

Le précurseur du peptide amyloïde dans la maladie d'Alzheimer

Jean-Noël Octave
Anne-Françoise Macq
Barbara Philippe

La maladie d'Alzheimer (MA) se caractérise par la formation, dans le cortex cérébral, de plaques séniles et de dégénérescences neurofibrillaires. Dans les plaques séniles s'accumule un petit peptide amyloïde appelé A- β qui dérive d'un précurseur: le précurseur du peptide amyloïde ou APP. Dans de rares formes familiales de MA, des mutations génétiques de l'APP ont été décrites. Cela suggère donc que le métabolisme de l'APP pourrait jouer un rôle déterminant dans le développement de la maladie. Différentes isoformes de l'APP, obtenues par épissage alternatif d'un très grand gène, comportent des domaines aux fonctions très diverses. Le peptide A- β est produit sous l'action des β et γ sécrétases, alors que le clivage de l'APP par l' α -sécrétase n'est pas amyloïdogène. Pour être neurotoxique, le peptide amyloïde doit s'organiser en structure fibrillaire. Son association à certaines protéines que l'on trouve dans les dépôts amyloïdes du cortex cérébral pourrait favoriser la formation des fibrilles. Le développement de nouvelles approches thérapeutiques bénéficiera grandement non seulement des modèles cellulaires qui permettent d'étudier le métabolisme de l'APP, mais également de la mise au point de modèles animaux performants.

La démence de la personne âgée constitue un problème majeur de santé publique en raison du vieillissement de la population. Une des causes les plus fréquentes de démence est la maladie d'Alzheimer (MA) [1]. La prévalence de la MA augmente de manière exponentielle avec l'âge; étant de 0,02 % pour des groupes d'âge de 30-59 ans, elle peut atteindre 10,8 % pour des groupes d'âge de 80-89 ans. En relation avec le profil d'évolution de la prévalence, l'incidence de MA semble tripler pour chaque nouvelle tranche de 10 ans d'âge à partir de 65 ans. En

conséquence, les stratégies thérapeutiques capables de retarder de dix ans l'apparition de la maladie pourraient réduire le taux de MA de 66 %. La description originale d'Alzheimer en 1907 décrivait le cas d'une femme de 51 ans décédée des suites d'une démence. Ce cas fut d'abord perçu comme un changement de personnalité. Ensuite, Alzheimer remarqua une importante détérioration de la mémoire et des fonctions cognitives. Après plusieurs années, ces manifestations neuropsychologiques furent considérées comme un dysfonctionnement homogène des fonctions du langage, des capacités perceptives et

ADRESSE

J.N. Octave : *chercheur qualifié du Fonds national de la recherche scientifique*; A.F. Macq, B. Philippe : *étudiants en thèse de doctorat au laboratoire de neurochimie*. Université catholique de Louvain, faculté de médecine, laboratoire de neurochimie, 3031 clos Chapelle-aux-Champs, B-1200 Bruxelles, Belgique.

RÉFÉRENCES

1. Ritchie K, Robine JM. La démence sénile en France: une estimation de la charge actuelle et projection des tendances futures. *médecine/sciences* 1994; 10: 680-6.
2. Brion JP, Passareiro H, Nunez J, Flament-Durand J. Mise en évidence immunologique de la protéine tau au niveau des lésions de dégénérescences neurofibrillaires de la maladie d'Alzheimer. *Arch Biol (Bruxelles)* 1985; 95: 229-35.
3. Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 1989; 3: 519-26.
4. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski H, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 4913-7.
5. Glenner GG, Wong CG. Initial report on the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 120: 885-90.
6. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 4245-9.
7. Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 1987; 325: 733-6.
8. Sinet P, Nicolle A, Ceballos I, Delabar J. Trisomie 21 et maladie d'Alzheimer. *médecine/sciences* 1987; 3: 256-62.
9. St George Hyslop PH, Tanzi RE, Polinsky RJ, Haines JL, Nee L, Watkins PC, Myers RH, Feldman RG, Pollen D, Drachman D, et al. The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science* 1987; 235: 885-90.

gestuelles, appelé syndrome aphaso-agnoso-apraxique. Cependant, il devint rapidement évident qu'une conception homogène des manifestations neuropsychologiques de la MA n'était pas défendable. Aujourd'hui, l'hétérogénéité de la maladie est démontrée par différents aspects: l'origine génétique, l'âge de survenue, l'évolution clinique, les symptômes psychiatriques et neurologiques et les lésions anatomopathologiques. Le diagnostic de la MA n'est formel que lorsque les données cliniques sont confirmées par l'analyse neuropathologique du cerveau prélevé en *post-mortem*.

Signes anatomopathologiques de la maladie d'Alzheimer

Les dégénérescences neurofibrillaires

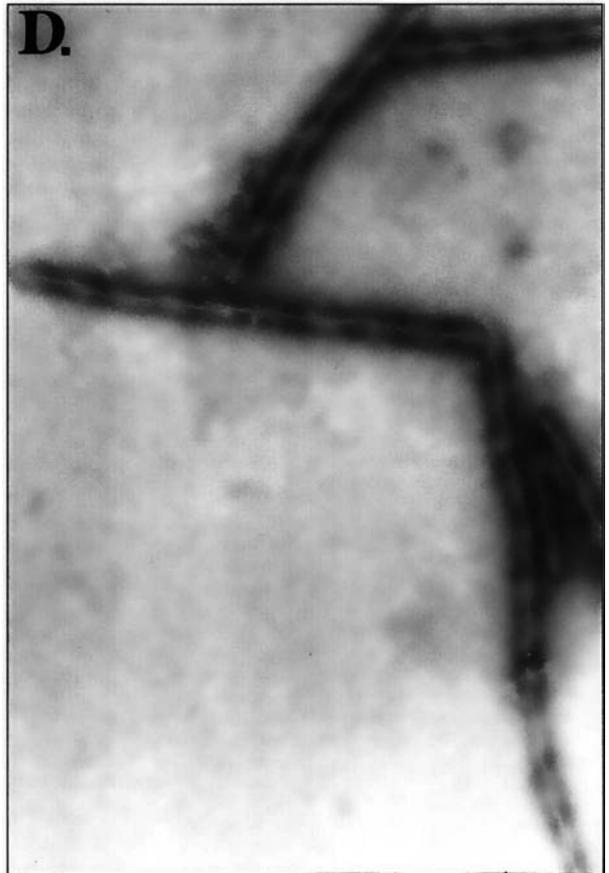
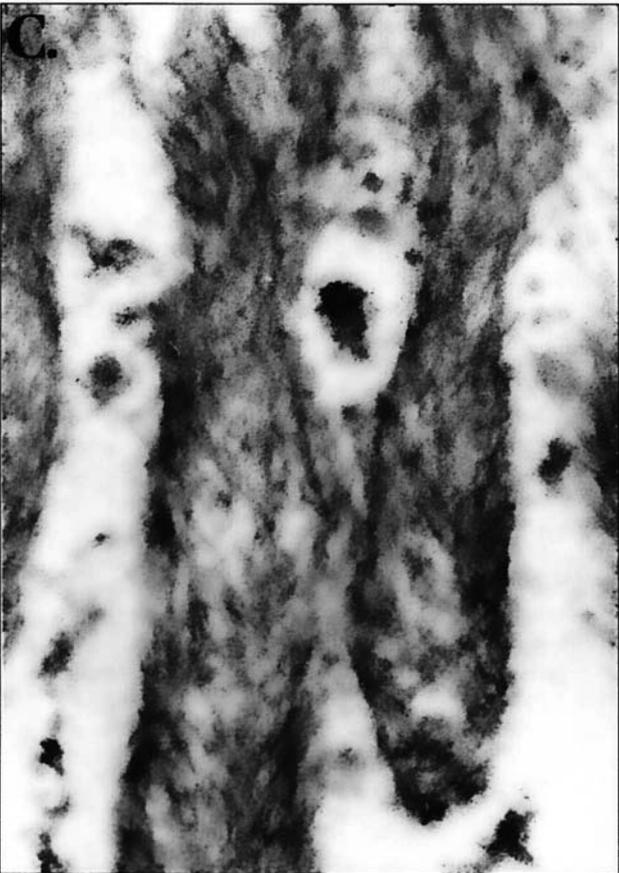
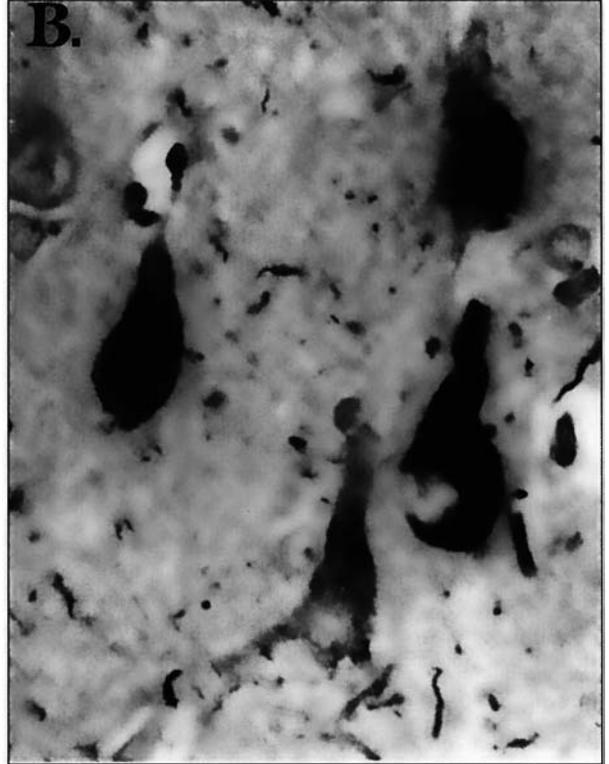
L'accumulation progressive de neurofibrilles intraneuronales constitue une caractéristique importante de la MA. C'est au niveau de la région transentorhinale que se trouvent les premières modifications du cortex cérébral. Les dégénérescences neurofibrillaires sont composées de faisceaux de filaments organisés en double hélice qui peuvent être visualisés par des anticorps dirigés contre la protéine tau [2] (*figure 1*). Tau appartient à une famille de protéines d'environ 45 à 68 kDa produites après épissage alternatif d'un gène unique [3]. Dans le cerveau humain, il existe six isoformes de tau. *In vitro*, la protéine se lie à la tubuline, et induit sa polymérisation en microtubules. Isolée du cerveau de patients atteints de la MA, tau sédimente à 100 000g dans sa forme de filaments en double hélice, et est caractérisée par une mobilité électrophorétique anormalement lente en conditions dénaturantes [4]. Cette modification

biochimique semble résulter d'une hyperphosphorylation de la protéine.

Les plaques séniles

Les plaques séniles sont des lésions extracellulaires contenant un noyau de fibres amyloïdes (*figure 1*). Bien que les dépôts amyloïdes extracellulaires soient présents dans le cerveau de sujets normaux âgés, leur densité est généralement beaucoup plus importante dans le cerveau de patients atteints de la MA. La nature biochimique des fibres fut déterminée à partir des dépôts amyloïdes cérébrovasculaires décrits dans plus de 90 % des cas de MA. A partir de ces fibres, un petit peptide d'environ 4 kDa appelé peptide β a été purifié [5]. Des anticorps dirigés contre le peptide β ont permis de localiser non seulement les dépôts amyloïdes vasculaires, mais également ceux des plaques séniles. L'analyse de la séquence en acides aminés des fibres amyloïdes des plaques séniles révèle qu'elles sont composées d'une protéine similaire appelée peptide A- β [6]. Différents types de dépôts de A- β ont été décrits: les plaques neuritiques avec un centre coloré par le rouge Congo, entouré de neurites dégénérés et de cellules gliales, ainsi que les plaques diffuses non congophiliques qui sont constituées de dépôts diffus de peptide A- β . Il semble que l'organisation fibrillaire du peptide A- β , le dépôt de certaines molécules associées à ce peptide et l'activation microgliale locale soient des étapes importantes conduisant à la formation des plaques neuritiques à partir des dépôts diffus. Le peptide A- β de 39 à 42 acides aminés provient d'un précurseur plus grand. Le précurseur du peptide amyloïde (APP), caractérisé par clonage d'un ADNc de cerveau fœtal humain, est une glycoprotéine transmembranaire de 695 acides aminés [7].

Figure 1. Les lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer sont révélées par des anticorps (A, B) et analysées en microscopie électronique (C, D). A. Les plaques séniles sont des lésions extracellulaires contenant un dépôt de substance amyloïde révélé par un anticorps anti-A- β . B. Les dégénérescences neurofibrillaires sont des lésions intraneuronales révélées par un anticorps anti-tau. C. L'organisation fibrillaire des dépôts amyloïdes est révélée en microscopie électronique. D. Les dégénérescences neurofibrillaires sont constituées de faisceaux de filaments organisés en double hélice.



Le gène du précurseur du peptide amyloïde

Le gène codant pour l'APP est localisé sur le bras long du chromosome 21 humain [7]. Les mongoliens, caractérisés par la trisomie 21, développent, à partir de l'âge de 35 ans, une quantité importante de plaques séniles et de dégénérescences neurofibrillaires dans le cortex cérébral [8]. Le surdosage de différents gènes, dont celui de l'APP, pourrait donc jouer un rôle important dans la formation des lésions caractéristiques de la MA. Par ailleurs, dans environ 10 % des cas, la MA est héréditaire et, dans certaines familles, le chromosome 21 est responsable de la transmission autosomique dominante de l'affection [9]. Néanmoins, dans la plupart de ces familles, ce n'est pas le gène APP lui-même qui est défectueux [10], mais bien un autre gène, localisé aussi sur le chromosome 21. Dans de très rares familles touchées par une MA survenant à un âge précoce, des mutations génétiques de l'APP ont cependant été mises en évidence [11, 12]. Ces mutations conduisent à différentes substitutions d'acides aminés de la protéine. Alors que dans la protéine normale, l'acide aminé 642 est une valine, cet acide aminé est substitué par une isoleucine, une phénylalanine, ou une glycine, dans la protéine présente chez les patients atteints de la MA. De même, aux positions 595 et 596, la protéine normale contient une lysine suivie d'une méthionine, alors que dans une famille suédoise touchée par la MA, on trouve à cet endroit une succession asparagine-leucine. Des mutations du gène APP induisent également des substitutions des acides aminés 617 et 618, au sein même du peptide A- β . Ces mutations sont liées à une forme familiale d'amyloïdose vasculaire de type hollandais, ou à une MA caractérisée par une angiopathie importante. Ces modifications très minimes de l'APP semblent constituer des facteurs étiologiques de la maladie, puisque ces mutations ne sont jamais présentes dans la population générale. Néanmoins, ces mutations ne permettent d'expliquer qu'environ 2 % des formes familiales de la maladie d'Alzheimer. Il faut donc trouver d'autres origines génétiques de l'affection. Dans certaines

formes familiales de MA caractérisées par un âge de survenue tardif, le chromosome 19 est responsable de la transmission héréditaire de l'affection [13]. Ce chromosome porte le gène de l'apolipoprotéine E, dont l'allèle $\epsilon 4$ constitue un facteur de risque important de développer la MA (*m/s n° 10, vol. 9, p. 1142 ; n° 3, vol. 10, p. 470*). Dans d'autres familles encore, le chromosome 14 est responsable de la transmission de la MA (*m/s n° 10, vol. 8, p. 1115*) [14]. L'identification de différents chromosomes impliqués dans diverses formes familiales de MA démontre l'hétérogénéité génétique de l'affection.

Le gène APP est très grand à l'échelle moléculaire. Il contient au moins 18 exons différents et a une taille d'environ 400 kpb; sa séquence complète n'a pas encore été déterminée. Le promoteur du gène APP a toutes les caractéristiques de celui d'un gène domestique, sans TATA box et avec de nombreuses répétitions du doublet CG. Dans le cas du gène APP, le terme d'épissage alternatif se justifie pleinement puisque 10 ARNm différents sont transcrits à partir du même gène, comme l'ont montré plusieurs laboratoires, dont le nôtre [7, 15-18]. Ces différents ARNm codent pour des protéines dont le contenu en acides aminés varie de 365 à 770. Dans le système nerveux central, l'APP 695 est largement majoritaire, surtout chez le sujet jeune. En fonction de l'âge, on remarque néanmoins une augmentation de l'isoforme de 751 acides aminés, qui peut atteindre une proportion équivalente à celle de l'APP 695. Dans le tissu périphérique, c'est essentiellement l'isoforme contenant 751 acides aminés qui est exprimée. L'ARNm correspondant contient tous les exons codant pour l'APP 695 plus un exon codant pour une séquence analogue des inhibiteurs de protéases à sérine. Parmi les 10 ARNm obtenus par épissage alternatif d'un gène unique, deux codent pour des isoformes particulières de l'APP. Nous avons montré que l'APP 563 ne contient ni le peptide amyloïde, ni la région transmembranaire de la protéine. Il s'agit d'une isoforme sécrétée non amyloïdogène de l'APP [17]. L'APP 365 ne contient également ni la séquence A- β , ni la région

RÉFÉRENCES

10. Van Broeckhoven C, Genthe AM, Vandenberghe A, Horstheinke B, Backhovens H, Raeymaekers P, Van Hul W, Wehnert A, Gheuns J, Cras P, Bruylant M, Martin JJ, Salbaum M, Multhaup G, Masters CL, Beyreuther K, Gurling HDM, Mullan MJ, Holland A, Barton A, Irving N, Williamson R, Richards SJ, Hardy JA. Failure of familial Alzheimer's disease to segregate with A4-amyloid gene in several European families. *Nature* 1987; 329: 153-5.
11. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, Hardy J. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 1991; 349: 704-6.
12. Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nature Genet* 1992; 1: 345-7.
13. Pericak-Vance MA, Bebout JL, Gaskell PC Jr, Yamaoka LH, Hung WY, Alberts MJ, Walker AP, Bartlett RJ, Haynes CA, Welsh KA, et al. Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 1034-50.
14. Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, White JA, Bonnycastle L, Weber JL, Alonso ME, et al. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* 1992; 258: 668-71.
15. Ponte P, Gonzalez-DeWhitt P, Schilling J, Miller J, Hsu D, Greenberg B, Davis K, Wallace W, Lieberburg I, Fuller F, Cordell B. A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors. *Nature* 1988; 331: 525-7.
16. Kitaguchi N, Takahashi Y, Tokushima Y, Shirohira S, Ito H. Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature* 1988; 331: 385-96.
17. de Sauvage F, Octave JN. A novel mRNA of the A4 amyloid precursor gene coding for a possibly secreted protein. *Science* 1989; 245: 651-3.

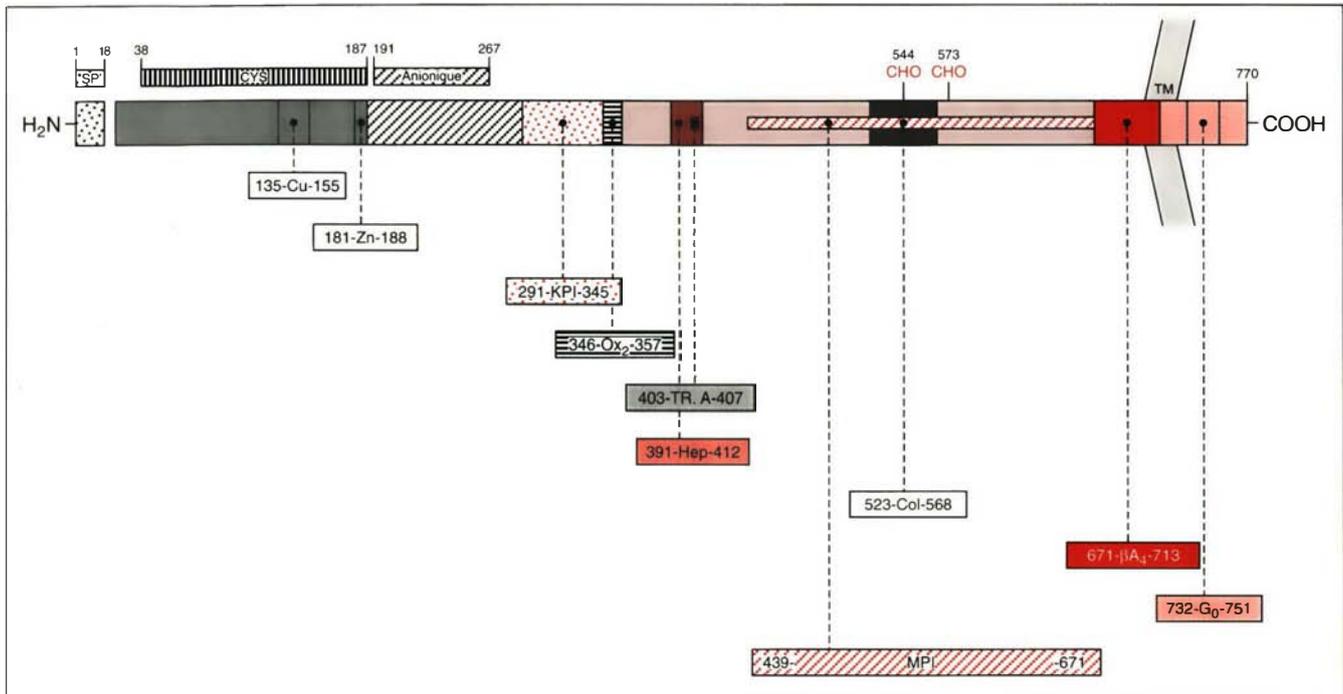


Figure 2. **Les différents domaines du précurseur du peptide amyloïde (APP 770).** Le peptide signal (SP) est clivé au cours de la sécrétion. Le domaine extracellulaire N-terminal contient une région riche en cystéines (cys), un domaine anionique (anionic), et des sites de glycosylation (CHO 544 et 573). L'APP fixe le cuivre (Cu), le zinc (Zn), l'héparine (Hep), et le collagène (Col). Il possède des régions inhibitrices de protéases à sérine (KPI) et de métalloprotéases (MPI). L'activité trophique de la protéine a été localisée (TR). L'APP contient également un domaine analogue à un antigène lymphocytaire (Ox₂), pourrait interagir avec une protéine fixant le GTP (G₀) et produit le peptide A₄-β (βA₄) dont la séquence est en partie extracellulaire et en partie transmembranaire (TM). La position exacte de ces différents domaines est indiquée par la numérotation des acides aminés correspondants.

transmembranaire ; ces deux isoformes contiennent néanmoins une séquence analogue des inhibiteurs de protéases à sérine.

Outre un épissage alternatif, l'ARNm de l'APP utilise deux sites de polyadénylation dans sa région 3' non codante. Comme en témoignent les travaux de notre groupe, cette polyadénylation alternative de l'ARNm permet de contrôler la production de la protéine, l'ARNm utilisant le deuxième site de polyadénylation étant traduit de manière trois fois plus efficace que l'ARNm utilisant le premier site de polyadénylation [19].

Les propriétés biologiques du précurseur du peptide amyloïde

Le clonage des premiers ADNc codant pour l'APP a révélé que cette protéine est une protéine transmembranaire avec un seul segment transmembranaire (figure 2). Le domaine

extracellulaire contient une région riche en cystéines qui pourrait stabiliser une structure quaternaire particulière. La région extracellulaire contient également un domaine très anionique qui pourrait être impliqué dans différentes interactions ioniques. L'APP est également une protéine glycosylée, phosphorylée, et sulfatée sur les tyrosines. Récemment, différents domaines de la protéine ont été identifiés. Un domaine extracellulaire de la protéine fixe l'héparine. Il existe également un site de fixation du cuivre, de même qu'un site de fixation du zinc, et en présence de zinc, l'affinité pour l'héparine augmente. La région extracellulaire de la protéine contient également un site de fixation du collagène, une séquence responsable de l'activité trophique de la protéine [20] et une région capable d'inhiber les métalloprotéases. Certaines isoformes contiennent une séquence analogue aux inhibiteurs

de protéases à sérine. Du côté cytoplasmique, une région de la protéine montre une affinité importante pour une protéine fixant le GTP (G₀). La mise en évidence de ces différents domaines fait de l'APP une protéine particulièrement polyvalente. Néanmoins, la fonction essentielle de la protéine reste inconnue.

Le catabolisme du précurseur du peptide amyloïde

La voie catabolique non amyloïdogène

Pour étudier le métabolisme cellulaire de l'APP, des anticorps anti-APP ont été utilisés pour analyser l'expression de la protéine après transfection de l'ADNc correspondant. Après transfection de cellules en culture par l'ADNc de l'APP 695, la protéine correspondante est détectée en immunotransfert par des anti-

RÉFÉRENCES

18. König G, Monning U, Czech C, Prior R, Banati R, Schreiter-Gasser U, Bauer J, Masters CL, Beyreuther K. Identification and differential expression of a novel alternative splice isoform of the beta A4 amyloid precursor protein (APP) mRNA in leukocytes and brain microglial cells. *J Biol Chem* 1992; 267: 10804-9.
19. de Sauvage F, Kruijs V, Marinx O, Huez G, Octave JN. Alternative polyadenylation of the amyloid protein precursor mRNA regulates translation. *EMBO J* 1992; 11: 3099-103.
20. Saitoh T, Sundsmo M, Roch JM, Kimura N, Cole G, Schubert D, Oltersdorf T, Schenk DB. Secreted form of amyloid beta protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. *Cell* 1989; 58: 615-22.
21. Weidemann A, König G, Bunke D, Fischer P, Salbaum-M, Masters CL, Beyreuther K. Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 1989; 57: 115-26.
22. Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T, McClure D, Ward PJ. Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 1990; 248: 1122-4.
23. Shoji M, Golde TE, Ghiso J, Cheung TT, Estus S, Shaffer LM, Cai XD, McKay DM, Tintner R, Frangione B, et al. Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* 1992; 258: 126-9.
24. Citron M, Oltersdorf T, Haas C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ. Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 1992; 360: 672-4.
25. Cai XD, Golde TE, Youkin SG. Release of excess beta protein from a mutant amyloid protein precursor. *Science* 1993; 259: 514-6.

corps spécifiques, dans la fraction cellulaire mais également dans le milieu extracellulaire. Cette protéine soluble extracellulaire est reconnue par des anticorps dirigés contre la partie N-terminale de la protéine mais n'est pas détectée par des anticorps dirigés contre sa partie C-terminale [21]. Ces résultats suggèrent que la protéine soluble est le produit du clivage de la protéine transmembranaire. Ce clivage a lieu au sein même du peptide amyloïde [22] et est réalisé par une ou plusieurs enzymes peu spécifiques qui n'ont pas encore été identifiées, mais néanmoins regroupées sous la terminologie α -sécrétase (figure 3). Pour que le clivage de l'APP puisse avoir lieu, il semble que la protéine doit être ancrée dans une membrane cellulaire. Le clivage par l' α -sécrétase n'est pas influencé par des inhibiteurs de protéases de spécificité variable, ajoutés au milieu de culture des cellules transfectées. L' α -sécrétase semble donc être une enzyme intracellulaire. Cette enzyme est insensible aux inhibiteurs d'enzymes lysosomiales, mais est affectée par une augmentation du

pH dans des vésicules acides de sécrétion.

La voie catabolique amyloïdogène

Parallèlement à l'accumulation de fragments C-terminaux de l'APP résultant du clivage de la protéine par l' α -sécrétase, les cellules transfectées accumulent des fragments C-terminaux de l'APP suffisamment longs pour contenir l'entièreté du peptide amyloïde. Les cellules transfectées produisent également de l'APP soluble clivé au site N-terminal du peptide amyloïde. L'accumulation de ces fragments C-terminaux amyloïdogènes semble impliquer une dégradation lysosomiale de l'APP. Ce clivage est réalisé par une enzyme non identifiée appelée β -sécrétase (figure 3). Il a été démontré récemment que les cellules exprimant l'APP libèrent également du peptide amyloïde A β soluble dans leur milieu de culture [23-25]. Cela suppose un clivage du côté C-terminal du peptide A β . Ce clivage est réalisé par une activité γ -sécrétase qui reste à identifier (figure 3). Le site de clivage de la γ -sécréta-

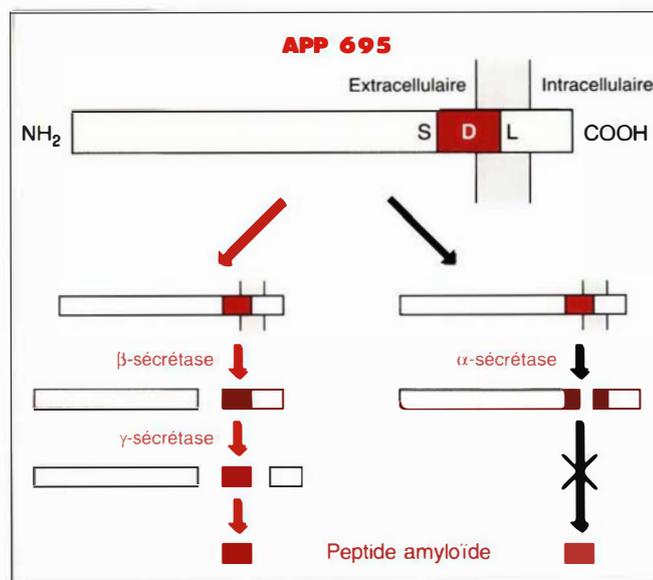


Figure 3. **Les deux voies cataboliques du précurseur du peptide amyloïde.** La voie catabolique non amyloïdogène utilise l'activité α -sécrétase. La voie catabolique amyloïdogène utilise les activités β - et γ -sécrétases. S, D et L localisent les substitutions d'acides aminés induites par les mutations du gène APP. La mutation S (Swedish) entraîne la production accrue de peptide A β . Les mutations D (Dutch) et L (London) augmentent l'organisation fibrillaire du peptide A β .

se étant localisé dans la région transmembranaire de l'APP, il a été suggéré que des altérations membranaires seraient requises pour la production de peptide amyloïde. Néanmoins, les cellules exprimant l'APP produisent du peptide A- β dans des conditions physiologiques. Nous avons donc envisagé une autre hypothèse pour expliquer la formation du peptide amyloïde. L'initiation de la traduction par un AUG interne à l'ARNm de l'APP, situé juste avant la séquence du peptide A- β , pourrait produire des fragments C-terminaux amyloïdogènes qui ne seraient pas transmembranaires, puisqu'ils ne posséderaient pas de peptide signal. Néanmoins, l'introduction d'un codon stop ou une altération de la phase de lecture avant ce codon potentiel d'initiation de la traduction empêche toute formation de peptide amyloïde par les cellules transfectées. Nous avons donc conclu que le peptide A- β est produit par dégradation de l'APP et non par initiation de la traduction de son ARNm par un AUG interne [26]. La production de peptide amyloïde est inhibée par des agents qui bloquent le précurseur dans le réticulum endoplasmique. Le transport de l'APP vers l'appareil de Golgi est donc indispensable pour la production de A- β . Alors que les inhibiteurs d'enzymes lysosomiales n'affectent pas la production de peptide amyloïde, les bases faibles capables d'alcaliniser des vésicules intracellulaires acides empêchent la production de A- β . Le peptide amyloïde semble donc être formé dans une vésicule acide intracellulaire non lysosomiale. L'internalisation de l'APP membranaire apparaît être essentielle dans la formation du peptide A- β .

Régulation de la production du peptide amyloïde

La production de A- β par des cellules en culture procure un modèle intéressant pour étudier l'influence de différents paramètres sur la production de peptide amyloïde. Dans des cellules transfectées, la présence d'une séquence analogue des inhibiteurs de protéases à sérine diminue de deux ou trois fois la production de peptide A- β . Ce résultat suggère que

le domaine inhibiteur de protéases à sérine pourrait inhiber une activité protéase nécessaire à la production du peptide A- β . Néanmoins, la quantité de peptide amyloïde produite à partir de l'APP semble également dépendre du type cellulaire utilisé. Des mutations du gène *APP* décrites dans certaines formes familiales de MA influencent également les voies cataboliques de l'APP. Lorsque des cellules en culture sont transfectées par l'ADNc de l'APP 695 contenant la double mutation mise en évidence dans une famille suédoise touchée par la MA, ces cellules produisent environ six fois plus de peptide amyloïde que les cellules contenant la séquence normale [24, 25]. Une autre mutation provoquant une substitution de la valine proche de l'extrémité C-terminale du peptide A- β n'affecte pas la quantité de peptide amyloïde produit, mais engendre un peptide amyloïde légèrement plus long qui s'organise plus facilement en structure fibrillaire [27]. L'utilisation d'anticorps permettant de discriminer les peptides A- β 1-40 et A- β 1-42 a permis de démontrer que le peptide amyloïde des dépôts vasculaires est constitué essentiellement du peptide 1-40 alors que le peptide amyloïde des plaques séniles contient essentiellement le peptide 1-42. L'utilisation des modèles cellulaires nous a permis de montrer que l'activation de la protéine kinase C par les esters de phorbol favorise la voie catabolique non amyloïdogène de l'APP [28] et inhibe la formation de peptide amyloïde.

La toxicité du peptide amyloïde

Dans le cerveau de patients atteints de la MA, de nombreux dépôts diffus de A- β n'entraînent pas d'altérations visibles des neurones et des cellules gliales qui les entourent. Il semble donc que la présence de dépôts diffus de A- β dans le cortex cérébral ne soit pas suffisante pour induire une neurotoxicité. Dans des modèles de culture cellulaire, le peptide amyloïde soluble non fibrillaire n'est pas toxique. En revanche, il existe une relation directe entre la formation de fibres par le peptide A- β et son pouvoir neurotoxique. L'association du peptide A- β à certaines protéines

telles que les héparan sulfate protéoglycane, l' α 1-antichymotrypsine, et l'apolipoprotéine E pourrait favoriser l'organisation fibrillaire du peptide amyloïde, responsable de sa toxicité [29]. Certains métaux sont également associés au peptide A- β dans les plaques séniles. L'aluminium, le zinc et le fer favorisent l'agrégation du peptide amyloïde *in vitro* [30]. Des études récentes concernant la neurotoxicité du peptide A- β en culture ont montré que le peptide amyloïde peut augmenter la vulnérabilité des neurones à l'exocitotoxicité, à l'hypoglycémie ou aux dommages liés à la peroxydation. Cette neurotoxicité semble résulter d'une perte de l'homéostasie du calcium ionisé intracellulaire $[Ca^{2+}]_i$, et est atténuée par des bloqueurs de canaux calciques. Il semble peu probable que l'effet déstabilisant du peptide A- β sur le $[Ca^{2+}]_i$ soit relayé par des récepteurs puisqu'il requiert l'organisation fibrillaire du peptide et qu'aucune liaison spécifique n'a été détectée sur des neurones. Une incubation prolongée de neurones en présence de peptide A- β induit une dégénérescence neuronale caractérisée par une fragmentation de l'ADN et des modifications morphologiques caractéristiques de l'apoptose.

Interaction entre APP et tau : un lien possible entre les plaques séniles et les lésions neurofibrillaires

Bien que le développement spatio-temporel des lésions neurofibrillaires contraste avec le développement des dépôts amyloïdes (*m/s n° 2, vol. 8, p. 180*), il a été suggéré que la dégénérescence neurofibrillaire de la MA pourrait être induite par l'activité neurotoxique du peptide A- β . La présence des dégénérescences neurofibrillaires dans les formes familiales de la MA caractérisées par une mutation du gène *APP* suggère qu'une anomalie du métabolisme de l'APP pourrait conduire aux modifications du cytosquelette neuronal observées dans la MA. Étant donné que l'APP est rapidement transporté dans des vésicules par un transport axonal antérograde, une association entre l'APP et le cytosquelette semble possible. Cette association pourrait éga-

RÉFÉRENCES

26. Macq AF, Philippe B, Octave JN. The amyloid peptide of Alzheimer's disease is not produced by internal initiation of translation generating C-terminal amyloidogenic fragments of its precursor. *Neurosci Lett* 1994; 182: 227-30.
27. Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L, Eckman C, Golde TE, Younkin SJ. An increased percentage of long amyloid β protein secreted by familial amyloid protein precursor (β APP717) mutants. *Science* 1994; 264: 1336-40.
28. Demaerschalck I, Delvaux A, Octave JN. Activation of protein kinase C increases the extracellular release of the transmembrane amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1181: 214-8.
29. Ma J, Yee A, Brewer B, Das S, Potter H. Amyloid-associated proteins α 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer β -protein into filaments. *Nature* 1994; 372: 92-4.
30. Bush AI, Pettingell WH, Multhaup G, Paradis MD, Vonsattel JP, Gusella JF, Beyreuther K, Masters CL, Tanzi RE. Rapid induction of Alzheimer A β amyloid formation by zinc. *Science* 1994; 265: 1464-7.
31. del C. Alonso A, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 5562-6.
32. Lamb BT, Sisodia SS, Lawler AM, Slunt HH, Kitt CA, Kearns WG, Pearson PL, Price DL, Gearhart JD. Introduction and expression of the 400 kilobase precursor amyloid protein gene in transgenic mice. *Nature Genet* 1993; 5: 22-30.
33. Games D, Adams D, Alessandrini R, et al Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F, β amyloid precursor protein *Nature* 1995; 373: 523-7.

lement survenir dans des conditions pathologiques puisqu'une association *in vitro* entre la partie C-terminale de l'APP et les paires hélicoïdales de filaments a été rapportée. Une association tau-APP observée dans des conditions pathologiques pourrait conduire à des altérations du cytosquelette neuronal. En effet, l'interaction de la protéine tau avec des protéines différentes de son substrat physiologique pourrait diminuer la quantité de protéine tau disponible pour l'assemblage de la tubuline en microtubules [31].

Les modèles animaux de la maladie d'Alzheimer

Pour essayer de retracer l'évolution de la MA et étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans des processus neurodégénératifs, des modèles animaux présentant des caractéristiques proches de celles de la maladie humaine constitueraient des outils particulièrement intéressants. A l'heure actuelle, le modèle le plus approprié est le singe âgé qui développe des déficits de la mémoire, des réductions de certains neurotransmetteurs et une neuropathologie caractéristique de la MA. De très gros efforts ont été entrepris pour développer un modèle animal transgénique mimant les signes de la MA. Cependant, les animaux transgéniques créés avec des constructions d'ADNc de l'APP n'ont montré que de très faibles niveaux d'expression du produit du transgène et n'ont pas reproduit les caractéristiques de la MA (*m/s n° 8, vol. 7, p. 859*). La construction d'animaux transgéniques à l'aide des séquences génomiques de l'APP comporte des avantages par rapport à l'utilisation de l'ADNc. En effet, les séquences génomiques de l'APP contiennent les éléments régulateurs de la transcription et les sites d'épissage nécessaires pour produire les différentes isoformes de l'APP (*m/s n° 4, vol. 11, p. 627*). Le transfert de chromosomes artificiels de levure (YAC) contenant la séquence complète du gène de l'APP dans des cellules embryonnaires de souris a été réalisé [32]. Chez les souris transgéniques ainsi produites, les niveaux d'ARNm de l'APP humain et l'expression de la protéine sont comparables à ceux de l'APP endogène.

Néanmoins, ces souris transgéniques ne développent aucune lésion neuropathologique caractéristique de la MA. Récemment, ont été décrites des souris transgéniques exprimant l'APP humain en quantité dix fois plus importante que l'APP endogène. Ces animaux accumulent des dépôts amyloïdes dans le cortex cérébral, mais ne développent pas de dégénérescences neurofibrillaires (*m/s n° 4, vol. 11, p. 627*) [33].

Amyloïdogénèse

Les études récentes de l'amyloïdose décrite dans différentes affections indiquent que l'amyloïdose doit être considérée comme un problème global de conformation des protéines. L'organisation des protéines amyloïdes en feuillets β plissés parallèles-anti-parallèles est un prérequis pour la détection des dépôts amyloïdes par des agents tels que le rouge Congo. L'identification et la caractérisation des fibres amyloïdes vasculaires et cérébrales déposées dans le cerveau de patients atteints de la MA a eu un impact majeur sur la compréhension de cette maladie. La substance amyloïde des plaques séniles et des dépôts cérébrovasculaires contient le peptide A- β . Cependant, les fibres amyloïdes vasculaires sont essentiellement composées de peptide A- β 1-40, tandis que les plaques séniles contiennent du peptide A- β 1-42. Il a été démontré que les derniers acides aminés C-terminaux du peptide A- β jouent un rôle important dans la formation des fibres.

L'origine vasculaire, gliale ou neuronale du peptide A- β a fait l'objet de nombreux débats depuis plusieurs années. L'identification de l'origine cellulaire du peptide A- β est sans doute devenue moins importante depuis la découverte de la production du peptide amyloïde sous forme soluble. Les dépôts amyloïdes diffus trouvés dans le parenchyme cérébral sont composés de ce peptide amyloïde non fibrillaire, non colorable par le rouge Congo, et dépourvu de toxicité pour les cellules avoisinantes. La maturation de ces plaques diffuses en plaques neuritiques avec formation concomitante de fibres amyloïdes est un événement essentiel dans la progression de la MA. La formation de fibres amyloïdes peut être obtenue

par différents mécanismes qui impliquent le peptide A- β lui-même ou son environnement.

Le peptide A- β est un fragment protéolytique interne de l'APP engendré dans des vésicules acides lors de l'internalisation du précurseur. Des mutations du gène *APP* ont été démontrées, et sont à l'origine de certaines formes familiales de la MA (*m/s* n° 8, vol. 8, p. 866). Dans des modèles cellulaires, ces mutations augmentent, soit la production de peptide A- β , soit son organisation en structure fibrillaire. Cependant, les mutations du gène *APP* restent un phénomène extrêmement rare qui permet d'expliquer moins de 3 % des cas de forme familiale de MA (*m/s* n° 9, vol. 8, p. 1007).

Une série de protéines sont colocalisées avec le peptide A- β dans les dépôts amyloïdes : l' α 1-antichymotrypsine, les glycosaminoglycanes, l'ApoE... Ces protéines, associées au peptide A- β , peuvent réduire sa solubilité et stabiliser la structure β -plissée des fibres amyloïdes. Ces protéines pourraient dès lors fonctionner comme « chaperon pathologique », ou interviendrait directement dans la formation de substance amyloïde.

Conclusions et perspectives

En conclusion, la MA est caractérisée par une hétérogénéité génétique importante. L'identification de nouvelles mutations pathogènes révélera si les gènes correspondants sont impliqués dans l'augmentation de la production de peptide A- β ou dans son organisation en structure fibrillaire. La compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans les voies cataboliques de l'APP pourrait conduire à de nouvelles stratégies permettant de moduler la production de peptide A- β . A l'heure actuelle, les animaux transgéniques n'ont pas réussi à reproduire les lésions neuropathologiques caractéristiques de la MA. Il faut espérer cependant que ces modèles animaux permettront d'étudier l'importance de certains facteurs étiologiques, et de tester de nouvelles approches thérapeutiques capables, entre autres, d'inhiber la formation de fibres amyloïdes ■

m/s n° 9, vol. 11, septembre 95

Summary

The amyloid peptide precursor in Alzheimer's disease

One hallmark of Alzheimer's disease (AD) is the formation in the brain of neurofibrillary tangles and senile plaques. The senile plaques contain a small peptide (A- β) derived from the amyloid precursor protein (APP). Mutations of the *APP* gene have been identified in rare cases of familial AD, suggesting a causal role for A- β deposition in AD. However, AD has been demonstrated to be characterized by an important genetic heterogeneity. The further identification of new pathogenic DNA mutations will reveal whether the corresponding genes are involved either in an increased production of A- β , a decrease of its removal, or in the fibrillogenic properties of the peptide. Several mammalian cells are able to produce A- β from APP. Understanding the cellular mechanisms that determine how cleavages occur in cells could help to identify new strategies for modulating A- β production. In attempts to produce animal models of AD, investigators have used transgenic strategies. To date, these efforts have not been very successful, although amyloid deposits can be generated in transgenic mice. These animal models should prove useful for examining the importance of putative etiological factors, and testing novel therapies including anti-amyloidogenic strategies.

TIRÉS À PART

J.N. Octave.