

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE**

PAR

SYLVIE GÉLINAS

**ANALYSE STRUCTURALE DES NEUROFILAMENTS ET LEUR
IMPLICATION DANS LES MALADIES NEURODÉGÉNÉRATIVES**

DÉCEMBRE 1998

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

"La meilleure façon de ne pas avancer est de suivre une idée fixe."

Jacques Prévert

RÉSUMÉ

Les éléments du cytosquelettes, en particulier les neurofilaments (NFs), sont endommagés dans les maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique. Les NFs appartiennent à la famille des filaments intermédiaires et ils sont composés de 3 sous-unités soit NF-H , NF-M et NF-L. Ces sous-unités sont caractérisées par un motif commun : un domaine amino-terminal, un domaine central formé de 3 tronçons en hélice α et un domaine carboxy-terminal formé de séquences répétitives lysine-sérine-proline de taille variable pour chaque sous-unité. De plus, les sous-unités NF-H et NF-M sont particulièrement phosphorylés au niveau du domaine carboxy-terminal. D'autre part, les espèces radicalaires et les dérivés actifs de l'oxygène sont des molécules très réactives qui déstabilisent les neurones et leurs organites. Les radicaux libres attaquent les différentes composantes cellulaires (protéines, lipides et acides nucléiques). Il a été démontré que les différentes réactions d'oxydations ciblent certains acides aminés plutôt que d'autres.

Durant mon projet de maîtrise, je me suis intéressée particulièrement à l'analyse structurale des NFs suite à un stress oxydatif. Mes résultats obtenus par différentes techniques (spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, gels d'électrophorèse et immunoblots) ont démontré que les NFs présentent des sites potentiels pour les attaques radicalaires. En effet, ces travaux ont montré des modifications structurales des NFs de rats suite à une exposition à des substances oxydantes. Nous avons utilisé différents systèmes oxydatifs : les catéchols et le système fer/ascorbate. Ces systèmes sont retrouvés *in vivo* et sont de plus en plus associés à certaines maladies neurodégénératives. De plus, j'ai démontré que la phosphorylation a pour effet de stabiliser les NFs lors d'une attaque radicalaire. En conclusion, mes recherches ont mis en évidence que les neurofilaments sont très sensibles aux dommages associés au stress oxydatif et que ce dernier pourrait être impliqué dans la pathogénèse de certaines maladies neurodégénératives dont la maladie de Parkinson.

REMERCIEMENTS

Un projet, c'est d'abord une hypothèse, une idée que l'on a envie d'exploiter. Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance envers mon directeur de maîtrise, le docteur Maria-Grazia Martinoli pour m'avoir prise sous son aile et m'avoir donnée une idée à développer. Je la remercie aussi de m'avoir initiée à la recherche, de m'avoir partagé ses nombreuses connaissances tant théoriques que pratiques ainsi que pour son dévouement irréprochable.

Je tiens également à remercier certaines personnes ayant joué un rôle important dans la réalisation de mon projet. Je pense aux docteurs Claude Gicquaud, Camille Chapados et Louis Cossette qui sont intervenus à différents moments tous aussi importants les uns que les autres. Merci au professeur Claude Gicquaud de m'avoir initiée à la microscopie électronique. Merci au professeur Camille Chapados qui a passé de longues heures à m'enseigner les rudiments de la spectroscopie infrarouge. Merci aussi au docteur Louis Cossette pour son support technique et ses précieux conseils.

J'aimerais aussi exprimer toute ma gratitude envers mes amis et collègues de travail Nadine, Joël, Meghan, les deux Isabelle, Christophe, Jocelyn, Steve, Serge, Philippe, Luc, Othman ainsi que tous les autres pour leurs conversations enrichissantes et leur amitié. J'aimerais aussi remercier mon copain Eric pour son support moral et ses encouragements. Merci de croire en moi.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	III
REMERCIEMENTS.....	V
TABLE DES MATIÈRES.....	VI
LISTE DES TABLEAUX.....	IX
LISTE DES FIGURES.....	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XI
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1. LA MALADIE DE PARKINSON.....	3
<i>1.1.1 Traits pathologiques de la maladie de Parkinson avec ou sans démence.....</i>	4
<i>1.1.2 Problématique du stress oxydatif dans le développement de la maladie de Parkinson.....</i>	5
1.2. PATHOGÉNÈSE DES CORPS DE LEWY	7
<i>1.2.1 Description générale des corps de Lewy</i>	8
1.2.1.1 Morphologie des corps de Lewy en microscopie optique.....	8
1.2.1.2 Aspect des corps de Lewy en microscopie électronique	10
<i>1.2.2 Fonction biologique des corps de Lewy</i>	10
<i>1.2.3 Hypothèse sur la biogénèse des corps de Lewy.....</i>	13
<i>1.2.4 Pathogénèse des corps de Lewy.....</i>	14
1.3 LES NEUROFILAMENTS.....	15
<i>1.3.1 Généralités.....</i>	15
1.3.1.1 Expression des filaments intermédiaires.....	16
1.3.1.2 Organisation structurale des filaments intermédiaires.....	16
<i>1.3.2 Les neurofilaments.....</i>	18
1.3.2.1 Assemblage.....	18
1.3.2.2 Composition et séquence	19
1.3.2.3 Les domaines des différents isoformes	23

1.3.2.4 Les sites de phosphorylation	25
1.3.2.5 Interaction des neurofilaments avec les autres composantes cellulaires.....	25
1.3.2.6 Modifications post-traductionnelles des neurofilaments.....	26
1.3.2.7 Rôle de la phosphorylation du domaine carboxy-terminal	28
1.4 DOMMAGES ASSOCIÉS AU STRESS OXYDATIF	29
1.4.1 <i>Rôle des radicaux libres en biologie et en médecine</i>	30
1.4.1.1 Nature des dérivés actifs d'oxygène.....	31
1.4.2 <i>Protéines modifiées par les radicaux libres</i>	31
1.4.3 <i>Formation et élimination des espèces réactives</i>	32
1.4.3.1 Rôle des catécholamines dans la production de radicaux libres.....	32
1.4.3.2 Rôle des métaux de transitions dans les réactions d'oxydations	35
1.4.3.3 Mécanismes de défense enzymatique.....	39
1.4.4 <i>Pathobiologie liée aux radicaux libres</i>	40
1.5 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE	41
CHAPITRE 2 MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	43
2.1 MATÉRIELS	43
2.2 PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX.....	44
2.2.1 <i>Purification des neurofilaments</i>	44
2.2.2 <i>Dosage de protéines par spectroscopie UV-visible</i>	46
2.2.3 <i>Traitements des neurofilaments</i>	46
2.2.4 <i>Microscopie électronique</i>	47
2.2.5 <i>Gel d'électrophorèse SDS-Page</i>	48
2.2.6 <i>Analyse par transfert western</i>	48
2.3. LA SPECTROSCOPIE INFRAROUGE À TRANSFORMÉE DE FOURIER	49
2.3.1 <i>Définition de la spectroscopie infrarouge</i>	50
2.3.2 <i>Principe de base</i>	51
2.3.3 <i>Transformation des interférogrammes en spectres</i>	53
2.3.4 <i>Équipement et paramètres utilisés</i>	53
2.3.5 <i>Préparation de l'échantillon</i>	54
2.3.6 <i>Traitement des données</i>	54
CHAPITRE 3 RÉSULTATS	57
3.1 ANALYSE DE L'ORGANISATION DES NEUROFILAMENTS PAR MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À TRANSMISSION	58
3.2 ANALYSE DES GELS SDS-PAGE ET IMMUNOBLOTS.....	60

3.3 ÉTUDE DU STRESS OXIDATIF SUR LES NFs PAR FTIR.....	64
3.3.1 Étude de la structure des NFs phosphorylés et déphosphorylés.....	65
3.3.2 Oxydation des NFs par le système MCO	69
3.3.3 Oxydation des NFs déphosphorylés.....	71
CHAPITRE 4 DISCUSSION.....	75
4.1 ANALYSE DES RÉSULTATS.....	75
4.1.1 Modifications structurales des NFs suite à leur oxydation.....	76
4.1.2 Modifications structurales des NFs déphosphorylés ayant subi un stress oxydatif.....	78
4.1.3 Rôle de la phosphorylation dans la stabilité des NFs.....	79
4.1.4 Rôle du stress oxydatif dans les maladies neurodégénératives.....	80
CONCLUSION.....	83
BIBLIOGRAPHIE.....	85

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Systèmes d'oxydations catalysés par les métaux.....	39
Tableau 2. Fréquences et description des bandes amides	54
Tableau 3. Position des bandes ir des NFs.....	77

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. COUPE TRANSVERSALE DE MÉSENCÉPHALE	7
FIGURE 2. PHOTO ILLUSTRANT UN CORPS DE LEWY EN MICROSCOPIE OPTIQUE.....	9
FIGURE 3. HYPOTHÈSE DE LA BIOGÉNÈSE DES CORPS DE LEWY	14
FIGURE 4. COMPARAISON DE LA STRUCTURE D'UNE VARIÉTÉ DE FI.....	17
FIGURE 5. MODÈLE D'ASSEMBLAGE DES FI.....	20
FIGURE 6. REPRÉSENTATION DES ARRANGEMENTS POSSIBLES ENTRE LES SOUS-UNITÉS POUR FORMER LE FILAMENT.....	21
FIGURE 7. REPRÉSENTATION DE LA COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS POUR CHAQUE SOUS-UNITÉS DE NFs..	22
FIGURE 8. STRUCTURE DES SOUS-UNITÉS DE NEUROFILAMENTS.....	24
FIGURE 9. FORMATION DE QUINONE À PARTIR DE LA DOPAMINE	33
FIGURE 10. TECHNIQUE DE PURIFICATION DES NEUROFILAMENTS PAR FLOTTAISON D'AXONES	45
FIGURE 11. SHÉMA ILLUSTRANT LES DIFFÉRENTES ÉTAPES DE TRAITEMENTS MATHÉMATIQUES POUR L'ANALYSE SPECTRALE DES ÉCHANTILLONS	56
FIGURE 12. MICROGRAPHIE DE NEUROFILAMENTS PAR COLORATION NÉGATIVE.....	59
FIGURE 13. GEL SDS-PAGE, 7.5% ACRYLAMIDE COLORÉ AU BLEU DE COOMASSIE.....	62
FIGURE 14. ANALYSE PAR GEL D'ÉLECTROPHORÈSE 7.5 % ACRYLAMIDE COLORÉ AU BLEU DE COOMASSIE... ..	63
FIGURE 15. RÉSULTAT DU TRANSFERT WESTERN.....	64
FIGURE 16. SPECTRE FTIR DE NFs DE RATS PHOSPHORYLÉS ET DÉPHOSPHORYLÉS.....	67
FIGURE 17. MODIFICATION DE LA CHAÎNE LATÉRALE DES ACIDES AMINÉS LORS DE LA DÉPHOSPHORYLATION. ..	68
FIGURE 18. OXYDATION DES NFs VIA LE SYSTÈME MCO.....	70
FIGURE 19. EXEMPLES DE DÉRIVÉS CARBONYLES OBTENUS SUITE À UNE RÉACTION D'OXYDATION SUR CERTAINS ACIDES AMINÉS.....	71
FIGURE 20. EFFET DU STRESS OXYDATIF SUR DES NFs DÉPHOSPHORYLÉS	73

LISTE DES ABRÉVIATIONS

μl: microlitre

APP: Protéine précurseur de l'amyloïde

CAT: catalase

FI: filament intermédiaire

FTIR: infrarouge à transformée de Fourier

g: force centrifuge

GFAP: protéine gliale fibrillaire acide

GPO: glutathione peroxydase

kD: kilodalton

LB(s): Corps de Lewy (Lewy body(ies))

L-Dopa: Levodopa

MCO: oxydation catalysée par les métaux

MCP: protéase multicatalytique (multicatalytic protease)

mM: Millimolaire (millimole par litre)

NAC: N-acetyl-cystéine

NAL: N-acetyl-lysine

NF(s): neurofilament(s)

NF-H: isoforme de haut poids moléculaire

NF-L: isoforme de bas poids moléculaire

NF-M: isoforme de poids moléculaire moyen

•OH: radical hydroxyle

P.M.: poids moléculaire

PD: maladie de Parkinson (Parkinson Disease)

PK: protéine kinase

SDS: sodium dodecyl sulfate

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

Les différentes études menées jusqu'à ce jour ont permis d'établir de façon précise les caractéristiques cliniques et pathologiques d'un bon nombre de maladies neurodégénératives. Des études approfondies sur les lésions observées permettent aujourd'hui d'identifier plusieurs maladies neurodégénératives en leur associant des marqueurs histopathologiques très caractéristiques. Différents travaux ont montré que les maladies du système nerveux étaient souvent accompagnées d'altérations de certains éléments fibrillaires à l'intérieur de la cellule nerveuse. L'altération la mieux connue est la dégénérescence neurofibrillaire et résulte d'une modification dans l'organisation des éléments fibrillaires retrouvés dans le cytoplasme de la cellule neuronale. Ce genre de modification est observé dans la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique, la maladie de Parkinson et dans plusieurs autres affections du système nerveux.

Les éléments du cytosquelette neuronal sont impliqués dans plusieurs processus cellulaires comme le maintien de la structure tridimensionnelle de la

cellule, la locomotion, la mitose et la sécrétion. Cette altération dans l'intégrité du cytosquelette neuronal fait toujours l'objet d'études dans le but de mieux comprendre toute la pathogénèse liée au développement des maladies neurodégénératives. Les éléments du cytosquelette les plus souvent en cause sont des protéines appartenant à la classe des filaments intermédiaires: les neurofilaments. En fait, on observe la présence de neurofilaments endommagés dans plusieurs lésions du système nerveux et dans différents types d'inclusions neuronales dont le corps de Lewy. Mes travaux de maîtrise s'intéressent principalement aux neurofilaments et ce dans un but très précis: mieux comprendre de quelle manière les neurofilaments contribuent à la formation des corps de Lewy.

La première section de ce chapitre vise à mettre en évidence l'intérêt physiologique d'une telle étude. Elle décrit la maladie de Parkinson et démontre le rôle du stress oxydatif dans la progression de cette maladie. La seconde section décrit les corps de Lewy, leur fonction biologique et les mécanismes susceptibles de participer à leur formation. La troisième section décrit les neurofilaments afin de permettre au lecteur de bien comprendre le rôle de ces protéines dans la cellule nerveuse et pourquoi elles semblent être une cible préférentielle dans plusieurs affections du système nerveux. Finalement, la dernière section met en lumière le rôle du stress oxydatif dans les maladies neurodégénératives et vise essentiellement à identifier les différents dommages

cellulaires liés au stress oxydatif et d'établir les liens avec les processus de dégénérescences.

1.1. La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est liée à une dégénérescence progressive des neurones contenant de la dopamine, principalement localisés dans la substance noire du mésencéphale. Les manifestations cliniques de cette maladie incluent le tremblement de repos, la rigidité musculaire, la bradikinésie (lenteur des mouvements) et l'instabilité posturale. Le remplacement de la dopamine par l'administration de son précurseur, la lévodopa (L-dopa), renverse les symptômes cliniques majeurs de la maladie de Parkinson, du moins initialement. La difficulté dans l'initiation des mouvements (akinésie), la bradikinésie, la rigidité et l'instabilité posturale sont très améliorées par le traitement avec la L-dopa. Mais, le traitement à long terme avec la L-dopa apporte des effets secondaires, aussi, sinon plus incapacitants que la maladie de Parkinson. Après quelques années, la plupart des patients traités avec la L-dopa expérimentent des fluctuations de leur fonction motrice. La tolérance se manifestant par un raccourcissement dans la durée de l'action antiparkinsonienne de la lévodopa et des mouvements involontaires appelés dyskinésies sont observées. Il s'avère donc nécessaire d'approfondir la pathophysiologie de la maladie de Parkinson en vue d'une stratégie thérapeutique plus efficace.

1.1.1 Traits pathologiques de la maladie de Parkinson avec ou sans démence.

La pathologie de la maladie de Parkinson (PD) est caractérisée par une perte neuronale et par la présence de corps de Lewy (LBs) à des sites précis du système nerveux. Durant l'évolution de la maladie, un patron caractéristique se développe dans les systèmes nerveux central et périphérique, avec une affection prédominante des structures afférentes corticales.

La maladie de Parkinson est caractérisée par une atteinte systématique de certaines structures nerveuses: une perte neuronale d'intensité variable ainsi que l'apparition d'une inclusion caractéristique, le corps de Lewy, sont observées. Les lésions des formations pigmentées du tronc cérébral sont constantes. À l'examen macroscopique, la substance noire apparaît pâle; cette dépigmentation, le plus souvent bilatérale et symétrique, est plus marquée à la partie centrale de la substance noire. La perte neuronale d'intensité variable, mais souvent sévère, est systématique; elle prédomine sur la zone compacte (*zona compacta*) et respecte relativement les groupes cellulaires médians et latéraux. Elle s'accompagne d'une libération de pigment mélanique, épars dans le parenchyme nerveux ou repris par des macrophages. La prolifération astrocytaire et microgliale, fonction de la déperdition neuronale, est généralement plus modérée. Des corps de Lewy sont observés dans la plupart des cas. Le *locus coeruleus*, source principale de l'innervation noradrénergique

du système nerveux central montre une raréfaction neuronale, des pigments mélаниques extraneuronaux, une gliose et des corps de Lewy. Les mêmes altérations sont présentes dans le noyau dorsal du vague. Certaines structures non pigmentées sont également altérées au cours de la maladie.

Bien que la distribution des corps de Lewy et des inclusions neuritiques soit légèrement irrégulière, il existe un patron caractéristique des lésions typiques de la maladie de Parkinson. Chez tous les sujets, on retrouve de la mélanine extraneuronale, de la gliose et des corps de Lewy au niveau de la substance noire (*substantia nigra*). Ces lésions sont associées avec une perte, légère à sévère, de neurones pigmentés (figure 1). Des corps d'inclusions pâles sont souvent présents. Dans le néocortex, on retrouve un nombre de corps de Lewy corticaux qui peut être assez variable. Dans l'amygdale, on retrouve des corps de Lewy corticaux et des inclusions neuritiques distribués de façon très spécifique autour des noyaux.

1.1.2 Problématique du stress oxydatif dans le développement de la maladie de Parkinson.

Le stress oxydatif dans la maladie de Parkinson peut provenir du métabolisme de la dopamine. L'auto-oxydation de la dopamine produit les semiquinones, qui sont elles-mêmes toxiques, et peuvent former des espèces

réactives d'oxygène. (Olanow & Arendash, 1994). De plus, le métabolisme de la dopamine génère également du peroxyde d'hydrogène.

Les radicaux libres sont impliqués dans la maladie de Parkinson (Jenner, 1996) parce que: (1) le turnover de la dopamine est augmenté dans les neurones survivants avec une augmentation résultante de H₂O₂; (2) les niveaux de glutathione réduit et total sont diminués dans la substance noire compacte (SNC) suggérant une diminution de la protection contre la formation de radical hydroxyle (OH⁻); (3) la concentration en fer est augmentée dans la SNC, ce qui augmente la probabilité d'interactions avec le H₂O₂ et la formation de radical hydroxyle; (4) la peroxydation lipidique est augmentée dans la SNC. Ces résultats indiquent que dans la maladie de Parkinson, la SNC est dans un état de stress oxydatif.

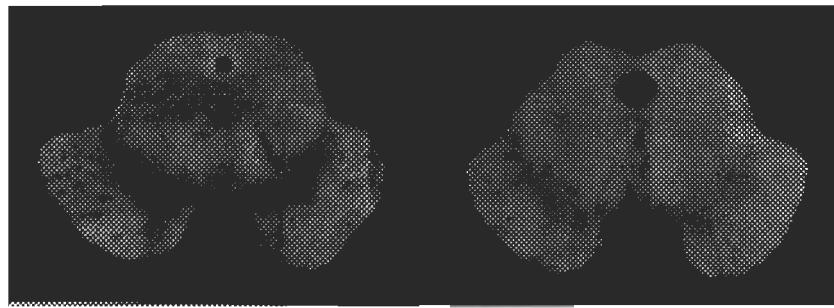


Figure 1. Coupe transversale de Mésencéphale. La coupe de gauche montre la présence de la pigmentation typique de la substance noire que l'on retrouve chez le sujet normal. La coupe de droite montre l'absence de pigmentation due à la mort des neurones dopaminergiques chez le sujet atteint de la maladie de Parkinson (communication privée).

1.2. Pathogénèse des corps de Lewy.

Les corps de Lewy sont observés dans tous les cas de maladie de Parkinson. Cependant, ils ne constituent pas un marqueur histologique propre à cette maladie. En effet, les corps de Lewy sont observés dans certaines autres maladies neurodégénératives. Les corps de Lewy sont des inclusions intra-neuronales dont l'aspect est variable selon qu'on les retrouve dans le péricaryon ou dans les prolongements cellulaires, dans le tronc cérébral, les ganglions sympathiques ou le cortex.

1.2.1 Description générale des corps de Lewy

1.2.1.1 Morphologie des corps de Lewy en microscopie optique

En microscopie optique, c'est dans la SNC que leur aspect est le plus caractéristique. Ils sont localisés dans le pérkaryon et refoulent le noyau et le pigment mélanique (figure 2). Ils sont généralement arrondis, parfois ovalaires et ils ont un cœur dense acidophile entouré d'un halo périphérique peu ou pas colorable quelque soit la méthode utilisée. La zone centrale est parfois homogène mais peut aussi présenter un centre plus coloré. On observe le plus souvent un seul corps de Lewy par cellule mais il arrive parfois d'en voir deux ou plusieurs. Dans le noyau basal de Meynert et le noyau dorsal du vague, le *locus caeruleus*, l'hypothalamus et surtout les ganglions, on retrouve, en plus des corps de Lewy typiques dans le pérkaryon des neurones, des inclusions hyalines acidophiles avec des contours et un halo moins nets et de forme allongée localisées dans les prolongements cellulaires (Forno, 1969; Forno, 1986). Ces inclusions appelées "Lewy neurites" sont similaires aux corps de Lewy.

Les colorations histologiques ou histo chimiques montrent que la composition des corps de Lewy est essentiellement protéique. Ils ne contiennent pas d'acide désoxyribonucléique, d'hydrates de carbone complexes, de lipides neutres, d'amylose, de fer ou de plomb. La présence de

sphyngomyéline a été notée par certains chercheurs mais demeure plus ou moins confirmée.

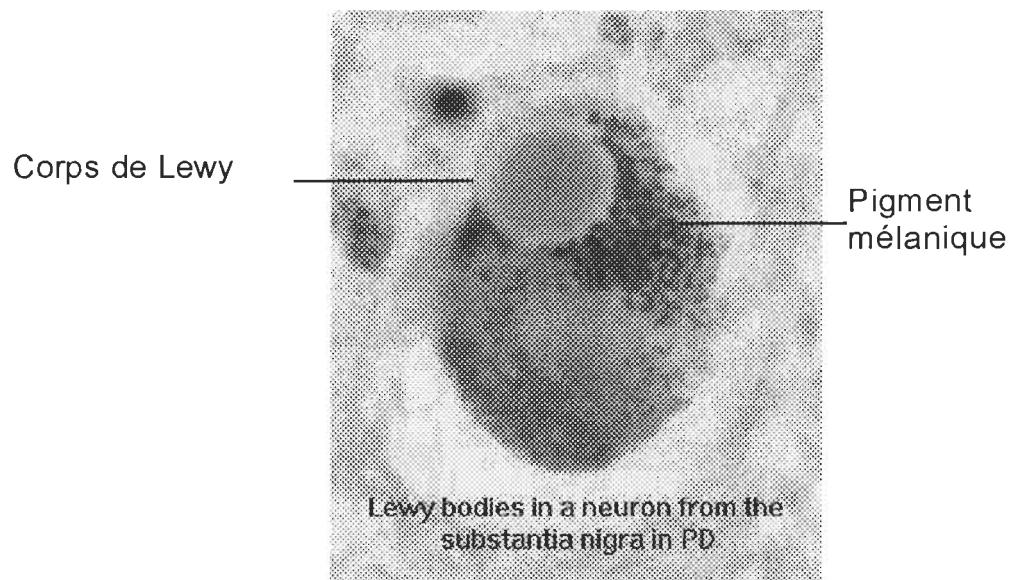


Figure 2. Photo illustrant un corps de Lewy en microscopie optique. On peut voir la présence d'un corps de Lewy au centre très coloré qui refoule le pigment mélanique dans une région de la cellule (communication privée).

1.2.1.2 Aspect des corps de Lewy en microscopie électronique

Les analyses en microscopie électronique montrent que les corps de Lewy sont formés de filaments de 8 à 10 nm de diamètre, mélangés à du matériel granulaire et à des vésicules ayant parfois un centre dense. Ces filaments sont disposés sans ordre au centre de l'inclusion et sont orientés de façon radiaire en périphérie. Les corps de Lewy corticaux ont un aspect un peu particulier, ils sont aussi formés principalement de filaments de 10 nm disposés au hasard et mêlés à du matériel granulaire et membranaire.

1.2.2 Fonction biologique des corps de Lewy

Un marqueur histologique important caractéristique de la maladie de Parkinson idiopathique est la présence de corps d'inclusions intraneuronale appelés corps de Lewy dans les noyaux mésencéphaliques. Des études morphologiques et de biologie cellulaire ont caractérisé les corps de Lewy dans une variété de maladies neurodégénératives, particulièrement dans les cortex cérébraux de patients atteints de démence. Basé sur la morphologie, il existe deux types de corps de Lewy, le type classique et le type cortical (Perry *et al.*, 1996). Par l'utilisation de techniques immunohistochimiques, plusieurs protéines composant les corps de Lewy ont été identifiées. Il est maintenant possible de suggérer que la présence des corps de Lewy reflète une réponse neuronale cytoprotectrice.

Plusieurs groupes de chercheurs confirment que les neurofilaments forment une composante importante des corps de Lewy (Forno *et al.*, 1986; Galloway *et al.*, 1988; Goldman *et al.*, 1983; Pollanen *et al.*, 1992). Les neurofilaments qui y sont retrouvés sont phosphorylés et fragmentés par protéolyse (Bancher *et al.*, 1989; Hill *et al.*, 1991; Schmidt *et al.*, 1991). Les neurofilaments sont probablement enchevêtrés pour former des filaments insolubles (Pollanen *et al.*, 1993).

Les corps de Lewy contiennent aussi de l'ubiquitine, de l'ubiquitine-carboxyl-terminal hydrolase (PGP9.5), la protéase multicatalytique (MCP) et l'αB-crystalline. Toutes ces composantes sont normalement impliquées dans l'élimination des protéines anormales ou endommagées. Leur présence peut être associée à une réponse suite à un stress cellulaire pour éliminer les protéines endommagées des neurones.

Les corps de Lewy contiennent également de la tubuline, les protéines associées aux microtubules (MAP), la protéine précurseur de la β-amyloïde (APP) et la protéine kinase II Ca^{2+} /calmoduline dépendante (Galloway *et coll.*, 1988; Bancher *et coll.*, 1989; Schmidt *et coll.*, 1991).

Les corps de Lewy sont donc, en général, des inclusions filaments/ubiquitine/cristalline. Cette perspective suggère que le corps de Lewy

est la manifestation d'une réponse cytoprotectrice et, donc théoriquement, un phénomène bénéfique (Pollanen et coll., 1993).

Les substances identifiées dans les corps de Lewy se divisent en deux groupes. D'un côté, celles qui sont intrinsèques à la fonction biologique des corps de Lewy en dégradant les protéines et de l'autre côté, les protéines endommagées. La présence d'APP, de synaptosine et de chromatogranine-A dans les corps de Lewy représentent possiblement des composantes cellulaires endommagées dues pour être éliminées. L'ubiquitine joue un rôle important au niveau du ciblage des protéines anormales ou endommagées qui sont ensuite dégradées; elle appartient à la famille des protéines de stress (Mayer et coll., 1991). Le fait que les corps de Lewy contiennent des enzymes associés à la voie protéolytique médiée par l'ubiquitine, PGP9 et MCP suggère que les corps de Lewy correspondent à un réarrangement structural ayant pour but l'élimination des éléments cellulaires endommagés. L' α B-crystalline est une protéine associée aux filaments intermédiaires et joue un rôle de chaperone moléculaire. Il est possible que l'assemblage des neurofilaments, pour former les corps de Lewy, soit médié par l' α B-crystalline qui compose 1/10 du corps de Lewy cortical (Lowe et al., 1990).

1.2.3 Hypothèse sur la biogénèse des corps de Lewy.

Les corps de Lewy sont probablement formés suite à l'intégration de stimuli environnementaux couplés à une réponse intrinsèque des neurones (figure 3). Le premier stade est probablement associé à la réponse cellulaire des neurones. Le réseau de filaments intermédiaires est bien connu pour collapser suite à un stress cellulaire et ce phénomène peut être considéré comme une réponse primaire (Perry et al., 1996). Le moteur moléculaire impliqué dans cette réponse est incertain mais le candidat le plus probable est l' α B-crystalline qui est associée aux filaments intermédiaires. L' α B-crystalline est une protéine de stress. Une fois collapsés, les neurofilaments sont ciblés par des kinases pour être phosphorylés et sont ensuite fragmentés par protéolyse. L'ubiquitine et tous les enzymes du système de l'ubiquitine s'associent alors aux corps de Lewy. Il est possible que certaines modifications des neurofilaments aient lieu durant la protéolyse médiée par l'ubiquitine mais ce n'est qu'une hypothèse.

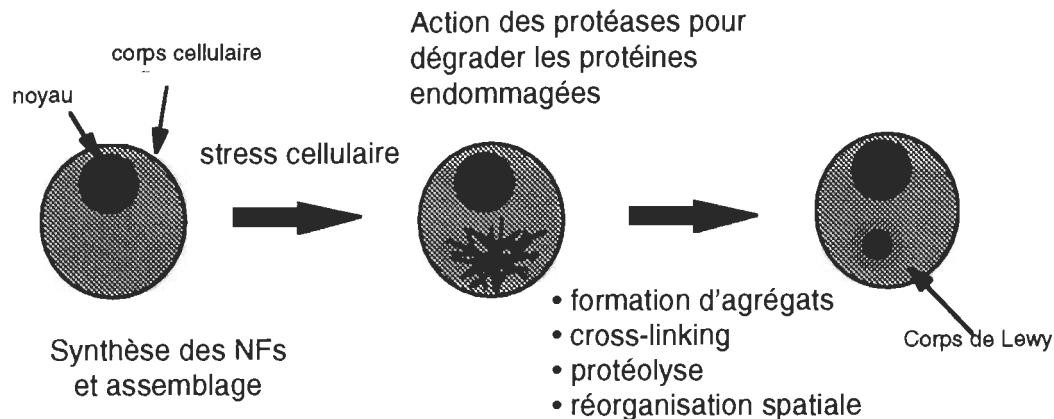


Figure 3. Hypothèse de la biogénèse des corps de Lewy

1.2.4 Pathogénèse des corps de Lewy

Comme nous l'avons déjà mentionné, les corps de Lewy sont composés principalement de neurofilaments. Des analyses directes et indirectes montrent la présence des 3 sous-unités soit: NF-L (70 kD), NF-M (160 kD) et NF-H (200 kD) retrouvés sous la forme phosphorylée et la forme non-phosphorylée. Les épitopes prédominants retrouvés au centre de l'inclusion correspondent à la sous-unité NF-L ainsi qu'au domaine amino-terminal des sous-unités. Ceci suggère la présence de fragments ayant subit une digestion partielle. De plus, la présence d'ubiquitine, d'ubiquitine-C-terminal hydrolase et d'ingestine dans les corps de Lewy suggère aussi que la protéolyse est impliquée dans la

pathogénèse. Finalement, l'insolubilité aux détergents indique que les neurofilaments qui composent les corps de Lewy sont altérés et probablement sous forme d'enchevêtrements.

1.3 Les Neurofilaments

1.3.1 Généralités

Les Neurofilaments appartiennent à la famille des filaments intermédiaires (FI). Les FI sont des filaments cytoplasmiques de 8 à 12 nm de diamètre et sont considérés comme étant des éléments structuraux de toute cellule : ils réunissent les desmosomes ponctuels des cellules épithéliales et stabilisent l'épithélium; ils constituent les protéines structurales prépondérantes de la peau et du système pileux; ils composent l'échafaudage qui maintient en place le disque Z et les myofibrilles des cellules musculaires; ils confèrent rigidité et solidité aux axones des neurones. Plusieurs aspects du rôle et de l'architecture des FI sont toutefois encore mal connus.

Les éléments protéiques des filaments intermédiaires sont des molécules filiformes qui s'associent comme les fils d'un cordage. L'assemblage des filaments intermédiaires paraît se produire sans dépense d'énergie. Ainsi, après dénaturation complète, les monomères protéiques des FI sont dans leur

structure originale, mais après l'élimination du dénaturant, ils reprennent une structure semblable aux filaments natifs.

1.3.1.1 Expression des filaments intermédiaires

Chacune des protéines de FI, c'est-à-dire, la vimentine, la desmine, la GFAP et les protéines de NF semblent n'être codées que par un seul gène du génome haploïde. Par contre, au moins 30 cytokératines distinctes constituent cette classe de protéine de FI. Les cytokératines sont classées en 2 groupes: le groupe acide (I) et les groupes neutre/basique. L'expression des cytokératines est propre aux cellules épithéliales et chaque type d'épithélium exprime un éventail singulier de cytokératines; les filaments de cytokératines sont toujours constitués d'un nombre égal de monomères appartenant aux superfamilles de type I et II. Les protéines de FI sont prépondérantes parmi les protéines propres à un type cellulaire.

1.3.1.2 Organisation structurelle des filaments intermédiaires

Les modules protéiques de tous les filaments intermédiaires sont formés d'un motif commun: un domaine N-terminal propre au type de monomère et de taille variable, un domaine central en bâtonnet, d'environ 40 nm, et d'un domaine C-terminal, propre aussi au type de monomère et de taille variable. Le bâtonnet

central consiste en longs tronçons d'heptades répétées qui tendent à former des dimères en superhélice α . Le domaine central d'heptades est interrompu par trois zones non hélicoïdales dont la position est étroitement conservée parmi les monomères des différents Fl (figure 4).

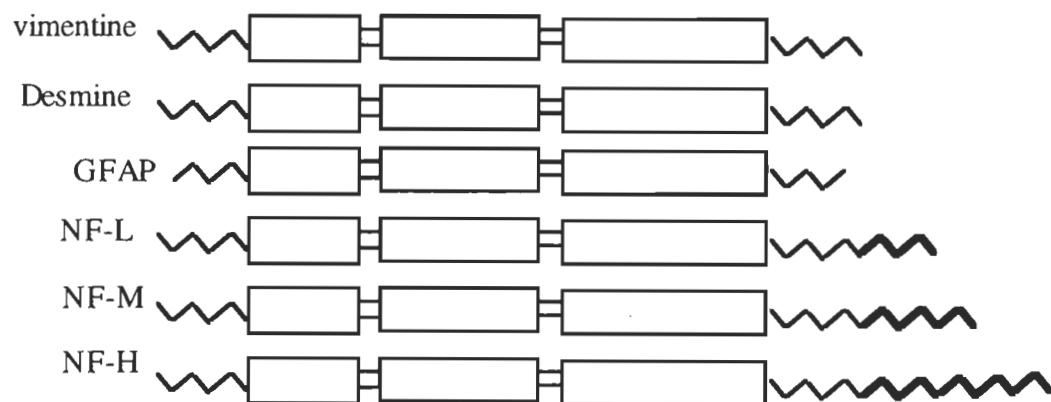


Figure 4. Comparaison de la structure d'une variété de Fl. Les rectangles représentent le domaine central en hélice α tandis que les lignes brisées correspondent aux domaines terminaux en conformation non-hélicoïdale.

1.3.2 Les neurofilaments

Les neurofilaments sont retrouvés dans les cellules nerveuses des systèmes nerveux central et périphérique des vertébrés et sont constitués de 3 polypeptides filamentaires distincts: NF-L, NF-M et NF-H dont les poids moléculaires réels sont dans l'ordre, 68, 95, 115 kDa (P.M. apparents respectifs de 70, 160 et 200 kDa). Ces trois sous-unités se distinguent par leur domaine C-terminal.

Les neurofilaments sont la principale composante du cytosquelette neuronal. Une fois synthétisés, ils sont assemblés et transportés vers l'axone. Les neurofilaments assemblés forment avec les autres protéines fibrillaires un réseau tridimensionnel filamenteux qui maintient le neurone tout en définissant sa taille et sa structure. Ils sont souvent associés aux microtubules axonaux. En fait, la résistance et la rigidité de l'axone dépend des complexes neurofilaments-microtubules. De plus, le réseau permet l'organisation et l'ancrage de certains constituants dans le cytoplasme de l'axone.

1.3.2.1 Assemblage

Une des premières étapes dans la formation du neurofilament est la formation de dimères. Cette opération fait intervenir le domaine central c'est-à-dire le corps des sous-unités de NFs. Cette région qui est principalement dans la conformation en hélice α se caractérise par une série de résidus non polaires

formant "une couture" tout au long de la structure hélicoïdale. Lors de l'assemblage "coiled-coil", le corps de deux polypeptides s'enroulent l'un sur l'autre le long de la couture pour ainsi former le dimère (figure 5). Puis, deux dimères s'enrouleront ensemble pour former un tétramère. Plusieurs tétramères se lient ensuite bout à bout et constituent un protofilament. Deux protofilaments s'accrochent pour former une protofibrille. Le filament intermédiaire typique est constitué de 4 protofibrilles. Ainsi, une coupe transversale d'un filament présentera donc 32 sous-unités. La figure 6 permet de visualiser comment les différentes sous-unités peuvent s'arranger pour former le filament. On peut noter la présence d'extensions latérales lesquelles possèdent une fonction très particulière dans l'assemblage et le maintien du réseau tridimensionnel des NFs.

1.3.2.2 Composition et séquence

La composition en acides aminés est bien connue. Les polypeptides sont caractérisés par un haut taux en résidus acides, principalement de l'acide glutamique qui compose environ 20% de chacune des sous-unités (figure 7). Le point isoélectrique du triplet se situe entre pH 5 et 6. L'acide aminé basique le plus abondant est la lysine qui compose environ 10% de chaque sous-unité. Des trois composantes, c'est la sous-unité NF-H qui possède le plus grand contenu en résidus proline, soit près de 8%.

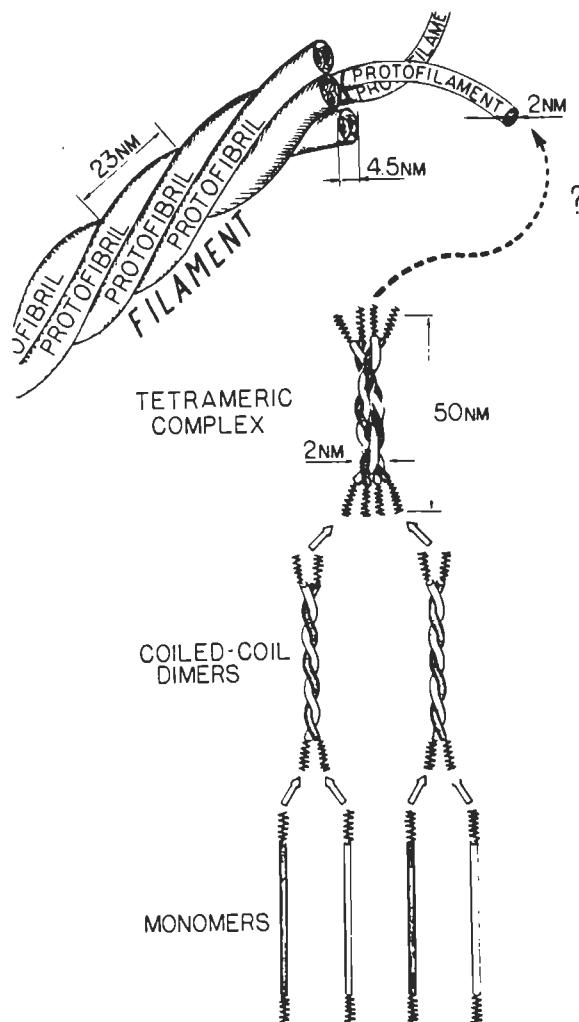


Figure 5. Modèle d'assemblage des Fl. La portion centrale (principalement en conformation d'hélice α) de deux monomères s'enroulent l'une sur l'autre pour donner un dimère. Deux dimères formeront un tétramère. Puis, un enchaînement bout à bout de tétramères formera le protofilament. Deux protofilaments donneront une protofibrille. Quatre protofibrilles formeront le filament de 10 nm. (Bershadsky, A. et Vasiliev, 1988)

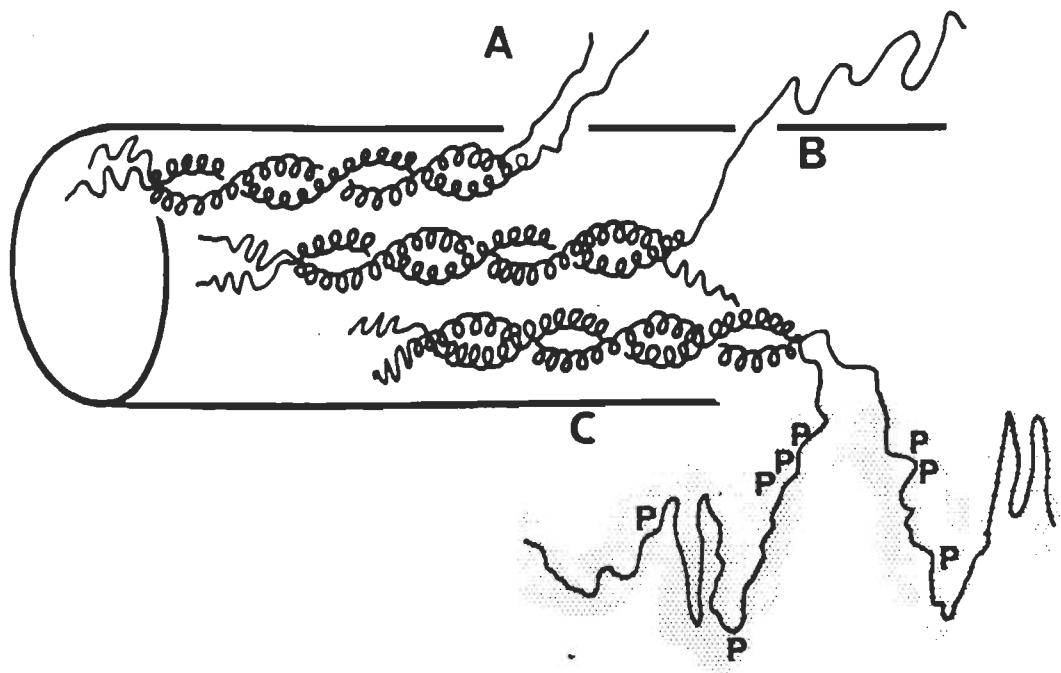


Figure 6. Représentation des arrangements possibles entre les sous-unités pour former le filament. A: exemple d'un dimère formé de deux polypeptides de même poids moléculaire, ici NF-L. B: exemple d'un dimère formé de deux polypeptides de poids moléculaires différents, ici NF-L et NF-M. C: exemple d'un dimère formé de deux polypeptides de haut poids moléculaire et présentant une projection latérale du domaine C-terminal qui est très phosphorylé et très chargé, correspond à NF-M ou NF-H (Flienger, K.H. et Liem, R.K.H., 1991).

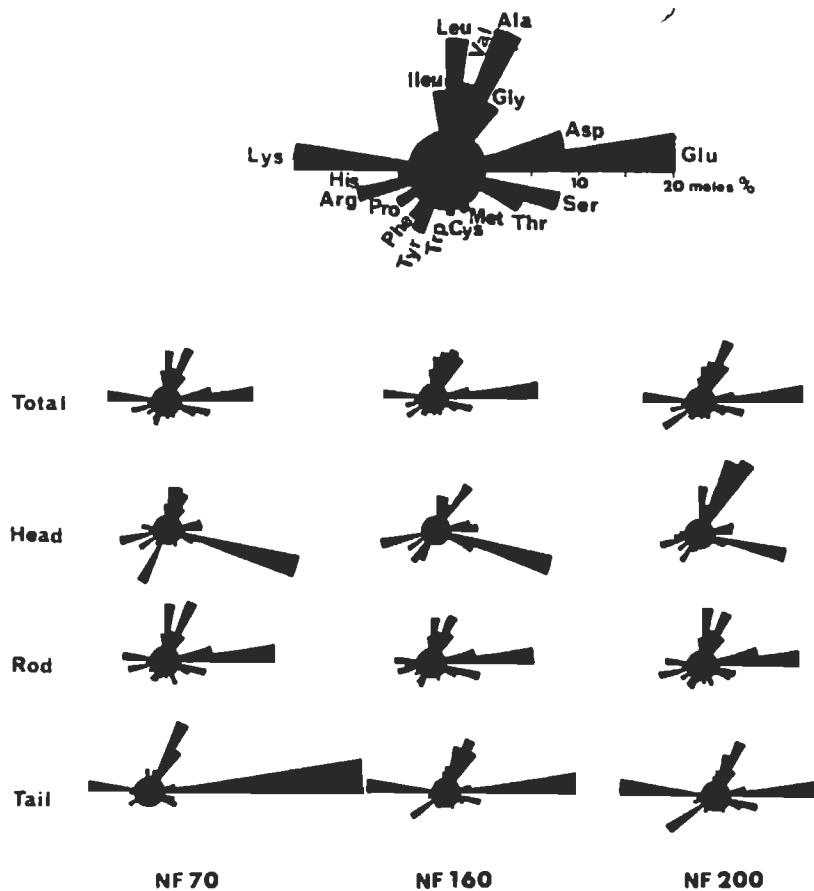


Figure 7. Représentation de la composition en acides aminés de chaque sous-unité de NFs. La correspondance des acides aminés et leur regroupement par propriétés est montrée avec NF-L comme exemple, dans le haut de la figure. Les acides aminés basiques comme lys, his, et arg sont représentés dans la partie gauche de la figure. Les acides aminés aliphatiques comme ileu, leu, val, ala et gly sont situés dans le haut de la figure. Les acides aminés acides comme asp et glu sont situés dans la partie droite de la figure. La composition en acides aminés est donnée en pourcentage de mole et est indiquée par la longueur du segment. On peut voir que la région correspondant au domaine central des polypeptides présente une composition assez similaire et qui réflète une conformation en hélice α . On peut voir la prédominance de ser dans le domaine amino terminal des 3 polypeptides tandis que le domaine carboxy terminal est très chargé avec une abondance de lys et glu (Flienger, K.H. et Liem, R.K.H., 1991).

1.3.2.3 Les domaines des différents isoformes

NF-L, qui constitue la plus petite des 3 sous-unités se caractérise par trois régions distinctes. D'abord une région N-terminale couvrant environ 80 acides aminés et qui a un caractère très basique. Cette séquence contient beaucoup d'acides aminés hydroxy et les prédictions, quant à la structure, suggèrent une structure β . Le domaine suivant constitue le corps du polypeptide. Il est formé d'approximativement de 310 acides aminés. Cette séquence est composée de répétition d'heptades où les positions 1 et 4 sont occupées généralement par des résidus non-polaires. La section suivante correspond au domaine C-terminal du polypeptide et comprend près de la moitié de tous les acides glutamiques (figure 7). En ce qui à trait à NF-H et NF-M, ils présentent des patrons assez similaires (figure 8). Ils possèdent un corps en hélice α avec une région N-terminale basique et une région C-terminale acide. Par contre, la taille du domaine C-terminal est très variable d'une sous-unité à l'autre ce qui constitue la principale différence entre les 3 sous-unités.

Comme pour le cas de NF-L, on retrouve pour NF-M et NF-H une région C-terminale très chargée, riche en lysine (15-26%) mais avec une abondance d'acide glutamique (20-30%). Ces régions sont également riches en proline soit 10% des acides aminés totaux (figure 7).

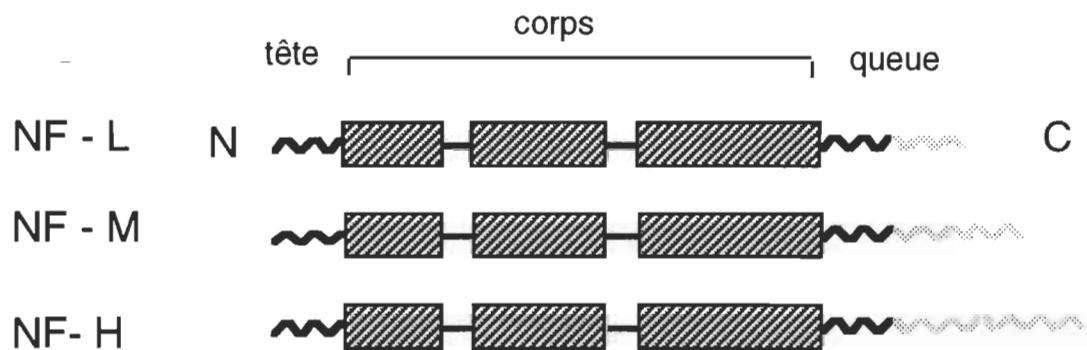


Figure 8. Structure des sous-unités de neurofilaments. Le corps se caractérise par 3 tronçons en hélice α très similaires pour les 3 polypeptides. On peut voir que la principale différence réside au niveau du domaine carboxy terminal. Les traits pointillés correspondent à la séquence répétitive qui varie en taille d'une sous-unité à l'autre.

1.3.2.4 Les sites de phosphorylation

La détermination de la séquence des 3 sous-unités a contribué à l'identification des sites de phosphorylation. Les études sur la phosphorylation ont montré que les neurofilaments natifs sont des molécules très phosphorylées. On retrouve une phosphorylation extensive au niveau du domaine C-terminal de NF-M et NF-H. On estime la quantité de phosphate pour les trois sous-unités NF-L, NF-M et NF-H à environ 1-3, 6-10 et 22-52 moles de phosphate/mole de protéine, respectivement. Ces estimations montrent une grande variation selon la technique utilisée par les différents laboratoires (Carden et coll., 1985; Geisler et coll., 1987; Georges et coll., 1986; Julien et Mushinsky, 1982). Dans NF-H, on retrouve les phosphates principalement sur des phosphoserines. Par contre, dans NF-M, les groupements phosphates sont retrouvés tant sur les phosphothéonines que les phosphoserines. Notons que le domaine N-terminal peut aussi être phosphorylé via des protéines kinases dépendantes des second messagers (ex.: PKA, PKC et Ca/CaM).

1.3.2.5 Interaction des neurofilaments avec les autres composantes cellulaires

Dans l'axoplasme, les neurofilaments s'associent pour former un réseau tridimensionnel complexe. Ce réseau résulte de l'arrangement des

neurofilaments entre eux, avec d'autres éléments du cytosquelette ainsi que des organites.

Les premières interactions pour établir le réseau tridimensionnel sont sans aucun doute la présence des bras latéraux qui, apparemment, lient les neurofilaments ensemble. Ils impliquent les extensions C-terminales des polypeptides qui, comme nous l'avons déjà mentionné, sont très chargées et très phosphorylées. La grande charge négative du domaine C-terminal contribue à garder un certain espace avec les neurofilaments voisins. On peut donc penser que les bras latéraux des neurofilaments servent à maintenir une certaine distance entre les neurofilaments au lieu de les tenir ensembles.

Des liens entre les neurofilaments et les microtubules ont été observés par plusieurs groupes de chercheurs. Les principaux indices nous permettant de croire à cette interaction sont d'abord la forte contamination par les NFs lors de la purification des microtubules (Delacourte et coll., 1977). De plus, lors du transport axonal lent, on note un mouvement coordonné des NFs et des microtubules (Willard, 1983).

1.3.2.6 Modifications post-traductionnelles des neurofilaments

Les neurofilaments sont des protéines hautement phosphorylées et des évidences expérimentales démontrent qu'il existe un "turnover" continu de la

plupart des phosphates (Sihag, R.K. et Nixon, R.A., 1991; Lee et coll., 1987; Nixon et coll., 1986).

Les modifications post-traductionnelles au niveau des domaines N-terminal et C-terminal sont des déterminants importants dans la plasticité, l'assemblage et la stabilité des filaments. Le domaine N-terminal a pour fonction d'assembler et de désassembler les sous-unités. Cette fonction est régulée par la phosphorylation.

Dans le cas de la vimentine, la desmine et la GFAP, la phosphorylation du domaine N-terminal par la protéine Kinase A ou C, *in vitro*, bloque la polymérisation des sous-unités et induit la dépolymérisation (Inagaki et coll., 1989, 1990; Kitamura et coll., 1989). Cet effet est inversé par la déphosphorylation. On retrouve le même phénomène pour NF-L dont le site principal de phosphorylation pour la PKA se situe sur le résidu serine-55 du domaine N-terminal (Sihag et Nixon, 1991). Ce site s'avère essentiel pour les premiers stades d'assemblage (Gill et coll., 1990). La présence de 2 résidus arginine précédant la serine-55 vient appuyer son rôle dans l'assemblage étant donné que les résidus arginine du domaine N-terminal des autres filaments intermédiaires jouent un rôle essentiel dans l'assemblage (Traub et Vorgias, 1989). Par contre, le rôle de la phosphorylation dans la régulation de l'assemblage est encore mal connu.

1.3.2.7 Rôle de la phosphorylation du domaine carboxy-terminal

La phosphorylation du domaine C-terminal particulièrement de NF-M et NF-H a un tout autre rôle. La phosphorylation de cette région permet de maintenir le calibre axonal (Nixon et coll., 1994) et de déterminer le taux de transport des neurofilaments dans l'axone (Nixon et coll., 1987; Nixon, 1991). Le domaine C-terminal des 3 sous-unités consiste en une région riche en glutamate avec des résidus serines. Ces résidus serines peuvent être phosphorylés par des caséines kinases. Le domaine C-terminal de NF-M et NF-H contient plusieurs sites de phosphorylation retrouvés dans un motif de séquences répétitives. Ces sites sont phosphorylés par des protéines kinases indépendantes d'un second messager. Par contre, certains sites retrouvés dans le domaine C-terminal sont phosphorylés par d'autres kinases encore mal connues. Récemment, un site de phosphorylation à la serine 435 au niveau du domaine C-terminal a été identifié comme étant un site pour la phosphokinase A (Cleverly et coll., 1998). Quant à la sous-unité NF-H, elle constitue la protéine la plus phosphorylée. Ses principaux sites de phosphorylation sont au niveau de la séquence répétitive KSP (lysine-serine-proline). La phosphorylation de ce domaine affecte l'interaction entre les neurofilaments et les microtubules, détermine le calibre de l'axone et protège NF-H de la protéolyse (Pant, 1988).

1.4 Dommages associés au stress oxydatif

La cause de la mort cellulaire dans les maladies neurodégénératives reste obscure. Les mécanismes pathologiques liés à la dégénérescence neuronale doivent non seulement expliquer le ou les processus pouvant être responsables de la formation des lésions menant à la mort des neurones mais elles doivent aussi être en mesure d'expliquer comment des protéines cellulaires normales sont modifiées en agrégats de protéines insolubles, pour composer des lésions en soi. Sur la base des marqueurs histopathologiques (corps de Lewy, plaques séniles, enchevêtements neurofibrillaires), la cause primaire de chaque maladie neurodégénérative est différente. On retrouve très peu d'informations précisant les mécanismes impliqués dans le processus de la mort neuronale.

Comme il en a été fait mention dans les sections précédentes, la formation de radicaux libres et l'apparition d'un stress oxydatif pourrait caractériser plusieurs de ces affections. En effet, les modifications biochimiques mises en évidence dans la maladie de Parkinson, la maladie des corps de Lewy, la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique et la neuropathie diabétique montrent la présence de signes caractéristiques (Jenner, 1997; Smith et coll., 1995, 1996, 1997; Castellani et coll., 1996; Tu et coll., 1997) . Ces signes s'accompagnent souvent d'anomalies qui traduisent des lésions dues aux radicaux libres, à savoir une augmentation de la peroxydation des lipides et un oxydation des protéines et de l'ADN. Certaines altérations caractéristiques

du stress oxydatif s'observent dans d'autres maladies neurodégénératives des noyaux gris centraux (syndrôme de Shy-Drager, maladie de Steele-Richardson, maladie d'Huntington), mais celles-ci ont été moins étudiées.

Le stress oxydatif englobe plusieurs processus physiologiques et non-physiologiques qui seront élaborés de façon plus explicite dans cette section. De plus, les différents dommages cellulaires résultant d'un stress oxydatif y seront abordés.

1.4.1 Rôle des radicaux libres en biologie et en médecine

L'oxygène est à la fois une molécule vitale pour les organismes vivants mais peut devenir très toxique lorsqu'il produit des radicaux libres. La toxicité associée aux radicaux libres est un phénomène normal du métabolisme de l'organisme. Pensons, par exemple, aux radicaux libres produits par les neutrophiles qui défendent l'organisme contre les bactéries. Malgré les bienfaits de ces molécules très réactives, les radicaux libres ainsi que leurs dérivés peuvent constituer une menace pour l'organisme. En effet, on associe de plus en plus la toxicité de ces molécules à diverses pathologies.

1.4.1.1 Nature des dérivés actifs d'oxygène

Les dommages associés aux espèces radicalaires et/ou pro-oxydantes proviennent de deux sources. Soit de source exogène qui comprend les xénobiotiques, les radiations et les toxines chimiques ou soit de source endogène comme la respiration mitochondriale, les réactions associées au cytochrome P-450 et les réactions phagocytaires impliquant les neutrophiles. (Cadet et Brannock, 1998). De plus, le cerveau est très riche en substrats oxydables dont les catécholamines et les lipides insaturés.

1.4.2 Protéines modifiées par les radicaux libres

L'oxydation des protéines est médiée par des interactions avec une ou plusieurs espèces réactives ($\cdot\text{OH}$, O_2^\cdot , H_2O_2 , O_3 , O_2 , ferryl et perferryl) lesquelles peuvent être générées par les radiations ionisantes, les réactions catalysées par des métaux, les processus photochimiques, ou être le produit de réactions redox catalysées par des enzymes. L'oxydation des acides aminés composant la protéine peut affecter la structure secondaire de la protéine. Ce type de modification peut altérer la fonction même de la protéine qui peut adopter une formation en agrégat, être fragmentée, et voir sa sensibilité à la protéolyse augmentée.

1.4.3 Formation et élimination des espèces réactives

Plusieurs réactions médiées ou non par des enzymes produisent des molécules toxiques, les radicaux dérivés de l'oxygène. Le radical hydroxyle, les anions superoxydes ainsi que plusieurs autres espèces radicalaires comme les semiquinones font partie de cette catégorie. Ces molécules très réactives sont souvent transformées en d'autres molécules comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Bien que moins réactif, le peroxyde d'hydrogène est toxique et peut être néfaste pour la cellule si on le retrouve en trop grande concentration. On fait alors appel à d'autres mécanismes enzymatiques qui élimineront le peroxyde d'hydrogène produit.

1.4.3.1 Rôle des catécholamines dans la production de radicaux libres

Les catécholamines représentent une source potentielle dans la production des radicaux libres (figure 9, a et b). Lors du métabolisme de la dopamine, sérotonine et noradrénaline par la monoamine oxydase, il y a production de peroxyde d'hydrogène (Cadet et Brannock, 1998). On parle alors de métabolisme oxydatif des catécholamines (figure 9a). De plus, les catécholamines ont le pouvoir de s'auto-oxyder pour former des quinones selon l'ordre de réactivité suivant: 6-hydroxydopamine > dopamine > noradrénaline > adrénaline (Graham, 1978). Ces molécules endommagent les protéines par des attaques nucléophiles de la chaîne latérale des acides aminés.

Il semble que l'acide ascorbique, le dithiothréitol, le glutathion, la SOD et la tetrahydrobioptérine soient capables d'inhiber l'auto-oxydation des catécholamines.

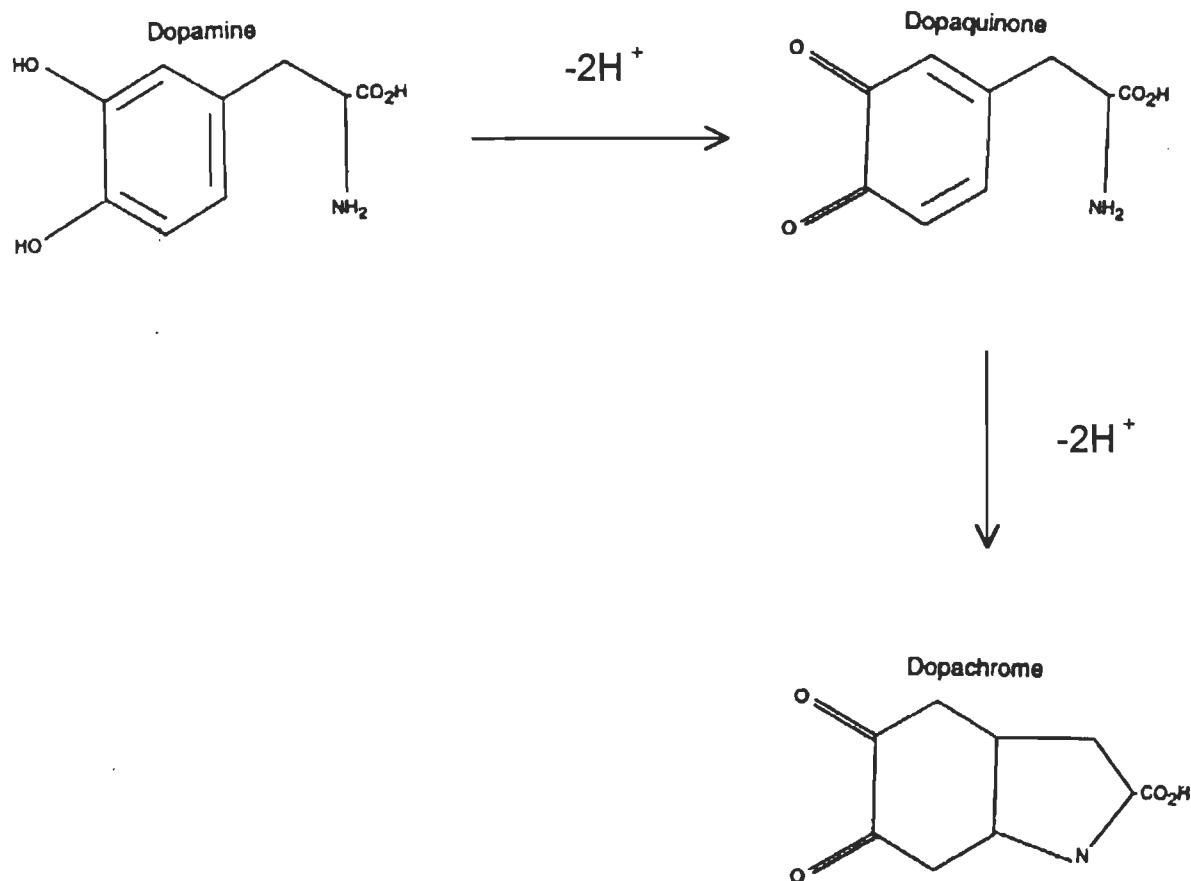
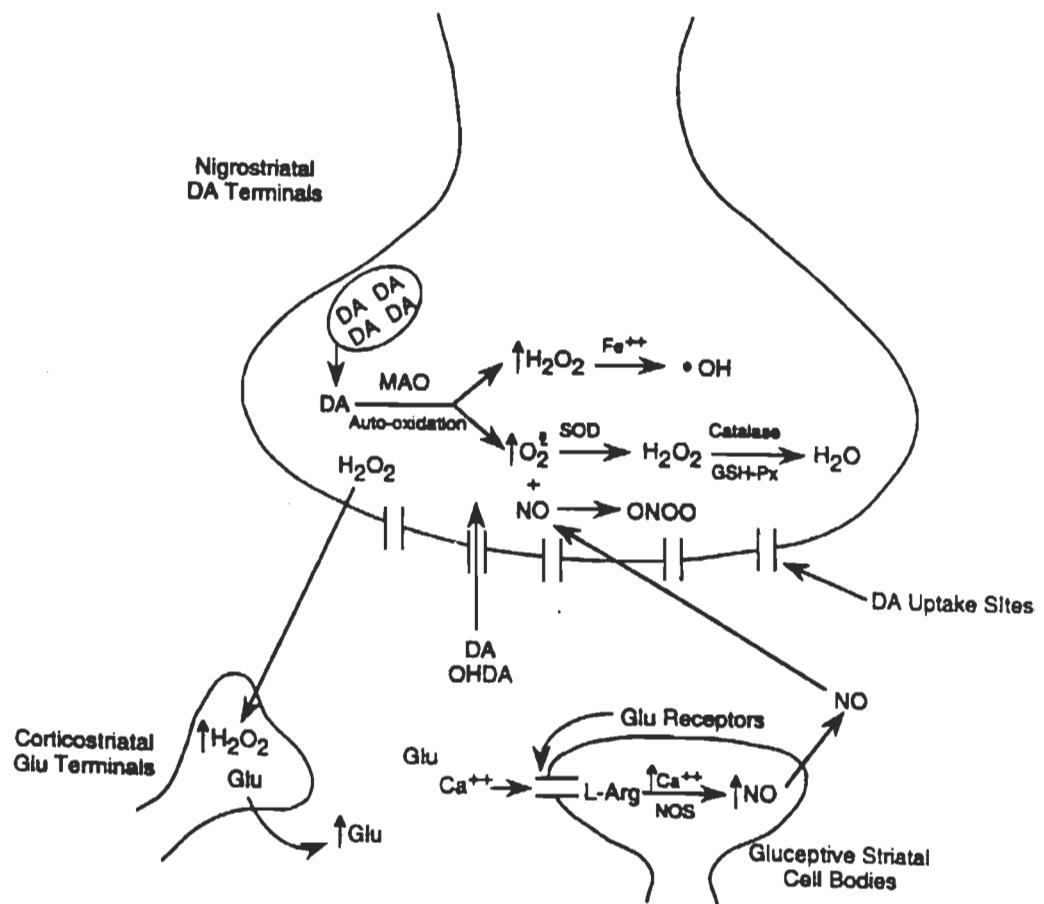


Figure 9. a) Formation de quinone à partir de la dopamine. La dopamine peut induire des réactions d'oxydo-réduction avec formation de radicaux libres.



b) Schéma illustrant la formation de radicaux libres et de dérivés toxiques à partir du métabolisme de la dopamine (Cadet, J.L., and Brannock, C., 1998).

1.4.3.2 Rôle des métaux de transitions dans les réactions d'oxydations

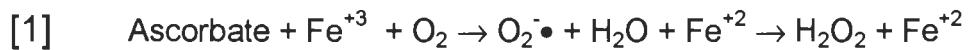
Le fer joue un rôle important dans l'initiation de réactions d'oxydation et agit comme catalyseur en présence d'oxygène (Halliwell et Gutteridge, 1985). Au pH physiologique, le fer est lié à la transferrine et à la lactoferrine. Dans des conditions de stress, le fer est libéré causant ainsi la propagation des dommages cellulaires.

L'oxygène moléculaire est capable d'accepter un seul électron d'un métal de transition, comme le fer, qui existe sous plusieurs états de valence. Ces métaux possèdent un électron faiblement lié et peuvent accepter ou donner un seul électron pour promouvoir des réactions d'oxydo-réduction et la formation de radicaux libres. Les réactions d'oxydations peuvent être influencées par la concentration en métaux de transition. Le recyclage du fer dans son état oxydé en son état réduit par l'acide ascorbique, le glutathione ou la dopamine peut amener des réactions d'oxydation et la formation de radicaux libres. On parle donc de pouvoir pro-oxydant. Ainsi, l'acide ascorbique qui est un antioxydant devient pro-oxydant lors d'une concentration trop élevée en fer. Certaines protéines comme la ferritine, la carnosine et l'homocarnosine se lient au fer et le maintiennent dans une forme non réactive. Ces protéines constituent un autre mécanisme de défense antioxydant.

D'autres métaux de transition comme le manganèse et le cuivre peuvent aussi participer à des réactions en tant que pro-oxydant.

Il existe plusieurs systèmes possibles qui font intervenir les métaux de transitions (voir tableau 1). On divise en 2 grands groupes les réactions MCO. Le premier groupe fait intervenir des enzymes comme la NAD(P)H deshydrogénase, la xanthine oxydase, la cytochrome P-450 réductase et la quinone réductase. L'autre groupe est non enzymatique et les substrats auto-oxydables les plus connus sont l'ascorbat et les composés sulphydryles (Stadtman, 1991).

Les réactions catalysées par des métaux (MCO) se résument par la formation de peroxyde d'hydrogène et de Fe^{+2} . En fait, la réaction d'oxydation nécessite un métal de transition, de l'oxygène et un donneur d'électron (Stadtman, 1991) (équation 1). La première étape fait intervenir le donneur d'électron (ici, l'ascorbat), l'oxygène moléculaire et l'ion métallique (ici le fer avec une valence de 3). Les produits de cette réaction sont alors un anion superoxyde et le fer sous sa forme réduite soit de valence 2. Puis, le peroxyde d'hydrogène est formé de façon spontanée par dismutation de l'anion superoxyde.



Le radical hydroxyle est ensuite généré par la réaction du peroxyde d'hydrogène avec un métal de transition via la réaction de Fenton et Haber-Weiss (Olanow, 1993) (équations 2 et 3 respectivement).

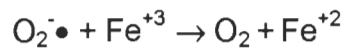
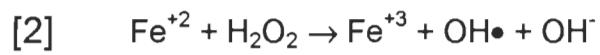


Tableau 1.

Systèmes d'oxydations catalysés par des métaux

Système	Références
NAD(P)H oxidase / NAD(P)H / O ₂ / Fe(III)	Fucci et coll., 1983
Xanthine oxydase / Xanthine / Fe(III) / O ₂	Stadtman et coll., 1985
P450 / P450 reductase / Fe(III) / NADPH / O ₂	Fucci et coll., 1983
Ascorbate / Fe(III) / O ₂	Levine et coll., 1981
Ascorbate / Cu(II) / O ₂	Shinar et coll., 1983
Ascorbate / Fe(III) / O ₂ / EDTA	Levine et coll., 1983
Fe(II) / O ₂	Stadtman, 1991
Fe(II) / H ₂ O ₂	Fucci et coll., 1983
Cu(II) / H ₂ O ₂	Cooper et coll., 1985
Peroxydase / ferredoxine / H ₂ O ₂	Stadtman et coll., 1985
Glucose oxydase / ferredoxine / glucose / O ₂	Stadtman et coll., 1985
RSH / O ₂ / Fe(III)	Kim et coll., 1985

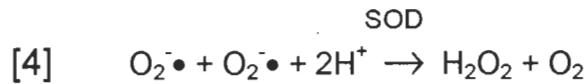
1.4.3.3 Mécanismes de défense enzymatique

Normalement, une série de mécanismes de défense prévient ou limite la production de radicaux libres et le dommage tissulaire (Olanow, 1993). Premièrement, la phosphorylation oxydative a lieu dans les mitochondries où les espèces réactives sont liées et réduites en eau. Deuxièmement, les radicaux superoxydes ($O_2\bullet^-$) sont transformés en H_2O_2 par la superoxyde dismutase (SOD), le H_2O_2 peut ensuite être éliminé par la catalase (située dans les peroxysomes) ou la glutathione peroxydase (GPO, cytosolique). Troisièmement, les anti-oxydants comme l'alphatocophérol (vitamine E) et l'acide ascorbique peuvent réagir directement avec les radicaux libres pour former des espèces beaucoup moins réactives. Finalement, d'autres mécanismes de défense peuvent s'opposer au stress oxydatif comme les chélateurs de fer (Olanow, 1993).

La superoxyde dismutase

La superoxyde dismutase (SOD) catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (équation 4). Cette enzyme représente la première ligne de défense contre les dérivés toxiques d'oxygène (Olanow, 1993). Il existe 3 types de SOD : 1) la SOD-1 Cu/Zn cytosolique, 2) la SOD-2 mitochondriale dépendante du manganèse et 3) la SOD-3 Cu/Zn extracellulaire. Seule la SOD-2 dépendante du manganèse est inductible. La SOD est propre

aux organismes aérobiques ce qui signifie que les bactéries anaérobiques, par exemple, sont dépourvues de cette enzyme puisqu'elle leur est d'aucune utilité.



Une diminution de l'activité de la SOD peut être létale pour les cellules car il en résulte une accumulation de l'anion superoxyde qui est une molécule très réactive. Par contre, une suractivité de la SOD serait aussi problématique puisque la conversion excessive de l' $\text{O}_2^{\cdot\bullet}$ en H_2O_2 promouvoit la formation de radicaux hydroxyles ($\text{OH}^{\cdot\bullet}$) selon la réaction de Fenton (Olanow, 1993).

1.4.4 Pathobiologie liée aux radicaux libres

Les cascades d'évènements impliquant les effets cytotoxiques des radicaux libres ne sont pas encore très connus. Les dérivés actifs d'oxygène causent d'importants dommages cellulaires en s'attaquant aux phospholipides, protéines et acides nucléiques.

Les radicaux dérivés de l'oxygène peuvent affecter la fonction des protéines. Ces attaques peuvent inactiver plusieurs enzymes comme la CAT,

SOD et GSH-Rx (Stadtman, 1993). Une diminution de l'activité de ces enzymes atténue le système de défense contre les attaques par différents dérivés d'oxygène se traduisant par une propagation excessive des attaques radicalaires et des dommages qui lui sont rattachés.

Les protéines oxydées deviennent alors sensibles à l'action protéolytique de certaines protéases qui sont elles-mêmes activées lorsque la cellule subit un stress oxydatif (Mellow-Filho et Meneghini, 1984). Normalement, un équilibre est maintenu entre les espèces radicalaires et les molécules "éboueuses" qui trappent les radicaux. Lorsque cet équilibre est rompu en faveur des molécules pro-oxydantes, celles-ci peuvent alors contribuer au développement de plusieurs maladies neurodégénératives.

1.5 Hypothèses et objectifs du projet de recherche

Comme nous l'avons décrit tout au long de la présente section, différentes études montrent l'implication du stress oxydatif dans le développement des maladies neurodégénératives. En effet, plusieurs évidences directes et indirectes laissent supposer que le stress oxydatif joue un rôle important dans la pathogénèse des maladies du système nerveux.

Le but de notre étude est de démontrer quels sont les effets du stress oxydatif sur les NFs. Nos travaux consistent à mettre en évidence les modifications biochimiques, moléculaires et structurales des NFs lorsqu'ils sont

dans des conditions de stress. Les préparations de NFs phosphorylés et déphosphorylés sont traitées avec différents types de produits connus pour leur réactivité c'est-à-dire les catécholamines et le Fer. Nous voulons ainsi vérifier l'influence de la phosphorylation sur la stabilité des NFs subissant des modifications suite à des réactions d'oxydations.

CHAPITRE 2

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Une description détaillée du matériel et des techniques utilisés sera faite dans ce chapitre. De plus, il sera fait état de la théorie relative à la technique de spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier et ce, dans le but de fournir au lecteur les outils nécessaires à la bonne compréhension des résultats et de la discussion directement reliés à cette technique.

2.1 Matériels

La moëlle épinière a été prélevée chez des rats Sprague-Dawley. Les différents catécholamines ainsi que les anti-oxydants ont été achetés chez Sigma. L'enzyme λ Phosphatase provient de New England Biolabs inc. Les standards de poids moléculaires, le TEMED, le persulfate d'ammonium, le bleu de coomassie et l'acrylamide pour les gels d'électrophorèse ont été achetés chez Bio-Rad. Les anticorps primaires et secondaires ainsi que les réactifs pour la détection des immunoblots par chimiluminescence ont été achetés chez Boehringer Mannheim. Les grilles utilisées pour la microscopie électronique

proviennent de chez Sigma. Tous les autres produits et solutions sont de qualité ASC.

2.2 Protocoles expérimentaux

2.2.1 Purification des neurofilaments

La purification des neurofilaments sous forme de triplets est basée sur la méthode de Liem et coll. (1982) avec de légères modifications. Dans cette étude, les rats mâles Sprague-Dawley ont d'abord été sacrifiés par décapitation. La moelle épinière est retirée rapidement de la colonne vertébrale puis est utilisée immédiatement pour l'étape de purification, sinon elle est congelée rapidement par immersion dans l'azote liquide et conservée à -80 °C jusqu'à l'utilisation.

La purification des neurofilaments suit principalement le protocole mis au point par l'équipe de Liem et collaborateurs (1978). Chaque moelle épinière est homogénéisée dans un eppendorf ou dans un tube de plastique en utilisant un homogénéiseur de plastique dans une solution A composée de tampon phosphate 10 mM, pH 6.8, 1 mM d'acide ethylenediaminetetraacétique (EDTA), 0.1 M NaCl et 0.85 M sucrose. Les axones myélinisés sont recueillis par flottaison en centrifugeant à 27 000 x g pendant 15 min à l'aide du rotor SW28

(figure 10). Cette étape permet d'enlever les débris cellulaires ainsi que les méninges pouvant être restés sur la moelle épinière.

Les axones sont prélevés à l'aide d'une spatule puis homogénéisés dans 20 ml de la solution B contenant du tampon 10 mM phosphate, pH 6.8, 1 mM d'acide ethylenediaminetetraacétique (EDTA), 0.1 M NaCl 1% de triton X-100. Notons que le triton permettra d'enlever les contaminants lipidiques. L'homogénat est déposé sur un volume de 10 ml de solution A puis centrifugé à 27 000 x g durant 45 min à 4 °C, à l'aide du rotor SW28. On recueille finalement le culot contenant les neurofilaments qui est resuspendu dans un tampon PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄), pH 7.3.

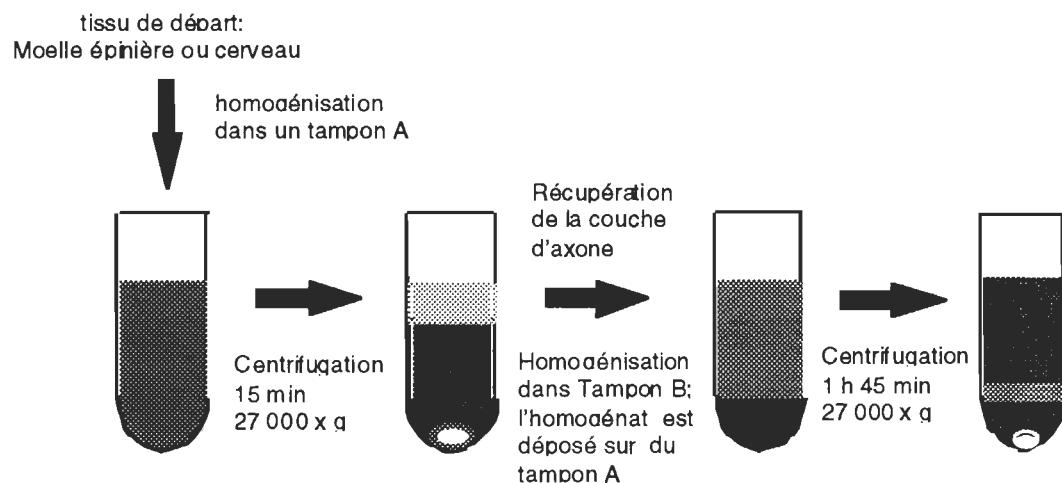


Figure 10. Technique de purification des neurofilaments par flottaison d'axones

2.2.2 Dosage de protéines par spectroscopie UV-visible

Les concentrations de protéines sont déterminées par la méthode colorimétrique de Bradford et coll. (1979), avec l'albumine bovine (BSA) pour établir la courbe étalon. Pour 10 µl de neurofilaments à doser nous ajoutons 740 µl d'eau distillée et 250 µl de colorant Bio-Rad. Après 15 min d'attente, on mesure l'absorbance à 595 nm. Les quantités utilisées pour la courbe étalon varient entre 0 et 60 µg de BSA.

2.2.3 Traitements des neurofilaments

Déphosphorylation des neurofilaments

Pour que la déphosphorylation soit maximale, les neurofilaments ont été incubés pendant 3 h à 30 °C dans un tampon Tris-Cl 50 mM, pH 7.8 contenant, 0.1 mM Na₂EDTA, 5 mM DTT, 0.01% Brij 35 et 2mM MnCl₂ ainsi que l'enzyme lambda phosphatase (λ PPase).

Oxydation des neurofilaments

Les neurofilaments ont été oxydés via deux systèmes. Le premier système est le système d'oxydation catalysé par des métaux. Les neurofilaments (0.4 mg/ml) ont été incubés avec 20 mM ascorbate et 100 µM FeCl₃ à 37 °C pendant 18 h.

L'autre système utilisait l'auto-oxydation des catécholamines. Les neurofilaments ont été incubés avec 5 mM d'une catécholamine (dopa, L-dopa ou dopac) suivant les mêmes conditions que le système catalysé par des métaux. Les réactions d'oxydation étaient arrêtées en transférant les tubes à -80 °C. Les conditions utilisées pour les réactions d'oxydations sont similaires à celles retrouvées dans la littérature (Troncoso et coll., 1995; Montine et coll., 1995).

Utilisation d'antioxydants

L'efficacité de deux antioxydants a été vérifiée, soit le N^α-acetyl-L-Cystéine (NAC) et le N^α-acetyl-L-Lysine (NAL). Les antioxydants ont été ajoutés à une autre série de tubes contenant les différents mélanges d'oxydation avec une concentration finale de 65 mM de NAC ou de NAL. Les réactions ont été arrêtées en transférant les tubes à -80 °C.

2.2.4 Microscopie électronique

La technique de coloration négative utilise un métal lourd, ici nous avons utilisé l'acétate d'uranium 1% (p/v). L'échantillon a été déposé sur une grille de 300 mesh en cuivre recouverte de formvar-carbone. La microscopie

électronique s'est réalisée sur le microscope électronique Philips 201 fonctionnant à 60 ou 80 kV et les photos ont été prises sur un film 35 mm.

2.2.5 Gel d'électrophorèse SDS-Page

Plusieurs électrophorèses ont été effectuées avec les neurofilaments ayant subi les différents traitements. L'appareil utilisé est un mini Protean II (Bio-Rad). Les gels de polyacrylamide-sulfate dodecyl de sodium (SDS-Page) utilisés étaient 6.5 à 8 % d'acrylamide pour le gel de résolution et 3% d'acrylamide pour le gel de compression dont l'épaisseur était de 0.75 mm. La migration s'est effectuée à 200 volts pendant 45 min. Le Bleu de Coomassie a été utilisé pour la coloration.

2.2.6 Analyse par transfert western

Avant de procéder au transfert, les échantillons sont déposés sur un gel d'électrophorèse 7.5 % acrylamide et migrent durant 45 min à 200 volts. Une fois la migration complétée, le gel est ensuite transféré sur une membrane de nitrocellulose 0.45 µm (Bio-Rad) à 4 °C pendant 2 h à 50 volts. La solution de transfert est composée de Tris-base 50 mM, Glycine 380 mM, SDS 0,1% et méthanol 20%.

Une fois le transfert complété, on bloque les sites non-spécifiques pendant 1 h à température de la pièce avec une solution bloquante 1% (BSA). On incube

ensuite avec les anticorps primaires ici, anti-NF-H, anti-NF-M et anti-NF-L. Les anticorps primaires sont dilués dans la solution bloquante 0.5%. L'incubation se fait durant 1 h sous agitation à la température de la pièce. La membrane est ensuite lavée 4 fois pendant 10 min à température de la pièce avec une solution TBS-T (50 mM Tris-Base, pH 7.5 et 150 mM NaCl contenant 1% de Tween-20).

La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps secondaire qui dans ce cas-ci est conjugué à une peroxydase. L'anticorps secondaire est dilué dans une solution bloquante 0.5% et l'incubation dure 30 min. à température de la pièce. On procède ensuite à 4 lavages de 10 min à température de la pièce avec la solution TBS-T et enfin, on ajoute la solution de révélation qui contient le luminol et on laisse agir pendant 1 min. On expose ensuite la membrane sur un film à autoradiographie et on développe après quelques secondes d'exposition.

2.3. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) est une technique très prometteuse dans l'étude des molécules biologiques. La popularité croissante de la technique est principalement due au fait qu'elle est facile d'utilisation et permet de déterminer la structure secondaire de peptides, protéines et même des protéines membranaires. De plus, des études récentes commencent à explorer le potentiel de cette technique pour la recherche biomédicale (Levine et Wetzel, 1993). Malgré ses nombreux avantages, la

technique FTIR demeure encore peu connue et peu utilisée dans ce champ d'étude. Cette section permettra donc au lecteur d'acquérir certaines bases en spectroscopie infrarouge nécessaires à la compréhension des prochaines sections.

2.3.1 Définition de la spectroscopie infrarouge

Les radiations infrarouges constituent la partie du spectre électromagnétique dont les longueurs d'onde sont supérieures à celles du spectre visible et inférieures à celles des ondes radio ultracourtes. La spectroscopie infrarouge mesure la quantité de lumière infrarouge qui est absorbée par un échantillon. L'absorption de radiation infrarouge induit un changement dans le moment dipolaire ce qui a pour conséquence de modifier le mouvement vibrationnel et rotationnel des atomes. Lorsque l'on parle de mouvement vibrationnel, cela comprend 2 types de mouvements soit les vibrations d'élongation et les vibrations de déformation. Les vibrations d'élongation correspondent au rapprochement et à l'éloignement continual de deux atomes. Quant aux vibrations de déformation, ce sont les angles des liaisons qui sont modifiés. On parle alors de vibration de cisaillement. Les radiations correspondant aux fréquences vibrationnelles des molécules se situent dans la région du moyen infrarouge qui s'étend d'environ 4000 cm^{-1} à 400 cm^{-1} .

2.3.2 Principe de base

Notons que le nombre de modes de vibrations possibles est de $3N - 6$ pour des molécules de N atomes ($3N - 5$ si la molécule est linéaire) (Haris et Chapman, 1992). On s'attend donc à un spectre très complexe pour les protéines étant donné leur nombreux modes de vibrations possibles.

Cependant, plusieurs de ces vibrations sont localisées à une région précise du spectre et correspondent à un type de liaison ou un même groupement précis. La liaison C = O et le groupement O-H en sont deux exemples. Ceci nous conduit au concept de fréquences caractéristiques pour certains groupements tels que les groupements C=O, -COOH, COO⁻, O-H et S-H. Il existe aussi des modes de vibrations qui n'apparaissent pas sous la forme d'un seul type de mouvement pour une liaison donnée mais qui apparaissent plutôt comme un mouvement vibrationnel fortement couplé aux vibrations des liaisons voisines.

Application de la spectroscopie infrarouge dans l'étude des protéines

Le phénomène décrit dans le paragraphe précédent se manifeste particulièrement dans les spectres infrarouge de protéines et s'observe par des régions d'absorption qu'on appelle les bandes amides. Selon leur position et

leur apparence, les bandes amides permettent de déterminer la structure secondaire d'une protéine. Comme les protéines peuvent comporter plusieurs régions dont les structures sont différentes (voir par exemple la structure des neurofilaments), il est possible d'établir les pourcentages des différentes structures secondaires (hélice, feuillet, pelote statistique) qui composent une protéine déterminée.

Ces différentes bandes amides ont été très étudiées et certaines vibrations ont été attribuées à la fonction amide située à une fréquence donnée (voir table 2).

Tableau 2

Fréquences et description des bandes amides.

Bandé	Nombre d'onde approximatif (cm ⁻¹)	Attribution
Amide A	3300	Élongation N – H
Amide B	3100	Bande harmonique de la bande Amide II
Amide I	1660	Élongation C=O
Amide II	1570	N – H et élongation C – N
Amide III	1300	Élongation C – N et N – H
Amide IV	630	O=C=N
Amide V	730	N – H
Amide VI	600	C = O

Il y a beaucoup de liaisons hydrogène associées aux groupements N–H et C=O aux liens amides. Le tableau 2 donne l'attribution des bandes Amides Dépendemment de la structure secondaire de la protéine, la position des bandes sera différente selon qu'on a une configuration en hélice α ou en feuillet beta. Ainsi, on peut noter une modification au niveau de l'intensité des bandes et de leur fréquence.

2.3.3 Transformation des interférogrammes en spectres

L'appareil enregistre les interférogrammes à partir de l'interféromètre et effectue les transformation afin de reconstituer le spectre infrarouge en fonction de la fréquence.

2.3.4 Équipement et paramètres utilisés

Les expériences ont été faites sur un spectromètre infrarouge Nicolet modèle 510P. Le spectromètre est relié à un ordinateur qui permet l'acquisition des données. Chaque expérience est faite trois fois afin de vérifier la reproductibilité. Les spectres (100 interférogrammes par essai) ont été enregistrés sur une région de 4800 à 800 cm^{-1} avec une résolution de 4 cm^{-1} .

Les fenêtres utilisées sont faites de BaF₂ et ont 4 mm d'épaisseur. Elles ont une bande passante s'étendant de 4800 à 700 cm⁻¹.

2.3.5 Préparation de l'échantillon

Les neurofilaments sont centrifugés à 13 000 x g pendant 15 min à 4 °C. Avant de prendre un spectre de l'échantillon, on prend d'abord le spectre des fenêtres. L'échantillon est placé entre les 2 fenêtres de BaF₂. On prend un spectre du surnageant et un spectre du culot. On prend aussi un spectre d'eau et de tampon. Ces derniers sont nécessaires pour le traitement des données (Max et coll., 1998).

2.3.6 Traitement des données

Notons que lorsque l'ordinateur enregistre le spectre de l'échantillon, la soustraction du spectre des fenêtres s'effectue automatiquement. Le spectre de base est enregistré en transmittance par l'ordinateur couplé au FTIR (figure 11a). Les données sont ensuite transférées sur disquette et portées sur tableur EXCEL afin de poursuivre le traitement des données. Le spectre est alors transformée en absorbance selon la formule:

$$[5] \quad y = -\text{LOG } x$$

où y correspond à la valeur d'absorbance et x à la valeur de la transmittance.

Le spectre résultant est montré à la figure 11b. Afin d'être en mesure d'analyser le spectre de l'échantillon, il s'avère nécessaire d'effectuer la soustraction des bandes d'eau. La soustraction est considérée comme suffisante lorsque la bande d'eau située à environ 2100 cm^{-1} est pratiquement nulle. Pour la soustraction, nous avons utilisé la combinaison de différents types d'eau, soit le tampon, le surnageant et l'eau distillée.

Finalement, pour la comparaison des spectres des différents échantillons, nous avons normalisé les spectres par les bandes CH retrouvées aux fréquences entre 2950 et 2850 cm^{-1} . Cette normalisation avait pour but de comparer les mêmes quantités d'échantillons.

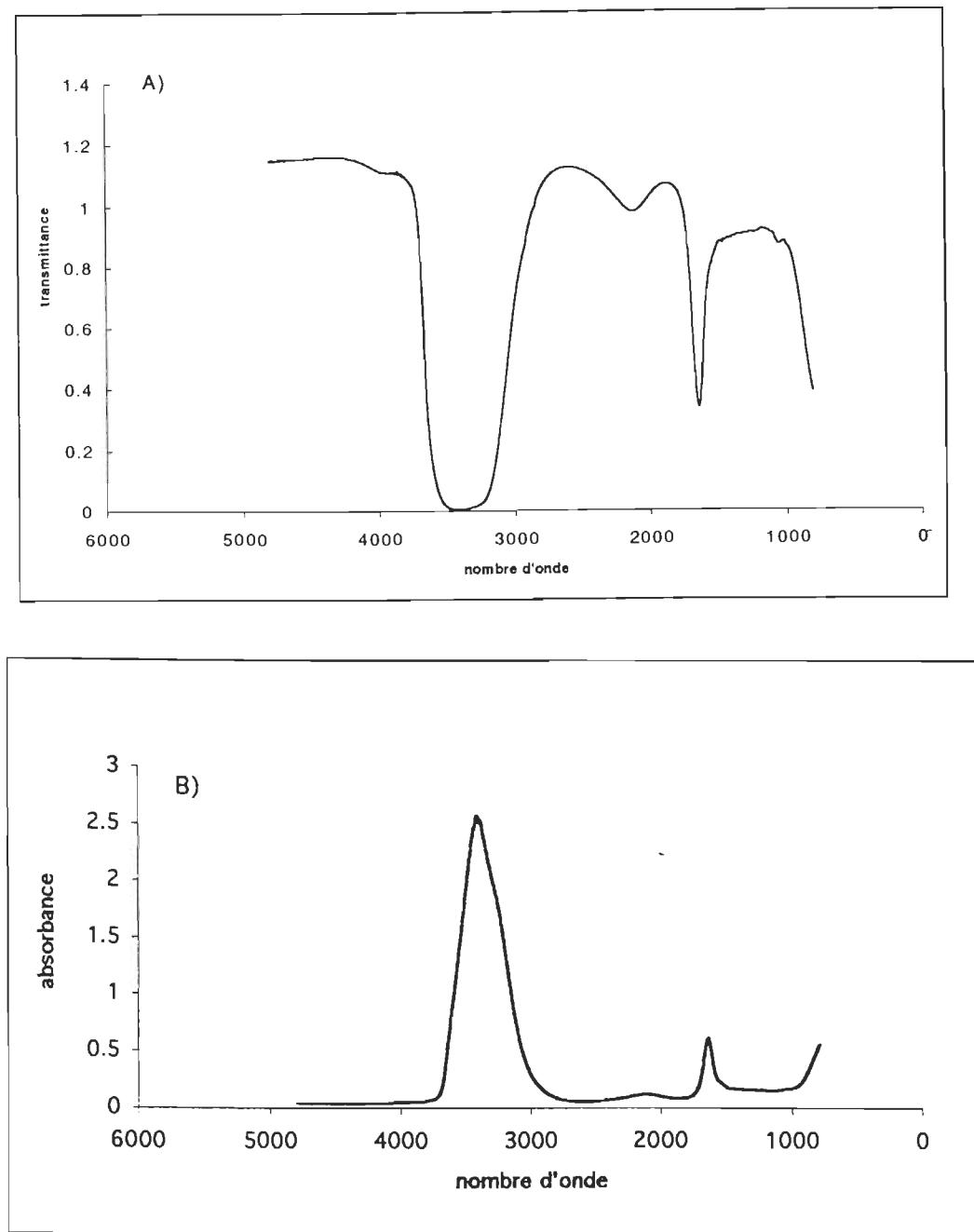


Figure 11. Schéma illustrant les différentes étapes de traitements mathématiques pour l'analyse spectrale des échantillons. A) Spectre brut en unité de transmittance. B) Spectre brut transformé en unité d'abosorbance.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

Mon travail de maîtrise consiste à démontrer que le stress oxydatif altère les neurofilaments. De plus, je démontre que selon le degré de phosphorylation les neurofilaments réagissent différemment au phénomène du stress oxydatif. Les différents résultats indiquent que les neurofilaments à l'état déphosphorylé sont très vulnérables au stress oxydatif.

Les expériences pour évaluer l'effet du stress oxydatif sur la structure des neurofilaments reposent sur l'utilisation de 3 techniques. La microscopie électronique nous a permis de montrer que l'organisation des neurofilaments est influencée par les différents stress oxydatifs qui ont été induits. Les gels SDS-Page et les immunoblots ont permis d'identifier quelles sont les sous-unités qui sont attaquées. Quant à la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, cette technique nous a permis de connaître l'influence du stress oxydatif sur les structures primaire (séquence d'acides aminés) et secondaire des neurofilaments. De plus, cette technique nous indique de façon évidente si les neurofilaments deviennent plus ou moins résistants à la protéolyse.

3.1 Analyse de l'organisation des neurofilaments natifs par microscopie électronique à transmission

Afin de vérifier si l'organisation des NFs natifs, donc phosphoryrés, est modifiée suite à un stress oxydatif, nous avons vérifié l'état des NFs en microscopie électronique. Cette technique est un outil qualitatif intéressant qui permet d'abord de s'assurer de la qualité des neurofilaments qui ont été purifiés et de vérifier si l'organisation est conservée suite à divers traitements. Les neurofilaments ont été oxydés par co-incubation avec le système $\text{FeCl}_3/\text{Ascorbate}$. Si on compare les neurofilaments natifs (fig 12a) aux neurofilaments oxydés (fig 12b), on constate que ces derniers apparaissent plus agrégés.

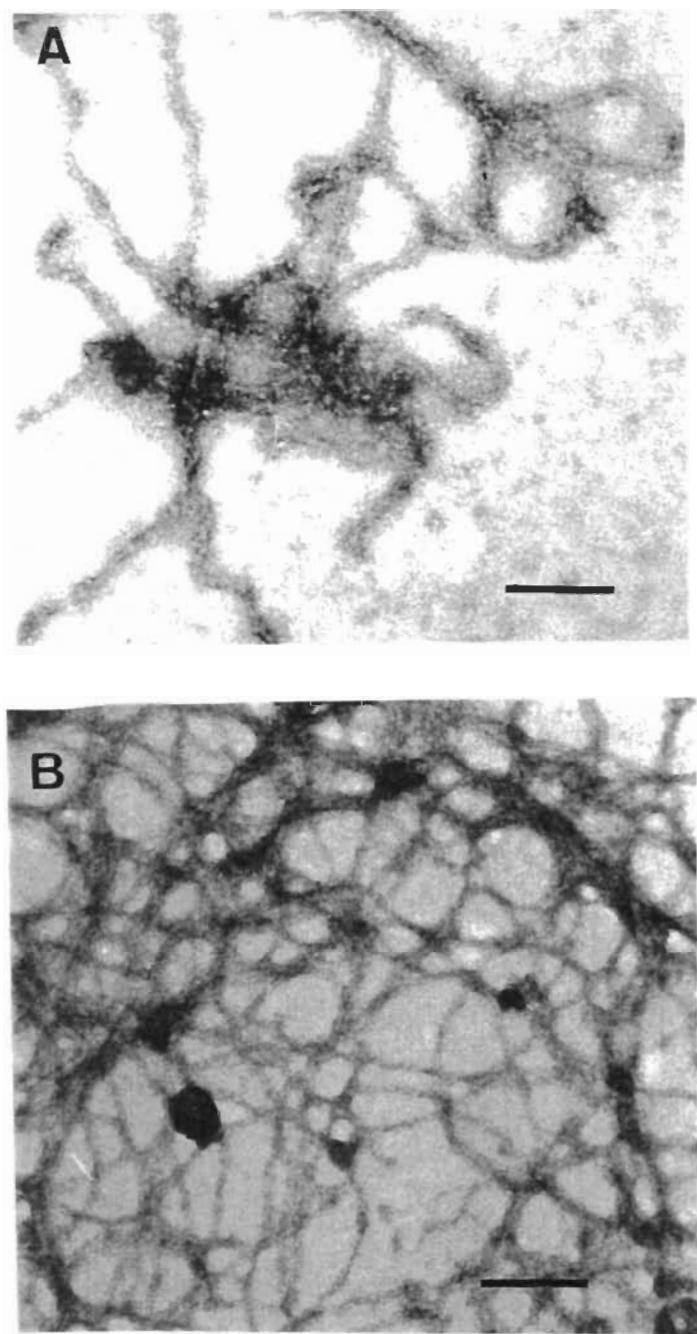


Figure 12. Micrographie de neurofilaments par coloration négative. A) Neurofilaments natifs (contrôle) de rats. B) Les neurofilaments ont été oxydés par co-incubation avec 20 mM ascorbate / 100 μ M $FeCl_3$ pendant 18 h à 37 °C. La barre représente 0.2 μ M.

3.2 Analyse des gels SDS-Page et immunoblots

Un des objectifs de mon projet de maîtrise était de comparer l'effet du stress oxydatif sur des neurofilaments phosphoryrés et déphosphoryrés. Afin de s'assurer que les neurofilaments étaient bien déphosphoryrés, des aliquots de neurofilaments de rats ont été prélevés à différents temps durant la déphosphorylation avec l'enzyme lambda phosphatase. Ces aliquots ont été déposés sur gel d'électrophorèse (figure 13) afin de contrôler l'état de déphosphorylation puis ont été utilisés pour les études par techniques FTIR.

La figure 13 montre que la déphosphorylation est maximale après 3 h d'incubation, à 30 °C, avec l'enzyme lambda phosphatase. On note une diminution assez importante du poids moléculaire apparent de NF-H et de NF-M. Quant à NF-L, son poids moléculaire apparent semble inchangé.

La figure 14 montre l'effet du stress oxydatif sur les neurofilaments phosphoryrés. Nous avons utilisé deux systèmes, le premier implique l'auto-oxydation des catécholamines tandis que le second utilise une réaction d'oxydation catalysée par des métaux. Nous avons effectué des réactions avec différentes catécholamines comme la DA, la L-DOPA et la dopac. En ce qui a trait au second système soit celui utilisant des ions métalliques, nous avons utilisé le FeCl_3 qui fournit un ion Fe^{+3} . Ce système, rappelons-le, nécessite la participation d'un donneur d'électron qui est dans ce cas-ci l'ascorbat.

Les expériences faites par gel d'électrophorèse montrent que le stress oxydatif a un effet sur les neurofilaments phosphorylés et ce, peu importe le mécanisme d'oxydation utilisé (figure 14). Effectivement, on constate l'atténuation des bandes correspondant aux trois sous-unités que ce soit via l'auto-oxydation des catécholamines ou bien via le système MCO. On remarque, par contre l'apparition d'une nouvelle bande de haut poids moléculaire demeurant dans le fond des puits.

Nous avons répété les mêmes expériences mais cette fois-ci en ajoutant dans le mélange un anti-oxydant soit le NAC ou le NAL (figure 14). On remarque que les anti-oxydants réussissent à empêcher les réactions d'oxydation puisque les bandes correspondant aux sous-unités de NFs n'apparaissent aucunement atténuées.

Une autre série d'expériences a été faite mais cette fois-ci nous avons utilisé les réactions médiées par l'auto-oxydation des catécholamines. Nous avons ensuite analysé les résultats par la technique de transfert western en utilisant des anticorps dirigés contre les sous-unités des NFs. La figure 15 illustre un immunoblot des expériences décrites précédemment. On note la disparition des bandes correspondant à la sous-unités NF-H et NF-L dans les différentes réactions utilisant un catéchol. De plus, les nouvelles bandes de haut poids moléculaire ne réagissent avec aucun des anticorps utilisés. Les

neurofilaments semblent donc perdre leur immunogénicité lors des réactions d'oxydations.

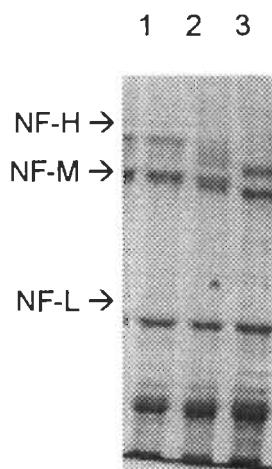


Figure 13. Gel SDS-Page, 7.5% acrylamide coloré au bleu de coomassie. Puits 1, NFs natifs (phosphorylés); puits 2, NFs après 1h d'incubation avec la lambda phosphatase; puits 3, NFs après 3h d'incubation avec la lambda phosphatase.

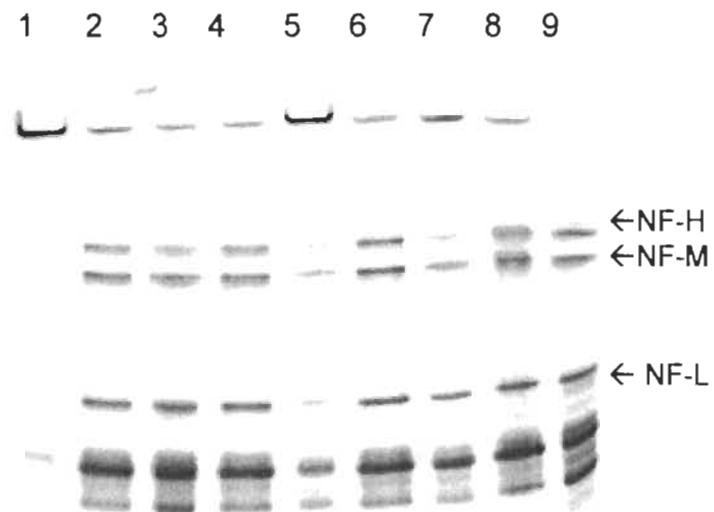


Figure 14. Analyse par gel d'électrophorèse 7.5 % d'acrylamide coloré au bleu de coomassie. Effet du stress oxydatif sur les NFs. Puits 1: NFs + 5 mM DA; puits 2: NFs + 5 mM DA + 65 mM NAC; puits 3: NFs + 5 mM L-DOPA; puits 4: NFs + 5 mM L-DOPA + 65 mM NAC; puits 5: NFs + 5 mM Dopac; puits 6: NFs + 5 mM Dopac+ 65 mM NAC; puits 7: NFs + 20 mM ascorbate/100 μ M FeCl₃; puits 8: NFs + 20 mM ascorbate/100 μ M FeCl₃ + NAC; puits 9: NFs contrôle (phosphorylé). Toutes les incubations ont été faites pendant 18 h à 30 °C. Tous les NFs étaient à l'état phosphorylé.

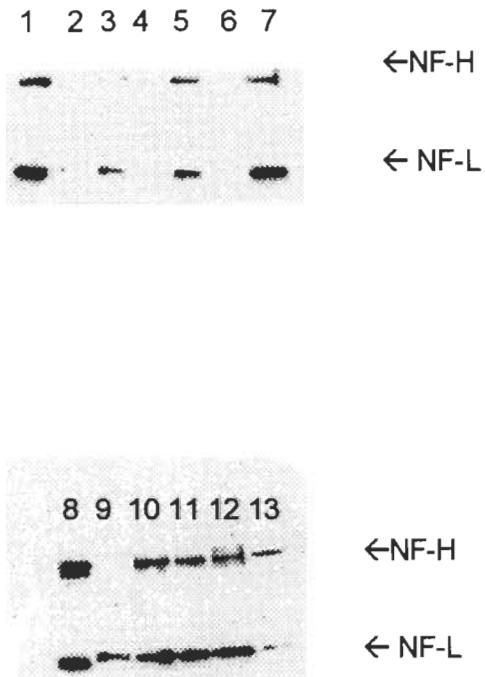


Figure 15. Résultat du transfert western. Les échantillons de NFs phosphorylés (0,4 mg/ml) ont été incubés sans catécholamine (puits 1 et 8) ou avec la dopamine 5 mM (puits 2,3 et 10), L-dopa 5 mM (puits 4, 5 et 11), ou avec dopac 5 mM (puits 6, 7 et 12). Les échantillons des puits 3, 5, 7 et 9 ont été co-incubés avec NAL 65 mM et les échantillons des puits 10 à 13 ont été co-incubés avec NAC 65 mM. Les anticorps utilisés sont spécifiques pour NF-H et NF-L.

3.3 Étude du stress oxydatif sur les NFs par FTIR

Les résultats présentés dans les pages précédentes indiquent qu'il y a des modifications dans l'organisation des NFs suite à un stress oxydatif. Par contre, les techniques de microscopie électronique, les gels d'électrophorèse et les immunoblots ne nous révèlent que très peu de choses quant au type de

modifications structuralea des NFs. La technique de FTIR permet préciser les modifications à l'échelle moléculaire. Il est possible, par cette technique, de connaître les changements au niveau de la structure secondaire des NFs. Afin de faciliter la compréhension de cette section des résultats, seuls les résultats finaux seront présentés dans cette section.

3.3.1 Étude de la structure des NFs phosphorylés et déphosphorylés

Comme il en est fait mention dans le premier chapitre, les neurofilaments sont majoritairement formés de structures en hélice α . La figure 16 montre les spectres de NFs à l'état phosphorylé et à l'état déphosphorylé. L'analyse des bandes Amide I et Amide II situées aux positions 1650 et 1550 cm^{-1} respectivement, nous donne le degré d'hélicité retrouvé dans les NFs. On constate que la la déphosphorylation n'affecte pas le degré d'hélicité des NFs.

La figure 16 nous donne une information supplémentaire concernant cette fois-ci les chaînes latérales des acides aminés qui composent les NFs. On remarque, suite à la déphosphorylation des NFs, la disparition de la bande située à la position 1082 cm^{-1} du spectre et l'apparition d'une bande située à 1055 cm^{-1} . La bande située à 1082 cm^{-1} correspond aux groupements phosphates situés principalement sur les phosphosérines. L'atténuation presque complète de cette bande suggère la disparition des groupements phosphates résultant de la déphosphorylation avec la lambda phosphatase. La

bande située à 1055 cm^{-1} correspond au groupement C-O de la fonction alcool présente sur la chaîne latérale des acides aminés qui ont été déphosphorylés. La figure 17 permet de mieux comprendre la réaction de déphosphorylation et de voir les modifications au niveau des chaînes latérales.

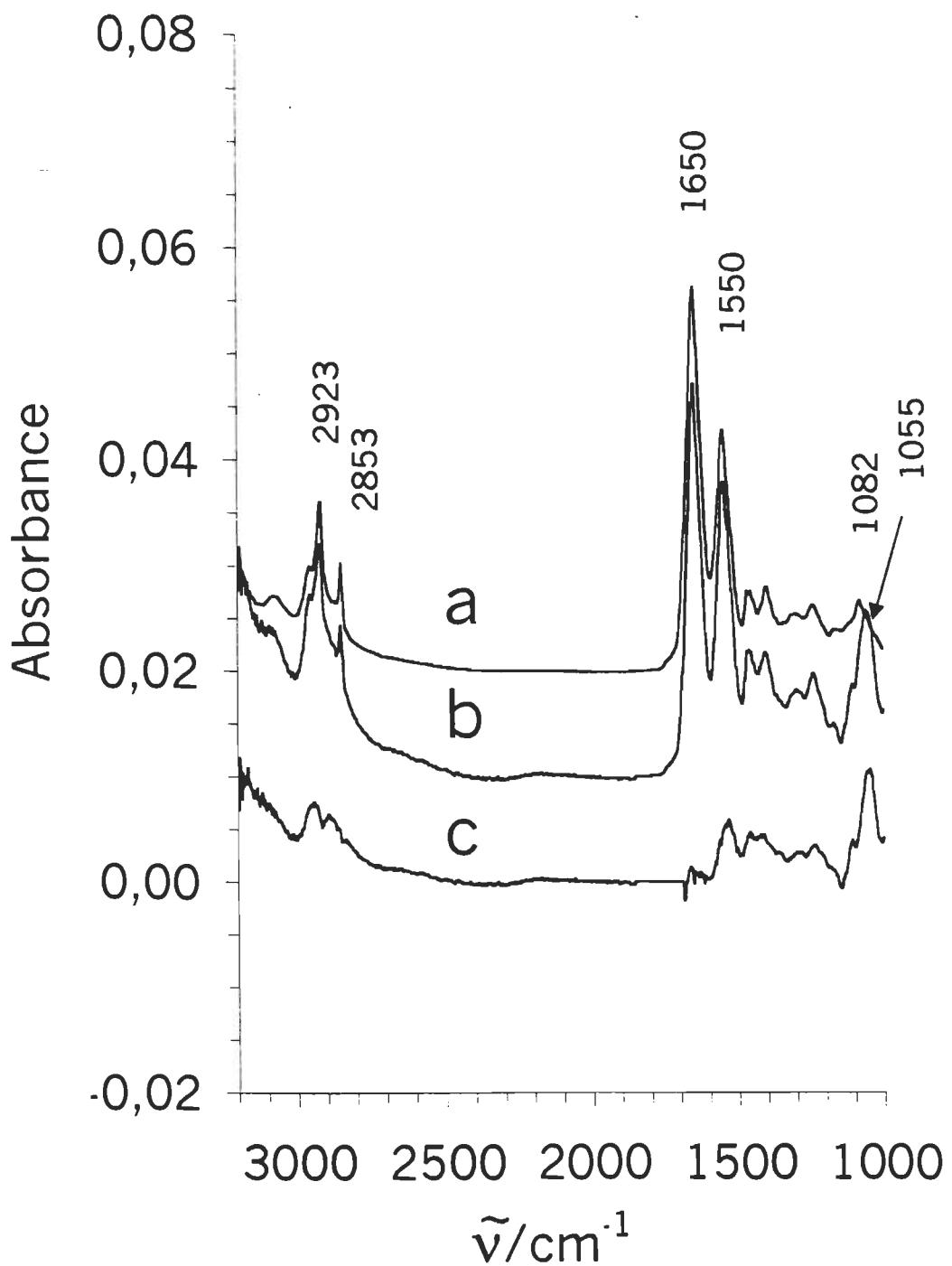


Figure 16. Spectre FTIR de NFs de rats phosphorylés et déphosphorylés. a) Spectre des NFs phosphorylés; b) NFs déphosphorylés avec la lambda phosphatase; c) spectre résultant de la soustraction du spectre b du spectre a ($b - a$). Les spectres ont été normalisés afin de comparer les mêmes quantités de NFs.

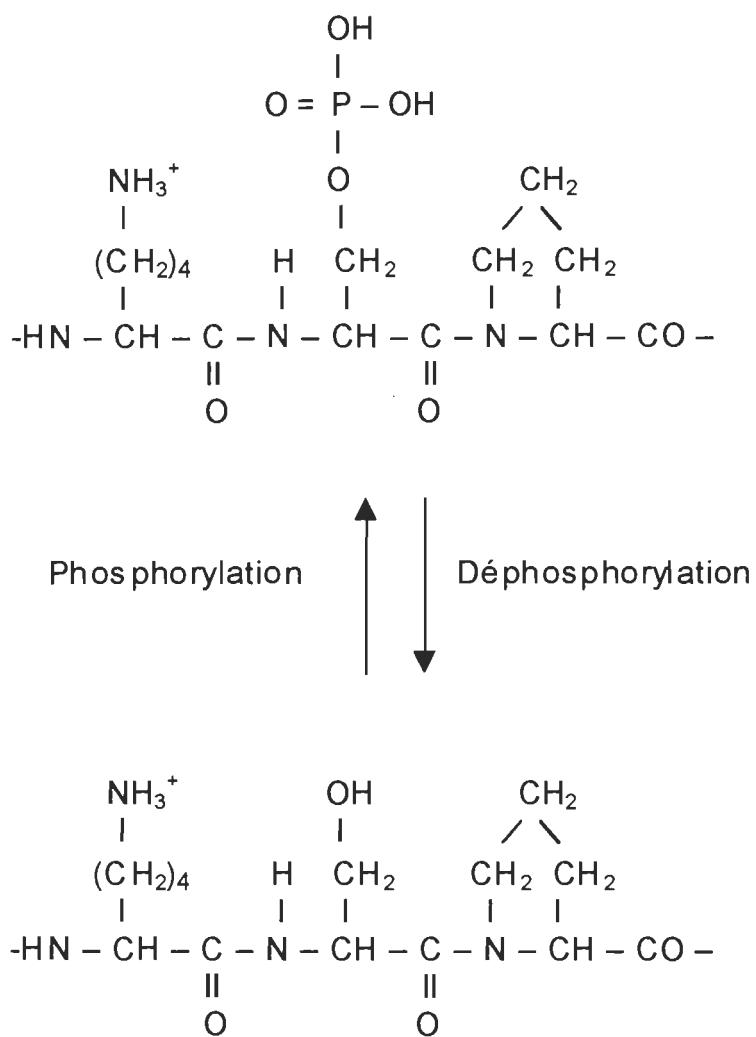


Figure 17. Modification de la chaîne latérale de la sérine lors de la déphosphorylation.

3.3.2 Oxydation des NFs par le système MCO

La figure 18 présente les spectres des NFs de rats à l'état natif et à l'état oxydé. Notons que l'état natif correspond aux NFs phosphorylés. Lorsque l'on compare l'état natif à l'état oxydé, on note une modification au niveau des bandes Amide I et Amide II. L'apparition d'épaulements de part et d'autre de la bande amide I situés à 1695 et 1620 cm⁻¹ reflète une augmentation d'environ 20 % de conformation en feuillets β. Le spectre c, qui est le spectre résultant de la soustraction du spectre a au spectre b, montre toutefois que les neurofilaments ne se sont pas dégradés puisque la région du spectre correspondant aux bandes amides est presque nulle.

Les spectres montrent aussi l'apparition de nouvelles bandes qui sont attribuées à des groupements de la chaîne latérale des acides aminés modifiés durant la réaction d'oxydation. L'apparition d'une bande à 1740 cm⁻¹ est typique d'une réaction d'oxydation. En fait, cette bande correspond à la vibration C=O de dérivés carbonyles. La figure 19 nous montre des exemples de dérivés carbonyles pouvant être obtenus suite à une réaction d'oxydation.

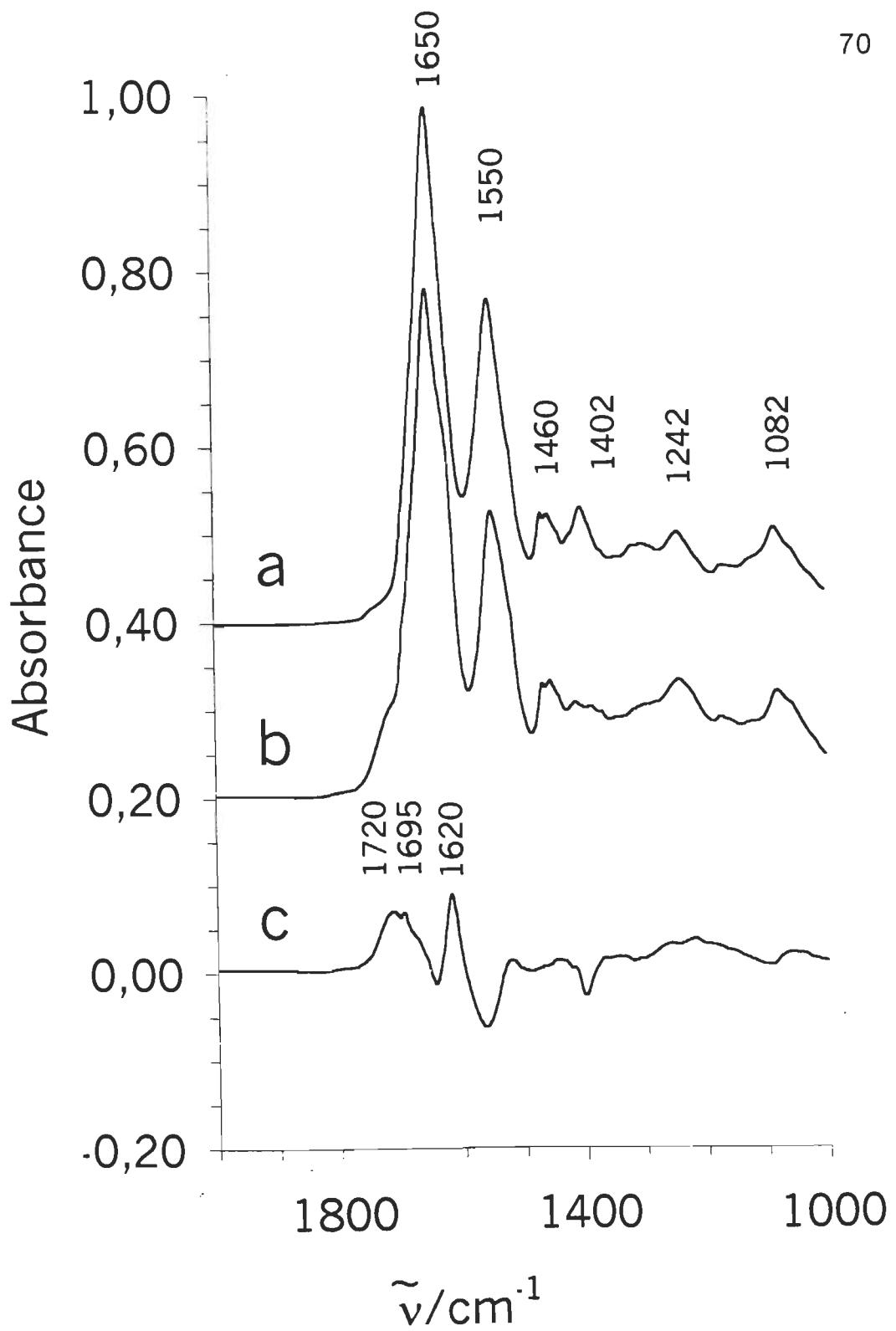


Figure 18. Oxydation des NFs via le système MCO. a) NFs natifs à l'état phosphorylé. b) NFs oxydés. c) Soustraction du spectre des NFs natifs du spectre des NFs oxydés (b-a).

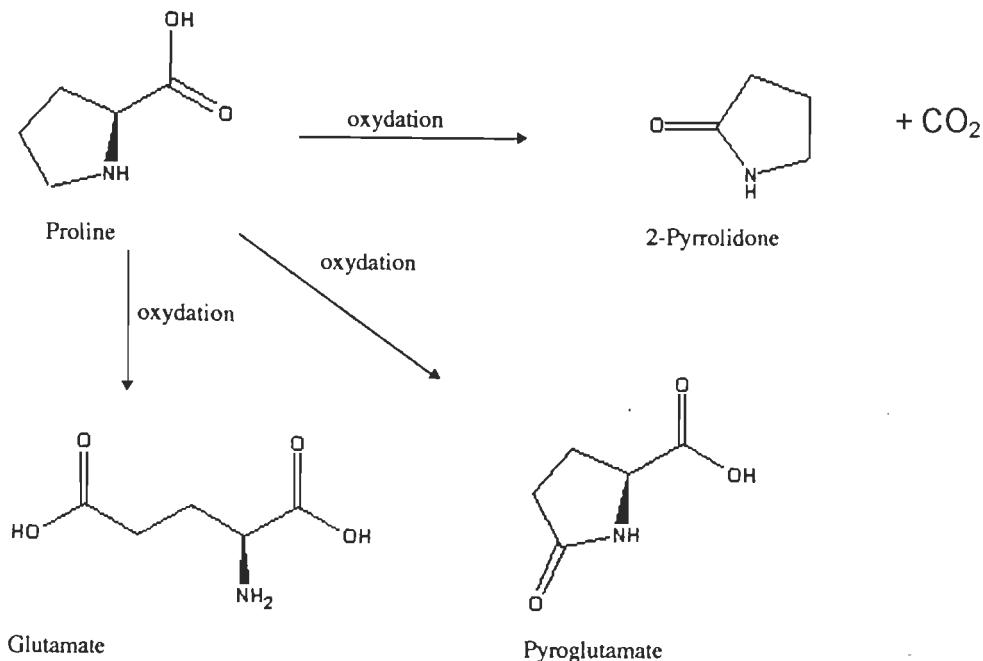


Figure 19. Exemples de dérivés carbonyles obtenus suite à une réaction d'oxydation via le système MCO sur certains acides aminés (Stadtman, 1993).

3.3.3 Oxydation des NFs déphosphorylés

La figure 20 représente l'effet du stress oxydatif sur des NFs déphosphorylés. Lorsque l'on compare le spectre de NFs déphosphorylés au spectre de NFs déphosphorylés et oxydés, on constate des modifications des bandes Amide I et Amide II qui sont attribuables à un changement au niveau du squelette même des acides aminés qui composent les NFs.

L'apparition d'épaulements de part et d'autre de la bande amide I situés à 1695 et 1620 cm^{-1} reflète une augmentation de conformation en feuillets β . Le spectre c, qui est le spectre résultant de la soustraction du spectre a au spectre b, montre des bandes négatives dans la région correspondant aux bandes

amides I et II. Ce résultat indique que la protéine s'est tout simplement fragmentée suite à la réaction d'oxydation.

Si on analyse les bandes reliées aux chaînes latérales des acides aminés, on constate des changements assez importants. D'abord on remarque l'apparition de nouvelles bandes à 1800, 1720, 1155 et 1072 cm⁻¹. Les bandes situées à 1720 et 1072 cm⁻¹ correspondent à de nouveaux groupements carbonyles qui se sont formés suite à la réaction d'oxydation. Les bandes situées à 1800, 1155 et une partie de la bande située à 1072 cm⁻¹ correspondent à un groupement carbonyle mais dans une situation plutôt particulière. Ce résultat suggère que le groupement carbonyle soit dans un environnement riche en oxygène du type O-CO-O.

Les NFs déphosphorylés apparaissent donc plus sensibles aux réactions d'oxydation puisqu'on note des dommages beaucoup plus drastiques que ceux observés sur les NFs phosphorylés oxydés. La phosphorylation pourrait donc jouer un rôle de protection contre la dégradation par oxydation. Afin de mieux comparer les différentes situations étudiées en spectroscopie FTIR, un tableau synthèse est présenté à la fin de cette section (tableau 3).

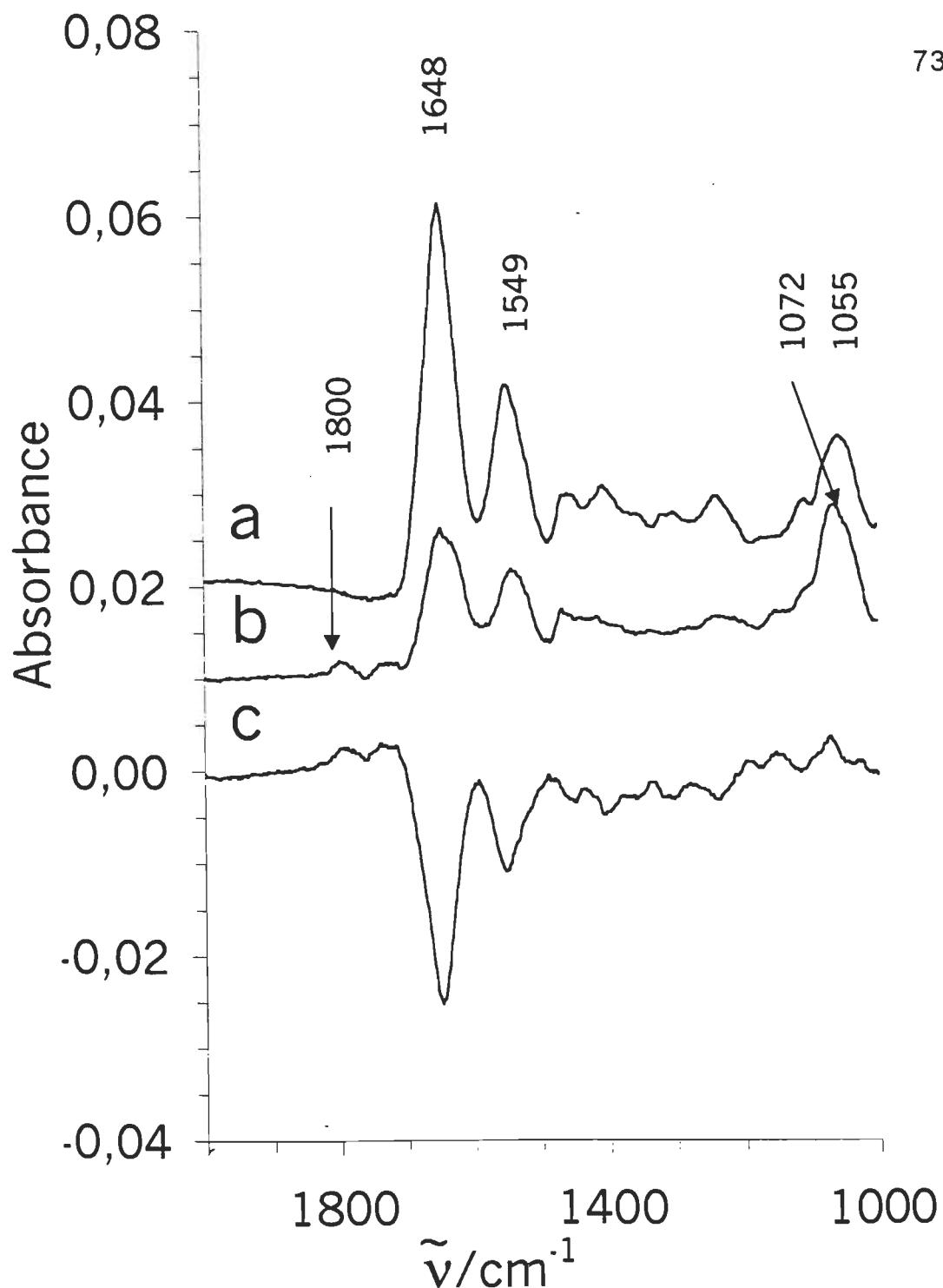


Figure 20. Effet du stress oxydatif sur des NFs déphosphorylés. a) Spectre des NFs déphosphorylés. b) Spectre des NFs déphosphorylés ayant subi un stress oxydatif. c) Spectre résultant de la soustraction du spectre (a) du spectre (b) (b-a).

Tableau 3

Positions (en cm^{-1}) des bandes ir des NFs

Natif	Oxydé	Dephosphorylé	Dephosphorylé et oxydé	Attribution	Réf.
3078	3078	3078	3078	Amide B	1
2956	2956	2956	2956	CH3 asym. élong.	2
2923	2923	2923	2923	CH2 asym. élong.	2
2853	2853	2853	2853	CH3 , CH2 sym. élong.	2
			1800	C=O élong, lactone	3
	~ 1720		~ 1720	C=O élong., acide	3
	~ 1695		~ 1695	Amide I, feuillet β	4-6
1650	1650	1650	1650	Amide I, helice α	1, 4-8
	~ 1620		~ 1620	Amide I, feuillet β	1, 4-8
1550	1550	1550	1550	Amide II	1, 4, 5, 7
1468	1460	1468	1460	CH2 asym. déf.	3, 9
1450	1450	1450		CH3 asym. déf.	3, 9
1402	1402	1402	1402	CH3 , CH2 sym. dér.	3, 9
1242	1242	1242	1242	Amide III	9, 1
			1155	C-O st., lactone	3
1082	1082			[OPO]– sym. élong.	9
	1072		1072	C-O st., acide et lactone	3
		1055		C-O st., alcool	3

Élong., élongation; sym, symétrique; asy, asymétrique; def., déformation. 1, Chapados *et al.*, 1991; 2, Chapados, 1985; 3, Alpert *et al.*, 1970; 4, Lavigne, 1994; 5, Görne-Tschelnokow *et al.*, 1993; 6, Stuart, 1996; 7, Haris, 1992; 8, Booth *et al.*, 1997; 9, Alben *et al.*, 1984;

CHAPITRE 4

DISCUSSION

Nous tenterons, dans ce chapitre, d'analyser d'un œil critique les résultats obtenus et de faire un lien entre nos résultats et les travaux effectués par d'autres équipes de chercheurs qui s'intéressent aussi au rôle du stress oxydatif dans les maladies neurodégénératives.

4.1 Analyse des résultats

Nos résultats obtenus en FTIR montrent de façon évidente que le stress oxydatif modifie les structures primaire et secondaire des NFs. Ces modifications pourraient contribuer au développement d'une désorganisation du cytosquelette neuronal qu'on retrouve dans plusieurs maladies neurodégénératives.

Il est bien établi que le stress oxydatif joue un rôle dans la progression de certaines maladies neurodégénératives. Les travaux des dernières années ont permis de corroborer cette hypothèse. Les travaux de Smith et coll. (1995a, 1995b, 1996, 1996) démontrent la présence de dérivés carbonyles au niveau des lésions retrouvées sur des coupes de cerveaux de sujets Alzheimer et Parkinsonien.

4.1.1 Modifications structurales des NFs suite à leur oxydation

Différents travaux démontrent que les NFs sont l'une des composantes les plus sévèrement touchées. Par exemple, les travaux effectués sur des cellules en culture par Cookson et coll. (1996) ont démontré que le stress oxydatif s'attaque préférentiellement aux NFs et qu'il ne modifie pas d'autres composantes du cytosquelette telles que l'actine et la tubuline. Leurs travaux utilisent le système fer/ascorbate similaire au système que nous avons utilisé dans nos expériences. Lorsque l'on confronte nos résultats obtenus en immunoblots avec ceux obtenus par Cookson et coll. (1996), on constate que nos résultats sont comparables. Effectivement, nos résultats montrent une atténuation complète des bandes correspondant aux sous-unités. Les résultats obtenus par la technique FTIR montrent que lorsque les NFs subissent un stress oxydatif, qui a été simulé ici par l'utilisation de catécholamines ou de Fer, il y a production de dérivés carbonyles.

La technique de FTIR a permis d'en connaître davantage sur la provenance de ces dérivés carbonyles et comment ils modifient la structure des NFs. En effet, grâce à sa sensibilité, cette technique permet d'étudier les modifications au niveau des structures primaire et secondaire des protéines. L'analyse du spectre des NFs oxydés montre clairement les modifications au niveau de la chaîne latérale des acides aminés. Selon les divers travaux portant sur l'oxydation des acides aminés libres ou composant les protéines, les dérivés carbonyles pourraient provenir de l'oxydation des résidus His, Arg, Lys, Pro, Met

et Cys puisque ces résidus sont très souvent retrouvés au site de liaison pour les métaux (Stadtman, 1993). Les NFs, plus particulièrement NF-H et NF-M, sont caractérisés par un domaine carboxy-terminal majoritairement composé de séquences répétitives KSP. Ces séquences forment des bras latéraux permettant l'assemblage des NFs en réseau tridimensionnel. Étant donné que ces bras latéraux semblent être la partie des NFs qui est la plus exposée au stress oxydatif, nous pensons que les dérivés carbonyles proviendraient principalement de l'oxydation des résidus Lys et Pro.

Ces modifications au niveau de la structure primaire, qui apparaissent progressivement au fur et à mesure que la protéine s'oxyde, ont pour conséquence de modifier le point isoélectrique, le repliement et l'hydrophobicité de cette protéine (Robert et coll. 1987). On constate qu'effectivement, la structure secondaire des NFs est modifiée lorsqu'elle est oxydée. Le spectre FTIR montre des modifications au niveau des bandes Amide I et Amide II reflétant une augmentation de la conformation en feuillets β .

Effet du changement de conformation sur l'organisation des NFs

Le changement de conformation observé en FTIR a pour effet de modifier l'arrangement des NFs. En effet, on constate, en microscopie électronique, que les NFs adoptent une forme plus agrégée comparativement aux NFs natifs. Cette nouvelle organisation confère aux NFs une certaine résistance à la

dégradation. Ce type d'organisation nous apparaît aussi sur gel d'électrophorèse sous forme d'une espèce de haut poids moléculaire demeurant au fond du puits.

4.1.2 Modifications structurales des NFs déphosphorylés ayant subi un stress oxydatif

Les études portant sur l'effet du stress oxydatif sur des protéines déphosphorylés sont très peu nombreuses voir pratiquement inexistantes. Les NFs, en particulier NF-H, sont parmi les protéines les plus phosphorylées du système nerveux. D'autre part, la plupart des maladies neurodégénératives impliquant une dysfonction des NFs montrent des lésions au niveau du corps cellulaire des neurones ou dans la partie proximale de l'axone. Rappelons que les NFs sont synthétisés au niveau du corps cellulaire et qu'ils sont alors à l'état déphosphorylé. Les NFs migrent vers l'axone et sont alors phosphorylés pour former ainsi un réseau tridimensionnel très organisé. Il devient donc important d'étudier les NFs dans les deux états (phosphorylé et non phosphorylé) et de comparer l'effet du stress oxydatif sur chacun d'eux.

Les résultats obtenus en FTIR portant sur l'effet du stress oxydatif sur les NFs permettent encore une fois d'observer, à l'échelle moléculaire, les modifications retrouvées au niveau des NFs. Les résultats démontrent qu'il y a un changement dans la structure des NFs oxydés peu importe leur degré de

phosphorylation. En effet, les NFs déphosphorylés, ayant été incubés avec un agent oxydant, montrent une augmentation de la conformation en feuillet β . Toutefois, contrairement à ce qui est observé dans les situations de stress où les NFs sont à l'état phosphorylé, on note cette fois-ci une diminution importante de l'intensité des bandes Amide I et Amide II. Ce qui indique qu'il y a clivage de la chaîne polypeptidique. Comme cette dégradation se produit en l'absence d'enzymes protéolytiques, on parle alors de fragmentation (Stadtman, 1993).

4.1.3 Rôle de la phosphorylation dans la stabilité des NFs

D'après les résultats obtenus en FTIR, on constate certaines modifications au niveau de la chaîne latérale des acides aminés phosphorylés. En effet, on constate que le groupement phosphate fait place à un groupement alcool lorsque les NFs sont déphosphorylés par la lambda phosphatase. Cependant, ces modifications ne semblent avoir aucun effet sur la structure secondaire des NFs. Qu'ils soient à l'état phosphorylé ou non, ils sont constitués principalement d'hélices α .

Bien qu'à première vue la phosphorylation semble avoir peu de conséquences sur les NFs nous avons quand même expérimenté l'effet du stress oxydatif sur les NFs mais cette fois-ci à l'état déphosphorylé. Ces travaux ont permis de mieux comprendre un des rôles que peut jouer la phosphorylation dans la stabilité des NFs.

Les résultats obtenus nous démontrent entre autre que la phosphorylation confère une protection aux NFs en augmentant leur stabilité malgré les modifications dues aux réactions d'oxydation. Ceci suggère que le stress oxydatif s'attaquerait préférentiellement aux NFs nouvellement synthétisés dans le corps cellulaire avant qu'ils soient phosphorylés et transportés dans l'axone.

4.1.4 Rôle du stress oxydatif dans les maladies neurodégénératives

Bien qu'on reconnaisse l'implication du stress oxydatif, il est encore difficile de savoir à quel moment il est impliqué dans la cascade d'évènements conduisant à la formation de lésions.

Les travaux effectués par Smith et coll. (1995a) démontrent une augmentation importante du taux de protéines oxydées chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer. En produisant un anticorps marquant les dérivés carbonyles, il a été possible de constater une augmentation de la concentration des dérivés sur des coupes de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

De plus, en ce qui concerne la maladie de Parkinson, il est maintenant bien connu que les radicaux libres contribuent grandement à l'augmentation du contenu en Fer et promouvoient la peroxydation des lipides (Jenner et Olanow, 1996). On note aussi une augmentation dans le métabolisme des catécholamines due à une forte activité de la monoamine oxydase. Les

semiquinones qui sont produites lors du métabolisme des catécholamines sont des espèces très réactives pouvant oxyder les protéines ou même les lipides membranaires.

Les deux systèmes utilisés pour nos expériences sur le stress oxydatif ont été choisi de façon à représenter les éléments retrouvés chez un patient atteint de la maladie de Parkinson. Les neurones dopaminergiques d'un sujet Parkinsonnien possèdent un marqueur pathologique très caractéristique soit la présence de corps de Lewy. Ceux-ci sont formés de plus de 90 % de NFs endommagés. Les différents résultats obtenus dans ce projet permettent donc de comprendre davantage les mécanismes impliqués dans la réponse intracellulaire lors de dommages causés par différents stress cellulaires qu'ils soient de sources endogène ou exogène.

Les expériences sur l'oxydation des NFs pour tenter d'expliquer certaines neuropathies impliquant les NFs sont assez nombreuses. Par exemple, les travaux effectués par Carden et coll. (1986) démontrent que certaines expositions à diverses substances retrouvées dans l'environnement peuvent contribuer à la progression de certaines neuropathies. Ils ont constaté que l'injection de 2,5-hexanedione (HD) chez des rats provoque une accumulation rapide de NFs qu'on retrouve sous la forme d'agrégats. Il y aurait ainsi formation d'un produit de haut poids moléculaire visible sur gel d'électrophorèse. Cependant, les résultats présentés par cette équipe de chercheurs révèlent que

ce produit de haut poids moléculaire serait spécifique pour l'anticorps anti-NF-H mais non pour anti-NF-M et anti-NF-L.

Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que les expériences effectuées par Carden et coll. (1986) ont été faites *in vivo* c'est-à-dire que les animaux ont été traités au HD, puis les NFs ont ensuite été purifiés selon la méthode par flottaison d'axone. Lors de nos expériences, nous avons effectué d'abord la purification de NFs à partir de sujets tout à fait normaux, puis nous avons traité ces NFs avec des agents oxydants. Une autre raison pouvant expliquer cette différence serait au niveau des anticorps utilisés qui sont probablement différents puisqu'ils sont d'une autre provenance.

CONCLUSION

Le but de la présente étude était de préciser quels sont les effets du stress oxydatif sur les NFs. Les résultats obtenus et ce, quel que soit le système d'oxydation utilisé, montrent à quel point les NFs représentent une cible potentielle d'attaque pour des dérivés actifs d'oxygène ou d'autres espèces radicalaires réactives.

Les expériences en microscopie électronique, l'analyse des gels d'électrophorèse et des immunoblots montrent que les NFs adoptent une organisation particulière suite à un stress oxydatif. De plus, les résultats obtenus par spectroscopie FTIR confirment ce qui a été observé par Smith et coll. (1995, 1996) c'est-à-dire la présence de dérivés carbonyles résultant d'une attaque par des espèces radicalaires réactives.

En effet, Smith et coll. avait noté la présence de dérivés carbonyles sur des coupes de cerveau provenant de sujets atteints de la maladie de Parkinson ou de la maladie d'Alzheimer. La technique de spectroscopie FTIR a permis de définir quels types de modifications structurales sont apportées aux NFs et surtout a permis de déduire que l'attaque se produit au niveau du domaine carboxy-terminal des NFs. Rappelons que le domaine carboxy-terminal est un

domaine riche en lysine et proline et qu'il contient la majorité des sites de phosphorylation. De plus, cette région correspond aux bras latéraux impliqués dans la formation du réseau tridimensionnel et se retrouve donc dans la région la plus disponible pour ce genre d'attaque.

Toutes ces données permettent de mieux comprendre le rôle du stress oxydatif dans les maladies neurodégénératives et quels sont les mécanismes qui sont impliqués dans la formation des corps de Lewy. Nous avons contribué à une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires impliqués entraînant des modifications structurales aux NFs qui sont présents dans les corps de Lewy. Toutefois, il serait intéressant de vérifier si le même genre de traitement appliqué sur un système *in vivo* résulte en une augmentation de la quantité de dérivés carbonyles et par la même occasion vérifier si cette augmentation est localisée à des endroits précis dans le cerveau.

BIBLIOGRAPHIE

- Alben, J. O. and Flamingo, F. G. Fourier Transform Infrared Spectroscopy, in
Optical techniques in biological research. Academic Press, inc., 1984.
- Alpert, N. L., Keiser, W. E., and Szymanski, H. A. IR: theory and practice of
infrared spectroscopy. Plenum, New York, 1970.
- Andersson, M. and Grankvist, K. Ascorbate induced free radical toxicity to
isolated islet cells (1995). *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **24**, 493-498.
- Bancher, C., Lassmann, H. and Budka, H. An antigenic profile of Lewy bodies:
immunocytochemical indication for protein phosphorylation and
ubiquitination (1989). *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **48**, 81-93
- Booth, D. R., Sunde, M., Bellotti, V., Robinson, C. V., Hutchinson, W. L., Fraser, P.
E., Hawkins, P. N., Dobson, C. M., Radford, S. E., Blake, C. C. F., Pepys, M.

- B. Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis (1997). *Nature*, **385**, 787-793.
- Cadrin, M. and Martinoli, M.G. Alteration of intermediate filaments in various histopathological conditions (1995). *Biochem. Cell. Biol.*, **73**, 627-634.
- Castellani, R., Smith, M. A., Richey, P. L., and Perry, G. Glycoxidation and oxidative stress in Parkinson disease and diffuse Lewy body disease (1996). *Brain Res.*, **737**, 195-200.
- Chapados, C. Aggregation of chlorophylls in monolayers 6. Infrared study of the C-H stretching bands of chlorophyll a and of chlorophyll b in monolayers (1985). *Biophys. Chem.*, **21**, 227-242.
- Chapados, C., Lemieux, S. and Carpentier, R. Protein and chlorophyll in photosystem 2 probed by infrared spectroscopy (1991). *Biophys. Chem.*, **39**, 225-239.
- Cookson M.R., Thatcher N.M., Ince P.G. and Shaw P.J. Selective loss of neurofilament proteins after exposure of differentiated human IMN-32 neuroblastoma cells to oxidative stress (1996). *Brain Res.* **738**, 162-166.
- Davies, K. J. A. and Delsignore, M.E. Protein damage and degradation by oxygen radicals (1987). *J. Biol. Chem.*, **262**, 9908-9913.

Davies, K. J. A., Delsignore, M.E. and Lin S. W. Protein damage and degradation by oxygen radicals (1987). *J. Biol. Chem.*, **262**, 9902-9907.

Davies, K. J. A., Lin S.W and Pacifici, R. E. Protein damage and degradation by oxygen radicals (1987). *J. Biol. Chem.*, **262**, 9914-9920.

Davies, K. J. A. Protein damage and degradation by oxygen radicals (1987). *J. Biol. Chem.*, **262**, 9895-9901.

Flienger, K.H. and Liem, R.K.H. Cellular and molecular biology of neuronal intermediate filaments (1991). *Int. Rev. Cytol.*, **131**, 109-167.

Forno, J. S. (1969). Concentric hyalin intraneuronal inclusions of Lewy type in the brains of ederly persons. *J. Am. Geriatr. Soc.* **17**, 557-75.

Forno, L. S. The Lewy body in Parkinson's disease. In *Advances in Neurology* New York: Raven Press edit., 1986.

Forno, L. S., Sternberger, L., Sternberger, N., Stresfling, A., Swanson, K. & Eng, L. Reaction of Lewy bodies with antibodies to phosphorylated and non phosphorylated neurofilaments(1986). *Neurosci. Lett.* **64**, 253-8.

Fuchs E. and Cleveland D.W. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease (1998). *Science*, **279**, 514-519.

Galloway, P., Grundke-Iqbali, I., Iqbali, K. and Perry, G. Lewy bodies contain epitopes both shared and distinct from Alzheimer's neurofibrillary tangles (1988). *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, **47**, 654-63.

Gardner, E. E., Dahl, D., and Bignami, A. Formation of 10 nm filaments from 150 k dalton neurofilament protein in vitro (1984). *J. Neurosci. Res.*, **11**, 145-155.

Goldman, J., Yne, S.-H., Chiu, F. & Peress, N. Lewy bodies of Parkinson's disease contain neurofilament antigens (1983). *Science*, **221**, 1082-4.

Goldman, J.E., and Yen, S.H. Cytoskeletal protein abnormalities in neurodegenerative diseases (1987). *Ann. Neurol.* **19**, 209-223.

Goldstein M.E., Sternberg N. H. and Sternberg L. A Phosphorylation protects neurofilaments against proteolysis (1987). *J. Neuroimmunol.* **14** (2), 149-160.

Gorne-Tschelnokow, U., Naumann, D., Weise, C. and Hucho, F. Secondary structure and temperature behaviour of acetylcholinesterase: Studies by Fourier-transform infrared spectroscopy (1993). *Eur. J. Biochem.*, **213**, 1235-1242.

Gou J.P., Gotow T., Janmey P.A. and Leterrier J.F. Regulation of neurofilament interactions in vitro by natural and synthetic polypeptides sharing Lys-Ser-

Pro sequences with the heavy neurofilament subunit NF-H neurofilament crossbridging by antiparallel sidearmoverlapping (1998). *Med. Biol. Eng. Comp.*, **36** (3), 371-378.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. Oxygen radicals and the nervous system (1985). *TINS*, **8**, 22-26.

Haris, P. I. and Chapman, D. Does Fourier-transform infrared spectroscopy provide useful information on protein structures? (1992). *Trends Biochem Sci.*, **17**, 328-33

Heins, S., Wong, P.C., Müller, S., Goldie, K., Cleveland, D.W., and Aebi, U. The rod domain of NF-L determines neurofilaments architecture, whereas the end domains specify filaments assembly and network formation (1993). *J. Cell Biol.*, **123**, 1517-1533.

Hill, W. D., Arai, M., Cohen, J. A and Trojanowski, J. Q. Neurofilament mRNA is reduced in Parkinson's disease substantia nigra pars compacta neurons (1993). *J. Comp. Neurol.*, **329**, 328-336.

Hill, W. D., Lee, V. M., Hurtig, H. I., Murray, J. M. and Trojanowski, J. Q. (1991). Epitopes located in spatially separate domains of each neurofilament subunit are present in Parkinson's disease Lewy bodies (1991). *J-Comp-Neurol.* **309** (1), 150-60.

Hisanaga, S. and Hirokawa, N. Molecular architecture of neurofilaments: in vitro reassembly process of neurofilaments-L protein (1990). *J. Mol Biol.*, **221**, 871-882.

Li, K., Ito, H., Tanaka, K. and Hirano, A. Immunocytochemical co-localization of the proteasome in ubiquitinated structures in neurodegenerative diseases and the elderly (1997). *J-Neuropathol-Exp-Neurol.*, **56** (2), 125-31.

Itoh, T., Sobue, G., Ken, E., Mitsuma, T., Takahashi, A., and Trojanowski, J.Q. Phosphorylated high molecular weight neurofilament protein in the peripheral motor, sensory and sympathetic neuronal perikarya: System-dependent normal variations and changes in amyotrophic lateral sclerosis and multiple system atrophy (1992). *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **83**, 240-245.

Jackson, M. and Mantsch, H.H. The medical challenge to infrared spectroscopy (1997). *J. Molec. Structure*, **408/409**, 105-111.

Jackson, M., Sowa, M.G. and Mantsch, H.H. Infrared spectroscopy: a new frontier in medicine (1997). *Biophys. Chem.*, **68**, 109:125.

Jenner P. and Olanow C.W. pathological evidence for oxidative stress in *Parkinson's disease and related degenerative disorders. In Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson's disease.* Olanow, Jenner, Youdim eds. (1996).

Jenner, P. *Neurodegeneration and Neuroprotection in Parkinson's Disease*, Academic Press Ed. inc., (1996).

Julien, J.P. A role for neurofilaments in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis (1995). *Biochem and Cell Bio.*, **73** (9 and 10), 593-609.

Julien, J.P. and Mushynski, W.E, Multiple phosphorylation sites in mammalian neurofilament polypeptides (1982). *J. Biol. Chem.*, **257**, 10467-10470.

Julien, J.P., Côté, F., Beaudet, L., Sidky, M., Flavell, D., Gosvelt, F., and Mushynski, W.E. Sequence and structure of the mouse gene coding for the largest neurofilament subunit (1988). *Gene (Amst.)*, **68**, 307-314.

Lavigne, P., Une nouvelle approche pour mesurer la contribution des résidus hydrophobes à la stabilisation de la structure tertiaire des protéines globulaires, Thèse, Université du Québec à Trois-Rivières. 1994.

Lee, M. K., Wong, P. C. and Cleveland, D.C., Neurofilaments are obligate heteropolymers in vivo (1993). *J. Cell. Biol.*, **122**, 1337-1350.

Lee, V. M. Y., Otvos, L., Carden, M. J., Holosi, M., Dietchold, B., and Lazzarini, R.A., Identification of the major phosphorylation site in mammalian neurofilaments (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 1998-2002.

Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.R. and Shacter, E., titre 37. Carbonyl assays for determination of oxidatively Modified Proteins (1994). *Meth. Enzym.* **233**, 346-357.

Lowe, J., Landon, M., Pike, I., Spendlove, I., McDermott, H. & Mayer, R. Dementia with b-amyloid deposition: involvement of α B crystallin supports two main diseases (1990). *Lancet*, **336**, 515-16.

Montine, T. J., Farris, D. B and Graham, D. G. Covalent crosslinking of neurofilament proteins by oxidized catechols as a potential mechanism of Lewy body formation (1995), *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **54**, 311-19.

Nixon, R.A., and Shea, T. B. Dynamics of neuronal intermediate filaments: a developmental perspective (1992). *Cell Motil. Cytoskeleton*, **22**, 81-91.

Olanow, C. W. A radical hypothesis for neurodegeneration (1993). *TINS*, **16**, 439-444.

Pant H. C. and Veeranna. Neurofilament phosphorylation (1995). *Biochem. Cell Biol.*, **73**, 575-592.

Pant, H. C. Dephosphorylation of neurofilament proteins enhances their susceptibility to degradation by calpain (1988). *Biochem. J.* **256**(2), 665-668.

Perry, R., McKeith, I. & Perry, E. *Dementia with Lewy bodies: clinical, pathological and treatment issues*. Cambridge university press, 1996.

Pollanen, M. S., Bergeron, C. & Weyer, L. Detergent-insoluble cortical lewy body fibrils share epitopes with neurofilament and tau (1992). *J. Neurochem.* **58**(5), 1953-6.

Pollanen, M. S., Dickson, D. W. and Bergeron, C. Pathology and biology of the Lewy body (1993). *J-Neuropathol-Exp-Neurol.*; **52**(3), 183-91.

Rosen, R. D., Siddique, T., Patterson D., Figlewicz D. A., Sapp P. Hentati A, Donaldson D. Goto J, and other 26 authors. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familiar amyotrophic lateral sclerosis (1993). *Nature*, **362** (59).

Schmidt, M. L., Carden, M. J., Lee, V. M. Y, and Trojanowski, J. Q. Phosphate-dependent and independent neurofilament epitopes in the axonal swellings of patients with motor neuron disease and controls (1987). *Lab. Invest.*, **56**, 282-294.

Schmidt, M. L., Murray, J., Lee, V. M. Y., and Hill, W. D. Epitope map of neurofilament protein domains in cortical and peripheral nervous system Lewy bodies (1991). *Am. J. Pathol.*, **139**, 53-65.

- Schmidt, M. L., Murray, J., Lee, V. M.-Y., Hill, W. D., Wertkin, A. & Trojanowski, J. Q. Epitope map of neurofilament protein domains in cortical and peripheral nervous system Lewy bodies(1991). *Am. J. Pathol.* **139**, 53-65.
- Sharma P., Barchi J. J., Huang X L., Amin N. D., Jaffe, H., and Pant H. C. Site-specific phosphorylation of Lys-Ser-Pro repeat peptides from neurofilament-H by cyclin-dependent kinase 5: Structural basis for substrate recognition (1998). *Biochemistry*, **37** (14), 4759-4766.
- Shaw, G., *Neurofilament protein. In The neuronal cytoskeleton* (Ed. R. D. Bourgoine) Wiley-Liss, Inc. U.S.A., New York, 1991.
- Smith M. A. and Perry G. free radical damage, iron, and Alzheimer's disease (1995). *J. Neurol Sci.* **134** Supp., 92-94.
- Smith, M. A., Perry, G., Richey, P. L., Sayre, L.M., Anderson, V.E., Beal, M.F. and Kowall, N. Oxidative damage in Alzheimer's (1996). *Nature*, **382**, 120-121.
- Smith, M.A., Rudnicka-Nawrot, M., Richey, P. L., Praprotnik, D., Mulvihill, P., Miller, C.A., Sayre, L.M. and Perry, G. Carbonyl-related posttranslational modification of neurofilament protein in the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease (1995). *J. Neurochem.*, **64**, 2660-66.

Smith, M.A., Sayre, L.M., Minnier, V.M. and Perry, G. Radical AGEing in Alzheimer's disease (1995). *TINS*, **18**, 172-176.

Spencer J. P. E., Jenner, A., Butler J., Aruoma, O. I., Dexter D. T., Jenner P., Halliwell B. Evaluation of the pro-oxidant and antioxidant actions of L-DOPA and dopamine in vitro: implications for Parkinson's disease (1996). *Free Rad. Res.*, **24** (2), 95-105.

Stadtman, E. R. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions (1993). *Annu. Rev. Biochem.*, **62**, 797-821

Stadtman, E. R. Protein oxidation and aging (1992). *Science*, **257**, 1220-1224.

Steinert, P. M., and Roop, D. R. Molecular and cellular biology of intermediate filaments (1988). *Annu. Rev. Biochem.*, **57**, 593-625.

Stuart, B. H. A Fourier transform infrared spectroscopic study of the secondary structure of myelin basic protein in reconstituted myelin (1996). *Biochem. Mol. Biol. Internat.*, **38**, 839-45.

Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.Y. Phosphorylation of neuronal cytoskeletal proteins in Alzheimer's disease and Lewy body dementias (1994). *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **747**, 92-109.

Troncoso, J.C., Costello, A. C., Kim, J.H. and Johnson, G.V.W. Metal-catalyzed oxidation of bovine neurofilaments in vitro (1995). *Free Rad. Biol. Med.*, **18**, 891-899.

Tu, P.H., Gurney, M.E., Julien, J.P., Lee, V.M.Y., and Trojanowski, J.Q. Oxidative stress, Mutant SOD1, and neurofilament pathology in transgenic mouse models of human motor neuron disease (1997). *Laboratory Investigation*, **76**, 441-456.

Veeranna, Amin N.D., Ahn N.G., Jaffe h., Winters C.A., Grant P. and Pant H. C. Mitogen-activated protein-kinase (erk 1,2) phosphorylate Lys-Ser-Pro (KSP) repeats in neurofilament proteins NF-H and NF-M (1998). *J. Neurosci.*, **18** (11), 4008-4021.

Zhu, Q., Couillard-Després, S., and Julien, J.-P. Delayed maturation of regenerative myelinated axons in mice lacking neurofilaments (1997). *Exp. Neurol.*, **148**, 299-316.