

Université du Québec
INRS– Institut Armand-Frappier
Centre de Recherche en Santé

Expression des récepteurs de l'endothéline dans la maladie d'Alzheimer et leurs régulations par le peptide β -amyloïde

Par
Lorenza Riccioni

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences expérimentales de la santé

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Pr Alain Fournier INRS- Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Pr M.R. Ven Murthy Faculté de Médecine Département de biologie médicale Université Laval, Québec
Directeur de recherche	Pr Charles Ramassamy INRS- Institut Armand-Frappier

RÉSUMÉ

Connaissances actuelles : L'endothéline (ET) est connu pour être un puissant vasoconstricteur. Certaines études soulignent que l'endothéline pourrait contribuer directement ou indirectement à endommager les neurones en particulier via les récepteurs ET_A. En revanche, l'endothéline semble jouer un rôle neuroprotecteur via les récepteurs ET_B, dans des conditions pathologiques. D'autres observations démontrent que le système de l'ET pourrait être impliqué dans la maladie d'Alzheimer (MA). L'enzyme (ECE) qui convertit la pro-endothéline en endothéline active, est capable de dégrader le peptide amyloïde (A β), qui est le peptide impliqué dans la neurodégénérescence caractéristique de la MA. Il existe différents facteurs de risque tels que l'âge, les maladies cérébro-vasculaires et les facteurs génétiques comme l'allèle $\epsilon 4$ de l'apolipoprotéine E (apoE). De nombreuses études épidémiologiques ont démontré que les personnes possédant l'allèle $\epsilon 4$ ont plus de risque de développer cette maladie. Dans la MA, des études *post-mortem* montrent que l'immunoréactivité envers le facteur nucléaire-kB (NF-kB) est plus élevée autour des plaques séniles retrouvées chez les patients atteints de cette maladie. D'autres études enfin, ont démontré la présence d'une séquence du NF-kB sur le gène qui code pour l'ET.

Objectifs de l'étude : Suite à ces observations, notre étude vise à vérifier si le système ET pourrait protéger les cellules cérébrales des effets toxiques de l'A β à travers son enzyme de synthèse ECE ou son récepteur ET_B. De plus, nous souhaitons aussi vérifier la dépendance du système ET en fonction de différents génotypes d'apoE et la capacité de l'A β d'induire un changement dans l'expression de deux récepteurs de l'ET. Enfin, pour clarifier le mécanisme de cette interaction, nous avons concentré notre attention sur le facteur NF-kB. Étant donné que, soit ET soit A β , peuvent réguler l'activité du NF-kB, nous analysons également le rôle de ce dernier dans le mécanisme protecteur de l'ET vis-à-vis du peptide A β .

Patients et méthodes : L'expression des récepteurs ET_A, ET_B et le niveau d'ECE ont été vérifiés par immunobuvardage ; ils ont été réalisés sur des échantillons provenant de tissus humains (hippocampe, cortex frontal) de patients atteints de la MA et de patients sains. Nous avons aussi utilisé des cellules N2a (neuroblastome murin) que nous avons traitées avec différentes concentrations toxiques du peptide

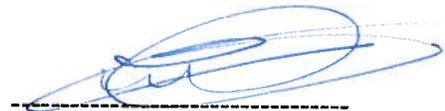
A β ₂₅₋₃₅. Par immunobuvardage nous avons observé les effets d'A β sur l'expression des récepteurs ET_A et ET_B et le niveau d'ECE. Nous avons utilisé la méthodologie de l'immunofluorescence pour analyser la localisation, l'internalisation et le recyclage des récepteurs au niveau cellulaire. Toujours par immunobuvardage, nous avons vérifié l'expression des récepteurs de l'ET dans les tissus provenant des cerveaux de souris déficientes pour une des deux sous-unités de NF-kB (p50^{-/-}). Enfin, nous avons dosé, par ELISA, la quantité d'ET dans nos échantillons.

Résultats : Nos résultats décrivent les modifications des récepteurs de l'endothéline et le niveau d'ECE dans l'hippocampe et le cortex frontal sur des tissus *post mortem* de patients atteints de la MA, en fonction des différents génotypes de l'apoE. Nous avons observé chez certains patients atteints par la MA par rapport aux sujets témoins que le niveau des récepteurs ET_A et ET_B était plus élevé surtout dans l'hippocampe, mais il n'y a aucun lien si l'on considère le génotype de l'apoE. En revanche, l'expression de l'enzyme ECE était inférieure chez les patients MA 4/4, homozygotes pour l'allele $\epsilon 4$. Dans les cellules N2a, le peptide A β ₂₅₋₃₅ à 200 $\mu\text{g/mL}$ semblait induire une surexpression des deux récepteurs ET_A et ET_B après 24 heures de traitement; cette surexpression a été observée aussi bien par immunobuvardage que par immunofluorescence. On a aussi remarqué une surexpression des deux récepteurs dans les tissus provenant de souris p50^{-/-} par rapport à ceux provenant de souris normales.

Conclusions : Nos résultats confirment l'hypothèse que le système de l'ET est impliqué dans la pathophysiologie de la MA à travers l'expression de l'enzyme ECE et des récepteurs ET_A et ET_B. Ces récepteurs pourraient être régulés par le peptide A β et leur expression semble être dépendante du NF-kB, qui est capable d'induire la production de l'ET.



Étudiante



Directeur de recherche

REMERCIEMENTS

*Si je m'arrête un instant
Pour te parler de ma vie
Juste comme ça tranquillement
Dans un bar rue St-Denis [...]*

*Les étoiles filantes
Les Cowboys Fringants
La Grand-Messe, 2004*

À mon Directeur de recherche **Pr Charles Ramassamy**,
Merci pour toutes ces années passées à Montréal et pour l'occasion unique que j'ai eue de venir travailler à l'INRS Institut Armand-Frappier avec toi.

À mon Examineur interne **Pr Alain Fournier**,
Merci pour votre soutien et la confiance que vous m'avez témoignée pendant mon séjour à l'INRS.

À mon Examineur externe **Pr M.R.Ven Murthy**,
Merci pour avoir dédié votre temps à la correction de mon mémoire.

À mes amis et collègues **Fanny et Tri**,
Merci pour les conseils techniques de tous les jours au labo, pour votre soutien pendant les moments plus difficiles et pour la force que vous m'avez donnée de continuer à bien travailler. Merci beaucoup à Fanny pour la sensation de vivre chez elle comme chez moi dès mon premier jour au Québec.

À mes amis de Rouen, **Stéphane, Héloïse, Fabien et Dorothée**,
Merci pour avoir apporté un rayon de soleil dans notre labo. Merci pour votre enthousiasme et pour toutes les choses que j'ai apprises de vous. Merci en particulier à Héloïse de m'avoir si bien aidée dans ma recherche.

À mon amie **Soazig**,
Merci de m'avoir accueillie à l'INRS avec ta bonne humeur et de m'avoir donnée la chance de vivre dans ta maison dans le quartier le plus beau de Montréal. Merci de m'avoir présenté toute ta famille.

À mon amie **Catherine**,
Merci pour ta sincère amitié, tu es une personne spéciale ! Merci pour toutes les heures qu'on a passées ensemble, je vais les garder dans mon cœur pour toujours.

À mon amie et coloc **Marie**,
Merci pour m'avoir toujours soutenue et écoutée et pour m'avoir donné plein de conseils. Merci surtout pour tous les éclats de rire qu'on a faits ensemble.

À mes amis **Joanna et Benjamin,**

Merci pour m'avoir nourrie et expliqué tous les secrets de la cuisine française. Merci encore pour m'avoir accueillie chez vous toutes les fois que j'avais besoin. Merci pour m'avoir fait apprendre et connaître la culture française et québécoise. Merci à Joanna pour m'avoir expliqué tous les secrets sur les baleines du Saint Laurent, qu'elle aime autant. Un grand merci à mon ange gardien Benjamin, pour m'avoir démontré son amitié en veillant toujours sur moi et sur mon mémoire...

À mes amis **Hélène et Eric,**

Merci pour m'avoir fait découvrir toutes les beautés de votre pays merveilleux. Merci pour m'avoir accueillie dans votre famille toujours si affectueuse. Merci à Hélène pour m'avoir corrigée chaque fois dans ma prononciation française gardant toujours son sourire merveilleux.

À mes amis **Noël et Véronique,**

Merci pour votre esprit toujours si vif et pétillant. Merci pour m'avoir approchée à la planche à voile et avoir applaudi à mes succès.

À mon amie **Jacinthe,**

Merci pour ne m'avoir fait sentir jamais seule. Merci pour ta bonne humeur et ton caractère si spécial, à prendre toujours comme exemple. Merci pour partager avec moi la joie de voir tomber la neige et de profiter de votre hiver québécois. Merci d'avoir écouté ma présentation pour trois jours de suite avec le mal au cœur et d'avoir corrigé les fautes de grammaire dans mon mémoire!

À mon cheri **Jérôme,**

Merci pour me soutenir et pour démonter ton grand amour à tous les jours. J'espère d'avoir la chance de passer toute ma vie avec toi...

À mon amie **Kathy,**

Merci de m'avoir gardé une place dans la chambre de fille. Merci pour ton sens de l'humour toujours si contagieux. Merci pour ton amitié. Merci pour m'avoir attendue plusieurs soirées à l'INRS pour rentrer ensemble à la maison avec ton 'char' (je suis devenue une vraie québécoise !).

À mes amis **Steve, Stéphane, Martin, Chantal et Myriam,**

Merci pour m'avoir enrichie avec votre savoir scientifique. Merci aussi pour m'avoir si bien accueillie dans votre labo, en me donnant envie de travailler avec vous...

À mes amis **Eliane, François, Claude, Valérie et Sonia,**

Merci pour m'avoir toujours soutenue et m'avoir donné plein de conseils et d'aide technique pour mes manips et pour avoir accueilli mes cellules dans votre incubateur. Merci à Eliane pour l'aide avec le microscope à fluorescence. Merci à Sonia pour m'avoir toujours invitée à toutes les activités de votre labo.

À mon ami **Patrice**,

Merci pour ta gentillesse. Merci pour m'avoir si bien expliqué l'utilisation du microscope à fluorescence qui m'a permis de faire des si belles photos des mes cellules.

À mon ami **Louis**,

Merci d'avoir contribué à mon succès dans tous les congrès, en m'aidant à imprimer mes affiches. Merci aussi d'avoir veillé sur moi à chaque jour.

Au **personnel de l'INRS**,

Merci pour votre aide technique et d'organisation.

Au **CRSNG** et à la **Fondation Armand-Frappier**,

Merci pour m'avoir donnée la bourse d'étude pour ma maîtrise au Québec.

À mon amie **Elisa**,

Merci pour m'avoir démontré ta sincère amitié chaque fois que j'en ai eu besoin. Merci pour être venue me voir pour passer des belles vacances d'été avec moi.

À mes **Parents**,

Merci pour m'avoir donnée la possibilité d'aller compléter mes études au Québec. Merci aussi pour m'avoir soutenue moralement et financièrement pour pouvoir explorer ce beau pays.

À mon professeur **Monica Di Luca**,

Merci pour m'avoir aidé à réaliser le rêve de pouvoir vivre sur l'autre bord de l'océan Atlantique.

Enfin, à tous ceux que j'aime pour m'avoir soutenue et supportée les derniers interminables mois de ma rédaction !

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
REMERCIEMENTS	v
TABLE DES MATIÈRES	viii
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES TABLEAUX	xiii
ABRÉVIATIONS	xiv
INTRODUCTION	1
1. LA MALADIE D'ALZHEIMER	1
1.1 L'importance de l'étude de la maladie d'Alzheimer	1
1.2 Historique	1
1.3 Aspects neuropathologiques.....	2
1.4 Structures cérébrales	4
1.5 Les rôles centraux de l'APP et de l'apolipoprotéine E (apoE) dans la MA.....	5
1.5.1 Les formes familiales de la MA : perturbation du métabolisme de l'APP par des mutations génétiques	5
1.5.1.1 Métabolisme de l'APP.....	6
1.5.2 Les formes sporadiques	9
1.6 L'apoE.....	9
1.6.1 Différentes isoformes de l'apoE humaine	10
1.6.2 Les effets de l'apoE au niveau cérébral	11
1.6.3 Les effets de l'apoE au niveau périphérique	13
2. LE SYSTÈME ENDOTHÉLINE	14
2.1 L'endothéline (ET)	14
2.2 La biosynthèse de l'ET.....	15
2.3 Les récepteurs couplés aux protéines-G (RCPGs).....	16
2.4 Les récepteurs de l'ET	18
2.5 Effets physiologiques de l'ET	19
2.6 Aspects fonctionnels et pathologies liées à l'ET	20
3. LE SYSTÈME ENDOTHÉLINE ET LA MALADIE D'ALZHEIMER 22	
3.1 Le métabolisme de l'A β	22
3.1.1 L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) :.....	23
3.1.2 L'enzyme de dégradation de l'insuline (EDI) :	23
3.2 La néprilysine (NEP)	24
3.3 L'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE).....	25
4. LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION NUCLÉAIRE-kB DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER	30
4.1 Régulation de l'activation du facteur de transcription nucléaire-kB (NF-kB)	30
4.2 Rôle du NF-kB dans la production de l'ET.....	31
OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	33

MATÉRIEL ET MÉTHODES	34
1. Échantillons des tissus cérébraux humains	34
1.1 Homogénéisation des tissus cérébraux humains.....	35
2. Culture cellulaire	35
2.1 La lignée cellulaire N2a	35
2.2 La lignée cellulaire CHO.....	35
2.3 Lyse des cellules	36
2.4 Traitement des cellules.....	36
2.5 Fibrillation de l'amyloïde A β ₂₅₋₃₅	36
3. Immunobuvardage	37
4. L'immunofluorescence	38
5. Homogénéisation des tissus provenant des cerveaux de souris déficientes pour la sous-unité p50 du NF-kB	38
6. Dosage de l'ET par le test ELISA	39
RÉSULTATS	41
1. Expression de l'enzyme ECE dans les tissus humains MA	41
2. Expression des récepteurs ET _A et ET _B dans les tissus humains MA.....	42
3. Mise en évidence des récepteurs ET _A et ET _B dans deux lignées cellulaires....	54
4. Localisation des récepteurs ET _A et ET _B dans deux lignée cellulaires	56
5. Expression des récepteurs ET _A et ET _B dans les tissus provenant des souris déficientes pour la sous-unité p50 du NF-kB.....	58
6. Présence de l'ET dans nos échantillons	59
DISCUSSION	61
CONCLUSION	73
APPENDICE	75
LISTE DES RÉFÉRENCES	79

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Alois Alzheimer (1864-1915)	2
Figure 2 : PS colorées au rouge Congo	3
Figure 3 : DNF: marquage des protéines tau par des anticorps anti-PHF	3
Figure 4 : Structures cérébrales: image schématique	5
Figure 5 : Clivage normal et anormal de l'APP	6
Figure 6 : Lyse de l'APP: voie non-amyloïdogène et amyloïdogène	8
Figure 7 : La distribution de l'ET dans les tissus humains.....	15
Figure 8 : Biosynthèse de l'ET.....	16
Figure 9 : Structure transmembranaire des RCPGs.....	17
Figure 10 : Ligands capables d'activer un RCPG	17
Figure 11 : Activation des protéines-G : le cycle GTPase.....	18
Figure 12 : Voie de signalisation de l'ET via ses récepteurs ET _A et ET _B	20
Figure 13 : Les sites de clivage de chaque enzyme capable de dégrader l'A β	24
Figure 14 : Structure de l'enzyme ECE.....	26
Figure 15 : Les quatre isoformes de l'enzyme ECE.....	27
Figure 16 : Structure et mécanisme d'action du NF-kB.....	31

Figure 17 : Immunobuvardage de l'ECE dans les tissus humains (cortex frontal et hippocampe).....	41
Figure 18 : Immunobuvardage d'ET _A dans les tissus humains (cortex frontal et hippocampe).....	43
Figure 19 : Immunobuvardage d'ET _B dans les tissus humains (cortex frontal et hippocampe).....	44
Figure 20 : A)Expression du récepteur ET _A dans l'hippocampe humain des patients contrôles (C) par rapport aux patients atteints de la MA. B)Expression du récepteur ET _A dans l'hippocampe humain des patients contrôles (C) par rapport aux patients atteints de la MA, pour voir un effet de l'allèle ε4. C)Expression du récepteur ET _A dans l'hippocampe humain des patients contrôles (C) par rapport aux patients atteints de la MA, pour voir un effet du génotype apoE.....	45
Figure 21 : A)Expression du récepteur ET _A dans le cortex frontal humain des patients contrôles (C) par rapport aux patients atteints de la MA. B)Expression du récepteur ET _A dans le cortex frontal humain des patients contrôles (C) par rapport aux patients atteints de la MA, pour voir un effet de l'allèle ε4. C)Expression du récepteur ET _A dans le cortex frontal humain des patients contrôles (C) par rapport aux patients atteints de la MA, pour voir un effet du génotype apoE.....	48
Figure 22 : A)Expression du récepteur ET _B dans l'hippocampe humain des patients contrôles (C) par rapport aux patients atteints de la MA. B)Expression du récepteur ET _B dans l'hippocampe humain des patients contrôles (C) par rapport aux patients atteints de la MA, pour voir un effet de l'allèle ε4. C)Expression du récepteur ET _B dans l'hippocampe humain des patients contrôles (C) par rapport aux patients atteints de la MA, pour voir un effet du génotype apoE.....	50
Figure 23 : A)Expression du récepteur ET _B dans le cortex frontal humain des patients contrôles (C) par rapport aux patients atteints de la MA. B)Expression du récepteur ET _B dans le cortex frontal humain des patients contrôles (C) par rapport aux patients atteints de la MA, pour voir un effet de l'allèle ε4. C)Expression du récepteur ET _B	

dans le cortex frontal humain des patients contrôles (C) par rapport aux patients atteints de la MA, pour voir un effet du génotype apoE..... 52

Figure 24 : Immunobuvardage des récepteurs ET_A et ET_B et la β -actine dans les cellules CHO transfectées avec les récepteurs de l'ET 54

Figure 25 : Immunobuvardage des récepteurs ET_A et ET_B dans les N2a 55

Figure 26 : Images en immunofluorescence (magnitude 40X) des cellules CHO transfectées avec les récepteurs de l'ET. 56

Figure 27 : Images en immunofluorescence (magnitude 40X) des cellules N2a traitées avec l'A β_{25-35} 57

Figure 28 : Immunobuvardage d'ET_A et d'ET_B dans des tissus provenant des souris déficientes pour la sous-unité p50 du NF-kB (p50^{-/-}) versus des tissus provenant des souris normales 58

Figure 29 : Graphique représentant des courbes d'étalonnage de l'ET-1 60

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : La distribution des génotypes d'apoE dans la population et leurs mutations.....	11
Tableau 2 : Le système ET dans les cellules	21
Tableau 3 : Le système ET et ses fonctions dans les différents tissus	22
Tableau 4 : Patients MA et contrôles groupés selon le génotype d'apoE, l'âge, le sexe, le délai <i>post-mortem</i> et la durée de la maladie	34
Tableau 5 : Courbe d'étalonnage de l'ET-1	40
Tableau 6 : Courbe d'étalonnage de l'ET-1	59

ABRÉVIATIONS

AA : acides aminés

A β : peptide amyloïde-bêta

ACV : accidents cérébro-vasculaires

ADAM : *a disintegrin and metalloprotease*

ADN : acide désoxyribonucléique

ANOVA : analyse de la variance

AMPc : adénosine-3', 5'-cyclique monophosphate

apoE : apolipoprotéine E

APP : protéine précurseur de l'amyloïde

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATCC : *american type culture collection*

ATP: adénosine-5'-triphosphate

BACE : *β -site APP cleaving enzyme*

BHE : barrière hémato-encéphalique

C : patients contrôles

C + : cellules endothéliales d'aorte de porc

[Ca²⁺]_i: concentration du calcium intracellulaire

CB : cervelet

CERAD: *consortium to establish a registry for Alzheimer's disease*

CF: cortex frontal

CHO: *Chinese hamster ovary cells*

CT: cortex temporal

DAG: diacylglycérol

DNF: dégénérescence neurofibrillaire

D.O.: densité optique

ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine

ECE : enzyme de conversion de l'endothéline

EDI : enzyme de dégradation de l'insuline

ELISA : *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*

ET : endothéline

ET-1, -2, -3 : endothéline-1, -2, -3

ET_A : récepteur de l'endothéline sous-type A

ET_B : récepteur de l'endothéline sous-type B
FBS : sérum bovin foetal
G (q,s,i) : protéines G
GDP: guanosine-5'-diphosphate
GMPc: guanosine-3', 5'-cyclique monophosphate
GTP: guanosine-5'-triphosphate
H: hippocampe
HDL: lipoprotéine à haute densité
IDL : lipoprotéine à densité intermédiaire
IκB : sous-unité inhibitrice du facteur-κB
IP₃ : inositoltriphosphate
LDH : lactate déhydrogenase
LDL : lipoprotéine à densité faible
L-VSCCs : canaux calciques de type L sensibles au voltage
MA : maladie d'Alzheimer
N2a : neuroblastome murin
NEP : néprilysine
NF-κB : facteur de transcription nucléaire-κB
NINCDS-ADRDA: *national institute of neurological disorders and stroke and Alzheimer's disease and related disorders association*
NO: monoxyde d'azote
OPD: dihydrochlorure d'*o*-phénylènediamine
PBS: tampon phosphate/saline
prépro ET: prépro-endothéline
PHF : *paired helical filament*
PKC : protéine kinase C
PLA₂ : phospholipase A₂
PLC : phospholipase C
pro ou big ET : pro ou big-endothéline
PS : plaques séniles
PVDF : difluorure de polyvinylidène
RCPG : récepteurs couplés aux protéines G
SDS : dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE : *SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*

SNC : système nerveux central

ST : striatum, corps strié

TACE : *tumor necrosis factor α converting enzyme*

TNF : facteur de nécrose tumorale

VLDL : lipoprotéine à densité très faible

INTRODUCTION

1. LA MALADIE D'ALZHEIMER

1.1 L'importance de l'étude de la maladie d'Alzheimer

Les progrès de la médecine et de l'hygiène durant ces dernières années ont permis un allongement considérable de la durée de vie. De cet allongement, des pathologies liées à la sénescence pourraient se développer avec une aggravation possible de la situation dans les années à venir. La maladie d'Alzheimer (MA) représente 75% du total des démences. Ces maladies cérébrales frappent 5% de la population de plus de 65 ans, 25% de celle de plus de 85 ans et constituent la cause majeure d'institutionnalisation dans cette population. Selon la Société Alzheimer du Canada, il y a actuellement 316 500 canadiens qui en souffrent, dont 75 000 cas sont répertoriés au Québec. On pense que d'ici 10 ans, le nombre de cas aura doublé. La MA coûte actuellement 3.9 milliards de dollars par année en soins médicaux au Canada. Pour cette raison la MA est devenue un champ important de la recherche médicale des pays développés (Collen, 2002).

1.2 Historique

La MA est caractérisée cliniquement par le développement progressif d'une démence où dominant les troubles de la mémoire, l'atteinte du langage et des fonctions cognitives. La détérioration mentale progressive lors du vieillissement est depuis longtemps connue et décrite. Mais c'est seulement à partir du XX^{ème} siècle que, grâce à un psychiatre allemand, Dr Alois Alzheimer (Figure 1), on a commencé à étudier les anomalies cellulaires au niveau cérébral. En 1906, il exposa le cas clinique d'un de ses patients de 51 ans, souffrant de sévères problèmes de mémoire, confusion, et ayant de la difficulté à répondre aux questions (Maurer et al, 1997). Après sa mort, une autopsie du cerveau fut réalisée et il découvrit des dépôts denses autour des neurones (plaques séniles), et à l'intérieur des cellules nerveuses il remarqua la présence des fibres anormalement enroulées (dégénérescences neurofibrillaires).

Aujourd'hui ce type de désordre neuronal prend son nom. L'observation *post mortem* de plaques et de dégénérescences est toujours requise pour donner un diagnostic définitif de la maladie.



Figure 1 : Alois Alzheimer (1864-1915)

1.3 Aspects neuropathologiques

La nature neurodégénérative de la MA se traduit par des lésions histopathologiques bien précises que sont les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires :

Les plaques séniles (PS): Ce sont des dépôts extracellulaires qui contiennent majoritairement la substance amyloïde de forme sphérique. La substance amyloïde est constituée de filaments d'un polypeptide de 39 à 43 acides aminés (AA) (42 dans sa forme la plus toxique) appelée protéine bêta-amyloïde ($A\beta$) et dont la conformation en feuillets bêta plissés lui confère son caractère insoluble et probablement, sa toxicité (Selkoe, 2004). Elles peuvent être révélées par une coloration au rouge Congo (Figure 2). Ce peptide provient d'un clivage anormal d'une glycoprotéine membranaire appelée protéine précurseur de l'amyloïde (APP) (Esch et al, 1990 ; Sisodia et al, 1990).

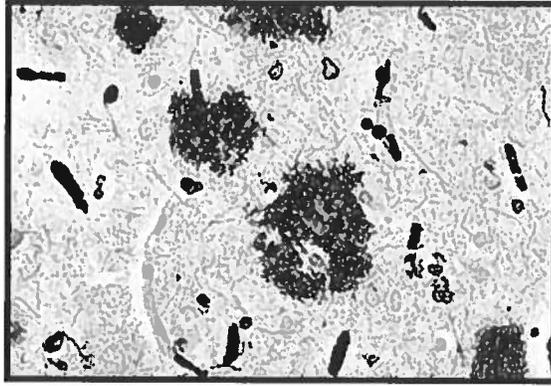


Figure 2 : PS colorées au rouge Congo

Les dégénérescences neurofibrillaires (DNF): Elles désignent des agrégats de matériel fibrillaire anormaux dans le cytoplasme des neurones. En observant ces lésions au microscope électronique, des paires de filaments appariés en hélice (PHF, *paired helical filament*) sont observés (Kidd, 1963). Ils sont principalement composés d'une protéine associée au cytosquelette, la protéine tau (Figure 3). Cette protéine est normalement capable de promouvoir l'assemblage des microtubules et d'en régler la stabilité. La protéine tau joue un rôle essentiel au niveau des axones en étant impliquée dans le transport antérograde des substances. Dans un cerveau sain, l'équilibre entre phosphorylation et déphosphorylation de la protéine tau module la stabilité du cytosquelette et par conséquent, la morphologie axonale. L'hyperphosphorylation de la protéine tau (Iqbal et al, 1986) provoque une diminution de l'affinité de la protéine pour la tubuline, donc une déstabilisation du cytosquelette et une accumulation de protéine tau sous la forme de PHF dans le cytoplasme (Maccioni et al, 2001 ; Mandelkow et al, 1998).

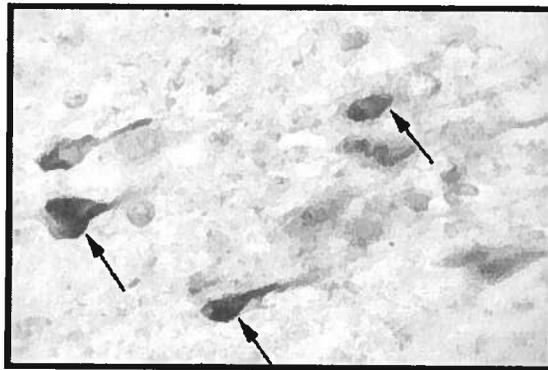


Figure 3 : DNF: marquage des protéines tau par des anticorps anti-PHF

1.4 Structures cérébrales

Le processus dégénératif est strictement sélectif pour certaines régions du cerveau et certains types de cellules. Des changements dans le comportement d'une personne peuvent indiquer des dommages à certaines régions du cerveau. Parmi les régions les plus vulnérables par rapport à la MA on peut citer l'hippocampe et le cortex frontal. Les circuits de la formation hippocampique sont impliqués dans l'établissement de la mémoire à court et à long terme. L'information en provenance des cortex associatifs visuels, auditifs ou somatiques parvient d'abord à la région parahippocampique du cortex, puis passe au cortex enthorinal et finalement à l'hippocampe comme tel. Ces régions font parties du système limbique (Glennner et Wong, 1984 ; Masters et al, 1985 ; Castano et al, 1995).

La topographie des lésions est corrélée à la nature des signes cliniques (Figure 4). Le système limbique est attaqué dès le début de la MA. Il intervient dans les émotions et la mémoire et il relie les différents lobes du cerveau entre eux, permettant d'établir ainsi la connexion entre les souvenirs et le comportement. L'hippocampe traite la mémoire verbale et visuelle ; c'est pour cette raison que chez la personne affectée on remarque des troubles de mémoire à court terme, une perte de ses aptitudes de vocabulaire, la difficulté à reconnaître les visages, les objets et les endroits connus. Le cortex frontal est le lieu de traitement de la pensée et du langage qui nous permet de prendre des initiatives, planifier, organiser nos actions et contrôler nos valeurs et notre comportement en société. Ainsi, une personne ayant des lésions dans cette région, semble indifférente ou apathique, se désintéresse rapidement d'une activité et répète les mêmes gestes sans pouvoir s'arrêter (Glennner et Wong, 1984 ; Masters et al, 1985 ; Castano et al, 1995).

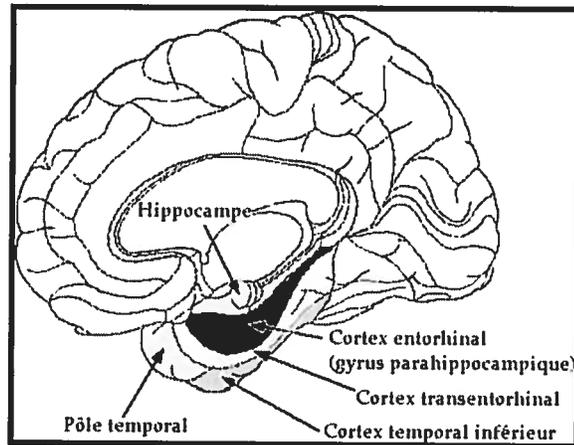


Figure 4 : Structures cérébrales: image schématique du cerveau et de ses régions

1.5 Les rôles centraux de l'APP et de l'apolipoprotéine E (apoE) dans la MA

Bien que la grande majorité des cas de la MA soit d'origine sporadique, il existe de rares cas familiaux où la maladie se déclenche précocement (avant 60 ans). En 1984, l'étude de ces familles a conduit à la découverte de mutations sur le gène de l'APP (Glennner et Wong, 1984 ; Masters et al, 1985 ; Goate et al, 1991), cloné pour la première fois en 1987 (Goldgaber et al, 1987 ; Tanzi et al, 1987 ; Robakis et al, 1987).

1.5.1 Les formes familiales de la MA : perturbation du métabolisme de l'APP par des mutations génétiques

Plusieurs mutations de l'APP et des protéines nommées présénilines ont été identifiées comme responsables de formes héréditaires de la MA à développement précoce et à transmission autosomale dominante (Tanzi et al, 1988 ; Tanzi et al, 1996 ; Hardy, 1996). Ces mutations perturbent le métabolisme de l'APP, dont le clivage protéolytique anormal conduit à l'accumulation de l'A β dans le cerveau.

L'APP est une glycoprotéine transmembranaire dont le gène se situe sur le chromosome 21 humain. Ce gène code pour plusieurs isoformes de l'APP membranaire, de 365 à 770 AA, obtenues par épissage alternatif de l'acide ribonucléique messager (ARNm)(Rossner et al, 1998). En raison de la perturbation évidente du métabolisme de l'APP au cours de la maladie et sa présence dans les PS, de nombreuses recherches se sont focalisées sur la compréhension des rôles

physiologiques normaux de l'APP et de ses dérivés (Turner et al, 2003 ; Dodart et al, 2000).

L'APP est répandue dans l'organisme jouant plusieurs rôles dans les cellules et dans le système nerveux central (SNC). C'est une molécule d'interaction cellule-cellule et elle est nécessaire pour la formation du cytosquelette, la régulation du calcium intracellulaire, la formation des synapses, la modulation des cholinestérases (Turner et al, 2003). Elle est véhiculée dans l'axone vers l'extrémité nerveuse et la synapse où elle joue un rôle important dans la plasticité neuronale et la neurotransmission. Néanmoins, la partie intracellulaire C-terminale de l'APP peut être reconnue par plusieurs ligands. Ces protéines fixant l'APP sont par exemple impliquées par leurs autres sites de liaisons dans la signalisation nucléaire, l'adhésion cellulaire, la stimulation de la croissance neuritique et la synaptogénèse (Turner et al, 2003 ; Dodart et al, 2000 ; De Strooper et al, 2000), la modélisation du cytosquelette et le recrutement de kinases. L'ensemble de ces données suggère que l'APP ne serait en fait qu'une des unités d'un ensemble complexe de protéines multifonctionnelles (De Strooper et al, 2000).

1.5.1.1 Métabolisme de l'APP

Les sécrétases : l'APP membranaire peut être clivée au niveau de trois sites endoprotéolytiques, par trois enzymes : les α -, β - et γ -sécrétases (Mills et Reiner, 1999)(Figure 5).

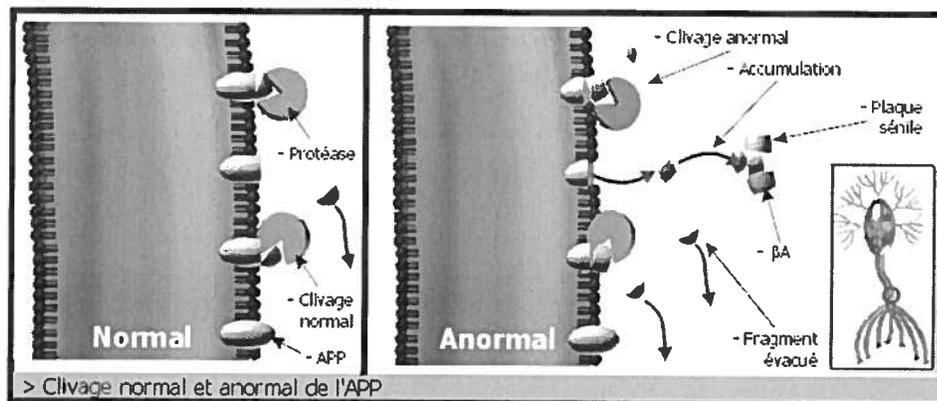


Figure 5 : Clivage normal et anormal de l'APP

On qualifie habituellement les différentes voies de sécrétion d'amyloïdogènes si elles génèrent de l'A β , et de non amyloïdogènes si elles n'en produisent pas (Esch et al. 1990 ; Sisodia et al, 1990 ; Checler et al, 2002)(Figure 6). L'équilibre entre la production et la dégradation du peptide A β détermine son accumulation.

La voie non amyloïdogène fait intervenir une activité α -sécrétase qui coupe l'APP membranaire au milieu de la séquence correspondante à l'A β , permettant ainsi la sécrétion dans l'espace extracellulaire d'une forme sécrétée de l'APP, le sAPP α . Ce clivage peut avoir lieu au sein du réseau trans-golgien ou bien au niveau de la membrane plasmique, puis le sAPP α est libéré dans l'espace extracellulaire. Le fragment C-terminal de l'APP restant, nommé C83, peut être clivé par l'activité γ -sécrétase pour générer deux fragments C57/59 et p3. Cette voie de sécrétion ne produit donc pas de protéine β -amyloïde. À ce jour, plusieurs α -sécrétases de la famille des disintégrines et des métalloprotéases (ADAM, *a disintegrin and metalloprotease*) ont été identifiées : ADAM 10, ADAM 17 (appelée aussi TACE, *tumor necrosis factor α converting enzyme*, l'enzyme de conversion du facteur de nécrose α). Ces métalloprotéases sont généralement impliquées dans le clivage de protéines transmembranaires (Buxbaum et al, 1998 ; Lammich et al, 1999).

La voie amyloïdogène fait intervenir les activités β - et γ -sécrétases qui clivent l'APP membranaire de part et d'autre de la séquence correspondant à l'A β . Cette voie conduit à la libération dans l'espace extracellulaire du peptide A β et d'une forme sécrétée de l'APP, le sAPP β . Le fragment C-terminal de l'APP restant est le fragment C99. Les clivages par la β - et la γ -sécrétase peuvent survenir au niveau du réticulum endoplasmique, au sein du réseau trans-golgien, au niveau de la membrane plasmique ou encore dans des endosomes après réinternalisation de l'APP membranaire. Il semblerait que l'A β ₁₋₄₂ soit produit dans le réticulum endoplasmique et que l'A β ₁₋₄₀ soit produite dans le compartiment golgien (Vassar, 2002). Les β -sécrétases identifiées à ce jour sont nommées BACE-1 et BACE-2 (*β -site APP cleaving enzyme*, l'enzyme qui coupe l'APP au niveau du site bêta) et sont deux protéases acides membranaires (Vassar, 2002). La nature de la γ -sécrétase est, quant à elle, encore aujourd'hui objet de débat. On a d'abord pensé que des protéines nommées présénilines 1 et 2 pouvaient avoir une activité γ -sécrétase, mais une étude montre que les présénilines représentent

plutôt une des parties d'un complexe protéique à activité γ -sécrétase (De Strooper, 2003).

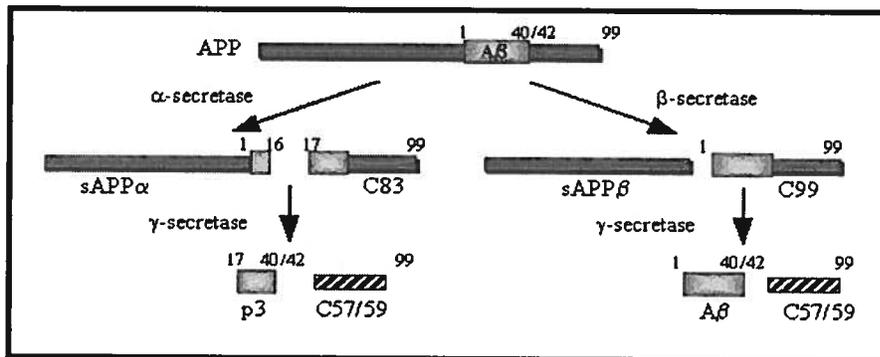


Figure 6 : Lyse de l'APP: voie non-amyloïdogène et amyloïdogène

Les présénilines : les présénilines 1 et 2 sont des protéines membranaires multifonctionnelles, elles possèdent respectivement 467 et 448 AA et leurs gènes sont situés respectivement sur les chromosomes 14 et 1 humains (Schellenberg, 1992 ; Rogaev et al, 1995 ; Li et al, 1995 ; Hardy, 1997).

Elles semblent en majorité situées dans les membranes du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi (Van Gassen et al, 2000) ; elles possèdent huit domaines transmembranaires et une large boucle cytoplasmique, au niveau de laquelle sont situés des sites de coupure par des protéases. L'attaque protéolytique de la boucle cytoplasmique engendre deux fragments N- et C-terminaux. Ces deux fragments peuvent ensuite former un hétérodimère stable correspondant aux complexes biologiquement actifs des présénilines (Capell et al, 1998). Les présénilines pourraient jouer le rôle de protéines chaperon, c'est-à-dire qu'elles seraient capables d'interagir avec d'autres protéines (par exemple l'APP) afin de les stabiliser au sein d'un complexe (Van Gassen et al, 2000 ; De Strooper et al, 2000).

1.5.2 Les formes sporadiques

La grande majorité des cas de la MA sont sporadiques et à développement tardif (au-delà de 65 ans). Il est alors difficile d'identifier les facteurs génétiques responsables.

On définit les facteurs de risque comme étant des caractéristiques appartenant à l'individu (le sexe ou l'âge) ou des variables de l'environnement (le style de vie ou la prise de médicaments) statistiquement associées à la fréquence accrue d'une maladie. Les facteurs de risque ont une influence sur la progression de la pathologie, mais ne causent pas nécessairement la maladie. Certains facteurs de risque sont accessibles à la prévention (style de vie), tandis que d'autres facteurs de risque ne sont pas modifiables (l'âge ou l'hérédité). En contrôlant les facteurs de risque modifiables, le but pour un malade, est de retarder autant que possible la venue et/ou la progression de la maladie. Nous allons maintenant concentrer notre attention sur le cas de l'allèle $\epsilon 4$ de l'apoE, un important facteur de risque génétique.

Le seul facteur de risque génétique dont l'implication et dont la plus grande force d'association avec la MA a été démontrée avec des centaines d'études épidémiologiques, est la possession de l'allèle $\epsilon 4$ de l'apoE (Corder et al, 1993 ; Strittmatter et al, 1993 ; Chartier-Harlin et al, 1994 ; Poirier et al, 1993). Il est par ailleurs reconnu comme facteur de risque des maladies vasculaires (Horejsi et Ceska, 2000).

1.6 L'apoE

L'apoE appartient à la famille des apolipoprotéines (Bolanos-Garcia et al, 2003), qui sont impliquées dans le transport des lipides dans le sang (Shore et Shore, 1972 ; Mahley, 1988). Elles peuvent se combiner à des lipides pour former différentes classes de particules lipoprotéiques. Les lipoprotéines ainsi formées sont des structures sphériques à surface hydrophile, constituées d'apolipoprotéines ainsi que de cholestérol et de phospholipides dont la tête hydrophile est tournée vers l'extérieur. L'intérieur hydrophobe de la sphère contient des triglycérides et des esters de cholestérol. Les apolipoprotéines peuvent réguler certaines enzymes agissant sur les

lipoprotéines et intervenir dans les interactions des lipoprotéines avec des récepteurs. Les lipoprotéines sont impliquées dans le transport des lipides dans le sang, et sont classées selon leur taille en lipoprotéines à haute densité, à densité intermédiaire, à densité faible et à densité très faible (respectivement : HDL, IDL, LDL et VLDL).

L'apoE est produite dans différents tissus de l'organisme (foie, reins, muscles, gonades...) et également dans le cerveau où elle est se trouve essentiellement dans les astrocytes et la microglie (Naidu et al, 2002). Néanmoins, les travaux de Linton et collaborateurs (1991) suggèrent que l'apoE ne passe pas la barrière hémato-encéphalique et que l'apoE cérébrale est indépendante de l'apoE plasmatique. Le gène APOE était surtout connu pour son implication dans les pathologies artérielles, comme l'athérosclérose (Chou et al, 2006 ; Schneider et al, 2005 ; Horejsi et Ceska, 2000 ; Linton et al, 1991), l'hypertension et l'hypercholestérolémie (Ashford, 2004).

D'autres études sur l'apoE ont mis en évidence sa présence au sein des lésions de la MA, aussi bien dans les PS que dans les DNF (Namba et al, 1991). Des études génétiques ont ensuite montré que l'apoE intervenait dans la maladie, en tant que facteur de risque (pour l'allèle $\epsilon 4$) ou protecteur (pour l'allèle $\epsilon 2$) (Corder et al, 1993 ; Strittmatter et al, 1993 ; Poirier et al, 1993 ; Roses et al, 1996). La possibilité de son intervention dans la MA a multiplié les études concernant son rôle au sein du système nerveux et son implication dans les processus neuropathologiques.

1.6.1 Différentes isoformes de l'apoE humaine

L'apoE est une protéine de 299 AA dont le gène se situe sur le chromosome 19 humain. Il existe plusieurs allèles du gène de l'APOE humain ; ces trois allèles humains de l'apoE sont nommés $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$. Les génotypes possibles sont donc au nombre de six, avec trois génotypes homozygotes $\epsilon 2/ \epsilon 2$, $\epsilon 3/ \epsilon 3$ et $\epsilon 4/ \epsilon 4$, et trois génotypes hétérozygotes $\epsilon 2/ \epsilon 3$, $\epsilon 2/ \epsilon 4$ et $\epsilon 3/ \epsilon 4$ (Poirier et al, 1993 ; Poirier, 1994 et 1996). Plusieurs études ont été réalisées sur l'incidence et la prévalence de la MA. L'allèle $\epsilon 3$ est le plus fréquent de la population, suivi de l'allèle $\epsilon 2$, puis de l'allèle $\epsilon 4$. Les trois allèles sont à l'origine de la synthèse de trois isoformes de la protéine, l'apoE2, l'apoE3 et l'apoE4, qui ne diffèrent l'un de l'autre que par un ou deux AA seulement. Les positions 112 et 158 de la séquence d'AA de l'apoE sont les sites de

polymorphisme. L'apoE2 possède une cystéine à chacune de ces deux positions, alors que l'apoE3 possède une arginine en position 158, et que l'apoE4 possède une arginine à chacune des deux positions (Tableau 1)(Mahley, 1988).

Des études épidémiologiques estiment que les personnes qui expriment au moins un allèle $\epsilon 4$ sont trois fois plus susceptibles d'être malades par rapport à ceux qui ne l'expriment pas. De plus, ceux qui sont homozygotes pour l'allèle $\epsilon 4$ sont neuf fois plus susceptibles de développer la maladie (Hsiung et al, 2004).

apo E allèle	% Population générale	AA position 112	AA position 158
$\epsilon 2$	15	Cys	Cys
$\epsilon 3$	77	Cys	Arg
$\epsilon 4$	8	Arg	Arg

Tableau 1 : La distribution des génotypes d'apoE dans la population et leurs mutations

1.6.2 Les effets de l'apoE au niveau cérébral

Dans la MA, l'apoE se trouve en grande quantité au niveau des PS. Après une lésion du SNC ou du système nerveux périphérique, la synthèse de l'apoE est fortement augmentée près du site de lésion (Ignatius et al, 1986 ; Poirier et al, 1991). En effet, l'apoE serait impliquée dans la réparation, la croissance et le maintien des membranes et de la myéline, en particulier après atteinte du système nerveux, en assurant la clairance des débris lipidiques et leur redistribution (White et al, 2001 ; Beffert et al, 1998). On comprend alors que toute altération du métabolisme de l'apoE peut fortement perturber les processus naturels de régénération neuronale. Par exemple, après un traumatisme crânien, des souris déficientes en apoE montrent un taux de dégénérescence neuronale et des déficits moteurs et comportementaux plus importants que des souris témoins exprimant l'apoE (Chen et al, 1997). Dans la MA, l'accumulation d'apoE et d'A β au niveau des PS pourrait refléter une altération du processus naturel de clairance de l'A β . Des travaux *in vitro* réalisés par Strittmatter et al. (1993) ont montré que l'apoE avait une forte affinité pour l'A β . Les deux protéines se lient vraisemblablement de façon non covalente pour former un complexe

relativement stable d'environ 40 kDa. Russo et al. (1998) ont montré que ce complexe était sensible aux protéases, et que l'A β libre était plus résistante à la dégradation que l'A β lié à l'apoE. Ainsi, l'apoE pourrait faciliter la dégradation de l'A β même. La perturbation de ce processus lors de conditions pathologiques pourrait induire une baisse de stabilité du complexe A β -apoE et expliquer, en partie, l'accumulation d'A β en feuillets insolubles dans les PS. De plus, la liaison A β -apoE4 est moins stable que la liaison A β -apoE3 (Russo et al, 1998). Par rapport à l'apoE3, l'apoE4 semble donc limiter la clairance de l'A β et favoriser l'agrégation de cette dernière, ce qui pourrait rendre compte de la prédisposition des individus possédant l'allèle ϵ 4 à développer la maladie.

Le fait que les souris déficientes en apoE soient plus vulnérables aux effets d'atteintes cérébrales (ischémie et traumatisme crânien) suggère que l'apoE est impliquée dans la réparation neuronale après une lésion cérébrale (Chen et al, 1997 ; Kitagawa et al, 2002). L'apoE3 favorise l'extension des neurites, et que l'apoE4 l'inhibe. Les effets bénéfiques de l'apoE3 contre la phosphorylation de la protéine tau favorisent la stabilisation des microtubules du cytosquelette (Nathan et al, 1994 ; Bellosta et al, 1995 ; Puttfarcken et al, 1997).

L'hypertension et l'hypercholestérolémie sont des conditions communes qui sont associées au développement de la MA, et les deux sont fortement déterminées par des facteurs génétiques. Comme le gène APOE a un rôle important associé au transport du cholestérol, il pourrait être amené à jouer un rôle important dans l'hypertension et l'hypercholestérolémie (Ashford, 2004). Ainsi, on peut supposer que l'allèle ϵ 4 pourrait aussi être un facteur de risque pour les accidents cérébrovasculaires (ACV), comme l'athérosclérose et les lésions cérébrales (Schneider et al, 2005). Dans leur étude, Schneider et al, voulaient mettre en évidence un lien possible entre le type d'allèle d'apoE et la présence d'un ACV. Leur étude était basée sur un groupe de 214 personnes : 65 présentaient l'allèle ϵ 4 (ϵ 2/4 :8 ; ϵ 3/4 :51 ; ϵ 4/4 :6) et 149 sans l'allèle ϵ 4 (ϵ 2/3 :23 ; ϵ 3/3 :126) ; il n'y avait pas de différence entre âges et sexes. Dans cette étude, l'angiopathie amyloïde semblait plus fréquente et sévère chez les patients possédant l'allèle ϵ 4; enfin les patients âgés de 65 ans et plus, possédant l'allèle ϵ 4, présentaient pour la plupart un ACV. Il faut souligner que la substance

amyloïde infiltre aussi la paroi de certains vaisseaux corticaux et méningés, c'est pour cette raison qu'elle peut constituer une angiopathie amyloïde. Ainsi, des dépôts amyloïdes peuvent exister soit dans le cortex cérébral soit dans les vaisseaux arachnoïdiens et cérébraux (Miller et al, 1993 ; Schmechel et al, 1993).

Dans cette étude, les auteurs ont remarqué la présence d'une angiopathie amyloïde dans 75% des cas. Même si les personnes avec l'allèle $\epsilon 4$ sont plus sensibles d'avoir un ACV, ils n'ont pas remarqué une association entre les deux ; ainsi, on ne peut pas conclure que l'apoE4 est un facteur de risque important dans les ACV (Schneider et al, 2005).

Ramassamy et al, ont remarqué dans différentes études que l'état antioxydant présent dans le cerveau dépend du génotype d'APOE (Ramassamy et al, 1999, 2000 et 2001). Le niveau d'apoE dans les cerveaux des malades MA est plus faible chez les patients homozygotes pour l'allèle $\epsilon 4$ par rapport aux patients sans cet allèle. De plus, chez les patients MA 4/4 l'activité des enzymes endogènes antioxydants est élevée. Cette observation suggère la présence d'un lien entre le niveau d'apoE et le stress oxydatif présent dans le cerveau (Ramassamy et al, 2001). Pour démontrer le rôle possible de l'apoE dans la balance effet oxydant/antioxydant, Ramassamy et al. (2001) ont utilisé dans leur étude des souris déficientes du gène APOE. Ils ont ainsi démontré que chez les souris APOE (-/-) les dommages induits par le stress oxydatif sont majeurs par rapport aux sujets contrôles. ApoE peut donc jouer un rôle important dans l'intégrité lipidique et la plasticité synaptique et peut influencer directement ou indirectement l'état de certains antioxydants endogènes.

1.6.3 Les effets de l'apoE au niveau périphérique

Au niveau périphérique, l'apoE joue un rôle prédominant dans le transport des lipides dans le sang et dans l'initiation et la progression de l'athérosclérose. On sait que l'isoforme apoE3 et l'isoforme apoE4 sont un facteur de risque important pour l'athérosclérose, par rapport à l'apoE2 qui serait plutôt protecteur (Horejsi et Ceska, 2000). D'autres études ont suggéré que le mécanisme qui explique l'association entre l'hypertension et la démence, explique aussi le lien direct entre hypertension, ACV et les lésions ischémiques. Pour soutenir cette hypothèse, Paris et al. (1998) ont incubé

l'aorte provenant de rats avec les différentes isoformes d'apoE et ont induit une vasoconstriction avec différentes concentrations d'endothéline-1 (ET-1). Ils ont observé que l'apoE3 et apoE4 augmente la vasoconstriction induite par ET-1 ($\epsilon_4 > \epsilon_3$) et qu'au contraire apoE2 n'a aucun effet sur l'activité de l'ET-1. Ces résultats supportent l'idée que des isoformes spécifiques d'apoE peuvent conférer le risque d'hypertension en promouvant la vasoconstriction. Ils ont remarqué un ordre de risque $\epsilon_4 > \epsilon_3 > \epsilon_2$, conformément au risque génétique induit par les allèles d'apoE pour l'hypertension et la MA.

Dans la même étude, Paris et al. ont examiné le niveau de vasoconstriction induit par l'A β et par les différentes isoformes d'apoE seules ou en combinaison avec l'A β ou traité seulement avec l'ET-1 sur l'aorte de rat (Paris et al, 1998). Ils ont remarqué que l'A β seul peut augmenter le niveau de constriction induit par l'ET-1, mais aucune isoforme d'apoE seule ne peut augmenter significativement le niveau de vasoconstriction par rapport au contrôle. De plus, aucune différence significative n'a été remarquée entre apoE2+A β , E3+A β et A β seul. Enfin, c'est seulement entre A β et apoE4 qu'on peut observer une augmentation synergique du niveau de constriction. Ce résultat soutient l'hypothèse que l'apoE4 et A β utilisent la même voie biologique, via ET-1, pour pouvoir induire la vasoconstriction (Paris et al, 1998).

2. LE SYSTÈME ENDOTHÉLINE

2.1 L'endothéline (ET)

L'ET est un peptide de 21 AA, qui a été découvert suite à la démonstration de son puissant effet vasoconstricteur. Ce peptide a été isolé pour la première fois des cellules endothéliales aortiques du porc en 1988 (Yanagisawa et al, 1988).

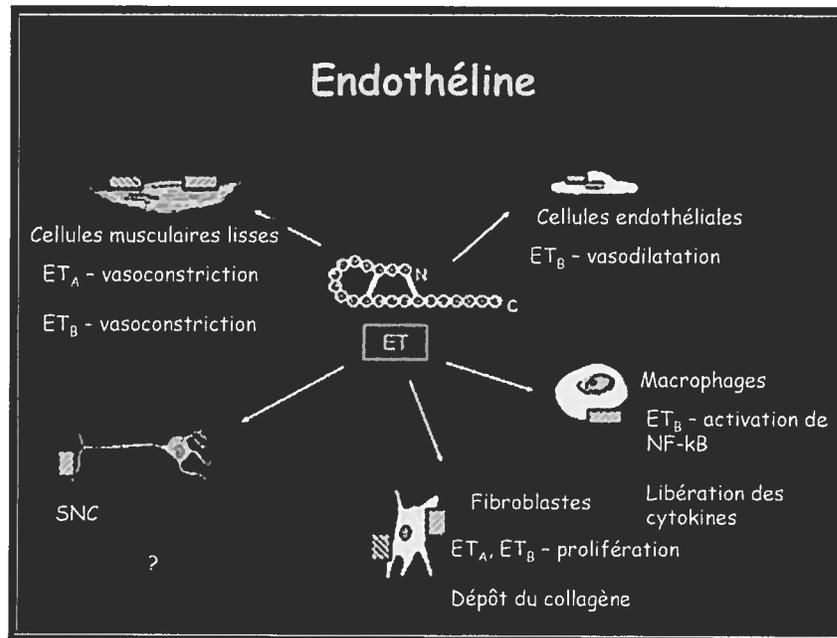


Figure 7 : La distribution de l'ET dans les tissus humains

L'ET est un peptide de 2492 Da, qui présente des structures C- et N-terminales libres et deux liens disulfures intramoléculaires. Il existe trois isoformes de l'ET (ET-1, ET-2, ET-3) provenant de trois gènes distincts exprimés différemment dans le système vasculaire mais aussi dans des tissus non vasculaires (Figure 7) (Inoue et al, 1989; Hori et al, 1992; Masaki, 2004; Masaki et Yanagisawa, 1992). ET-1 est produit par les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les macrophages, les fibroblastes, les myocytes cardiaques et les neurones. ET-2 est exprimée par les cellules épithéliales de l'intestin et ET-3 par les neurones, les cellules épithéliales tubulaires du rein et les cellules de l'intestin (Sokolovsky, 1995; Masaki, 2004).

2.2 La biosynthèse de l'ET

Le précurseur de l'ET est clivé par deux groupes de protéases pour produire l'ET mature et active. La prépro-endothéline (prépro ET-1, -2, -3) de 200 AA, est clivée par des endopeptidases de type furine, une enzyme spécifique pour les résidus dibasiques : Lys-Arg (lysine-arginine). Elle donne lieu à un intermédiaire peu actif appelé pro ou big-endothéline (pro ou big ET-1, -2, -3), peptide de 37 à 41 AA. La pro ET est ensuite clivée pour former le peptide final de 21 AA, l'endothéline active (Gray et Webb, 1996 ; Doherty, 1992). Cette dernière étape est effectuée par des métalloprotéases membranaires à zinc de la superfamille des néprilysines (NEP),

appelées enzymes de conversion de l'ET (ECE-1, ECE-2). Elle clive le peptide entre Trp²¹ et Val²² (tryptophane et valine) pour ET-1, -2 ou Ile²² (isoleucine) pour ET-3 (Sokolovsky, 1995 ; Blais et al. 2002 ; Pinet, 2004)(Figure 8).

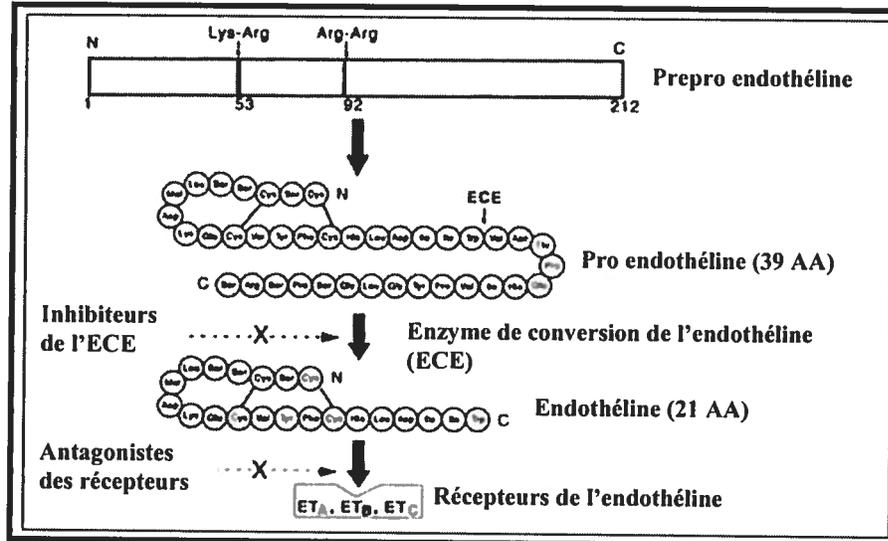


Figure 8 : Biosynthèse de l'ET

2.3 Les récepteurs couplés aux protéines-G (RCPGs)

Ces récepteurs présentent une structure commune à sept hélices alpha transmembranaires (Figure 9). L'extrémité amino-terminale de la protéine est extracellulaire et l'extrémité carboxy-terminale est intracellulaire ; on peut observer trois boucles extracellulaires (nommées E1, E2 et E3) et trois boucles intracellulaires (nommées I1, I2 et I3)(Figure 9). Ces sept domaines transmembranaires sont organisés dans la membrane plasmique et des études ont présenté la structure spatiale (Karnik et al, 2003).

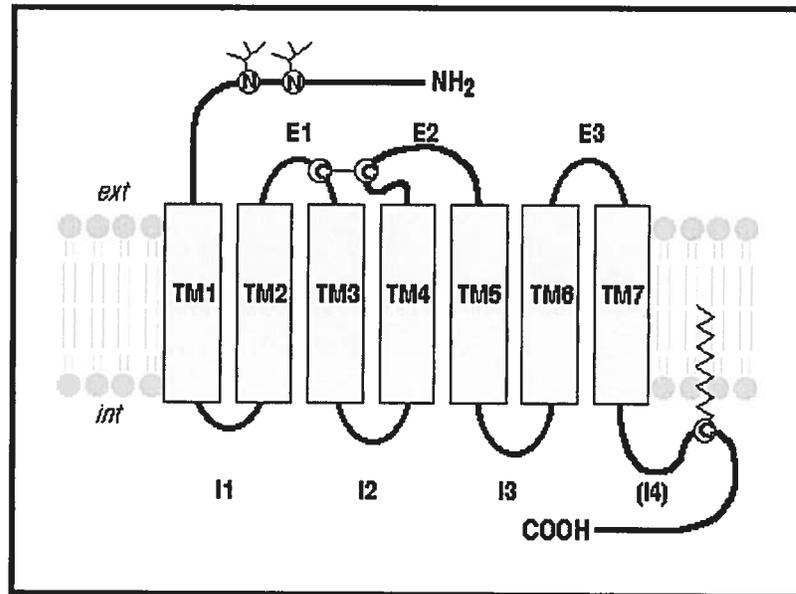


Figure 9 : Structure transmembranaire des RCPGs (E : boucles extracellulaires ; I : boucles intracellulaires ; TM : domaines transmembranaires ; Ext : membrane extracellulaire ; Int : membrane intracellulaire)

L'activation d'un récepteur couplé aux protéines-G, par son ligand, entraîne un remaniement de la structure du récepteur, qui devient capable d'activer des protéines-G intracellulaires (Figure 10). Ces protéines-G activent à leur tour une série d'effecteurs intracellulaires (enzymes, canaux ioniques, transporteurs...), membranaires ou cytosoliques. Ces effecteurs permettent la modulation de la concentration intracellulaire de messagers secondaires tels que l'adénosine-3', 5'-cyclique monophosphate (AMPc), l'inositol-triphosphate (IP₃), le calcium, le diacylglycérol (DAG)(Karnik et al, 2003).

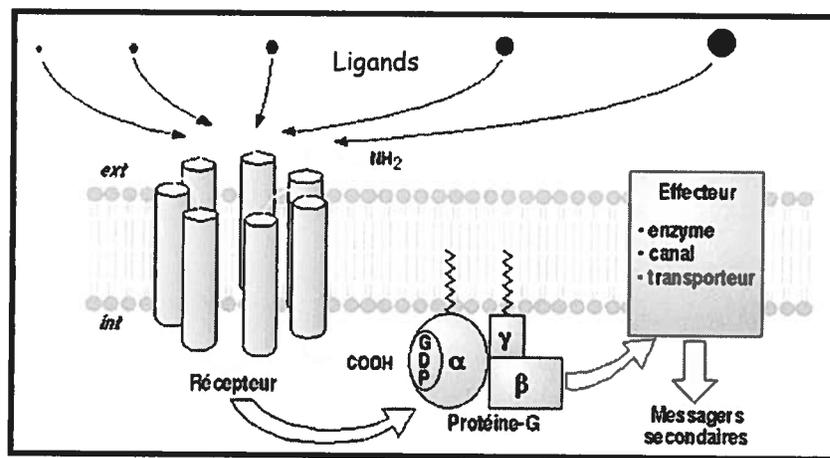


Figure 10 : Ligands capables d'activer un RCPG

Un RCPG au repos est activé par la liaison d'un agoniste spécifique (Figure 11). Le changement de conformation du complexe agoniste-récepteur, induit par cette liaison, permet l'activation de l'échange de la guanosine-5'-diphosphate (GDP) par de la guanosine-5'-triphosphate (GTP) et donc l'activation de la protéine-G hétérotrimérique (sous-unités $G\alpha$ et $G\beta/\gamma$) intracellulaires qui vont réguler l'activité de divers effecteurs membranaires ou cytosoliques. Le déclenchement de l'activité phosphatase intrinsèque à la sous-unité G, entraîne la réassociation des sous-unités $G\alpha$ et $G\beta/\gamma$ et le retour à l'état initial (Karnik et al, 2003).

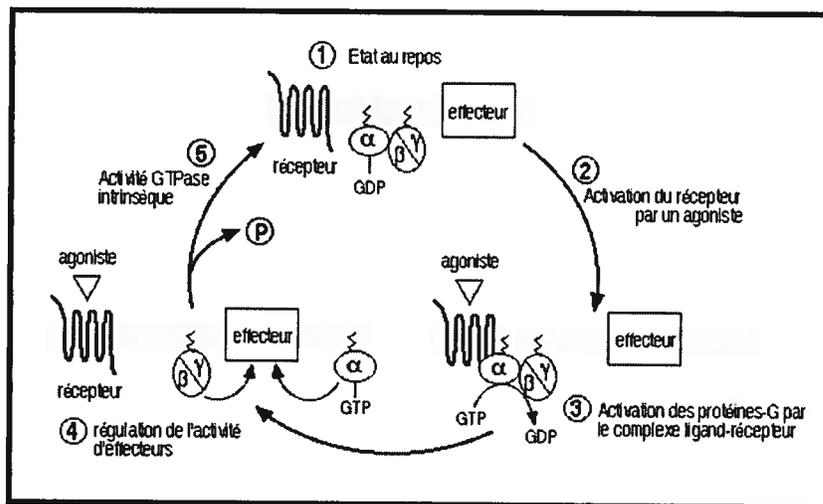


Figure 11 : Activation des protéines-G : le cycle GTPase

2.4 Les récepteurs de l'ET

En 1990 ont été identifiés les deux récepteurs de l'ET, ET_A et ET_B (Arai et al, 1990; Sakurai et al, 1990). Ils appartiennent à la grande famille des RCPGs et présentent une structure caractéristique à cette famille : une extrémité N-terminale extracellulaire, sept domaines transmembranaires et un segment C-terminal intracellulaire (Sokolovsky, 1995). Les deux récepteurs présentent cependant des différences entre eux : ils diffèrent par leurs affinités respectives pour les isoformes de l'ET ; ET_A ayant une affinité plus élevée pour ET-1 que pour ET-2 ou ET-3, alors que ET_B présente la même affinité vers les trois isopeptides (Sakamoto et al, 1993). Ils diffèrent aussi dans leur distribution, ET_A étant localisé sur la membrane plasmique de cellules musculaires lisses, alors que ET_B se trouve à la surface de cellules

endothéliales. De plus, le récepteur ET_A est principalement couplé aux protéines Gq et Gs alors que ET_B est couplé à Gq et Gi (Takagi et al, 1995).

Les domaines transmembranaires et la boucle cytoplasmique diffèrent par une capacité particulière de liaison et ceux-ci assurent une certaine spécificité qui va déterminer l'activité différente des deux récepteurs. Les séquences de la partie cytoplasmiques de chacun des récepteurs varient beaucoup et cette région serait intimement impliquée dans le processus d'internalisation, de désensibilisation et du recyclage de chaque récepteur.

2.5 Effets physiologiques de l'ET

Lors de la liaison avec son récepteur ET_A , l'ET au niveau des cellules musculaires lisses du système vasculaire va induire une vasoconstriction rapide et soutenue. Une fois liée à son récepteur, en formant un complexe, l'ET va activer dans un premier temps, la phospholipase C (PLC), conduisant à la formation du DAG et de l' IP_3 , qui vont activer soit la protéine kinase C (PKC), soit les canaux calciques du réticulum sarcoplasmique (Rubanyi et Polokoff, 1994). La libération du calcium intracellulaire va ensuite donner lieu à la première phase de contraction, caractérisée par sa rapidité et son importante amplitude. Même si le niveau de calcium intracellulaire semble diminuer, son taux reste élevé car on assiste également à une entrée de calcium extracellulaire via l'activation des canaux calciques transmembranaires et les protéines G. Cette entrée soutenue d'ions Ca^{2+} va caractériser la contraction provoquée par ET et peut durer plusieurs heures (Rubanyi et Polokoff, 1994)(Figure 12).

L'ET est aussi impliquée dans le maintien du tonus vasculaire basal, via les récepteurs ET_A qui déterminent la vasoconstriction des cellules musculaires lisses. En revanche, l'ET peut provoquer une vasodilatation des cellules endothéliales, grâce à une augmentation de l'activité du monoxyde d'azote (NO) ou via une forte synthèse de guanosine-3', 5'-cyclique monophosphate (GMPc) ; on obtient cette vasodilatation via les récepteurs ET_B (Pinet, 2004; Masaki, 2004)(Figure 12).

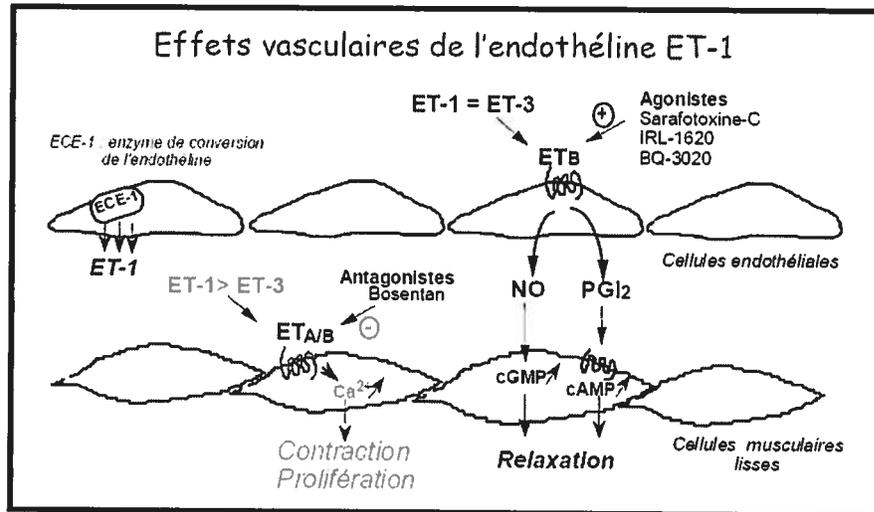


Figure 12 : Voie de signalisation de l'ET via ses récepteurs ET_A et ET_B

2.6 Aspects fonctionnels et pathologies liées à l'ET

Agissant sur des récepteurs ET_A et ET_B, les endothélines provoquent une vasoconstriction importante et de longue durée, y compris au niveau des artères coronaires et pulmonaires. Elles augmentent le rythme (chronotrope positif) et la force de contraction (inotrope positif) du cœur (Pinet, 2004). Le développement d'agonistes et d'antagonistes sélectifs des deux récepteurs et l'élaboration de modèles animaux génétiquement modifiés ont permis de montrer que le système ET n'était pas uniquement important dans le domaine cardiovasculaire (Pinet, 2004)(Tableau 2).

	ET-1	ET-A	ET-B	ECE-1
Cellules endothéliales	+	-	+	+
Cellules musculaires lisses	-	+	+	+
Myocytes cardiaques	+	+	+	-
Hépatocytes	+	+	+	+
Cellules du canal collecteur rénal	+	+	+	+
Neurones	+	+	+	+
Ostéoblastes	+	+	+	+
Kératinocytes	+	+	+	+
Adipocytes	+	+	+	+
Cellules de Leydig	+	+	+	+
Cellules de la granulosa	+	+	+	+

Tableau 2 : Le système ET dans les cellules

Chez les mammifères, ce système est essentiel pour le développement embryonnaire et néonatal (les gènes codant pour ET-1, ET_A et ECE-1 sont nécessaires au développement des structures cranio-faciales et des éléments du système d'éjection cardiaque dérivés des crêtes neurales ; les souris invalidées pour les gènes codant pour ET-1 et ET_A meurent à la naissance par asphyxie (Pinet, 2004) ; les souris invalidées pour les gènes codant pour ET-3 ou ET_B sont viables à la naissance (Pinet, 2004) mais elles ne se développent pas et meurent après trois à six semaines. Des anomalies cardiaques plus graves ont été observées chez les souris doublement invalidées pour ECE-1 et ECE-2. Elles jouent un rôle dans l'homéostasie rénale (le système ET contrôle l'excrétion d'eau et de sodium, ainsi que l'équilibre acido-basique), dans le maintien du tonus vasculaire et dans l'angiogenèse (Pinet, 2004).

Le système ET est aussi impliqué de manière délétère dans l'athérosclérose. Dans cette maladie, ET-1 active les récepteurs ET_A présents sur les macrophages, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes. La synthèse d'ET-1 est stimulée par les lipoprotéines LDL oxydées dans les cellules endothéliales, les macrophages et les cellules musculaires lisses d'artères coronaires ; une coexpression d'ECE-1 et d'ET-1, corrélée à l'évolution des plaques d'athérosclérose (Pinet, 2004), a été observée dans les artères humaines et récemment dans la MA (Tableau 3).

Fonctions	Constituants impliqués
Rôles bénéfiques	
<i>Développement embryonnaire et néonatal</i>	ET-1, ECE-1, ET-A
Crête neurale cardiaque et céphalique	ET-3, ECE-1, ET-B
Mélanocytes de la peau et neurones entériques	ET-2, ECE-1 (?), ET-A, ET-B
Croissance néonatale et fonctions intestinales	ET-2, ECE-1 (?), ET-A et ET-B (?)
Homéostasie rénale	
Homéostasie sodée	ET-1, ECE-1 (?), ET-B
Équilibre acido-basique	ET-1, ECE-1 (?), ET-B
Maintien du tonus vasculaire	ET-1, ECE-1 (?), ET-A ++
Réparation du tissu cardiaque après ischémie aiguë	ET-1, ECE-1 (?), ET-A ++
Régulation de la respiration	ET-1, ECE-1 (?), ET-A ++
Rôles délétères (dans plusieurs tissus)	ET-1 ++, ECE-1 et ECE-2 (?), ET-A ++
Conditions physiopathologiques impliquant un tonus vasculaire anormalement élevé	ET-1, ECE-1 ++, ET-A ++
Tissus endommagés/remodelage/ réponses inflammatoires	ET-1, ECE-1 ++, ET-A et ET-B

Tableau 3 : Le système ET et ses fonctions dans les différents tissus

3. LE SYSTÈME ENDOTHÉLINE ET LA MALADIE D'ALZHEIMER

3.1 Le métabolisme de l'A β

Le métabolisme de l'A β est associé à la pathologie et à l'étiologie de la MA. Comme pour tout neuropeptide cérébral, les taux d'A β formés sont régulés par l'action des enzymes de maturation du précurseur ainsi que par les enzymes de dégradation des peptides formés (Ouimet, 2001). Il est intéressant de concentrer l'attention sur les enzymes capables d'être à la base de la clairance de l'A β . Récemment des études ont découvert que les enzymes qui appartiennent à la famille des métalloprotéases à zinc M13, semblent jouer un rôle dans la dégradation de l'A β (Inguibert et al, 2002; Kanemitsu et al, 2003). Les deux enzymes les plus connus qui appartiennent à cette famille sont :

3.1.1 L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) :

L'ECA joue un rôle important dans la régulation du tonus et de la perméabilité vasculaire par deux mécanismes distincts. D'une part, elle agit sur l'angiotensine I, formée par l'action de la rénine sur l'angiotensinogène. Elle élimine le dipeptide C-terminal pour former l'angiotensine II, un puissant vasoconstricteur, par des effets à la fois pariétaux, centraux et neuro-hormonaux avec libération d'aldostérone (Bénéteau-Burnat et Baudin, 1991). D'autre part, l'ECA dégrade séquentiellement la bradykinine, agent vasodilatateur et pro-inflammatoire. En dehors de ces effets dans les systèmes rénine-angiotensine, l'ECA intervient dans la dégradation de peptides neuronaux (Bénéteau-Burnat et Baudin, 1991). Hemming et al. (2005) ont basé leur recherche sur le fait que ECA était capable de cliver l'A β . L'expression d'ECA peut promouvoir la dégradation de l'A β ₁₋₄₀ et l'A β ₁₋₄₂, permettant une clairance significative des deux peptides. Ils ont remarqué que les deux extrémités N- et C-terminales de l'enzyme jouent un rôle fondamental dans la clairance de l'A β . Les mêmes chercheurs ont démontré qu'en utilisant un puissant inhibiteur d'ECA, le captopril, on observait une accumulation de l'A β dans le milieu des cellules exprimant l'APP et l'ECA (Hemming et al, 2005).

3.1.2 L'enzyme de dégradation de l'insuline (EDI) :

L'insuline et ses récepteurs sont impliqués dans la transmission synaptique et semblent avoir un rôle dans l'apprentissage et la mémoire (Wickelgren, 1998 ; Zhao et al, 1999). Ils sont exprimés dans le cerveau et une altération dans la voie de signalisation de l'insuline semble contribuer au développement de la MA. L'EDI est principalement exprimé dans le foie, les testicules, les muscles et le cerveau. Son expression est régulée dans la différenciation cellulaire, la croissance et le développement. De plus, son expression diminue avec l'âge, et une baisse dans son activité. Qiu et Folstein (2006) ont montré un lien entre l'augmentation du peptide A β et une baisse dans l'activité d'EDI. Différents petits peptides avec un poids moléculaire entre 3 et 10 kDa, incluant l'insuline et l'A β (Farris et al, 2003), ont été présentés comme substrat potentiel pour cet enzyme. Enfin, différentes études ont montré que dans des conditions pathologiques, EDI était sécrété à des niveaux plus forts par les cellules de la microglie et était capable de dégrader soit l'A β ₁₋₄₀ soit l'A β ₁₋₄₂ (Eckman et Eckman, 2005 ; Qiu et Folstein, 2006).

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 est généralement exposé à la surface extra-cellulaire (Ouimet, 2001). Chaque enzyme joue un rôle dans la régulation de l'accumulation de l'A β dans le cerveau et leurs sites de clivage sont aussi connus (Eckman et Eckman, 2005)(Figure 13).

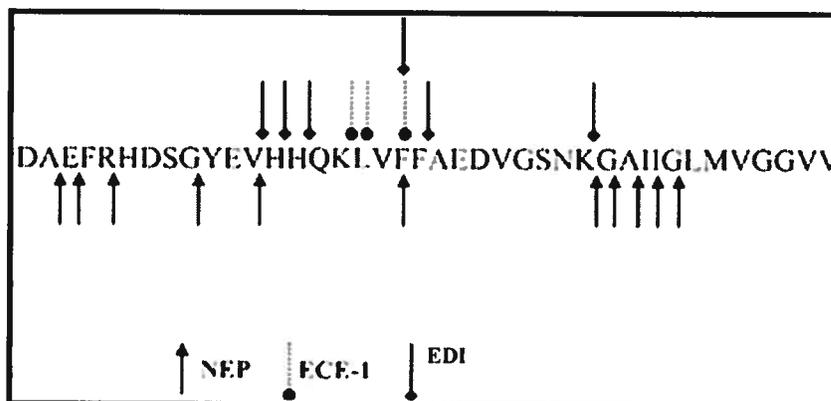


Figure 13 : Les sites de clivage de chaque enzyme capable de dégrader l'A β

3.2 La néprilysine (NEP)

Facchinetti et al. (2003) ont fait une recherche pour mettre en évidence la localisation de l'ARNm de NEP, NEP-2 et ECE-1 par hybridation *in situ*, surtout dans le système nerveux central et périphérique. La distribution de l'ARNm de NEP et NEP-2 est abondante dans les régions cérébrales (Ouimet et al, 2000). NEP est plus exprimée dans le striatum, noyau caudé, putamen, globus pallidus, substantia nigra, alors que NEP-2 est plus présente dans le thalamus et l'hypothalamus. L'ARNm d'ECE-1 a été principalement observé chez la population neuronale qui exprime aussi le gène de la prepro ET-1 (Ouimet et al, 2000; Facchinetti et al, 2003).

D'autres études ont démontré que l'abondance régionale de la NEP dans le cortex cérébral est inversement corrélée aux dépôts d'A β ; cette observation pourrait en partie expliquer la résistance de certaines régions cérébrales aux processus pathologiques de la MA (Akiyama et al, 2001). Une autre chose intéressante à observer est l'affinité entre le type de métalloprotéase et la vulnérabilité du peptide A β monomère et oligomère. L'équipe du Kanemitsu a observé que la NEP dégrade

préférentiellement le peptide monomère $A\beta_{1-40}$ que le monomère $A\beta_{1-42}$. Ils ont constaté que la NEP est capable de dégrader aussi les formes oligomères de l' $A\beta_{1-40}$. En revanche, EDI est capable de dégrader les monomères mais pas les oligomères. De cette observation, on peut dire que la NEP semble être plus puissant par rapport à l'EDI pour diminuer les niveaux cérébraux d' $A\beta$ oligomère, et donc être un candidat plus intéressant à pouvoir hydrolyser l' $A\beta$ dans les PS (Kanemitsu et al, 2003).

Apelt et al. (2003) ont observé par immunofluorescence chez des souris transgéniques Tg 2576, la présence d'une sur-régulation locale de la NEP chez les astrocytes réactifs et les neurites dystrophiques tout autour des plaques d' $A\beta$. D'autres études ont démontré que la NEP semblait mieux dégrader l' $A\beta$ soluble qui ne présentait pas encore une forme fibrillaire et ainsi plus accessible à l'activité de l'enzyme (Mohajeri et al, 2004). La NEP joue un rôle sur le dépôt d' $A\beta$ (Iwata et al, 2001 et 2000) : une diminution de l'activité de NEP peut être due soit à la diminution de l'expression de l'enzyme, soit à la diminution de son activité, soit aux deux. L'ARNm de la NEP était significativement diminué dans les cerveaux atteints de la MA par rapport aux sujets contrôles. La diminution de la NEP est reliée à l'âge dans l'hippocampe chez les souris (Eckman et Eckman, 2005). Wang et al. (2003) ont aussi remarqué que NEP chez les cerveaux humains MA et contrôles peut être endommagé par le stress oxydatif et ainsi déterminer une accumulation d' $A\beta$ dans la MA.

3.3 L'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE)

La dernière étape de maturation de l'ET est effectuée par l'enzyme ECE ; elle est une métalloendopeptidase membranaire fortement glycosylée. Elle existe sous la forme d'un dimère retenu par un lien disulfure (Figure 14).

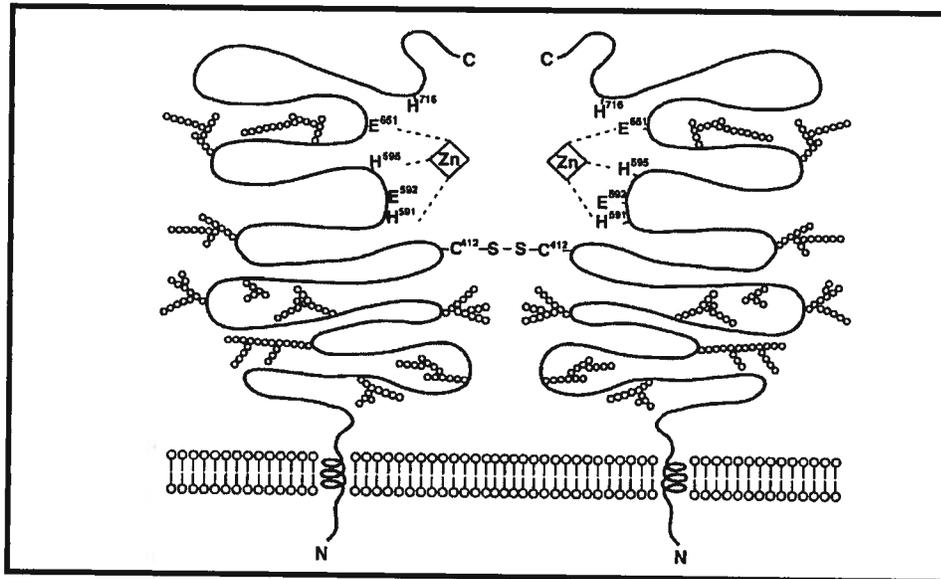
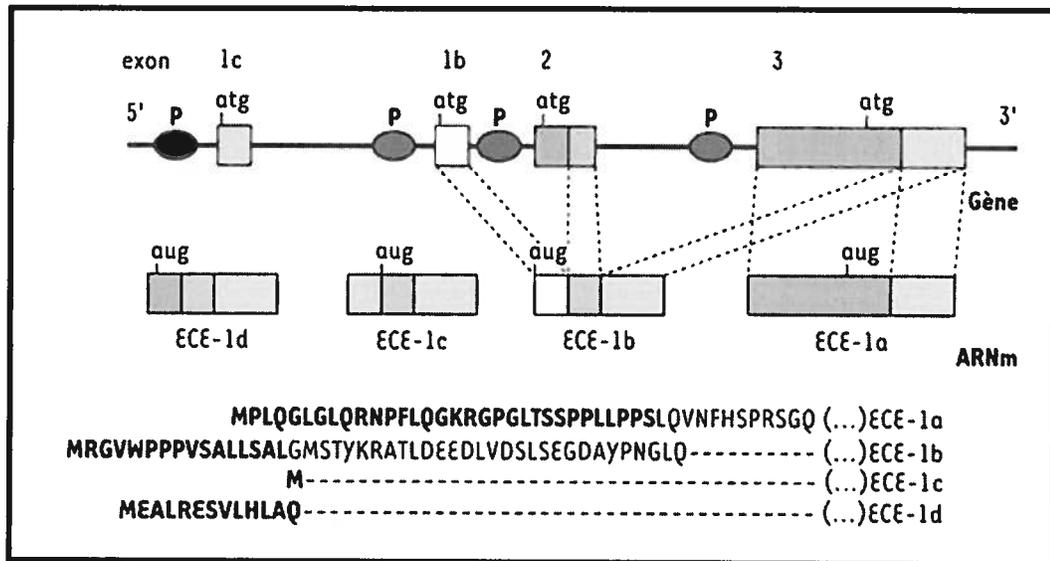


Figure 14 : Structure de l'enzyme ECE

Elle est sensible au phosphoramidon, un inhibiteur de métalloprotéase, mais pas au thiorphan, un inhibiteur des endopeptidases neutres (NEP) (Gray et Webb, 1996 ; Doherty, 1992 ; Masaki et Yanagisawa, 1992 ; Okada et al, 1990).

Pour notre recherche nous nous sommes intéressés en particulier à l'activité catabolique d'ECE-1. Deux enzymes différentes ont été clonées ECE-1 et ECE-2. Les deux enzymes sont exprimées dans des régions du cerveau atteintes par la MA (Funalot et al, 2004). La première enzyme identifiée est ECE-1, qui est exprimée dans les cellules vasculaires endothéliales de tous les organes, ainsi que dans les cellules non-vasculaires de différents tissus (poumons, pancréas, testicules, ovaires, glandes surrénales). Dans le cerveau, l'immunoréactivité d'ECE-1 est présente chez les neurones du cortex cérébral, l'hippocampe et les astrocytes (Eckman et al, 2001).

Il existe quatre isoformes d'ECE-1 humains qui se différencient seulement par la partie cytoplasmique. Les quatre isoformes sont capables de cliver la pro ET de la même manière mais ils diffèrent dans la localisation subcellulaire et la distribution dans les tissus : ECE-1a, -1c, -1d sont localisés dans la membrane plasmique en particulier ; ECE-1b, -1c, -1d ont aussi une localisation intracellulaire (Figure 15).



Fisk et al. (2006) ont analysé les effets de l'hypoxie et du stress oxydatif sur l'expression d'ECE-1 dans les cellules de neuroblastome humain NB7. L'enzyme ECE-1 montrait une baisse plus importante suite à une hypoxie de 24 heures par rapport à celle due au stress oxydatif. En revanche, le niveau de l'ARNm ne variait pas significativement (Fisk et al, 2006). Dans leur travail, ils avaient aussi observé la même diminution d'expression d'ECE-1 dans le cortex frontal des rats suite à une ischémie de 15 minutes. Enfin, il est intéressant de souligner que Fisk et al. (2006) ont démontré que l'isoforme ECE-1c en particulier était celle le plus exprimée dans les cellules NB7 ; cette observation démontre que l'ECE-1c est la forme plus commune dans les cellules neuronales (Fisk et al, 2006).

En addition à la forme complète d'ECE-1, Klipper et al. (2006) ont identifié dans les cellules endothéliales une forme alternative appelée ECE-1sv (sv, *splice variant*). ECE-1sv diffère des autres formes parce qu'elle ne possède pas de région transmembranaire et a un poids moléculaire de 75 kDa. Klipper et al. (2006), ont confirmé que ECE-1sv était capable de dégrader l'A β , de la même manière que la forme soluble d'ECE-1 privée de sa région transmembranaire, en soulignant l'importance de la présence de cette région dans l'hydrolyse de l'A β .

ECE-2 en revanche, est une enzyme homologue avec une activité catalytique similaire à celle d'ECE-1. ECE-2 est exprimée chez une population hétérogène de neurones au niveau du thalamus, hypothalamus, amygdale, dentate gyrus et CA3 (hippocampe). Comme ECE-1, ECE-2 est capable de cliver la pro ET-1 plus efficacement par rapport aux trois autres pro ETs (Eckman et al, 2003 et 2001). L'enzyme ECE est aussi capable d'hydrolyser *in vivo* différents peptides biologiquement actifs, incluant la bradykinine, la neurotensine et la substance P. La capacité de l'ECE de dégrader l'A β a été découverte après avoir observé que l'inhibiteur des métalloprotéases, le phosphoramidon, augmentait rapidement le niveau d'accumulation de l'A β dans les cellules exprimant l'enzyme. D'autres études avec une enzyme recombinante, ont démontré que l'enzyme ECE-1 pouvait couper l'A β en différents sites (Eckman et Eckman, 2005)(Figure 13).

Pour déterminer l'efficacité d'ECE-1 et ECE-2 dans le clivage du peptide amyloïde, Eckman et al. (2005) ont examiné le niveau de l'A β endogène dans des cerveaux de souris déficientes pour les deux enzymes. Les niveaux d'A β étaient analysés chez les souris ECE-1 (+/-), qui étaient en santé et avec une réduction de 27% dans l'activité de l'enzyme. La baisse dans l'activité de l'enzyme correspond à une augmentation des niveaux de l'A β_{1-40} et de l'A β_{1-42} dans le cerveau ; A β semble être un substrat physiologiquement important pour ECE-1. Ce peptide est aussi un substrat pour ECE-2, car les niveaux des deux peptides A β_{1-40} et A β_{1-42} augmentent dans les cerveaux des souris ECE-2 (-/-), qui sont vivantes et en santé (Eckman et Eckman, 2005).

En 2004, Funalot et al. ont étudié le rôle d'hydrolyse exercé par l'ECE sur l'A β . Ils ont observé la présence d'ECE dans l'hippocampe et dans le cortex frontal, pariétal, temporal et occipital. Ils ont remarqué une variante génétiquement fonctionnelle localisée sur la région régulatrice du gène codant pour ECE-1. L'allèle A est associé à l'augmentation de l'expression de l'ARNm pour ECE-1 dans le neurocortex humain avec une diminution du risque de développer la MA (Funalot et al, 2004). Dans leur étude, ils ont aussi observé une interaction possible entre l'expression d'ECE et les génotypes d'apoE, indépendamment de la présence ou l'absence de l'allèle ϵ 4 (Funalot et al, 2004).

3.4 Les récepteurs de l'ET dans le SNC

L'incapacité de l'ET de passer la barrière hémato-encéphalique (BHE) explique la nécessité de la synthétiser à l'intérieur du cerveau et confirme la présence du système ET dans le SNC (Naidoo et al, 2004). Les chercheurs ont montré, par immunobuvardage, l'ubiquité des récepteurs ET_B et la présence des récepteurs ET_A surtout dans les neurones. La différente localisation des deux récepteurs de l'ET dans le SNC souligne une fonction spécifique de l'ET au niveau cérébral selon les régions et les types cellulaires (Naidoo et al, 2004).

Dans le cerveau, l'ET est synthétisée par les cellules endothéliales, les neurones, la glie et ses récepteurs sont aussi exprimés dans les astrocytes et la microglie (Islamov et al, 2003 ; Rogers et al, 1997 ; Lee et al 1990 ; MacCumber et al, 1990). Toutefois, le rôle biologique du système ET dans le SNC est encore peu connu. Des études récentes indiquent que l'ET est impliquée dans le développement des neurones et des précurseurs de la glie ; elle est impliquée aussi dans la libération des neurotransmetteurs ; elle participe à la nociception et elle a un effet neuroprotecteur et anti-apoptotique (Ehrenreich et al, 1999 ; Yagami et al, 2005 et 2002). L'ET est aussi impliquée dans la prolifération, la survie, la différenciation et l'activation neuronale (Hasselblatt et al, 2001 ; Ehrenreich et al, 1999).

Dans le tissu nerveux après un traumatisme crânien ou une ischémie (Rogers et al, 2003 ; Dawson et al, 1999 ; Uesugi et al, 1996), les récepteurs de l'ET ont été retrouvés surexprimés. Hasselblatt et al (2001), ont aussi conclu que l'hypoxie stimule les astrocytes à libérer l'ET mature et cette stimulation est compensée par une augmentation des liens de l'ET à ses récepteurs. Sato et Noble (1998) ont évalué l'efficacité de l'administration du Ro 61-1790, un antagoniste des récepteurs ET_A, en démontrant qu'il peut atténuer le dommage du cortex et retarder la mort de la glie dans le cervelet. Le lien entre le système de l'ET et la MA a été montré grâce à une étude faite par Zhang et al (1994). Une immunoreactivité vers l'ET dans les astrocytes cérébraux a été observée chez les patients atteints de la MA par rapport aux sujets contrôles. Cette immunoreactivité était fréquemment localisée à côté des vaisseaux sanguins dans le néocortex, l'hippocampe, le cervelet ou autour des PS (Zhang et al, 1998)

L'homéostasie calcique est un des facteurs fondamentaux pour la régulation de l'apoptose soit au niveau cytoplasmique soit au niveau nucléaire (Santella et Carafoli, 1997). Les récepteurs ET_A et ET_B , couplés aux protéines G, jouent un rôle très important dans l'entrée des ions Ca^{2+} via les canaux calciques de type L, sensibles au voltage (L-VSCCs)(Islamov et al, 2003). Yagami et al (2002, 2005) ont découvert que les agonistes des récepteurs ET_B peuvent sauver les neurones corticaux du peptide $A\beta$. En effet, l' $A\beta$ augmente l'entrée des ions Ca^{2+} via les L-VSCCs induisant la mort neuronale (Ueda et al, 1996). Rogers et al (1997, 2003) soulignent aussi que l'augmentation dans l'expression des récepteurs ET_B , dans des conditions pathologiques, pourrait être impliqué dans la régénération et la protection du système nerveux.

4. LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION NUCLÉAIRE-kB DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER

4.1 Régulation de l'activation du facteur de transcription nucléaire-kB (NF-kB)

Dans la MA, des études en *post-mortem* montrent que l'immunoréactivité (vers la sous-unité p65 dans les astrocytes et les neurones) est plus élevée autour des PS (Kaltschmidt et al, 1997). L'immunoréactivité entre l'anticorps et p65 est observée au niveau de l'hippocampe et du cortex entorhinal (Terai et al, 1996). La neurotoxicité de l' $A\beta$ détermine la translocation du NF-kB (Kaltschmidt et al, 1997). Des résultats d'immunohistochimie sur des tissus de souris, démontrent une activation plus significative chez les souris exprimant l'apoE4 plutôt que chez les souris apoE3 (Ophir et al, 2005).

Le NF-kB est une protéine constituée de plusieurs sous-unités. La famille Rel/NF-kB comprend cinq polypeptides structurellement reliés : p50, p65 (Rel A), p52, c-Rel et Rel B, qui peuvent s'associer en formant des homo ou des hétérodimères. La sous-unité la plus commune est p50/p65. Elle présente une séquence responsable de la liaison à la sous-unité inhibitrice du facteur-kB (IkB), de la localisation nucléaire et de la liaison à l'acide désoxyribonucléique (ADN). Le NF-kB

est généralement séquestré par I κ B dans le cytoplasme sous une forme inductible. Le NF- κ B est contrôlé par un système d'ubiquitination et de phosphorylation. Suite à un signal pro-inflammatoire approprié, I κ B est phosphorylé ; cette modification le rend apte à être ubiquitinylé puis dégradé. Le protéasome est alors capable de dégrader le répresseur et ainsi, le NF- κ B est libre de migrer dans le noyau vers son site d'attache sur l'ADN (Sen et Baltimore, 1986)(Figure 16).

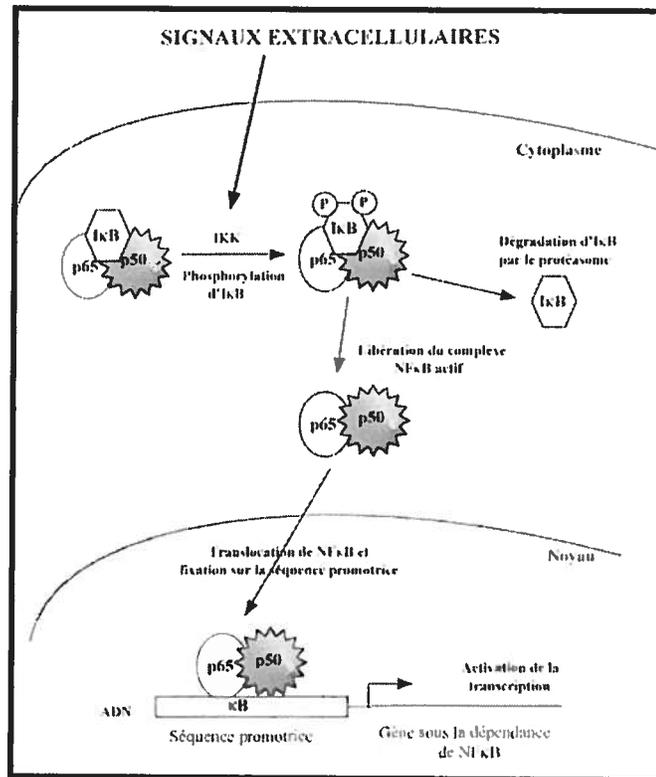


Figure 16 : Structure et mécanisme d'action du NF- κ B

4.2 Rôle du NF- κ B dans la production de l'ET

Il existe un rapport entre l'ET-1 et la famille NF- κ B ; en effet, de récentes études ont rapporté que NF- κ B était capable de moduler la production de l'ET-1 en régulant l'expression du gène pour l'ET-1 dans des cellules endothéliales (Ohkita et al, 2003 et 2002b). Ohkita et al. (2002) ont utilisé un suppresseur du NF- κ B pour vérifier la diminution de la production d'ET. Le BAY 11-7082, un inhibiteur de la phosphorylation d'I κ B, est capable de réduire l'expression de l'ARNm de la prépro ET (Ohkita et al, 2002a). En parallèle aux études faites par Ohkita et al, une autre

équipe de chercheurs, Quehenberger et al. ont démontré que le gène humain qui code pour l'ET-1 présente un site de liaison pour le NF-kB, confirmant une fois de plus l'implication du NF-kB dans la production de l'ET (Quehenberger et al, 2000).

En conclusion, ces résultats soulignent que la prévention de l'activation du NF-kB réduit la production d'ET-1 au niveau de la transcription et suggèrent donc que le facteur NF-kB est un des signaux pour la production d'ET.

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

La MA est une maladie neurodégénérative progressive et irréversible. Le composant principal des PS est l'A β ; son niveau dépend non seulement du système de production mais aussi des mécanismes responsables de sa dégradation. Des études récentes suggèrent l'importance des métalloprotéases dans la dégradation de l'A β . En particulier l'ECE, enzyme clef dans la production de l'ET, provoque une réduction de la concentration de l'A β , en démontrant que cette enzyme pourrait hydrolyser l'A β *in vitro*.

L'ET, un puissant vasoconstricteur, exerce son action à travers ses deux récepteurs ET_A et ET_B. Leurs expressions dans différentes cellules non-vasculaires, associent le récepteur ET_A à une toxicité neuronale, et ET_B à un effet neuroprotecteur.

Parmi les différents facteurs de risque de la MA, nous pouvons retrouver l'âge, les ACV et les facteurs génétiques comme l'allèle ϵ 4 de l'apoE. Un autre facteur impliqué dans la MA est le NF-kB ; sa présence a été confirmée dans les PS. De plus, une séquence NF-kB a été découverte récemment sur le gène codant pour l'ET.

Notre étude vise à vérifier l'hypothèse que le système ET pourrait jouer un rôle dans la pathophysiologie de la MA. Dans notre recherche, nous souhaitons analyser le niveau d'expression des deux récepteurs ET_A et ET_B et celui de l'enzyme ECE dans des tissus cérébraux provenant des patients atteints de la MA. Nous voulons aussi vérifier la dépendance du système ET de différents génotypes d'apoE et la capacité de l'A β d'induire un changement dans l'expression des deux récepteurs de l'ET. Enfin, nous souhaitons observer si le facteur NF-kB pourrait être impliqué dans la production de l'ET même.

Pour pouvoir accomplir notre projet, les techniques utilisées sont l'immunobuvardage, l'immunofluorescence et le test ELISA. Les échantillons proviennent de tissus cérébraux humains, de tissus des souris et d'une lignée cellulaire de neuroblastome murin.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Échantillons des tissus cérébraux humains

Les tissus humains ont été fournis par la banque du cerveau du 'Centre de Recherche de l'Hôpital Douglas' à Verdun (QC). Les patients présentaient une histoire de démence ou d'autres désordres neurologiques. Tous les patients supposés atteints de la MA étaient classés selon les critères du '*National Institute of Neurological Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*' (NINCDS-ADRDA) pour le diagnostic clinique. Les cerveaux provenant des malades étaient examinés en concordance avec les règlements du '*Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*' (CERAD).

Les premières causes de décès comprenaient : œdème pulmonaire, broncho-pneumonie, carcinome, infarctus aigu du myocarde, artériosclérose et occlusion des artères coronaires, cardiomyopathie, tumeurs intestinales, maladie rénale chronique ou causes inconnues ; les patients contrôles ne présentaient quant à eux, aucun problème neurologique.

Les cerveaux étaient prélevés durant l'autopsie, séparé en deux hémisphères dont un était coupé et conservé à -80°C. Les tissus pour les manipulations étaient disséqués sur un lit de glace sèche, en utilisant un couteau de titane, conservés à -80°C avant utilisation. Les caractéristiques générales des patients sont expliquées dans le tableau ci après (Tableau 4) :

Cas	Génotypes d'apo E	Nombres	Age (années)	Sexe (M/F)	Délai <i>post-mortem</i> (heures)	Longueur de la durée de la maladie (années)
<u>Contrôles</u>	ε 3/3	15	76±5	7/3	22±4	
<u>MA</u>	ε 3/3	16	79±3	4/6	19±3	6±1
	ε 3/4	22	79±2	4/6	27±5	6±1
	ε 4/4	7	75±2	5/3	19±2	11±1
<u>MA</u>	Totale	60	78±1	13/15	19±2	

Tableau 4 : Patients MA et contrôles groupés selon le génotype d'apoE, l'âge, le sexe, le délai *post-mortem* et la durée de la maladie

Les échantillons MA ont été séparés en sous-groupes selon les différents génotypes d'apoE préalablement étudiés par le laboratoire du Dr Poirier. On doit remarquer que la disponibilité des sujets homozygotes ϵ 4/4 est limitée ce qui s'explique pour le fait qu'ils représentent moins de 2% de la population générale.

1.1 Homogénéisation des tissus cérébraux humains

L'hippocampe et le cortex frontal, provenant de patients MA et de sujets contrôles ont été homogénéisés avec un tampon phosphate saline d'extraction froid (8 mL, PBS 1X, Sigma, USA) à l'aide d'un potter teflon-vitre. Après homogénéisation, les tissus ont été centrifugés à 3000 rpm durant 10 minutes à 4°C ; puis le surnageant a été collecté, aliquoté et gardé à -80°C.

2. Culture cellulaire

2.1 La lignée cellulaire N2a

Les cellules de neuroblastome murin N2a provenaient de chez 'American Type Culture Collection' (ATCC); ATCC est un organisme à but non-lucratif de biosource fournissant des produits biologiques, des services techniques et des programmes éducatifs aux industries privées, publiques et aux organisations académiques dans le monde entier. Les N2a ont été cultivées dans un milieu Mégacell DME/F-12 Ham medium enrichi avec 200 mM L-glutamine, 100 U/mL pénicilline/streptomycine et du sérum bovin foetal (FBS, Sigma, USA) et incubées à 37°C en présence de 5 % en CO₂ (voir APPENDICE). Les cellules ont été cultivées sur des plaques de 6 puits (Fisher, USA) avant de pouvoir les collecter pour préparer les échantillons pour l'immunobuvardage.

2.2 La lignée cellulaire CHO

Les cellules CHO (*Chinese hamster ovary cells*) transfectées de façon stable avec les deux récepteurs de l'ET par le Dr Michel Detheux et le Dr Emmanuel Burgeon, provenaient de chez 'Euroscreen', Belgique. Le protocole que nous avons suivi pour la culture cellulaire a été donné par le fournisseur.

2.3 Lyse des cellules

Les cellules ont été lysées en utilisant un tampon de lyse contenant du TRIS à 50 mM à pH 8, du NaCl à 150 mM, du Igepal 0,5%, du SDS 0.1%, du Triton 0,01%, un cocktail d'inhibiteurs de protéases 10% (voir APPENDICE). Les cellules ont été collectées avec 350 μ L de tampon dans chaque puits, et elles ont ensuite été déposées dans des tubes à microcentrifugation de 1,5 mL (Fisher, USA). Après agitation de 45 minutes à 4°C, nous avons centrifugé à 13 000 rpm à 4°C durant 45 minutes. Nous avons collecté le surnageant et les protéines ont été dosées avec un kit (BCA, Protein Assay Kit, Pierce, USA).

2.4 Traitement des cellules

Avant l'immunobuvardage et l'immunofluorescence les cellules ont été traitées avec différentes concentrations toxiques (50-200 μ g/mL) de peptide amyloïde A β ₂₅₋₃₅ fibrillé (American Peptide, USA) pendant différents temps (45 minutes, 2, 24 ou 48 heures). Environ 24 heures avant les traitements, les cellules ont été privées de leurs éléments nutritifs.

2.5 Fibrillation de l'amyloïde A β ₂₅₋₃₅

Nous avons utilisé 1 mL d'eau distillée stérile pour resuspendre l'A β ₂₅₋₃₅ à une concentration de 1 mg/mL. La suspension a été incubée à 37°C durant 48 heures et les aliquots à 200 μ L ont été gardés à -20°C pour l'utilisation. Dans le laboratoire, l'état de fibrillation a été vérifié par microscopie électronique et spectrométrie à fluorescence (Longpre et al, 2006). La toxicité de l'A β présent dans nos cellules, a été analysée par le test de toxicité cellulaire LDH (Cytotoxicity Detection Kit ; Roche, USA). LDH est un test colorimétrique (lecture au spectrophotomètre) capable de quantifier la mort et la lyse cellulaire, en se basant sur la mesure de l'activité du lactate déhydrogenase libérée par le cytosol des cellules endommagées dans le surnageant. Le protocole que nous avons suivi a été fourni par le fabricant.

3. Immunobuvardage

Après le dosage des protéines, provenant soit de tissus humains homogénéisés, soit de cellules lysées, nous avons préparé les échantillons pour l'immunobuvardage. Afin d'identifier les protéines selon leur poids moléculaire, nous avons utilisé la détection par électrophorèse. L'électrophorèse est la migration de protéines chargées grâce à un champ électrique. Cette migration a été réalisée à travers un gel de polyacrylamide en présence du dodécylsulfate de sodium (SDS). On parle alors de SDS-PAGE : *SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* (voir APPENDICE).

Les protéines (20 µg/µL par puits) ont été séparées par électrophorèse (120 volts, 1 heure et demie) grâce à un gel à gradient (4-10% ou 4-8% ; voir APPENDICE) sous des conditions dénaturantes et puis transférées (0.3 ampères, 2 heures) sur une membrane PVDF (*Polyvinylidene difluoride*, Bio-Rad Laboratoires, USA). Comme certaines protéines ont un poids moléculaire qui se situe entre 100 et 300 kDa, nous avons utilisé un gel à 8% afin de mieux les séparer et de les mettre en évidence ; d'autres protéines, au contraire, ont un poids moléculaire qui se situe entre 30 et 80 kDa et nous avons alors utilisé un gel à 10 %. Après transfert, les membranes ont été incubées une nuit à 4°C avec des anticorps de lapin polyclonaux dirigés contre les récepteurs ET_A ou ET_B (d. 1 :200 ; Sigma, USA) ou avec des anticorps de lapin polyclonaux dirigés contre l'enzyme ECE anti-hECE (735-750) (d. 1 :250 ; Zymed, USA). L'anticorps secondaire anti-lapin IgG conjugué à une peroxydase (d. 1 :2000 ; 1 :3000 ; Sigma, USA) a été utilisé pour reconnaître les anticorps primaires pour les récepteurs ET_A et ET_B, pour ECE.

Sur les échantillons que nous avons étudiés, nous avons détecté la β-actine (d. 1 :500 ; Sigma, USA) et après l'anticorps secondaire anti-souris conjugué à une peroxydase (d. 1 :10 000 ; Sigma, USA ; voir APPENDICE). La β-actine est utilisée afin de normaliser les résultats obtenus. En effet, la quantité de β-actine ne varie pas d'une cellule à l'autre. En la dosant, nous vérifions ainsi la quantité de protéines déposées sur le gel.

Les bandes représentant les protéines ont été visualisées par un système de détection à chémioluminescence (ECL ; voir APPENDICE) et détectées par une

analyse d'images lumineuses. La densité optique (D.O.) des bandes des récepteurs de l'ET et d'ECE, a été quantifiée par une analyse d'immunobuvardage (Multi-Analyst, Bio-Rad Laboratoires, USA).

4. L'immunofluorescence

Les cellules ont été placées sur des lamelles stériles (Fisher, USA) de 12mm de diamètre, puis ont été traitées avec des concentrations toxiques (50-200µg/mL) d'Aβ₂₅₋₃₅ fibrillé (American peptide, USA) à différents temps (45 minutes, 2, 24 ou 48 heures). Les cellules ont été fixées dans du méthanol 100% à -20°C durant 15 minutes. Les anticorps primaires (ET_A et ET_B; d. 1 :100 ; Sigma, USA) et l'anticorps secondaire (AlexaFluor 568 ; d. 1 :100 ; Molecular Probes, USA) ont été ajoutés dans le tampon GDB 1X (voir APPENDICE). L'anticorps primaire a été laissé une nuit à 4°C ; le lendemain, les cellules ont été lavées trois fois avec le tampon de lavage (NaCl 500mM, Na₂HPO₄ 20mM ; voir APPENDICE). Ensuite, nous avons ajouté l'anticorps secondaire durant 1 heure, à la température de la pièce et à l'abri de la lumière. Après un lavage avec le même tampon, les cellules ont été incubées avec le DAPI 1 µg/mL (Biomol, USA) durant 15 minutes à l'abri de la lumière. Après un dernier lavage, de trois fois 10 minutes avec le même tampon, les lamelles ont été laissées dans le PBS 1X puis montées à l'inverse directement sur une lame. Les cellules étaient visualisées au microscope avec un filtre spécifique pour la fluorescéine (DAPI ; noyau) et un filtre spécifique pour la rhodamine (AlexaFluor 568 ; récepteurs ET_A et ET_B; voir APPENDICE). Les images à fluorescence ont été acquises avec un microscope à fluorescence (Nikon, Japan, Magnitude 40X, camera Sensicam).

5. Homogénéisation des tissus provenant des cerveaux de souris déficientes pour la sous-unité p50 du NF-kB

Les souris p50 (-/-) et les souris sauvages (Jackson, USA), toutes âgées de six à huit semaines, ont été décapitées. Les structures cérébrales comme le cortex frontal (CF), l'hippocampe (H), le striatum (ST), le cortex temporal (CT) et le cervelet (CB) ont été prélevées, pesées et posées dans un potter teflon-vitre pour être homogénéisées avec un tampon froid de PBS 1X. L'homogénat a été placé dans des tubes pour être

centrifugé à 1000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant obtenu, a été utilisé pour le dosage des protéines et pour l'immunobuvardage.

6. Dosage de l'ET par le test ELISA

Le test ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) est un test immunologique destiné à détecter et/ou doser une protéine dans un tissu ou un homogénat. Dans la technique de dosage utilisée, les puits d'une microplaque ont été tapissés avec un antigène, dans notre cas l'ET-1, par interaction électrostatique. L'anticorps de capture assure la spécificité du test et il est dirigé contre l'antigène. Une quantité fixe d'anticorps a été incubée avec des quantités croissantes d'antigène et ce mélange a été déposé dans les puits. Ainsi, il y aura une compétition entre l'antigène en solution et celui au fond des puits pour la liaison avec l'anticorps. Un deuxième anticorps, l'anticorps traceur, capable de se lier à l'anticorps de capture était alors ajouté dans le puits et les anticorps traceurs non fixés ont été éliminés par rinçage. L'anticorps traceur est couplé à une enzyme catalysant la formation d'un produit coloré. La réaction peut ainsi être quantifiée par colorimétrie. On obtient donc une courbe d'étalonnage où les plus faibles quantités d'antigène en solution sont caractérisées par les plus fortes réactions colorimétriques. Ensuite, on peut répéter avec une solution contenant une quantité inconnue d'antigène et déterminer sa concentration grâce à notre courbe d'étalonnage.

L'anticorps de capture utilisé était l'anticorps dirigé contre l'ET-1 (d. 1 : 2500 ; Sigma, USA), l'anticorps traceur était couplé à une peroxydase (d. 1 : 4000 ; Sigma, USA) et la courbe d'étalonnage a été préparée selon les dilutions décrites si dessous (Tableau 5).

TUBE	[ET- 1]	Vol ET-1 (µL)	Vol PBS 1X
1	0	5 µL de 100 ng/mL	1000 µL
2	0,5 ng/mL	10 µL de 100 ng/mL	995 µL
3	1 ng/mL	50 µL de 100 ng/mL	990 µL
4	5 ng/mL	100 µL de 100 ng/mL	950 µL
5	10 ng/mL	500 µL de 100 ng/mL	900 µL
6	50 ng/mL	1000 µL de 100 ng/mL	500 µL
7	100 ng/mL	100 µL de 1 µg/mL	900 µL
8	500 ng/mL	500 µL de 1 µg/mL	500 µL
9	1000 ng/mL	1000 µL de 1 µg/mL	0

Tableau 5 : Courbe d'étalonnage de l'ET-1

La réaction colorimétrique a donné un produit orange soluble, due à la présence d'un substrat chromatique le dichlorure d'*o*-phénylènediamine (OPD, Sigma, USA). La réaction OPD a été arrêtée en ajoutant une solution de H₂SO₄ 3M ; la plaque a été lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 492 nm.

Dans ce type de test, la courbe d'étalonnage représente une équation de type : $y = - ax + b$; elle doit avoir un R carré (R²) le plus proche possible de l'unité. Pour cette raison la courbe d'étalonnage a été réalisée plusieurs fois afin d'avoir celle qui correspondait le plus possible à la meilleure des courbes standard, pour ensuite doser l'ET dans nos échantillons.

7. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel Systat (Systat Software Inc., USA) et un seuil de significativité $\alpha = 0,05$. Les comparaisons entre les groupes témoins et MA ont été effectuées avec le test *t* de Student et les comparaisons entre les différents génotypes ou allèle d'apo E ont été effectuées avec les test *t* de Dunnett.

RÉSULTATS

1. Expression de l'enzyme ECE dans les tissus humains MA

Lors du projet de recherche, nous avons vérifié l'expression de l'enzyme ECE dans les tissus humains des malades atteints de la MA. Dans la Figure 17A et 17B, nous pouvons remarquer une faible expression de l'ECE dans les cellules endothéliales d'aorte de porc (C+) et un signal plus fort pour l'enzyme purifiée (ECE). On constate une variété interindividuelle pour les deux structures cérébrales entre les sujets témoins (Figure 17A et 17B) ainsi que chez les individus atteints de la MA. Les sujets atteints de la MA sont séparés en MA 3/3 avec deux allèles $\epsilon 3$, MA 3/4 avec un allèle $\epsilon 3$ et un $\epsilon 4$ et enfin MA 4/4 avec deux allèles $\epsilon 4$. Le signal de toutes les bandes provenant des immunobuvardages a été normalisé à l'aide de la β -actine. L'expression de la β -actine ne varie pas de façon significative entre les individus. La quantité en protéines peut donc être considérée identique dans tous les puits, la différence d'expression que nous remarquons est due à une réelle variation d'expression de la protéine d'intérêt.

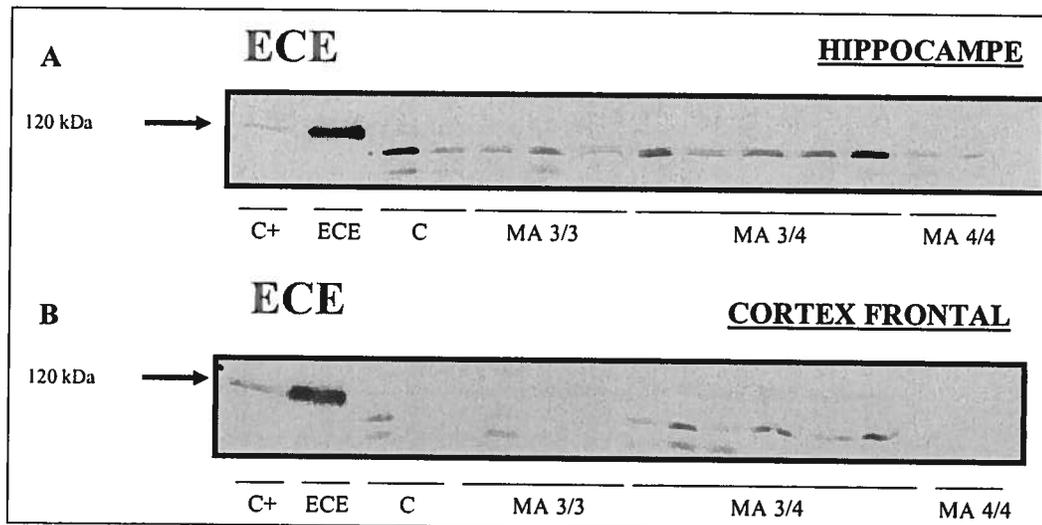


Figure 17 : Immunobuvardage de l'ECE dans les tissus humains (cortex frontal et hippocampe) **C+** : cellules endothéliales d'aorte de porc, contrôle positif ; **ECE** : enzyme purifié ; **C** : sujets témoins ; **MA** : sujets malades partagés selon les génotypes d'apoE

L'expression de l'ECE chez certains sujets MA 3/3 est plus faible par rapport à certains sujets témoins et chez certains sujets appartenant au groupe MA 3/4,

l'expression d'ECE est très variable par rapport aux témoins (Figure 17A). En effet, il y a une variabilité interindividuelle entre les patients appartenant au même groupe, chez le groupe témoin et le groupe MA. En revanche, on remarque l'expression d'ECE la plus faible chez le groupe MA 4/4 par rapport aux autres groupes.

Nous pouvons observer (Figure 17B) que le groupe MA 3/4 est le groupe avec les patients qui expriment le plus l'enzyme ECE par rapport à celui des témoins. Dans le groupe MA 3/3, on remarque une expression de l'ECE plus faible. De plus, nous remarquons une variabilité interindividuelle chez les différents groupes dans le cortex frontal. Mais, c'est surtout chez le groupe MA 4/4 que nous devons concentrer encore une fois notre attention. Dans ce cas aussi, l'expression de l'enzyme ECE semble presque inexistante.

En résumé, nous pouvons souligner que chez les sujets MA 4/4, que ce soit dans l'hippocampe (Figure 17A) ou dans le cortex frontal (Figure 17B), l'enzyme présente la plus faible expression observée. On peut donc en déduire que l'enzyme semble avoir une diminution d'activité, en particulier dans les tissus MA 4/4 avec le taux plus élevé d'A β .

2. Expression des récepteurs ET_A et ET_B dans les tissus humains MA

Après avoir observé l'activité d'ECE, notre intérêt s'est porté sur l'expression des récepteurs ET_A et ET_B dans les tissus humains des malades atteints de la MA. Une variation d'ET_A et/ou d'ET_B peut être justifiée pour compenser le manque d'ET, due à la faible activité d'ECE.

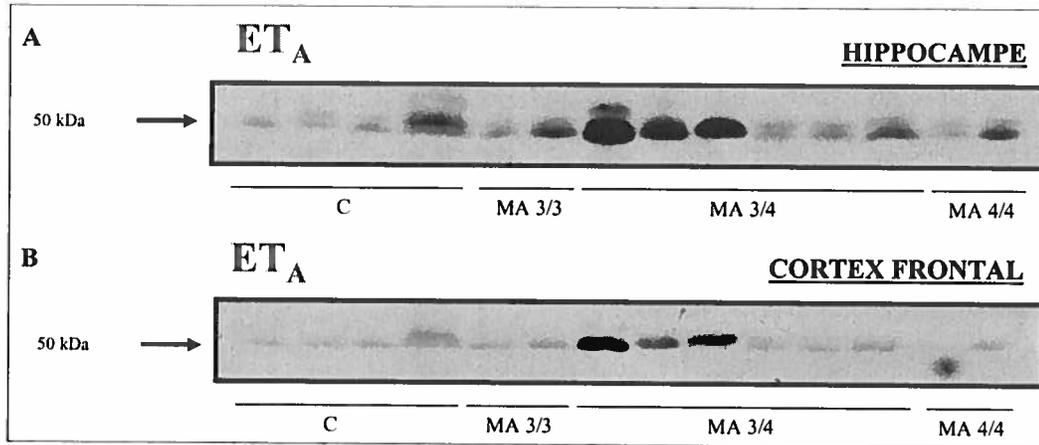


Figure 18 : Immunobuvardage d' ET_A dans les tissus humains (cortex frontal et hippocampe) C : sujets témoins ; MA : sujets malades partagés selon les génotypes d'apoE

On observe l'expression d'ET_A dans l'hippocampe chez les sujets atteints de la MA par rapport aux témoins (Figure 18A). Les sujets atteints de la MA sont toujours présentés de la façon suivante : MA 3/3 avec deux allèles ε3, MA 3/4 avec un allèle ε3 et un ε4, MA 4/4 avec deux allèles ε4. Nous pouvons remarquer que c'est chez le groupe MA 3/4 en particulier que nous avons l'expression la plus forte par rapport aux témoins et aux autres groupes MA. On doit souligner toutefois la présence d'une certaine variabilité entre les individus à l'intérieur du groupe qui reflète une variabilité d'expression du récepteur ET_A.

Les échantillons montrés dans la Figure 18B, étaient partagés entre groupe témoin et groupe MA, provenant tous du cortex frontal. Dans cette figure, nous remarquons toujours que l'expression majeure du récepteur ET_A se trouve dans le groupe MA 3/4.

Dans la Figure 19A nous remarquons l'expression d'ET_B dans l'hippocampe chez les sujets atteints de la MA par rapport aux témoins. Dans ce cas ce sont les groupes MA 3/4 et MA 4/4 qui montrent une expression plus prononcée du récepteur. Nous observons toujours la variabilité interindividuelle à l'intérieur de chaque groupe aussi bien chez les patients contrôles que chez les patients atteints de la MA.

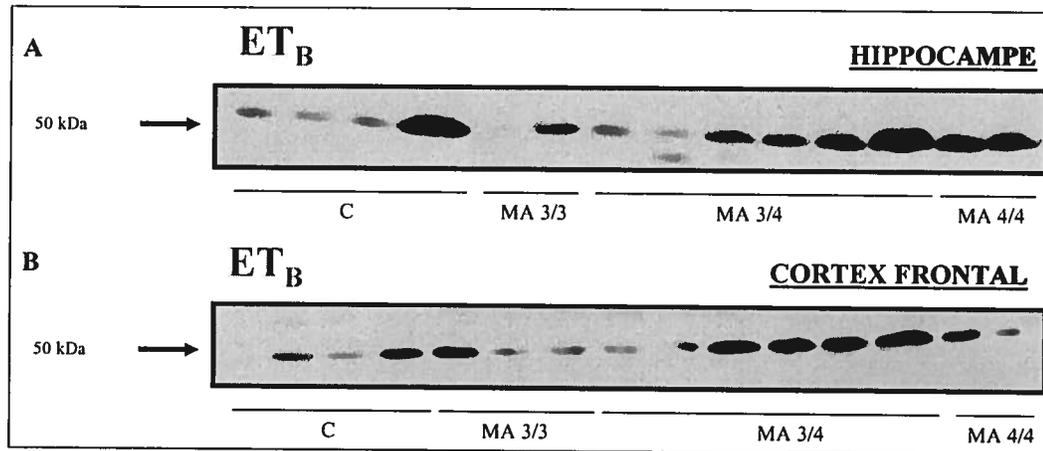


Figure 19 : Immunobuvardage d'ET_B dans les tissus humains (cortex frontal et hippocampe) C : sujets témoins ; MA : sujets malades partagés selon les génotypes d'apoE

Enfin, la Figure 19B nous présente l'expression d'ET_B, dans le cortex frontal. Le groupe MA 3/4 et MA 4/4 montrent, dans ce cas aussi, une forte expression correspondante à la présence du récepteur ET_B. Nous remarquons aussi dans le cortex frontal une variabilité interindividuelle chez les différents patients à l'intérieur du même groupe.

En résumé, nous pouvons affirmer que le récepteur ET_A semble être plus exprimé chez le groupe MA 3/4 que chez les témoins. En revanche, le récepteur ET_B est plus exprimé chez les groupes MA 3/4 et MA 4/4. Le signal de toutes les bandes provenant des immunobuvardages a été normalisé à l'aide de la β -actine. Comme l'expression de la β -actine ne varie pas de façon significative entre les individus, la différence d'expression que nous remarquons est due à une réelle variation d'expression de la protéine d'intérêt.

Les graphiques présentés à partir des immunobuvardages tiennent compte de la moyenne des densités optiques (D.O.) des bandes ET_A et des bandes ET_B, correspondant à chaque patient (Figures de 20 à 23).

La Figure 20A nous montre l'expression d'ET_A dans l'hippocampe humain dans le groupe contrôle et le groupe MA. En observant ce graphique, nous pouvons remarquer que l'expression du récepteur ET_A chez la plupart des patients appartenant au groupe contrôle montre une expression faible et inférieure de la moyenne (0,18).

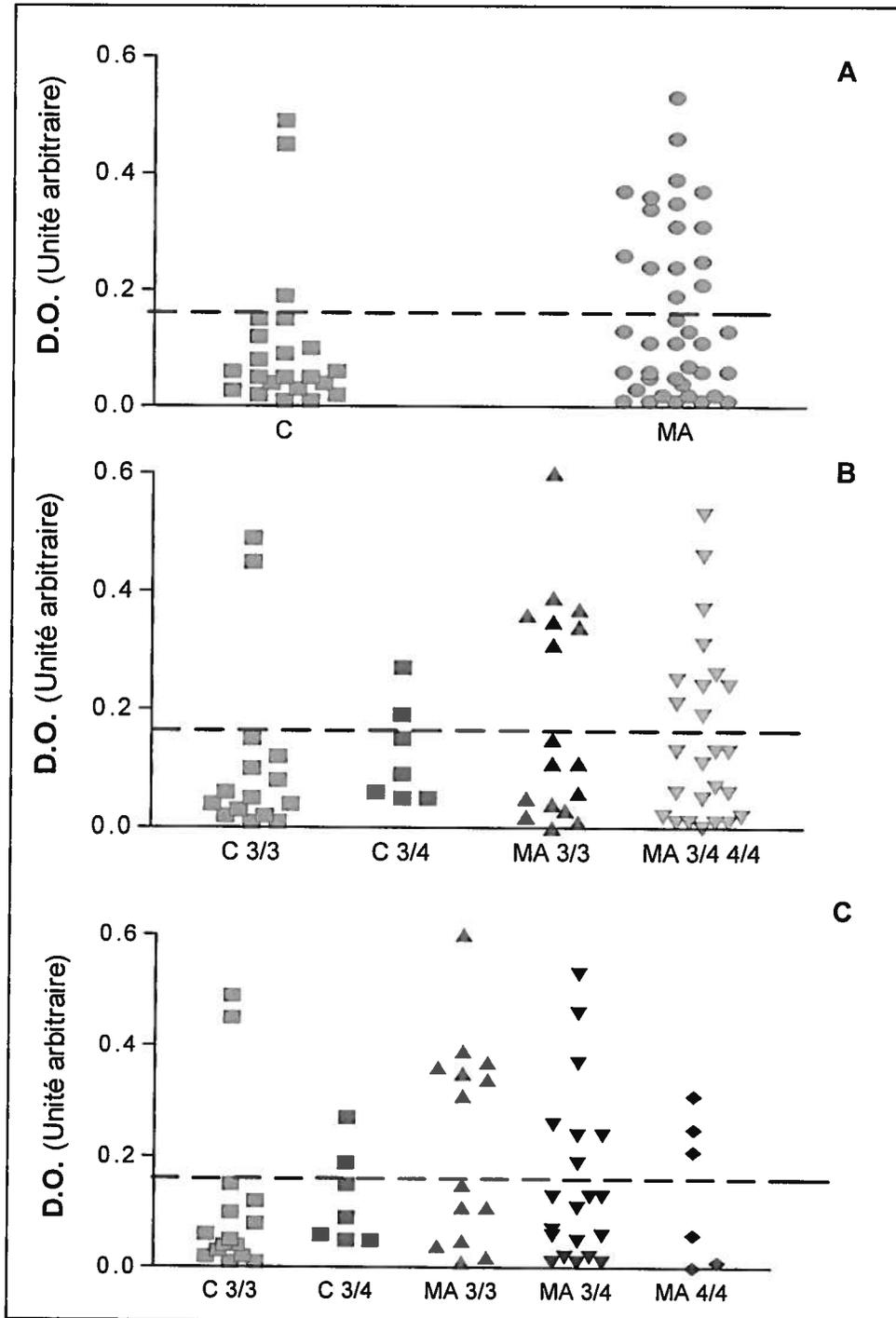


Figure 20 : A) Expression du récepteur ET_A dans l'hippocampe humain des patients contrôles (C) par rapport aux patients atteints de la MA. B) Expression du récepteur ET_A dans l'hippocampe humain des patients contrôles (C) par rapport aux patients atteints de la MA, pour voir un effet de l'allèle ϵ_4 . C) Expression du récepteur ET_A dans l'hippocampe humain des patients contrôles (C) par rapport aux patients atteints de la MA, pour voir un effet du génotype apoE. D.O. : densité optique ; C 3/3 : sujets témoins avec 2 allèles ϵ_3 ; C 3/4 : sujets témoins avec 1 allèle ϵ_3 et 1 allèle ϵ_4 ; MA 3/3 : sujets malades avec 2 allèles ϵ_3 ; MA 3/4 : sujets malades avec 1 allèle ϵ_3 et 1 allèle ϵ_4 ; MA 4/4 : sujets malades avec 2 allèles ϵ_4 ; (---) : la moyenne des D.O. des sujets témoins (0,18)

Dans le groupe témoin la distribution des patients est plus homogène, mais on note deux patients ayant une expression du récepteur très élevée, supérieure à 0,4. En revanche, l'expression du récepteur ET_A chez les patients appartenant au groupe MA est différente. L'expression du récepteur chez ces patients est distribuée d'une manière plus hétérogène autour de la moyenne. On remarque des patients montrant une expression du récepteur similaire aux patients du groupe contrôle et des patients qui expriment plus fortement le récepteur ($> 0,18$).

Nous observons ainsi l'effet de l'allèle $\epsilon 4$ sur l'expression d' ET_A dans l'hippocampe (Figure 20B). Le groupe contrôle est partagé en deux sous-groupes, C 3/3 et C 3/4, en présence ou en absence de l'allèle $\epsilon 4$. Dans le groupe C 3/3 la plupart des patients présentent une expression du récepteur ET_A faible et inférieure à la moyenne ; on trouve deux patients seulement qui présentent une expression très élevée. Dans le groupe C 3/4, même si le nombre total de patients est inférieur au groupe C 3/3, on peut remarquer une distribution différente. On observe une expression d' ET_A ayant une distribution plus hétérogène à l'intérieur du groupe. Dans le groupe MA 3/3 on remarque trois sous-groupes importants : dans le premier, on trouve les patients avec une expression du récepteur ET_A faible et inférieure à la moyenne et leur distribution est similaire à celle du groupe C 3/3 ; dans le deuxième, on trouve six patients qui expriment plus fortement le récepteur ; dans le troisième, on a un patient seulement qui montre une expression très élevée du récepteur ET_A (0,6). Enfin, dans le groupe MA 3/4 4/4 avec au moins un allèle $\epsilon 4$, la distribution de l'expression du récepteur ET_A est plus hétérogène. À l'intérieur du groupe on observe une distribution des patients ayant soit une très faible expression (autour de zéro) ainsi que des patients possédant une très forte expression du récepteur (0,6).

Nous nous sommes intéressés à l'étude de l'effet du génotype de l'apoE sur l'expression d' ET_A dans l'hippocampe (Figure 20C). La distribution des patients dans le groupe C 3/3 et C 3/4 est la même que celle observée dans la Figure 20B. Dans le groupe MA 3/3 on remarque toujours deux groupes qui sont l'un en-dessous et l'autre au-dessus de la moyenne, et un patient seulement avec une forte expression du récepteur ET_A (0,6).

Le groupe MA 3/4 4/4 montre une distribution plus hétérogène, comme dans la Figure 20B. Enfin, dans le groupe MA 4/4, qui est le groupe plus restreint en nombre de patients, on note qu'il est scindé en deux sous-groupes équivalents. En effet, nous avons trois patients avec une expression du récepteur ET_A très faible (autour de zéro) et trois autres avec une expression au contraire très forte (entre 0,2 et 0,4).

La Figure 21A présente l'expression d' ET_A dans le cortex frontal humain dans le groupe contrôle et le groupe MA. Nous pouvons remarquer que l'expression du récepteur dans les deux groupes se ressemble. On note que dans le groupe contrôle, la majorité des patients est située en-dessous de la moyenne (0,18), mais on voit cinq patients qui expriment le récepteur ET_A de manière plus hétérogène (entre 0,18 et 0,5). Dans le groupe MA, la distribution est plus hétérogène, distribuée autour de la moyenne et deux patients seulement expriment plus fortement le récepteur ($> 0,4$).

Dans la Figure 21B nous observons l'effet de l'allèle $\epsilon 4$ sur l'expression d' ET_A dans le cortex frontal. Il est intéressant de vérifier l'expression du récepteur dans le groupe MA qui est partagé en MA 3/3 et MA 3/4 4/4, selon la présence ou l'absence de l'allèle $\epsilon 4$. Dans le groupe MA 3/3 on remarque deux sous-groupes : les patients appartenant au premier sous-groupe expriment ET_A selon une distribution très similaire à la plupart des patients appartenant au groupe C 3/3. L'expression du récepteur ET_A est très faible et inférieure à la moyenne (0,18) ; le deuxième groupe est formé de quatre patients seulement qui montrent une expression d' ET_A un peu plus importante et ils se trouvent tous au-dessus de la moyenne. Enfin, dans le groupe MA 3/4 4/4, avec au moins un allèle $\epsilon 4$, on remarque une distribution plus hétérogène à l'intérieur du groupe. Certains patients montrent une très faible expression du récepteur (autour de zéro), d'autres patients montrent une plus forte expression du récepteur ET_A (entre 0,4 et 0,6). Cette distribution est similaire à celle trouvée dans l'hippocampe pour le même groupe et le même récepteur (Figure 20B).

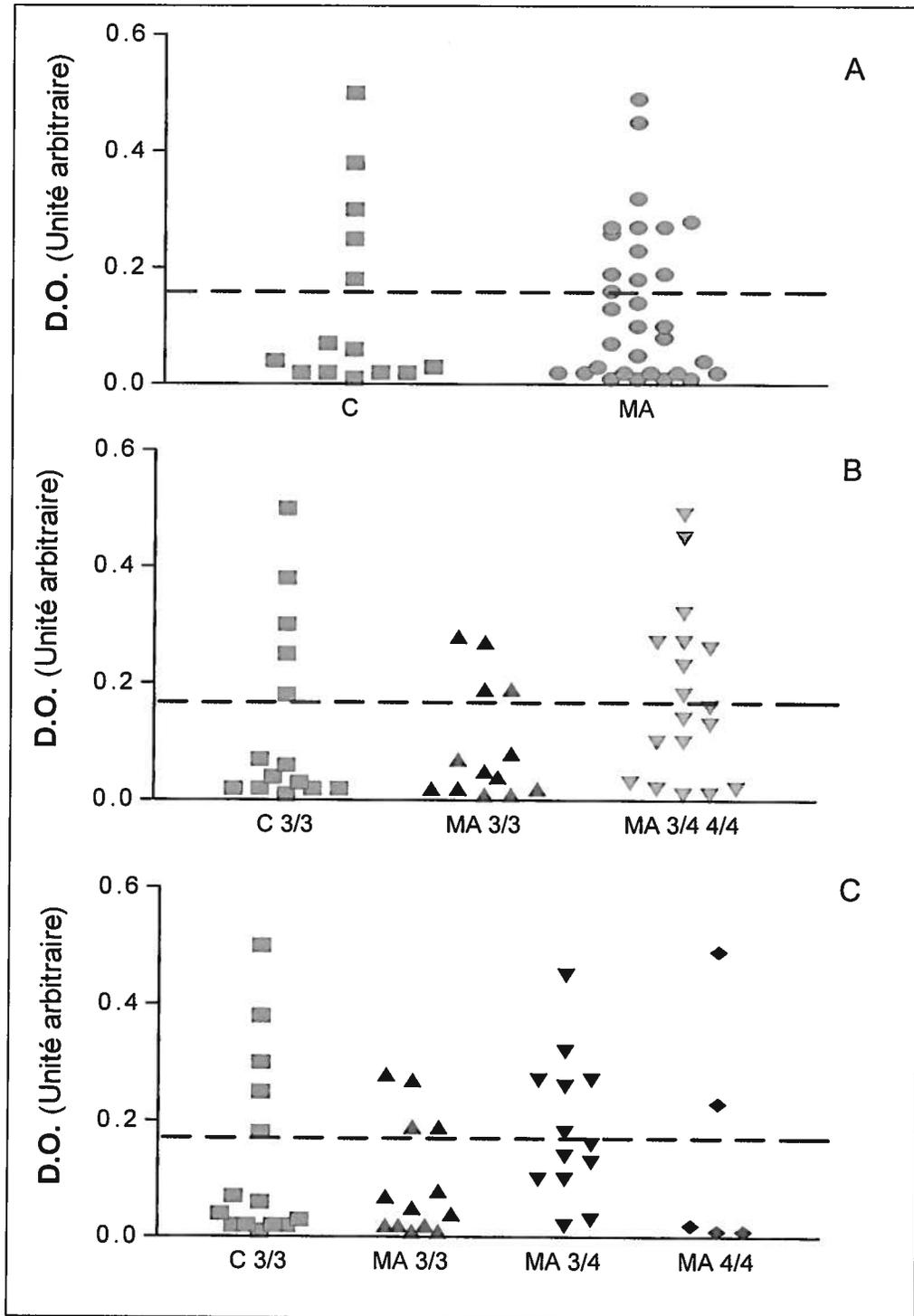


Figure 21 : A) Expression du récepteur ET_A dans le cortex frontal humain des patients contrôles (C) par rapport aux patients atteints de la MA. B) Expression du récepteur ET_A dans le cortex frontal humain des patients contrôles (C) par rapport aux patients atteints de la MA, pour voir un effet de l'allèle ϵ_4 . C) Expression du récepteur ET_A dans le cortex frontal humain des patients contrôles (C) par rapport aux patients atteints de la MA, pour voir un effet du génotype apoE. D.O. : densité optique ; C 3/3 : sujets témoins avec 2 allèles ϵ_3 ; MA 3/3 : sujets malades avec 2 allèles ϵ_3 ; MA 3/4 : sujets malades avec 1 allèle ϵ_3 et 1 allèle ϵ_4 ; MA 4/4 : sujets malades avec 2 allèles ϵ_4 ; (---) : la moyenne des D.O. des sujets témoins (0,18)

L'effet du génotype de l'apoE sur l'expression d'ET_A dans le cortex frontal est montré dans la Figure 21C. La distribution des patients dans le groupe C 3/3 est la même que celle observée dans les figures précédents. Dans le groupe MA 3/3 on remarque toujours deux groupes qui sont en-dessous et au-dessus de la moyenne. Le groupe MA 3/4 présente des patients qui ont une expression différente du récepteur ET_A avec des valeurs en-dessous et au-dessus de la moyenne, en montrant une expression du récepteur de très faible à très forte. En effet, on peut remarquer qu'un patient exprime plus fortement le récepteur ($> 0,4$). Enfin, dans le groupe MA 4/4, qui est le groupe plus restreint en nombre de patients, nous avons trois patients avec une très faible expression d'ET_A (autour de zéro), un avec une expression autour de la moyenne (0,18) et un autre patient avec une très forte expression du récepteur (presque 0,6).

Maintenant on analyse la distribution de l'expression d'ET_B dans l'hippocampe humain (Figure 22A). Nous pouvons remarquer une distribution différente du récepteur, entre les deux groupes ; le groupe témoin peut être partagé en trois sous-groupes : le premier plus homogène où tous les patients présentent une très faible expression du récepteur ET_B ; le deuxième composé de quatre patients ayant une expression un peu plus forte, supérieure à la moyenne (0,23) et le troisième avec un patient qui possède la plus forte expression du récepteur (proche de 0,6) à l'intérieur du groupe. Le groupe MA montre encore une fois une distribution plus hétérogène. Les patients appartenant au groupe MA ont une expression d'ET_B qui va de très faible à très forte, jusqu'à des valeurs très proches de 0,6.

Dans la Figure 22B nous observons l'effet de l'allèle $\epsilon 4$ sur l'expression d'ET_B dans l'hippocampe humain.

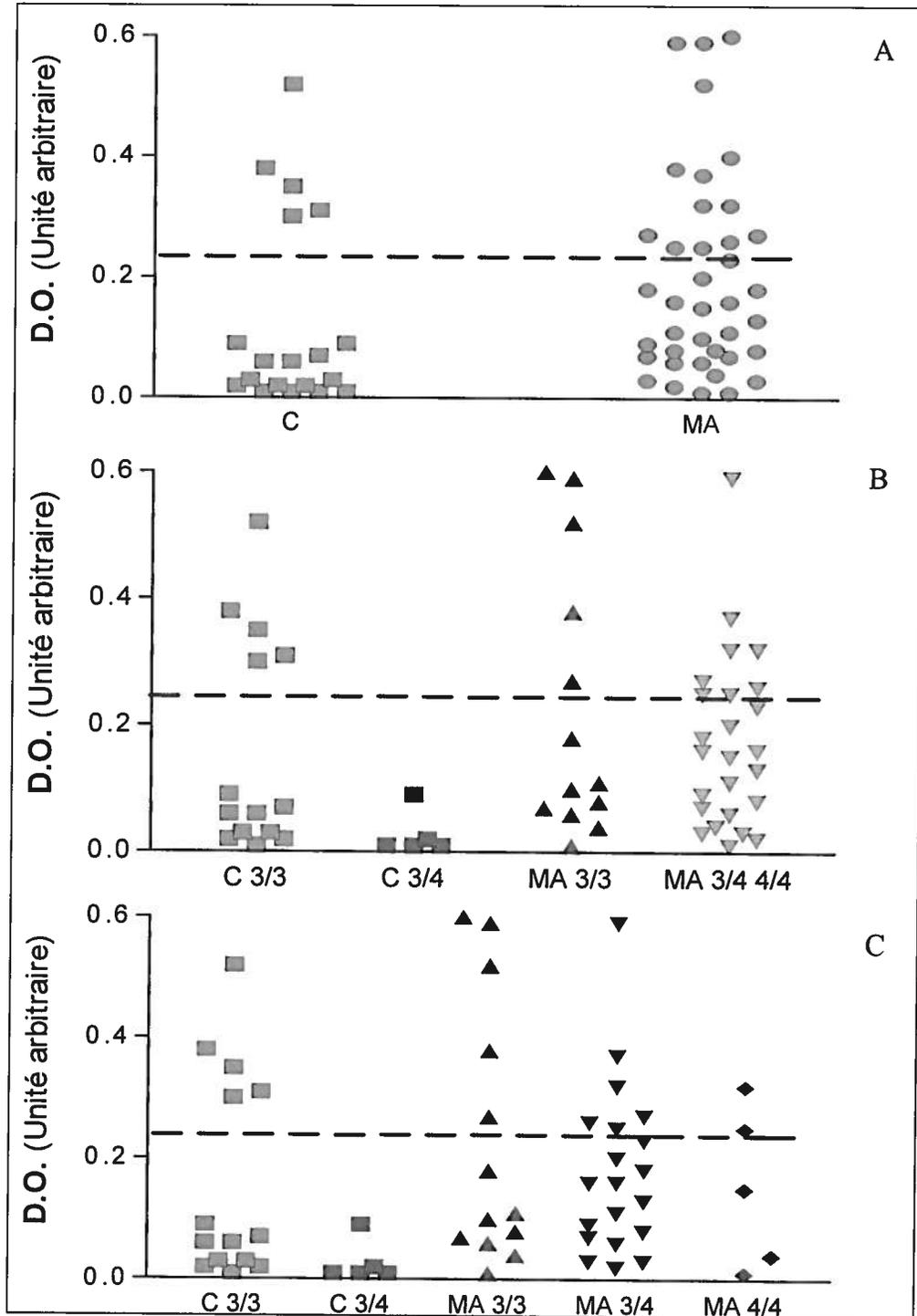


Figure 22 : A) Expression du récepteur ET_B dans l'hippocampe humain des patients contrôles (C) par rapport aux patients atteints de la MA. B) Expression du récepteur ET_B dans l'hippocampe humain des patients contrôles (C) par rapport aux patients atteints de la MA, pour voir un effet de l'allèle ϵ_4 . C) Expression du récepteur ET_B dans l'hippocampe humain des patients contrôles (C) par rapport aux patients atteints de la MA, pour voir un effet du génotype apoE. **D.O.** : densité optique ; **C 3/3** : sujets témoins avec 2 allèles ϵ_3 ; **C 3/4** : sujets témoins avec 1 allèle ϵ_3 et 1 allèle ϵ_4 ; **MA 3/3** : sujets malades avec 2 allèles ϵ_3 ; **MA 3/4** : sujets malades avec 1 allèle ϵ_3 et 1 allèle ϵ_4 ; **MA 4/4** : sujets malades avec 2 allèles ϵ_4 ; (---) : la moyenne des D.O. des sujets témoins (0,23)

Le groupe témoin est séparé en C 3/3 et C 3/4 suite à la présence de l'allèle $\epsilon 4$. Une partie des patients montre une distribution homogène. Tous les patients C 3/4 ayant une expression très faible se trouvent autour de zéro, comme la plupart des patients C 3/3. Il y a quatre patients seulement C 3/3 qui expriment plus fortement le récepteur ET_B et un patient en particulier avec une très forte expression ($> 0,4$). En revanche, dans le groupe MA 3/3 on observe une distribution plus hétérogène. L'expression d' ET_B reflète des valeurs très faibles, mais aussi très fortes (0,6). Le groupe MA 3/4 4/4 avec au moins un allèle $\epsilon 4$, montre lui aussi une distribution plus hétérogène (autour de la moyenne) avec un patient seulement qui exprime plus le récepteur ET_B (0,6).

Nous remarquons l'effet du génotype de l'apoE sur l'expression d' ET_B dans l'hippocampe (Figure 22C). La distribution des patients dans le groupe C 3/3, C 3/4 et MA 3/3 est la même que celle observée dans la Figure 22B. Le groupe MA 3/4 a une distribution plus hétérogène, avec un seul patient ayant une expression d' ET_B très élevée. Enfin, dans le groupe MA 4/4, qui est le groupe plus restreint en nombre de patients, on remarque trois patients avec une très faible expression du récepteur et deux patients exprimant de manière plus intense ET_B ($> 0,23$).

La distribution de l'expression d' ET_B dans le cortex frontal humain est montrée dans la Figure 23A. La distribution entre les deux groupes contrôle et MA se ressemble. On peut observer trois sous-groupes : le premier est formé de patients avec une expression d' ET_B faible et très inférieure à la moyenne (0,23) ; dans le deuxième on trouve deux patients seulement en-dessous de la moyenne et les autres au-dessus ; pour le troisième groupe on remarque un patient contrôle avec une forte expression d' ET_B et en parallèle un groupe de sept patients atteints de la MA qui ont une expression plus importante du récepteur ET_B .

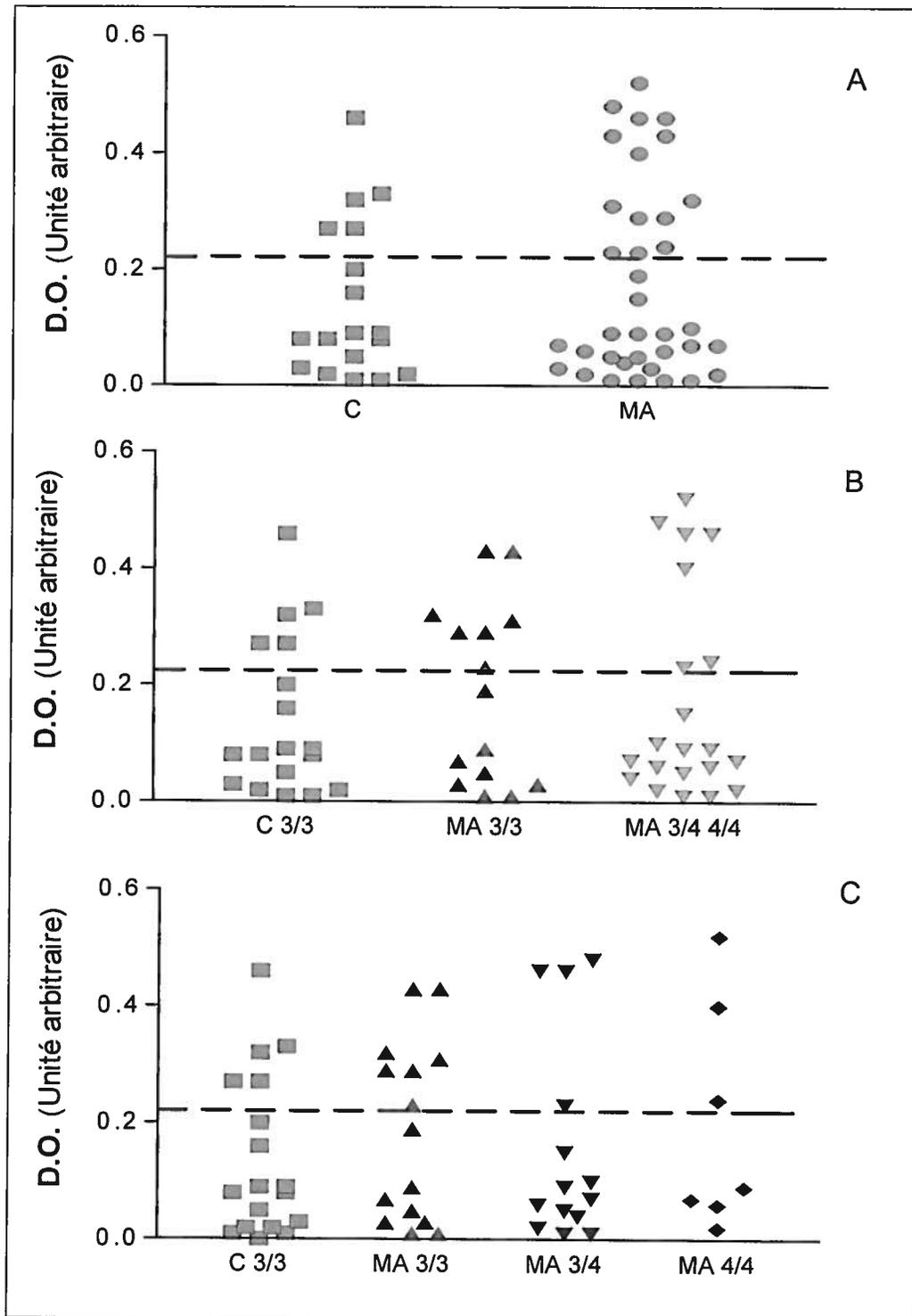


Figure 23 : A) Expression du récepteur ET_B dans le cortex frontal humain des patients contrôles (C) par rapport aux patients atteints de la MA. B) Expression du récepteur ET_B dans le cortex frontal humain des patients contrôles (C) par rapport aux patients atteints de la MA, pour voir un effet de l'allèle ϵ_4 . C) Expression du récepteur ET_B dans le cortex frontal humain des patients contrôles (C) par rapport aux patients atteints de la MA, pour voir un effet du génotype apoE. D.O. : densité optique ; C 3/3 : sujets témoins avec 2 allèles ϵ_3 ; MA 3/3 : sujets malades avec 2 allèles ϵ_3 ; MA 3/4 : sujets malades avec 1 allèle ϵ_3 et 1 allèle ϵ_4 ; MA 4/4 : sujets malades avec 2 allèles ϵ_4 ; (---) : la moyenne des D.O. des sujets témoins (0,23)

Nous avons observé l'effet de l'allèle $\epsilon 4$ sur l'expression d' ET_B dans le cortex frontal (Figure 23B). L'expression d' ET_B chez les patients C 3/3 est la même que celle retrouvée dans la figure précédente (Figure 23A). Le groupe MA 3/3 montre des patients ayant une faible expression d' ET_B (autour de zéro), ainsi d'autres exprimant plus fortement le récepteur. On peut partager le groupe MA 3/4 4/4 avec au moins un allèle $\epsilon 4$, en trois sous-groupes : un groupe est formé de patients avec une faible expression d' ET_B ; le deuxième est composé de deux patients qui se trouvent sur la moyenne (0,23) et enfin, le troisième avec cinq patients qui présentent l'expression plus élevée du récepteur par rapport aux autres patients du même groupe (presque de 0,6).

La Figure 23C présente l'effet du génotype de l'apoE sur l'expression d' ET_B dans le cortex frontal. L'expression d' ET_B chez les patients appartenant au groupe C 3/3, C 3/4 et MA 3/3 a la même distribution par rapport à celle observée dans les figures précédentes (Figure 23A et 23B). Certains patients appartenant au groupe MA 3/4 4/4 présentent une expression très faible du récepteur ; un patient se trouve sur la moyenne (0,23) et trois autres montrent une forte expression d' ET_B ($> 0,4$). Enfin, c'est le groupe MA 4/4, qui est le groupe plus restreint en nombre de patients, qui est composé d'un sous-groupe de patients ayant une faible expression d' ET_B ; un patient qui se trouve toujours sur la moyenne (0,23), un autre à 0,4 et le dernier patient avec la plus haute expression du récepteur (presque 0,6) par rapport aux patients appartenant au même groupe.

Nous pouvons ainsi conclure que le niveau des récepteurs dans l'hippocampe est plus élevé chez certains patients MA 3/3 et MA 3/4 par rapport aux sujets témoins. En considérant les graphiques du cortex frontal pour ET_A et ET_B et en considérant au même temps le génotype d'apoE, nous pouvons noter que l'expression des récepteurs n'est pas significativement différente entre le groupe contrôle et le groupe MA.

3. Mise en évidence des récepteurs ET_A et ET_B dans deux lignées cellulaires

Après avoir observé l'expression des deux récepteurs de l'ET dans les tissus humains MA, nous avons voulu vérifier leur présence dans deux lignées cellulaires, les cellules CHO et les cellules N2a, au moyen de la technique de l'immunobuvardage.

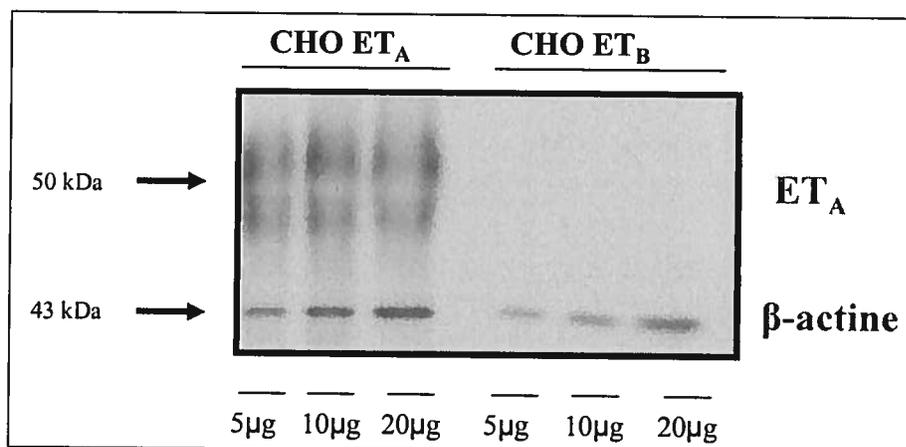


Figure 24 : Immunobuvardage des récepteurs ET_A et ET_B et la β -actine dans les cellules CHO transfectées avec les récepteurs de l'ET

L'immunobuvardage de deux groupes de cellules CHO transfectées de façon stable avec ET_A ou ET_B (Figure 24) nous confirme soit la présence du récepteur ET_A dans les cellules CHO qui expriment ET_A soit la spécificité de l'anticorps primaire vers le récepteur même. Comme le signal dû à la présence du récepteur ET_A était très intense, nous pouvons remarquer une bande très diffuse. Sur notre film, nous montrons aussi la β -actine comme standard interne. Chez les deux groupes, nous pouvons remarquer que l'intensité des bandes est proportionnelle à la quantité des protéines déposée sur le gel (5 μ g le moins foncée, 20 μ g le plus foncée).

Les deux récepteurs de l'ET sont aussi exprimés au niveau des cellules N2a (Figure 25A). Ce résultat met en évidence pour la première fois la présence des récepteurs de l'ET dans cette lignée cellulaire. Par rapport à l'expression d'ET_A, l'intensité des bandes semble être proportionnelle avec la quantité des protéines qu'on avait déposées dans nos échantillons (5 μ g la moins foncée, 20 μ g la plus foncée). Au contraire pour ET_B, la différence entre les différentes bandes est moins évidente. La β -actine a été utilisée afin de normaliser les résultats obtenus.

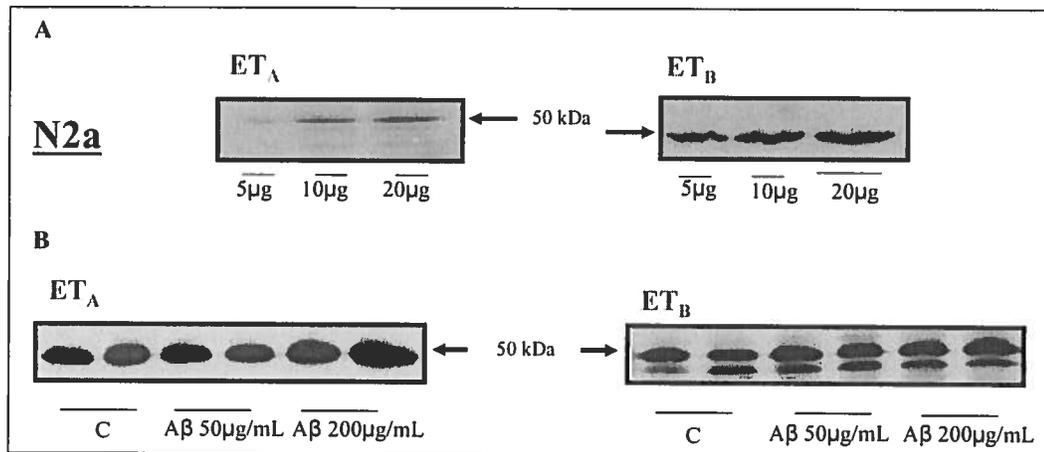


Figure 25 : Immunobuvardage des récepteurs ET_A et ET_B dans les N2a

Grâce aux analyses faites préalablement, nous avons démontré que les cellules N2a, purement d'origine nerveuse, exprimaient naturellement les deux récepteurs de l'ET. Les récepteurs ET_A et ET_B sont donc non seulement exprimés dans les cellules vasculaires, mais aussi chez les cellules non-vasculaires. À ce point de la recherche, il était intéressant comprendre pour quelle raison les deux récepteur de l'ET semblent être surexprimés dans les tissus MA. Afin d'observer la réaction des cellules en présence du peptide Aβ, on a vérifié par immunobuvardage l'expression des récepteurs chez les cellules traitées avec l'Aβ₂₅₋₃₅ en comparaison avec des cellules non traitées. La figure 25B nous montre que le peptide Aβ₂₅₋₃₅, à la plus grande concentration de 200 μg/mL, semble induire une surexpression des deux récepteurs ET_A et ET_B chez les cellules N2a après 24 heures de traitement. Dans l'immunobuvardage représentant l'expression d'ET_B, nous remarquons deux bandes. La bande inférieure à 34 kDa est un produit de protéolyse dû à l'activité d'une métalloprotéinase à partir de la protéine à 50 kDa (Kozuka et al, 1991).

Nous avons choisi le peptide Aβ₂₅₋₃₅ car il présente les mêmes caractéristiques de toxicité que les peptides Aβ₁₋₄₀ et Aβ₁₋₄₂, naturellement présents chez les humains. Les concentrations ont été choisies pour avoir des doses toxiques pour des cellules plus résistantes comme les N2a qui sont des cellules tumorales.

4. Localisation des récepteurs ET_A et ET_B dans deux lignée cellulaires

Nous avons voulu vérifier la localisation des deux récepteurs de l'ET dans les cellules CHO et N2a par immunofluorescence.

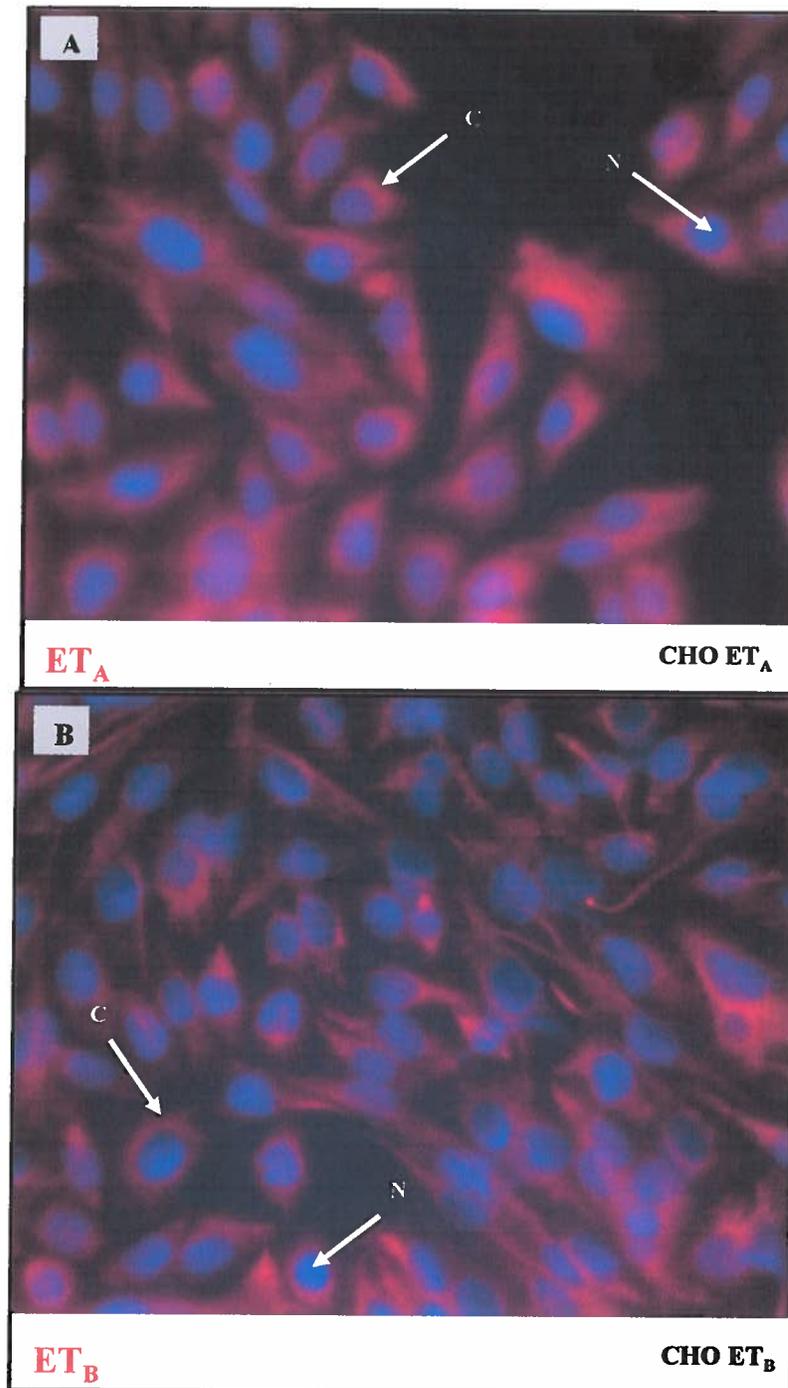


Figure 26 : Images en immunofluorescence (magnitude 40X) des cellules CHO transfectées avec les récepteurs de l'ET. C : cytoplasme, récepteurs ET_A et ET_B /Alexa Fluor 568 (signal rouge) ; N : noyau, DAPI staining (signal bleu)

Dans la figure 26, nous remarquons un fort signal de couleur rouge pour ET_A (Figure 26A) et ET_B (Figure 26B) généralement localisé dans le cytoplasme et sur la surface de la membrane cellulaire. Les cellules CHO sont transfectées de façon stable avec ET_A et ET_B , c'est pour cette raison que nous observons au niveau du cytoplasme un signal intense, très similaire entre les deux récepteurs.

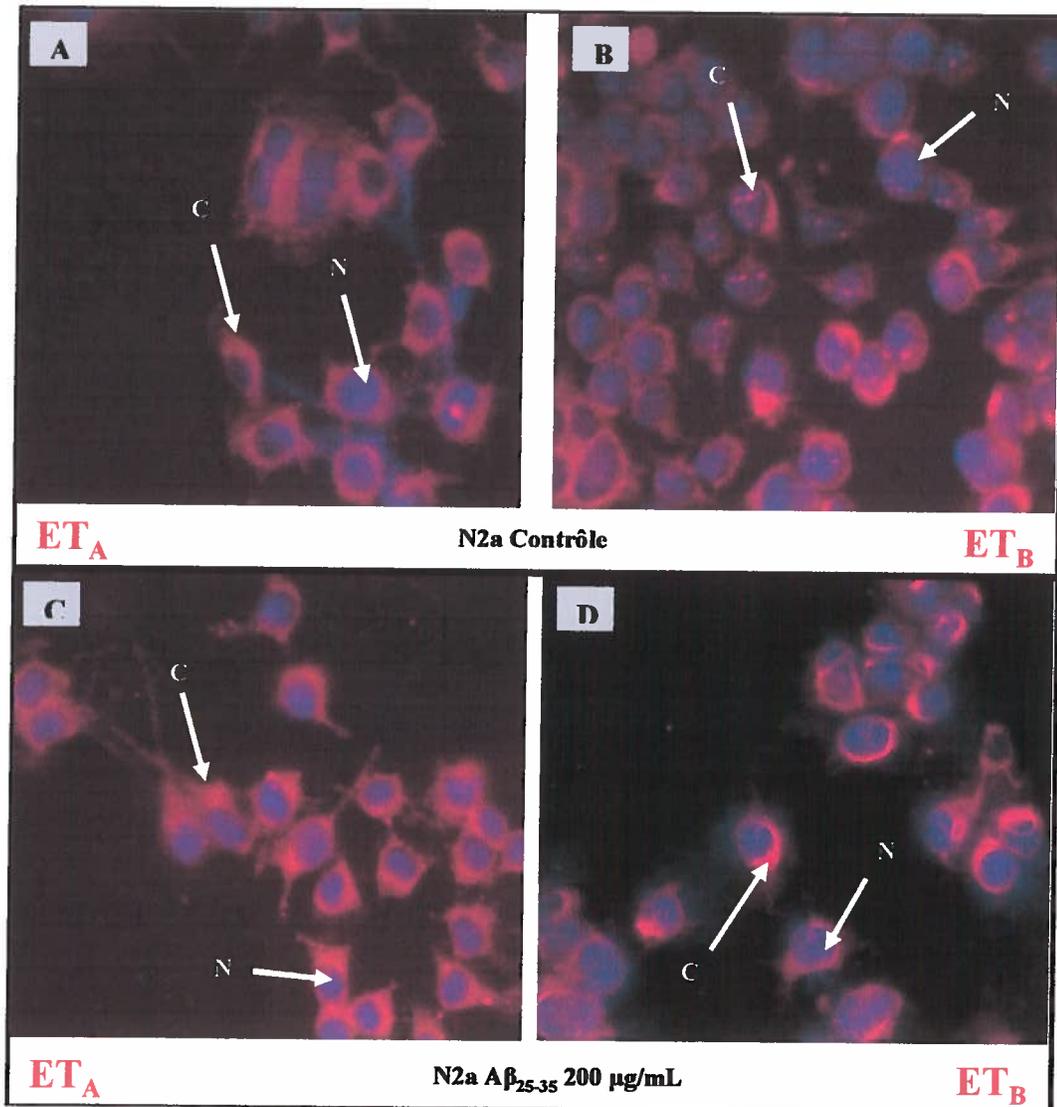


Figure 27 : Images en immunofluorescence (magnitude 40X) des cellules N2a traitées avec l' $A\beta_{25-35}$.
C : cytoplasme, récepteurs ET_A et ET_B /Alexa Fluor 568 (signal rouge) ; N : noyau, DAPI staining (signal bleu)

Dans la figure 27 nous observons la localisation des deux récepteurs de l'ET dans les cellules N2a contrôles et traitées avec l' $A\beta$ à une forte concentration toxique (200 $\mu\text{g/mL}$). Le récepteur ET_A dans les N2a contrôles (Figure 27A) a une distribution

diffuse dans le cytoplasme. Le signal d'ET_B (Figure 27B) est visiblement concentré en petits points rouges localisés dans le cytoplasme, mais on le retrouve aussi au niveau de la membrane cytoplasmique. Dans les cellules traitées, ET_A (Figure 27C) est toujours présent dans le cytoplasme et au niveau de la membrane cellulaire, mais son signal est plus intense. Toujours dans les N2a traitées, la localisation d'ET_B (Figure 27D) change drastiquement ; le signal des récepteurs ET_B est très fort et il est surtout concentré au niveau de la membrane cytoplasmique.

5. Expression des récepteurs ET_A et ET_B dans les tissus provenant des souris déficientes pour la sous-unité p50 du NF-κB

La Figure 28 montre l'expression des récepteurs ET_A et ET_B dans les tissus provenant des souris sauvages et des souris déficientes pour la sous-unité p50 (p50^{-/-}).

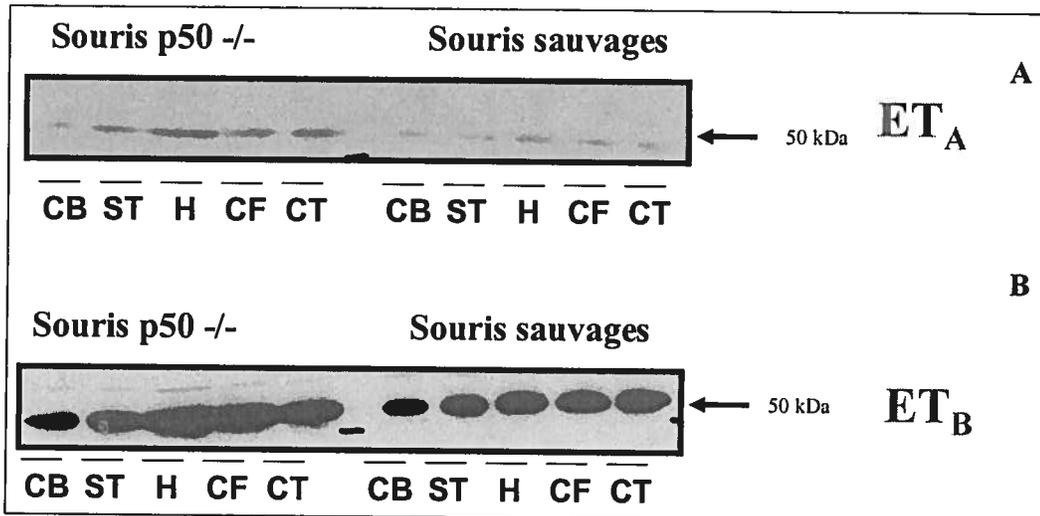


Figure 28 : Immunobuvardage d'ET_A et d'ET_B dans des tissus provenant des souris déficientes pour la sous-unité p50 de NF-κB (p50^{-/-}) versus des tissus provenant des souris sauvages. CB : cervelet ; ST : striatum ; H : hippocampe ; CF : cortex frontal ; CT : cortex temporal

L'expression d'ET_A est présentée dans la Figure 28A. Le signal est plus fort dans le groupe souris p50^{-/-}, en particulier dans l'hippocampe par rapport aux autres structures.

Dans la Figure 28B, au contraire, on observe l'expression d'ET_B. Nous pouvons remarquer la présence du récepteur, dans ce cas aussi, soit chez les souris sauvages soit chez les souris p50^{-/-}. Le signal semble plus intense dans les souris p50^{-/-}, mais il est plus difficile de voir une différence entre les différentes structures

cérébrales. La différence d'expression que nous remarquons dans nos immunobuvardages n'est pas due à une variation de concentration des protéines dans les puits, mais à une réelle variation d'expression de la protéine d'intérêt chez les différents groupes, en normalisant nos résultats avec la β -actine.

6. Présence de l'ET dans nos échantillons

Après avoir observé la présence des deux récepteurs de l'ET et l'expression de l'enzyme ECE dans les tissus humains, dans deux lignée cellulaires et dans le souris p50 (-/-), il est intéressant aller mesurer la concentration de l'ET chez nos échantillons à l'aide du test ELISA. Voici la courbe d'étalonnage de l'ET-1 (Tableau 6) :

TUBE	[ET- 1]	Vol ET-1 (μ L)	Vol PBS 1X
1	0	5 μ L de 100 ng/mL	1000 μ L
2	0,5 ng/mL	10 μ L de 100 ng/mL	995 μ L
3	1 ng/mL	50 μ L de 100 ng/mL	990 μ L
4	5 ng/mL	100 μ L de 100 ng/mL	950 μ L
5	10 ng/mL	500 μ L de 100 ng/mL	900 μ L
6	50 ng/mL	1000 μ L de 100 ng/mL	500 μ L
7	100 ng/mL	100 μ L de 1 μ g/mL	900 μ L
8	500 ng/mL	500 μ L de 1 μ g/mL	500 μ L
9	1000 ng/mL	1000 μ L de 1 μ g/mL	0

Tableau 6 : Courbe d'étalonnage de l'ET-1

À partir de la courbe d'étalonnage, nous avons ainsi réalisé un graphique représentant trois régressions linéaires (Figure 29) :

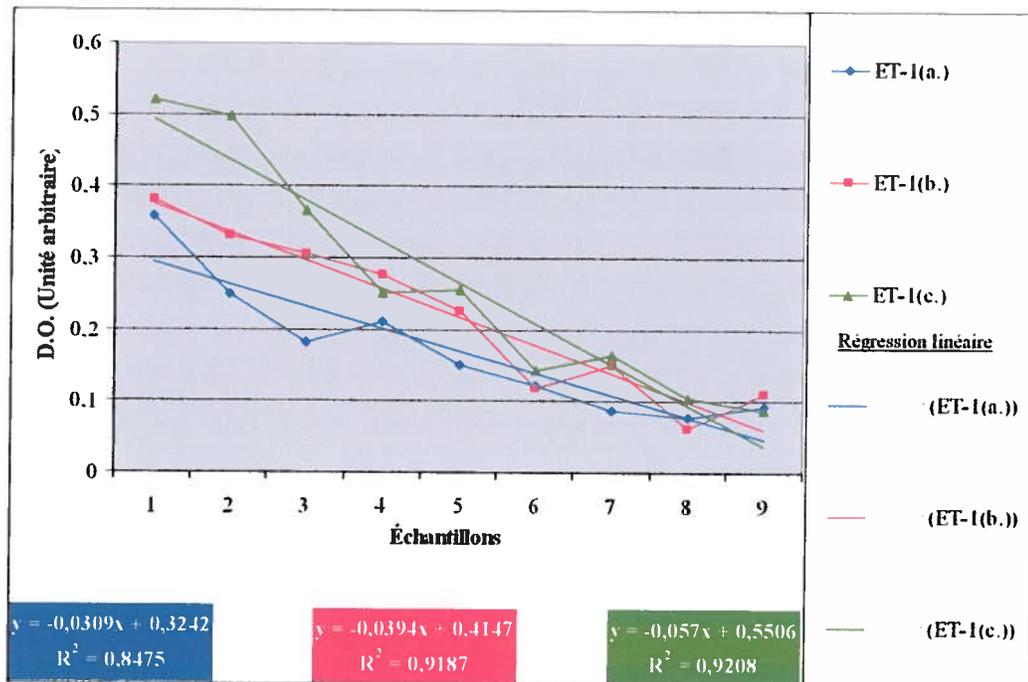


Figure 29 : Graphique représentant des courbes d'étalonnage de l'ET-1

Ce graphique est un échantillonnage représentatif de ce qui a été observé. En effet, les R^2 que nous montrons sont de l'ordre de 0,8475 (bleu) ; 0,9187 (rouge) ; 0,9208 (vert), très proche de l'unité (Figure 29).

DISCUSSION

- Analyse du niveau d'expression de l'enzyme ECE dans les tissus humains MA

Dans la partie résultats, la Figure 17 présentait l'expression de l'enzyme ECE dans l'hippocampe et le cortex frontal des patients atteints de la MA. L'ECE montrait une très faible expression en particulier chez les sujets MA 4/4.

Eckman et al. (2001) ont été les premiers auteurs à découvrir la capacité d'hydrolyse *in vitro* de l'A β par l'enzyme ECE. Dans d'autres études, ils ont montré une forte augmentation des niveaux de l'A β ₁₋₄₀ et de l'A β ₁₋₄₂ dans les cerveaux des souris déficientes en l'enzyme ECE (Eckman et al, 2003). Nos résultats démontrent pour la première fois que l'expression de l'ECE est plus faible chez les MA 4/4. De plus, les patients MA 4/4 sont ceux qui présentent le taux d'A β le plus élevé (Schmechel et al, 1993). Ceci suggère donc que chez l'humain le niveau d'A β et l'expression d'ECE sont également inversement associés. Nous pouvons supposer que la faible expression d'ECE, dans l'hippocampe ainsi que dans le cortex frontal des patients MA 4/4, est reliée au fait que les MA 4/4 sont les patients qui présentent des PS très compactes et un état de fibrillation avancé (Mohajeri et al, 2004). Nos observations sont donc en accord avec les travaux de Akiyama et al. (2001) et Eckman et al. (2005) qui ont montré que l'abondance régionale des métalloprotéases, comme l'ECE, est inversement corrélée aux dépôts d'A β .

Il faut souligner que toutes les métalloprotéases semblent mieux dégrader l'A β soluble et moins celui dans la forme fibrillaire, composant principal des PS (Mohajeri et al, 2004). Grâce à cette observation, on peut dire que l'enzyme ECE limite l'accumulation de l'A β dans le cerveau, avant qu'il ne se dépose pour former les PS (Eckman et al, 2003). Akiyama et al (2001), ont montré que l'abondance de NEP dans le cortex cérébral est inversement proportionnelle à l'accumulation de l'A β ; cette observation pourrait aider à expliquer la relative résistance de certaines régions du cerveau à la dégénérescence neuronale due à la MA. Nous pouvons conclure que l'expression d'ECE chez les patients MA 4/4 est plus faible par rapport aux autres groupes, parce que l'enzyme est moins capable d'hydrolyser l'A β présent dans leurs cerveaux déjà sous sa forme fibrillaires et compacte. Kanemitsu et al (2003), ont

démontré que la NEP montre la même affinité pour l'A β soit dans sa forme monomérique que oligomérique ; au contraire, l'EDI montre une majeure affinité pour la forme monomérique de l'A β . La NEP pourrait ainsi être un meilleur enzyme pour réduire le niveau cérébral de l'A β . Selon nos observations l'ECE semblerait avoir, lui aussi, une affinité inférieure pour l'A β dans la forme oligomérique.

Cook et al. (2003), avaient observé que les patients atteints de la MA avec au moins un allèle $\epsilon 4$ montraient une réduction du niveau de l'ARNm de la métalloprotéase EDI dans l'hippocampe. Les résultats que nous avons obtenus, dans notre cas par rapport à ECE, montraient une dépendance entre l'expression d'ECE et de la présence des deux allèles $\epsilon 4$. En revanche, on avait remarqué une expression plus forte chez les patients MA 3/4. Même s'ils présentent au moins un allèle $\epsilon 4$, l'expression d'ECE n'était pas mineur. D'après nos observations, cette dépendance semblait être due plus à la présence des deux allèles $\epsilon 4$. Nos conclusions sont, en tous cas, opposées à celles faites par Funalot et al. (2004). Après avoir étudié l'interaction possible entre l'expression d'ECE et les génotypes d'apoE, les auteurs n'avaient remarqué aucun lien entre les deux. Leur explication se basait sur un effet homogène par rapport aux variantes génétiques d'ECE chez les sujets avec un ou deux allèles $\epsilon 4$. Les différences dans les résultats observés entre différentes études peuvent être dues à des choix différents des techniques utilisées (immunobuvardages ou RT-PCR) et du nombre des patients à disposition.

Un autre facteur de risque pour la MA est l'âge. Fukami et al. (2002) ont montré que l'activité de l'enzyme NEP, appartenant à la même famille de métalloprotéases de l'ECE, pouvait être régulée par l'âge. Ils ont observé une réduction significative dans l'expression de la NEP dans les régions les plus atteintes de la MA, comme l'hippocampe. D'autres études ont montré que les niveaux soit de la NEP ainsi que de l'EDI diminuaient selon l'âge, dans l'hippocampe et le cortex frontal de souris transgéniques et des tissus humains chez des patients atteints de la MA (Caccamo et al, 2005). Nous avons remarqué une baisse dans l'expression de l'ECE dans les mêmes structures cérébrales utilisées dans les études de Fukami et al. (2002) et Caccamo et al. (2005). Même si l'ECE appartient à la même famille de métalloprotéases que NEP, il faut souligner que dans les résultats obtenus, la baisse

dans l'activité d'ECE ne semble pas être reliée à l'âge des patients (Tableau 4). L'âge des patients utilisés comme échantillons, ne diffère pas significativement.

En analysant nos immunobuvardages, on remarque que certaines bandes obtenues ne sont pas très nettes ; les protéines d'intérêt semblaient moins exprimées dans nos tissus et les anticorps utilisés semblaient être moins spécifiques. Cette difficulté reflète le fait que ces tissus ont été conservés à - 80°C depuis longtemps, congelés et décongelés plusieurs fois pour l'utilisation par plusieurs personnes à des moments différents, sans l'ajout d'antiprotéases dans les homogénats. Ces conditions peuvent induire l'activation des protéases et d'une cascade enzymatique qui pourrait avoir endommagé nos tissus et rendue plus difficile la détection des récepteurs.

- Analyse du niveau d'expression des récepteurs ET_A et ET_B dans les tissus humains MA

L'expression du récepteur ET_A et ET_B dans l'hippocampe et le cortex frontal des patients atteints de la MA est présentée dans les Figures 18 et 19. Le récepteur ET_A est plus exprimé chez certains patients MA 3/4 par rapport aux témoins. En revanche, ET_B est plus exprimé chez certains patients MA 3/4 et MA 4/4. De plus, chez les mêmes patients MA 3/4 où l'expression d'ET_A augmentait, celle d'ET_B diminuait réciproquement.

L'activité biologique de l'ET dans le cerveau et les tissus neuronaux est peu connue. Lors des premières études l'intérêt était plus concentré sur la présence des deux récepteurs au niveau du SNC (Takahashi et al, 1991). ET_A et ET_B ont été détectés dans le cerveau humain, en particulier dans l'hippocampe, le cervelet, l'hypothalamus, le cortex cérébral, la médulla oblongue, les ganglions, l'amygdale et le bulbe olfactif (Takahashi et al, 1991 ; Naidoo et al, 2004). En revanche, d'autres études (Hama et al, 1997 ; Uesugi et al, 1996 ; Yamada et al, 1995 ; Uesugi et al, 1998) ont démontré une augmentation de l'expression du système de l'ET dans le SNC après un traumatisme crânien. Cette observation souligne le fait que le système de l'ET peut être activé suite à un stress. Zhang et al (1994), avaient surtout concentré leur attention sur la présence du peptide ET dans le cerveau des patients atteints de la MA. Toutefois, il n'existe aucune étude montrant l'expression des récepteurs de l'ET

dans les tissus humains des patients atteints de la MA. Nous sommes ainsi les premiers à avoir analysé l'expression des deux récepteurs dans des tissus nerveux provenant des patients atteints de la MA.

Nous avons remarqué une variation interindividuelle dans l'expression des deux récepteurs en particulier chez les patients MA 3/4. De plus, chez les patients MA 4/4 l'expression du récepteur ET_B est supérieure à celle du récepteur ET_A. Ces variations d'expression laissent supposer une activité différente du système de l'ET via ces deux récepteurs dans le développement de la MA. Des études précédentes sur l'expression d'ET_A et ET_B suite à un traumatisme au niveau du SNC, montraient le rôle différent joué par les deux récepteurs. Willette et al. (1990), ont observé que l'administration directe d'ET dans le système cérébro-vasculaire réduisait drastiquement la perfusion microvasculaire cérébrale en donnant lieu à un dommage ischémique dû à une forte vasoconstriction par le biais des récepteurs ET_A. Sato et Noble (1998), ont eux aussi montré que l'activation du récepteur ET_A provoque un vasospasme et une vasoconstriction prolongée suite à une ischémie cérébrale.

De plus, un antagoniste spécifique pour ET_A, Ro 61-1790, est capable de bloquer l'activité d'ET_A et de diminuer le vasospasme cérébral provoqué par un traumatisme crânien (Roux et al, 1997 ; Dawson et al ; 1999). La toxicité neuronale induite par le système de l'ET via ET_A est reliée au fait que l'ET peut augmenter la concentration du calcium intracellulaire dans les neurones (Koizumi et al, 1994 ; Siesjo, 1988 ; Yue et al, 1990). Une activation exagérée du système de l'ET peut induire la mort neuronale. L'utilisation des antagonistes spécifiques pour ET_A pourraient ainsi jouer un rôle neuroprotecteur (Feuerstein et al, 1994 ; Goto et al, 1996 ; Hama et al, 1997 ; Hama et al, 1992 ; Koizumi et al, 1994 ; MacCumber et al, 1990). La surexpression du récepteur ET_A que nous avons observée chez les patients MA souligne la présence d'une toxicité neuronale et un état de danger pour les neurones.

Il a été observé que l'ET était un puissant facteur de croissance chez les astrocytes *in vitro* et *in vivo* via les récepteurs ET_B (Hama et al, 1992 ; Uesugi et al, 1998). Ces résultats suggèrent que l'ET pourrait être impliquée dans les processus de régénération tissulaire après un traumatisme du SNC (Uesugi et al, 1998). La

surexpression du récepteur ET_B que nous avons observée chez les patients MA pourrait suggérer ainsi un rôle neuroprotecteur d'ET_B comme réponse compensatoire suite à une toxicité neuronale. Pour soutenir cette hypothèse et justifier les observations faites, nous pouvons citer l'étude faite par Yagami et al. (2002). Ils ont été les premiers à mettre en évidence le fait que les agonistes des récepteurs ET_B présentent un effet anti-apoptotique contre l'A β . L'A β induit la mort neuronale via l'apoptose, caractérisée par la formation de corps apoptotiques à la surface membranaire, la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN (Forloni et al, 1993 ; Ueda et al, 1996). De plus, la présence du calcium peut déterminer une altération dans les protéines, l'activation des enzymes et la production des radicaux libres qui vont créer un environnement stressant et toxique pour les neurones (Yagami et al, 2005). Enfin, des agonistes sélectifs pour ET_B, comme ET-3 et IRL 1620, peuvent réduire la toxicité de l'A β et favoriser la survie neuronale. En revanche, un antagoniste ET_B, BQ 788, peut inhiber l'effet neuroprotecteur de l'ET (Yagami et al, 2005).

Il est intéressant d'ajouter que chez les patients MA 4/4, où l'expression d'ECE était très faible, nous avons observé une forte expression d'ET_B. Ehrenreich et al. (1999) ont remarqué, pour la première fois, dans une culture primaire d'astrocytes provenant des souris déficientes pour le récepteur ET_B, que le récepteur même était impliqué dans la régulation de l'activité d'ECE. En particulier la conversion de la pro ET en ET mature était réduite en présence des récepteurs ET_B actifs. Dans ce cas, ET_B induisait un rétro-contrôle négatif sur l'activité de l'enzyme ECE, en allant moduler la production de l'ET mature. Les conclusions de cette étude pourraient soutenir nos résultats.

Les graphiques (Figures 20 à 23) ont présenté la tendance et la variabilité d'expression des deux récepteurs de l'ET. Nous avons observé que plusieurs patients atteints de la MA montrent une surexpression des deux récepteurs par rapport aux témoins (Figures 20A, 21A, 22A et 23A). De plus, nous avons remarqué que les patients ayant une très forte expression des deux récepteurs étaient les patients MA 3/3 et MA 3/4 (Figures 20C, 21C, 22C et 23C). Aucune étude n'a été faite préalablement pour vérifier la possible dépendance d'expression des deux récepteurs par rapport aux différents génotypes d'apoE. Mais, d'après nos résultats il ne semble

pas y avoir de différence significative d'expression d'ET_A et ET_B selon les génotypes d'apoE.

Il faut souligner que les valeurs plus élevées d'expression, d'ET_A et d'ET_B, dans les deux structures cérébrales appartenaient aux mêmes patients atteints de la MA. Nous avons vérifié si ces patients présentaient d'autres maladies qui pourraient être reliées à l'ET (l'hypertension, les ACV, une ischémie, le diabète, l'hypercholestérolémie ou une insuffisance rénale) (Pinet, 2004) et qui pouvait justifier une surexpression du système de l'ET. Mais, d'après les informations que nous avons eues, nous n'avons retrouvé aucun lien qui pouvait justifier la surexpression des récepteurs.

- Analyse de l'expression des récepteurs ET_A et ET_B dans les cellules N2a traitées avec l'Aβ

Il était important d'utiliser d'autres modèles pour mieux comprendre le système de l'ET. Nous avons observé l'expression des récepteurs ET_A et ET_B dans les cellules N2a, purement neuronales, traitées pendant 24 heures avec l'Aβ₂₅₋₃₅ à une concentration de 50 µg/mL et de 200 µg/mL (Figure 25B).

Yankner et al. (1990), avaient souligné que même si l'Aβ₂₅₋₃₅ ne se retrouve pas dans les cerveaux des patients atteints de la MA, sa toxicité est similaire à celle de l'Aβ₁₋₄₀ et Aβ₁₋₄₂. D'autre part, sa solubilisation est beaucoup plus facile et donne des résultats plus reproductibles que les formes 1-40 ou 1-42. De plus son utilisation est beaucoup repandue dans la littérature. Pour toutes ces raisons, nous avons préféré utiliser l'Aβ₂₅₋₃₅. Cette condition nous permettait d'analyser *in vitro* l'expression des deux récepteurs ET_A et ET_B. La Figure 25B montre une surexpression d'ET_A et d'ET_B surtout quand les cellules sont traitées durant 24 heures avec la concentration la plus élevée et la plus toxique. Aucune étude précédente n'a été faite en analysant l'expression des deux récepteurs de l'ET chez les cellules N2a. Nous pouvons néanmoins citer l'étude réalisée par Fisk et al. (2006) qui ont observé l'expression d'ECE dans les cellules de neuroblastome humain NB7 et celle de Barnes et al. (1997) qui ont eux aussi observé l'ECE dans les cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y. Fisk et al. (2006) ont remarqué par immunobuvardage que l'expression d'ECE diminue suite à un stress appliqué pendant 24 heures. Cette étude est intéressante

parce qu'ils ont analysé l'expression d'ECE dans une lignée cellulaire de neuroblastome humain qui ressemble beaucoup aux cellules N2a de neuroblastome murin. De plus, ils ont fait des traitements avec les mêmes temps d'attente que ceux de notre expérience.

Dans le cerveau des patients atteints de la MA, la toxicité neuronale est provoquée par différents facteurs (la présence des dépôts d'A β (Selkoe, 2004), de l'apoE (Poirier et al, 1993), la présence d'un état d'inflammation autour des PS (Selkoe, 2004) ou d'un niveau inférieur d'antioxydants (Ramassamy et al, 1991)). Pour nos traitements nous avons choisi d'utiliser l'A β parce qu'on souhaitait vérifier si le peptide même était capable de changer l'expression du niveau d'ET_A et d'ET_B. En analysant nos résultats, nous pouvons conclure que l'A β , qu'à concentration élevée, semble induire une surexpression des deux récepteurs.

- Analyse de la localisation des récepteurs ET_A et ET_B dans les cellules N2a traitées avec l'A β

La technique de l'immunofluorescence était utile pour mieux comprendre la localisation, l'internalisation et le recyclage du récepteur ET_A et du récepteur ET_B, chez les cellules N2a après un traitement avec l'A β ₂₅₋₃₅. Grâce à cette technique, selon l'intensité du signal détecté, nous observons la localisation des deux récepteurs au niveau cellulaire et leur expression en réponse à un stress. La Figure 26 montre des cellules CHO transfectées de manière stable avec les deux récepteurs de l'ET et la Figure 27 montre des cellules N2a contrôles, traitées avec l'A β ₂₅₋₃₅ à 200 μ g/mL pour 24 heures.

Les récepteurs ET_A et ET_B sont localisés dans le cytoplasme et sur la surface de la membrane cellulaire (Figure 26). Des études faites par Paasche et al. (2005), Bremnes et al. et Abe et al. (2000), ont mis en évidence par immunofluorescence la localisation, l'internalisation et le recyclage des deux récepteurs de l'ET chez les CHO transfectées dans une manière stable avec ET_A et ET_B. Bremnes et al. (2000) ont remarqué qu'après 15 minutes d'attente, le récepteur ET_A était visible à côté du noyau, au contraire le récepteur ET_B après 90 minutes d'attente était observable et correspondait aux lysosomes présents dans le cytoplasme. Dans cette étude, les

auteurs ont observé la voie intracellulaire suivie par les deux récepteurs après internalisation à différents temps d'attente. Nous avons observé la localisation des deux récepteurs seulement après 24 heures. La localisation des récepteurs est différente de celle observée par Bremnes et al. (2000) dans leur étude ; cette différence est due possiblement aux différents temps d'attente utilisés.

Les récepteurs ET_A dans les cellules N2a contrôles (Figure 27A) et traitées avec l' $A\beta$ (Figure 27C) sont localisés dans le cytoplasme et au niveau de la membrane cellulaire mais le signal est plus intense dans les N2a traitées pendant 24 heures. Bremnes et al. (2000) ont remarqué que plus de 30 minutes après l'internalisation, les récepteurs ET_A sont recyclés à la membrane. Nous avons observé la même localisation chez les N2a. Le signal plus intense dans les cellules traitées souligne une surexpression du récepteur à cause de la présence de l' $A\beta$. Nous sommes les premiers à démontrer la présence des récepteurs de l'ET chez les N2a après les avoir traitées avec l' $A\beta$, aucune étude n'a été réalisée sur cette lignée cellulaire. Les récepteurs ET_B , apparaissent comme des petits points rouges dans les cellules contrôles (Figure 27B). Dans les cellules traitées avec l' $A\beta$ (Figure 27D), ils semblent à nouveau exprimés sur la membrane cytoplasmique en montrant un signal beaucoup plus intense. Il est intéressant de souligner qu' ET_B dans les cellules N2a contrôle montre la même localisation que dans les cellules CHO utilisées dans l'étude de Bremnes et al. (2000). Le récepteur se trouve à l'intérieur des lysosomes, prêt à être dégradé. Dans les cellules N2a traitées, le récepteur ET_B est recyclé à la membrane et le signal observé est très intense. Le fait que le récepteur se trouve à nouveau exprimé sur la membrane cellulaire indique que la cellule dans un état de stress recycle ET_B à la membrane. Le fait de remarquer une forte expression d' ET_B dans nos figures, nous suggère la possibilité d'une réponse compensatoire suite à la toxicité induite par l' $A\beta$.

Nous avons traité les cellules pendant différents temps (45 minutes, 2, 24 et 48 heures) au lieu de 15, 30 et 90 minutes comme dans les études précédentes. Nous avons remarqué que le signal représentant les deux récepteurs ne variait pas significativement entre les différents temps d'attente. Nous avons choisi ainsi d'étudier la localisation des deux récepteurs seulement après 24 heures, le même temps d'attente choisi préalablement dans les traitements détectés par immunobuvardage.

- Analyse de l'expression des récepteurs ET_A et ET_B dans les tissus provenant des souris déficientes pour la sous-unité p50 du NF-kB

La Figure 28 montre l'expression des récepteurs ET_A et ET_B dans différentes régions du cerveau des souris p50 (-/-). Nous avons remarqué un signal, pour les deux récepteurs, beaucoup plus intense chez les souris p50 (-/-) par rapport aux témoins.

La production d'ET peut dépendre de différentes molécules régulatrices (NO, bradykinine, thrombine, ATP, cytokines, interleukines, oxytocine, vasopressine) (Rubanyi et Polokoff, 1994) qui déterminent une régulation autocrine et/ou paracrine avec des mécanismes de rétro-contrôle qui vont moduler la concentration de l'ET dans les tissus. Quehenberger et al. (2000), ont découvert une séquence régulatrice NF-kB sur le gène codant pour l'ET. Le NF-kB est un des facteurs capables de réguler la production d'ET via une transcription nucléaire. L'absence de p50 chez les souris p50 (-/-) entraîne l'inactivation du NF-kB, qui n'est plus capable de transloquer dans le noyau. Par conséquent, il ne peut plus moduler la production de l'ET. La baisse dans la concentration de l'ET explique la surexpression des deux récepteurs observée dans nos résultats.

- Détection de la présence de l'endothéline dans nos échantillons par le test ELISA

Les courbes d'étalonnage de l'ET nécessaires pour mettre au point le test ELISA, sont présentées dans la Figure 29. La mise au point du test ELISA à ce moment de notre étude, nous donnait l'opportunité de compléter les données préalablement obtenues. Les analyses faites par immunobuvardage nous avaient montré une baisse dans l'activité d'ECE et en parallèle une surexpression des deux récepteurs de l'ET. Les étapes à suivre pour clarifier les observations faites, étaient d'aller enfin mesurer la concentration de l'ET dans les mêmes échantillons. Notre hypothèse était de retrouver dans ces échantillons un niveau très faible d'ET dû à la baisse d'activité de son enzyme de synthèse.

Nous avons eu des problèmes techniques, après plusieurs essais, nous n'étions plus capables de répéter nos conditions de travail. Le problème n'était pas seulement un problème technique mais il devenait aussi un problème scientifique, d'interprétation des données. Le test ELISA est un test très délicat et il demande beaucoup de précision pour avoir des données reproductibles. Le test est très sensible aux variations de manipulation, de changement d'opérateur, de changement du matériel et de type de lecture au spectrophotomètre.

Pour résoudre le problème nous avons répété plusieurs fois la courbe d'étalonnage en changeant les solutions, le matériel ou l'ordre de charge des puits pour éviter des interférences possibles avec les surfaces des bords externes de la plaque. Le test étant non reproductible, il nous a été impossible de connaître la vraie concentration d'ET dans nos échantillons.

- Analyses statistiques

Les variations importantes observées dans les résultats sont essentiellement la conséquence des variations fréquemment obtenues lorsque l'on travaille avec des tissus humains dont la source et l'obtention ne peuvent être standardisées et dont le nombre reste toujours restreint. Il serait intéressant d'avoir accès à un plus grand nombre des sujets contrôles et des sujets malades pour pouvoir diminuer le risque d'erreur d'écart-type. Malheureusement il est très difficile d'obtenir un grand nombre d'échantillons, car nous travaillons sur l'Humain.

- Perspectives

Ayant mis en évidence le fait que l'enzyme ECE est capable d'hydrolyser l'A β et de le dégrader, le fait que les deux récepteurs jouent deux rôles opposés dans la MA et sont localisés différemment dans le SNC et que le gène codant pour l'ET présente une séquence NF-kB, ouvre des perspectives intéressantes pour la poursuite de la recherche sur le système ET et son rôle dans la pathophysiologie de la MA.

Avec notre projet de maîtrise nous avons voulu vérifier l'hypothèse que l'ET pouvait jouer un rôle important dans la MA. D'autres études sont nécessaires pour confirmer et soutenir les premières données obtenues. Plusieurs manipulations pourraient aider à clarifier ces résultats. On pourrait quantifier l'ARNm de l'ECE et les deux récepteurs de l'ET par RT-PCR, par hybridation *in situ* ou par immunobuvardage de type Northern, dans l'hippocampe et le cortex frontal des patients atteints de la MA par rapport aux sujets contrôles. De cette manière nous pourrions faire des comparaisons entre la protéine elle-même et son ARNm. On pourrait aussi calculer l'activité enzymatique de l'ECE, dans les homogénats provenant des tissus humains. On pourrait traiter des cellules N2a avec l'A β à une concentration toxique et ajouter des antagonistes sélectifs du récepteur ET_A, comme le Ro 61-1790 ou le BQ 123, pour moduler l'expression d'ET_A. Des agonistes sélectifs du récepteur ET_B, comme l'IRL 1620, ou des antagonistes sélectifs, comme le BQ 788, pourraient aussi être utilisés pour moduler l'expression d'ET_B. Enfin, le taux de toxicité pourrait être vérifié par des tests de toxicité XTT ou LDH, pour détecter une activité neuroprotectrice des agonistes ou des antagonistes.

D'autres recherches seraient intéressantes à réaliser sur l'action du NF-kB sur l'ET, en utilisant les cellules N2a. On pourrait les traiter durant des temps différents et à différentes concentrations toxiques d'A β , en ajoutant aussi des inhibiteurs du NF-kB. La parthénolide, capable d'empêcher la phosphorylation d'IkB et par conséquent la translocation du NF-kB dans le noyau, pourrait être ajoutée à différentes concentrations et temps d'attente pour vérifier *in vitro* l'activité régulatrice de l'NF-kB sur la production de l'ET. On pourrait faire d'autres immunobuvardages sur les tissus humains des patients atteints de la MA, pour observer l'expression des sous-unités du NF-kB (p50 et p65). En utilisant un kit d'extraction nucléaire nous sommes

capables de voir au même temps l'expression des protéines dans la fraction cytoplasmique et dans la fraction nucléaire. Selon la détection de ses sous-unités dans le cytoplasme ou dans le noyau, nous pourrions comprendre si le NF-kB a été activé. En parallèle, à l'aide du test ELISA, la quantité d'ET présente dans nos échantillons pourrait être mesurée soit dans sa forme mature, ainsi que comme prépro ET ou pro ET.

Tous les études futures pourraient soutenir la recherche sur le rôle du système de l'ET dans la physiopathologie de la MA et clarifier bon nombre des résultats obtenus dans les études préalablement réalisées.

CONCLUSION

Notre projet a été mis sur pied avec l'objectif de découvrir un lien possible entre le système ET et la MA. Cette étude visait à déterminer l'expression des récepteurs ET_A et ET_B ainsi que le niveau de l'enzyme ECE dans des tissus provenant de patients atteints de la MA par rapport aux patients témoins. Pour ce faire, nous avons voulu observer par immunobuvardage l'expression des récepteurs ET_A et ET_B dans des tissus humains (hippocampe et cortex frontal) et dans une lignée cellulaire N2a qui a été traitée à des concentrations et des temps différents avec l'A β , protéine anormale au cœur des PS.

Les premiers essais ont montré que chez certains patients atteints de la MA (MA 3/4 4/4) par rapport aux sujets contrôles, le niveau des récepteurs ET_A et ET_B est plus élevé surtout dans l'hippocampe. On a aussi voulu vérifier l'existence d'une possible relation entre l'expression des deux récepteurs, l'activité de l'enzyme ECE et la présence du génotype d'apoE, facteur de risque reconnu pour la MA. D'après nos résultats, l'expression des deux récepteurs semble être indépendante du génotype d'apoE. Au contraire, nous pouvons souligner que l'expression d'ECE est inférieure chez les patients MA 4/4 ; caractéristique qui semble être liée à la présence de l'allèle $\epsilon 4$. Ces données confirment le fait que l'ECE semble avoir la capacité d'hydrolyser l'A β , activité déjà mise en évidence par Eckman et al. (2001). Enfin, contrairement aux analyses faites par Funalot et al. (2004), nous avons remarqué une possible dépendance de l'activité de l'enzyme chez les patients exprimant les différents génotypes d'apoE.

Nos résultats suggèrent que la présence des deux récepteurs et de l'enzyme ECE dans les tissus provenant des malades est associée à la dégénérescence neuronale. Comme suggéré par quelques auteurs (Sato et Noble, 1998 ; Yagami et al, 2005 ; Rogers et al, 2003), les récepteurs ET_A sembleraient associés à une toxicité neuronale et les récepteurs ET_B seraient, au contraire, associés à une neuroprotection. Les résultats provenant des immunobuvardages faites sur les cellules N2a traitées avec l'A β ₂₅₋₃₅ nous montrent aussi une surexpression des deux récepteurs et ce

particulièrement à une concentration de 200µg/mL, après 24 heures. En somme, il semble que ET_A et ET_B pourraient être régulés par l'Aβ.

Pour mieux comprendre le rôle effectif de l'ET dans la pathophysiologie de la MA via ses récepteurs, nous avons utilisé d'autres techniques. Grâce à l'immunofluorescence, nous avons élucidé le fait que ET_A et ET_B sont surexprimés autant chez les patients atteints de la MA que chez les cellules N2a traitées. En effet, selon l'intensité du signal fluorescent observé dans les cellules N2a traitées avec l'Aβ, on remarque, par rapport aux cellules témoins, une surexpression des deux récepteurs.

En plus, nous avons voulu vérifier le lien entre l'activation du NF-kB, index d'une réaction inflammatoire dans le tissu des malades MA, et la production d'ET. L'idée est venue grâce à des études récentes de Quehenberger et al. (2000) qui avaient reconnu une séquence NF-kB sur le gène codant pour ET. Pour ce faire, nous avons utilisé des échantillons provenant des tissus de souris déficientes pour la sous-unité p50 du NF-kB, afin de vérifier l'expression d'ET_A et ET_B, par la technique d'immunobuvardage. Nous avons remarqué une surexpression des deux récepteurs.

Pour conclure, nous pouvons souligner que mon projet de maîtrise a contribué à documenter le possible lien entre le système ET et la MA. Toutes les différentes étapes, comme la production d'ET, la surexpression des récepteurs ET_A et ET_B et l'activation de l'enzyme ECE semblent être impliquées à un certain niveau dans le développement de la MA. Pour cette raison, il sera intéressant de réaliser d'autres études afin de connaître plus exactement l'implication de l'ET dans la MA.

Dans l'avenir, l'utilisation d'agonistes sélectifs (ET-3 ou IRL-1620) vers le récepteur ET_B ainsi que le développement d'activateurs de l'ECE pourraient constituer un espoir thérapeutique pour réduire les symptômes de la MA. Il faut toujours se rappeler qu'en modulant l'activité du système ET, on pourrait toutefois se retrouver avec des effets secondaires importants surtout au niveau du système cardio-vasculaire (hypertension, vasoconstriction, vasodilatation exagérée). C'est pour cette raison que d'autres recherches sont d'une extrême importance.

APPENDICE

- **Culture cellulaire**

Milieu complet

Mégacell DME/F-12 Ham medium	Sigma, USA
200mM L-glutamine	Sigma, USA
100U/mL pénicilline/streptomycine	Sigma, USA
sérum bovin foetal	Sigma, USA

Tampon de lyse

50mM tris pH8	Sigma, USA
150mM NaCl	Sigma, USA
0,5% igepal	Sigma, USA
0,1% (p/v) SDS	Laboratoire Mat, CA
0,01% triton	Bio-rad, USA
cocktail inhibiteur de protéase	Sigma, USA

- **Immunobuvardage**

Gel SDS- Page

Gel SDS- Page phase de séparation 10%

pour 2 petits gels:	3,9mL eau distillée	
	2,5mL tris-HCL 1.5M pH8.8	Sigma, USA
	3,4mL acrylamide/Bis 30%	Bio-rad, USA
	100µL SDS 10%	Laboratoire Mat, CA
	50µL APS 10%	EMD chemicals, USA
	10µL temed	Sigma, USA

Gel SDS- Page phase de séparation 8%

pour 2 petits gels:	4,7mL eau distillée	
	2,5mL tris-HCL 1.5M pH8.8	Sigma, USA
	2,6mL acrylamide/Bis 30%	Bio-rad, USA
	100µL SDS 10%	Laboratoire Mat, CA
	50µL APS 10%	EMD chemicals, USA
	10µL temed	Sigma, USA

Gel SDS- Page phase de compression 4%

pour 2 petits gels:	6,1mL eau distillée	
	2,5mL tris-HCL 1.5M pH8.8	Sigma, USA
	1,3mL acrylamide/Bis 30%	Bio-rad, USA
	100µL SDS 10%	Laboratoire Mat, CA
	50µL APS 10%	EMD chemicals, USA
	10µL temed	Sigma, USA

Tampon pour l'immunobuvardage**Tampon d'électrode 10X**

pour une solution de 500mL:	15g tris base	Sigma, USA
	14,4g glycine	Sigma, USA
	5g SDS	Laboratoire Mat, CA
	qn eau distillée	

Tampon de transfert 10X

pour une solution de 2L:	6g tris base	Sigma, USA
	37,5g glycine	Sigma, USA
	qn eau distillée	

Tampon pour les anticorps**Tampon anticorps primaire**

pour une solution de 50mL:	5mL TBS10X	
	150µL tween20	Sigma, USA
	0,5g BSA	EMD chemicals, USA
	25mg sodium azide	Sigma, USA
	qn eau distillée	

Tampon anticorps secondaire

pour une solution de 20mL:	0,6g lait en poudre
	2mL TBS10X
	qn eau distillée

Les anticorps**Anticorps primaire**

Anti-ET _A	d. 1:200	Sigma, USA
Anti-ET _B	d. 1:200	Sigma, USA
Anti-hECE	d. 1:250	Zymed, USA
Anti-βactine	d. 1:500	Sigma, USA

Anticorps secondaire

Anti-lapin	d. 1:2000	Sigma, USA
	d. 1:2000	
	d. 1:3000	
Anti-souris	d. 1:10000	Sigma, USA

La solution de détection**ECL**

solution A:	68mM p-coumaric acid en DMSO
solution B:	1,25mM luminol en 0,1M tris-HCl pH8,5

volume pour 1 membrane 6cmx9cm:	14μL solution A
	1,4mL solution B
	1μL H ₂ O ₂ 30%

- **Immunofluorescence**

Tampon pour les anticorps**Tampon GDB2X**

2% gélatine	Fisher, USA
10% triton	Bio-rad, USA
0,2M Na ₂ HPO ₄	Sigma, USA
4M NaCl	Sigma, USA
qn eau distillée	

Les anticorps**Anticorps primaire**

Anti-ET _A	d. 1:100	Sigma, USA
Anti-ET _B	d. 1:100	Sigma, USA

Anticorps secondaire

AlexaFluor
568 d. 1:100 Molecular Probes, USA

Tampon de lavage**Tampon de lavage**

20mM Na₂HPO₄ Sigma, USA
500mM NaCl Sigma, USA

LISTE DES RÉFÉRENCES

- ABE, Y., K. Nakayama, A. Yamanaka, T. Sakurai et K. Goto. 2000. «Subtype-specific trafficking of endothelin receptors». J Biol Chem, vol. 275, p. 8664-71.
- AKIYAMA, H., H. Kondo, K. Ikeda, M. Kato et P.L. Mc Geer. 2001. «Immunohistochemical localization of neprilysin in the human cerebral cortex: inverse association with vulnerability to amyloid β -protein (A β) deposition». Brain Res, vol. 902, p. 277-81.
- APELT, J., K. Ach et R. Schliebs. 2003. «Aging-related down-regulation of neprilysin, a putative β -amyloid-degrading enzyme, in transgenic Tg 2576 Alzheimer-like mouse brain is accompanied by an astroglial upregulation in the vicinity of β -amyloid plaques». Neurosci Lett, vol. 339, p. 183-6.
- ARAI, H., S. Hori, H. Aramori, H. Ohkubo et S. Nakanishi. 1990. «Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor». Nature, vol. 348, p. 730-2.
- ASHFORD, J.W. 2004. «Apo E genotype effects on Alzheimer's disease onset and epidemiology». J Mol Neurosci (Revue), vol. 23, p. 155-63.
- BARNES, K., B.J. Walkden, T.C. Wilkinson et A.J. Turner. 1997. «Expression of endothelin-converting enzyme in both neuroblastoma and glial cell lines and its localisation in rat hippocampus». J Neurochem, vol. 68, p. 570-7.
- BEFFERT, U., M. Danik, P. Krzykowski, C. Ramassamy, F. Berrada et J. Poirier. 1998. «The neurobiology of apolipoproteins and their receptors in the CNS and Alzheimer's disease». Brain Res Brain Res Rev, vol. 27, p. 119-42.
- BELLOSTA, S., B.P. Nathan, M. Orth, L.M. Dong, R.W. Mahley et R.E. Pitas. 1995. «Stable expression and secretion of apolipoprotein E3 and E4 in mouse neuroblastoma cells produce differential effects on neurite outgrowth». J Biol Chem, vol. 270, p. 27063-71.
- BÉNÉTAU-BUNART, B. et B. Baudin. 1991. «Angiotensin-converting enzyme: clinical applications and laboratory investigations on serum and other biological fluids». Crit Rev Clin Lab Sci (Revue), vol. 28, p. 337-56.
- BLAIS, V., M. Fugere, J.B. Denault, K. Klarskov, R. Day et R. Leduc. 2002. «Processing of proendothelin-1 by members of the subtilisin -like pro-protein convertase family». FEBS Lett, vol. 524, p. 43-8.
- BOLANOS-GARCIA, V.M. et R.N. Miguel. 2003. «On the structure and function of apolipoproteins : more than a family of lipid-binding proteins». Prog Biophys Mol Biol (Revue), vol. 83, p. 47-68.
- BREMNES, T., J.D. Paasche, A. Mehlum, C. Sandberg, B. Bremnes et H. Attramadal. 2000. «Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors». J Biol Chem, vol. 275, p. 17596-604.

BUXBAUM, J.D., K.N. Liu, Y. Luo, J.L. Slack, K.L. Stocking, J.J. Peschon, R.S. Johnson, B.J. Castner, D.P. Cerretti et R.A. Black. 1998. «Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor». J Biol Chem, vol. 273, p. 27765-67.

CACCAMO, A., S. Oddo, M.C. Sugarman, Y. Akbari et F.M. LaFerla. 2005. «Age- and region-dependent alterations in A β -degrading enzymes: implications for A β -induced disorders». Neurobiol Aging, vol. 26, p. 645-54.

CAPELL, A., J. Grunberg, B. Pesold, A. Diehlmann, M. Citron, R. Nixon, K. Beyreuther, D.J. Selkoe et C. Haass. 1998. «The proteolytic fragments of the Alzheimer's disease-associated presenilin-1 form heterodimers and occur as a 100-150kDa molecular mass complex». J Biol Chem, vol. 273, p. 3205-11.

CASTANO, P., L. Cocco, M. De Barbieri, L. D'Este, F. Floriani, G. Gheri, M.R. Mondello, S. Papa, P. Petriglieri, G. Pizzini, C. Ridola, S. Rossi, G. Sacchi, T. Sirigu et S. Spinella. 1995. «Anatomia Umana». Ed ERMES-Milano.

CHARTIER-HARLIN, M.C., M. Parfitt, S. Legrain, J. Perez-Tur, T. Brousseau, A. Evans, C. Berr, O. Vidal, P. Roques et V. Gourlet. 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». Hum Mol Genet, vol. 3, p. 569-74.

CHECLER, F., C. Alves da Costa, C. Dumanchin-Njock, E. Lopez-Perez, P. Marambaud, E. Paitel, A. Petit et B. Vincent. 2002. «Métabolisme du précurseur du peptide amyloïde et présénilines». Médecine/Sciences, vol. 18, p. 717-24.

CHEN, Y., L. Lomnitski, D.M. Michaelson et E. Shohami. 1997. «Motor and cognitive deficits in apolipoprotein E-deficient mice after closed head injury». Neuroscience, vol. 80, p. 1255-62.

CHOU, C.Y., W.P. Jen, Y.H. Hsieh, M.S. Shiao et G.G. Chang. 2006. «Structural and functional variations in human apolipoprotein e3 and e4». J Biol Chem, vol. 281, p. 13333-44.

COLLEN, M.F. 2002. «Vicissitudes of preventive medicine: a new challenge». Methods Inf Med, vol. 41, p. 224-9.

COOK, D.G., J.B. Leverenz, P.J. McMillan, J.J. Kulstad, S. Ericksen, R.A. Roth, G.D. Schellenberg, L. Jin, K.S. Kovacina et S. Craft. 2003. «Reduced hippocampal insulin-degrading enzyme in late-onset Alzheimer's disease is associated with the apolipoprotein E- ϵ 4 allele». Am J Pathol, vol. 162, p. 313-9.

CORDER, E.H., A.M. Saunders, W. J. Strittmatter, D.E. Schmechel, P.C. Gaskell, G.W. Small, A.D. Roses, J.L. Haines et M.A. Paricak-Vance. 1993. «Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families». Science, vol. 261, p. 921-3.

- DAWSON, D.A., H. Sugano, R.M. McCarron, J.M. Hallenbeck et M. Spatz. 1999. «Endothelin receptor antagonist preserves microvascular perfusion and reduces ischemic brain damage following permanent focal ischemia». Neurochem Res, vol. 24, p. 1499-505.
- DE STOPPER, B. 2003. «Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex». Neuron (Revue), vol. 38, p. 9-12.
- DE STOPPER, B. et W. Annaert. 2000. «Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein». J Cell Sci (Revue), vol. 113, p. 1857-70.
- DODART, J.C., C. Mathis et A. Ungerer. 2000. «The beta-amyloid precursor protein and its derivatives: from biology to learning and memory processes». Rev Neurosci, vol. 11, p. 75-93.
- DOHERTY, A.M. 1992. «Endothelin: a new challenge». J Med Chem (Revue), vol. 35, p. 1493-508.
- ECKAMN, E.A. et C.B. Eckman. 2005. «Abeta-degrading enzyme: modulators of Alzheimer's disease pathogenesis and targets for therapeutic intervention». Biochem Soc Trans, vol. 33, p. 1101-5.
- ECKMAN, E.A., M. Watson, L. Marlow, K. Sambamurti et C.B. Eckman. 2003. «Alzheimer's disease β -amyloid peptide is increased in mice deficient in endothelin-converting enzyme». J Biol Chem, vol. 278, p. 2081-84.
- ECKMAN, E.A., D.K. Reed et C.B. Eckman. 2001. «Degradation of the Alzheimer's amyloid β peptide by endothelin-converting enzyme». J Biol Chem, vol. 276, p. 24540-48.
- EHRENREICH, H., B. Löffler, M. Hasselblatt, H. Langen, J. Oldenburg, T. Subkowski, L. Schilling et A. Sirén. 1999. «Endothelin converting enzyme activity in primary rat astrocytes is modulated by endothelin B receptors». Biochem Biophys Res Comm, vol. 261, p. 149-55.
- ESCH, F.S., P.S. Keim, E.C. Beattie, R.W. Blacker, A.K. Culwell, T. Oltersdorf, D. McClure et P.J. Ward. 1990. «Cleavage of amyloid β peptide during constitutive processing of its precursor». Science, vol. 248, p. 1122-24.
- FACCHINETTI, P., C. Rose, J.C. Schwartz et T. Ouimet. 2003. «Ontogeny, regional and cellular distribution of the novel metalloprotease neprilysin 2 in the rat: a comparison with neprilysin and endothelin-converting enzyme-1». Neuroscience, vol. 118, p. 627-39.
- FARRIS, W., S. Mansourian, Y. Chang, L. Lindsley, E.A. Eckman, M.P. Frosch, C.B. Eckman, R.E. Tanzi, D.J. Selkoe et S. Guénette. 2003. «Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid β -protein, and the β -amyloid precursor protein intracellular domain in vivo». Proc Natl Acad Sci USA, vol. 100, p. 4162-7.

FEUERSTEIN, G.Z., J.L. Gu, E.H. Ohlstein, F.C. Barone et T.L. Yue. 1994. «Peptidic endothelin 1 receptor antagonist, BQ 123, and neuroprotection». Peptides, vol. 15, p. 467-9.

FISK, L., N.N. Nalivaeva et A.J. Turner. 2006. «Regulation of endothelin-converting enzyme-1 expression in human neuroblastoma cell». Exp Biol Med, vol. 231, p. 1048-53.

FORLONI, G., R. Chisa, S. Smioldo, L. Verga, M. Salmona, F. Taglivini et N. Angeretti. 1993. «Apoptosis mediated neurotoxicity induced by chronic application of β amyloid fragment 25-35». Neuroreport, vol. 4, p. 523-6.

FUKAMI, S, K. Watanabe, N. Iwata, J. Haraoka, B. Lu, N.P. Gerard, C. Gerard, P. Fraser, D. Westaway, P. St George-Hyslop et T.C. Saido. 2002. «Abeta-degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse brain: synaptic and axonal localization inversely correlating with Abeta pathology». Neurosci Res, vol. 43, p. 39-56.

FUNALOT, B., T. Ouimet, A. Claperon, C. Fallet, A. Delacourte, J. Epelbaum, T. Subkowski, N. Léonard, V. Cordon, J.P. David, P. Amouyel, J.C. Schwartz et N. Helbecque. 2004. «Endothelin-converting enzyme-1 is expressed in human cerebral cortex and protects against Alzheimer's disease». MolPsychiatry, vol. 9, p. 1122-8.

FUNATO, H., M. Yoshimura, K. Kusui, A. Jamaoka, K. Ishikawa, N. Ohkoshi, K. Namekata, R. Okeda et Y. Ihara. 1998. «Quantification of amyloid β -protein (A β) in the cortex during aging and in Alzheimer's disease». Am J Pathol, vol. 152, p. 1633-40.

GLENNER, G.G. et C.W. Wong. 1984. «Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein». Biochem Biophys Res Commun, vol. 120, p. 885-90.

GOATE, A, M.C. Chartier-Harlin, M. Mullan, J. Brown, F. Crawford, L. Fidani, L. Giuffra, A. Haynes, N. Irving, L. James, R. Mant, P. Newton, K. Rooke, P. Roques, C. Talbot, M. Pericak-Vance, A. Roses, R. Williamson, M. Rossor, M. Owen et J. Hardy. 1991. «Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease». Nature, vol. 349, p. 704-6.

GOLGABER, D., M.I. Lerman, O.W. McBride, U. Saffiotti et D.C. Gajdusek. 1987. «Characterisation and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease». Science, vol. 235, p. 877-80.

GOTO, K., H. Hama et Y. Kasuya. 1996. «Molecular pharmacology and pathophysiological significance of endothelin». Jpn J Pharmacol, vol. 72, p. 261-90.

GRAY, G.A. et D.J. Webb. 1996. «The endothelin system and its potential as therapeutic target in cardiovascular disease». Pharmacol Ther (Revue), vol. 72, p. 109-48.

HAMA, H., Y. Kasuya, T. Sakurai, G. Yamada, N. Suzuki, T. Masaki et K. Goto. 1997. «Role of the endothelin on rat astrocytic responses after acute brain damage». J Neurosci Res, vol. 47, p. 590-602.

HAMA, H., T. Sakurai, Y. Kasuya, M. Fujiki, T. Masaki et K. Goto. 1992. «Action of endothelin on rat astrocytes through the ET_B receptor». Biochem Biophys Res Commun, vol. 186, p. 355-62.

HARDY, J. 1997. «Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease». Trends Neurosci (Revue), vol. 20, p. 154-9.

HARDY, J. 1996. «New insights into the genetics of Alzheimer's disease». Ann Med, vol. 28, p. 255-8.

HASSELBLATT, M., P. Lewczuk, B. Löffler, H. Kamrowski-Kruck, N. Von Ahsen, A. Sirén et H. Ehrenreich. «Role of the astrocytic ET_B receptor in the regulation of extracellular endothelin-1 during hypoxia». GLIA, vol. 34, p. 18-26.

HEMMING, M.L. et D.J. Selkoe. 2005. «Amyloid β -protein is degraded by cellular angiotensin-converting enzyme (ACE) and elevated by an ACE inhibitor». J Biol Chem, vol. 280, p. 37644-50.

HOREJSI, B. et R. Ceska. 2000. «Apolipoprotein and atherosclerosis. Apolipoprotein E and apolipoprotein(a) as candidate genes of premature development of atherosclerosis». Physiol Res (Revue), vol. 49, p. 63-9.

HORI, S., Y. Komatsu, R. Shigemoto, N. Mizuno et S. Nakanishi. 1992. «Distinct tissue distribution and cellular localization of two messenger ribonucleic acids encoding different subtypes of rat endothelin receptors». Endocrinology, vol. 130, p. 1885-95.

HSIUNG, G.R., A.D. Sadovnick et H. Feldman. 2004. «Apolipoprotein E ϵ 4 genotype as a risk factor for cognitive decline and dementia: data from the Canadian study of health and aging». CMAJ, vol. 171, p. 863-7.

IGNATIUS, M.J., P.J. Gebicke-Harter, J.H. Skene, J.W. Shilling, K.H. Weisgraber, R.W. Mahley et E.M. Shooter. 1986. «Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration». Proc Natl Acad Sci USA, vol. 83, p. 1125-9.

INGUINBERT, N., H. Poras, F. Teffo, F. Beslot, M. Selkti, A. Tomas, E. Scalbert, C. Bennejean, P. Renard, M. Fournié-Zaluski et B. Roques. 2002. «N-[2-(Indian-1-yl)-3-mercapto-propionyl] amino acids as highly potent inhibitors of the three vasopeptidases (NEP, ACE, ECE): in vitro and in vivo activities». Bioorg Med Chem Lett, vol. 12, p. 2001-5.

INOUE, A., M. Yanagisawa, S. Kimura, Y. Kasuya, T. Miyauchi, K. Goto et T. Masaki. 1989. «The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes». Proc Natl Acad Sci USA, vol. 86, p. 2863-7.

IQBAL, K., I. Grundke-Iqbal, T. Zaidi, P.A. Merz, G.Y. Wen, S.S. Shaikh, H.M. Wisniewski, I. Alafuzoff et B. Winblad. 1986. «Defective brain microtubule assembly in Alzheimer's disease». Lancet, vol. 2, p. 421-6.

ISLAMOV, R.R., V. Chintalgattu, R.J. McMurray, E.S. Pak, A.K. Murashov et L.C. Katwa. 2003. «Differential expression of endothelin receptors in regenerating spinal motor neurons in mice». Mol Brain Res, vol. 116, p. 163-7.

IWATA, N., S. Tsubuki, Y. Takaki, K. Shirotani, B. Lu, N.P. Gerard, C. Gerard, E. Hama, H. Lee et T.C. Saido. 2001. «Metabolic regulation of brain A β by neprilysin». Science, vol. 292, p. 1550-2.

IWATA, N., S. Tsubuki, Y. Takaki, M. Watanabe, M. Sekiguchi, E. Hosoki, M. Kawashima-Morishima, H. Lee, E. Hama, Y. Sekine-Aizawa et T.C. Saido. 2000. «Identification of the major A β ₁₋₄₂-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition». Nat Med, vol. 6, p. 143-50.

KALTSCHMIDT, B., M. Uherek, B. Volk, P.A. Baeuerle et C. Kaltschmidt. 1997. «Transcription factor NF-kB is activated in primary neurons by amyloid β peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease». Proc Natl Acad Sci USA, vol. 94, p. 2642-7.

KANEMITSU, H., T. Tomiyama et H. Mori. 2003. «Human neprilysin capable of degrading amyloid β peptide not only in the monomeric form but also the pathological oligomeric form». Neurosci Letters, vol. 350, p. 113-6.

KARNIK, S.S., C. Gogonea, S. Patil, Y. Saad et T. Takezako. 2003. «Activation of G-proteins – coupled receptors: a common molecular mechanism». Trend in endocrinol and Metab (Revue), vol. 14, p. 431-7.

KIDD, M. 1963. «Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease». Nature, vol. 197, p. 192-3.

KITAGAWA, K., M. Matsumoto, K. Kuwabara, K. Takasawa, S. Tanaka, T. Sasaki, K. Matsushita, T. Ohtsuki, T. Yanagihara et M. Hori. 2002. «Protective effect of apolipoprotein E against ischemic neuronal injury is mediated through antioxidant action». J Neurosci Res, vol. 68, p. 226-32.

KLIPPER, E., N. Levy, T. Gilboa, L. Muller et R. Meidan. 2006. «Identification of a novel endothelin converting enzyme-1 lacking a transmembrane domain». Exp Biol Med, vol. 231, p. 723-8.

KOIZUMI, S., S. Kataoka, M. Niwa, K. Yamashita, K. Taniyama et Y. Kudo. 1994. «Endothelin increased [Ca²⁺]_i in cultured neurons and slices of rat hippocampus». Neuroreport, vol. 5, p. 1077-80.

LAMMICH, S., E. Kojro, R. Postina, S. Gilbert, R. Pfeiffer, M. Jasionowski, C. Haass et F. Fahrenholz. 1999. «Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of

Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease». Proc Natl Acad Sci USA, vol. 96, p. 3922-7.

LEE, M., S.M. de la Monte, S. Ng, K.D. Bloch et T. Quertermous. 1990. «Expression of the potent vasoconstrictor endothelin in the human central nervous system». J Clin Invest, vol. 86, p. 141-7.

LI, J., J. Ma et H. Potter. 1995. «Identification and expression analysis of a potential familial Alzheimer disease gene on chromosome 1 related to AD3». Proc Natl Acad Sci USA, vol. 92, p. 12180-4.

LINTON, M.F., R. Gish, S.T. Hubl, E. Butler, C. Esquivel, W.I. Bry, J.K. Boyles, M.R. Wardell et S.G. Young. 1991. «Phenotypes of apolipoprotein B and apolipoprotein E after liver transplantation». J Clin Invest, vol. 88, p. 270-81.

LONGPRE, F., P. Garneau, Y. Christen et C. Ramassamy. 2006. «Protection by EGb 761 against beta-amyloid-induced neurotoxicity: involvement of NF-kappaB, SIRT1, and MAPKs pathways and inhibition of amyloid fibril formation». Free Radic Biol Med, vol. 41, p. 1781-94.

LORENZO, A., B.A. Yankner. 1994. « β -Amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by Congo red». Proc Natl Acad Sci USA, vol. 91, p. 12243-47

MACCIONI, R.B., J.P. Munoz et L. Barbeito. 2001. «The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders». Arch Med Res (Revue), vol. 32, p. 367-81.

MACCUMBER, M.W., C.A. Ross et S.H. Snyder. 1990. «Endothelin in the brain: receptors, mitogenesis, and biosynthesis in glial cells». Proc Natl Acad Sci USA, vol. 87, p. 2359-63.

MAHLEY, R.W. 1988. «Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology». Science (Revue), vol. 240, p. 622-30.

MANDELKOW, E.M. et E. Mandelkow. 1998. «Tau in Alzheimer's disease». Trends Cell Biol (Revue), vol. 8, p. 425-7.

MASAKI, T. 2004. «Historical review: endothelin». Trends Pharmacol Sci, vol. 25, p. 219-24.

MASAKI, T. et M. Yanagisawa. 1992. «Endothelins». Essays Biochem (Revue), vol. 27, p. 79-89.

MASTERS, C.L., G. Simms, N.A. Weinman, G. Multhaup, D.L. McDonald et K. Beyereuther. 1985. «Amyloid plaque core protein in Alzheimer's disease and Down syndrome». Proc Natl Acad Sci USA, vol. 82, p. 4245-9.

MAURER, K., S. Volk et H. Gerbaldo. 1997. «Auguste D and Alzheimer's disease». Lancet, vol. 349, p. 1546-9.

- MILLER, D.L., I.A. Papayannopoulos, J. Styles, S.A. Bobin, Y.Y. Lin, K. Biemann et K. Iqbal. 1993. «Peptide compositions of the cerebrovascular and senile plaque core amyloid deposits of Alzheimer's disease». Arch Biochem Biophys, vol. 301, p. 41-52.
- MILLS, J. et P.B. Reiner. 1999. «Regulation of amyloid precursor protein cleavage». J Neurochem (Revue), vol. 72, p. 443-60.
- MOHAJERI, M.H., K. Kuehnle, H. Li, R. Poirier, J. Tracy et R.M. Nitsh. 2004. «Anti-amyloid activity of neprilysin in plaque-bearing mouse models of Alzheimer's disease». FEBS Lett, vol. 562, p. 16-21.
- NAIDOO, N., S. Naidoo, R. Mahabeer et D.M. Raidoo. 2004. «Cellular distribution of the endothelin system in the human brain». J Chem Neuroanat, vol. 27, p. 87-98.
- NAIDU, A., Q. Xu, R. Catalano et B. Cordell. 2002. «Secretion of apolipoprotein E by brain glia requires protein prenylation and is suppressed by statins». Brain Res, vol. 958, p. 100-11.
- NAMBA, Y., M. Tomonaga, H. Kawasaki, E. Otomo et K. Ikeda. 1991. «Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease». Brain Res, vol. 541, p. 163-6.
- NATHAN, B.P., S. Bellosta, D.A. Sanan, K.H. Weisgraber, R.W. Mahley et R.E. Pitas. 1994. «Differential effects of apolipoprotein E3 and E4 on neuronal growth in vitro». Science, vol. 264, p. 850-2.
- OHKITA, M., M. Takaoka, M. Sugii, Y. Shiota, R. Nojiri et Y. Matsumura. 2003. «The role of nuclear factor- κ B in the regulation of endothelin-1 production by nitric oxide». Eur J Pharmacol, vol. 472, p. 159-64.
- OHKITA, M., M. Takaoka, Y. Shiota, R. Nojiri et Y. Matsumura. 2002a. «Nitric oxide inhibits endothelin-1 production through the suppression of nuclear factor κ B». Clinical Sci (Lond.), vol. 103, p. 68-71.
- OHKITA, M., M. Takaoka, Y. Shiota, R. Nojiri, M. Sugii et Y. Matsumura. 2002b. «A nuclear factor- κ B inhibitor BAY 11-7082 suppresses endothelin-1 production in cultured vascular endothelial cells». Jap J Pharmacol, vol. 89, p. 81-4.
- OKADA, K., T. Miyazaki, J. Takada, K. Matsuyama, T. Yamaki et M. Yano. 1990. «Conversion of big endothelin-1 by membrane-bound metalloendopeptidase in cultured bovine endothelial cells». Biochem Biophys Res Commun, vol. 171, p. 1192-8.
- OPHIR, G., N. Amariglio, J. Jacob-Hirsch, R. Elkon, G. Rechavi et D.M. Michaelson. 2005. «Apolipoprotein E4 enhances brain inflammation by modulation of the NF- κ B signalling cascade». Neurobiol Dis, vol. 20, p. 709-18.

OUIMET, T. 2001. «Le catabolisme des peptides β -amyloïdes dans le cerveau : une nouvelle fonction pour la néprilysine». Médecine/Sciences, vol. 17, p. 1091-2.

OUIMET, T., P. Facchinetti, C. Rose, M. Bonhomme, C. Gros et J. Schwartz. 2000. «Neprilysin II: a putative novel metalloprotease and its isoforms in CNS and testis». Biochem Biophys Res Commun, vol. 271, p. 565-70.

PAASCHE, J.D., T. Attramadal, K. Kristiansen, M.P. Oksvold, H.K. Johansen, H.S. Huitfeldt, S.G. Dahl et H. Attramadal. 2005. «Subtype-specific sorting of the ET_A endothelin receptor by a novel endocytic recycling signal for G protein-coupled receptors». Mol Pharmacol, vol. 67, p. 1581-90.

PARIS, D., T. Town, T.A. Parker, J. Humphrey et M. Mullan. 1998. «Isoform-specific vasoconstriction induced by Apolipoprotein E and modulation of this effect by Alzheimer's β -amyloid peptide». Neurosci Letters, vol. 256, p. 73-6.

PINET, F. 2004. «À quoi sert le système endothéline ?». Médecine/Sciences, vol. 20, p. 339-45.

POIRIER, J. 1996. «Apolipoprotein E in the brain and its role in Alzheimer's disease». J Psychiatry Neurosci, vol. 21, p. 128-34.

POIRIER, J. 1994. «Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease». Trends Neurosci (Revue), vol. 17, p. 525-30.

POIRIER, J., J. Davignon, D. Bouthillier, S. Kogan, P. Bertrand et S. Gauthier. 1993. «Apolipoprotein E phenotype and Alzheimer's disease». Lancet, vol. 342, p. 697-9.

POIRIER, J., M. Hess, P.C. May et C.E. Finch. 1991. «Astrocytic apolipoprotein E mRNA and GFAP mRNA in hippocampus after entorhinal cortex lesioning». Mol Brain Res, vol. 11, p. 97-106.

PUTTFACKEN, P.S., A.M. Manelli, M.T. Falduto, G.S. Getz et M.J. LaDu. 1997. «Effect of apolipoprotein E on neurite outgrowth and beta-amyloid-induced toxicity in developing rat primary hippocampal cultures». J Neurochem, vol. 68, p. 760-9.

QIU, W.Q. et M.F. Folstein. 2006. «Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis». Neurobiol Aging (Revue), vol. 27, p. 190-8.

QUEHENBERGER, P., A. Bierhaus, C. Mueller, M. Klevesath, M. Hong, G. Stier, M. Sattler, E. Schleicher, W. Speiser et P.P. Nawroth. 2000. «Endothelin-1 transcription is controlled by nuclear factor- κ B in age-stimulated cultured endothelial cells». Diabetes, vol. 49, p. 1561-70.

RAMASSAMY, C., P. Krzywkowski, D. Averill, S. Lussier-Cacan, L. Theroux, Y. Christen, J. Davignon et J. Poirier. 2001. «Impact of apoE deficiency on oxidative insults and antioxidant levels in the brain». Brain Res Mol Brain Res, vol. 86, p. 76-83.

RAMASSAMY, C., D. Averill, U. Beffert, L. Theroux, S. Lussier-Cacan, J.S. Cohn, Y. Christen, A. Schoofs, J. Davignon et J. Poirier. 2000. «Oxidative insults are associated with apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease brain». Neurobiol Dis, vol. 7, p. 23-37.

RAMASSAMY, C., D. Averill, D. Beffert, S. Bastianetto, L. Theroux, S. Lussier-Cacan, J.S. Cohn, Y. Christen, J. Davignon, R. Quirion et J. Poirier. 1999. «Oxidative damage and protection by antioxidant in the frontal cortex of Alzheimer's disease is related to the apolipoprotein E genotype». Free Radic Biol Med, vol. 27, p. 544-53.

ROBAKIS, N.K., N. Ramakrishna, G. Wolfe et H.M. Wisniewski. 1987. «Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides». Proc Natl Acad Sci, vol. 84, p. 4190-4.

ROGAEV, E., R. Sherrington, E.A. Rogaeva, G. Levesques, M. Ikeda, Y. Llang, H. Chi, C. Lin, K. Holman, T. Tsuda, L. Mar, S. Sorbi, B. Nacmias, S. Placentini, L. Amaducci, I. Chumakov, D. Cohen, L. Lannfelt, P.E. Fraser, J.M. Rommens et P. St George-Hyslop. 1995. «Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related on the Alzheimer's disease type 3 gene». Nature, vol. 376, p. 775-8.

ROGERS, S.D., C.M. Peters, J.D. Pomonis, H. Hagiwara, J.R. Ghilardi et P.W. Mantyh. 2003. «Endothelin B receptors are expressed by astrocytes and regulate astrocytes hypertrophy in the normal and injured CNS». GLIA, vol. 41, p. 180-190.

ROGERS, S.D., E. Demaster, M. Catton, J.R. Ghilardi, L.A. Levin, J.E. Maggio et P.W. Mantyh. 1997. «Expression of endothelin-B-receptors by glia *in vivo* is increased after CNS injury in rats, rabbits and humans». Exp Neurol, vol. 145, p. 180-195.

ROSES, A.D. 1996. «Apolipoprotein E in neurology». Curr Opin Neurol (Revue), vol. 9, p. 265-70.

ROSSNER, S., U. Ueberham, R. Schliebs, J.R. Perez-Polo et V. Bigl. 1998. «The regulation of amyloid precursor protein metabolism by cholinergic mechanisms and neurotrophin receptor signalling». Prog Neurobiol (Revue), vol. 56, p. 541-69.

ROUX, S., V. Breu, T. Giller, W. Neidhart, H. Ramuz, P. Coassolo, J.P. Clozel et M. Clozel. 1997. «Ro 61-1790, a new hydrosoluble endothelin antagonist: general pharmacology and effects on experimental cerebral vasospasm». J Pharmacol Exp Ther, vol. 283, p. 1110-18.

RUBANYI, G.M. et M.A. Polokoff. 1994. «Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology and pathophysiology». Pharmacol Rev (Revue), vol. 46, p. 325-415.

RUSSO, C., G. Angelini, D. Dapino, A. Piccini, G. Piombo, G. Schettini, S. Chen, J.K. Teller, D. Zaccheo, P. Gambetti et M. Tabaton. 1998. «Opposite roles of

apolipoprotein E in normal brains and in Alzheimer's disease». Proc Natl Acad Sci USA, vol. 95, p. 15598-602.

SANTELLA, L. et E. Carafoli. 1997. «Calcium signalling in the cell nucleus». FASEB J, vol. 11, p. 1091-1109.

SAKAMOTO, A., M. Yanagisawa, T. Sawamura, T. Enoki, T. Ohtani, T. Sakurai, K. Nakao, T. Toyooka et T. Masaki. 1993. «Distinct subdomains of human endothelin receptors determine their selectivity to endothelin A-selective antagonist and endothelin B-selective agonists». J Biol Chem, vol. 268, p. 8547-53.

SAKURAI, T., M. Yanagisawa, Y. Takawa, H. Miyazaki, S. Kimura, K. Goto et T. Masaki. 1990. «Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor». Nature, vol. 348, p. 732-5.

SATO, M. et L.J. Noble. 1998. «Involvement of the endothelin receptor subtype A in neuronal pathogenesis after traumatic brain injury». Brain Res, vol. 809, p. 39-49.

SCHELLENBERG, G. 1992. «Genetic linkage for a novel familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14». Science, vol. 258, p. 868-71.

SCHMECHEL, D.E., A.M. Saunders, W.J. Strittmatter, B.J. Crain, C.M. Hulette, S.H. Joo, M.A. Pericak-Vance, D. Goldgaber et A.D. Roses. 1993. «Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease». Proc Natl Acad Sci USA, vol. 90, p. 9649-53.

SCHNEIDER, J.A., J.L. Bienias, R.S. Wilson, E. Berry-Kravis, D.A. Evans et D.A. Bennet. 2005. «The Apolipoprotein E $\epsilon 4$ allele increases the odds of chronic cerebral infarction detected at autopsy in older persons». Stroke, vol. 36, p. 954-9.

SELKOE, D.J. 2004. «Alzheimer's disease: mechanistic understanding predicts novel therapies». Ann Intern Med (Revue), vol. 140, p. 627-38.

SEN, R. et D. Baltimore. 1986. «Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a post-translational mechanism». Cell, vol. 47p. 921-8.

SHORE, B. et V. Shore. 1972. «Structure of normal and pathological lipoproteins». Expos Annu Biochim Med, vol. 31, p. 4-12.

SIESJO, B. K. 1988. «Historical overview: calcium, ischemia and death of brain cells». Ann NY Acad Sci, vol. 522, p. 638-61.

SISODIA, S.S., E.H. Koo, K. Beyreuther, A. Unterbeck et D.L. Price. 1990. «Evidence that β -amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing». Science, vol. 248, p. 492-5.

SOKOLOVSKY, M. 1995. «Endothelin receptor subtypes and their role in transmembrane signalling mechanisms». Pharmacol Ther (Revue), vol. 68, p. 435-71.

- STRITTMATTER, W.J., A.M. Saunders, D. Schmechel, M. Pericak-Vance, J. Englund, G.S. Salvesen et A.D. Roses. 1993. «Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease». Proc Natl Acad Sci USA, vol. 90, p. 1977-81.
- TAKAGI, Y., H. Ninomiya, A. Sakamoto, S. Miwa et T. Masaki. 1995. «Structural basis of G protein specificity of human endothelin receptors. A study with endothelin A/B chimeras». J Biol Chem, vol. 270, p. 10072-8.
- TAKAHASHI, M., M.A. Ghatge, P.M. Jones, J.K. Murphy, H.C. Lam, D.J. O'Halloran et S.R. Bloom. 1991. «Endothelin in human brain and pituitary gland: presence of immunoreactive endothelin, endothelin messenger ribonucleic acid, and endothelin receptors». J Clin Endocrinol Metab, vol. 72, p. 693-9.
- TANZI, R.E., D.M. Kovacs, T.W. Kim, R.D. Moir, S.Y. Guenette et W. Wasco. 1996. «The gene defects responsible for familial Alzheimer's disease». Neurobiol Dis (Revue), vol. 3, p. 159-68.
- TANZI, R.E., A.I. McClatchy, E.D. Lamperti, L. Villa-Komaroff, J.F. Gusella et R.L. Neve. 1988. «Protease inhibitor domain encoded by an amyloid precursor mRNA associated with Alzheimer's disease». Nature, vol. 331, p. 528-30.
- TANZI, R.E., J.F. Gusella, P.C. Watkins, G.A. Bruns, P. St George-Hyslop, M.L. Van Keuren, D. Patterson, S. Pagan, D.M. Kurnit et R.L. Neve. 1987. «Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus». Science, vol. 235, p. 880-4.
- TERAI, K., A. Matsuo et P.L. McGeer. 1996. «Enhancement of immunoreactivity for NF- κ B in the hippocampal formation and cerebral cortex of Alzheimer's disease». Brain Res, vol. 735, p. 159-68.
- TURNER, P.R., K. O'Connor, W.P. Tate et W.C. Abraham. 2003. «Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory». Prog Neurobiol (Revue), vol. 70, p. 1-32.
- UEDA, K., T. Yagami, H. Kageyama et K. Kawasaki. 1996. «Protein kinase inhibitor attenuates apoptotic cell death induced by amyloid β protein in culture of the rat cerebral cortex». Neurosci Lett, vol. 203, p. 175-8.
- UESUGI, M., Y. Kasuya, K. Hayashi et K. Goto. 1998. «SB209670, a potent endothelin receptor antagonist, prevents or delays axonal degeneration after spinal cord injury». Brain Res, vol. 786, p. 235-9.
- UESUGI, M., Y. Kasuya, H.Hama, M. Yamamoto, K. Hayashi, T. Masaki et K. Goto. 1996. «Endogenous endothelin initiates astrocytic cell growth after spinal cord injury». Brain Res, vol. 728, p. 255-9.

- VAN GASSEN, G., W. Annaert et C. Van Broeckhoven. 2000. «Binding partners of Alzheimer's disease proteins: are they physiologically relevant?». Neurobiol Dis (Revue), vol. 7, p. 135-51.
- VASSAR, R. 2002. «Beta-secretase (BACE) as a drug target for Alzheimer's disease». Adv Drug Deliv (Revue), vol. 54, p. 1589-602.
- WANG, D., N. Iwata, E. Hama, T.C. Saido et D.W. Dickson. 2003. «Oxidized neprilysin in aging and Alzheimer's disease brains». Biochem Biophys Res Commun, vol. 310, p. 236-41.
- WHITE, F., J.A. Nicoll et K. Horsburgh. 2001. «Alterations in ApoE and ApoJ in relation to degeneration and regeneration in a mouse model of entorhinal cortex lesion». Exp Neurol, vol. 169, p. 307-18.
- WICKELGREN, I. 1998. «Tracking insulin to the mind». Science, vol. 280, p. 517-19.
- WILLETTE, R.N., C.F. Sauermelech, M. Ezekiel, G. Feuerstein et E.H. Ohlstein. 1990. «Effect of ET on cortical microvascular perfusion in rats». Stroke, vol. 21, p. 451-8.
- YAGAMI, T., K. Ueda, T. Sakaeda, N. Okamura, H. Nakazato, T. Kuroda, S. Hata, G. Sakaguchi, N. Itoh, Y. Hashimoto et M. Fujimoto. 2005. «Effects of an endothelin B receptor agonist on secretory phospholipase A₂-IIA, induced apoptosis in cortical neurons». Neuropharmacol, vol. 48, p. 291-300.
- YAGAMI, T., K. Ueda, K. Asakura, T. Kunoda, S. Hata, T. Sakaeda, Y. Kambayashi et M. Fujimoto. 2002. «Effects of endothelin B receptor agonists on amyloid β protein (25-35)-induced neuronal cell death». Brain Res, vol. 948, p. 72-81.
- YAMADA, G., H. Hama, Y. Kasuya, T. Masaki et K. Goto. 1995. «Possible sources of endothelin 1 in damaged rat brain». J Cardiovasc Pharmacol, vol. 26, p. 448-51.
- YANAGISAWA, M., A. Inoue, T. Ishikawa, Y. Kasuya, S. Kimura, S. Kumagaye, K. Nakajima, T.X. Watanabe, S. Sakakibara, K. Goto. 1988. «Primary structure, synthesis and biological activity of rat endothelin, an endothelium-derived vasoconstrictor peptide». Proc Natl Acad Sci USA, vol. 85, p. 6964-67.
- YANKNER, B.A., L.K. Duffy et D.A. Kirschner. 1990. «Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides». Science, vol. 250, p. 279-82.
- YUE, T.L., M.M. Gleason, P.G. Lysko et G. Feuerstein. 1990. «Effect of endothelins on cytosolic free calcium concentration in neuroblastoma Ng108-15 and NCB-20 cells». Neuropep, vol. 17, p. 7-12.
- ZHANG, W.W., T. Badonic, A. Hoog, M.H. Jiang, K.C. Ma, X.J. Nic et Y. Olsson. 1994. «Astrocytes in Alzheimer's disease express immunoreactivity to the vasoconstrictor endothelin-1». J Neurol Sci, vol. 122, p. 90-6.

ZHAO, W., H. Chen, H. Xu, E. Moore, N. Meiri, M.J. Quon et D.L. Alkon. 1999.
«Brain insulin receptors and spatial memory». J Biol Chem, vol. 274, p. 34893-902.