., Brayne C., Breteler M.M.B., Clarke M., Copeland J.R (1991) Frequency and distribution of Alzheimer's disease in Europe - A collaborative study of 1980-1990 prevalence findings. *Ann Neurol.* 30: 381-390.

Rogers J., Luber-Narod J., Styren S.D., Civin W.H. (1988) Expression of immune system-associated antigens by cells of the human central nervous system: relationship to the pathology of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 9(4): 339-349

Roses A.D., Saunders A.M., Alberts M.A., Strittmatter W.J., Schmechel D., Gorder E., Pericak-Vance M.A. (1995) Apolipoprotein E  $\epsilon$ 4 allele and risk of dementia. *JAMA.* 273: 374-375.

Rosler N., Wichart I., Jellinger K.A. (1996) Total tau protein immunoreactivity in lumbar cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 60: 237-238.

Ross M.H., Galaburda A.M., Kemper T.L. (1984) Down's syndrome: is there a decreased population of neurons? *Neurology* 34(7): 909-916

Rossor M.N., Fox N.C., Beck J., Campbell T.C., Collinge J. (1996) Incomplete penetrance of familial Alzheimer's disease in a pedigree with a novel presenilin-1 gene mutation. *Lancet.* 347: 1560.

**-S-**

Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D., St George-Hyslop P.H.S., Pericak (1993) Association of apolipoprotein-E allele epsilon-4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology.* 43: 1467-1472.

Sautiere P.E., Caillet-Boudin M.L., Watzet A., Buée-Scherrer V., Delacourte A. (1993) Detection of Alzheimer type pathological epitopes on Tau proteins of neuroblastoma cells after treatment with okadaic acid. *C R Acad Sci.* 316(5): 533-535.

Scott C.W., Vulliet P.R., Caputo C.B. (1993) Phosphorylation of tau by proline-directed protein kinase (p34(cdc2)/p58(cyclin-A)) decreases tau-induced microtubule assembly and antibody SMI33 reactivity. *Brain Res.* 611: 237-242.

Scott C.W., Spreen R.C., Herman J.L., Chow F.P., Davison M.D., Young J. C. (1993) Phosphorylation of recombinant tau by cAMP-dependent protein kinase - Identification of phosphorylation sites and effect on microtubule assembly. *J Biol Chem.* 268: 1166-1173.

Schlageter N.L., Carson R.E., Rapoport S.I. (1987) Examination of blood-brain barrier permeability in dementia of the Alzheimer type with [68Ga]EDTA and positron emission tomography. *J Cereb Blood Flow Metab.* 7(1):1-8.

Schmidt M.L., Huang R., Martin J.A., Henley J., Mawal-Dewan M., Hurtig H.I., Lee V.M.Y., Trojanowski J.Q. (1996) Neurofibrillary tangles in progressive supranuclear palsy contain the

same tau epitopes identified in Alzheimer's disease PHF-tau. *J Neuropath Exp Neur.* 55: 534-539.

Selkoe D.J., Abraham C.R., Podlisny M.B., Duffy L.K. (1986) Isolation of low-molecular-weight proteins from amyloid plaque fibers in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 46: 1820.

Selkoe D.J. (1996) Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 271: 18295-18298.

Sergeant N., David J.P., Lefranc D., Vermersch P., Watzel A., Delacourte A. (1997) Different distribution of phosphorylated tau protein isoforms in Alzheimer's and Pick's diseases. *FEBS Lett.* 412: 578-82.

Seubert P., Mawal-Dewan M., Barbour R., Jakes R., Goedert M., Johnson G.V.W., Litersky J.M., Schenk D., Lieberburg I., Trojanowski J.Q., Lee V.M.Y. (1995) Detection of phosphorylated Ser(262) in fetal tau, adult tau, and paired helical filament tau. *J Biol Chem.* 270: 18917-18922.

Sherrington R., Rogaev E.I., Liang Y., Rogaeva E.A., Levesque G., Ikeda M., Chi H., Lin C., Li G., Holman K., Tsuda T., Mar L., Foncin J.F., Bruni A.C., Montesi M.P., Sorbi S., Rainero I., Pinessi L., Nee L., Chumakov I., Pollen D., Brookes A., Sanseau P., Polinsky R.J., Wasco W., Dasilva H.A.R., Haines J.L., Pericak-Vance M.A., Tanzi R.E., Roses A.D., Fraser P.E., Rommens J.M., St George-Hyslop P.H. (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature.* 375: 754-760.

Singh T.J., Grundke-Iqbal I., Iqbal K. (1995) Phosphorylation of tau protein by casein kinase-1 converts it to an abnormal Alzheimer-like state. *J Neurochem.* 64: 1420-1423.

Sinha U.K., Hollen K.M., Miller C.A. (1993) Abnormal neuritic architecture identified by Di-I in Pick's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 52: 411-418.

Skoog I., Vanmechelen E., Andreasson L.A., Palmertz B., Davidsson P., Hesse C., Blennow K. (1995) A population-based study of tau protein and ubiquitin in cerebrospinal fluid in 85-year-olds: Relation to severity of dementia and cerebral atrophy, but not to the apolipoprotein E4 allele. *Neurodegeneration.* 4: 433-442.

Song J., Combs C.K., Pilcher W.H., Song L.Y., Utal A.K., Coleman P.D. (1997) Low initial tau phosphorylation in human brain biopsy samples. *Neurobiol Aging.* 18(5): 475-481.

Spillantini M.G., Schmidt M.L., Lee V.M.Y., Trojanowski J.Q., Jakes R., Goedert M. (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature.* 388: 839-840.

Spillantini M.G., Bird T.D., Ghetti B. (1998) Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: a new group of tauopathies. *Brain Pathol.* 8: 387-402.

Spillantini M.G., Murrell J.R., Goedert M., Farlow M.R., Klug A., Ghetti B. (1998) Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 7737-7741.

Steele J.C., Richardson J.C., Olzewski J. (1964) Progressive supranuclear palsy. A heterogeneous degeneration involving brain stem, basal ganglia and cerebellum with vertical gaze and pseudobulbar palsy, nuchal dystonia and dementia. *Arch Neurol.* 10: 333-359.

Steiner B., Mandelkow E.M., Biernat J., Gustke N., Meyer H.E., Schmidt B., Mieskes G., Soling H.D. (1990) Phosphorylation of microtubule-associated protein Tau - Identification of the site for Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin dependent Kinase and relationship with Tau-phosphorylation in Alzheimer tangles. *EMBO J.* 9: 3539-3544.

Strittmatter W.J., Weisgraber K.H., Goedert M., Saunders A.M., Huang D., Corder E.H., Dong L.M., Jakes R., Alberts M.J., Gilbert J.R., Han S.H., Hulette C., Einstein G., Schmechel D.E., Pericak-Vance M.A., Roses A.D. (1994) Hypothesis - microtubule instability and paired helical filament formation in the Alzheimer disease brain are related to apolipoprotein e genotype. *Exp Neurol.* 125: 163-171.

Sulvaka R., Wikstrom J., Aromaa A. (1985) Prevalence of severe dementia in Finland. *Neurology.* 35: 1025-1029.

### -T-

Tabaton M., Whitehouse P.J., Perry G., Davies P., Autilio-Gambetti P. (1988) Alz 50 recognizes abnormal filaments in Alzheimer's disease and progressive supranuclear palsy. *Ann. Neurol.* 24: 407-413.

Takashima A., Murayama M., Murayama O., Kohno T., Honda T., Yasutake K., Nihonmatsu N., Mercken M., Yamaguchi H., Sugihara S., Wolozin B. (1998) Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(16): 9637-9641

Takauchi S., Mizuhara T., Miyoshi K., (1983) Unusual paired helical filaments in Progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol.* 59: 225-228.

Tato R.E., Frank A., Hernanz A. (1995) Tau protein concentrations in cerebrospinal fluid of patients with dementia of the Alzheimer type. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 59: 280-283.

Tellez-Nagel I. et Wisniewski H.M. (1973) Ultrastructure of neurofibrillary tangles in Steele-Richardson-Olszewski syndrome. *Arch. Neurol.* 29: 324-327.

Terajima M., Arai H., Itabashi S., Higuchi M., Zhu C., Sasaki H. (1996) Elevated cerebrospinal fluid tau: implications for early diagnosis of Alzheimer's disease. *J. Am. Geriatr. Soc.* 44: 1012-1013.

Terry R.D., Peck A., Deteresa R., Schechter R., Horupian D.S. (1981) Some morphometric aspects of the brain in senile dementia of the Alzheimer type. *Ann. Neurol.* 10: 184-192.

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4354.

Trojanowski J.Q., Clark C.M., Arai H., Lee V.M.Y. (1996) Elevated levels of tau in cerebrospinal fluid: implications for the antemortem diagnosis of Alzheimer's disease. *Alzheimer disease rev.* 1: 77-83.

-U-

Ulrich J., Haugh M., Anderton B.H., Probst A., Lautenschlager C., His B. (1987) Alzheimer dementia and Pick's disease: neurofibrillary tangles and Pick bodies are associated with identical phosphorylated neurofilament epitopes. *Acta Neuropathol.* 73: :240-246.

-V-

Vaitukaitis J, Robbins JB, Nieschlag E, Ross GT (1971) A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J Clin Endocrinol Metab.* 33(6): 988-991.

Van Broeckhoven C.L. (1995) Molecular genetics of Alzheimer disease: Identification of genes and gene mutations. *Eur. Neurol.* 35: 8-19.

Vandermeeren M., Mercken M., Vanmechelen E., Six J., Vandevoorde A., Martin J.J., Cras P. (1993) Detection of tau proteins in normal and Alzheimer's disease cerebrospinal fluid with a sensitive sandwich Enzyme-Linked immunosorbent assay. *J Neurochem.* 61: 1828-1834.

Vandevoorde A., Vanmechelen E., Vandermeeren M., Dessaint F., Beeckman W., Cras P. (1995) Detection of tau in cerebrospinal fluid. *Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders.* Eds: Iqbal, K. Mortimer, J.A. Winblad, B. Wisniewski, H.M. John Wiley & Sons Ltd. 189-195.

Vanduijn C.M., Deknijff P., Cruts M., Wehnert A., Havekes L.M., Hofman A., Van Broeckhoven C. (1994) Apolipoprotein E4 allele in a population-based study of early-onset Alzheimer's disease. *Nature Genetics.* 7: 74-78.

Vermersch P., Robitaille Y., Bernier L., Wattez A., Gauvreau D., Delacourte A. (1994) Biochemical mapping of neurofibrillary degeneration in a case of progressive supranuclear palsy: Evidence for general cortical involvement. *Acta Neuropathol.* 87: 572-577.

Vermersch P., Bordet R., Ledoze F., Ruchoux M.M., Chapon F., Thomas P., Destée A., Lechevallier B. (1995) Demonstration of a specific profile of pathological Tau proteins in frontotemporal dementia cases. *C R Acad Sci.* 318: 439-445.

Vigo-Pelfrey C., Seubert P., Barbour R., Blomquist C., Lee M., Lee D., Coria F., Chang L., Miller B., Lieberburg I., Schenk D. (1995) Elevation of microtubule-associated protein tau in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Neurology*. 45: 788-793.

Vigo-Pelfrey C., Seubert P., Blomquist C., Barbour R., Lee M., Lee D., Coria F., Chang L., Miller B., Lieberburg I., Schenk D. (1995) Tau in cerebrospinal fluid: An antemortem marker for Alzheimer's disease?. *Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders*. Eds: Iqbal, K. Mortimer, J.A.

-W-

Wakabayashi K., Oyanagi K., Makifuchi T., Ikuta F., Homma A., Homma Y., Horikawa Y., Tokiguchi S., (1994) Corticobasal degeneration: Etiopathological significance of the cytoskeletal alterations. *Acta Neuropathol*. 87: 545-553.

Watson A.M. et Scott M.G. (1995) Clinical utility of biochemical analysis of cerebrospinal fluid. *Clin Chem*. 41/3: 343-360.

Wavrant-De Vrièze F., Pérez-Tur J., Lambert J.C., Frigard B., Pasquier F., Delacourte A., Amouyel P., Hardy J., Chartier-Harlin M.C. (1997) Association between the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) and Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett*. 227 : 68-70.

Wechsler D. (1989) Echelle d'intelligence de Wechsler pour adultes, forme révisée (WAISR). Paris, Centre de psychologie appliquée, 156 pages.

Weingarten M.D., Lockwood A.H., Hwo S.Y., Kirschner M.W. (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 1858-1862.

Wilhelmsen K.C., Lynch T., Pavlou E., Higgins M., Nygaard T.G. (1994) Localization of disinhibition-dementia-parkinsonism-amyotrophy complex to 17q21-22. *Am J Hum Genet*. 55: 1159-1165.

Wischik C.M., Novak M., Thogersen H.C., Edwards P.C., Runswick M.J., Jakes R., Walker J.E. (1988) Isolation of a fragment of Tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85: 4506-4510.

Wischik C.M., Novak M., Edwards P.C., Klug A., Tichelaar W., Crowther R.A. (1988) Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85: 4884-4888.

Wisniewski H.M. et Terry R.D. (1973) Reexamination of the pathogenesis of the senile plaque. In: Zimmerman H.M. (Ed), *Progress in neuropathology*. 2: 1-26.

Wu J.M., Chen Y.P., Hsieh T.C., Brandt R., Lee G. (1996) Phosphorylation of native and truncated isoforms of protein tau by the double-stranded DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) shows that the primary phosphorylation sites are localized between amino acid residues 212-231 of the longest tau. *Biochem Mol Biol Int*. 40: 21-31.



Wuerker R.B. et Paley S.L. (1969) Neurofilaments and microtubules in anterior horn cells of the rat. *Tissue Cell*. 1: 387-402.

-Z-

Zemlan F.P. et Dean G.E. (1996) Monoclonal antibody PHF-9 recognizes phosphorylated Ser 404 of Tau protein and labels paired helical filaments. *J Neurosci Res*. 46: 90-97.

Zheng-Fischhofer Q., Biernat J., Mandelkow E.M., Illenberger S., Godemann R., Mandelkow E. (1998) Sequential phosphorylation of Tau by glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and protein kinase A at Thr212 and Ser214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filament-like conformation. *Eur J Biochem*. 252: 542-52.

