

# Le catabolisme des peptides $\beta$ -amyloïdes dans le cerveau : une nouvelle fonction pour la néprilysine

Le rôle de l'accumulation des peptides  $\beta$ -amyloïdes (A $\beta$ ) dans le développement de la maladie d'Alzheimer est aujourd'hui bien accepté et les plaques amyloïdes formées par les peptides A $\beta$  40 et 42 sont souvent considérées comme le trait majeur de la maladie (*m/s* 2001, n° 4, p. 523). Les peptides A $\beta$  dérivent d'un précurseur (APP), une protéine membranaire de type I. Comme pour tout neuropeptide cérébral, les taux d'A $\beta$  formés sont réglés par l'action des enzymes de maturation du précurseur ainsi que par les enzymes de dégradation des peptides formés. La majorité des efforts déployés dans les dix dernières années ont été dirigés vers l'identification des enzymes responsables de la maturation du précurseur amyloïde, dénommés  $\beta$ - et  $\gamma$ -sécrétases. Ces recherches sont d'ores et déjà bien avancées et devraient aboutir à la mise au point d'inhibiteurs spécifiques dont le rôle thérapeutique visera à diminuer la production du peptide amyloïde [1]. Une seconde approche, qui a fait l'objet de peu de recherches, consiste en l'étude de la dégradation de l'A $\beta$ , phénomène appelé « clairance ». Depuis le début du nouveau millénaire, le groupe de T.C. Saido a suggéré un rôle fonctionnel de la néprilysine (aussi appelée NEP, endopeptidase neutre, enképhalinase, 3.4.24.11 ou CD10) dans ce processus [2-4].

La NEP est une métalloprotéase dont l'activité enzymatique est dépendante du zinc et responsable de l'inactivation de nombreux neuropeptides (enképhalines, substance P et peptides natriurétiques, entre autres) (*m/s* 2001, n° 8/9, p. 968). Cette enzyme est aujourd'hui l'archétype d'une sous-famille appelée M13,

constituée de 7 membres. Trois sont des enzymes de maturation de l'endothéline, ECE-1 et ECE-2 (*endothelin converting enzyme*) et Kell, un antigène majeur des érythrocytes humains. Une autre, PEX (ou PHEX), est impliquée dans l'homéostasie du phosphate (*m/s* 2001, n° 5, p. 657). Enfin, deux autres membres de cette famille ont été plus récemment identifiés: ECEL1 (pour *ECE-like*) anciennement nommée XCE (*X-converting enzyme*) car on ne connaît pas ses substrats, et NEP2. Toutes ces molécules sont des glycoprotéines membranaires de type II, avec un court domaine cytosolique situé en amino-terminal, un domaine transmembranaire suivi d'un large domaine contenant le site actif qui, dans la majorité des cas, est exposé à la surface extra-cellulaire, bien que diverses isoformes, notamment de ECE-1 et de NEP2, avec différentes localisations sub-cellulaires aient été caractérisées (*figure 1*).

Afin d'identifier le type d'enzyme responsable de la dégradation des peptides A $\beta$ , et plus particulièrement

de la forme la plus amyloïdogénique A $\beta$  42, le groupe de Saido a d'abord mis au point un système d'injection d'A $\beta$  42 radioactif dans la région CA1 de l'hippocampe chez le rat, permettant ainsi d'étudier son hydrolyse *via* l'analyse par HPLC des produits formés *in vivo*. Étaient injectés avec ce peptide des inhibiteurs de différentes classes d'enzymes (enzymes de type lysosomal, à sérine, cystéine, aspartate, chymotrypsine, aminopeptidases et autres métallopeptidases telles que NEP, ECE et ACE). Seuls le phosphoramidon, un inhibiteur non spécifique des métalloprotéases de la sous famille M13, et le thiorphan, un inhibiteur jusqu'alors connu comme spécifique de la NEP, inhibaient la dégradation du peptide amyloïde injecté. Ces résultats suggérant une action de la NEP dans ce processus, les auteurs ont ensuite comparé le patron de dégradation du peptide amyloïde *in vivo* avec celui obtenu *in vitro* à l'aide d'une préparation de NEP purifiée à partir de cerveau de rat. Les résultats étant similaires, ils ont enfin procédé à une injection

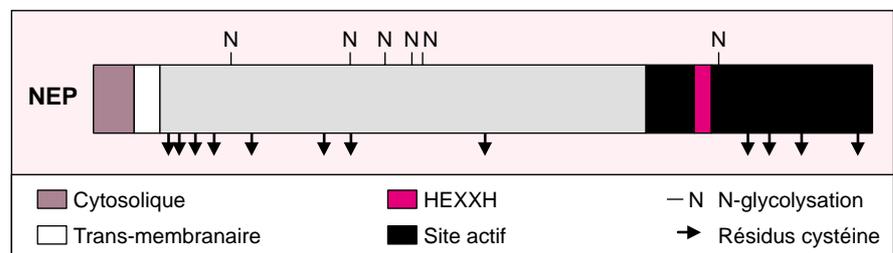


Figure 1. Représentation graphique de NEP. La néprilysine ou NEP est une protéine membranaire de type II. Comme les autres membres de cette famille de métalloprotéases, la NEP est fortement glycosylée, et certaines de ces glycosylations sont importantes pour son activité enzymatique. Sa conformation tridimensionnelle est maintenue par 12 résidus cystéine (flèches noires) tous impliqués dans des ponts disulfures. HEXXH: site de fixation du zinc.

chronique de thiorphan par voie intrathécale (car cet inhibiteur de NEP ne franchit pas la barrière hémato-encéphalique) et observé, après 30 jours, la formation de plaques amyloïdes diffuses [2]. Récemment, ce groupe a confirmé une partie de ces résultats en utilisant des souris invalidées pour le gène NEP, dans le cerveau desquelles ils ont pu mettre en évidence, à l'aide du même protocole d'injection d'A $\beta$  multimerisé suivi d'analyse par HPLC, une diminution du catabolisme du peptide injecté dans la région hippocampique. Il semble par ailleurs que ces mêmes souris mutantes possèdent un taux de A $\beta$  42 endogène augmenté par rapport aux souris sauvages, et selon un gradient régional hippocampe > cortex > thalamus strié > cervelet. Par ailleurs, un effet de dose du gène est obtenu chez les souris hétérozygotes. Enfin, l'augmentation des taux de A $\beta$  42 chez les souris hétérozygotes NEP est comparable à celle que l'on observe chez des souris porteuses de la mutation de la préséniline 1 (mutation liée à des formes familiales de maladie d'Alzheimer) [3] et (*m/s* 1999, n° 1, p. 119).

Bien que l'ensemble de ces résultats plaident en faveur d'un rôle fonctionnel de la NEP dans la dégradation du peptide amyloïde, cela n'exclut en rien l'implication d'autres membres de la famille M13 dans ce processus. En effet, les résultats d'HPLC présentés par le groupe de Saido révèlent qu'une partie du peptide A $\beta$  42 injecté est toujours métabolisée chez les souris dont le gène de la NEP a été invalidé. L'apparition du catabolite majeur chez les animaux homozygotes n'est en réalité diminuée que d'environ 50 % par rapport à ce que l'on observe chez les animaux sauvages. En outre, si l'injection chronique de thiorphan dans le cerveau de rat est accompagnée par l'apparition de plaques amyloïdes diffuses, celles-ci ne sont jamais observées dans le cerveau des souris mutantes. De plus, il faut souligner que les concentrations inhibitrices de thiorphan sont d'environ 2 nM en ce qui concerne la NEP, alors que les concentrations des solutions administrées *in situ* étaient de

1  $\mu$ M et 1 mM, valeurs à partir desquelles l'agent perd sa spécificité et peut alors inhiber de nombreuses autres métalloprotéases, NEP2, ECE-1 et ACE en particulier. Enfin, dans aucun des cas présentés, le thiorphan n'inhibe la totalité du catabolisme du peptide amyloïde.

De manière intéressante, quatre laboratoires ont récemment identifié un nouveau membre de la famille M13 dénommé NEP2 (mais aussi *secreted endopeptidase-SEP* ou *neprylisin-like NL-1* ou *NL- $\alpha$* ) [4-7]. Celui-ci s'avère être inhibé par le thiorphan avec un  $K_i$  de l'ordre du nanomolaire et est également capable de cliver les peptides A $\beta$  *in vitro* avec un profil identique à celui produit par la NEP [4]. Par ailleurs, une étude de Eckman *et al.* [8] montre que l'enzyme de conversion de l'endothéline, ECE-1, autre membre de la famille M13, est également capable de métaboliser les peptides A $\beta$  *in vivo* et *in vitro*, dans deux modèles cellulaires, les CHO (cellules d'ovaires de hamster) et les cellules endothéliales humaines de la veine du cordon ombilical. De plus, ces auteurs suggèrent que ce catabolisme des peptides amyloïdes par l'ECE est intracellulaire. Enfin, on peut noter que ces deux dernières enzymes, ECE-1 et NEP2, sont localisées sur le chromosome 1 chez l'homme, dans une région associée à la maladie d'Alzheimer [9].

Il semble donc que plusieurs enzymes de la famille M13 des métalloprotéases pourraient jouer un rôle dans le phénomène de clairance des peptides amyloïdes avec, potentiellement, un rôle clé pour la NEP. Il sera sans doute essentiel dans le futur d'examiner ce phénomène dans différentes régions du cerveau exprimant ces enzymes de manière hétérogène. On peut en effet supposer que les enzymes impliquées jouent un rôle spécifique intra- ou extracellulaire, mais aussi selon les cellules ou les régions. Bien qu'il soit en théorie possible d'envisager une modulation de l'activité de ces enzymes comme traitement d'appoint de la maladie d'Alzheimer, cette voie semble pour l'instant irréaliste en pratique : il est en effet plus facile de développer un inhibiteur qu'un activateur enzymatique, et la capacité des

enzymes de dégrader les peptides A $\beta$  40 et 42 sous forme d'agrégats au sein des plaques amyloïdes reste à démontrer. Malgré tout, ces résultats amènent de nouveaux gènes candidats dans l'étude de l'étiologie de la maladie d'Alzheimer et ouvrent, de fait, une nouvelle voie de recherche.

1. Vassar R, Citron M. A $\beta$ -generating enzymes: recent advances in  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase research. *Neuron* 2000; 27: 419-22.
2. Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, *et al.* Identification of the major A $\beta$  1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med* 2000; 6: 143-50.
3. Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, *et al.* Metabolic regulation of brain A $\beta$  by neprilysin. *Science* 2001; 292: 1550-2.
4. Shirota K, Tsubuki S, Iwata N, *et al.* Neprilysin degrades both amyloid  $\beta$  peptides 1-40 and 1-42 most rapidly and efficiently among thiorphan and phosphoramidon-sensitive endopeptidases. *J Biol Chem* 2001; 276: 21895-901.
5. Ikeda K, Emoto N, Raharjo SB, *et al.* Molecular identification and characterization of novel membrane-bound metalloprotease, the soluble secreted form of which hydrolyzes a variety of vasoactive peptides. *J Biol Chem* 1999; 274: 32469-77.
6. Ouimet T, Facchinetti P, Rose C, Bonhomme MC, Gros C, Schwartz JC. Neprilysin II: a putative novel metalloprotease and its isoforms in CNS and testis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 271: 565-70.
7. Ghaddar G, Ruchon AF, Carpentier M, *et al.* Molecular cloning and biochemical characterization of a new mouse testis soluble-zinc-metalloprotease of the neprilysin family. *Biochem J* 2000; 347: 419-29.
8. Eckman EA, Reed DK, Eckman CB. Degradation of the Alzheimer's Amyloid beta peptide by endothelin-converting enzyme. *J Biol Chem* 2001; 276: 24540-8.
9. Kehoe P, Warvran-De Vrieze F, Crook R, *et al.* A full genome scan for late onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 237-45.

#### Tanja Ouimet

*Inserm U. 109, Unité de neurobiologie et pharmacologie moléculaire, IFR Broca-Ste-Anne, 2ter, rue d'Alésia, 75014 Paris, France.*