

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR STRASBOURG-I

Année 2005

Thèse N°

THESE

Présentée en vue de l'obtention du

Doctorat ès-Sciences

Domaines : Neuroimmunologie et Biologie cellulaire

Soutenue publiquement le 27 Septembre 2005

par

Nada CHOUCAIR-JAAFAR

Récepteurs des cellules microgliales impliqués dans la reconnaissance et l'ingestion des peptides amyloïdes.

Membres du Jury :

M. Philippe POINDRON,	Professeur à l'Université Louis Pasteur	Directeur de Thèse
M. Jean-Pierre GIES,	Professeur à l'Université Louis Pasteur	Co-directeur de Thèse
M. Christian KELCHE,	Directeur de Recherche au CNRS	Rapporteur Interne
M. Jean GIAIMIS,	Professeur à l'Université Montpellier I	Rapporteur Externe
M. Manuel MODOLELL,	Max Planck Institut, Freiburg	Rapporteur Externe

On vous a dit aussi que la vie est obscurité, et dans votre lassitude vous répétez ce que disent les las.

Et je vous dis que la vie est en effet obscure sauf là où il y a élan,

Et tout élan est aveugle sauf là où il y a la connaissance.

Et toute connaissance est vaine sauf là où il y a le travail,

Et tout travail est futile sauf là où il y a l'amour ;

Gibran Khalil Gibran (Le prophète).

Ce travail est dédié au mémoire du Professeur Jean-Marie Warter

On permettra au directeur de cette thèse d'ajouter un mot à cette dédicace. Il y maintenant deux ans, le Professeur Jean-Marie Warter nous quittait. C'est peu de dire que nous perdions un médecin et un scientifique hors pair. Nous perdions plus encore, un ami, un frère, un cœur plein de délicatesse, un esprit sensible et fin. Il avait commencé de suivre ce travail et le faisait avec passion. Du balcon du ciel, maintenant, il peut voir que nous continuons, et que nous pensons à lui toujours avec émotion et gratitude.

Philippe Poindron

Je remercie Monsieur le Professeur Philippe Poindron qui m'a accueillie au sein de son laboratoire et qui a dirigé mon travail pendant ces quatre années. Ces qualités morales et scientifiques m'ont aidées à m'épanouir. Sa culture générale et surtout sur le Moyen-Orient qui n'a cessé de m'émerveiller. Merci pour votre confiance et pour le temps et l'application que vous avez mis pour corriger ce mémoire, surtout que c'est votre dernière thèse. J'espère que vous allez profiter de la retraite pour vous reposer. Merci pour tout !

Je remercie Monsieur le Professeur Jean-Pierre Gies qui a accepté de co-dirigé ce travail. Merci pour les conseils, les remarques et surtout de m'avoir poussé à publier mes résultats.

Je remercie Monsieur le Professeur Jean Giaimis qui a accepté de juger ce travail, c'est grâce à votre travail que nous sommes arrivés là. Merci pour les conseils à propos de la signalisation de la phagocytose.

Je remercie Monsieur le Docteur Christian Kelch d'avoir bien voulu juger ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma respectueuse gratitude.

Je remercie Monsieur le Professeur Manuel Modolell d'avoir accepté de juger ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je remercie Monsieur le Docteur Emmanuel Jovert pour son aide dans la préparation de l' $\alpha 2$ Macroglobuline radioiodée.

Je remercie le Docteur Philippe Boucher et Estelle Woldt pour leur aide avec les Western Blot du récepteur LRP.

-Les enseignants-chercheurs de notre laboratoire.

Je remercie le Docteur Yves Lombard, qui m'a tout appris dans le domaine de culture de cellules, il sait mettre de l'ambiance dans l'équipe et m'a toujours soutenu pendant les moments de dépression et de panique.

Je remercie le Docteur Rachel Lévy qui tout au long de ces années m'a aidé et encouragée. Merci Rachel pour tout ce que tu m'as appris aussi bien sur le plan personnel que professionnel.

Je remercie le Docteur Giliane Coupin pour sa gentillesse et ces efforts pour que tout fonctionne dans le laboratoire.

Je remercie le Docteur Serge Dumont pour les discussions sympathiques et d'être toujours prêt à nous aider lorsqu'un problème technique surgit.

Je remercie le Professeur Philippe André pour la bonne humeur et les propos échangés pendant les pauses «tisane-café».

Je remercie notre secrétaire Myriam Benelhoucine pour son efficacité et nos échanges sympathiques.

Je remercie Valérie Goepp pour sa serviabilité et les discussions matinales.

Comme je suis la dernière, je tiens à remercier les membres passés du laboratoire de Pathologies des Communications entre Cellules Nerveuses et Musculaires qui ont toujours su garder une ambiance détendue :

Je remercie Vincent Laporte qui m'a appris ma première « Phagocytose », mon travail est la suite du sien. Qu'il reçoive ici le témoignage de ma reconnaissance pour son aide, son amitié et son soutien.

Je remercie Aline Appert-Colin Benasroune et Anne-Sophie Arnold pour leur aide, leurs conseils et nos discussions sympathiques.

Je remercie Constant Voudouhe pour sa gentillesse et Stéphanie Wagner pour son aide et ses conseils.

Je remercie mon « compatriote de souffrance » Mor Gueye qui a arrêté sa thèse pour travailler dans un autre domaine « la Diplomatie » et je lui souhaite bonne chance dans sa nouvelle vie au Québec.

Je remercie Audrey Lebon qui a choisi d'arrêter la recherche après son DEA pour devenir une «maman» à temps plein !

Je remercie Emilie Sick et je lui souhaite bon courage et bonne route.

Je remercie tous les stagiaires qui ont travaillé avec moi durant ma thèse : Pierre, Myriam, Christelle.... Et m'ont aidé à compter des levures.

A mes parents, pour les sacrifices qu'ils ont faits afin qu'on poursuive nos études pendant la guerre. Pour leur confiance inconditionnelle, j'espère les avoir rendus fiers.

A mes sœurs Rana et Hiba et mon frère Hadi, qu'ils trouvent ici le témoignage de mon affection.

A ma belle-famille, pour le soutien et la confiance.

A mes amis pour leur aide et leurs encouragements sans comprendre vraiment ce que je fais !

A ma petite famille :

Merci à toi Hicham, pour ton soutien et ta compréhension pendant les moments difficiles et tout au long de mes études. Tu m'as toujours poussé vers l'avant et c'est grâce à tes encouragements que je suis arrivée là.

A Yara, un rayon de lumière qui illumine ma vie tous les jours.

A mon petit paysle Liban.

Table des matières.

Table des matières.	<i>i</i>
Table des abréviations.	<i>vii</i>
Table des Figures.	<i>xi</i>
Table des Tableaux.	<i>xiv</i>
Avant-propos.	1
1-Introduction.	2
11-Origine des cellules microgliales.	3
111-Origine mésodermique.	3
1111-Origine monocyttaire.	3
1112-La dérivation hématopoïétique des cellules microgliales.	4
112-Origine neuro-ectodermique.	5
113-Invasion du système nerveux central.	6
1131-Entrée des précurseurs des cellules microgliales dans le système nerveux central.	6
1132-Dispersion des cellules microgliales dans le parenchyme cérébral.	8
11321-La prolifération.	8
11322-La migration.	8
(1) Migration tangentielle et migration radiale.	8
(2) Facteurs contrôlant la migration des cellules microgliales.	9
114-Différenciation des cellules microgliales amiboïdes.	10
1141-Changements morphologiques.	10
1142-Changements du phénotype antigénique.	10
1143-Facteurs contrôlant la différenciation	11
115-Fonctions des cellules microgliales.	14
1151-Rôle des cellules gliales amiboïdes.	14

(1) Elimination des neurones dégénérés.	14
(2) Activités neurotrophes.	14
12-La phagocytose.	15
121-Les différents types de phagocytose.	15
122-Rôle du cytosquelette dans la phagocytose.	16
1221-Rôle de l'actine dans la phagocytose.	17
(1) Polymérisation de l'actine.	17
(2) Protéines et ligands affectant les propriétés de l'actine.	19
1222-Rôle des autres constituants du cytosquelette.	21
1223-Stratégie de reconnaissance des éléments pathogènes par les cellules microgliales.	22
1224-Signalisation intracellulaire associée à la phagocytose.	23
123-Les cellules microgliales ramifiées : les phagocytes cérébraux.	26
1231-Le système immunitaire cérébral.	26
12311-L'activation des cellules microgliales ramifiées.	27
(1) Les activateurs des cellules microgliales en culture.	27
(2) Les inhibiteurs de l'activation des cellules microgliales.	28
12312-Récepteurs des cellules microgliales impliqués dans la reconnaissance des éléments pathogènes.	30
(1) Les récepteurs ne faisant pas intervenir les opsonines.	30
(11) Le récepteur du mannose.	30
(12) Le récepteur des β -glucannes.	31
(2) Les récepteurs faisant intervenir les opsonines.	32
(21) Les récepteurs du complément.	32
(22) Les récepteurs du fragment cristallisable.	35
12313-Migration des cellules microgliales et élimination des éléments pathogènes.	36
13-La maladie d'Alzheimer.	37
131-Introduction.	37
1311-Histoire de la maladie.	37
1312-Evolution de la maladie.	38
13121-Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer ;	40
(1) L'atrophie corticale.	41
(2) Les dépôts amyloïdes.	41
(21) La substance amyloïde.	41
(211) Les plaques séniles.	42
(212) L'angiopathie amyloïde.	43

(213) Ultrastructure de la plaque sénile.	44
(214) Biochimie de la plaque sénile.	47
(22) Le précurseur des peptides β -amyloïdes, son métabolisme et la génération des peptides amyloïdes	47
(221) Le catabolisme du précurseur des peptides amyloïdes.	49
(2211) L' α -sécrétase.	49
(2212) La β -sécrétase.	51
(2213) La γ -sécrétase.	52
(3) Les dégénérescences neurofibrillaires.	54
(31) Ultrastructure des dégénérescences neurofibrillaires.	55
(32) Biochimie des dégénérescences neurofibrillaires.	56
14-Implication de la cellule microgiale dans la maladie d'Alzheimer.	57
141-Effet du peptide amyloïde sur les cellules microgliales.	59
1411-Le peptide amyloïde active les cellules microgliales.	60
(1) Les protéines du système du complément.	60
(2) Les cytokines pro-inflammatoires.	61
(3) Les intermédiaires réactifs de l'oxygène et de l'azote.	62
1412-Le peptide amyloïde active les cellules microgliales	63
1413-Les récepteurs convoyant les effets chimiotactiques et les effets activateurs du peptide amyloïde.	63
142-Elimination du peptide amyloïde par les cellules microgliales.	64
1421-Situation <i>in situ</i> .	64
(1) Situation chez l'Homme.	64
(2) Situation chez l'animal.	65
1422-Elimination du peptide amyloïde <i>in vitro</i> .	66
(1) Elimination du peptide A β fibrillaire.	66
(2) Elimination du peptide A β non fibrillaire.	67
143-La <i>low density lipoprotein receptor-related protein</i>.	68
1431-Identification et clonage de la <i>low density lipoprotein receptor-related protein</i> .	68
1432-Localisation de la <i>low density lipoprotein receptor-related protein</i> .	68
1433-Biosynthèse de la <i>low density lipoprotein receptor-related protein</i> .	69
1434-Structure de la <i>low density lipoprotein receptor-related protein</i> .	70
1435- La <i>low density lipoprotein receptor-related protein</i> : un récepteur endocytaire.	71

(1) Récepteur de l'apolipoprotéine E.	72
(2) Récepteur de la lipoprotéine lipase.	73
(3) Récepteur de la lactoferrine.	73
(4) Récepteur de l' α 2-macroglobuline.	74
(5) Activation et inhibition du plasminogène.	74
(6) Récepteur du composant C3 du système du complément.	75
(7) Récepteur de ligands contenant le domaine KPI.	76
1436-Les différentes voies de liaison et d'ingestion des ligands par la <i>low density lipoprotein receptor-related protein</i> .	77
(1) Liaison indirecte.	77
(2) Liaison directe.	77
1437-Signalisation intracellulaire déclenchée par l'engagement de la la <i>low density lipoprotein receptor-related protein</i> .	78
1438-La <i>low density lipoprotein receptor-related protein</i> et la maladie d'Alzheimer ;	78
1439-Production du peptide β -amyloïde : dualité de la <i>low density lipoprotein receptor-related protein</i> .	80
15-Présentation et objectif de ce travail.	81
2-Matériels et méthodes.	83
21-Culture des cellules.	84
221-Cocultures.	84
222-Cellules BV2.	84
22-Préparation des fibres de peptide β-amyloïde.	85
23-Préparation des plaques séniles artificielles.	85
231-Culture des levures.	85
232-Opsonisation des levures par les fibres amyloïdes.	85
24-Préparation de l'α2-macroglobuline.	86
241-Activation de l'α2-macroglobuline.	86
242-Iodation de l'α2-macroglobuline.	86

243-Endocytose de l' α 2-macroglobuline.	87
25-Phagocytose des levures.	88
251-Phagocytose des levures opsonisées.	88
2511-Epreuve de phagocytose.	88
2512-Coloration.	88
2513-Quantification de la phagocytose.	89
2514-Analyses statistiques	90
26-Mesure de la cytotoxicité par la technique au XTT.	90
27-Expression du mRNA de la <i>low density lipoprotein receptor-related protein</i>.	90
271-Extraction des mRNA totaux.	91
272-Transcription inverse et réaction en chaîne de la polymérase.	92
2721-Principe.	92
2722-Protocole de transcription inverse.	92
2723-Mise en œuvre de la réaction en chaîne de la polymérase.	92
2724-Choix des amorces et conditions de la réaction en chaîne de la polymérase.	93
2725-Semi-quantification de la réaction en chaîne de la polymérase.	94
28-Immuno-empreinte de type <i>western</i> de la <i>low density lipoprotein receptor-related protein</i>.	95
281-Lyse des cellules, extraction et dosage des protéines totales.	95
282-Electrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide.	95
283-Immuno-empreinte de type <i>western</i> .	96
29-Révélation de la <i>low density lipoproteinreceptor-related protein</i>.	96
2.10-Produits chimiques et réactifs.	96
3-Résultats et discussion.	98
31-Récepteurs impliqués dans la phagocytose des peptides amyloïdes par les cellules microgliales.	99

311-Implication de la <i>low density lipoprotein receptor-related protein</i>.	99
312-Implication des protéoglycannes à héparane sulfate dans la phagocytose des levures opsonisées par les peptides β-amyloïdes.	101
32-Implication du récepteur 3 du complément dans la phagocytose des levures opsonisées par les peptides amyloïdes.	103
33-Rôle des ions calcium et magnésium dans la reconnaissance et la phagocytose des levures opsonisées par les peptides amyloïdes.	109
34-Signalisation intracellulaire associée à la phagocytose des levures opsonisées par les peptides $A\beta$ 1-40 et $A\beta$ 1-42.	119
35-Digestion des levures opsonisées par les peptides $A\beta$ 1-40 et $A\beta$ 1-42.	128
36-Toxicité des levures opsonisées par les peptides $A\beta$ 1-40 et $A\beta$ 1-42 pour les cellules microgliales.	129
37-La lignée BV2, un autre modèle d'étude de l'élimination des plaques séniles artificielles.	130
4-Conclusions et perspectives.	136
5-Bibliographie.	139
6-Annexes.	176
61-Article paru dans les BioValley Monographs.	
62-Article soumis.	

Table des abréviations.

AA	: acide aminé.
AAr	: acide arachidonique.
A β PP $_{\alpha, \beta}$: partie soluble α, β du précurseur du peptide amyloïde.
ABP	: <i>actin binding protein</i> , protéine liant l'actine.
Ac	: anticorps.
AcMo	: anticorps monoclonal.
ADAM	: <i>A disintegrin and metalloproteinase domain</i> .
ADF	: <i>actin depolymerizing filament</i> .
Ag	: antigène.
AICD	: <i>AβPP intracellular domain</i> .
α 2M	: α 2-macroglobuline.
α 2M*	: α 2-macroglobuline activée.
α 1ACT	: α 1-antichymotrypsine
ApoE, B, J	: apolipoprotéine E, B, J.
APP	: protéine précurseur du peptide β -amyloïde.
BACE	: <i>β-site APP cleaving enzyme</i> .
BDNF	: <i>brain-derived neurotrophic factor</i> .
bFGF	: <i>basic fibroblast growth factor</i> .
BSA	: albumine sérique de Bœuf.
CAM	: complexe d'attaque membranaire.
CMH	: complexe majeur d'histocompatibilité.
CMHI ou II	: complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ou II.
CPX2	: cyclo-oxygénase inductible.
CR	: <i>complement receptor</i> , récepteur du complément.
CSPG	: protéoglycane à chondroïtine sulfate.
C1qRp	: récepteur du composant C1q impliqué dans la phagocytose.
CTF	: extrémité carboxyterminale de la préséniline.
CTLD	: domaine de reconnaissance des sucres de type C.
CVF	: <i>Cobra venom factor</i> ; toxine de Cobra.
DAG	: diacylglycérol.
Dexa	: dexaméthasone (seulement dans la légende de la Figure 3.33).
DMSO	: diméthylsulfoxyde.
DNF	: dégénérescence neurofibrillaire.
D.O	: densité optique.
DSPG	: protéoglycane à dermatane sulfate.
EGF	: <i>epidermal growth factor</i> .
FcR	: récepteur du fragment cristallisable des immunoglobulines.
Fc α R	: récepteur du fragment cristallisable des immunoglobulines A.

FcεR	: récepteur du fragment cristallisable des immunoglobulines E.
FcγR	: récepteur du fragment cristallisable des immunoglobulines G.
fMLP	: Met-Leu-Phe formylé.
FPRL-1	: <i>FPR-like 1</i> ou FPR 2 humain.
FPR 1, 2	: récepteur des peptides formylés, de type 1, de type 2.
G-CSF	: <i>granulocyte colony stimulating factor</i> .
GM-CSF	: <i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i> .
HI	: héparinase I.
HSPG	: protéoglycane à héparane sulfate.
ICAM	: <i>intercellular adhesion molecule</i> .
IFNγ	: interféron gamma.
Ig	: immunoglobuline.
iNOS	: NO synthase inductible.
IL	: interleukine.
ITAM	: <i>immunoreceptor tyrosin-based activation motif</i> .
ITIM	: <i>immunoreceptor tyrosin based inhibitory motif</i> .
kb	: kilobase.
LCR	: liquide céphalo-rachidien.
LDL	: <i>low density lipoprotein</i> .
Lf	: lactoferrine.
LFA	: <i>lymphocyte function associated antigen</i> .
LIM-K1, -K2	: <i>LIM kinase proteins</i> .
LPL	: lipoprotéine lipase.
LPS	: lipopolysaccharide.
LRP	: <i>low density lipoprotein receptor-related protein</i> .
MA	: maladie d'Alzheimer.
MARCKS	: <i>myristoylated alanine-rich C kinase substrate</i> .
MBL	: <i>mannose binding lectin</i> .
MCP-1	: <i>monocyte chemotactic protein 1</i> .
M-CSF	: <i>macrophage colony stimulating factor</i> .
MIP	: <i>macrophage inhibitory protein</i> .
MM	: masse moléculaire.
NA	: référence de la lignée microgliale utilisée dans le présent travail.
nc	: non communiqué.
NGF	: <i>nerve growth factor</i> .
NK	: <i>natural killer</i> .
NMA	: nombre moyen de levures adhérentes par cellule microgliale.
NMP	: nombre moyen de levures ingérées par cellule microgliale.
NT	: neurotrophine.
NTF	: extrémité aminoterminal de la préséniline.
N-WASP	: <i>neuronal Wiskott-Aldrich syndrom protein</i> .
PAI-I	: <i>plasminogen activator inhibitor I</i> .

PAMP	: <i>pathogen associated molecular pattern</i> .
pb	: paire(s) de bases.
PBS	: solution saline tamponnée aux phosphates.
PBS ⁻	: solution saline tamponnée aux phosphates et dépourvue d'ions calcium et magnésium.
PCR	: réaction en chaîne de la polymérase.
PDGF	: <i>platelet-derived growth factor</i> .
PHF	: paire de filaments hélicoïdaux.
PIP	: phosphatidylinositolphosphate.
PIP2	: phosphatidylinositoldiphosphate.
PI-PLC	: phospholipase C spécifique des phospho-inositides.
PI3K	: phospho-inositide 3 kinase.
PKA	: protéine kinase A.
PKB	: protéine kinase B.
PKC	: protéine kinase C.
PLA2	: phospholipase A2.
PLC	: phospholipase C.
PLD	: phospholipase D.
PMA	: <i>phorbol myristate acetate ester</i> .
PMS	: méthosulfate de phénazine.
PMSF	: fluorure de phénylméthanesulfonyl.
PRR	: <i>pathogen recognition receptor</i> .
PS	: plaque sénile.
PS-1, PS-2	: préséniline 1, préséniline 2.
RAGE	: <i>receptor for advanced glycation end products</i> .
RAP	: <i>receptro-associated protein</i> .
RREC	: répétitions riches en Cys.
RT	: transcription inverse.
RT-PCR	: réaction en chaîne de la polymérase couplée à la transcription inverse.
SAP	: <i>serum amyloid protein</i> .
SDS	: dodécylsulfate de sodium.
SFV	: sérum foetal de veau.
SNC	: système nerveux central.
SR	: <i>scavenger receptor</i> .
SR-A, -B	: <i>scavenger receptor type A</i> ou <i>type B</i> .
TACE	: <i>tumor necrosis factor α-converting enzyme</i> .
tau	: <i>tubule-associated unit</i> .
TFE	: trifluoroéthanol.
TFPI	: <i>tissue factor proteinase inhibitor</i> .
TGF β	: <i>transforming growth factor β</i> .
Tm	: température de fusion.
TNF α	: <i>tumor necrosis factor α</i> .

tPA	: <i>tissue type plasminogen activator</i> .
U	: unité.
uPA	: <i>urokinase type plasminogen activator</i> .
uPAR	: récepteur de l'activateur du plasminogène de type urokinase.
v	: volume.
VLDL	: <i>very low density lipoprotein</i> .

Ne sont pas incluses dans cette liste les abréviations internationales des unités de mesure ni celles de certains composants de la matière vivante (mRNA, DNA, etc.) pour lesquels on a gardé l'abréviation internationalement acceptée. Pour les unités de volume, on a préféré L, mL, etc. à l, ml.

Les substantifs de forme latine passés dans la langue courante ne prennent pas le pluriel latinisé (exemple : un stimulus, des stimulus). Ceux qui ne sont pas passés dans la langue courante le prennent (exemple : un *nucleus*, des *nuclei* et figurent alors en *italiques*. Les locutions en langues étrangères sont écrites en *italiques* (exemple : des *remnants*).

La définition d'une abréviation est toujours donnée entre []. Les abréviations sont considérées comme invariables et ne sont jamais définies dans des titres de SECTION, de Figures ou de Tableaux. Quand une abréviation est utilisée pour la première dans un Tableau ou dans une Figure, la définition en est donnée dans les notes de bas de Tableau. Les mots Tableaux et Figures prennent toujours une majuscule.

Table des Figures.

Figure 1.1. Les 2 étapes de la migration des précurseurs des cellules microgliales.	9
Figure 1.2. Différenciation morphologique des cellules microgliales de Caille dans le <i>tectum</i> optique d'embryons de Caille âgés de 12 jours.	11
Figure 1.3. Les 3 voies d'activation du système du complément et les facteurs impliqués.	34
Figure 1.4. Lésions pathognomoniques de la maladie d'Alzheimer.	39
Figure 1.5. Coupe de cortex humain marqué par immunocytochimie avec un anticorps anti-peptide A β .	42
Figure 1.6. Aspect de plaques séniles après coloration à la thioflavine.	43
Figure 1.7. Angiopathie amyloïde après coloration au rouge Congo.	44
Figure 1.8. Représentation schématique de la formation d'une fibre amyloïde.	46
Figure 1.9. Métabolisme du précurseur des peptides β -amyloïdes et genèse de ces peptides : voie amyloïdogène et la voie amyloïdogène.	50
Figure 1.10. Les différents constituants du complexe γ -sécrétase.	53
Figure 1.11. Mise en évidence des dégénérescences neurofibrillaires par l'imprégnation de Bielschowsky.	54
Figure 1.12. Les dégénérescences neurofibrillaires sont des lésions intra-neuronales qui correspondent à la prolifération de paires de filaments en hélice. Marquage à l'hématéine-éosine.	56
Figure 1.13. Structure de la <i>low density lipoprotein receptor-related protein</i> .	71
Figure 1.14. Les différentes voies d'internalisation des ligands par la <i>low density lipoprotein receptor-related protein</i> .	79
Figure 1.15. Dualité de la <i>low density lipoprotein receptor-related protein</i> .	81
Figure 2.1. Phagocytose des levures par les cellules microgliales.	89
Figure 2.2. Séparation en gel d'agarose des produits de la réaction en chaîne de la polymérase obtenues avec les amorces <i>low density lipoprotein receptor-related protein</i> et glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase.	94
Figure 3.1. Effet de la lactoferrine sur la phagocytose des levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42.	99
Figure 3.2. Effet de la lactoferrine sur la phagocytose des levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42.	100
Figure 3.3. Effet de la protamine sur la phagocytose des levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42.	101
Figure 3.4. Effet de l'héparinase sur la phagocytose des levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42.	102
Figure 3.5. Effet de divers anticorps monoclonaux (surnageants de culture d'hybridome) dirigés contre le récepteur 3 du complément, sur la phagocytose des levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42.	104

Figure 3.6. Comparaison de l'effet des anticorps monoclonaux anti-CD11b et anti-CD18 sur la phagocytose des levures opsonisées par le peptide A β 1-40.	105
Figure 3.7. Comparaison de l'effet des anticorps monoclonaux anti-CD11b et anti-CD18 sur la phagocytose des levures opsonisées par le peptide A β 1-42.	106
Figure 3.8. Effet de l'anticorps monoclonal MECA32 sur la phagocytose des levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42	106
Figure 3.9. Effet de l' α 2-macroglobuline activée et de l'anticorps monoclonal M1/70 sur la phagocytose des levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42.	107
Figure 3.10. Effet de la toxine de venin Cobra sur la phagocytose des levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42, en absence d'anticorps.	108
Figure 3.11. Effet de la toxine de venin Cobra sur la phagocytose des levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42, en présence de l'anticorps dirigés contre la sous-unité CD11b du récepteur 3 du complément.	109
Figure 3.12. Phagocytose des levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42 dans une solution saline tamponnée aux phosphates, dépourvues d'ions calcium et magnésium.	111
Figure 3.12 bis. Effet de l'EDTA et de l'EGTA sur la phagocytose de levures opsonisées par le peptide A β 1-40. (Résultats de Vincent Laporte).	111
Figure 3.12 ter. Effet de l'EDTA et de l'EGTA sur la phagocytose de levures opsonisées par le peptide A β 1-42. (Résultats de Vincent Laporte).	113
Figure 3.13. Effet de l'EGTA et de l'EDTA sur la reconnaissance de levures opsonisées par le peptide A β 1-40.	114
Figure 3.14. Effet de l'EGTA et de l'EDTA sur la reconnaissance de levures opsonisées par le peptide A β 1-42.	114
Figure 3.15. Effet du lavage préalable en solution saline tamponnée aux phosphates dépourvues d'ions calcium et magnésium, ou traitées par l'EDTA ou l'EGTA avant adjonction aux cellules microgliales, sur la phagocytose de levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42.	115
Figure 3.16. Effet du BAPTA-AM et de la thapsigargine sur la phagocytose de levures opsonisées par le peptide A β 1-40.	117
Figure 3.17. Effet du BAPTA-AM et de la thapsigargine sur la phagocytose de levures opsonisées par le peptide A β 1-42.	118
Figure 3.18. Endocytose de différentes concentrations d' α 2-macroglobuline activée radio-iodée.	120
Figure 3.19. Effet du H89 et de la forskoline sur l'endocytose de l' α 2-macroglobuline activée radio-iodée, convoyée par la <i>low density lipoprotein receptor-related protein</i> .	120
Figure 3.20. Effet du H89 sur la phagocytose de levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42.	121
Figure 3.21. Effet du KT5720 sur la phagocytose de levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42.	122

- Figure 3.22. Effet de la forskoline sur la phagocytose de levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42.
- Figure 3.23. Effet du GF109203X sur la phagocytose de levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42.
- Figure 3.24. Effet du chlorure de chlérythine sur la phagocytose de levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42.
- Figure 3.25. Effet de la toxine cholérique sur la phagocytose de levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42.
- Figure 3.26. Effet de la wortmannine sur la phagocytose de levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42.
- Figure 3.27. Persistance des levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42 après phagocytose.
- Figure 3.28. Toxicité des levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42.
- Figure 3.29. Mise en évidence de la *low density lipoprotein receptor-related protein* par immuno-empreinte de type de type *western*.
- Figure 3.30. Etat des récepteurs impliqués dans la phagocytose des levures non opsonisées par les cellules BV2.
- Figure 3.31. Effet de la lactoferrine et de l' α 2-macroglobuline activée sur la phagocytose des levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42 en cellules BV2.
- Figure 3.32. Effet du lipopolysaccharide, de l'interféron γ et de la dexaméthasone sur la morphologie des cellules BV2.
- Figure 3.33. Effet du lipopolysaccharide, de l'interféron γ et de la dexaméthasone sur l'expression des mRNA de la *low density lipoprotein receptor-related protein* en cellules BV2.

Table des Tableaux.

Tableau 1.1. Expression de diverses molécules de surface par les cellules microgliales amiboïdes et ramifiées.	12
Tableau 1.2. Expression de diverses enzymes lysosomiques dans les cellules microgliales amiboïdes et ramifiées.	13
Tableau 1.3. Activateurs conventionnels et endogènes des cellules microgliales ramifiées en culture.	29
Tableau 1.4. Les récepteurs du complément, leurs spécificités, fonctions et distribution dans différents types cellulaires.	35
Tableau 1.5. Constituants mineurs de la plaque sénile regroupés selon leur nature biochimique ;	48
Tableau 1.6. Composants secondaires des dégénérescences neurofibrillaires ;	57

Avant-propos.

La maladie d'Alzheimer [MA] est une maladie du système nerveux central qui se traduit par une dégénérescence neuronale dont la conséquence est une perte des fonctions cognitives. Les principales lésions neuropathologiques sont les dépôts focaux de peptide β -amyloïde situés au cœur des plaques séniles [PS], et les dégénérescences neurofibrillaires [DNF].

Le rôle des cellules gliales associées aux dépôts amyloïdes et les conséquences de cette association sont depuis longtemps discutés. Nous nous proposons d'étudier, *in vitro*, les interactions entre le peptide β -amyloïde et les cellules microgliales dans un système mis au point au laboratoire. Pour réaliser ce projet, nous utilisons comme modèle d'étude une culture de cellules microgliales en lignée non transformée et des dépôts amyloïdes artificiels.

Cette modélisation permet (a) d'évaluer l'élimination des dépôts par les cellules microgliales, (b) de caractériser les récepteurs impliqués dans ce mécanisme, et (c) d'en étudier les étapes.

L'objet du travail expérimental, dont les résultats sont exposés dans le CHAPITRE Résultats et discussion, vise en effet à déterminer le mécanisme moléculaire de l'élimination des peptides amyloïdes par les cellules microgliales lors de la MA.

Nous exposerons tout d'abord dans l'Introduction l'origine des cellules microgliales et leur implication dans la MA. Puis, dans 3 autres SECTIONS, nous décrirons brièvement la MA, les caractéristiques principales de la phagocytose et les propriétés du récepteur LRP [*low density lipoprotein receptor-related protein*]

Dans la première partie du CHAPITRE Résultats et discussions, nous étudierons les récepteurs impliqués dans la phagocytose des levures opsonisées par les peptides amyloïdes, puis l'implication des ions calcium et magnésium dans la phagocytose des plaques amyloïdes artificielles. Nous continuerons par une étude de l'expression du LRP dans une lignée de cellules microgliales, les cellules BV2, de la digestion des levures opsonisées après qu'elles ont subi la phagocytose et de leur cytotoxicité après l'ingestion. Enfin, dans une quatrième et dernière partie, nous fournirons quelques éléments concernant la signalisation intracellulaire consécutive à la phagocytose de ces levures opsonisées.

1-INTRODUCTION.

11-Origine des cellules microgliales.

C'est Nissl (1899) qui a décrit pour la première fois des cellules du cerveau capables de migrer et de phagocyter. Grâce à une coloration au carbonate d'argent, del Rio-Hortega (1932) a pu identifier 2 sous-types de cellules de la troisième composante cellulaire du système nerveux central [SNC], décrite par Cajal (1913) que sont les oligodendrocytes et les cellules microgliales.

La cellule microgliale doit son appellation à un caractère morphologique qui, dans le tissu adulte, la différencie des autres types cellulaires gliaux, les astrocytes et les oligodendrocytes ; elle possède un corps cellulaire de dimension réduite et de longs prolongements tortueux et ramifiés.

Deux théories ont tenté d'expliquer l'origine des cellules microgliales. La première estime qu'elles dérivent de l'ectoderme, comme les autres cellules de la glie. La deuxième, qu'elles dérivent du mésoderme. Cette théorie a la préférence des chercheurs ; les auteurs qui la défendent présument que les cellules microgliales dérivent directement des monocytes qui ont colonisé le parenchyme cérébral, ou encore qu'une cellule souche hématopoïétique pénètre dans le système nerveux central pour les y engendrer.

111- Origine mésodermique.

Del Rio-Hortega (1932) a été le premier à supposer une origine mésodermique aux cellules microgliales

1111-Origine monocyttaire.

L'origine embryologique des cellules microgliales fait encore l'objet de controverses. La cellule microgliale proviendrait de l'envahissement du tissu par des monocytes circulants. Dans le cerveau immature, ces cellules sont désignées sous le terme de macrophages cérébraux ou cellules microgliales amiboïdes. L'origine monocyttaire des cellules microgliales a été évoquée pour la première fois par Santha et Juba (1933). Une infiltration de monocytes circulants, suivie de leur transformation en macrophages, est évidente dans de nombreux contextes pathologiques impliquant une altération des parois vasculaires. Les cellules amiboïdes se différencient en cellules microgliales ramifiées par une involution du corps cellulaire ainsi que par l'émission de prolongements (Imamoto *et al*, 1982 ; Ling *et al*, 1980). On peut mettre en évidence une infiltration des monocytes dans le

cerveau en injectant des particules de carbone dans la circulation de rats âgés de quelques jours. A l'examen histologique, on retrouve dans les cerveaux de ces rats des cellules microgliales amiboïdes contenant des particules de carbone ; elles proviennent des monocytes qui ont ingéré ces particules et ont ensuite infiltré le parenchyme cérébral (Ling, 1979). Des monocytes marqués *ex vivo* par des particules de carbone ou par de l'encre ont également été injectés à de jeunes rats (Ling *et al.*, 1980). L'examen du corps calleux de ces animaux met en évidence la présence de cellules microgliales contenant ces particules ou cette substance.

Les cellules microgliales partagent avec les monocytes des marqueurs enzymatiques comme les estérases non spécifiques et les phosphatases acides (Boya *et al.*, 1979 ; Ling *et al.*, 1982b ; Fujimoto *et al.*, 1987 ; Castellano *et al.*, 1991). Elles ont en commun aussi des marqueurs reconnaissant des lectines comme l'isolectine B4 de *Griffonia simplicifolia* ou l'agglutinine de *Ricinus communis* (Mannoji *et al.*, 1986) qui, effectivement, marquent des résidus glucidiques à la surface de ces 2 types de cellules (Streit and Kreutzberg, 1987 ; Hutchins *et al.*, 1990 ; Acarin *et al.*, 1994).

Les antigènes [Ag] spécifiques des cellules dérivant du monocyte ont été également détectés dans les cellules microgliales. C'est le cas du déterminant antigénique F4/80, qui s'exprime spécifiquement à la surface des macrophages murins quel que soit l'état d'activation (Austyn et Gordon, 1981) et qui est reconnu par l'anticorps [Ac] F4/80, et qui l'est également à la surface des cellules microgliales de l'adulte et de l'embryon et est reconnu par le même Ac (Perry *et al.*, 1985).

D'autres Ag spécifiques des monocytes sont exprimés par les cellules microgliales comme le récepteur du complément type 3 [CR3] (Ling *et al.*, 1990) ou le récepteur du fragment Fc [FcR] des immunoglobulines [Ig] G [FC γ R] (Perry *et al.*, 1985). Une approche expérimentale indirecte a mis en évidence une diminution du nombre des cellules microgliales amiboïdes dans les cerveaux de rats après traitement par de la cortisone (Ling, 1982a) ou par de la dexaméthasone (Kaur *et al.*, 1994), stéroïdes connus pour supprimer de la production de monocytes (Russo-Marie, 1992).

1112-La dérivation hématopoïétique des cellules microgliales.

Il a été montré que les cellules microgliales apparaissent dans le SNC avant qu'il ne se vascularise (Ashwell, 1991 ; Cuadros *et al.* 1993 ; Wang *et al.*, 1996) et avant la production de monocytes dans les tissus hématopoïétiques (Naito *et al.*, 1996). Il est donc possible que les cellules microgliales proviennent de cellules hématopoïétiques installées dans le SNC

avant sa vascularisation et indépendamment d'elle (Hurley et Streit, 1995). Les cellules hématopoïétiques présentes dans la moelle osseuse et le parenchyme nerveux sont capables de se différencier en cellules microgliales dans le cerveau d'embryons de Souris et de Souris adulte (Alliot *et al.*, 1991).

L'hypothèse de la dérivation hématopoïétique des cellules microgliales a été vérifiée chez des Mammifères. Après greffe de la moelle osseuse, on a cherché si les cellules microgliales retrouvées dans le cerveau du receveur provenaient du donneur ou du receveur. Il a été montré que les cellules microgliales périvasculaires dérivait de la moelle du donneur (Hickey et Kimura, 1988).

La proportion de cellules microgliales a été estimée après transplantation de moelle osseuse à des souris adultes ou à des souriceaux âgés d'1 jour (De Groot *et al.*, 1992). Elle est de 10 % aussi bien chez l'adulte que chez le nouveau-né. Le reste semble être d'origine neuroectodermique. Cependant, 3 à 4 mois après la greffe, la proportion des cellules microgliales originaires du donneur atteignent les 20 % (Krall *et al.*, 1994). Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres travaux dans lesquels il est observé que 8 à 9,5 % des cellules hématopoïétiques qui ont envahi le parenchyme cérébral se différencient en cellules microgliales (Eglitis et Mezey, 1997). Il est donc possible que des cellules progénitrices ou que des macrophages fœtaux localisés dans le corps jaune se dispersent dans les différents tissus, comme le foie et le SNC, et se différencient selon leurs localisations en macrophages spécifiques du tissu niche (Takahashi *et al.*, 1989 ; Sorokin *et al.*, 1992). Ces macrophages continuent à proliférer et à se différencier dans le cerveau, jusqu'à devenir des cellules microgliales.

112- Origine neuroectodermique.

Une partie des cellules microgliales serait d'origine neuroectodermique. Dans ce contexte, les glioblastes qui proviennent du neuroectoderme en seraient ou en sont le ou l'un des précurseur(s) (Fujita *et al.*, 1981).

La genèse de la cellule microgliale dans l'hippocampe de Souris a été analysée par autoradiographie après injection postnatale de thymidine tritiée. En utilisant cette méthode, on a pu montrer que 91 % des cellules gliales y sont produites après la naissance. La population astrogliale est engendrée avant le sixième jour de vie, alors que la plupart des cellules microgliales adultes apparaissent 9 jours après la naissance. Les cellules microgliales proviennent des glioblastes qui produisent aussi les astrocytes (Kitamura *et al.*, 1984).

Le marquage de clones dérivés d'un cerveau de souriceau contenant des astrocytes et des cellules microgliales, par des Ac dirigés contre la lipocortine-1, un marqueur spécifique des cellules neuroépithéliales, et contre l'Ag MAC-1 montre que ces 2 types cellulaires partagent une même cellule progénitrice bipotentielle (Mc Kanna, 1993). Cette cellule aurait soit une origine neuroépithéliale, soit une origine hématopoïétique.

L'hypothèse de l'origine neuroectodermique des cellules microgliales est confortée par des études montrant qu'une production de cellules macrophagiques et/ou de cellules microgliales peut se faire à partir de neuroépithélium embryonnaire qui, prélevé avant sa vascularisation, en engendre *in vitro*. En effet, il a été possible d'obtenir une culture de cellules microgliales, après élimination sélective des cellules présentant des marqueurs spécifiques des macrophages et des cellules microgliales du neuroépithélium d'embryon de Souris (Hao *et al.*, 1991). Les éventuels précurseurs microgliaux d'origine mésenchymateuse de ce tissu ont donc été supprimés par ce traitement et l'on ne peut attribuer l'origine des cellules microgliales qu'au tissu neuroépithélial subsistant.

Des études ont montré qu'il existe des cellules microgliales dans le SNC d'embryons de Souris âgées de 8 jours (Alliot *et al.*, 1999), alors que les monocytes sont détectés à partir de 10-11 jours de gestation (Takahashi *et al.*, 1989).

113-Invasion du système nerveux central.

Les cellules microgliales apparaissent dans le SNC murin vers la fin de la période embryonnaire et vers les premiers jours de vie (période post-natale) (Perry *et al.*, 1985 ; Perry et Gordon, 1991). Trois étapes sont nécessaires pour la constitution de la population microgliale cérébrale : (a) l'entrée des précurseurs des cellules microgliales dans le cas où les précurseurs dérivent d'un autre tissu que le tissu cérébral ; (b) la dispersion de ces précurseurs à travers le parenchyme cérébral ; et enfin, (c) la différenciation des précurseurs en cellules microgliales matures.

1131- Entrée des précurseurs des cellules microgliales dans le système nerveux central.

Les précurseurs ont 3 voies d'accès possibles au tissu cérébral. (a) La circulation sanguine ; les précurseurs traversent alors la barrière hémato-encéphalique. (b) Les ventricules cérébraux ; effectivement on a observé que des cellules microgliales peuvent

traverser les parois ventriculaires (Cuadros *et al.*, 1994 ; Moujahid *et al.*, 1996). (c) Les méninges ; les précurseurs doivent alors traverser la pie-mère (Boya *et al.*, 1979).

La première voie d'entrée serait celle des cellules microgliales au cas où elles ont une origine hématopoïétique. Son existence a été vérifiée dans des expériences qui consistent à injecter des monocytes marqués dans le flux sanguin et à en retrouver les marqueurs dans les cellules microgliales (Ling *et al.*, 1980). Ces dernières adhèrent probablement à la paroi des vaisseaux puis pénètrent dans le parenchyme nerveux par diapédèse comme feraient les monocytes-macrophages avant de pénétrer dans les différents tissus (Cramer, 1992).

Il apparaît que l'invasion du SNC par les monocytes est facilitée quand le tissu cérébral est encore immature et que la barrière hémato-encéphalique n'est pas encore complètement formée. L'entrée des cellules microgliales par les ventricules et les méninges prend place pendant le développement embryonnaire, parce qu'elles apparaissent dès le deuxième jour du développement embryonnaire chez le Rat, avant la vascularisation du tissu nerveux (Wang *et al.*, 1996).

Le *lymphocyte function associated antigen* [LFA-1] est une intégrine exprimée uniquement à la surface des leucocytes. Elle se lie à l'*intercellular adhesion molecule* [ICAM-1]. Cette glycoprotéine s'exprime à la surface des cellules endothéliales et permet la translocation des leucocytes, de l'espace vasculaire vers les tissus périphériques ou vers les tissus non vasculaires. Il existe une étroite corrélation entre l'expression du LFA-1 et de l'ICAM-1 dans le SNC. Ainsi, l'expression de LFA-1 par les cellules microgliales amiboïdes et par les monocytes après leur migration coïncide avec l'expression d'ICAM-1 par les cellules endothéliales (Dalmau *et al.*, 1997). L'immunomarquage de LFA-1 et ICAM-1 s'affaiblit après la naissance ; ce fait indique que le système d'adhésion LFA-1/ICAM-1 est très probablement impliqué dans l'envahissement du parenchyme cérébral par les monocytes.

L'entrée des cellules microgliales par la voie des méninges a été supposée pour la première fois par del Rio-Hortega (1932). Plusieurs études dans lesquelles on a observé la présence de précurseurs des cellules microgliales de part et d'autre de la pie-mère suggèrent en effet que ces derniers traversent les méninges (Dalmau *et al.*, 1997).

L'existence de chacune des 3 voies d'entrée est expérimentalement prouvée ou à tout le moins suggérée, ce qui laisse à penser que les précurseurs des cellules microgliales les utilisent conjointement pour envahir le tissu nerveux et constituer différentes sous-populations de cellules microgliales (Provis *et al.*, 1996).

1132- Dispersion des cellules microgliales dans le parenchyme cérébral.

La distribution des cellules microgliales varie d'une zone du parenchyme cérébral à l'autre bien qu'elles y soient présentes en toutes régions (Lawson *et al.*, 1990). Prolifération et migration sont les 2 mécanismes qui contribuent à la propagation des cellules microgliales dans le cerveau.

11321-La prolifération.

Les cellules microgliales manifestent une activité proliférative dans le cerveau adulte normal de Souris (Lawson *et al.*, 1992). Pendant le développement normal du SNC, les cellules microgliales amiboïdes prolifèrent aussi. Cette activité est mise en évidence par l'incorporation de nucléotides marqués ou par l'expression de l'Ag nucléaire des cellules prolifératives de l'hippocampe et du cortex de raton ou d'embryon de rat (Mander et Morris, 1996 ; Cossmann *et al.*, 1997).

Plusieurs facteurs, impliqués dans le contrôle et la prolifération des macrophages et des cellules microgliales, ont été caractérisés *in vitro*. Ainsi en est-il du *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* [GM-CSF] ou du *macrophage colony stimulating factor* [M-CSF] actifs sur cellules microgliales de Rat (Sawada *et al.*, 1990 ; Suzumura *et al.*, 1990 ; Ganter *et al.*, 1992) ou sur des cellules microgliales humaines, fœtales ou adultes (Lee *et al.*, 1994).

Des interleukines [IL] telles que l'IL-1 et l'IL-3, et le *tumor necrosis factor* α [TNF α] stimulent aussi la prolifération des cellules microgliales . Il a été montré également que certaines neurotrophines [NT] comme la NT-3 ou le *brain-derived neurotrophic factor* [BDNF] stimulent la croissance des cellules microgliales (Elkabes *et al.*, 1996).

11322-La migration.

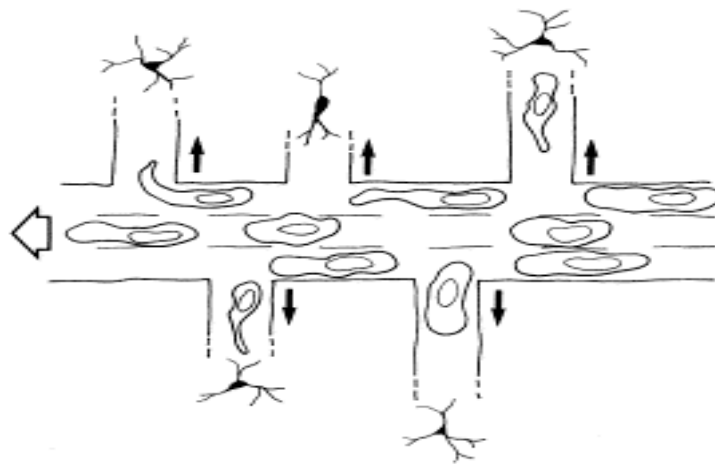
(1) Migration tangentielle et migration radiale.

La migration des cellules microgliales a été mise en évidence dans le SNC de la Grenouille (Lazar et Pal, 1996). Le mode de migration des cellules microgliales a été étudié dans la rétine embryonnaire de Caille (Marin-Teva *et al.*, 1998). L'observation de coupes de rétine embryonnaire, du *tectum* optique (Cuadros *et al.*, 1994) et du cervelet (Cuadros *et al.*,

1997) de Caille montre que la migration se déroule en 2 étapes. Pendant la première, appelée migration tangentielle, les précurseurs se déplacent ensemble, parallèlement aux fibres du nerf optique (Navascuès *et al.*, 1995), de l'*album stratum* central du *tectum* (Cuadros *et al.*, 1994) et de la substance blanche du cervelet (Cuadros *et al.*, 1997). La deuxième étape est appelée migration radiale ; les cellules migrent individuellement en changeant de direction selon un axe perpendiculaire à celui qui est suivi pendant la migration tangentielle. Ainsi, les précurseurs microgliaux atteignent toutes les régions du tissu concerné (Figure 1.1).

FIGURE 1.1.

Les deux étapes de la migration des précurseurs des cellules microgliales (Navascuès *et al.*, 1995).



Dans la migration tangentielle, les précurseurs migrent dans la même direction ; dans la migration radiale, les précurseurs migrent perpendiculairement à l'axe de la migration tangentielle et subissent ensuite la différenciation.

(2) Facteurs contrôlant la migration des cellules microgliales.

Les facteurs libérés pendant la mort cellulaire peuvent influencer la migration des cellules microgliales. On a observé une migration des précurseurs des cellules microgliales ainsi qu'une accumulation de macrophages et de cellules microgliales dans des régions du parenchyme cérébral où survient une importante mort cellulaire (Hume *et al.*, 1983 ; Pearson *et al.*, 1993 ; Ashwell, 1991a, 1991b). Les cellules microgliales peuvent aussi être attirées par des facteurs produits par les astrocytes comme le M-CSF (Mallat *et al.*, 1997).

D'autres facteurs jouent un rôle dans la migration des cellules microgliales, et notamment le *monocyte chemoattractant protein-1* [MCP-1] et une cytokine, RANTES, ainsi que

l'IL-8. La distribution des cellules microgliales dans le parenchyme cérébral pourrait être coordonnée à l'expression temporo-spatiale particulière de ces chimiokines, qu'elles soient d'origine microgliale ou astrogliale (Rezaie et Male, 1999).

114-Différenciation des cellules microgliales amiboïdes.

1141- Changements morphologiques.

Les cellules microgliales amiboïdes acquièrent progressivement une morphologie ramifiée. Elles passent par un stade intermédiaire au cours duquel elles présentent des extensions cytoplasmiques de longueur moyenne, avant de devenir des cellules microgliales ramifiées. Cette transformation s'accompagne d'une réduction de la masse cytoplasmique, d'une diminution du nombre de lysosomes et d'une disparition des vacuoles (Kaur *et al.*, 1985). Les cellules microgliales amiboïdes ne sont pas détectables dans le cerveau adulte. Contrairement aux cellules microgliales amiboïdes qui sont mobiles et prolifératives, les cellules microgliales ramifiées prolifèrent à vitesse lente (Lawson *et al.*, 1992), sont immobiles et quasi-quiescentes.

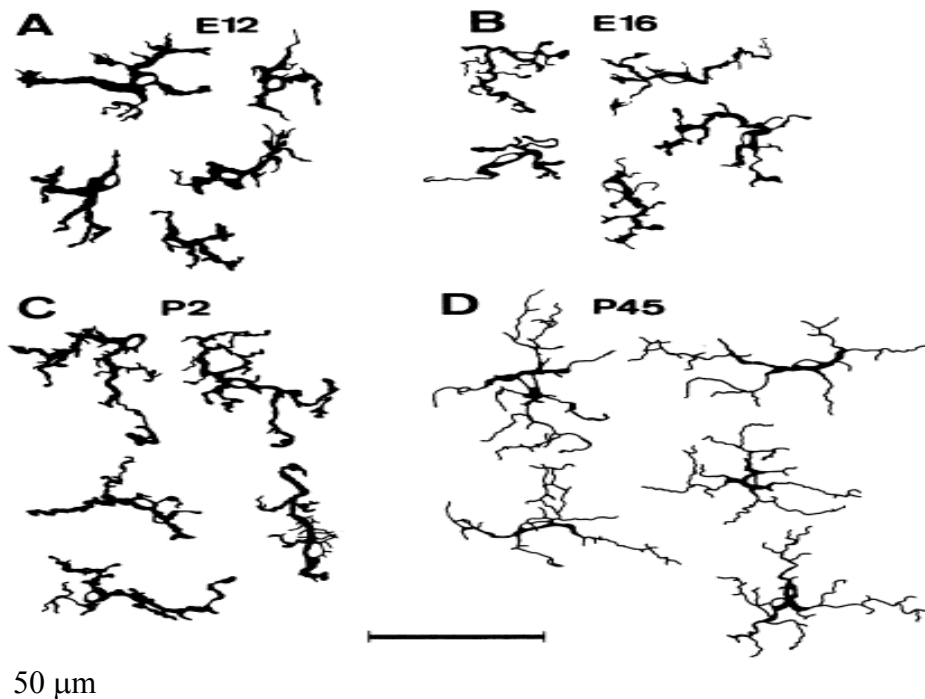
L'évolution morphologique a été mise en évidence au moyen de la technique d'injection de particules de carbone au Rat (Ling, 1979). Il apparaît que les particules de carbone sont détectées aussi bien dans des cellules microgliales amiboïdes que dans des cellules microgliales ramifiées. L'apparition séquentielle de particules de carbone dans les monocytes, dans les cellules microgliales amiboïdes et dans les cellules microgliales ramifiées suppose qu'il existe un lien ontogénique entre ces 3 types cellulaires. On a estimé que les 2 tiers de la population microgliale amiboïde dégénéraient *in situ* quand le tiers restant évoluait vers la forme ramifiée et persistait dans le SNC adulte (Figure 1.2).

1142- Changements du phénotype antigénique.

L'expression de plusieurs protéines antigéniques de surface est modifiée lors de la différenciation des cellules microgliales amiboïdes en cellules microgliales ramifiées (Tableau 1.1).

FIGURE 1.2

Différenciation morphologique des cellules microgliales dans le *tectum* optique d'embryons de Caille âgés de 12 jours (A), 16 jours (B), 2 jours après la naissance (C) et 45 jours après la naissance (D) (d'après Cuadros *et al.*, 1994).



Les changements morphologiques et antigéniques accompagnant la différenciation coïncident avec la diminution de la fonction de phagocytose. L'activité de phagocytose des cellules microgliales amiboïdes est supérieure à celle des cellules microgliales ramifiées. On comprend pourquoi l'expression des récepteurs spécialisés dans la fonction de phagocytose, comme le CR3 ou le CD [*cluster of differentiation*] 64, soit régulée négativement comme l'est aussi celle des enzymes lysosomiques (Tableau 1.2).

1143-Facteurs contrôlant la différenciation des cellules microgliales amiboïdes.

Plusieurs facteurs jouent un rôle dans la différenciation des cellules microgliales. Des composants de la matrice extracellulaire interviennent, semble-t-il, dans le phénomène de ramification. La laminine inhibe cette dernière (Chamak et Mallat, 1991), alors que la fibronectine, à l'inverse, la promeut (Chamak et Mallat, 1991), ou n'a pas d'effet significatif (Giulian *et al.*, 1991).

TABLEAU 1.1.
Expression de diverses molécules de surface par les cellules microgliales amiboïdes et ramifiées.

Ag de surface/récepteur	Cellules microgliales amiboïdes	Cellules microgliales ramifiées	Références
CR3	+++ ^a	+ ^a	Ling <i>et al.</i> , 1990
CMH ^b I	+++	+/- ^a	Ling <i>et al.</i> , 1991
CMH ^b II	+/-	+/-	Ling <i>et al.</i> , 1991
CD45	+++	+	Ling <i>et al.</i> , 1991 ; Sedgwick <i>et al.</i> , 1991
CD64 ^c	+	+/-	Rezaie <i>et al.</i> , 1997 ; Ulvestad <i>et al.</i> , 1994b
CD68	+	-	Rezaie <i>et al.</i> , 1997
ED1	+	-	Milligan <i>et al.</i> , 1991

^a +++ : très forte expression ; + : expression moyenne ; +/- : faible expression ; - : absence d'expression.

^b CMH : complexe majeur d'histocompatibilité ; CMH I : CMH de classe I ; CMH II : CMH de classe II.

^c CD64 : Fc γ R1 humain.

Les cellules microgliales amiboïdes prennent la forme ramifiées lorsqu'elles sont cultivées en présence d'astrocytes non fixés ou fixés, ou en présence de la matrice extracellulaire abandonnée sur le substrat de culture par des astrocytes (Sievers *et al.*, 1994 ; Kloss *et al.*, 1997 ; Tanaka *et al.*, 1999) et restent amiboïdes en présence de fibroblastes (Sievers *et al.*, 1994). Ces résultats suggèrent donc qu'un facteur non diffusible, localisé dans la membrane des astrocytes, est nécessaire à la ramification. Mais il existe aussi un facteur soluble qui tend également à promouvoir celle-ci (Tanaka et Maeda, 1996). Ce facteur soluble pourrait être le GM-CSF qui affecte la ramification et la multiplication des cellules microgliales, mais non le M-CSF (Fujita *et al.*, 1996), cytokines secrétées l'une et l'autre par les astrocytes en culture (Ohno *et al.*, 1990 ; Lee *et al.*, 1993). Les effets du GM-CSF

TABEAU 1.2.
Expression de diverses enzymes lysosomiques dans les cellules microgliales amiboïdes et ramifiées.

Enzyme	Cellules microgliales amiboïdes	Cellules microgliales ramifiées	Références
Phosphatase acide	+++ ^a	- ^a	Ling <i>et al.</i> , 1977 ; Lowe <i>et al.</i> , 1989
Estérases non spécifiques	+++	+ ^a	Chamak et Mallat, 1991 ; Lowe <i>et al.</i> , 1989
Thiamine pyrophosphatase	+++	nc ^a	Kaur <i>et al.</i> , 1987
Arylsulfatase	+++	nc	Ling <i>et al.</i> , 1977
ATPase	+	+	Ling <i>et al.</i> , 1977 ; Lowe <i>et al.</i> , 1989

^a+++ : très forte expression ; + : expression moyenne ; - : absence d'expression ; nc : non communiqué.

et du M-CSF varient selon les conditions expérimentales. En effet, le sérum, l'insuline, la progestérone et le glucose à fortes concentrations inhibent l'induction de la ramification par le GM-CSF (Fujita *et al.*, 1996), tout comme l'interféron gamma [IFN γ], le lipopolysaccharide [LPS] et l'IL-3.

Ces résultats sont à mettre en rapport avec la situation qui prévaut *in vivo*. Ainsi, les régions du SNC dépourvues de barrière hémato-encéphalique efficace peuvent être infiltrées par des facteurs sériques ; ces régions contiennent justement des cellules microgliales peu ramifiées (Lawson *et al.*, 1990).

115- Fonctions des cellules microgliales.

1151-Rôle des cellules microgliales amiboïdes.

Les cellules microgliales amiboïdes jouent un rôle important dans le développement du cerveau. Elles participent à l'élimination des neurones dégénérés et à la sécrétion de facteurs neurotrophes.

(1) Elimination des neurones dégénérés.

Les cellules microgliales amiboïdes éliminent les débris cellulaires pendant la période de développement cérébral (Pearson *et al.*, 1993). La mort neuronale et la désintégration des axones associés aux neurones apoptotiques accompagnent naturellement la maturation du SNC. Après la production intensive de neurones et la multiplication des connexions interneuronales, le cerveau entreprend de réorganiser son réseau. Dans le SNC, la mort neuronale coïncide avec l'entrée des cellules microgliales (Perry *et al.*, 1985 ; Ashwell, 1990 et 1991) ; les neurones morts ou en cours d'apoptose libèrent des facteurs qui pourraient attirer les monocytes vers le parenchyme nerveux. En effet, on observe une association physique entre les cellules microgliales et les neurones présentant les modifications nucléaires caractéristiques de l'apoptose dans le SNC en développement (Ferrer *et al.*, 1990).

Les cellules microgliales utilisent leur activité phagocytaire pour éliminer les neurone en dégénérescence ainsi que les axones transitoires ou aberrants (Innocenti *et al.*, 1983 ; Koppel *et al.*, 1983 ; Ashwell, 1990). Des études conduites *in vitro* (Witting *et al.*, 2000) ont montré que les récepteurs de la vitronectine et les récepteurs de la phosphatidylsérine sont impliqués dans l'ingestion des corps apoptotiques neuronaux.

(2) Activités neurotrophes.

Les cellules microgliales interviennent dans des processus qui augmentent la complexité du SNC. Elles secrètent des facteurs de croissance qui affectent le fonctionnement et le développement des neurones et des astrocytes (Nagata *et al.*, 1993 ; Elkabes *et al.*, 1996 ; Jonakait *et al.*, 1996 ; Mazzoni et Kenigsberg, 1997). Les cellules microgliales tout comme les macrophages pourraient guider les neurites durant le développement du SNC (Stolz *et al.*,

1991). Elles peuvent aussi promouvoir la croissance des axones *in vitro* (Nakajima *et al.*, 1993 ; Chamak *et al.*, 1994, 1995) et *in vivo* (Rabchevsky et Streit, 1997).

Les cellules microgliales stimulent la prolifération des astrocytes, et augmentent la myélinogenèse ainsi que la vascularisation du SNC (Giulian *et al.*, 1988).

Ces différentes fonctions des cellules microgliales sont convoyées par des facteurs de croissance tel que le *nerve growth factor* [NGF], le *basic fibroblast growth factor* [bFGF], la NT-3, l'IL-1, l'IL-6, le M-CSF, le G-CSF [*granulocyte colony stimulating factor*] et le TNF α (Benveniste *et al.*, 1995 ; Elkabes *et al.*, 1996).

Ces facteurs régulent aussi bien les fonctions des cellules microgliales que celles des neurones et des astrocytes (Elkabes *et al.*, 1996).

12-La phagocytose.

Pour phagocyter des éléments figurés ou non, les cellules de Mammifères peuvent emprunter 3 types de mécanismes.

La pinocytose est le premier d'entre eux. Elle correspond à l'ingestion de liquide qui constitue le milieu environnant la cellule. C'est un mécanisme d'ingestion peu spécifique et non saturable. On lui donne aussi le nom d'endocytose de la phase fluide.

L'endocytose convoyée par un récepteur fait intervenir l'interaction d'un ligand et d'un récepteur de surface. Après inclusion dans une vésicule formée par une invagination de la membrane plasmique, le ligand se trouve enclos dans un endosome. Certains virus sont ingérés par ce mécanisme et se retrouvent dans des vésicules à clathrine [*clathrin-coated pits*] ou vésicules mantelés. Ce processus est utilisé par l'hépatocyte pour capter, par exemple, les lipoprotéines et la transferrine. Toutes les cellules, sauf les érythrocytes, peuvent endocyter des ligands en utilisant cette modalité particulière d'endocytose.

La phagocytose, enfin, est considérée comme une forme spécialisée d'endocytose. Elle permet à certaines cellules spécialisées (macrophages, granulocytes neutrophiles) d'ingérer des particules étrangères comme des bactéries ou des débris cellulaires. La phagocytose joue un rôle important dans la fonction immunitaire ; elle constitue en effet une première ligne de défense de l'organisme contre les infections bactériennes et parasitaires. Elle se distingue de l'endocytose par 3 caractéristiques : (a) la taille des particules ingérées est supérieure ou égale à 1 μm ; (b) elle est bloquée par les cytochalasines (Axline et Reaven,

1974) qui ont peu d'influence sur l'endocytose résultant de l'assemblage de la clathrine et de la formation de puits mantelés ; (c) la phagocytose est fortement influencée par la température. Elle est bloquée si la température est inférieure ou égale à 18°C alors que dans ces conditions, les autres modes d'endocytose persistent, sur un rythme ralenti toutefois.

121- Les différents types de phagocytose.

Quatre étapes caractérisent la phagocytose en général. (a) La phase de reconnaissance de la cible. Celle-ci est effectuée directement, grâce à des récepteurs de l'élément figuré étranger, exprimés par le phagocyte [PRR, pour *pathogen recognition receptor*], ou indirectement, dans le cas d'éléments figurés étrangers opsonisés — c'est-à-dire recouverts de molécules particulières, appelées les opsonines —, grâce à des récepteurs d'opsonines (FcR, CR [pour *complement receptor*]). (a) La phase d'ingestion qui nécessite des modifications morphologiques du phagocyte. (b) La phase "d'internalisation" conclut la phase d'ingestion ; elle aboutit à la formation d'une vésicule de phagocytose ou phagosome. (c) Enfin, survient la phase de dégradation totale ou partielle de l'élément figuré étranger par les enzymes protéolytiques contenues dans les lysosomes, après que ces derniers ont fusionné avec le phagosome.

Il existe 3 modalités de phagocytose. (a) **La phagocytose par enroulement** (*coiling phagocytosis*) est observée au cours de la phagocytose de bactéries comme *Legionella pneumophila* (Cirillo *et al.*, 1999), *Borrelia burgdorferi* (Linder *et al.*, 2001) ou de levures comme *Candida albicans* (au moins pour les hyphes de ce Champignon). En général, durant ce type de phagocytose, un enroulement spiralé de membrane cytoplasmique se forme autour du parasite. Le complexe phagocytaire se retrouve ensuite à l'intérieur du phagocyte. (b) **La phagocytose par enfoncement** [*sinking in*] a été observée chez des macrophages en train d'ingérer des particules opsonisées par le complément. Dans ce cas, la membrane se déforme au contact de la particule et se creuse. La particule se retrouve au fond d'une sorte de puits et s'enfonce progressivement dans la cellule jusqu'à être complètement entourée par la membrane plasmique et les lèvres du puits membranaire se rejoignent pour former le phagosome (Allen et Aderem, 1996). (c) **La phagocytose la plus connue est celle qui implique une émission de pseudopodes** [*engulfment*] ; elle est dite "de la fermeture à glissière" (*zipper*). Ce mécanisme prévaut chez les macrophages en train d'ingérer des particules opsonisées par des IgG (Allen et Aderem, 1996). Il commence par une agrégation des FcγR consécutivement à la reconnaissance de la particule recouverte d'IgG. S'ensuit un

assemblage et un pontage des filaments d'actine, dans la partie sous-jacente aux récepteurs agrégés. Il en résulte la formation de pseudopodes qui émergent de part et d'autre de la particule et commencent à l'envelopper. La réorganisation du cytosquelette augmente la surface de la membrane qui est en contact avec la particule et donc le nombre des FcγR en contact avec les IgG. Les récepteurs vont ensuite déclencher l'assemblage des protéines du cytosquelette et l'extension plus en avant des pseudopodes jusqu'à ce qu'ils entourent complètement la particule. Les pseudopodes vont fusionner à leur point de rencontre pour former le phagosome.

122-Rôle du cytosquelette dans la phagocytose.

Le cytosquelette est un réseau complexe de filaments protéiques s'étendant dans tout le cytoplasme, et l'organisant. Il permet aux cellules eucaryotes de s'adapter à une grande variété de changements morphologiques et d'effectuer des mouvements coordonnés. Il est nécessaire à la formation des pseudopodes consécutivement à l'interaction entre la particule et le phagocyte. Le cytosquelette est constitué de 3 types de filaments protéiques: **les microfilaments d'actine** (7 à 9 nm de diamètre), **les microtubules** (25 nm de diamètre) et **les filaments intermédiaires** (10 nm de diamètre).

1221-Rôle de l'actine dans la phagocytose.

(1) Polymérisation de l'actine.

L'actine est la protéine intracellulaire prépondérante de la cellule eucaryote, et représente, selon les cellules, de 1 à 10 % de la quantité totale des protéines cellulaires (10 % dans les macrophages). Cette protéine de taille moyenne (375 acides aminés [AA]) se présente dans la cellule soit sous forme de monomère globulaire (actine G) soit sous forme de polymère (actine F). Elle a une masse moléculaire [MM] de 42,5 kD. En absence de toute stimulation, les phagocytes contiennent plus de 60 % d'actine G. Après l'ingestion d'une particule, il s'accumule de l'actine F par polymérisation d'actine G. Ce sont des forces électrostatiques et hydrophobes qui contribuent à la formation de ces polymères homogènes, non-covalents, de structure hélicoïdale, d'environ 10 nm de diamètre et de plusieurs μm de long. Le filament d'actine est doué d'une forte flexibilité et d'une capacité de torsion qui lui est nécessaire pour former des structures ordonnées. Le polymère d'actine possède 2 extrémités

aux propriétés distinctes : l'une est dite à croissance rapide (extrémité + ou barbée), l'autre, à croissance lente (extrémité - ou pointue).

L'assemblage de l'actine purifiée en filaments se fait en 3 étapes successives.

La première est l'activation du monomère : la présence de sels, d'ATP et d'une concentration protéique minimale, entraîne des changements locaux dans la conformation du monomère d'actine, qui entre très rapidement dans un état activé et acquiert des propriétés structurales différentes, lui conférant notamment une plus grande résistance à la protéolyse. Cette nouvelle entité protéique possède désormais les compétences nécessaires pour le déclenchement du processus de polymérisation.

La deuxième est la nucléation du monomère. Elle est relativement lente, mais elle est essentielle et dépend pour l'essentiel de la concentration en actine. Elle représente l'étape limitante du déclenchement de la polymérisation, et suppose l'association de monomères d'actine activée et la formation de noyaux constitués de 2, 3 ou 4 monomères en équilibre rapide.

La troisième étape est l'allongement du filament. C'est l'étape la plus rapide ; elle se manifeste par l'association de monomères d'actine aux 2 extrémités du centre de nucléation ou du filament en cours de formation. La vitesse de croissance du polymère d'actine est 5 à 10 fois plus rapides à l'extrémité barbée qu'à l'extrémité pointue, quel que soit le nucléotide lié à l'actine.

In vivo, l'actine est sous la forme actine G-ATP et sa polymérisation s'accompagne de l'hydrolyse de l'ATP (liée à chaque unité monomérique) en ADP et Pi. La libération du γ -phosphate déstabilise les interactions actine-actine ce qui entraîne une dissociation plus rapide à l'extrémité pointue du filament (riche en ADP) qu'à l'extrémité barbée (riche en ATP). Le filament mûr ou actine F est constitué essentiellement d'actine F-ADP à l'exception de la partie barbée qui possède des sous-unités actine F-ADP-Pi. L'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP engendre une sorte de manège moléculaire continu appelé "tapis roulant" (*treadmilling*). L'organisation de l'actine formée *in vitro* se distingue de celle de l'actine détectée *in vivo*, par certains caractères, comme l'organisation rectiligne des filaments, dont la longueur peut dépasser 10 μm (0,5 μm *in vivo*) et qui ne sont pas rattachés les uns aux autres.

(2) Protéines et ligands affectant les propriétés de l'actine.

L'extraordinaire capacité de reconnaissance de nombreuses protéines par l'actine, (qu'elle soit sous sa forme G ou F) constitue un moyen biologique unique dans sa diversité pour contrôler l'association ou la dissociation des filaments et leur organisation en faisceaux ou en réseaux ainsi que leur ancrage à des structures membranaires, en réponse à des différents signaux externes. Un grand nombre d'*actin binding proteins* [ABP] a été identifié (Pollard et Cooper, 1986). Ces protéines sont classées en 4 à 6 voire 7 grandes familles selon leur mode de liaison *in vitro* à l'actine. Il convient de noter que chacune de ces protéines peut être assignée à plusieurs groupes.

Le premier d'entre eux contient des protéines comme **la thymosine β 4** et **la DNase I** qui séquestrent l'actine et la maintiennent sous sa forme monomérique dans le cytosol. La thymosine β 4 est une protéine de faible MM (5 kD), elle a été isolée dans le thymus (Ruggiere *et al.*, 1983). Elle inhibe l'échange des nucléotides liés à l'actine tout comme la profiline (Pring *et al.*, 1992). Elle interagit à de fortes concentrations avec l'actine F *in vitro* (Carlier *et al.*, 1996) et *in vivo* (Sun *et al.*, 1996). L'affinité de cette ABP pour l'actine dépend du nucléotide associé à cette dernière. Elle est plus élevée pour l'ATP-actine que pour l'ADP-actine (Carlier *et al.*, 1993). La DNase I est une glycoprotéine dotée d'une activité d'endonucléase : elle clive le DNA en oligonucléotides ; elle est aussi impliquée dans des mécanismes d'apoptose (Peitsch *et al.*, 1993). Son activité dépend des ions calcium et magnésium ; elle a une forte affinité pour l'actine G, mais se lie avec une moins forte affinité à l'actine F, pour augmenter la vitesse de dissociation des monomères du côté pointu (Weber *et al.*, 1994). Ces protéines permettent de constituer un réservoir de monomères nécessaires à une brusque polymérisation de l'actine.

Le deuxième groupe d'ABP est constitué des protéines de dépolymérisation comme **la Cap Z** et **l'ADF/cofiline** [ADF pour *actin depolymerizing filament*], qui induisent la conversion de actine F en actine G, Elles jouent un rôle dans la nucléation de la polymérisation. Le complexe se lie aussi à l'ADP-actine (actine F ou actine G). La cofiline se lie aux monomères d'ADP-actine pour empêcher l'échange de leurs nucléotides (Nishida *et al.*, 1985). L'activité de ce complexe est régulée par les phosphatidylinositols phosphate et diphosphate [PIP et PIP2] (Yonezawa *et al.*, 1990), Il est aussi phosphorylé par les LIM-kinase proteins 1 et 2 [LIM-K1] et [LIM-K2] sous le contrôle des petites GTPases comme Rac pour LIM-K 1 (Yang *et al.*, 1998) et cdc42 et Rho pour LIM-K 2 (Bamburg *et al.*, 1999). Les LIM-K sont régulés par phosphorylation d'un résidu Thr (Edwards *et al.*, 1999). La Cap Z

est un hétérodimère de 2 sous-unités, α et β , nécessaires à son fonctionnement (Casella *et al.*, 1994). Elle régule aussi l'assemblage de l'actine du côté barbé du filament. Elle joue un rôle dans la nucléation des filaments d'actine et aussi dans leur coiffage [*capping*]. Son activité de coiffage est régulée *in vivo* par les PIP et PIP2. Ces derniers régulent aussi l'activité de la cofiline et de la DNase I (Yonezawa *et al.*, 1990), des profilines et de la gelsoline (Tuominen *et al.*, 1999). Ils permettent la libération des extrémités barbées des filaments et par conséquent facilitent la polymérisation des filaments d'actine. Les profilines sont connues pour favoriser la polymérisation en favorisant la formation d'ATP-actine (Ampe *et al.*, 1988),

Le troisième groupe d'ABP est constitué des protéines qui inhibent l'échange de monomères à l'extrémité pointue, comme **la tropomoduline**, l'une des rares protéine avec **ARP2/3** à se lier au côté pointu du filament d'actine. Elle a été clonée et son expression largement étudiée dans les muscles cardiaques et squelettiques (Sung *et al.*, 1996).

Le quatrième groupe d'ABP contient des protéines qui, comme **la gelsoline**, interagissent avec les extrémités barbées des filaments d'actine en interdisant à celle-ci les échanges de monomères (Mc Cough *et al.*, 1998). La gelsoline a un site de liaison à l'actine sensible aux ions calcium (Pope *et al.*, 1995).

Le cinquième groupe d'ABP contient des protéines comme **l'ARP2/3** qui possèdent au moins 2 sites de liaison à l'Actine F et qui facilitent ainsi la formation et la branchement des filaments. Elle participe aussi à la nucléation des filaments d'actine par un mécanisme particulier. ARP2/3 se trouve en général sous une forme inactivée ; elle est activée par l'homologue neuronal de la *Wiskott-Aldrich syndrom protein* [N-WASP], sous le contrôle de Cdc42 ou de PIP2. Elle est aussi activée par la myosine I dans les levures (Evangelista *et al.*, 2000). Le complexe formé par N-WASP et ARP2/3 peut activer la nucléation des filaments d'actine (Welch *et al.*, 1997) lors de la phagocytose convoyée par les FC γ R et par le CR3 (May *et al.*, 2000). **La taline**, une protéine qui se lie au cytosquelette, est localisée à proximité des phagosomes formés par l'engagement des FC γ R et du CR3. L'absence de taline dans *Dictyostelium discoïdum* bloque la phagocytose (Niewohner *et al.*, 1997). Cette molécule se lie à la sous-unité β 2 des intégrines (comme le récepteur CR3, [Sampath *et al.*, 1998]) et à l'actine F.

Le sixième groupe d'ABP contient des protéines comme **la tropomyosine** qui stabilisent les 2 extrémités des filaments d'actine, afin d'empêcher leur dépolymérisation.

Le septième groupe contient des protéines motrices comme **les myosines** qui utilisent les filaments d'actine pour se déplacer dans le cytoplasme.

Le processus de polymérisation de l'actine peut être aussi influencé par des substances naturelles comme les cytochalasines qui bloquent l'extrémité à croissance rapide des filaments et inhibent la migration cellulaire, ou la phalloïdine qui, au contraire, renforce les contacts inter-monomères et stabilise le filament. La polymérisation peut être aussi fortement perturbée ou inhibée par des phénomènes comme l'ADP-ribosylation, processus physiopathologique qui résulte de l'action de la toxine C2 de *Clostridium botulinum* sur la monomère d'actine (Aktories *et al.*, 1990). D'autres substances comme l'exoenzyme C3 ADP-ribosyltransférase, ou encore les toxines A et B de *Clostridium difficile*, catalysent, lors d'une étape post-traductionnelle, la glycosylation des petites protéines G à des sites spécifiques. L'inactivation de ces protéines désorganise le remodelage supposé extensif et permanent du cytosquelette d'actine lors de la cytomorphogenèse et perturbe profondément la motilité cellulaire. Les petites GTPases et plus particulièrement les facteurs cdc42, Rac, Rho sont des triphosphatases reliées à la superfamille Ras, qui fixent et hydrolysent les nucléotides guanidyliques ; elles font l'objet d'un intérêt croissant. Divers ligands agonistes interagissant avec divers récepteurs membranaires, tels que l'*epidermal growth factor* [EGF], le *platelet derived growth factor* [PDGF], ou encore la bradykinine ou l'insuline, acteurs essentiels de la signalisation intracellulaire, se sont révélés être des régulateurs primordiaux de la réorganisation rapide de l'actine. Ils contribuent à la formation des filopodes, des lamellipodes, des plaques d'adhérence focale et des fibres de tension, toutes structures indispensables aux mouvements unidirectionnels et synchronisés des cellules vivantes (Aspenstrom *et al.*, 1999).

1222-Rôle des autres constituants du cytosquelette.

Il n'est pas évident que d'autres constituants du cytosquelette — microtubules et filaments intermédiaires — soient impliqués dans la phagocytose. L'actine et les protéines associées à l'actine sont localisées dans la région cytoplasmique sous-jacente à la membrane cytoplasmique alors que les autres constituants du cytosquelette sont plutôt localisés au niveau du corps cellulaire (Cassimeris *et al.*, 1986).

Les microtubules interviennent lors de la mitose ainsi que dans le transport intracellulaire des vésicules et dans la migration cellulaire (Valiron *et al.*, 2001 ; Nabi, 1999). Les microtubules peuvent aussi jouer un rôle dans certains types de phagocytose. Certains activateurs des macrophages comme le PMA [*phorbol myristate acetate ester*] induisent une augmentation du nombre de microtubules (Robinson et Vandre, 1995). Le LPS augmente la

stabilité de ces éléments (Allen *et al.*, 1997). L'intégrité des microtubules est nécessaire au bon déroulement de certains types de phagocytose comme celle qui est convoyée par les récepteurs CR1 et CR3, mais elle n'est pas nécessaire à celle qui l'est par les FC γ R (Newman *et al.*, 1991). D'autres études ont montré que les microtubules sont impliqués dans la phagocytose convoyée par les FC γ R dans les monocytes et dans une lignée de macrophages (Athlin *et al.*, 1986 ; Bjermer *et al.*, 1988). Les microtubules seraient également impliqués dans l'organisation des β 2 intégrines (Zhou *et al.*, 2001) ; ce fait tend à confirmer leur implication dans la phagocytose convoyée par le CR3. On note que les substances qui dépolymérisent les microtubules, comme la colchicine ou la podophyllotoxine, n'affectent pas la phagocytose contrairement aux cytochalasines (Keller *et al.*, 1984). Les filaments intermédiaires ne présentent pas de polarité, et donc n'interviennent pas dans le transport directionnel. Ils interviennent surtout dans le maintien de la morphologie cellulaire, dans la résistance aux stress mécaniques et dans le maintien de la cohésion intercellulaire (dans les épithélium, par exemple) par l'intermédiaire de l'ancrage aux desmosomes et aux plaques d'adhérence.

1223-Stratégies de reconnaissance des éléments pathogènes par les cellules microgliales.

Il existe 2 stratégies bien connues de reconnaissance des micro-organismes pathogènes par les cellules phagocytaires. (a) La reconnaissance directe, qui implique des récepteurs comme le récepteur du mannose, le récepteur des β -glucannes, et la famille des récepteurs *scavenger* [SR] A et B [SR-A, SR-B]. (b) La deuxième stratégie de reconnaissance s'effectue par intermédiaire d'opsonines. Ces opsonines vont permettre aux microorganismes ou aux corps apoptotiques d'être capturés plus efficacement. Les principales opsonines sont la *mannose binding lectin* [MBL], le fragment C1q du système du complément (ainsi que des molécules du surfactant), les IgG et les fractions C3b/C3bi du système du complément (discutés dans la SECTION consacrée au récepteur du complément).

La MBL possède des domaines lectines (dépendants des ions calcium) qui se lient à de très nombreux sucres libres. D'une façon générale, ces derniers ne sont pas exposés à la surface des cellules des Mammifères, mais sont abondants à celle des micro-organismes, en particulier des bactéries non capsulées comme *Listeria monocytogenes* et *Hemophilus influenzae* (Shang *et al.*, 2005). En se liant aux micro-organismes, la MBL en facilite l'élimination ; elle se lie au même récepteur que le fragment C1q, [récepteur dénommé C1qRp

(p pour phagocytose)]. Cette reconnaissance entraîne l'ingestion des particules opsonisées sans provoquer l'activation du macrophage, en particulier sans induire la synthèse de cytokines inflammatoires.

Les phagocytes possèdent des récepteurs pour le fragment cristallisable Fc des IgG. Les principaux de ces récepteurs ont pour nom CD64 (Fc γ RI), CD32 (Fc γ RII) et CD16 (Fc γ RIII). C'est surtout le premier d'entre qui présente une forte affinité pour les IgG.

1224-Signalisation intracellulaire associée à la phagocytose.

On connaît peu de chose sur la ou les cascade(s) de signalisation intracellulaire concomitante(s) et/ou consécutive(s) à la phagocytose, bien que la structure des récepteurs impliqués dans ce phénomène ainsi que son mécanisme soient bien connus. Le récepteur du mannose, les SR, le CR3 et les différents récepteurs du fragment Fc des IgG (Fc γ RI-III) sont les plus couramment impliqués dans la phagocytose. C'est donc les cascades de signalisation intracellulaire déclenchées par leur engagement que nous étudierons ici, et plus particulièrement celles que déclenche la reconnaissance des Fc γ R et du CR3.

D'une manière générale, on observe que ces cascades dépendent des cellules étudiées, macrophages ou neutrophiles par exemple.

L'interaction entre un Fc γ R et une IgG induit une phosphorylation de la queue intracytoplasmique du récepteur par un membre de la famille des tyrosine kinases Src, comme Lyn, Fgr et Hck (Ghazizadeh *et al.*, 1994 ; Fitzer-Attas *et al.*, 2000). Cette phosphorylation est suivie de l'activation de Syk (Darby *et al.*, 1994) qui joue un rôle dans la formation de la dépression (*cup*) (Greenberg *et al.*, 1996) nécessaire à "l'internalisation". On observe aussi que la caséine kinase II est activée lors de la phagocytose convoyée par les Fc γ R (Suzuki, 1991 ; Yamada *et al.*, 1989) ; cette enzyme a dans la phagocytose un rôle qui n'est pas très bien compris, mais elle pourrait recruter des composés du cytosquelette en direction du phagosome (Yamada *et al.*, 1989).

Une libération d'acide arachidonique [AAr] accompagne la phagocytose de levures et de particules opsonisées par des IgG (Aderem *et al.*, 1986). Il est métabolisé en leucotriènes, prostaglandines et thromboxanes qui entretiennent l'inflammation. Cet acide est également impliqué dans les mouvements de la membrane lors de la phagocytose (Lennartz *et al.*, 1997). Sa libération est provoquée par l'action d'une phospholipase A2 [PLA2] (Lennartz *et al.*, 1997), en particulier et probablement par celle d'une PLA2 indépendante des ions

calcium (Dennis, 1997). La production d'AAr ne nécessite pas une augmentation des ions calcium intracellulaires (Lennartz *et al.*, 1991). Le rôle des ions calcium dans la phagocytose convoyée par les Fc γ R fait l'objet d'une controverse. Dans les neutrophiles, il est suggéré par certains travaux (Kobayashi *et al.*, 1995) et écarté par d'autres (Della-Bianca *et al.*, 1990). En revanche, les ions calcium semblent être impliqués dans la fusion du phagosome avec le lysosome (Jaconi *et al.*, 1991).

La protéine kinase C [PKC] intervient dans la phagocytose, en particulier dans la réorganisation du cytosquelette (Sheterline *et al.*, 1986). Elle phosphoryle en effet des protéines comme MARCKS [*myristoylated alanine-rich C kinase substrate*], (Hartwing *et al.*, 1992) et la plekstrine, exprimée aussi bien par les plaquettes que par les macrophages (Brumell *et al.*, 1999). La famille des protéines kinases C est constituée de 4 membres : les PKC- δ , ϵ , ν , et θ . Les différentes isoformes contrôlent certaines étapes de la phagocytose convoyée par les Fc γ R (Larsen *et al.*, 2000). Ainsi, la PKC- ϵ est impliquée dans la cascade de signalisation déclenchée à la suite l'engagement des récepteurs Fc γ R par des particules opsonisées par des IgG (Zheng *et al.*, 1995).

Le diacylglycérol [DAG] est responsable de l'activation de la PKC. Il est produit directement par l'action d'une phospholipase C [PLC] spécifique des phospho-inositides [PI-PLC] ou par celle d'une PLC spécifique de la phosphatidylcholine [PC-PLC], ou indirectement par la phospholipase D [PLD]. Des études ont montré que la PI-PLC ne serait pas impliquée dans la phagocytose de particules opsonisées par les IgG (Della Bianca *et al.*, 1990). Ce type de phagocytose implique aussi une phospho-inositide-3-kinase [PI3K]. La wortmannine, un inhibiteur de l'PI3K bloque la phagocytose de ce type de particules par les neutrophiles et par les macrophages (Ninomiya *et al.*, 1994). La cascade de signalisation intracellulaire déclenchée par l'engagement des Fc γ R impliquerait les activations subséquentes suivantes : PI3K sur PIP2 donne le PIP3 qui sous l'action de la PLD engendre l'acide phosphatidique qui sous l'action de l'hydrolase d'acide phosphatidique produit du DAG : le DAG active la PKC ; la PKC activée active à son tour la phospholipase phagocytaire qui transforme la phosphatidyléthanolamine en AAr (Lennartz, 1999).

La PI3K joue un rôle dans la phagocytose en modulant la polymérisation de l'actine. Ses produits, le PIP2 (3,4) et le PIP3 (3,4,5), forment des complexes avec la profiline et la gelsoline et promeuvent la polymérisation de l'actine ainsi que la formation de pseudopodes (Derman *et al.*, 1997). Cette même enzyme peut également agir sur le cytosquelette en modulant l'activité des protéines G à faible MM comme Rho et Rac, essentielles au bon

déroulement de la phagocytose (Cox *et al.*, 1997). Elle joue enfin un rôle dans la fermeture des phagosomes (Araki *et al.*, 1996).

La phagocytose convoyée par les CR se différencie morphologiquement de celle qui l'est par les Fc γ R. C'est en effet une phagocytose par enfoncement, qui n'implique ni réponse inflammatoire ni explosion oxydative, alors que la phagocytose convoyée par les Fc γ R implique l'émission de pseudopodes. Consécutivement à la reconnaissance du récepteur, une PKC phosphoryle le résidu Ser de la sous-unité β (Buyon *et al.*, 1990 ; Chatila *et al.*, 1989) des CR (pour ceux d'entre eux qui sont du type intégrine). L'activité de la PKC est nécessaire à la phagocytose de particules opsonisées par le fragment C3bi du système du complément, et à celle qui fait intervenir les récepteurs des β -glucanes (Allen et Aderem, 1996 ; Roubey *et al.*, 1991). La phagocytose convoyée par le CR3 implique une PI3K (Cox *et al.*, 2001). Les tyrosine kinases ne semblent pas intervenir dans ce processus (Allen et Aderem, 1996). La PLD est impliquée dans la phagocytose de particules opsonisées avec des fragments C3 du système du complément, dans les macrophages — chez lesquels une inhibition de la phagocytose induit une diminution de l'activité de cette enzyme —, et chez les neutrophiles (Kusner *et al.*, 1996 ; Serrander *et al.*, 1996). Elle est activée d'une manière indépendante des ions calcium (Fallman *et al.*, 1992) et du cytosquelette (Serrander *et al.*, 1996). En revanche, *in vitro* son activité est améliorée en présence d'ions calcium (Exton, 1997). La phagocytose de particules opsonisées par des fragments C3 du système du complément implique aussi une tyrosine kinase ; en effet, l'ingestion de ces particules est bloquée par des inhibiteurs de cette classe d'enzymes (Kusner *et al.*, 1996).

D'autres récepteurs, comme $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$, sont impliqués dans la phagocytose de particules opsonisées par la fibronectine (Blystone *et al.*, 1994). La phagocytose convoyée par le récepteur du mannose, par celui du LPS (CD14) et par les SR ressemble morphologiquement au mécanisme de phagocytose convoyée par les Fc γ R, mais elle ne s'accompagne pas de réponse inflammatoire (Meagher *et al.*, 1992). Il semble au contraire que cette réponse soit atténuée (Fadok *et al.*, 1998 ; Voll *et al.*, 1997). La phagocytose convoyée par ce groupe de récepteurs fait intervenir l'actine (Platt *et al.*, 1998). MARCKS est impliquée dans la phagocytose du zymosan convoyée par le récepteur du mannose (Allen et Aderem, 1995).

123-Les cellules microgliales ramifiées : les phagocytes cérébraux.

1231-Le système immunitaire cérébral.

Le SNC est sous la surveillance constante d'un système immunitaire qui lui est spécifique. Il possède différents dispositifs physiques et chimiques pour se protéger des dommages causée par l'inflammation du tissu périphérique. Le liquide céphalo-rachidien [LCR] et la barrière hémato-meningée font partie des dispositifs physiques de protection. La barrière hémato-méningée règle le passage des cellules immunitaires et des protéines dans le SNC. Elle a pour fonction de protéger le système nerveux contre les invasions de micro-organismes pathogènes ou de toxines microbiennes. Elle se rend imperméable aux protéines par la présence de jonctions serrées ; cette imperméabilité est facilitée par la faiblesse du flux transcellulaire.

Le principal mécanisme de défense chimique est représenté par des molécules localement produites, dotées de propriétés anti-inflammatoire, comme le *transforming growth factor β* [TGF β], présent dans le LCR. Ce facteur exerce un chimiotactisme négatif sur les leucocytes désireux de pénétrer dans le SNC.

Les cellules immunitaires qui réussissent à vaincre ces différentes barrières sont éliminées par apoptose. Le signal apoptotique est convoyé par le récepteur CD95 et son ligand est produit constitutivement à la périphérie du SNC (Flugel *et al.*, 2000).

Le SNC est également surveillé par des macrophages professionnels associés au plexus choroïde, aux ventricules et aux leptoméninges (McMenamin, 1999). Les cellules microgliales périvasculaires jouent le rôle de sentinelle, grâce à leur fonction de phagocytose, d'endocytose et de régulation des mécanismes immuns. Ainsi, un réseau dense de cellules immunitaires contrôle tous les points d'entrée potentiels des cellules immunitaires et des agents pathogènes circulant dans le sang.

Les cellules microgliales ramifiées du parenchyme cérébral sont dans un état quiescent. Elles sont transformées en cellules immunocompétentes sous l'action d'un stimulus physiologique ou d'un stress. On les appelle alors cellules microgliales activées. Elles affectent une forme arrondie, elles prolifèrent, et elles acquièrent les fonctions dévolues aux macrophages. En effet, elles secrètent des cytokines, des facteurs inflammatoires et elles deviennent capables de phagocyter et de présenter l'Ag tout comme les cellules microgliales amiboïdes fœtales.

12311-L'activation des cellules microgliales ramifiées.

Les cellules microgliales ramifiées sont activées *in vitro* quand elles sont exposées à de différents agents pathogènes comme des virus, des bactéries Gram négatives ou Gram positives, des parasites ; elles le sont *in vivo* en cas de lésion cérébrale, de tumeur, de maladie neurodégénérative ou de maladie auto-immune. Dans toutes ces situations, les cellules microgliales ramifiées rétractent leurs ramifications, et reprennent la forme ronde qu'elles affectent quand elles sont immatures. Elles sont recrutées par un signal chimiotactique qui les fait migrer vers la zone où elles doivent éliminer les éléments pathogènes ou étrangers.

(1) Les activateurs des cellules microgliales en culture.

Le signal qui déclenche l'activation des cellules microgliales consécutivement à l'entrée d'une entité étrangère dans le SNC peut avoir 2 natures et 2 origines différentes.

Il peut provenir de l'agent pathogène et il est alors perçu par des récepteurs à large spectre de reconnaissance qui identifient un nombre d'agents très différents.

Il peut aussi être engendré par les cellules microgliales et astrogliales, activées par l'agent pathogène ou par la réaction inflammatoire commençante. Ces cellules, notamment les microgliales, secrètent des cytokines activatrices et les récepteurs des cytokines sont alors impliqués.

De toutes les cellules de la glie qui peuvent présenter les Ag, les meilleures présentatrices sont probablement les cellules microgliales, car elles expriment les molécules du CMH II ainsi que les molécules d'adhésion. Les astrocytes ne régulent positivement les molécules du CMH II qu'en de rares occasions, et n'expriment pas de molécules d'adhésion.

Les réponses de type Th1 sont favorisées par la production d'IL-12, celles de type Th2 par la production d'IL-4. Les cellules résidentes ne produisent pas d'IL-4. En revanche, la cellule microgliale activée produit de l'IL-12. Les astrocytes n'en produisent pas mais en inhibent la production par la cellule microgliale activée (Aloisi *et al*, 1997).

La cellule microgliale activée et les astrocytes agressés produisent des cytokines (IL-10, TGF- β) et des prostaglandines qui limitent l'installation d'une réponse Th1. Elle produit aussi de la MIP [*macrophage inhibitory protein*]-1 α , qui est plutôt un attracteur de Th1, tandis que les astrocytes secrètent de la MCP-1 qui serait plutôt un attracteur de Th2.

Le LPS est un glycolipide de la couche externe des bactéries Gram négatives (endotoxines). Il peut déclencher une série de réactions inflammatoires dans les cellules

microgliales. Il est utilisé expérimentalement pour les activer. Dans ces conditions ces dernières produisent des cytokines comme le $\text{TNF}\alpha$, de l'IL-1 β et de l'IL-6 (Nakamura *et al.*, 1999), des prostaglandines et des chimiokines comme MIP-1 α et RANTES (Minami *et al.*, 2000). En outre, le LPS active la NO synthase inductible [iNos], et par conséquent, il induit la production de NO (Nakamura *et al.*, 1999).

Le LPS appartient au groupe des stimulateurs conventionnels, mais il existe des stimulateurs propres à certains états pathologiques. ainsi en est-il de peptide β -amyloïde, de la protéine du prion, des protéines du virus HIV et de certaines molécules endogènes qui ont un effet propre ou qui accentue l'effet d'autres molécules dont le LPS (Tableau 1.3).

(2) Les inhibiteurs de l'activation des cellules microgliales.

L'activation des cellules microgliales est régulée par des facteurs physiques comme la propagation de potentiels électriques le long des axones, ou par des facteurs chimiques comme les neuromédiateurs. L'effet des différentes molécules qui activent les cellules microgliales — LPS et $\text{INF}\gamma$, par exemple — est contrecarré par les facteurs de croissance comme le NGF, le BDNF ou la NT-3 qui diminuent l'expression du CMH II induit par l' $\text{INF}\gamma$ (Neumann *et al.*, 1998). Les prostaglandines inhibent la production de $\text{TNF}\alpha$ et d'IL-1 β induit par le LPS (Koppal *et al.*, 2000). Les stéroïdes comme la dexaméthasone ont un effet désactivateur sur les cellules microgliales. Cette molécule diminue la production de NO (Minghetti *et al.*, 1999). Les médiateurs neuronaux désactivent les cellules microgliales. Ainsi, les agonistes β adrénergiques ou le glutamate diminuent la sécrétion de protéines pro-inflammatoires ou l'expression du CMH II (McCluskey et Lampson, 2001). Les astrocytes régulent eux aussi l'activité des cellules microgliales ramifiées. Ils bloquent l'expression de l'iNOS et la sécrétion d'IL-12 induites par le LPS (Aloisi *et al.*, 1997 ; Vincent *et al.*, 1997). Le $\text{TGF}\beta$ sécrété par ces cellules serait responsable de cet effet (Vincent *et al.*, 1997). Les contacts cellulaires semblent aussi jouer un rôle dans l'activation des cellules microgliales (Hoek *et al.*, 2000). Ainsi, le CD200 exprimé par les neurones et les cellules endothéliales permet de tempérer cette activation en interagissant avec un récepteur qui lui est spécifique et se trouve exprimé par les cellules myéloïdes. Les cellules microgliales des souris

TABLEAU 1.3
Activateurs conventionnels et endogènes des cellules microgliales ramifiées en culture.

Activateurs	Effet ou production	Références
LPS	TNF α , IL-1 β , IL-6, iNos/NO, MIP-1 α , BDNF, NGF.	Nakamura <i>et al.</i> , 1999 ; Neumann <i>et al.</i> , 1998.
IFN γ	\uparrow^a expression du CD40, \uparrow production de NO et de TNF α induite par le LPS, et d'O $_2^-$ induite par le PMA.	Tan <i>et al.</i> , 1999.
LPS/INF γ	Apoptose des cellules microgliales convoyée par l'interaction Fas/FasL.	Badie <i>et al.</i> 2000.
PMA	Apoptose des cellules	Lee <i>et al.</i> , 2001.
ATP	microgliales ; O $_2^-$. iNOs/NO, TNF α , IL-1 β , IL-6.	Hide <i>et al.</i> , 2000 ; Sanz <i>et al.</i> , 2000.
Ganglioside	NO, TNF α , COX2 ^b .	Pyo <i>et al.</i> , 1999.
Thrombine	NO, TNF α , IL-6, IL-12, mobilisation des ions calcium, prolifération.	Moller <i>et al.</i> , 2000 ; Ryu <i>et al.</i> , 2000.
Albumine	\uparrow production du O $_2^-$ induite par le PMA.	Si <i>et al.</i> , 2000.
Ions manganoux	\uparrow iNOs/NO induite par le LPS.	Chang <i>et al.</i> , 1999.
Ions potassium (fortes concentrations)	\uparrow production de NO et de TNF α induite par le LPS.	Chang <i>et al.</i> , 2000.
GM-CSF	\uparrow de la prolifération.	Liva <i>et al.</i> , 1999.
Endothéline	\uparrow de la concentration des ions calcium intracellulaires.	McLarnon <i>et al.</i> , 1999.
<i>Platelet-activating factor</i>	Idem	Wang <i>et al.</i> , 1999

^a \uparrow : augmente.

^b COX2 : cyclo-oxygénase inductible.

déficientes en CD200 ont moins de ramifications et les immunomarquages montrent une expression accrue du CR3 et du CD45. En outre, ces cellules microgliales répondent plus rapidement à une lésion que les cellules témoins.

12312-Récepteurs des cellules microgliales impliqués dans la phagocytose des éléments pathogènes.

Les cellules microgliales et les macrophages reconnaissent de nombreux agents pathogènes. Elles possèdent des récepteurs capables d'identifier des structures moléculaires conservées des éléments pathogènes, comme les LPS des bactéries Gram négatives, le peptidoglycane des parois des bactéries à Gram positives et les mannanes des parois des Champignons et des Levures. On appelle ces éléments activateurs universels ou PAMP [pour *pathogen-associated molecular pattern*], et les récepteurs qui les identifient, récepteurs à large spectre de reconnaissance. On compte au nombre de ces récepteurs le récepteur du mannose, le récepteur des β -glucannes, les SR-A, le récepteur du LPS (ou CD14) et le CR3. Dans ce qui suit, nous ne nous intéresserons qu'aux récepteurs pertinents à notre modèle d'étude.

(1) Les récepteurs ne faisant pas intervenir les opsonines.

(11) Le récepteur du mannose.

Le récepteur du mannose ou CD206 (MM : 180 kD) comprend 5 domaines qui de l'extrémité aminoterminal extracellulaire à l'extrémité carboxyterminale intracellulaire sont les suivants. (a) Un domaine riche en Cys ; (b) un domaine présentant des homologies de structures avec la séquence répétée de type II de la fibronectine ; (c) une succession de 8 domaines identiques au domaine de reconnaissance des sucres des lectines de type C [CTLD] ; (d) le domaine transmembranaire ; et (e) la queue intracytoplasmique.

La Souris est l'animal le plus fréquemment utilisé pour l'étude du récepteur du mannose. L'expression de ce dernier y est limitée aux cellules microgliales périvasculaires et aux macrophages professionnels du plexus choroïde, des ventricules et des leptoméninges. Les cellules microgliales ramifiées du parenchyme cérébral ne l'expriment pas (Linehan *et al.*, 1999).

L'IL-4, IL-13 et IL-10 augmentent l'expression du récepteur du mannose par les macrophages péritonéaux (Stein *et al.*, 1992 ; Doyle *et al.*, 1994 ; Martinez-Pomares *et al.*, 2003). Les anti-inflammatoires, comme la dexaméthasone, l'augmentent (Pontow *et al.*, 1992), tandis que d'autres substances comme l'INF γ la diminue (Harris *et al.*, 1992). La liaison d'IgG au Fc γ R peut également la réguler (Schreiber *et al.*, 1991)

Le récepteur du mannose est impliqué dans l'endocytose de la peroxydase de raifort (Stahl *et al.*, 1978), des enzymes lysosomiques (Shepherd et Hoidal, 1990) et des glycoprotéines hautement mannosylées. Le récepteur du mannose reconnaît aussi un large spectre de micro-organismes grâce à son domaine CTLD. Parmi les agents pathogènes reconnus, on note *C. albicans* (Marodi *et al.*, 1991), *Pneumocystis carinii* (= *P. jirovecii*) (O'Riordan *et al.*, 1995) et le HIV (Nguyen *et al.*, 2003). Cette reconnaissance est souvent suivie de l'ingestion.

Le récepteur du mannose joue un rôle dans l'activation cellulaire, malgré l'absence de messagers secondaires du côté intracytoplasmique. Un Ac dirigé contre lui induit une inhibition de la production d'IL-12 après action d'une endotoxine (Nigou *et al.*, 2001). Le récepteur du mannose active NF- κ B en réponse à *P. carinii* (= *jirovecii*) mais pas en réponse au LPS (Zhang *et al.*, 2004). Ces résultats indiquent que des ligands endogènes reconnaissent ce récepteur lors de certains types de phagocytose.

(12) Le récepteur des β -glucannes.

Les récepteurs des β -glucannes ont été identifiés pour la première fois lors de l'étude de la phagocytose de zymosan — non opsonisé — par des monocytes humains (Czop, 1985). Ces récepteurs sont aussi exprimés par de nombreuses cellules immunitaires, comme les macrophages, les neutrophiles, les éosinophiles et par des cellules non immunitaires comme les cellules endothéliales et cellules épithéliales alvéolaires. En fait, de nombreux récepteurs sont capables d'identifier les β -glucannes *in vitro* ; ainsi en est-il du CR3, du lactosylcéramide, des SR et de la dectine-1. Ce dernier est le seul à pouvoir identifier les β -glucannes *in vivo*.

Le récepteur dectine-1 (MM : 28 kD) possède un motif ITAM [pour *immunoreceptor tyrosin-based activation motif*] du côté intracytoplasmique. Ce motif active des tyrosines kinases. Il possède un domaine transmembranaire, un domaine CTLD avec 2 sites de glycosylation (Ariizumi *et al.*, 2000). Il reconnaît la chaîne principale des β -D-glucannes de la paroi de *Saccharomyces cerevisiae*. Cette chaîne est constituée de résidus de glucose reliés entre eux par des liaisons β 1 \rightarrow 3, sur laquelle sont greffées des chaînes latérales

par des liaisons $\beta 1 \rightarrow 6$; il existe dans cette paroi un autre type de glucannes dont la chaîne principale est formée par des résidus de glucose reliés entre eux par des liaisons $\beta 1 \rightarrow 6$ et sur laquelle se greffent des chaînes latérales par des liaisons $\beta 1 \rightarrow 3$ ou $\beta 3 \rightarrow 6$. Les particules de zymosan activent la voie alterne du complément. En absence d'opsonines, la phagocytose du zymosan par les monocytes est bloquée par la laminarine, dont la structure est similaire à celle des β -D-glucannes entrant dans sa constitution (Czop et Austen, 1985). Le récepteur des β -glucannes est sensible à la trypsine.

La phagocytose de zymosan par les macrophages est également bloquée en présence d'un Ac dirigé contre le récepteur dectine-1 et elle n'est pas affectée par la présence d'un Ac dirigé contre le CD11b (Brown *et al.*, 2002). Ces faits montrent que la dectine-1 est le récepteur principal des β -glucannes. Le récepteur dectine-1 reconnaît des ligands endogènes par un site différent de celui qui reconnaît les β -glucannes (Brown *et al.*, 2002).

(2) Les récepteurs faisant intervenir les opsonines.

(21) Les récepteurs du complément.

Les protéines du système du complément sont au nombre de 35 environ ; la plupart sont solubles dans le plasma sanguin ou sont associées aux membranes cellulaires. Par le rôle qu'elles jouent, on peut distinguer 3 groupes de protéines intervenant dans la cascade du système du complément : (a) les protéines participant à l'activation du complément ; (b) les protéines participant aux régulations de la cascade ; et (c) les récepteurs des éléments du système du complément.

Les protéines du premier et du deuxième groupe circulent dans le courant sanguin sous une forme non activée. L'activation du système est une réaction de défense dont l'élément essentiel est le composant C3. C3 appartient à la famille de l' $\alpha 2$ -macroglobuline [$\alpha 2$ M]. Le fragment C3 (et aussi les fragments C4 et C5) contient un groupe thio-ester, qui lui confère une réactivité exceptionnelle. Lors d'une protéolyse partielle ou d'un changement de conformation, le thio-ester devient accessible aux protéines nucléophiles ; il est responsable de la fixation covalente de ces protéines sur des membranes ou sur d'autres protéines. Une telle propriété permet l'opsonisation d'éléments figurés par des fragments (C3 essentiellement) du système du complément.

L'activation des protéines du système du complément se fait en une cascade au cours de laquelle chaque composant acquiert des propriétés enzymatiques qui lui permettent d'activer le composant situé immédiatement en aval de la chaîne de réaction. Le système du complément peut être activé de 3 manières différentes (Figure 1.3).

La voie classique d'activation fait intervenir des IgM et certaines sous-classes d'IgG qui se fixent à la surface des micro-organismes ; elle peut être déclenchée par la liaison directe du composant C1q (la première protéine recrutée dans la cascade du complément) à la surface de l'agent pathogène. Cette voie est aussi empruntée lors des réponses immunitaires adaptatives par la liaison du composant C1q aux complexes Ac-Ag.

La voie des lectines fait intervenir la MBL qui se fixe sur des polysaccharides spécifiques de la surface des micro-organismes. Dans ces 2 voies, la C3 convertase est formée à partir des molécules C4b et C2b fixées à la membrane. Les composants C4 et C2 ont été au préalable clivés par le complexe C1 de la voie classique ou par le complexe MBL de la voie des lectines.

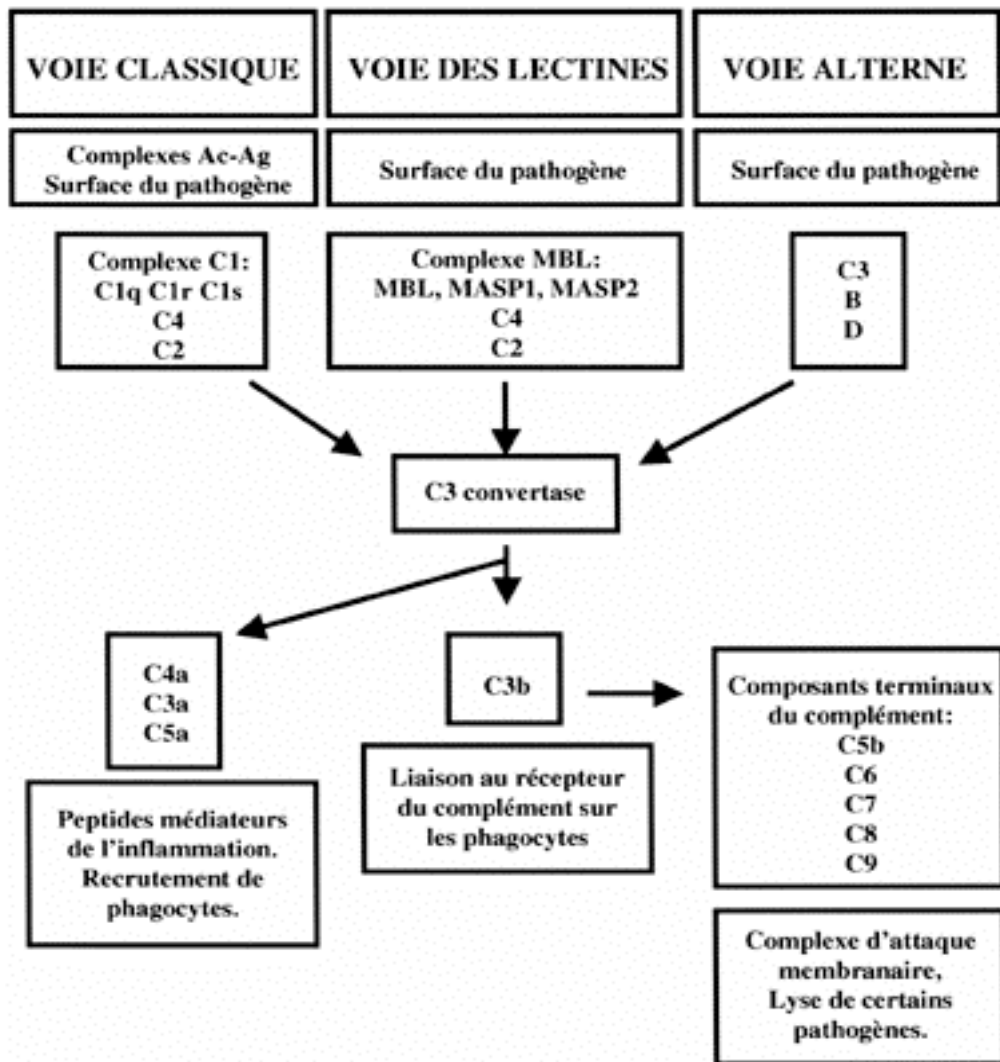
La voie alterne du complément est déclenchée par des composants qui s'activent spontanément à la surface des agents infectieux. La protéine C3 possède la particularité de se cliver spontanément et d'engendrer le facteur C3b qui se lie au facteur B. Dans la voie alterne, la C3 convertase est formée par le fragment C3b complexés au fragment Bb. Ce dernier est issu du clivage du facteur B par une protéase plasmatique, le facteur D. Les C3 convertases clivant le composant C3 en fragments C3b et C3a, la voie alterne peut servir de boucle d'amplification à toutes les voies.

Le fragment C3b est le principal effecteur de la cascade du complément. Il agit en opsonine en se liant de façon covalente à l'agent pathogène, afin de le cibler pour une destruction par les phagocytes exprimant le récepteur du C3b. Le fragment C3a est un médiateur de l'inflammation.

Le fragment C3b peut se lier à la C3 convertase afin de former une C5 convertase, engendrant à partir du composant C5, (a) le fragment C5a, le plus important médiateur de l'inflammation et (b) le fragment C5b qui déclenche les événements tardifs de l'activation du complément. Ces événements tardifs correspondent à une séquence de réactions de polymérisation dans laquelle les composants terminaux du complément interagissent afin de former le complexe d'attaque membranaire (C5b, C6, C7, C8 et C9). Ce complexe est capable de créer des pores dans la membrane de certains agents pathogènes ; la formation de ces pores conduit à la mort cellulaire.

FIGURE 1.3

Les 3 voies d'activation du système du complément et les facteurs impliqués.



Les phagocytes possèdent également les récepteurs du complément CD35 (CR1), CD11b/CD18 (CR3, Mac1, α M β 2), CD11c/CD18 (CR4). CR3 et CR4 sont des intégrines de la famille β 2 intervenant aussi dans les phénomènes de migration leucocytaires (Diamond *et al.*, 1993). Les récepteurs du fragment C3b pour le premier et du fragment C3bi pour les 2 autres facilitent grandement la capture et l'ingestion des Ag revêtus d'IgG et de C3 (Tableau 1.4).

TABLEAU 1.4**Les récepteurs du complément, leurs spécificités, fonctions et distributions dans différents types cellulaires.**

Récepteur	Spécificité	Fonction	Types cellulaires
CR1	C3b, C4b, C3bi	Dégradation de C3b et de C4b. Stimulation de la phagocytose. Transport des complexes immuns par les érythrocytes.	Erythrocytes, phagocytes, lymphocytes B, cellules dendritiques.
CR2	C3b, C3bi	Corécepteur des lymphocytes B.	Lymphocytes B, cellules dendritiques.
CR3	C3bi	Stimulation de la phagocytose.	Phagocytes, lymphocytes B, cellules dendritiques.
CR4	C3bi	Stimulation de la phagocytose.	Phagocytes, lymphocytes B, cellules dendritiques.

Le CR3 est composé d'une chaîne β (CD18) associée d'une manière non covalente à une chaîne α (CD11b). Il est exprimé principalement par les phagocytes mononucléés, par les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles et par les lymphocytes *natural killers* [NK]. Le CR4 est plus fortement exprimé que le CR3 par les macrophages (Myones *et al.*, 1988).

Le CR3 reconnaît une grande diversité de ligands endogènes et exogènes. On compte parmi ces ligands le facteur X de coagulation, les ICAM-1 et 2, le LPS (Wright *et al.*, 1989). La liaison entre le CR3 et le LPS induit l'activation de NF- κ B (Medvedev *et al.*, 1998). Cette liaison implique le domaine lectine — situé à l'extrémité carboxyterminale de la sous-unité α du récepteur. La reconnaissance des agents pathogènes par le système immunitaire, et l'élaboration du signal d'activation primitif impliquerait donc le CR3.

(22) Les récepteurs du fragment cristallisable.

Les phagocytes expriment des FcR de certaines classes ou sous-classes d'Ig. On peut les distribuer en 2 grands groupes : le premier est constitué essentiellement des Fc γ R. Il existe 3 sous-groupes de ces récepteurs cellulaires, qui sont, par ordre d'affinité décroissante : Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) et Fc γ RIII (CD16). Les Fc γ R ne fixent pas toutes les sous-classes d'IgG. (a) Les récepteurs Fc γ RI sont présents sur les macrophages. Ils permettent de

fixer les micro-organismes recouverts d'IgG et de les phagocyter. (b) Les récepteurs Fc γ RII sont notamment exprimés par les macrophages et par les polynucléaires neutrophiles ; les Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIIA, Fc γ RIIIB et Fc α RI [FcR des IgA] sont des récepteurs à faible affinité et leur activation nécessite un complexe immunitaire multivalent (Raghavan et Bjorkman, 1996). La classe des Fc γ R contient des récepteurs activateurs et des récepteurs inhibiteurs qui constituent ainsi un équilibre entre l'activation et inhibition de l'activation des cellules. (c) Les Fc γ RIII sont présents à la surface des macrophages, des polynucléaires neutrophiles, des cellules NK et de certains lymphocytes T.

Le deuxième groupe de FcR est constitué des FcR des IgE [Fc ϵ R]. On en distingue 2 types : les Fc ϵ RI et les Fc ϵ RII. Les Fc ϵ RI sont des récepteurs de haute affinité, exprimés par les mastocytes et par les polynucléaires basophiles.

La liaison des FcR aux Ig peut déclencher la phagocytose du complexe ainsi qu'une libération de cytokines et de médiateurs de l'inflammation. On note que les Fc γ RIIB sont les seuls des FcR à induire une inhibition au lieu d'une activation des cellules (Daëron, 1997). Les FcR sont constitués de 3 chaînes : α , β et γ . Seule la chaîne α est impliquée dans la reconnaissance spécifique des ligands ; les 2 autres chaînes jouent un rôle dans la signalisation intracellulaire. La chaîne γ des FcR possède un motif ITAM responsable de la signalisation intracellulaire et par suite de l'activation des cellules. Les récepteurs Fc inhibiteurs possèdent le motif ITIM [*immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif*] qui est phosphorylé par une tyrosine kinase (Muta *et al.*, 1994). Les FcR interagissent avec la partie Fc des Ac d'une manière asymétrique. Les sucres attachés aux sites de glycosylation conservés de la partie Fc des Ac sont nécessaires à cette interaction (Jefferis *et al.*, 1998).

12313-Migration des cellules microgliales et élimination des éléments pathogènes.

Les cellules microgliales possèdent des récepteurs des chimiokines comme le CCR-3, le CCR-5 (Albright *et al.*, 1998) et le CXCR-4 (Vallat *et al.*, 1998) exprimés *in vivo*. En outre l'expression d'autres récepteurs comme le CXCR-1 a été mise en évidence *in vitro* (Jiang *et al.*, 1998). Dans certaines maladies neurodégénératives comme la sclérose en plaque, certains de ces récepteurs sont surexprimés (Simpson *et al.*, 2000). Les chimiokines qui les reconnaissent peuvent être libérées par les cellules microgliales consécutivement à une inflammation induite par une infection ou par une maladie neurodégénérative (Glabinski et

Ransohoff, 1999). Ces molécules peuvent jouer un rôle dans la migration des cellules microgliales.

Les cellules microgliales sont activées consécutivement à l'inflammation. Elles migrent vers les sites sièges de la réaction inflammatoire et y procèdent à l'élimination des éléments pathogènes. L'activation des cellules microgliales les transforme en phagocytes professionnels, capables d'éliminer les agents pathogènes par phagocytose. La cellule microgliale activée surexprime les récepteurs impliqués dans l'opsonophagocytose et notamment dans celle qui est convoyée par le CR3 (Bohatschek *et al.*, 2001) ou par les FcγRI, II et III (Ulvestad *et al.*, 1994). Cette surexpression permet d'éliminer un très large spectre d'agents pathogènes ou d'éléments figurés, comme les bactéries, du zymosan, des débris cellulaires, des corps apoptotiques et des billes de latex.

Dans le modèle d'étude que nous utilisons dans ce travail, nous étudions l'interaction entre des levures opsonisées par des peptides amyloïdes et des cellules microgliales en culture. Les levures opsonisées par le peptide amyloïde (Aβ1-40 ou Aβ1-42) miment les PS présentes dans les cerveaux des patients atteints de MA.

Nous exposons dans la SECTION suivante quelques aspects importants de cette maladie, aspects qui permettront au lecteur de mieux comprendre les objectifs de notre travail.

13-La maladie d'Alzheimer.

131-Introduction.

1311-Histoire de la maladie

C'est en 1907, avec la publication du compte-rendu de la trente-septième conférence des psychiatres allemands tenue un an plutôt à Tübingen, qu'est décrite pour la première fois, par Alois (sic) Alzheimer, un type particulier de démence humaine, qui porte aujourd'hui le nom de cet auteur. L'article est intitulé "A propos d'une curieuse maladie du cortex cérébral". Les observations du médecin commencent à l'asile d'aliénés et d'épileptiques de Francfort-sur-le-main. Augusta D. y est admise le 25 novembre 1901. C'est la femme d'un employé des

chemins de fer allemands. Elle est âgée de 51 ans. et souffre de comportements imprévisibles, d'une perte de sens de l'orientation, de paranoïa, d'hallucinations auditives et d'un délabrement psychosocial avancé. Depuis cette date, on avait pris l'habitude d'utiliser le terme de MA pour définir une démence pré-sénile, apparaissant avant 65 ans, et confirmée à l'autopsie par le présence de lésions histologiques caractéristiques, les PS, et les DNF (Figure 1.4). En réalité, la MA apparaît aujourd'hui chez des sujets plus âgés.

L'évolution socio-démographique des pays industrialisés explique que cette affection frappe à l'heure actuelle une population de plus en plus importante. La tendance va aller s'accroissant dans les décennies à venir. En un peu plus d'un siècle, en effet, l'espérance de vie est passée de 40 à 75 ans. Et l'on compte de nos jours 1 dément sur 20 sujets, à l'âge de la retraite, et 4 fois plus 20 ans plus tard.

Le vieillissement de la population fait donc que cette affection a un avenir redoutable, et justifie qu'on l'appelle "l'épidémie silencieuse", la "maladie n°1 de l'an 2000", ou encore la "peste noire du vingtième siècle".

1312-Evolution de la maladie.

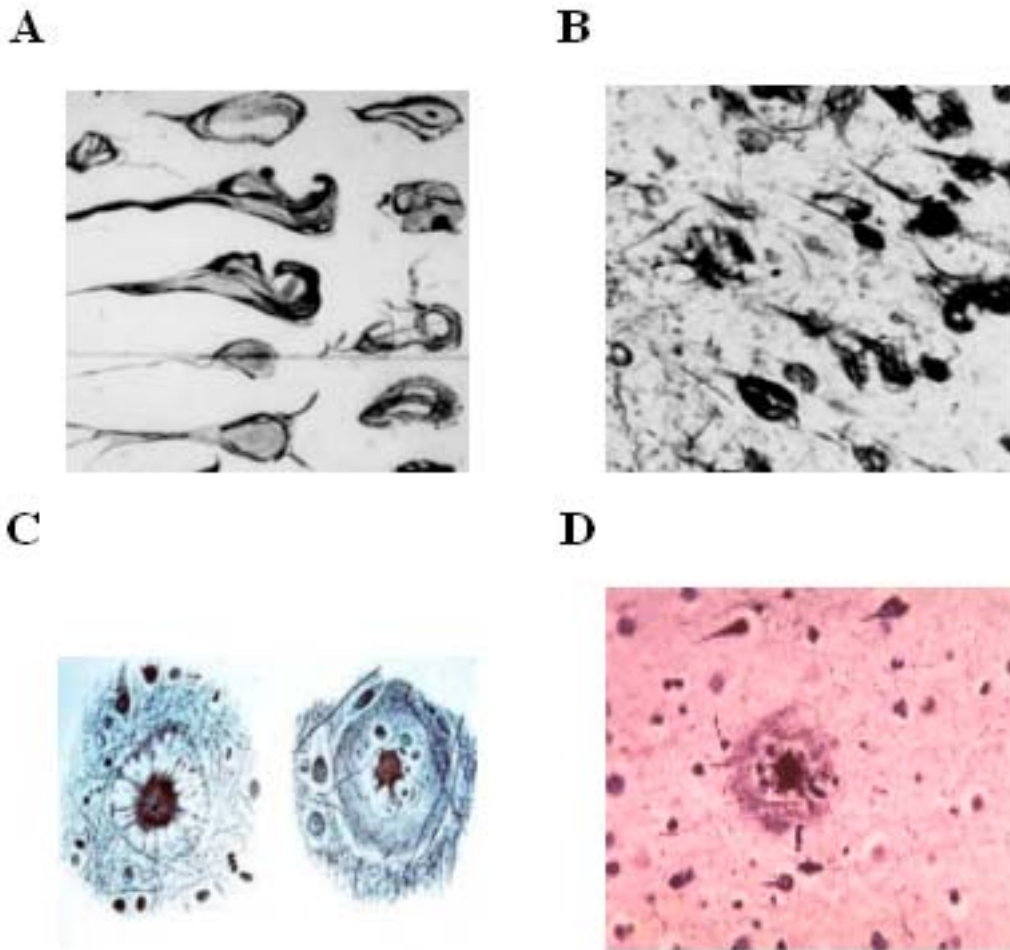
La maladie commence par une phase asymptomatique qui peut durer plus de 20 ans. Puis les lésions apparaissent dans le lobe temporal, en une région impliquée dans la mémoire. Elles s'étendent ensuite vers les lobes frontaux, temporaux, pariétaux et occipitaux aux régions responsables de fonctions dites supérieures : raisonnement, langage, réalisations des gestes, identification visuelle.

Le début de la maladie est insidieux et progressif ; il est marqué par l'apparition d'une perte de la mémoire des faits récents, qui va avoir un retentissement sur la vie familiale. Le malade perd l'initiative, présente des troubles du langage, ne sait plus s'habiller correctement tout seul, présente une perte de poids.

Après quelques années, la maladie se complique de troubles cognitifs profonds : la mémoire ancienne commence à être atteinte ; la désorientation temporo-spatiale s'accroît ; le malade présente des troubles du comportement, de l'agitation, une inversion du sens du jour et de la nuit, des troubles psychiques (délires, hallucinations, dépression, modification de l'humeur sans raison apparente). Par la suite, apparaissent une altération du langage (aphasie), des troubles des gestes (apraxie), des difficultés à utiliser des objets de maniement plus ou moins complexes (appareils électroménagers, téléphone), la difficulté dépendant de l'évolution de la maladie.

FIGURE 1.4.

Lésions neuropathologiques pathognomoniques de la maladie d'Alzheimer. (A) Dessins originaux d'Alzheimer mettant en évidence la présence de lésions (obscurcissement) intracellulaires (enchevêtrements). (B) Enchevêtrements neurofibrillaires mis en évidence au moyen de techniques modernes de coloration et d'observation. (C) Dessins originaux d'Alzheimer mettant en évidence la présence dans le cortex de corps circulaires à allure fibrillaire et possédant un centre dense, les plaques séniles. (D) Aspect d'une plaque amyloïde sénile colorée au rouge Congo. La cœur dense de la plaque et sa périphérie sont constitués essentiellement de peptides A β 42 insolubles.



Tous ces troubles ont un retentissement sur la vie active et conduisent à une perte d'autonomie et à une dépendance vis-à-vis de l'entourage familial. Le patient perd tout contact avec le réel et finit par ne plus reconnaître ses proches ; ses facultés intellectuelles tendent à disparaître. Le patient devient incontinent et son placement en institution s'impose.

Plusieurs facteurs de risques interviennent dans le déterminisme de la maladie. Il en existe 2 dont le rôle est certain : (a) l'âge et (b) la forme allélique de l'apolipoprotéine E [ApoE]. D'autres ont un rôle probable : il s'agit (a) du sexe ; (b) du niveau d'études ; (c) du

maintien de la vie active et (d) de l'état vasculaire. Enfin, il existe des facteurs de risque possibles ou putatifs. Parmi eux, on note (a) l'existence d'un état dépressif ; (b) l'alimentation ; (c) la consommation d'alcool ; (d) le taux d'aluminium dans l'eau de boissons ; (e) les estrogènes ; (f) les anti-inflammatoires ; (g) l'environnement social ou encore (h) la taille de la tête (Dartigues *et al.*, 2002).

Diverses hypothèses sont envisagées pour expliquer l'origine de la MA : l'hypothèse neurochimique, qui doit rendre compte des anomalies spécifiques des systèmes des neurotransmetteurs et en particulier le système cholinergique ; l'hypothèse génétique qui repose sur l'existence de formes familiales de la MA ; l'hypothèse virale, soulevée par l'analogie de la MA avec la maladie de Kreutzfeldt-Jakob — la MA serait due à un agent infectieux ; l'hypothèse immunologique fondée sur l'existence d'une lymphopénie associée et d'auto-Ac chez les sujets atteints de MA ; l'hypothèse vasculaire et métabolique qui impute aux troubles de la circulation sanguine les lésions observées chez les malades ; l'hypothèse toxique qui incrimine l'aluminium car le taux d'aluminium est effectivement augmenté dans le cerveau des patients atteints ; l'hypothèse des radicaux libres qui attribue la MA à des anomalies du métabolisme des dérivés de l'oxygène et des radicaux libres susceptibles d'entraîner un vieillissement accéléré du cortex associé aux modifications histopathologiques de la maladie.

Les traitements actuels de la MA sont dits symptomatiques. Ils améliorent les fonctions cognitives et les activités quotidiennes, et donc la qualité de vie. Ces traitements ne permettent pas aux patients de récupérer une autonomie totale, mais retardent le placement en institution. Il est donc très important de commencer à traiter les malades le plus tôt possible. Les thérapeutiques actuelles visent à inhiber une enzyme qui dégrade l'acétylcholine, neuromédiateur impliqué dans la transmission synaptique et qui intervient dans les processus de mémoire et de cognition.

13121-Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer.

La nature neurodégénérative de la MA se traduit par des lésions histopathologiques bien précises qui sont les PS et les DNF (Figure 1.5). Une troisième lésion caractéristique est l'atrophie corticale.

(1) L'atrophie corticale.

Chez les patients atteints de MA, le cerveau peut perdre de 8 % à 10 % de son poids tous les 10 ans, alors que chez les sujets sains cette perte n'est que de 2 %. L'atrophie corticale s'accompagne d'une dilatation des ventricules cérébraux et des sillons corticaux ainsi que d'une perte neuronale affectant particulièrement le système cholinergique (noyau basal de Meynert, septum, cortex entorhinal, amygdale et hippocampe).

(2) Les dépôts amyloïdes.

Il existe 2 types de dépôts amyloïdes extracellulaires. Les premiers sont localisés au centre des PS et les autres entourent la paroi des vaisseaux pour former l'angiopathie amyloïde.

(21) La substance amyloïde.

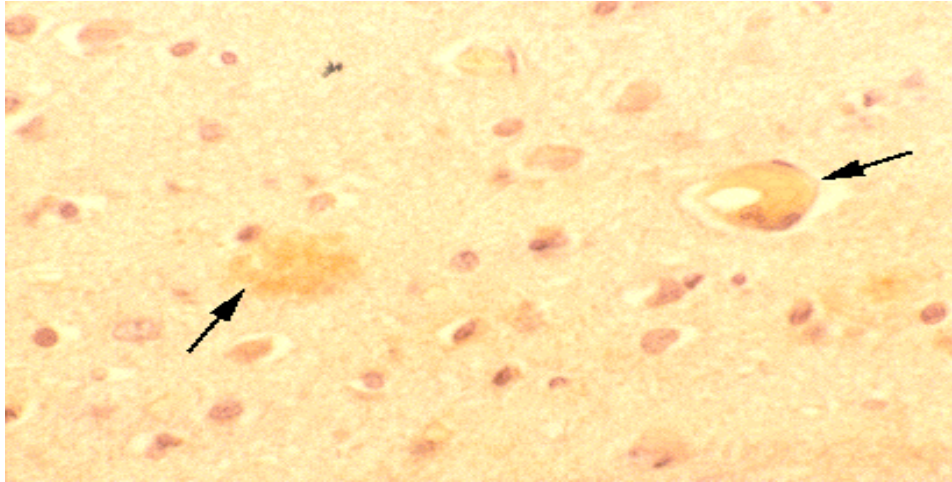
Il existe quelques 23 protéines amyloïdes différentes ; elles sont toutes élaborées par l'organisme. En temps normal, ces protéines sont solubles, mais il leur arrive parfois de se lier à d'autres substances pour former des fibres microscopiques toxiques. Ces fibres s'accumulent anormalement en dépôts qui forment une masse solide, nuisent au fonctionnement de divers tissus et organes et détruisent les cellules sur lesquelles ils se fixent. Il en résulte des troubles organiques graves, le plus souvent mortels.

La substance amyloïde est de nature protéique, mais elle possède des propriétés particulières. Elle a une affinité intense pour le rouge Congo, qui, en s'y liant fait apparaître une biréfringence en lumière polarisée, avec dichroïsme vert-jaune. Certaines thioflavines peuvent aussi se lier aux dépôts amyloïdes et voient alors leur spectre de fluorescence se modifier (Figure 1.6). Depuis ces observations, on sait que ces particularités tinctoriales sont dues à la structure en feuillet β -plissé des substances amyloïdes, comme l'ont amplement démontré les études ultérieures de diffraction des rayons X par ces formations. La conformation normale d'une substance amyloïdogène est l'hélice α dont la conversion en feuillet β engendre une substance amyloïde.

FIGURE 1.5.

Coupe de cortex humain marqué par immunocytochimie avec un anticorps anti-peptide A β .

Dépôt diffus (flèche de gauche) et dépôt vasculaires (flèche de droite). [D'après site internet Alzheimer-Montpellier].



(211) Les plaques séniles.

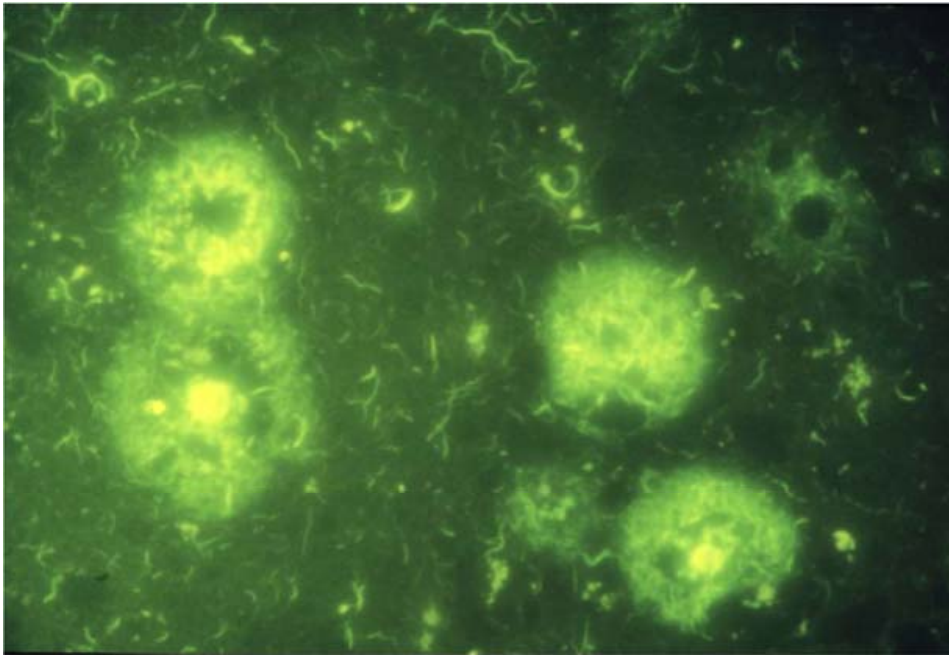
Les PS sont des dépôts extracellulaires affectant une forme sphérique, et ayant de 10 à 20 μm de diamètre. Ils sont entourés ou non de prolongements neuritiques en voie de dégénérescence, de cellules microgliales et d'astrocytes. Les PS envahissent l'hippocampe et tout le cortex cérébral. La grande variation de leur distribution d'un individu à l'autre ne permet pas d'établir une cinétique spécifique d'apparition des dépôts amyloïdes au cours de la MA (Braak et Braak, 1991).

Plusieurs types de PS ont été décrits : (a) **La plaque diffuse** a un aspect chevelu. Le dépôt volumineux qui la constitue est peu congophile et ses contours sont assez irréguliers. (b) **La plaque primitive** présente un centre amorphe irrégulièrement arrondi et modérément congophile. Une zone peu colorable l'entoure. L'ensemble est bordé par quelques cellules microgliales et par des astrocytes. (c) **La plaque mature** ou plaque neuritique se présente comme une plaque primitive avec un dépôt amyloïde fortement congophile. Les cellules microgliales entourant le dépôt sont plus nombreuses et présentent les caractéristiques de cellules activées. Les prolongements cellulaires pathologiques qui sont visibles à la périphérie de la plaque mature sont des axones et des dendrites (Schmidt *et al.*, 1991) ; ce sont ces caractéristiques qui ont valu le terme de plaque neuritique à la plaque mature. (d) **La plaque**

éteinte se présente comme un dépôt complètement coloré au rouge Congo, et dépourvu d'anomalie périphérique

FIGURE 1.6.

Aspect des plaques séniles après coloration à la thioflavine [D'après site internet : www.alzheimer-adna.com].



(212) L'angiopathie amyloïde.

Les angiopathies amyloïdes cérébrales se caractérisent par la formation de dépôts amyloïdes dans les parois des vaisseaux cérébraux (Figure 1.7). Leur présentation est variable et va de la présence de dépôts amyloïdes asymptomatiques dans la paroi de vaisseaux cérébraux normaux, à une atteinte sévère de la paroi artérielle (Vonsattel *et al.*, 1991), associée alors à des hémorragies cérébrales, à des infarctus cérébraux, à des leuco-encéphalopathies, avec ou sans démence.

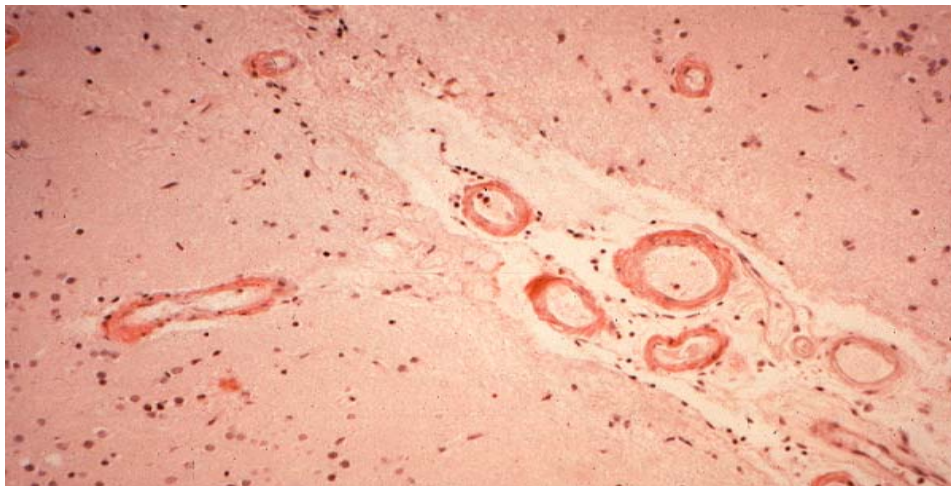
L'amyloïdose vasculaire atteint les artères corticales de petit calibre, dont le diamètre, par conséquent, ne dépasse pas les 50 à 150 μm . L'infiltration amyloïde siège dans la *media* artérielle mais l'ensemble de la paroi vasculaire peut être intéressé par ce dépôt. Deux types d'angiopathie amyloïde cérébrale ont été décrits. (a) **L'angiopathie dyshorique**

consiste en un dépôt pariétal et périvasculaire avec une infiltration de substance amyloïde dans le neuropile. Elle semble être associée aux dépôts des PS. (b) **L'angiopathie congophile** se présente sous la forme d'une infiltration pariétale aux contours limités, sans expansion dans le parenchyme.

(213) Ultrastructure de la plaque sénile.

La PS est constitué d'un dépôt focal de peptide $A\beta$, localisé en son cœur, et d'une couronne de prolongements chargés en protéines tau [pour *tubule associated unit*] et d'autres inclusions protéiques. La topographie des dépôts de peptide $A\beta$ et celle de dégénérescence neurofibrillaire sont différentes. Les dépôts amyloïdes intéressent, dès les stades les plus précoces de la maladie, la plupart des aires du cortex cérébral, y compris celles qui sont dépourvues de pathologie neurofibrillaire. Dans des cas de trisomie 12 où le décès est survenu à un âge précoce, des dépôts de peptide $A\beta$ ont été observés, avant apparition de toute dégénérescence neurofibrillaire. Cette observation est un argument de poids en faveur de l'hypothèse de la "cascade amyloïde", selon laquelle l'accumulation de peptide amyloïde provoquerait la dégénérescence neurofibrillaire et une perte neuronale (Hardy et Higgins, 1992). Mais cette hypothèse ne tient pas compte d'une autre constatation : dans la population générale, la pathologie fibrillaire précède la formation des dépôts de peptide $A\beta$ (Duyckaerts et Hauw, 1997).

FIGURE 1.7.
Angiopathie amyloïde après coloration au Rouge Congo.



Du fait de l'insolubilité de la plaque, l'examen de la structure amyloïde a porté sur des fibres amyloïdes formés *in vitro* à partir de peptide synthétique homologue au peptide β -amyloïde. Ces fibres reconstituées ont une immunoréactivité identique aux fibres formées *in situ*.

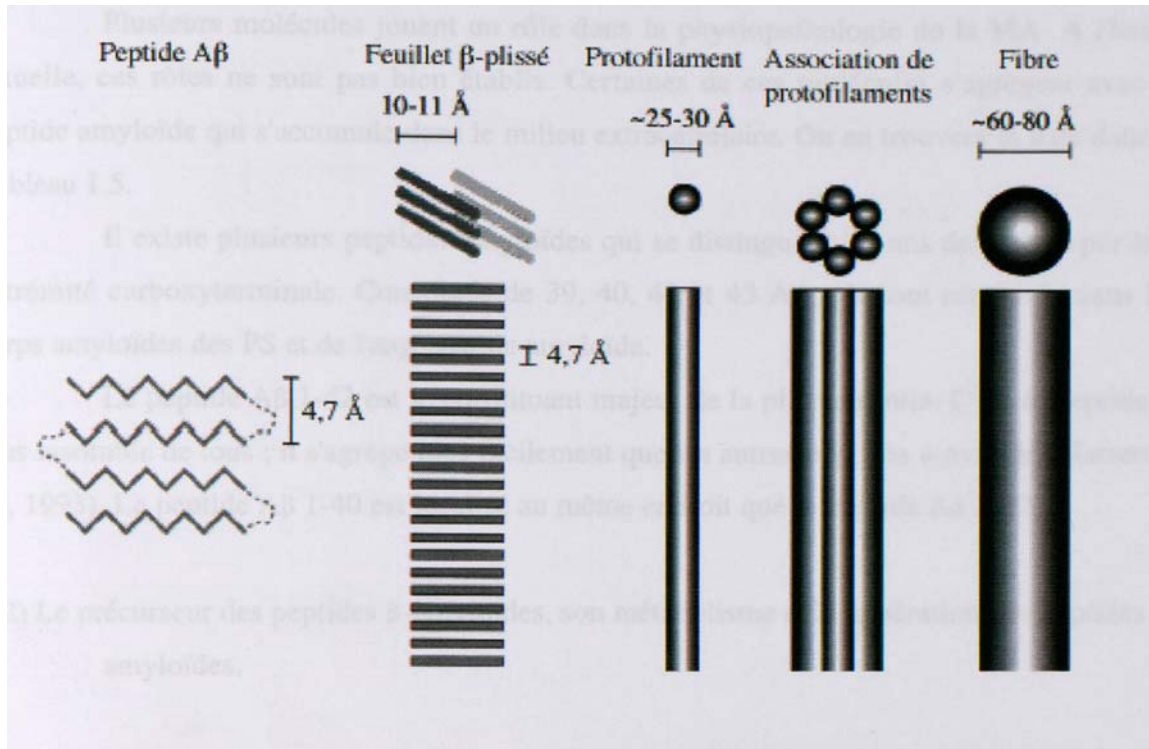
Les fibres $A\beta$ solubles contiennent 10 résidus hydrophobes à l'extrémité carboxyterminale. Les résidus 17 à 21 sont aussi très hydrophobes ; à partir du résidu 28, les AA sont impliqués dans la formation des feuillets β . Les repliements des feuillets β se forment tous les 6 à 8 AA. Le peptide β -amyloïde a été largement étudié en solution, Il prend la conformation α quand il est dissous dans un solvant organique comme le diméthylsulfoxyde [DMSO] ou le trifluoroéthanol [TFE] (Barrow *et al.*, 1992) et il prend la conformation de feuillets β plissés quand il est dissous dans de l'eau. Plusieurs facteurs, comme le pH, la concentration en peptide et le temps d'incubation, affectent la conformation du peptide β -amyloïde (Hilbich *et al.*, 1991).

La formation des fibres est un mécanisme complexe (Figure 1.8). On pense qu'elle fait intervenir un événement initial de nucléation et que des produits intermédiaires préexistent à la formation des fibres. En effet, on observe la présence de dimères et de trimères stables de fibres $A\beta$ 1-42 dans les préparations de peptides purifiés à partir de cerveaux de malades et l'on y détecte aussi des monomères capables de former des fibres *in vitro* (Roher *et al.*, 1996). Le processus de fibrillation comporte une étape intermédiaire au cours de laquelle il se forme des micelles à partir des monomères de peptides. C'est à partir de ces micelles que les fibres vont se développer (Lomakin *et al.*, 1996). D'autres études consacrées aux peptides $A\beta$ 1-40 et $A\beta$ 1-42 ont montré qu'il se formait des dimères, puis des tétramères et des filament d'oligomères durant la fibrillogenèse (Harper *et al.*, 1997 ; Walsh *et al.*, 1997).

Les protofilaments sont des précurseurs de la fibre amyloïde. Leur formation est précédée de l'apparition d'oligomères de peptide $A\beta$. Deux hypothèses ont été avancées pour expliquer leur apparition : (a) les oligomères interagiraient directement entre eux pour déclencher la formation des protofilaments qui s'allongent afin de former ultérieurement des fibres complètes ; (b) les protofilaments sont formés en premier et s'associent par 5 ou 6 pour engendrer la fibre.

FIGURE 1.8.

Représentation schématique de la formation d'une fibre amyloïde (D'après Serpell *et al.*, 1997).



Des études ultrastructurales ont porté également sur des fibres isolées extraites de cerveaux pathologiques. Ces fibres ont de 4 à 8 nm de diamètre et sont composées de 2 filaments enroulés l'un autour de l'autre (Merz *et al.*, 1983).

Enfin les études réalisées *in situ* ont fourni des résultats disparates. Parfois la fibre est décrite comme une structure tubulaire muni d'un centre creux (Terry *et al.*, 1964). L'étude de répliques pratiquées après congélation rapide de la préparation permet d'observer des sous-unités globuleuses de 3 à 5 nm de diamètre, assemblée en un brin hélicoïdal dans lequel 5 sous-unités constituent un tour d'hélice (Miyakawa *et al.*, 1986). Récemment, un nouveau modèle de structure des fibres amyloïdes a été proposé. Selon ce modèle, les fibres amyloïdes partagent certains caractères des microfibrilles du tissu conjonctif. Un noyau composé de la protéine amyloïde P sérique [SAP: pour *serum amyloid protein*] et de protéoglycannes à chondroïtine sulfate [CSPG] est recouvert entièrement de protéoglycannes à héparane sulfate [HSPG]. Les fibres amyloïdes, d'un diamètre de 1 nm sont attachées, à la surface de cet ensemble tout au long de l'axe et perpendiculairement à lui. Il convient de noter que les fibres d'autres substances amyloïdes, retrouvées dans diverses autres amyloses, auraient une structure identique (Inoue *et al.*, 1998).

(214) Biochimie de la plaque sénile.

Plusieurs molécules jouent un rôle dans la physiopathologie de la MA. A l'heure actuelle, ces rôles ne sont pas bien établis. Certaines de ces molécules s'agrègent avec le peptide amyloïde qui s'accumule dans le milieu extracellulaire. On en trouvera la liste dans le Tableau 1.5.

Il existe plusieurs peptides amyloïdes qui se distinguent les uns des autres par leur extrémité carboxyterminale. Constitués de 39, 40, 42 et 43 AA, ils sont retrouvés dans les corps amyloïdes des PS et de l'angiopathie amyloïde.

Le peptide A β 1-42 est le constituant majeur de la plaque sénile. C'est le peptide le plus insoluble de tous ; il s'agrège plus facilement que les autres peptides amyloïdes (Jarrett *et al.*, 1993). Le peptide A β 1-40 est localisé au même endroit que le peptide A β 1-42.

(22) Le précurseur des peptides β -amyloïdes, son métabolisme et la génération des peptides amyloïdes.

Le gène de l'APP [*amyloid β precursor protein*] fut le premier gène connu (Kang *et al.* 1987) pour être associé à une forme familiale de la MA (Chartier-Harlin *et al.* 1991). Aujourd'hui, on a répertorié plus de 15 mutations différentes dans ce gène. Elles représentent environ 5-10 % de tous les cas familiaux connus (Kowalska 2003). L'APP est une glycoprotéine de type 1 transmembranaire, à fonction peu connue, bien que de plus en plus de travaux lui associent un rôle dans le transport protéique dépendant de la kinésine (Annaert et De Strooper 2002 ; Wolfe 2003). L'APP est exprimée de façon ubiquiste et 3 isoformes principales peuvent être engendrées par épissage alternatif. L'isoforme neuronale de l'APP n'a que 695 AA (Takahashi *et al.*, 1988), les 2 autres isoformes, plus longues, sont trouvées dans tous les types cellulaires des Mammifères. L'épissage alternatif se fait à hauteur des exons 7, 8 et 15. Il conduit à l'expression des 3 isoformes de 695, 751 ou 770 AA. Ces protéines sont soumises à diverses modifications post-traductionnelles, telles que des O- et N-glycosylations, des sulfatations ou des phosphorylations. Les APP 695 et 751 présentent un domaine homologue au motif KPI [ou domaine inhibiteur des Ser-protéases de type inhibiteur de Kunitz].

TABLEAU 1.5.
Constituants mineurs de la plaque sénile regroupés selon leur nature biochimique.

Constituant	Références
Protéoglycannes	
HSPG	Snow <i>et al.</i> , 1988 ; Inoue <i>et al.</i> 1999.
CSPG	Dewitt <i>et al.</i> , 1993.
DSPG ^a	Snow <i>et al.</i> , 1992.
Protéines de la phase aiguë	
SAP	Inoue <i>et al.</i> , 1999.
α 1ACT ^a	Abraham <i>et al.</i> , 1988.
α 2M ^a	Van Gool <i>et al.</i> , 1993.
α 1-antitrypsine	Gollin <i>et al.</i> , 1992.
Protéine réactive C	Iwamoto <i>et al.</i> , 1994.
Composants du système du complément	
C1q	McGeer <i>et al.</i> , 1989.
C3d	McGeer <i>et al.</i> , 1989.
C3b, C3c	Eikelenboom et Stam, 1982.
C4d	McGeer <i>et al.</i> , 1989.
Ligands des récepteurs des lipoprotéines	
ApoE	Namba <i>et al.</i> , 1991.
Lipoprotéine lipase	Rebeck <i>et al.</i> , 1995.
Lf ^a	Rebeck <i>et al.</i> , 1995.
Facteurs de la coagulation	
Thrombine	Akiyama <i>et al.</i> , 1992.
Activateur du plasminogène de type urokinase	Rebeck <i>et al.</i> , 1995.
Activateur du plasminogène de type tissulaire	Rebeck <i>et al.</i> , 1995.
Facteur XII (facteur d'Hageman)	Yasuhara <i>et al.</i> , 1994.
Thromboplastine	McComb <i>et al.</i> , 1991.
Inhibiteur de l'activateur du plasminogène	Rebeck <i>et al.</i> , 1995.
Composants de la lame basale	
Laminine	Perlmutter <i>et al.</i> , 1991
Collagène de type IV	Perlmutter <i>et al.</i> , 1991
Autres produits	
AGE ^a	Kimura <i>et al.</i> , 1995 ; Sasaki <i>et al.</i> , 1998

^a DSPG : protéoglycane à dermatane sulfate ; α 1ACT : α 1-antichymotrypsine ; α 2M : α 2-macroglobuline ; Lf : lactoferrine ; AGE : *advanced glycation end product*.

(221) Le catabolisme du précurseur des peptides β -amyloïdes.

L'APP est métabolisée de façon constitutive *via* 2 voies biologiques : la voie non-amyloïdogène et la voie amyloïdogène (Nunan et Small, 2002 ; Ling *et al.*, 2003 ; Evin et Weidemann, 2002). Ces 2 voies se distinguent l'une de l'autre essentiellement par le type d'enzymes impliquées dans le clivage de l'APP, et par les métabolites (fragments) qu'elles engendrent. En bref, la voie plus commune, dite non-amyloïdogène, qui par conséquent ne produit pas de peptides amyloïdes, fait intervenir 2 clivages endoprotéolytiques orchestrés par l' α -sécrétase, puis la γ -sécrétase, et engendre 3 fragments distincts : la partie APP soluble α [A β PPs α], le domaine AICD [A β PP *intracellular domain*] et le peptide P3. Alternativement, dans la voie amyloïdogène, l'APP peut être clivé par la β -sécrétase puis par la γ -sécrétase. Il apparaît alors 2 autres fragments : l'A β PP soluble β [A β PPs β] et les peptides A β .

Mis à part le rôle que le fragment AICD pourrait jouer dans la transmission des signaux de la membrane vers le noyau (signalisation cellulaire), ces fragments n'ont toujours pas de fonction physiologique précisément assignée.

De nombreuses études ont montré que la β -sécrétase était l'aspartyl protéase membranaire [BACE, pour *β -site APP cleaving enzyme*] (voir ci-dessous). Un groupe de métalloprotéases incluant la TACE [*tumor necrosis factor α -converting enzyme*] qui serait quant à lui responsable d'une fraction significative de l'activité α -sécrétase (Evin et Weidemann, 2002). Comme nous allons le voir, la γ -sécrétase est dépendante des présénilines, plus particulièrement de la préséniline-1 [PS-1].

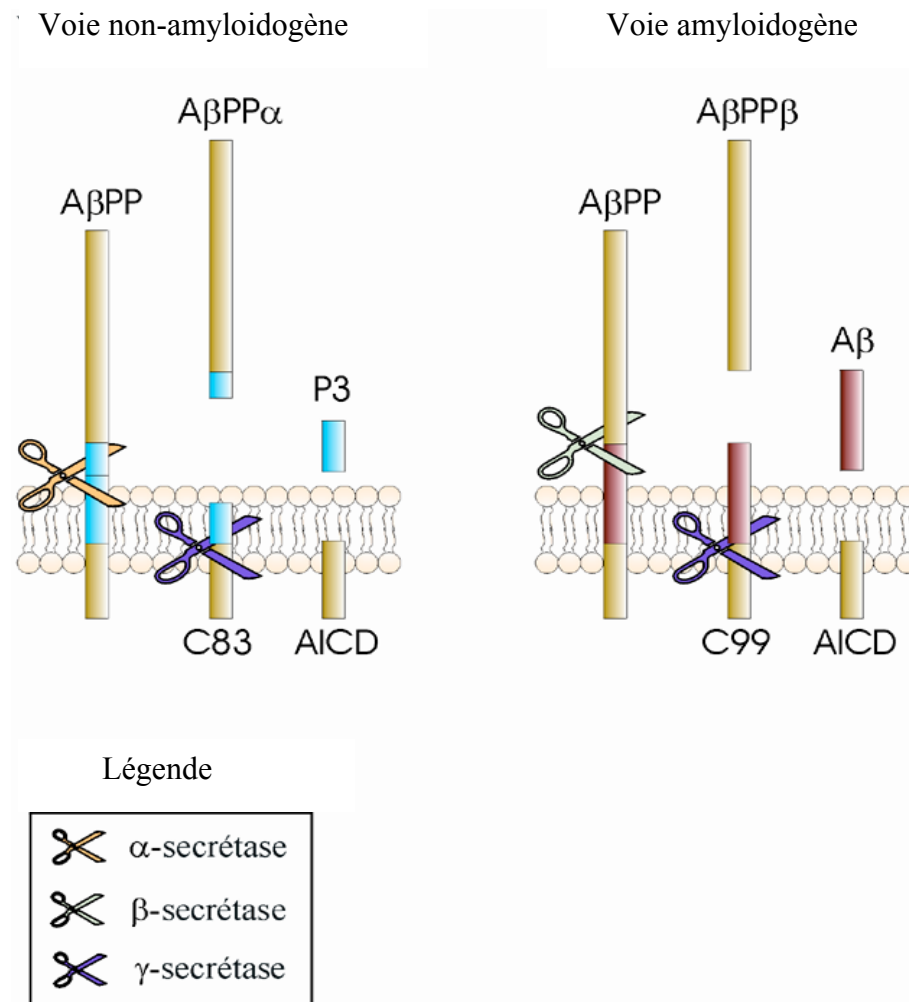
(2211) L' α -sécrétase.

L'activité α -sécrétase clive l'APP entre les AA 687 et 688, au beau milieu de la séquence du peptide A β dont elle empêche ainsi la production. En revanche, sous l'effet de cette activité, un large domaine extracellulaire soluble est libéré : l'A β PPs- α . Il résulte également de cette coupure l'apparition d'un fragment carboxyterminal, appelé C83, qui est transmembranaire et contient 83 AA.

Des activateurs de la PKC diminuent la production de peptide A β (Hung *et al.*, 1993) : par conséquent, la régulation de l'expression ou de l'activité de l' α -sécrétase est peut-être assurée par cette kinase. Le mécanisme de régulation fait également intervenir le récepteur muscarinique de l'acétylcholine (Nitsch *et al.*, 1992).

FIGURE 1.9.

Métabolisme du précurseur des peptides β -amyloïdes et genèse de ces peptides : voie non amyloïdogène et la voie amyloïdogène [D'après site internet : www.theses.ulaval.ca].



L'A β PPs- α est produit à la membrane plasmique et lors du trafic intracellulaire de l'APP. Les activités α -sécrétases sont localisées précisément à la face *trans* de l'appareil de Golgi et dans le feuillet externe de la membrane plasmique (Kuentzel *et al.*, 1993 ; Lammich *et al.*, 1999).

Trois enzymes sont candidates au portage de cette activité ; toutes les 3 sont membres de la famille ADAM [*A disintegrin and metalloprotease domain*] des métalloprotéinases dépendantes du zinc ; il s'agit de l'ADAM-9 (meltrine γ ou MDC9 ; Koike *et al.*, 1999), de l'ADAM-10 qui est ancrée dans la membrane plasmique et de l'ADAM-17 (Lammich *et al.*,

1999 ; Buxbaum *et al.*, 1998). L'ADAM-17 présente une activité similaire à celle de l' α -sécrétase. Elle est identifiable à la TACE qui est responsable de la maturation du TNF α à partir du pro-TNF α .

Il existe aussi une activité α -sécrétase constitutive. Elle est assurée par la pro-hormone convertase [PC] 7. La surexpression de cette enzyme dans des cellules HEK 293 favorise la production d'A β PPs- α (Lopez-Perez *et al.*, 1999).

(2212) La β -sécrétase.

En 1999, 4 groupes indépendants ont cloné et caractérisé le gène BACE et son produit, la β -sécrétase impliquée dans le premier clivage de l'APP et par conséquent dans la genèse de l'A β 1-42 neurotoxique (Hussain *et al.*, 1999 ; Sinha *et al.*, 1999 ; Vassar *et al.*, 1999 ; Yan *et al.*, 1999). BACE est une enzyme de la famille des aspartyl protéases. La coupure de l'APP par la β -sécrétase se fait entre les AA 671 et 672 de l'APP ; cette réaction libère un domaine extracellulaire plus petit que l'A β PPs- α , l'A β PPs- β , et un fragment carboxyterminal transmembranaire de 99 AA, le C99. Ce fragment contient la région correspondante à la partie aminoterminal du peptide A β .

BACE est exprimée dans plusieurs types cellulaires et organes mais plus particulièrement dans le pancréas et le cerveau. Elle est localisée principalement dans la région du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi (Huse *et al.*, 2002). Toutefois, de petites quantités de BACE semblent présentes à la surface membranaire ainsi que dans certaines vésicules cytoplasmiques (endosomes) (Kinoshita *et al.*, 2003).

Des analyses de l'expression de BACE dans la cellule confirment que les α - et β -sécrétases sont en compétition pour agir sur l'APP, leur substrat (Tyler *et al.*, 2002). Par ailleurs, la surexpression de BACE augmente les clivages à hauteur de l'aspartate 1 et du glutamate 11 (sites endoprotéolytiques précédemment reconnus comme substrats de la β -sécrétase) mais pas en d'autres sites de l'APP (Howlett *et al.*, 2000). À l'inverse, si l'on inhibe l'expression endogène de BACE (par exemple, par des oligonucleotides anti-sens ou par des iRNA), on observe une baisse très importante de l'activité β -sécrétase endogène (Vassar *et al.*, 1999 ; Luo *et al.*, 2001 ; Basi *et al.*, 2003). Du reste, la surexpression de BACE par des souris transgéniques induit une diminution des dépôts amyloïdes (Lee *et al.*, 2005).

Des expériences pratiquées *in vitro* avec de la protéine BACE purifiée montrent que cette enzyme n'est pas un simple cofacteur, ni un activateur pour une β -sécrétase inconnue.

Son activité directe sur l'APP démontre sans contestation possible qu'elle joue bien le rôle d'une β -sécrétase.

(2213) La γ -sécrétase.

La γ -sécrétase coupe des produits de clivage de l'APP entre les AA 711 et 713 localisés dans le domaine transmembranaire de cette molécule. En effet, ce sont les dérivés de l'APP — et non l'APP dans son entier — qui sont les substrats de cette enzyme ou de cette activité enzymatique. Ainsi selon la nature de la coupure survenant avant l'intervention de la γ -sécrétase, les substrats, et donc les produit de réaction peuvent changer.

Les études portant sur la caractérisation du métabolisme des présénilines ont permis de démontrer que l'activité enzymatique de type γ -sécrétase était étroitement liée à un complexe de haute MM contenant l'hétérodimère NTF [extrémité aminoterminal de la préséniline]/CTF [extrémité carboxyterminale de la préséniline] (Levitan *et al.*, 2001). Toutefois, eu égard à cette caractéristique (la MM du complexe allant, selon les auteurs, de 250 à 2.000 kD), il est apparu que l'activité γ -sécrétase requérait certainement la participation d'autres protéines (Li *et al.*, 2000a ; Steiner *et al.*, 2002 ; De Strooper 2003 ; Farmery *et al.*, 2003 ; Kimberly *et al.*, 2003).

Des recherches intensives conduites ces dernières années (1995-2005) ont permis de conclure que l'activité γ -sécrétase est probablement portée par un large complexe protéique multimérique, appelé complexe γ -sécrétase. De multiples protéines membranaires participent à sa formation, parmi lesquelles la nicastrine, l'aph-1, la pen-2 et finalement les PS-1 et préséniline-2 [PS-2], et plus particulièrement les hétérodimères NTF/CTF (De Strooper 2003 ; Kimberly *et al.*, 2003 ; Wolfe 2003).

La nicastrine fut d'abord isolée parce qu'elle interagissait avec PS-1 dans le complexe de haute MM, obtenu par co-immunoprécipitation et isolement en gel d'acrylamide non dénaturant. Dans la cellule, la nicastrine est principalement localisée dans le réticulum endoplasmique et dans l'appareil de Golgi. Peu de temps après la découverte de la nicastrine, les protéines aph-1 et pen-2 furent isolées par criblage génétique chez des mutants de la voie de signalisation *Notch* [*Notch-defective*] chez *Cænorhabditis elegans*.

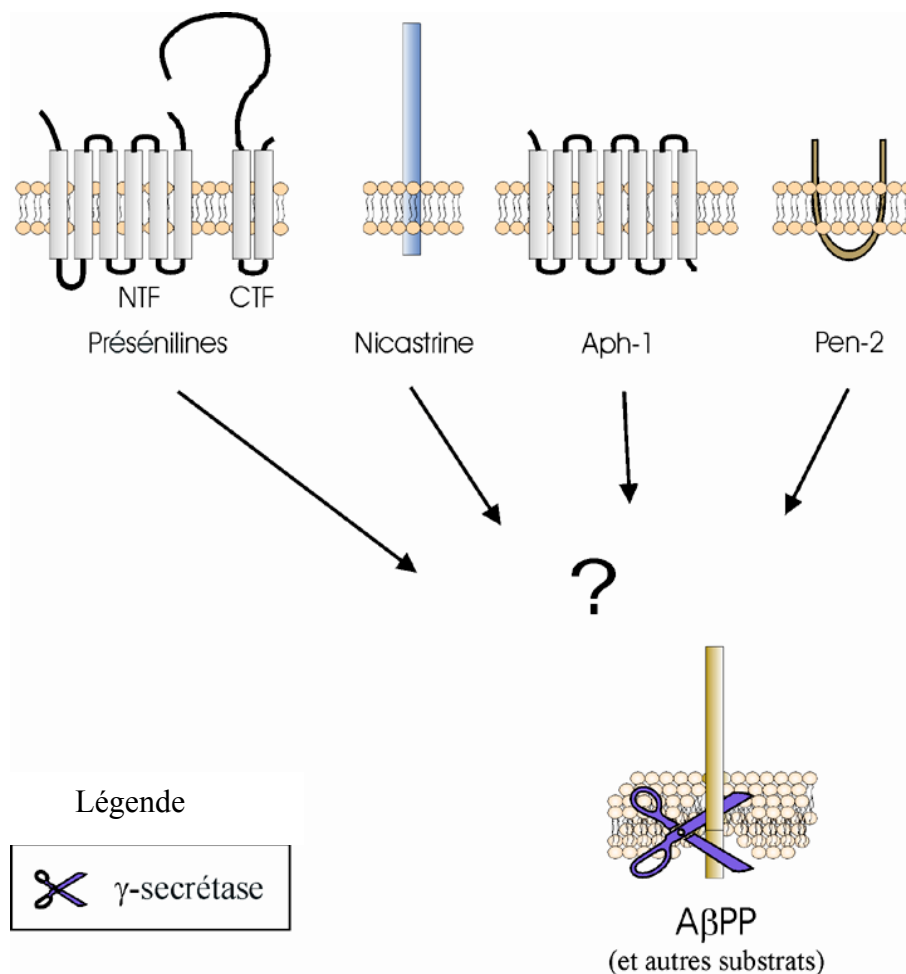
Cependant, le rôle spécifique de ces protéines dans le complexe et leur rôle en général restent inconnus. L'effet des mutations des gènes des présénilines sur le site de clivage de l'APP en position γ suggère toutefois qu'elles peuvent elles-mêmes assurer la fonction protéolytique du complexe γ -sécrétase (Wolfe 2003). Mais cette hypothèse est loin de faire l'unanimité, même si de plus en plus de preuves biochimiques tendent à en prouver la validité.

Ainsi, il a été montré que la PS-1 porte des résidus Asp conservés dans les domaines transmembranaires 6 et 7, positions qui s'accorderaient au site de clivage γ de l'APP (Figure 1.10) (Wolfe *et al.*, 1999). La mutagenèse dirigée des 2 résidus Asp de la PS-1, mentionnés plus haut, empêche le clivage de l'APP (Wolfe *et al.*, 1999 ; Kimberly *et al.*, 2000). De plus, des inhibiteurs de transition de la γ -sécrétase qui miment le site de clivage γ de l'APP se lient spécifiquement à la PS-1, plus particulièrement à l'hétérodimère NTF/CTF actif (Esler *et al.*, 2000).

FIGURE 1.10

Les différents constituants du complexe γ -sécrétase.

Les PS (principalement les hétérodimères), combinées aux protéines aph-1, nicastrine et pen-2 constituent l'ensemble minimal du complexe γ -sécrétase actif. Toutes ces protéines sont transmembranaires. La manière dont les protéines s'associent pour cliver l'APP dans son domaine transmembranaire reste un phénomène toujours inexpliqué [D'après site internet : www.theses.ulaval.ca].



Bien que cette hypothèse reste à confirmer, du moins *in vitro*, la PS-1 assure incontestablement la protéolyse intramembranaire régulée de l'APP (et des autres substrats cités ci haut) tandis que les autres membres du complexe γ -sécrétase interviendraient dans la régulation de l'activité de protéolyse.

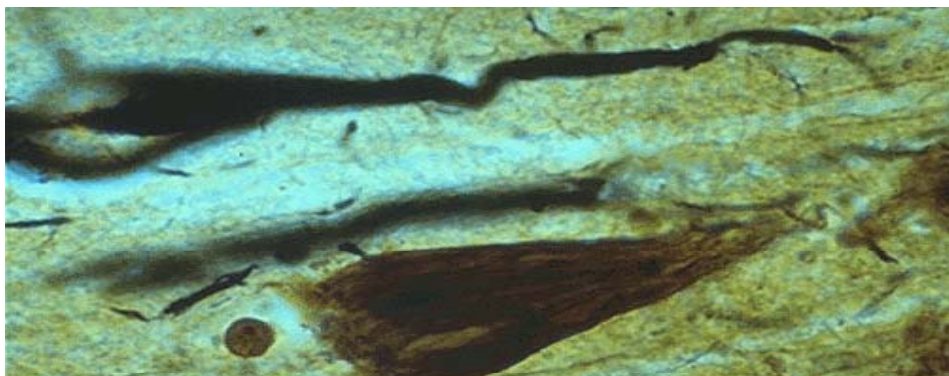
(3) Les dégénérescences neurofibrillaires.

À l'inverse des PS, les DNF se situent à l'intérieur des neurones. Ce sont des écheveaux de filaments anormaux constitués entre autre d'une forme hyperphosphorylée de la protéine tau qui se transforme en paires de filaments hélicoïdaux. La protéine tau normalement phosphorylée (2 ou 3 fois contre 5 à 9 fois dans la MA) joue un rôle dans la polymérisation et dépolymérisation des microtubules du cytosquelette et par conséquent dans le transport axonal.

Les DNF résistent à la protéolyse. On les met en évidence par immunohistochimie dans le cytoplasme des neurones où elles ont tendance à s'agréger. Elles constituent alors des rubans torsadés, visibles en microscopie électronique, sur lesquels précipitent l'argent métallique lors de la mise en œuvre des techniques histologiques destinées à révéler les neurofibrilles neuronales (imprégnation argentique ; voir Figure 1.11).

FIGURE 1.11.

Mise en évidence des dégénérescences neurofibrillaires par l'imprégnation de Bielschowsky [D'après site internet : www.alzheimer-montpellier.org].



Agrégées dans les corps cellulaires des neurones, les protéines tau pathologiques hyperphosphorylées constituent les DNF. Au décours de la MA, elles s'agrègent aussi dans les prolongements nerveux, notamment dans ceux qui avoisinent les PS. Elles participent ainsi à la constitution des PS dites matures.

(31) Ultrastructure des dégénérescence neurofibrillaires.

Les protéines tau forment un groupe de protéines normales associées aux microtubules, et qui, avec les neurofilaments et les microfilaments, constituent le cytosquelette neuronal. Dans le neurone, ces organites prennent le nom de neurotubules. Ils jouent un rôle majeur dans le flux axonal qui permet les transferts de substances et d'organites variés du corps cellulaire des neurones vers les extrémités de leurs prolongements — et inversement. Les microtubules sont constitués de tubuline. Ils forment des petits tubes de 25 nm de diamètre avec un centre clair contenant un granule dense de 5 nm de diamètre. Des protéines spéciales appelées protéines associées aux microtubules stabilisent la structure de la tubuline.

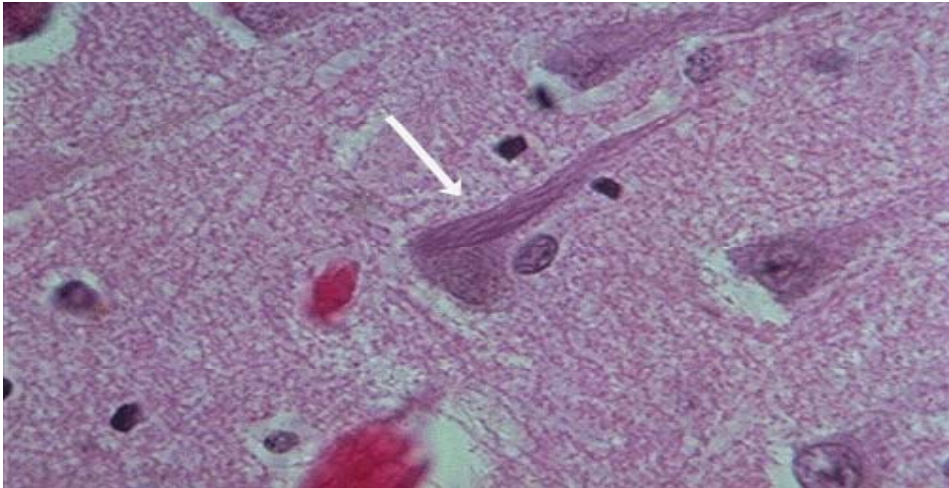
La principale fonction des protéines tau est de stabiliser les microtubules selon leur état de phosphorylation, et donc de " rigidifier " la cellule. Ces protéines comportent, en effet, de multiples sites de phosphorylation, sites dont l'occupation varie en fonction du degré de maturité du cerveau et aussi, en cas de MA, du degré de sévérité de l'atteinte. Chez l'adulte, on a décrit 6 isoformes de protéines tau.

Dans la MA et dans certaines autres affections du SNC, des agrégats anormaux de protéines tau s'accumulent dans les neurones. Ils ont l'aspect de paires de filaments hélicoïdaux [PHF]. Ces PHF sont formées de 2 filaments de 10 nm de diamètre enroulés l'un autour de l'autre pour former une double hélice dont le pas est de 80 nm.

En haute résolution, les filaments constitutifs des PHF apparaissent comme constitués de l'assemblage de 4 protofilaments, eux-mêmes formés de structures globulaires de 3 nm reliées entre elles par des éléments longitudinaux de 4,5 nm (Wisniewski et Wen, 1985). De nouvelles techniques de réplique après congélation ont permis d'affiner les premières observations. Ainsi, les PHF seraient plutôt constituées de 2 rubans de largeur variable. Leur largeur maximale moyenne est constante et atteint 14,9 nm. La largeur minimale étant irrégulière, 3 catégories de tailles ont pu être définies : la première est de 2,4 nm, la seconde est de 4,9 nm et la troisième de 9,6 nm. La valeur la plus fréquente est 2,4 nm (Ruben *et al.*, 1993a et b).

FIGURE 1.12.

Les dégénérescences neurofibrillaires sont des lésions intra-neuronales qui correspondent à la prolifération de paires de filaments en hélice. Marquage à l'hématéine-éosine [D'après site internet : www.alzheimer-montpellier.org].



(32) Biochimie des dégénérescences neurofibrillaires.

La protéine tau est le constituant majeur des DNF. Le profil électrophorétique des protéines tau extraites des cerveaux de patients atteints de MA diffère de celui des protéines tau extraites de cerveaux de sujets témoins. Chez les sujets atteints, on observe 3 bandes alors qu'on en trouve 6 chez les sujets sains. Le profil électrophorétique normal est rétabli si les extraits de tissus cérébraux de sujets malades sont traités par une phosphatase avant d'être soumis à l'électrophorèse. Ces observations montrent que la protéine tau est anormalement phosphorylée chez les sujets atteints (Alonso *et al.*, 2001).

Les sites de phosphorylation de la protéine tau contiennent des motifs Ser-Pro ou Thr-Pro. Ils sont phosphorylés *in vitro* par des protéines kinases reconnaissant ces motifs. Les Ser et Thr non suivis d'une Pro sont également phosphorylés *in vitro* par des protéines kinases non spécifiques des motifs à Pro.

La protéine tau des DNF présente également des glycosylations (Takahashi *et al.*, 1999) et des glycations (Ko *et al.*, 1999) absentes de la protéine tau normale. De nombreuses autres molécules, de nature diverse rentrent aussi dans la composition des DNF. Ces composants ont été identifiés par des techniques immunohistochimiques (Tableau 1.6).

TABLEAU 1.6.
Constituants secondaires des dégénérescences neurofibrillaires.

Constituants	Références
ApoE	Namba <i>et al.</i> , 1991 ; Benzing et Mufson, 1995.
HSPG	Perry <i>et al.</i> , 1991.
CSPG	De Witt <i>et al.</i> , 1993.
DSPG	Snow <i>et al.</i> , 1992.
Ubiquitine	Morishima-Kawashima <i>et al.</i> , 1993.
α 1ACT	Gollin <i>et al.</i> , 1992.
α 1-antitrypsine	Gollin <i>et al.</i> , 1992.

14-Implication de la cellule microgiale dans la maladie d'Alzheimer.

Les PS et les DNF sont les principales lésions associées à la MA, mais à elles seules, elles ne suffisent pas à provoquer d'importantes pertes neuronales. On peut effectivement retrouver ces lésions chez des individus qui ne présentent aucun signe de démence. C'est là qu'interviennent très probablement les cellules microgliales, troisième acteur qui joue un rôle très important dans la MA. Après autopsie, on a comparé des coupes de cerveaux de sujets ayant présenté les signes cliniques de MA à des coupes de cerveaux normaux provenant de sujets âgés non-déments, dépourvus de dépôts de peptides A β ou ne présentant que des dépôts diffus de peptides avec ou sans neurites dystrophiques périphériques. Cette comparaison a montré qu'il y a une plus forte densité de cellules microgliales dans les cerveaux de malades que dans les cerveaux de sujets sains. Une deuxième étude a montré que le nombre de cellules microgliales dans le cortex du cerveau de sujets apparemment sains mais présentant des dépôts amyloïdes, était supérieur à celui que l'on retrouve dans le cortex du cerveau de sujets témoins dépourvus de dépôts amyloïdes. Ces 2 observations montrent qu'une prolifération des cellules microgliales est associée à la MA

(Mackenzie *et al.*, 1995). Enfin, il semble que l'activation des cellules microgliales dans les plaques diffuses pourrait participer à la maturation de ces formations (Mackenzie et Munoz, 1998).

Dans la MA, les cellules microgliales qui entourent les PS ont une morphologie différente. Dans le cerveau atteint, on peut observer 3 morphotypes de cellules microgliales activées : la cellule primaire, la cellule élargie et la cellule phagocytaire.

La distinction de ces 3 types de cellules est fondée sur leur différence d'immunoréactivité à l'IL-1 α . La forme ramifiée est la moins marquée par les Ac anti-IL-1 α (Sheng *et al.*, 1997). Les cellules microgliales activées expriment les produits du CMH II, ainsi que le CD45 et le CD68 qui sont des marqueurs de l'activation (Sasaki *et al.*, 1997).

Le taux d'association aux dépôts amyloïdes est le marqueur du degré d'activation des cellules microgliales. En effet, seulement 16 % des cellules microgliales primaires sont localisées aux environs de ces dépôts alors que plus de 90 % des cellules microgliales phagocytaires se situent près des PS. Les cellules activées sont préférentiellement associées aux plaques matures ; on ne les retrouve pas à proximité des plaques éteintes, que l'on considère comme le dernier stade de l'évolution de ces lésions. Ainsi, une fois que le peptide A β est totalement condensé en fibres amyloïdes, l'immunogénicité des plaques disparaît (Sasaki *et al.*, 1997). Les Ag attirant et activant les cellules microgliales pourraient alors être masqués ou dégradés.

Il existe des individus sains dont le cerveau présente des plaques diffuses et des plaques matures. Dans ce cas, la distribution des cellules microgliales est similaire à celle qui prévaut dans les cerveaux des malades : elles sont plus nombreuses à entourer les plaques matures et elles présentent un phénotype activé (Mackenzie *et al.*, 1995, Sasaki *et al.*, 1997). Cette distribution dépend de la morphologie des PS. Les cellules microgliales sont associées préférentiellement aux plaques contenant les 2 formes de peptide amyloïde A β 1-40 et A β 1-42 plutôt qu'aux plaques constituées uniquement de peptide A β 1-42 (Mann *et al.*, 1995 ; Fukumoto *et al.*, 1996).

L'activation microgliale peut aussi suivre la formation des DNF ou être influencée par elles. On trouve souvent les cellules microgliales activées à hauteur des terminaisons axonales de neurones en contenant. Dans l'hippocampe, cette activation semble d'ailleurs plus souvent associée à l'extension des DNF qu'à l'accumulation du peptide (Hüll *et al.*, 2000).

141-Effet du peptide amyloïde sur les cellules microgliales.

Le peptide A β exerce des effets aussi bien sur les neurones que sur les cellules microgliales. A forte concentration, il est effet toxique pour les neurones hippocampiques, alors qu'à des concentrations plus faibles, il possède des effets neurotrophes (Yankner *et al.*, 1990). Pour qu'il soit neurotoxique, il faut qu'il ait adopté la conformation fibrillaire ; le traitement des neurones en culture par du peptide A β amorphe ne semble pas toxique (Howlett *et al.*, 1995 ; Lorenzo *et al.*, 1996), mais cette observation n'est pas toujours confirmée, et du peptide non fibrillaire est parfois toxique (Pillot *et al.*, 1999).

D'un autre côté, le peptide A β attire les cellules microgliales et les active ; il induit alors la production de différentes substances comme les cytokines.

1411-Le peptide amyloïde attire les cellules microgliales.

In vitro, le peptide A β 1-42 attire les macrophages péritonéaux de Souris (Davis *et al.*, 1992), les cellules microgliales humaines (Rogers et Lue, 2001a), les cellules microgliales de Rat (Davis *et al.*, 1992) et les monocytes humains (Fiala *et al.*, 1998). En outre, le fragment A β 25-35 se révèle aussi chimiotactique pour plusieurs types cellulaires (Davis *et al.*, 1992 ; Meda *et al.*, 1996).

Le peptide A β induit la synthèse de plusieurs médiateurs solubles, comme le MCP-1, le MIP-1 α/β et l'IL-8, par les monocytes humains et par les cellules microgliales de Souris (Meda *et al.*, 1996 ; Fiala *et al.*, 1998).

Les cellules microgliales humaines sécrètent du MCP-1, du MIP-1 α et de l'IL-8 quand elles sont cultivées dans un milieu contenant du peptide (Lue *et al.*, 2001a). Dans un modèle de barrière hémato-encéphalique, où les cellules myéloïdes du compartiment cérébral sont traitées par le peptide amyloïde, on observe que les monocytes migrent du compartiment sanguin vers le compartiment cérébral. Cette migration est favorisée par la sécrétion des chimiokines induites par le peptide A β dans le compartiment cérébral (Fiala *et al.*, 1998). Le peptide A β peut aussi agir sur d'autres types cellulaires comme les neurones, qui libèrent du M-CSF (Du Yan *et al.*, 1997b), et les astrocytes et les onligodendrocytes qui libèrent du MCP-1 et RANTES (Prat, 2000 ; Johnstone *et al.*, 1999).

1412-Le peptide amyloïde active les cellules microgliales.

Les cellules microgliales traitées par du peptide A β produisent de nombreux médiateurs de l'inflammation comme des protéines du système du complément, des cytokines pro-inflammatoires, des prostaglandines et des radicaux libres azotés et oxygénés (Akiyama *et al.*, 2000). Les neurones produisent aussi un nombre de ces médiateurs, mais ce sont surtout aux astrocytes et aux cellules microgliales que revient la responsabilité de la réponse inflammatoire dans le cerveau de patients atteints de la MA.

(1) Les protéines du système du complément.

Le système immunitaire et notamment le système du complément jouent un rôle important dans la reconnaissance et élimination des entités toxiques. Mais l'activation du système du complément à des degrés excessifs peut causer de sévères dommages tissulaires. Le système du complément est donc un facteur d'exacerbation et de propagation des lésions tissulaires et il pourrait être impliqué dans l'évolution des désordres neurodégénératifs comme la MA. L'anaphylatoxine C5a libérée dans la circulation consécutivement à l'activation du système du complément semble être impliquée dans l'apoptose neuronale (Benard *et al.*, 2004). Le complément pourrait être activé directement (sans qu'il soit lié à un immunocomplexe) par des peptides A β , et ses fragments activés interagiraient avec la surface des cellules microgliales pour y induire la formation d'anions superoxydes toxiques pour les neurones (Van Muiswinkel *et al.*, 1996). Cette hypothèse est corroborée par une observation essentielle : on retrouve du complexe d'attaque membranaire [CAM ou complexe C5b-9] dans les neurites entourant les PS et les DNF ; ce CAM pourrait être à l'origine d'un influx calcique intracellulaire et former un dépôt de protéines du système du complément conduisant à la dégradation progressive des neurites.

Bien que le rôle principal du complément activé soit d'induire la lyse de la cible par l'intermédiaire du CAM, il apparaît que les anaphylotoxines C3a et C5a ainsi que des quantités sub-lytiques de CAM sont impliquées dans des activités pro- et anti-inflammatoires. Le système du complément participerait, entre autres, au remodelage et à la réparation du tissu cérébral. Il contribuerait à la clairance des dépôts fibrillaires amyloïdes et favoriserait la phagocytose des neurones nécrosés ou en cours d'apoptose par la cellule microgliale. Enfin, la cellule microgliale exposée au fragment C3a *in vitro* produit du NGF, lequel est impliqué *in vivo* dans le processus précoce de régénérescence neuronale (Heese *et al.*, 1998).

Le complément présente donc une sorte de dualité dans son activité centrale. D'un côté, il exacerbe les lésions tissulaires, et d'un autre il semble également impliqué dans les phénomènes de réparation tissulaire et dans l'élimination de dépôts potentiellement toxiques présents dans les cerveaux de patients atteints de MA.

Le composant C1q est présent dans les PS matures de la MA ainsi qu'à la surface des neurones contenant ou non des DNF. Il peut se lier directement au peptide fibrillaire et activer alors la voie classique de la cascade du complément. Son rôle est de déclencher l'activation de cette dernière, laquelle conduit à la lyse cellulaire par l'intermédiaire du CAM. La fraction C1q est en outre une importante opsonine qui peut recouvrir les cellules cibles de manière qu'elles puissent être reconnues par la cellule microgliale qui exprime le C1qRp. Il existe d'autres opsonines qui jouent un rôle dans ce phénomène, comme des fragments du C3 (C3b et C3bi) dont l'ingestion est convoyée par les CR3 ou CR4, présents eux aussi à la surface de la cellule microgliale.

Des études récentes ont montré que les neurones apoptotiques et les neurones riches en DNF, ainsi que le peptide fibrillaire présent dans les PS, seraient opsonisés par le complément et spécifiquement reconnus et éliminés par la cellule microgliale, qui exprime les récepteurs C1aRp, CR3 et CR4. L'activation du complément aux stades précoces de la MA serait intéressante et bénéfique en termes de phagocytose et de clairance des molécules et débris, potentiellement toxiques et susceptibles d'engendrer des réactions inflammatoires supplémentaires nocives (Gasque *et al.*, 2000).

(2) Les cytokines pro-inflammatoires.

Les cellules microgliales produisent un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires. En présence de peptide A β , elles libèrent de l'IL-6, du TNF α et du précurseur de l'IL-1 β (Lue *et al.*, 2001a). L'analyse de prélèvements pratiqués *post-mortem* sur des cerveaux de sujets atteints ou non de la MA ont montré que les monocytes y secrètent de l'IL-1 β , du TNF α , de l'IL-6 et de l'IL-12 (Fiala *et al.*, 1998). Les mRNA de plusieurs de ces cytokines ont été mis en évidence dans les cellules microgliales associées aux PS (Walker *et al.*, 1995). Ces substances exercent des effets divers sur les cellules microgliales. L'IL-1 β promeut la synthèse et la protéolyse de l'APP ; elle accélère ainsi la synthèse du peptide A β et favorise son dépôt sous forme de plaques ou son incrustation dans les plaques préexistantes. Cette même cytokine incite les astrocytes à produire de l'ACT et de l'ApoE qui l'un et l'autre favorisent la fibrillation du peptide amyloïde (Das et Potter, 1995), ainsi que de la S100 β ,

cytokine qui contribue à la croissance neuritique (Sheng *et al.*, 1996b). Tous ces éléments concourent à l'établissement d'un *cycle infernal* (Griffin *et al.*, 1998), dans lequel (a) l'expression d'IL-1 β est soutenue par les dérivés du catabolisme de l'APP comme l' α - ou le β -APP (Barger et Harmon, 1997) et (b) la croissance neuritique promue par la S100 β conduit inéluctablement à une augmentation de l'expression neuronale de l'APP.

L'IL-6 induit la production des protéines de la phase aiguë, augmente la perméabilité vasculaire, active les lymphocytes et la synthèse des Ac. Elle exerce des effets néfastes sur le SNC quand elle est surexprimée localement ou systémiquement. L'expression chronique d'IL-6 par des Souris génétiquement manipulées entraîne des dommages cérébraux ainsi que des troubles comportementaux et cognitif (Heyser *et al.*, 1997).

Le TNF α joue un rôle important dans la MA. Il est exprimé à un taux élevé chez les sujets qui en sont atteints. Il joue un rôle dans l'activation autocrine des cellules microgliales qui libèrent des chimiokines après stimulation par le peptide A β (Meda *et al.*, 1996). Il diminue la viabilité des neurones *in vitro*. Des neurones corticaux humains entrent en apoptose quand ils sont traités par du TNF α (Shi *et al.*, 1998). Des souris transgéniques exprimant du TNF α de façon chronique développent une réaction inflammatoire cérébrale sévère et une importante neurodégénérescence (Akassoglou *et al.*, 1997).

(3) Les intermédiaires réactifs de l'oxygène et de l'azote.

Les intermédiaires réactifs de l'oxygène, comme l'anion superoxide (O $_2^-$) ou le peroxyde d'hydrogène, sont produits par les cellules microgliales alors que les intermédiaires réactifs de l'azote, comme le monoxyde d'azote (NO), le sont par les cellules microgliales et les astrocytes. Ces composés lèsent les cellules environnantes et induisent la transcription de gènes pro-inflammatoires ou apoptotiques placés sous le contrôle du facteur NF- κ B.

Le monoxyde d'azote est produit par les cellules microgliales consécutivement à un traitement par le peptide A β (Lue *et al.*, 2001a) ou par des cytokines activatrices (Meda *et al.*, 1995). Les cellules microgliales humaines ne produisent pas de NO après avoir été stimulées contrairement aux cellules murines qui en produisent en grandes quantités (Meda *et al.*, 2001). En revanche, les cellules microgliales provenant d'individus atteints de MA produisent de grandes quantité de NO après stimulation comparativement aux cellules microgliales provenant de sujets âgés non déments (Lue *et al.*, 2001a). Cette production dépend de l'état clinique du patient ; plus il est sévère, et plus les cellules microgliales répondent au peptide A β . Ces données suggèrent que les cellules astrogliales sont à l'origine du NO dans les

cerveaux des malades mais que la production de NO par les cellules microgliales s'accroît aux stades tardifs de la MA.

En culture, les radicaux oxygénés ne sont produits que par les cellules microgliales d'Homme ou de Rat activées (Klegeris *et al.*, 1994 ; Van Muiswinkel *et al.*, 1996). L'activation de la chaîne respiratoire des cellules microgliales passe par une stimulation directe du système de la NADPH oxydase qui est un composant de la chaîne de transport mitochondriale des électrons (Akiyama *et al.*, 2000). Deux régions différentes du peptide sont responsables de l'activation de la NADPH oxydase car celle-ci est activée par les peptides A β 1-40, et A β 1-42, et par les fragments A β 25-35 et A β 1-16 (Van Muiswinkel *et al.*, 1999).

1413-Les récepteurs convoyant les effets chimiotactiques et les effets activateurs du peptide amyloïde.

Les cellules microgliales possèdent des récepteurs spécifiques du peptide β -amyloïde qui leur permettent de répondre aux propriétés chimiotactiques directes et indirectes de ce dernier. En plus de l'expression des chimiokines, le peptide A β induit la surexpression du récepteur de l'activateur du plasminogène de type urokinase, récepteur dont l'engagement peut stimuler le chimiotactisme, l'adhésion et l'activation des phagocytes mononucléés quand il fixe son ligand naturel. Dans la MA, ce récepteur est surexprimé, et les cellules microgliales peuvent s'activer au contact de la plaque sénile (Walker *et al.*, 2002). Le récepteur RAGE [pour *receptor for advanced glycation end products*] reconnaît le peptide A β ; son engagement par le peptide déclenche la sécrétion de M-CSF ainsi qu'une réponse chimiotactique (Lue *et al.*, 2001b). Il est surexprimé par les cellules microgliales du cerveau de patients atteints de MA (Sasaki *et al.*, 2001a). Les SR-A et SR-B sont surexprimés par les cellules microgliales qui entourent les PS. Les SR-A induisent une production d'intermédiaires réactifs de l'oxygène après interaction avec le peptide A β 25-35 (El Khoury *et al.*, 1996). Dans le groupe des SR-B, le CD36 reconnaît le peptide amyloïde ; il en résulte une production de peroxyde d'hydrogène (Coraci *et al.*, 2002). Le récepteur du tripeptide Met-Leu-Phe formylé [fMLP] est un composé fortement chimiotactique qui permet le recrutement des monocytes, des macrophages et des cellules microgliales lors d'une infection bactérienne. Il existe 2 récepteurs des peptides formylés [FPR]. L'un et l'autre possèdent une structure similaire, à 7 domaines transmembranaires, mais ils se différencient l'un de l'autre par leur affinité pour le fMLP : le FPR 1 est un récepteur de haute affinité alors que le FPR 2 a une affinité plus faible. Chez l'homme, le FPR 2 est appelé FPR-like 1 [FPRL-1]. La forme longue

du peptide A β est un agoniste du récepteur humain FPRL-1 et de son homologue murin FPR 2 (Le *et al.*, 2000 ; Tiffany *et al.*, 2001). Les domaines du récepteur FPRL-1 nécessaires à l'interaction avec le peptide A β 1-42 ont été localisés en utilisant comme modèle d'étude la migration de cellules HEK 293 transfectées par des gènes chimères du récepteur FPRL-1. Cette interaction induit une mobilisation du calcium intracellulaire (Le *et al.*, 2004).

142-Elimination du peptide amyloïde par les cellules microgliales.

Trois mécanismes sont impliqués dans l'élimination du peptide A β : (a) la protéolyse extracellulaire ; (b) le transport à travers la barrière hémato-encéphalique et (c) l'ingestion convoyée par un récepteur. La néprilysine et l'*insulin-degrading enzyme*, notamment, 2 métalloprotéinases, parmi d'autres, capables de dégrader le peptide A β (Iwata *et al.*, 2000 ; Qiu *et al.*, 1998), peuvent jouer un rôle dans la protéolyse extracellulaire. Le transport du compartiment cérébral vers le compartiment sanguin met en jeu le récepteur gp330/mégaline et son ligand, l'ApoJ. L'ApoJ lie le peptide A β présent dans le LCR, et en permet la liaison au récepteur gp330/mégaline (Hammad *et al.*, 1997 ; Zlokovic *et al.*, 1996). Le LRP aussi convoierait le transport du peptide A β à travers la barrière hémato-encéphalique ; il agirait en coopération avec des ligands de ce récepteur (Shibata *et al.*, 2000). Les mécanismes d'endocytose et de phagocytose des fibres de peptide A β , discutés ci-après, pourraient être orchestrés par les cellules microgliales après qu'elles ont atteint le dépôt de peptide A β . En effet, un certain nombre d'études conduites *in vivo* suggèrent que ces cellules sont chargées de fibres amyloïdes et qu'elles éliminent le peptide du milieu de culture *in vitro*.

1421-Situation *in situ*.

(1) Situation chez l'Homme.

Le contenu cytoplasmique des cellules microgliales activées associées aux PS est hétérogène ; un tel fait suggère que ces cellules sont le siège d'une intense activité de phagocytose (Sheng *et al.*, 1997). Celle-ci, du reste, pourrait être dirigé contre les neurites dystrophiques qui entourent les PS.

Une étude ultrastructurale des cellules microgliales de patients atteints de MA a révélé que les fibres amyloïdes y sont localisées plutôt dans le réticulum endoplasmique (Frackowiak *et al.*, 1992) ; elle a donné à penser que les cellules microgliales sont engagées

dans la synthèse et non dans la phagocytose du peptide A β . Ultérieurement, il a été observé que la distribution intracellulaire du peptide A β ne se superpose pas aux structures impliquées dans la voie sécrétoire ; ce fait suggère, à l'inverse, que les cellules microgliales sont impliquées dans l'élimination du peptide A β (el Hachimi et Foncin, 1994). Les 2 fonctions, certes, ne sont pas mutuellement exclusives, et puisque les cellules microgliales expriment l'APP, on peut penser que production et clairance du peptide A β y coexistent.

Les résultats qui viennent d'être évoqués ci-dessus ont été partiellement confirmés ; des fragments de peptide A β tronqués du côté carboxyterminal ont été observés dans des granules cytoplasmiques de cellules microgliales (Akiyama *et al.*, 1996) et des fibres amyloïdes en décorent le cytoplasme (Lewandowska *et al.*, 1999). Cependant, aucun élément de ces travaux ne précise si la substance amyloïde est localisée dans une voie sécrétoire, ou dans une voie phagocytaire ou endocytaire. Ces expériences indiquent donc et indiquent seulement que les cellules microgliales contiennent du peptide A β .

(2) Situation chez l'animal.

Plusieurs souris transgéniques surexprimant l'APP sauvage ou mutée ont été produites afin de déterminer si un changement du métabolisme de cette protéine ou la formation de dépôts amyloïdes provoquaient une mort neuronale analogue à celle qui prévaut dans la MA. Aucun des modèles murins ne permet de conclure à l'heure actuelle que la formation de dépôts amyloïdes ou un changement du métabolisme de l'APP conduit à un phénotype neuropathologique analogue à celui de la MA. En effet, même si les souris surexprimant l'APP mutée présente une augmentation de la production de peptides ou de dépôts amyloïdes, aucune ne présente de DNF. Certaines de ces souches présentent divers déficits, comme des troubles du comportement et de l'apprentissage (Kumar-Singh *et al.*, 2000 ; Billings *et al.*, 2005), ou bien encore une perturbation de la plasticité synaptique (Chapman *et al.*, 1999 ; Fitzjohn *et al.*, 2001). D'autres présentent une vulnérabilité accrue au choc ischémique (Koistinaho *et al.*, 2002). Les analyses de coupes de cerveau d'animaux supposés mimer la MA n'apportent guère plus d'informations que celles tirées de l'observation des coupes de cerveaux de malades : du peptide A β est présent dans le cytoplasme des cellules microgliales de la Souris transgénique APP23 (Stalder *et al.*, 1999). Toutefois, la reconstruction tridimensionnelle des coupes sériées ultrafines indique que les fibres amyloïdes intracellulaires sont connectées au dépôt extracellulaire (Stalder *et al.*, 2001).

Les cellules microgliales ingèrent les dépôts amyloïdes isolés de cerveaux de malades et injectés dans les aires corticales et hippocampiques du Rat. La quasi-totalité des noyaux de dépôts amyloïdes est retrouvée dans le cytoplasme des cellules microgliales une semaine après injection (Frautschy *et al.*, 1992).

1422-Elimination du peptide amyloïde *in vitro*.

La plupart des études portant sur l'élimination du peptide A β par les cellules microgliales ont été réalisées en culture de cellules. L'élimination des fibres amyloïdes du milieu de culture est rapportée dans de nombreux travaux.

(1) Elimination du peptide A β fibrillaire.

Le peptide A β fibrillaire est éliminé du milieu de culture par les cellules microgliales de Rat (Shaffer *et al.*, 1995) ; il se retrouve dans les phagosomes (Ard *et al.*, 1996) et il y persiste jusqu'à 20 jours après que les cellules y ont été exposées (Frackowiak *et al.*, 1992). Des cœurs de PS extraites de cerveaux de patients sont aussi ingérés par les cellules microgliales *in vitro* (De Witt *et al.*, 1998).

L'identification des récepteurs impliqués dans la reconnaissance et dans l'absorption des peptides A β fait l'objet d'études intensives. Des cellules CHO transfectées par les gènes SR-A I et II de la Souris ou par le gène SR-B 1 du Hamster ingèrent le peptide A β fibrillaire. Le blocage de ces récepteurs par des ligands appropriés, aussi bien en lignées cellulaires manipulées génétiquement qu'en cellules microgliales de Souris, indique que chacun de ces récepteurs lie effectivement le peptide A β 1-42 (Paresce *et al.*, 1996). La liaison des fibres amyloïdes à ces mêmes récepteurs est suivie d'endocytose. Leur localisation intracellulaire est endosomique ; elle correspond en effet à celle de l' α 2M, protéine qui suit la voie typique de l'endocytose convoyée par un récepteur, le LRP en l'occurrence. Cependant des ligands du LRP ne modifient pas la clairance des fibres amyloïdes par les cellules microgliales (Paresce *et al.*, 1996). Le peptide A β 1-42 fibrillaire est partiellement résistant à la dégradation lysosomique et persiste dans les endosomes des cellules microgliales pendant au moins 12 jours (Paresce *et al.*, 1997 ; Chung *et al.*, 1999). Une partie du peptide A β finit par s'échapper dans le milieu de culture (Chung *et al.*, 1999).

Plusieurs agents modifient l'endocytose du peptide A β par les cellules microgliales. Les œstrogènes augmentent les capacités d'ingestion du peptide A β , et cet effet est inhibé par

un antagoniste du récepteur des œstrogènes (Li *et al.*, 2000b). Le composant C1q diminue la phagocytose du peptide A β 1-42 sans réduire celle des globules rouges de Mouton opsonisés par des Ac (Webster *et al.*, 2000).

(2) Elimination du peptide amyloïde non fibrillaire.

Les cellules microgliales sont capables d'éliminer le peptide A β sous forme monomérique ou non fibrillaire. Cependant cette clairance n'est pas convoyée par le SR-A car des ligands de ce récepteur n'en modifient pas le taux. Elle mettrait en œuvre la pinocytose (Chung *et al.*, 1999). Le peptide A β non fibrillaire rejoint le compartiment des endosomes tardifs dans lesquels il pourrait s'incorporer aux fibres amyloïdes déjà présentes. Les cellules microgliales seraient donc des acteurs majeurs de la formation des fibres amyloïdes.

Une étude récente donne du poids à cette hypothèse. En plus de son rôle de médiateur des propriétés chimiotactiques du peptide A β , le FPRL-1 est capable de capturer ce dernier. Bien que, dans l'étude discutée ici, la structure du peptide présenté aux cellules ne soit pas clairement établie, il semble bien que la forme qui se fixe au FPRL-1 soit non-fibrillaire, car des fibres de peptide A β se forment dans le cytoplasme des macrophages humains et des cellules HEK 293 (Yazawa *et al.*, 2001).

Des complexes de peptides A β et de diverses protéines peuvent être éliminés ultérieurement sous forme d'hétérodimères. Dans ce cas, la protéine additionnelle se lie à un récepteur que ne reconnaîtrait pas forcément le peptide A β isolé. Il existe au moins 3 molécules susceptibles de jouer ce rôle de médiateur de liaison : (a) la Lf (Qiu *et al.*, 1999) ; (b) l' α 2M (Qiu *et al.*, 1999) ; et (c) l'ApoE (Yang *et al.*, 1999). Le LRP, récepteur de la Lf, de l' α 2M et de l'ApoE, fixe les complexes qui sont alors éliminés par les cellules microgliales, par des neurones ou par des cellules génétiquement modifiées exprimant le LRP.

Ainsi émerge la notion de dualité fonctionnelle du LRP qui, en effet, joue un rôle aussi bien dans la synthèse que dans la capture du peptide A β .

143-La low density lipoprotein receptor-related protein.

Le LRP est un récepteur membranaire multifonctionnel très bien conservé au cours de l'évolution et qui fait partie de la grande famille du récepteur des LDL [*low density lipoprotein*]. Le LRP peut lier une grande variété de ligand et semble jouer un rôle important dans divers systèmes physiologiques et pathologiques.

1431-Identification et clonage de la *low density lipoprotein receptor-related protein*.

Ce récepteur a été cloné vers la fin des années 1980 (Herz *et al.*, 1988), au cours d'une recherche visant à isoler par la technique de criblage homologue des protéines partageant des domaines riches en répétitions de Cys, communes aux protéines du complément et au récepteur des LDL. Au cours de ce criblage, il est isolé le cDNA d'un récepteur candidat à l'ingestion de divers résidus. Ce cDNA code aussi des séquences qui ressemblent aux autres domaines du récepteur des LDL. En raison de cette similitude des domaines protéiques et des motifs structuraux, le récepteur est nommé LRP. Il se compose de 4.525 AA, ce qui en fait la plus grande protéine transmembranaire jamais décrite ; son mRNA fait 15 kb [kilobases] ; c'est un des plus long jamais identifié.

1432-Localisation de la *low density lipoprotein receptor-related protein*.

Le LRP est exprimé dans de nombreux tissus, principalement le foie, le cerveau et le placenta. Les types cellulaires qui expriment ce récepteur sont restreints ; il s'agit des hépatocytes, et, minoritairement des cellules de Kuppfer, des adipocytes, des fibroblastes, des macrophages, des neurones du SNC (Moestrup *et al.*, 1992 ; Wolf *et al.*, 1992) et des syncytiotrophoblastes placentaires.

Dans le cerveau adulte normal, la distribution de ce récepteur est assez ubiquiste : il est exprimé par les neurones en général, et avec une plus forte intensité dans les neurones du cortex et de l'hippocampe en particulier (Rebeck *et al.*, 1995).

Dans certaines conditions pathologiques, comme la réaction inflammatoire ou une agression infectieuse, les astrocytes expriment aussi le LRP. Son expression est localisée dans les prolongements astrocytaires de la zone périvasculaire, ce qui suggère que ce récepteur joue un rôle dans le fonctionnement de la barrière hémato-encéphalique.

Le LRP est exprimé dans les lésions cérébrales du cerveau de patients atteints de MA (Tooyama *et al.*, 1993). La découverte de ce récepteur dans les cellules microgliales est particulièrement intéressante car il a déjà été identifié dans les neurones et les astrocytes dans

certaines conditions pathologiques. Le fait que le LRP n'ait pas été observé plus tôt dans les cellules microgliales pourrait être imputable à la distribution, la morphologie et les fonctionnalités hétérogènes de la cellule microgliale dans le SNC. Elles sont en effet relativement petites lorsqu'elles ne sont pas totalement activées ; elles représentent moins de 20 % de la population totale des cellules gliales et sont fréquemment associées aux astrocytes.

La cellule microgliale ingère un ligand du LRP (Paresce *et al.*, 1997) mais l'identité du récepteur mis en cause dans cette ingestion n'est pas connue. Un autre ligand du LRP, le tPA [*tissue type plasminogen activator*], serait impliqué dans l'activation des cellules microgliales (Rogove *et al.*, 1999). Les cellules microgliales de Rat expriment le récepteur LRP *in vitro*. (Marzolo *et al.*, 2000). *In vivo*, ce dernier est également retrouvé dans les muscles lisses et dans les macrophages humains, ainsi que dans les macrophages de Souris et de Lapin peuplant les lésions athéroscléreuseuses (Luoma *et al.*, 1994 ; Hiltunen *et al.*, 1998 ; Leppänen *et al.*, 1998). Chez l'homme, ce récepteur est abondamment exprimé par les cellules du muscle lisse et de la paroi artérielle. De là vient l'hypothèse de son implication dans l'athérosclérose.

1433- Biosynthèse de la *low density lipoprotein receptor-related protein*.

La synthèse du LRP débute par la formation, dans le réticulum endoplasmique, d'un précurseur polypeptidique à chaîne unique et de MM apparent de 600 kD. Le précurseur subit ensuite une N-glycosylation et une protéolyse dans le compartiment golgien (Herz *et al.*, 1990). C'est là qu'il est clivé par la furine entre les AA 3.924 et 3.925, localisés dans la région homologue du précurseur de l'EGF. Cette protéolyse permet d'engendrer 2 sous unités : une sous-unité aminoterminal de 515 kD contenant une portion majeure — extracellulaire — de la molécule, associée de manière non-covalente, mais en étroite juxtaposition, à une petite sous-unité carboxyterminale de 85 kD contenant le domaine transmembranaire et le domaine intracytoplasmique.

1434-Structure de la *low density lipoprotein receptor-related protein*.

Le LRP est composée de 4.525 AA formant une série de domaines protéiques caractéristiques (Figure 1.13). La portion extracellulaire aminotermine du LRP est composée de copies multiples de 3 ou 4 motifs structuraux, présents également dans le domaine extracellulaire du récepteur des LDL. Ces motifs incluent des répétitions riches en Cys [RREC], aussi appelée domaine de liaison ligand/récepteur, des RREC du domaine de l'EGF et un domaine homologue du précurseur de l'EGF, des régions d'espacement (*spacer*) et enfin une troisième répétition de type EGF. Le domaine O-glycosylé juxtamembranaire du récepteur des LDL est absent du LRP.

La partie extracellulaire du LRP se compose d'une grande sous-unité de 31 séquences du type RREC, désignées comme les répétitions ligand-récepteur, et de 22 séquences présentant un domaine homologue de l'EGF (le récepteur des LDL contient uniquement 3 RREC, localisées dans le domaine homologue du précurseur de l'EGF). Cette multiplicité des répétitions paraît apporter au LRP une structure idéale capable d'engendrer de nombreux sites de liaison distincts pour des ligands variés. Cette interprétation est confirmée par l'absence générale de compétition entre les différents ligands susceptibles de se lier au LRP. On peut cependant remarquer que ce dernier ne peut lier l'ApoB, comme le fait le récepteur des LDL.

Le LRP est une protéine membranaire de type I : l'extrémité aminotermine est extracellulaire, l'extrémité carboxyterminale est intracellulaire. Elle est ancrée à la membrane plasmique par un seul segment transmembranaire. Le domaine carboxyterminal cytoplasmique est constitué de 100 AA. Le nombre d'AA est le double de celui qui compose le domaine intracellulaire du récepteur des LDL. La petite sous-unité carboxyterminale de 85 kD du LRP contient 2 copies du motif Asn [N]-Pro [P]-X-Tyr [Y]. Une copie au moins de ce motif est présente dans la queue intracytoplasmique de tous les membres de la famille des récepteurs des LDL. C'est en général le signal d'ingestion, qui permet de guider les récepteurs des LDL vers les puits à clathrine (Chen *et al.*, 1990). En revanche, dans le cas du LRP, le signal prédominant d'endocytose serait le motif Tyr [Y]-X-X-Lys [L] (Li *et al.*, 2001).

FIGURE 1.13.
Structure de la *low density lipoprotein receptor-related protein*. (D'après Lestavel et Fruchart, 1994).



1435-La *low density lipoprotein receptor-related protein* : un récepteur endocytaire.

Le LRP est un récepteur d'endocytose doté de nombreux rôles physiologiques, notamment de celui de régulateur du métabolisme des lipides et de la croissance neuritique. Il est aussi impliqué dans l'athérogenèse, dans la migration cellulaire et dans la réponse immunitaire. Il joue un rôle important dans l'activité protéolytique, tout particulièrement par sa capacité à lier et à ingérer l' α 2M activée, les activateurs du plasminogène et certains facteurs de croissance.

Le LRP peut aussi être impliqué dans la phagocytose des corps apoptotiques ou des globules rouges de Mouton (Patel *et al.*, 2003) et il a été montré récemment dans notre laboratoire que le LRP peut phagocyter des levures opsonisées par le peptide amyloïde (Laporte *et al.*, 2004).

Le LRP possède dans son domaine intracytoplasmique les signaux potentiels d'endocytose (YXXL ou NPXY) ; cette caractéristique suggère qu'il intervient dans

l'endocytose de divers ligands. On a étudié l'effet de divers Ac monoclonaux dirigés le LRP (Herz *et al.*, 1990). Le premier, dénommé LRP-515, reconnaît la portion extracellulaire du LRP ; sa liaison est dépendante de pH : l'Ac se lie à pH physiologique, mais il est relargué à pH acide. Une fois lié au LRP, l'Ac LRP-515 est ensuite ingéré, relargué lors de l'acidification physiologique des endosomes, puis il est dégradé dans les lysosomes. Un autre Ac, le LRP-85, en revanche, se lie à la petite sous-unité transmembranaire de 85 kD — qui ne contient pas de domaine homologue du précurseur de l'EGF. Il n'est pas relargué à pH acide. Il est endocyté avec le récepteur, mais il ne subit pas de dégradation lysosomique, et il est recyclé avec le LRP à la surface de la membrane plasmique. On peut donc conclure que le relargage des ligands du LRP comme du récepteur du LDL nécessite la présence du domaine homologue du précurseur de l'EGF qui joue le rôle de région sensible au pH. Les Ac marqués à l'iode radioactif et injectés par voie intraveineuse à des lapins sont rapidement éliminés de la circulation par le foie, ce qui montre que le LRP peut fonctionner *in vivo* comme un récepteur hépatique de clairance.

(1) Récepteur de l'apolipoprotéine E.

Les ApoE sont des protéines ubiquistes synthétisées principalement dans le foie. Leur seconde source de production est le cerveau. Elle y est assurée par les oligodendrocytes, par les cellules microgliales et par les astrocytes. Le LRP permet l'endocytose des débris lipoprotéiques riches en ApoE par le foie. Des Ac polyclonaux dirigés contre le LRP ont montré qu'il est impliqué dans l'internalisation des β -VLDL [*very low density lipoprotein*] d'une manière dépendante de l'ApoE, dans des cultures de fibroblastes déficientes en récepteurs des LDL (Kowal *et al.*, 1989). Les β -VLDL constituent une fraction lipoprotéique riche en cholestérol contenant principalement des résidus de chylomicrons et de VLDL. Ces résidus sont des ligands du récepteur des LDL. Mais une fois qu'ils sont enrichis en ApoE, ils peuvent aussi être reconnus par le LRP. Le LRP est donc capable de fixer avec une forte affinité les particules lipoprotéiques enrichies en ApoE, ce qui permet, semble-t-il, une endocytose efficace. Ainsi, seuls les chylomicrons totalement dégradés, et qui ont accumulé suffisamment d'ApoE, seraient éliminés dans le foie par l'intermédiaire du LRP. L'ApoE est ensuite dégradée tout au long de la voie endosomique/lysosomique. Les lipoprotéines enrichies en ApoE seraient mieux ingérées après leur liaison à des HSPG exprimés à la surface des cellules (Mahley *et al.*, 1999). L'ApoE n'a pas pour unique fonction d'apporter des

lipides aux cellules. Certaines de ses isoformes seraient aussi impliquées dans l'excrétion/évacuation des lipides hors des astrocytes et des neurones (Michikawa *et al.*, 2000).

(2) Récepteur de la lipoprotéine lipase.

La lipoprotéine lipase [LPL] est une enzyme exprimée principalement à la surface des cellules endothéliales des capillaires périphériques du muscle et des tissus adipeux. Elle est responsable de l'hydrolyse des triglycérides dans les chylomicrons et dans les VLDL. Le LRP est nécessaire à l'endocytose et la dégradation de la LPL par des cellules en culture. La LPL peut aussi se substituer à l'ApoE, ou s'y ajouter, pour convoier la liaison des lipoprotéines au LRP. Cette enzyme pourrait donc jouer un rôle actif dans l'internalisation hépatique des résidus de chylomicrons et de VLDL. Pourtant, *in vivo*, la LPL seule n'est pas suffisante à l'accomplissement de cette fonction : la présence d'ApoE est requise. En effet, des Souris ou des patients génétiquement déficients en ApoE développent un défaut profond de la clairance des résidus de chylomicrons et de VLDL (*remnants*), bien qu'ils expriment des quantités normales de LPL (Zhang *et al.*, 1992).

(3) Récepteur de la lactoferrine.

La Lf est une protéine qui inhibe la multiplication des bactéries. Elle est sécrétée par les polynucléaires neutrophiles. C'est un ligand du LRP. A de très faibles concentrations (10 µg/mL), la Lf entre en compétition de manière très efficace avec les lipoprotéines dépendantes de l'ApoE dans des cellules en culture (Willnow *et al.*, 1992). L'injection de Lf à des lapins inhibe l'ingestion hépatique des résidus de chylomicrons et de VLDL. De telles observations confirment de manière indirecte le rôle du LRP dans la fixation des *remnants* dans le foie.

(4) Récepteur de l' α 2-macroglobuline.

L' α 2M est une grande glycoprotéine plasmatique tétraédrique formée de 4 sous-unités identiques. Le cDNA du gène du LRP est identique à celui du gène du récepteur de l' α 2M (Strickland *et al.*, 1990). L' α 2M est également présente dans le cerveau humain. Elle a pour principale propriété d'être un inhibiteur circulant des Ser-protéases. Elle représente 30 % de l'activité anticoagulante totale du plasma. La liaison covalente de l'endoprotéinase à la région amorce de l' α 2M induit un changement de conformation de l'inhibiteur, changement qui lui permet, par exposition du site de liaison, son interaction avec le LRP. Une fois formés, les complexes α 2M activée [α 2M*]/protéase sont éliminés rapidement du plasma par l'intermédiaire de récepteurs de haute affinité exprimés dans le foie.

Le LRP peut servir de récepteur pour la clairance de nombreuses protéases sériques et notamment pour les complexes α 2M*/protéase. De nombreuses cytokines et facteurs de croissance de petite MM, comme le TGF β , l'IL-6, le NGF, et le PDGF circulent en partie complexés à l' α 2M* et peuvent être éliminés de la circulation par un mécanisme endocytose convoyée par le LRP.

Le traitement de l' α 2M avec la méthylamine entraîne le clivage d'un pont thiol-ester intramoléculaire. Ce clivage entraîne le changement conformationnel induit par l'attaque de l'endoprotéinase ; il permet donc de produire la forme active de l' α 2M, la seule capable de se lier au LRP (Warshawsky *et al.*, 1993).

(5) Activation et inhibition du plasminogène.

Le LRP peut convoier l'ingestion d'autres complexes de type inhibiteur/protéase, comme les complexes activateurs/inhibiteurs du plasminogène, et intervenir dans leur dégradation. En facilitant leur élimination de la surface de la cellule, le LRP joue ainsi un rôle dans fibrinolyse et le remodelage tissulaire. Les complexes formés par les activateurs du plasminogène tPA et uPA [*urokinase type plasminogen activator*] et leur inhibiteur PAI-I [*plasminogen activator inhibitor-I*] sont reconnus avec une forte affinité par le LRP. Les activateurs du plasminogène sont produits surtout par les cellules endothéliales. Ils possèdent une forte affinité pour la fibrine. Une fois stabilisés par cette liaison, le tPA et l'uPA transforment, grâce à leur activité enzymatique exprimée à la surface de la fibrine, le plasminogène en plasmine. La plasmine est une enzyme protéolytique très active, mais ayant une faible spécificité de substrat. Elle participe à de nombreux processus biologiques comme la restauration tissulaire, la fibrinolyse et la thrombolyse.

Le PAI-I est sécrété par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les plaquettes. Il se lie spécifiquement au tPA et à l'uPA pour les inactiver et arrêter la fibrinolyse. Le tPA et le complexe tPA/PAI-I se lient à des sites chevauchants mais distincts à hauteur du second domaine du LRP (Orth *et al.*, 1994). Le tPA peut donc être reconnu par le LRP indépendamment du PAI-I. Le LRP peut éliminer le tPA de la circulation (Warshawsky *et al.*, 1993). Il existe une autre voie d'élimination pour ce dernier. Elle fait intervenir le récepteur de mannose qui en reconnaît les groupes riches en mannose.

En revanche, l'ingestion de l'uPA ne peut se faire directement. L'endocytose du complexe uPA/PAI-I par le LRP nécessiterait qu'il interagît préalablement avec son propre récepteur à la surface des cellules [uPAR]. L'uPA liée à l'uPAR reste à la surface cellulaire pendant un long moment. L'inactivation de cette protéase fixée à son récepteur par le PAI-I entraîne une ingestion rapide du complexe par endocytose suivie d'une dégradation lysosomique (Jensen *et al.*, 1990). Comme l'uPAR ne présente pas de queue cytoplasmique pourvue d'un signal d'endocytose, le LRP intervient pour éliminer le complexe uPAR/uPA/PAI-I (Conese *et al.*, 1995).

(6) Récepteur du composant C3 du système du complément.

Le composant C3 du système du complément et l' α 2M dérivent d'un gène ancestral commun. Cet ancêtre commun, décrit chez l'Arthropode *Limulus polyphemus*, est une protéine à pont thiol-ester, combinant les fonctions spécifiques de l' α 2M et du composant C3 : capacité de cytolysse et inhibition des protéases (Armstrong *et al.*, 1993). Malgré l'évolution, et l'expression de fonctions divergentes, des homologies structurales persistent, notamment chez les Mammifères, entre les 2 produits. C'est pourquoi on a étudié la capacité du LRP à lier le composant C3 activé et le fragment C3b et à en convoier l'endocytose, aussi bien qu'il le fait pour l' α 2M* (Meilinger *et al.*, 1999). L'obtention des formes activées de ces 2 protéines repose d'ailleurs sur le même mécanisme, la coupure d'un pont thiol-ester.

Le composant C3b peut se lier à une protéine endosomique humaine de 600 kD de MM. La *receptor associated protein* [RAP], la Lf et l'endotoxine A de *Pseudomonas* qui sont des ligands connus du LRP rentrent en compétition avec le fragment C3b pour la liaison à cette protéine. La liaison est sensible à la diminution de l'expression du LRP et elle est dépendante des ions calcium. (Le récepteur des LDL et les récepteurs apparentés sont eux aussi dépendants des ions calcium ; les mécanismes d'endocytose qu'ils convoient sont inhibés par l'EDTA.) Toutes ces caractéristiques sont typiques des répétitions riches en Cys propres

aux membres de la famille des récepteurs des LDL — le LRP en possède 31, réparties en 4 groupes contenant respectivement 2, 8, 10 et 11 répétitions — ; elles assurent la liaison des ligands au récepteur. La liaison de C3b au LRP ne requiert que l'un de ces 4 groupes : en effet, le LR8, récepteur du poulet, homologue du récepteur des LDL et qui ne porte que 8 répétitions, peut aussi lier le fragment C3b. Des fibroblastes de Souris exprimant le LRP peuvent ingérer du fragment C3b. L'ingestion est saturable et elle est inhibée par RAP. En revanche, le composant C3 natif ne peut être endocyté.

(7) Récepteur de ligands contenant le domaine KPI.

Le domaine KPI est un domaine inhibiteur des Ser-protéases, du type inhibiteur de Kunitz (aussi appelé protéase Nexine II). Le LRP peut fixer diverses protéines contenant un domaine KPI, comme l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire TFPI [pour *tissue factor proteinase inhibitor*] et certaines formes secrétées de l'APP (Kounnas *et al.*, 1995). L'APP existe sous différents isoformes résultant d'un épissage alternatif de son mRNA. Les isoformes les plus longs (APP770 et APP751) contiennent un domaine KPI capable d'inhiber des protéinases tels que les facteurs XIa et IXa ; elles sont exprimées aussi bien par des neurones que par d'autres types cellulaires.

Le TFPI est une glycoprotéine inhibitrice des sérines protéinases du type inhibiteur de Kunitz ; il est secrété par les cellules endothéliales. Il régule négativement le FT [facteur tissulaire] qui permet le déclenchement de la voie extrinsèque de la coagulation, dite d'urgence. En l'inhibant, le FTPI bloque le déclenchement de la coagulation.

Des études conduites *in vitro* sur des cellules d'hépatomes ont montré que le LRP permet l'ingestion et la dégradation du TFPI (Narita *et al.*, 1995). Cependant, des sites de liaison distincts, de basse affinité, semblent exister à la surface de l'endothélium et des hépatocytes. Ce sont les HSPG. Effectivement, un blocage des sites HSPG par de la protamine, induit une inhibition de liaison du TFPI à des cellules d'hépatomes en lignée. *In vivo*, des Souris surexprimant RAP présentent une diminution de la clairance de TFPI. Cette dernière est complètement inhibée en présence de protamine et ce fait prouve que le LRP et les HSPG sont responsables de la clairance du TFPI *in vivo*.

Le LRP peut aussi reconnaître et internaliser d'autres ligands. Nous ne les avons pas discutés en détail pour ne pas alourdir cette introduction. Il suffira d'en donner la liste. On y trouve la thrombospondine I, protéine de la matrice extracellulaire qui interagit avec d'autres protéines comme la fibronectine et le collagène pour réguler la prolifération, la migration et

l'adhésion cellulaires, des ligands toxiques comme l'endotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa* (Kounnas *et al.*, 1992), des ligands viraux comme les *Rhinovirus* humains, et des ligands divers comme les facteurs de coagulation IXA et la cofacteur VIII (Neels *et al.*, 2000).

1436-Les différentes voies de liaison et d'ingestion des ligands par la *low density lipoprotein receptor-related protein*.

Le récepteur LRP est capable d'internaliser ces ligands de 3 manières différentes : (a) après liaison aux protéoglycannes (cas des lipoprotéines enrichies en ApoE), (b) après liaison à des récepteurs cellulaires (cas d'uPAR), et enfin (c) après liaison directe (cas de l' α 2M* ou du tPA) (Figure 1.14).

(1) Liaison indirecte.

Le LRP peut internaliser des ligands liés à d'autres sites de la surface cellulaire comme l'ApoE et la LPL associées aux protéoglycannes extracellulaires, et les complexes uPA/PAI-I, liés aux récepteurs uPAR.

L'ApoE ou la LPL jouent un rôle dans l'ingestion des *remnants* de lipoprotéines par les cellules. Le traitement de ces dernières par de l'héparinase diminue en effet de manière importante l'ingestion des lipoprotéines ou de la LPL convoyée par le LRP (Ji *et al.*, 1994). L'uPAR ne contient pas de signal d'endocytose ; les complexes uPA/PAI-I ne peuvent pas être endocytés lorsque le LRP est bloqué.

(2) Liaison directe.

Il existe des ligands qui, contrairement à l'ApoE ou au LPL, se lient directement au LRP et sont ingérés sans liaison intermédiaire à d'autres protéines de surface. C'est le cas des complexes α 2M*/endoprotéinase, du tPA et de la vitellogénine. Par contre cette dernière échappe à la dégradation lysosomique grâce à une translocation à travers les membranes intracellulaires vers le cytoplasme où, en plus de son activité enzymatique, elle inactive le facteur d'élongation 2.

1437-Signalisation intracellulaire déclenchée par l'engagement de la *low density lipoprotein receptor-related protein*.

Le LRP intervient dans la signalisation intracellulaire. Il participe, par la signalisation intracellulaire qu'engendre son engagement, à la croissance neuritique. L' α 2M, l'ApoE et d'autres ligands du LRP stimuleraient par ce moyen la croissance neuritique. La régulation négative de l'expression du gène du tPA dans des fibroblastes de colon serait convoyée par l'interaction du tPA avec le LRP (Hardy *et al.*, 1997). Le LRP contrôle l'endocytose et l'ubiquitination du récepteur du PDGF (Takayama *et al.*, 2005). Il est clivé par la BACE (Von Arnim *et al.*, 2005). Le LRP reconnaît la protéine Wnt et active la voie des β -catenines en conjonction avec le récepteur *Frizzled* (Cong *et al.*, 2004).

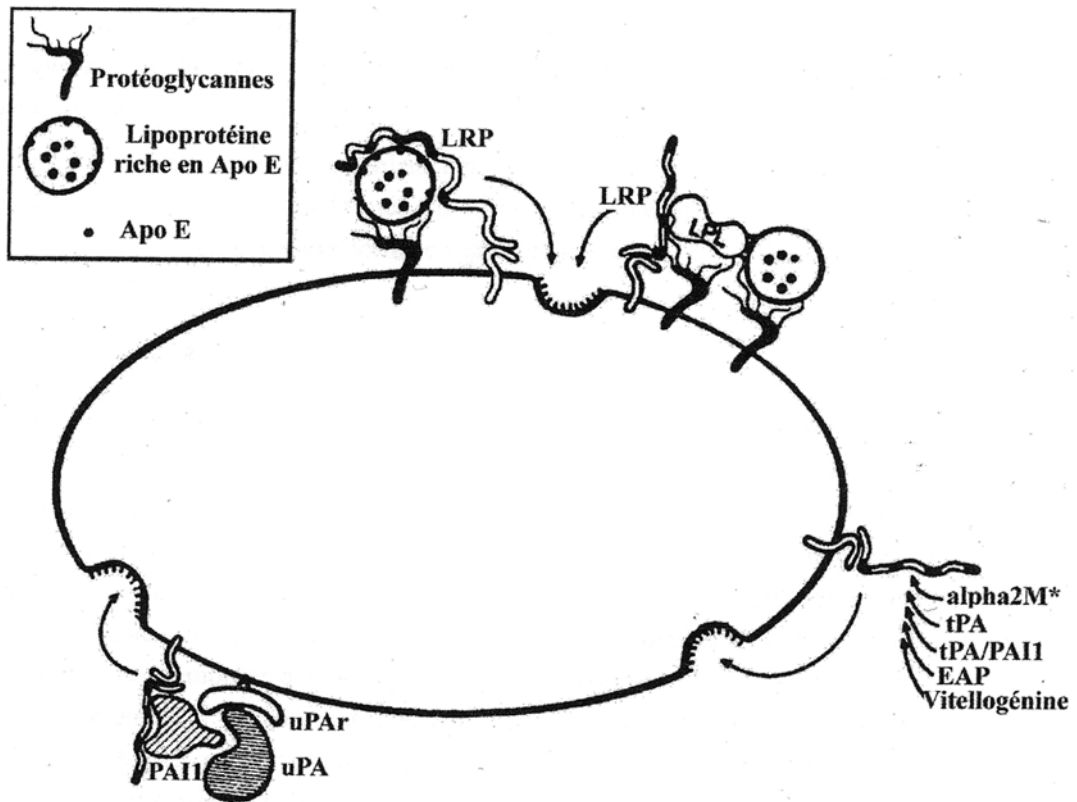
La queue intracytoplasmique du LRP interagit avec une protéine hétérotrimérique liant le GTP ; il s'ensuit une activation de la protéine kinase A [PKA] (Goretzki *et al.*, 1998) faisant intervenir 2 adaptateurs protéiques appelés FE65 et DAB1. Elle interagit aussi avec le domaine intracellulaire de l'APP (Kinoshita *et al.*, 2003 ; Trommsdorff *et al.*, 1998). La queue intracytoplasmique du LRP est phosphorylée par une PKC α à hauteur des résidus Ser et Thr. Cette phosphorylation réduit l'association du LRP à des protéines intracellulaires comme Shc, et elle en augmente l'interaction avec Dab-1 et CED-6/GULP, molécules impliquées dans l'endocytose (Ranganathan *et al.*, 2004) ainsi que dans la phagocytose de cellules apoptotiques convoyées par ce récepteur (Su *et al.*, 2002). Plusieurs autres kinases sont capables de phosphoryler le LRP comme Src, Yes et Fyn (Barnes *et al.*, 2003). La liaison de uPAR au LRP régule l'activation d'erk et de Rac-1 lors de la migration cellulaire (Ma *et al.*, 2002).

1438-La *low density lipoprotein receptor-related protein* et la maladie d'Alzheimer.

De nombreux ligands du LRP sont des composants de la PS, et notamment l'ApoE, l' α 2M*, la Lf, l'héparane sulfate, le tPA, l'uPA, la LPL et enfin le PAI-I (Rebeck *et al.*, 1995). Tous ces composants s'accumulent en effet dans cette structure. On trouve des taux élevés de certaines de ces substances (ApoE, plasmine et α 1ACT) dans le sérum et le LCR de patients atteints de MA. Ces observations suggèrent que l'expression ou le fonctionnement du LRP sont déficients.

FIGURE 1.14.

Les différentes voies d'internalisation des ligands par le LRP. (D'après Krieger et Herz, 1994).



Le LRP est le point de convergence du métabolisme de 3 protéines (ApoE, α_2M et APP) impliquées dans les aspects génétiques et biochimiques de la MA. Les lipoprotéines contenant de l'ApoE et ingérées par l'intermédiaire de ce récepteur, convoient les effets neurotrophes de cette substance (Narita *et al.*, 1997). En outre, la plupart des ligands du LRP, comme la Lf et l' α_2M stimuleraient, l'extension neuritique.

Le LRP est exprimé par presque tous les neurones du SNC. Chez les sujets sains, le LRP est détecté dans les neurones, dans les cellules gliales et dans les cellules de certains capillaires ; le marquage neuronal est accru dans la région de l'hippocampe et dans le cortex entorhinal (Tooyama *et al.*, 1993). Chez les malades, l'immunoréactivité du LRP est augmentée dans certains neurones comme l'est aussi le nombre de cellules gliales marquées. De plus les PS, les DNF et les extensions neuritiques dystrophiques expriment aussi le LRP. Cette observation confirme l'implication de ce récepteur dans la MA. Enfin il convient de

noter que l'expression du LRP est significativement réduite chez les sujets atteints de MA en comparaison de son expression chez des sujets sains.

Le LRP est aussi impliqué dans la clairance des peptides amyloïdes (voir la SECTION Elimination du peptide amyloïde). Un de ses ligands, l' $\alpha 2M^*$, peut se lier au peptide amyloïde, et le complexe $\alpha 2M^*/A\beta$ peut-être dégradé par une voie qui implique le LRP (Narita *et al.*, 1997). En outre, l'incubation du peptide avec l' $\alpha 2M^*$ en réduit l'agrégation (Du *et al.*, 1998). En culture, des neurones corticaux de Rat sont moins sensibles à l'action toxique du peptide lorsqu'ils sont prétraités avec de l' $\alpha 2M^*$. On peut donc penser que l' $\alpha 2M^*$ maintient le peptide en une forme soluble et diminue la probabilité qu'il a de former des fibrilles ou d'exalter ses propriétés toxiques directes *in vitro*.

1439-Production du peptide β -amyloïde : dualité de la *low density lipoprotein receptor-related protein*.

Le LRP joue un rôle dans le métabolisme de l'APP et donc dans la génération de peptide amyloïde. Le LRP convoie l'endocytose des isoformes de l'APP porteuses du domaine KPI, qu'elles soient sous leur forme soluble (Kounnas *et al.*, 1995) ou membranaire (Knauer *et al.*, 1996). Il s'agit principalement de l'APP751 et de l'APP770 transmembranaires. Dans le SNC, ces formes longues sont les plus abondantes. Il existe une troisième isoforme d'APP, dépourvue celle-là de domaine KPI, l'APP695. L'ingestion de l'APP est une étape importante pour la production de peptides amyloïdes dans certains systèmes. L'interaction APP/LRP affecte donc incontestablement la production de ceux-ci (Perez *et al.*, 1999).

La culture à long terme de cellules en présence de RAP entraîne une augmentation de l'APP de surface et une réduction significative de la production de peptide. De plus si on restaure l'expression du gène codant le LRP dans des cellules qui ne l'exprimaient plus, mais produisait de manière stable de l'APP, on observe une augmentation de la production de peptide amyloïde. Le LRP contribue donc à la production du peptide (Ulery *et al.*, 2000).

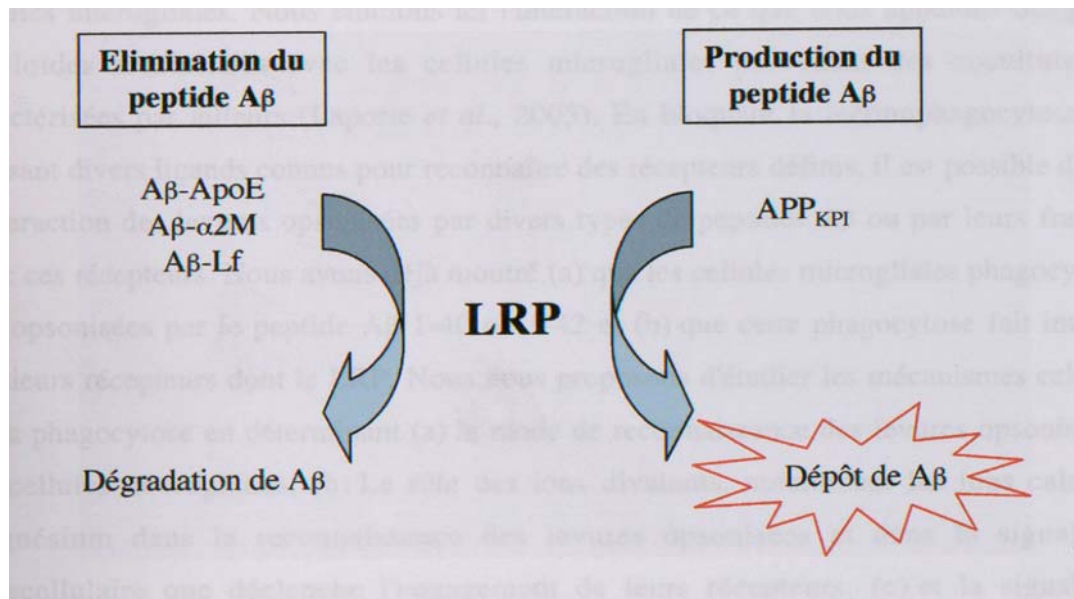
On peut supposer que les interactions LRP/APP avec la surface cellulaire modulent le trafic de l'APP au sein de la voie endosomique et favorisent la voie amyloïdogène. En se liant au LRP, l'APP peut subir des changements conformationnels rendant plus accessibles les sites de clivage par les β - et γ -sécrétases.

Le LRP, inversement, est impliqué dans la clairance du peptide soluble sans que sa production à partir de l'APP695 ne soit modifiée (cette isoforme est dépourvue du domaine KPI). Le LRP et l'APP695 sont exprimés de manière prédominante par les neurones. Une

diminution de l'expression du LRP dans le cerveau de patients atteints de MA a donc un impact négatif sur la clairance du peptide mais non sur sa production à partir de l'APP695 (Kang *et al.*, 2000) (voir Figure 1.15).

FIGURE 1.15

Dualité fonctionnelle de la *low density lipoprotein receptor-related protein* dans la maladie d'Alzheimer. (D'après Ulery et Strickland, 2000).



15-Présentation et objectifs du travail.

Nous avons validé dans notre laboratoire un modèle expérimental qui permet d'étudier l'élimination des dépôts de fibres amyloïdes par les cellules microgliales ayant une taille comparable à celle des PS (Laporte *et al.*, 2004). Notre modèle d'étude consiste à préparer des PS artificielles par la fixation de peptide Aβ à la surface de levures (*S. cerevisiae*) autoclavées [LA]. Selon la nature du peptide [Aβ 1-40 ou Aβ 1-42] qui recouvre les LA, on leur donnera désormais le nom de LA 1-40 et LA 1-42.

L'utilisation de LA pour fixer les fibres présente un double intérêt. D'une part, la phagocytose des LA non opsonisées a été très soigneusement étudiée et décrite dans notre laboratoire (Giannis *et al.*, 1993). On lui donne le nom de lectinophagocytose car elle est convoyée par des récepteurs de type lectine — le récepteur du mannose et le récepteur des β-glucannes en l'occurrence. Les α-mannanes solubles et la laminarine, ligands respectifs de ces 2 récepteurs, bloquent la lectinophagocytose des LA. Il est donc possible de contrôler la

reconnaissance des structures propres aux LA, et il est légitime de les assimiler à des supports inertes quand elles sont recouvertes de fibres de peptides A β . En outre, les LA sont des particules de taille suffisamment importante et elles présentent des propriétés tinctoriales telles qu'il est possible de quantifier précisément la phagocytose et de distinguer les levures ingérées des levures adsorbées à la surface du phagocyte.

Un système de coculture établi au laboratoire, permet d'obtenir en continu des cellules microgliales. Nous étudions ici l'interaction de ce que nous appelons des plaques amyloïdes artificielles avec les cellules microgliales provenant des cocultures bien caractérisées par ailleurs (Laporte *et al.*, 2005). En bloquant la lectinophagocytose, et en utilisant divers ligands connus pour reconnaître des récepteurs définis, il est possible d'étudier l'interaction des levures opsonisées par divers types de peptides A β ou par leurs fragments avec ces récepteurs. Nous avons déjà montré (a) que les cellules microgliales phagocytent les LA opsonisées par le peptide A β 1-40 ou 1-42 et (b) que cette phagocytose fait intervenir plusieurs récepteurs dont le LRP. Nous nous proposons d'étudier les mécanismes cellulaires de la phagocytose en déterminant (a) le mode de reconnaissance des levures opsonisées par les cellules microgliales, (b) Le rôle des ions divalents, notamment les ions calcium et magnésium dans la reconnaissance des levures opsonisées et dans la signalisation intracellulaire que déclenche l'engagement de leurs récepteurs, (c) et la signalisation intracellulaire déclenchée par cet engagement.

En d'autres termes, nous nous proposons de contribuer à étudier le mécanisme de l'élimination des diverses formes de peptides A β par les cellules microgliales. S'il est avéré que les cellules microgliales jouent un rôle très important dans l'élimination des peptides A β , il apparaît logique de conclure que la modulation de ce phénomène peut contribuer à modifier le cours de la MA.

2-MATERIELS ET METHODES.

21-Culture des cellules.

211-Cellules microgliales en coculture.

Les cocultures — ainsi appelées parce que les cellules microgliales adhérentes au support sont associées à des cellules astrogliales — référencées NA [pour non activée] 1, sont entretenues dans des flacons de plastique de 25 cm² (Falcon, Becton Dickinson, Le Pont-de-Claix, France). Les cellules sont cultivées en milieu RPMI 1640 (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France), additionné de 10 % (volume [v]/v) de sérum fœtal de veau [SFV] (Life Technologies) décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30 min, de 2 x 10⁵ unités [U]/l de benzylpénicillate de sodium (Life Technologies) et de 40 µg/mL de sulfate de streptomycine (Life Technologies) ; ce milieu est appelé milieu de culture. Les cellules sont cultivées à 37°C dans un incubateur à air (95 %)-CO₂ (5 %) humidifié. Lorsque les cocultures sont établies, la plupart des cellules adhèrent au support ; seule une fraction d'entre elles passe spontanément en suspension. Ces cocultures évoluent et sont entretenues comme les cocultures de macrophages dont le mode d'établissement a été mis au point au laboratoire (Lombard *et al.*, 1985, 1988).

La moitié du milieu de culture (environ 5 mL/flacon) est renouvelée 2 fois par semaine. Dans ces conditions, des cellules de la couche passent spontanément en suspension dans le milieu de culture qui, au moment du renouvellement du milieu, en contient environ 50.000 par mL ; la viabilité cellulaire est évaluée par l'épreuve d'exclusion du bleu trypan (Life Technologies) ; le pourcentage de cellules viables est supérieur à 90 % ; il s'agit pour l'essentiel de cellules microgliales.

212-Cellules BV2.

Les cellules BV2 sont entretenues dans des flacons de plastique de 75 cm² (Falcon). Elles sont cultivées en milieu RPMI 1640 (Life Technologies), additionné de 10 % (v/v) de (Life Technologies) décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30 min, de 2 x 10⁵ U/l de benzylpénicillate de sodium (Life Technologies) et de 40 µg/ml de sulfate de streptomycine ; ce milieu est appelé milieu de culture. Elles sont cultivées à 37°C dans un incubateur à air (95 %)-CO₂ (5 %) humidifié. Une fraction des cellules passe spontanément en suspension. La moitié du milieu de culture (environ 5 ml/flacon) est renouvelée 2 fois par semaine. Dans ces

conditions, des cellules de la couche passent spontanément en suspension dans le milieu de culture qui au moment du renouvellement du milieu en contient environ 80.000 par mL.

22-Préparation des fibres de peptide β -amyloïde.

Les peptides A β 1-40 et A β 1-42 fournis sous forme de lyophilisats (Bachem, Voisins-le-Bretonneux, France), sont dissous dans de l'eau distillée stérile à raison d'1 mg de peptide par mL. La solution est répartie en portions aliquotes de 20 μ L, portions que l'on conserve à -80°C. En fonction des besoins expérimentaux, les tubes sont placés à l'étuve à 37°C pour favoriser la formation de fibres par les divers peptides. Nous appelons "fibrogenèse" ce phénomène. La durée d'incubation est variable selon les lots de peptide ; elle est décidée après analyse de la fibrogenèse au microscope électronique et après des épreuves de phagocytose conduites à différents jours d'incubation.

23-Préparation des plaques séniles artificielles.

231-Culture des levures.

La souche de *S. cerevisiae* utilisée dans les expériences de phagocytose est une souche locale. Elle est cultivée dans un milieu de Sabouraud, sous agitation, pendant 72 h à 28°C. Au bout de ce temps, la suspension de levure est tuée par un autoclavage de 45 min, à 120 °C. La suspension de LA est ensuite lavée 2 fois avec de la solution saline tamponnée aux phosphates et dépourvue d'ions calcium et magnésium [PBS⁻]. Les LA sont alors dénombrées à l'aide d'un cytomètre, et la suspension est ajustée à 4 x 10⁹ particules par mL. Cette préparation est ensuite répartie en portions aliquotes de 50 mL et elle est conservée à 4°C.

232-Opsonisation des levures par les fibres amyloïdes.

La suspension de LA est distribuée dans des tubes Eppendorf (1 mL de suspension à 2 x 10⁸ levures par tube) et centrifugée pendant 6 min à 3.200 x g. Après élimination du surnageant, le culot est repris dans 20 μ L de solution de peptide fibrillaire et le mélange est

incubé à température ambiante pendant une nuit. Trois lavages des levures avec de la solution saline tamponnée aux phosphates et contenant des ions calcium et magnésium [PBS] sont nécessaires pour éliminer l'excès de peptide non lié aux levures. Ils sont entrecoupés de centrifugations pratiquées dans les mêmes conditions qu'il est dit ci-dessus. Le culot final est repris dans 1 mL de PBS et le tube est conservé à 4°C. Les préparations ainsi obtenues sont appelées LA 1-40 et LA 1-42 selon la nature du peptide utilisé pour traiter les levures.

24-Préparation de l' α 2-macroglobuline.

241-Activation de l' α 2-macroglobuline.

La préparation d' α 2M (Sigma) à 1 μ mol/L est traitée pendant 1 h par une solution de méthylamine (Sigma) à 200 mmol/L, dans un tampon constitué de 50 mmol/L de Na₂HPO₄, et de 150 mmol/L de NaCl, pH 7,4. Après ce traitement, l' α 2M est dans sa conformation activée et elle peut se lier au récepteur LRP. La forme active est désignée par l'abréviation α 2M*. Pour éliminer la méthylamine, la solution est introduite dans une cassette à dialyse au point de séparation compris entre 12.000 et 14.000 D (Pierce, Interchim, Montluçon, France). Pendant cette opération, il faut s'assurer qu'une pression hydrostatique suffisante est appliquée à la solution contenue dans le sac à dialyse, afin d'éviter que, sous l'effet de la pression osmotique, du tampon ne rentre dans le sac et ne dilue l' α 2M*.

La dialyse s'effectue contre une solution aqueuse à 0,1 mol/L de NaHCO₃, et 0,5 mol/L de NaCl, pH 8,3, sous agitation, pendant 3 à 4 h à 4°C. L'agitation permet que la solution dialysée s'équilibre rapidement avec le tampon, et la basse température empêche l'action des protéases sur les protéines de la solution dialysée. Le tampon est éliminé une première fois, et il est remplacé par 1 L du même tampon, frais. La solution d' α 2M* est répartie en portions aliquotes qui sont stockées à -20°C.

242-Iodation de l' α 2-macroglobuline.

L' α 2M* à 1 nmol/L est incubée en présence de 100 μ g de réactif IODO-GEN (Pierce, Interchim) avec 10 mCi de Na¹²⁵I pendant 25 min sur de la glace. La préparation est alors passée sur une colonne de chromatographie Sephadex G25 PD-10 (Amersham

Biosciences GMBH, Saclay, France) après qu'elle a été équilibrée avec 25 mL de tampon phosphate pH 7.4, contenant de l'albumine sérique de Boeuf (Sigma, L'Isle d'Abeau-Chesnes, France), [BSA] à 0.5 mg/mL, de façon à éliminer l'iode libre. Le même tampon, sans albumine, est alors ajouté à la colonne pour enlever l'excès d'albumine. Puis la colonne est ensuite lavée avec la solution tampon. On recueille 5 à 12 gouttes par tube, et ce, dans 20 tubes. La radioactivité est mesurée et l'on conserve les tubes les plus radioactifs. On obtient 1,2 mL de solution d' $\alpha 2M^*$ radio-iodée.

243-Endocytose de l' $\alpha 2$ -macroglobuline par les cellules microgliales.

Les cellules sont pré-incubées en présence des différents inhibiteurs pendant différentes durées, selon les expériences. Elles sont traitées avec 250 μ L de solution de H89 à 25 et 40 μ mol/L, ou par une solution de forskoline à 100 μ mol/L, pendant 30 min. Ces composés sont dilués, aux concentrations finales indiquées ci-dessus, dans du milieu RPMI 1640 contenant 0,1 % de BSA, à partir de solutions stocks à 10 mmol/L (H89) ou à 5 mg/mL (forskoline) dans du DMSO.. Les cellules sont incubées avec le ligand radioactif pendant 3 h. à 4°C. Un excès de ligand froid est ajouté dans les puits afin de pouvoir évaluer la liaison non spécifique. Après 3 lavages au PBS à 6 mg/mL de BSA, les cellules sont incubées pendant 10 min avec un tampon contenant 0,2 mol/L d'acide acétique et 0,1 mol/L de chlorure de sodium afin de récupérer l' $\alpha 2M^*$ radio-iodée à la surface des cellules. Après 3 lavages, les cellules sont lysées avec une solution bouillante d'hydroxyde de sodium N, pendant 1 h, à température ambiante, pour récupérer le ligand endocyté. La radioactivité des solutions contenant respectivement l' $\alpha 2M^*$ extracellulaire et $\alpha 2M^*$ intracellulaire est mesurée à l'aide d'un compteur gamma. Les résultats sont exprimés en termes du rapport des concentrations du ligand intracellulaire et du ligand de surface [Intra/Extra].

25-Phagocytose des levures.

251-Phagocytose des levures opsonisées.

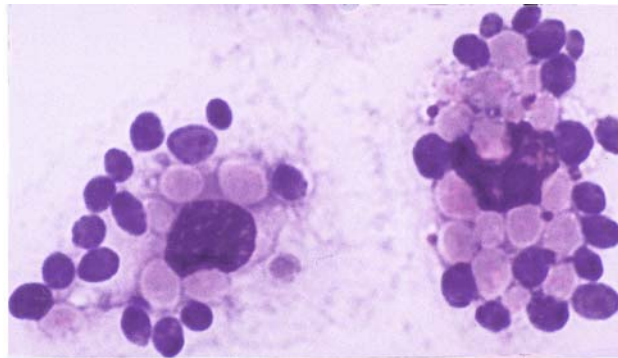
2511-Epreuve de phagocytose proprement dite.

Pour l'épreuve de phagocytose, on fait adhérer les cellules microgliales (10^5 par puits) sur des lamelles de verre stériles, préalablement introduites dans les puits d'une plaque à 24 puits. Après une nuit de culture, les cellules sont rincées 2 fois avec du PBS puis pré-incubées en présence des inhibiteurs de signalisation intracellulaire. Ensuite, 475 μ L de PBS contenant les inhibiteurs de lectinophagocytose — α -mannanes solubles de la paroi de *S. cerevisiae* et laminarine extraite de *Laminaria digitata*, tous les 2 à la concentration de 0,4 mg/mL — sont distribués dans chaque puits. Les levures sont ajoutées 10 min plus tard, sous un volume de 25 μ L. Le volume réactionnel sous lequel se réalise la phagocytose est de 500 μ L. L'épreuve se déroule à 37°C dans une étuve air (95 %)-CO₂ (5 %) humidifiée ; sa durée est fixée à 45 min.

2512-Coloration.

Les cellules sont rincées 2 fois avec du PBS puis elles sont traitées pendant 30 s avec le même milieu additionné d'1 % d'acide tannique (Merck, Darmstadt, Allemagne) ; ce réactif est préparé extemporanément à partir d'une solution stock d'acide tannique à 10 %, conservée à l'obscurité à température ambiante. Grâce aux propriétés tinctoriales qu'ils confèrent aux levures auxquelles il se fixe, l'acide tannique permet de distinguer les particules ingérées par les cellules microgliales de celles qui y adhèrent (Figure 2.1). Après 2 lavages rapides avec du PBS, on ajoute une goutte de SFV sur les préparations. L'excès de SFV est éliminé et les préparations sont rapidement séchées à froid. Cette procédure a été mis au point dans notre laboratoire par Giaimis *et al.* (1992).

FIGURE 2.1.
Phagocytose de levures par les cellules microgliales.



Les levures ingérées apparaissent en rose clair, et les levures adhérentes, en violet foncé.

Les préparations sont ensuite colorées aux colorants de May-Grünwald et Giemsa directement dans les puits ; on prend soin de recouvrir toute la surface des lamelles (utiliser au moins 250 μ L de réactif). En pratique, on traite les préparations avec le colorant de May-Grünwald (Rhône-Poulenc, réactifs RAL, Villers Saint-Paul, France) pur durant 2 à 3 min, puis on ajoute un volume équivalent d'eau au pH ajusté à 7,15-7,25 (appelée eau tamponnée), et on laisse agir pendant 1 min. Les préparations sont alors rincées à l'eau tamponnée, puis recouvertes avec le colorant de Giemsa (Rhône Poulenc, réactifs RAL) dilué extemporanément (au 1/25 dans de l'eau tamponnée) ; on laisse le colorant agir 13 min. Il est nécessaire de rincer les lamelles avant de les monter, face retournée, sur une lame de verre, sur laquelle on a déposé au préalable une goutte de résine poly-mount (Polysciences Inc., Warrington, PA, Etats Unis ; réf. 08381).

2513-Quantification de la phagocytose.

On dénombre séparément les levures intra- et extracellulaires pour 100 cellules microgliales. Ce dénombrement permet de déterminer divers paramètres, tels que le nombre moyen de levures phagocytées par cellule microgliale [NMP], ou le nombre moyen de levures adhérentes par cellule microgliale [NMA].

Les résultats représentent la moyenne de 3 déterminations effectuées pour une même expérience. Toutes les expériences ont été réalisées au moins 3 fois.

2514-Analyses statistiques.

Les interprétations statistiques des résultats sont effectuées par analyse de variance (ANOVA) à l'aide du logiciel StatView Student v1.0 (Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA, USA).

26-Mesure de la cytotoxicité par la technique au XTT.

Les expériences de mesure de la cytotoxicité des levures opsonisées, 1 h, 24 h, 48 h et 72 h après leur ingestion par les cellules microgliales, sont pratiquées dans des plaques de 96 puitsensemencées avec 72.000 cellules/puits 24 h auparavant. Les cellules sont d'abord incubées pendant 10 min en présence de 50 μ L de solution d' α -mannanes et de laminarine, puis on ajoute à chaque puits 5 μ L de suspension de levures opsonisées ou non, et on laisse en contact pendant 45 min à 37°C. Les cellules sont alors lavées avec du PBS et on les garde dans du RPMI à 5 % de SFV inactivé par chauffage à 56°C pendant 30 min, jusqu'à la mesure de la cytotoxicité.

Pour mesurer la cytotoxicité, on ajoute 50 μ L de solution de XTT-PMS [méthosulfate de phénazine; Sigma] à chaque puits. La solution est préparée en mélangeant extemporanément une solution de XTT à 1 mg/mL dans du milieu RPMI 1640 avec une solution de PMS à 1,53 mg/mL dans du PBS, à raison de 25 μ L de solution de PMS pour 5 mL de solution de XTT).

Les cellules sont incubées avec la solution XTT-PMS pendant 4 h à 37°C et la DO [densité optique] est lue dans un lecteur de plaques, à 450 nm après que les plaques ont été doucement agitées.

27-Expression du mRNA de la *low density lipoprotein receptor-related protein*.

La réaction en chaîne de la polymérase [PCR pour *polymerase chain reaction*] permet d'amplifier rapidement des séquences prédéterminées de DNA, *in vitro*. La

transcription inverse [RT] couplée à la PCR [RT-PCR] est utilisée dans le cas présent pour étudier l'expression du mRNA du LRP dans la lignée BV-2. Le traitement des cellules BV-2 avec les différentes substances se fait directement dans les boîtes de culture. Le LPS de *Salmonella abortus equi* (Sigma) et l'IFN γ recombinant de Souris (Sigma) sont solubilisés dans du milieu de culture et utilisés à des concentrations de 1 μ g/mL pendant 72 h et 200 U/mL pendant 48 h respectivement et la dexaméthasone à 10⁻⁶ mol/L pendant 48 h. Le traitement est suivi de l'extraction des mRNA totaux.

271-Extraction des mRNA totaux.

Les mRNA totaux des cellules BV-2 sont extraits à l'aide du Tri-Reagent (Euromedex, Souffelweyersheim, France) ; la conception du réactif fait appel à une méthode universellement utilisée aujourd'hui (Chomczynski et Sacchi, 1987). Les cellules microgliales cultivées en flacons de culture de 25 cm² sont incubées pendant 5 min dans le Tri Reagent (1 mL par flacon). La solution résultante est ensuite transvasée dans un tube Eppendorf ; elle est homogénéisée et laissée à température ambiante pendant 5 min. Elle est alors traitée au chloroforme à raison de 0,2 mL pour 1 mL de Tri Reagent. Le mélange est vigoureusement agité et placé pendant 10 min à la température du laboratoire, avant d'être centrifugé pendant 10 min à 12.000 x g à 4°C. Trois phases se forment : (a) la phase supérieure contient le RNA ; (b) la phase intermédiaire flocculeuse renferme les protéines ; (c) et la phase inférieure organique contient le DNA.

La phase supérieure est récupérée et transvasée dans un nouveau tube. Afin d'éliminer le DNA contaminant cette phase, on y ajoute de l'isopropanol (100 μ l pour 1 mL de Tri Reagent) et l'on mélange le tout par retournement. Après un repos de 2 à 3 min à température ambiante, le tube est centrifugé pendant 10 min à 12.000 x g à 4°C. Dans la majeure partie des cas, le culot de DNA est trop petit pour être visible. Le surnageant est donc prélevé très délicatement et déposé dans un nouveau tube Eppendorf. Un volume plus important d'isopropanol y est ajouté (400 μ l pour 1 mL de Tri Reagent) afin de précipiter le RNA. On laisse reposer le mélange pendant 5 à 10 min à température ambiante. Il est ensuite centrifugé pendant 10 min à 12.000 x g à 4°C. Le culot de RNA est lavé avec de l'éthanol à 75 % (1 mL pour 1 mL de Tri Reagent) et la suspension est centrifugée à 7.500 x g pendant 5 min à 4°C, après homogénéisation au vortex. Le surnageant est éliminé, le culot est séché sous hotte et il est repris dans une solution aqueuse de diéthylpyrocarbonate à 1 g/l. La solution de RNA est conservée à -80°C.

Le RNA est dosé par la mesure de la DO à 260 nm. A cette longueur d'onde, une unité de DO correspond à 40 µg/mL de RNA.

272-Transcription inverse et réaction en chaîne de la polymérase.

2721-Principe

Les mRNA à transcrire en cDNA sont additionnés d'un excès d'hexamères aléatoires de nucléotides, capables de se fixer en de multiples sites (*random primers*). L'adjonction de 4 désoxyribonucléotides (dATP, dUTP, dGTP, dCTP) et de transcriptase inverse permet de transcrire tous les mRNA en cDNA : c'est à cette étape que l'on réserve le nom de RT.

2722-Protocole de transcription inverse.

La RT est pratiquée dans des microtubes (microAmp, Perkin Elmer, Courtabœuf, France) pendant 40 min à 42°C dans les conditions suivantes : à 100 ng de RNA sont ajoutés 25 U de transcriptase inverse de virus de la leucémie murine de Moloney (Life Technologies.), 10 µl de tampon de RT (250 mmol/L de Tris-HCl, 375 mmol/L de KCl, 15 mmol/L de MgCl₂, pH 8,3), 100 U d'inhibiteur de RNase (Life Technologies), 20 mmol/L de dNTP (Life Technologies), 100 µmol/L d'amorces hexamériques aléatoires (Roche Diagnostics, Meylan, France), 100 mmol/L de dithiothréitol (Appligene-Oncor, Illkirch, France), sous un volume réactionnel final de 50 µl. L'étape de RT est réalisée dans un thermocycleur (Perkin Elmer ; *geneAmp PCR system 9700*) selon le schéma suivant : (a) 45 min à 42°C ; (b) 5 min à 92°C ; (c) 5 min à 10°C.

2723-Mise en œuvre de la réaction en chaîne de la polymérase.

La PCR est effectuée à partir des produits de rétrotranscription obtenus après la RT de la façon suivante : à 5 µL de solution de cDNA à 20 ng/µL sont ajoutés 1,25 U de Taq polymérase (Life Technologies), 5 µL de tampon de PCR (200 mmol/L de Tris-HCl, 500 mmol/L de KCl, pH 8,4), 25 pmol d'amorces (Genosys, Pampisford, Grande-Bretagne), du MgCl₂ et des dNTP (voir ci-dessus). L'amplification est réalisée dans le même thermocycleur que celui qui a servi à la RT mais selon un schéma différent : (a) dénaturation pendant 5 min à 94°C, suivie de (b) n cycles d'amplification (dénaturation : 30 s à 94°C ;

hybridation des amorces pendant 30 s à 52°C ; élongation pendant 30 s à 72°C) ;
(c) élongation finale pendant 7 min à 72°C.

Le nombre n de cycles, et la concentration en MgCl₂ et en dNTP dépendent des amorces utilisées.

2724-Choix des amorces et conditions de la réaction en chaîne de la polymérase.

Le choix des amorces se fait par l'analyse des séquences des cDNA dérivés des mRNA d'intérêt. Deux séquences nucléotidiques d'une vingtaine de bases sont sélectionnées selon des critères physico-chimiques, selon des critères de position sur le cDNA et selon des critères de spécificité. En effet, (a) les amorces putatives constituées par ces 2 séquences doivent avoir des températures de fusion [T_m] proches l'une de l'autre, afin d'obtenir une hybridation homogène ; la T_m dépend de la composition en A, T, G et C ; (b) la taille du fragment à amplifier ne doit pas être trop grande – en général, elle est inférieure à 800 paires de base [pb] ; (c) les séquences retenues ne doivent pas coder des séquences exprimées par d'autres messagers murins afin de ne pas courir le risque d'amplifier des cDNA parasites.

Les séquences des amorces utilisées pour amplifier le cDNA du LRP sont les suivantes :

LRP(+) : 5'-GAAGCTGCTGTTACAGTAGC-3' T_m : 57°C

LRP(-) : 5'-GTCCACAGAGTAAAGCCC-3' T_m : 57°C

Les conditions optimales de PCR de ces amorces retenues sont les suivantes : 30 cycles en présence d'1,25 mmol/L de MgCl₂ et de 10 mmol/L de dNTP. La longueur théorique du fragment attendu est de 234 pb (Figure 2.2).

Les séquences des amorces utilisées pour amplifier le cDNA de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase [GAPDH] sont les suivantes :

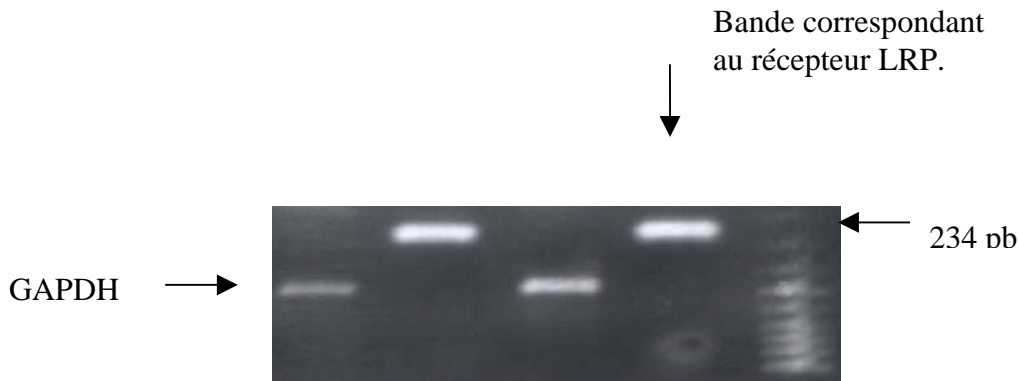
GAPDH(+) : 5'-CACCATCTTCCAGGAGCGAG-3' T_m : 67,2°C

GAPDH(-) : 5'-GTTCAGCTCTGGGATGACCTT-3' T_m : 64,4°C

Les conditions optimales de PCR de ces amorces sont obtenues à 30 cycles en présence d'1,25 mmol/L de MgCl₂ et de 10 mmol/L de dNTP. La longueur théorique du fragment attendu est de 454 pb (Figure 2.2).

FIGURE 2.2.

Séparation en gel d'agarose des produits de la réaction en chaîne de la polymérase obtenus avec les amorces LRP et GAPDH.



Le produit d'amplification du gène LRP migre à 234 bp. Le produit d'amplification de la GAPDH (une protéine ubiquiste codée par un gène ménager d'expression constitutive) migre à 454 bp. Il sert de contrôle positif.

2725-Semi-quantification de la réaction en chaîne de la polymérase.

L'étude de l'expression des mRNA d'intérêt est semi-quantitative puisque cette dernière est comparée à celle d'un gène constitutif, celui de la GAPDH. La séparation des fragments de cDNA amplifiés se fait par électrophorèse en gel d'agarose (Agarose, DNA grade, Euromedex) à 1,5 %, dans du tampon constitué de 40 mmol/L de tris-acétate et d'1 mmol/L d'EDTA, pH 8,3 (Life Technologies) additionné de 0,5 µg/mL de bromure d'éthidium (Sigma). Les échantillons sont mélangés à une solution alourdissante (*loading dye solution* ; Euromedex) puis déposés sur le gel à côté d'un marqueur de MM (*Gene Ruler*, 100 bp, DNA ladder ; Euromedex).

On laisse les fragments migrer pendant 1 h, puis on photographie l'électrophorégramme sous rayons ultraviolets. La mesure de l'intensité des bandes obtenues est réalisée à l'aide du logiciel NIH Image 1.61 (National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA). Les signaux d'intérêt sont comparés au signal qu'engendre le gène de la GAPDH, et l'on calcule le rapport des intensités [signal du gène d'intérêt]/ [signal du gène de la GAPDH].

28-Immuno-empreinte de type *western* de la *low density lipoprotein receptor-related protein*.

Nous avons mis en évidence l'expression de la protéine LRP dans les cocultures et dans la lignée BV2.

281- Lyse des cellules, extraction et dosage des protéines totales.

Après qu'elles ont été lavées par du PBS froid contenant du fluorure de phénylméthanesulfonyl [PMSF], 20 µL/mL, les cellules sont grattées dans 250 µL de tampon de lyse refroidi, constitué d'une solution aqueuse à 150 mmol/L de NaCl, 1% de triton X100, 10 mmol/L d'HEPES pH 7,4, 0,1% de dodécylsulfate de sodium [SDS], 0,1% de désoxycholate, 2 mmol/L d'EDTA, 50 mmol/L de NaF, 2 mmol/L de Na₃Va₄, 1,53 mmol/L de Na₂HPO₄, 8,47 mmol/L de NaH₂PO₄. Pour éviter la dégradation des protéines on ajoute au tampon de lyse un mélange d'inhibiteurs de protéases (Sigma) constitué de leupeptine (10µg/mL), d'aprotinine (1 mmol/L), de PMSF, d'oxyde de phénylarsine (10 mL/mL) et de β-mercaptoéthanol (5 mmol/L). Les cellules sont homogénéisées environ 20 fois par aspiration et refoulement à travers une aiguille de calibre 23. La préparation est laissée pendant 30 min sur de la glace. Elle est ensuite centrifugée pendant 40 min à une vitesse de 13.000 x g à +4°C. Le surnageant, qui contient les protéines, est récupéré et congelé à -20°C jusqu'à son utilisation. Les protéines totales sont dosées à l'aide de la trousse de dosage de Bio-Rad (Ivry-sur-seine, France) et la quantité de protéines est déterminée par comparaison avec une gamme étalon de BSA.

282-Electrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide.

Un gel vertical, composé d'un gel de concentration de 4% de polyacrylamide (ICN Biomedicals Inc, Orsay, France) et d'un gel de séparation de 10% de polyacrylamide contenant 1% de SDS, est coulé dans un appareil d'électrophorèse. Trente µg de protéines totales préalablement dénaturées en présence de tampon de Laemmli (Laemmli, 1970) par chauffage à +95°C pendant 5 min, sont déposés dans chaque puits. On laisse migrer sous une tension de 130 V pendant 1 h 30.

283-Immuno-empreinte de type *western*.

L'étape qui suit la migration des protéines est celle du transfert sur une membrane de nitrocellulose (Hybond ECL, Amersham France SA, Les Ulis France). La membrane est préalablement hydratée puis incubée dans du tampon de transfert (Tris : 25 mmol/L, pH 8,3-8,6 ; glycine : 92 mmol/L ; méthanol : 20 %). L'électrotransfert des protéines est réalisé à l'aide d'un appareil à immersion (Modular Mini-Protean II system, réf. 165-2940, Bio-Rad). A cette fin, le gel est placé dans un sandwich constitué de 2 tampons de *scotch-brite*, de 2 papiers Whatmann (Poly Labo, Strasbourg, France), et d'une membrane de nitrocellulose, de façon telle que le gel se trouve directement au contact de la membrane, cette dernière se situant du côté de l'anode.

Le transfert s'effectue sous agitation, en immersion dans du tampon de transfert, à une tension constante de 70 V pendant 1 h 45.

284-Révélation de la *low density lipoprotein receptor-related protein*.

La membrane de nitrocellulose est incubée pendant 1 h dans un tampon de blocage afin de saturer les sites non-spécifiques. Ce tampon est constitué de PBS à 0,05 % de Tween 20 pH 7,4 (Sigma) et 5 % de lait écrémé. La membrane est mise ensuite en contact avec l'Ac primaire (dilué au 1/30.000), pendant une nuit sous agitation, à +4°C. Cet Ac reconnaît la partie intracellulaire du LRP. Le lendemain, la membrane est lavée 3 fois pendant 10 min avec du PBS à 0,05 % de Tween 20 pH 7,4 et incubée pendant 1 h avec l'Ac secondaire conjugué à la peroxydase de raifort, et dilué au 1/30.000). La peroxydase, en présence d'un réactif augmentant la chimioluminescence, catalyse une réaction aboutissant à une émission de lumière, détectable à l'aide d'un film autoradiographique. La détection a été faite par le Dr Philippe BOUCHER, à l'IGBMC (Illkirch, France).

29-Produits chimiques et réactifs.

Sauf mention contraire explicite, tous les produits chimiques et enzymes utilisés dans ce travail proviennent de chez Sigma. La toxine de Cobra [CVF pour *Cobra venom factor*] est fournie par Calbiochem-Novabiochem (Bad Soden, Allemagne) et le chlorure de chlérythine l'est par Euromedex.

L'Ac dirigé contre le LRP nous a été aimablement donné par le Dr Philippe Boucher, avec l'accord du Dr Herz qui l'a développé (Herz *et al.*, 1990). Il s'agit d'un Ac polyclonal de Lapin dirigé contre le LRP de Souris. L'Ac secondaire utilisé pour révéler l'immuncomplexe LRP-Ac anti-LRP est un Ac de Chèvre dirigé contre les Ig de Lapin, et couplé à la peroxydase (Promega France, Charbonnières-les-Bains, France).

Les Ac monoclonaux [AcMo] MECA32, M18/2a et M1/70 ont été obtenus auprès de la *Developmental studies hybridoma bank, Department of Biological Sciences, The University of Iowa, Iowa City, IA, Etats Unis.*

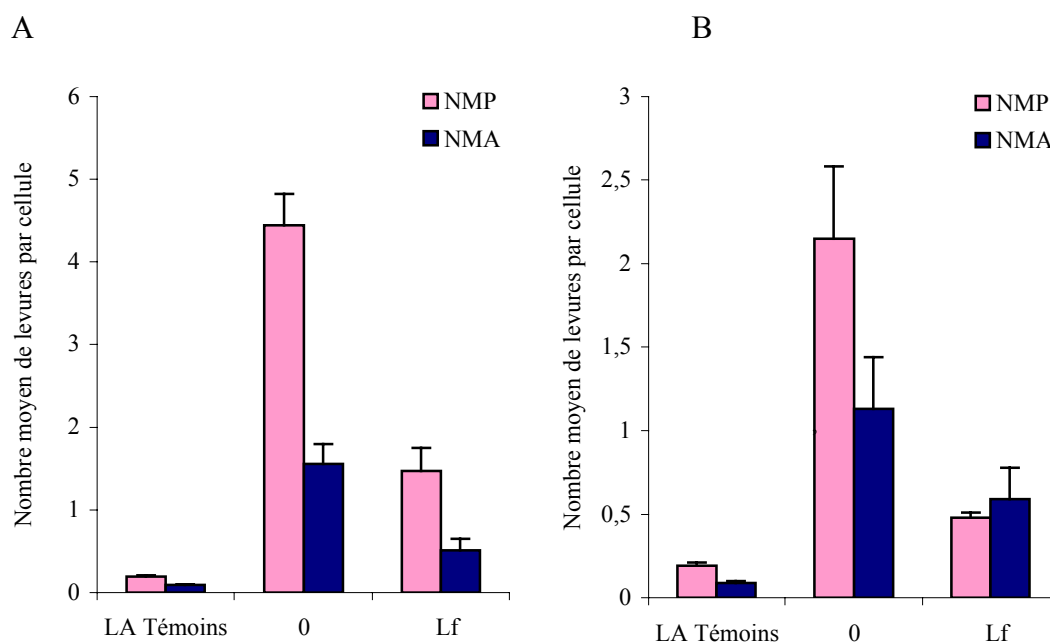
3-RESULTATS ET DISCUSSION.

31-Récepteurs impliqués dans la phagocytose des peptides β -amyloïdes par les cellules microgliales.

311-Implication de la *low density lipoprotein receptor-related protein* dans la phagocytose des levures opsonisées par les peptides amyloïdes A β 1-40 et A β 1-42.

La surexpression du LRP par les cellules microgliales qui bordent les PS, ainsi que la présence d'ApoE et d' α 2M dans les dépôts amyloïdes, suggèrent que ce récepteur joue un rôle majeur dans la pathologie. Nous avons montré dans notre laboratoire que le LRP est impliqué dans l'élimination des levures opsonisées par les peptides amyloïdes (voir Laporte *et al.*, 2004). Pour ce faire, nous avons utilisé la Lf et l' α 2M*, 2 ligands du LRP, comme compétiteurs. La phagocytose des 2 types de levures opsonisées diminue significativement en présence de chacun de ces 2 ligands (Figures 3.1 et 3.2).

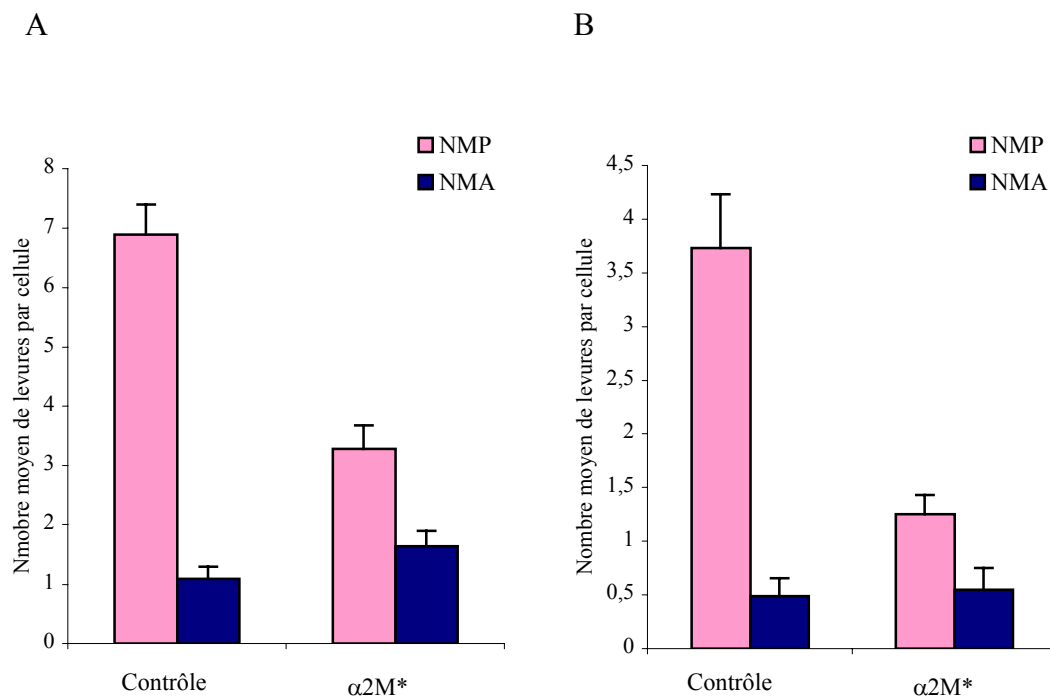
FIGURE 3.1.
Effet de la lactoferrine sur la phagocytose des levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42.



Phagocytose des LA 1-40 [A] et LA 1-42 [B] par des cellules microgliales traitées par de la Lf à 0,1 mg/mL ; *** : $p < 0,001$; ** $p < 0,01$. La Lf est ajoutée en même temps que les inhibiteurs de la lectinophagocytose.

FIGURE 3.2.

Effet de l' α 2-macroglobuline sur la phagocytose des levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42.



Phagocytose des LA 1-40 [A] et LA 1-42 [B] par des cellules microgliales en présence d' α 2M* à 300 nmol/L. *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$. L' α 2M* est ajoutée en même temps que les inhibiteurs de la lectinophagocytose.

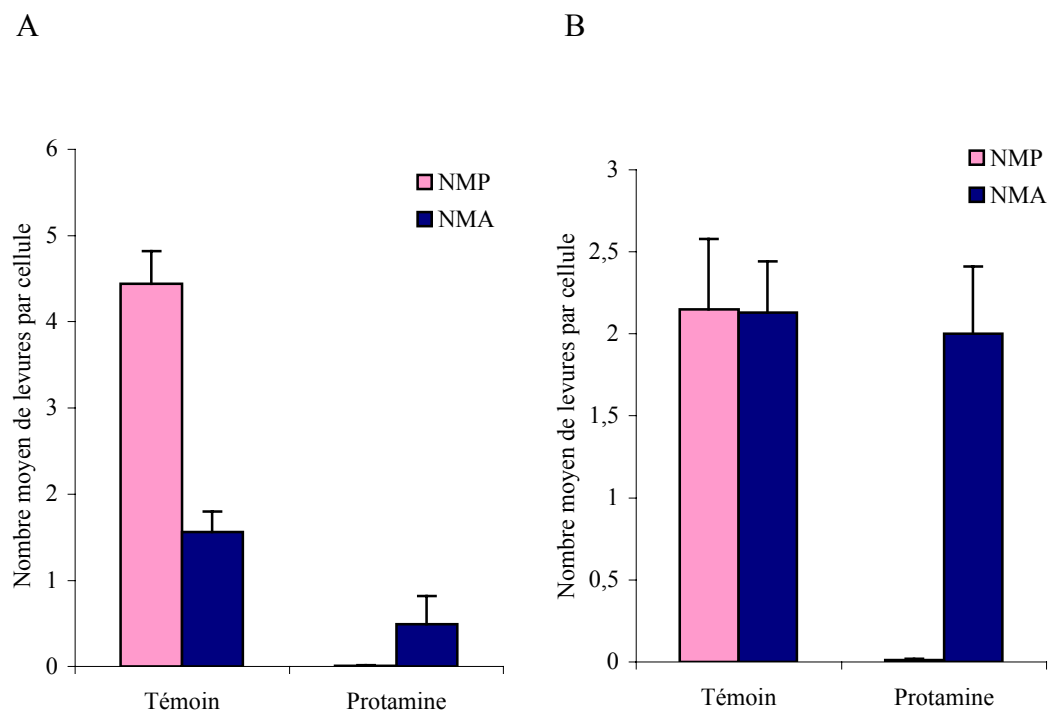
Le LRP joue un rôle important dans le métabolisme lipidique. Il permet l'ingestion d'ApoE par un mécanisme d'endocytose qui fait intervenir un HSPG. Il est également impliqué dans le recyclage des complexes protéase-inhibiteur de protéase grâce à son affinité pour l' α 2M, un inhibiteur non spécifique et puissant des protéases. Cette capture se fait par liaison directe au LRP sans intervention d'HSPG. Ainsi, le LRP peut convoier 2 mécanismes d'endocytose. L' α 2M et le peptide A β forment un complexe qui est endocyté par le LRP (Narita *et al.*, 1997). Ce récepteur peut aussi être impliqué dans des mécanismes de phagocytose. En effet, les LA 1-40 et 1-42 interagissent avec le LRP et cette interaction entraîne l'ingestion.

312-Implication des protéoglycannes à héparane sulfate dans la phagocytose des levures opsonisées par les peptides β amyloïdes.

Pour étudier le rôle des HSPG dans la phagocytose des LA opsonisées, de la protamine, à une concentration de 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, et de l'héparinase I [HI], à une concentration de 1 U/mL et 2 U/mL, ont été ajoutées au milieu de culture avant les LA 1-40 ou 1-42. La protamine est capable de masquer par sa charge positive les héparanes sulfates des HSPG de surface et l'HI dégrade l'héparane sulfate de ces mêmes HSPG.

FIGURE 3.3.

Effet de la protamine sur la phagocytose des levures opsonisées par les peptides $A\beta$ 1-40 et $A\beta$ 1-42.



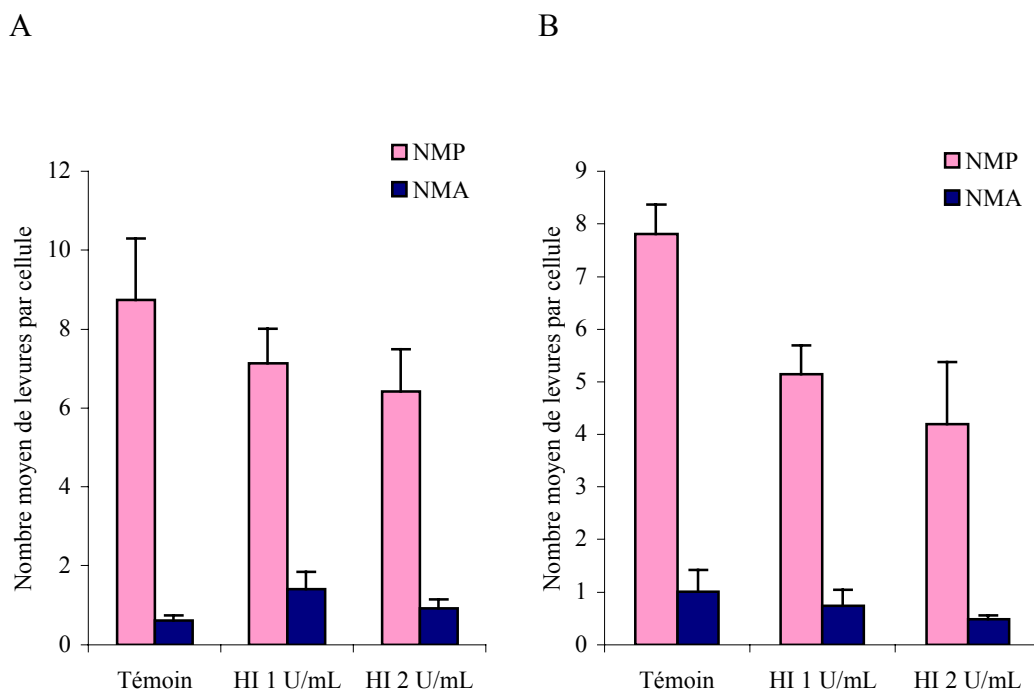
Phagocytose des LA 1-40 [A] et LA 1-42 [B] par des cellules microgliales traitées par de la protamine à 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$; *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$. La protamine est ajoutée en même temps que les inhibiteurs de la lectinophagocytose.

En présence de protamine, le NMP diminue fortement. Avec les LA 1-40, il passe en effet de 4,4 à 0,01, et avec les LA 1-42, il passe de 2,15 à 0,01. Le NMA diminue significativement durant la phagocytose des LA 1-40, mais il reste inchangé dans le cas des LA 1-42. Cette différence de comportement suggère que ces 2 types de LA ne reconnaissent

pas le même récepteur ou reconnaissent le même récepteur mais en des sites différents (Figure 3.3).

Quoi qu'il en soit, ces résultats montrent que l'HSPG est impliqué dans la phagocytose des 2 types de levures opsonisées et qu'il joue un rôle important dans la reconnaissance des LA 1-40 mais non dans celle des LA 1-42. Cependant, comme la protamine agit grâce à sa charge, elle peut avoir un effet non spécifique sur ces phénomènes. C'est pourquoi des expériences de confirmation ont été conduites après traitement des cellules par l'HI (Figure 3.4).

FIGURE 3.4.
Effet de l'héparinase sur la phagocytose des levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42.



Phagocytose des LA 1-40 [A] et LA 1-42 [B] par des cellules microgliales traitées par l'HI à 1 U/mL et 2 U/mL pendant 30 min à 37°C. *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$. L'HI est ajoutée 30 min avant les inhibiteurs de la lectinophagocytose.

La phagocytose des LA 1-40 et des LA 1-42 diminue d'une manière significative et dépendante de la dose d'enzyme. Le mécanisme d'ingestion des LA 1-40 et des LA 1-42 implique donc des HSPG, qui, on le rappelle, sont des constituants des PS.

Les HSPG jouent un rôle important dans la pathogénie de la MA. *In vitro*, ils interagissent avec l'APP et cette interaction affecte la production du peptide amyloïde (Narindrasorasak *et al.*, 1991). Les HSPG peuvent se lier au peptide amyloïde et augmenter par ce moyen la formation de fibres (Snow *et al.*, 1994), mais ils peuvent aussi le protéger de la destruction par des protéases (Gupta *et al.*, 1995). Des souris transgéniques surexprimant l'HI possèdent moins de dépôts amyloïdes dans les reins, le foie et la rate que des Souris témoins (Li *et al.*, 2005).

32-Implication du récepteur 3 du complément dans la phagocytose des levures opsonisées par les peptides amyloïdes.

Le CR3 est un récepteur hétérodimérique de surface, formé de 2 sous-unités, appelées CD11b et CD18. Le CR3 peut convoier l'ingestion de différents micro-organismes opsonisés ou non par des composants ou des fragments de composants du système du complément. Après avoir montré le rôle du LRP dans l'ingestion des LA 1-40 et 1-42, il était intéressant d'étudier l'implication de cet autre récepteur dans l'ingestion de ces 2 types de LA.

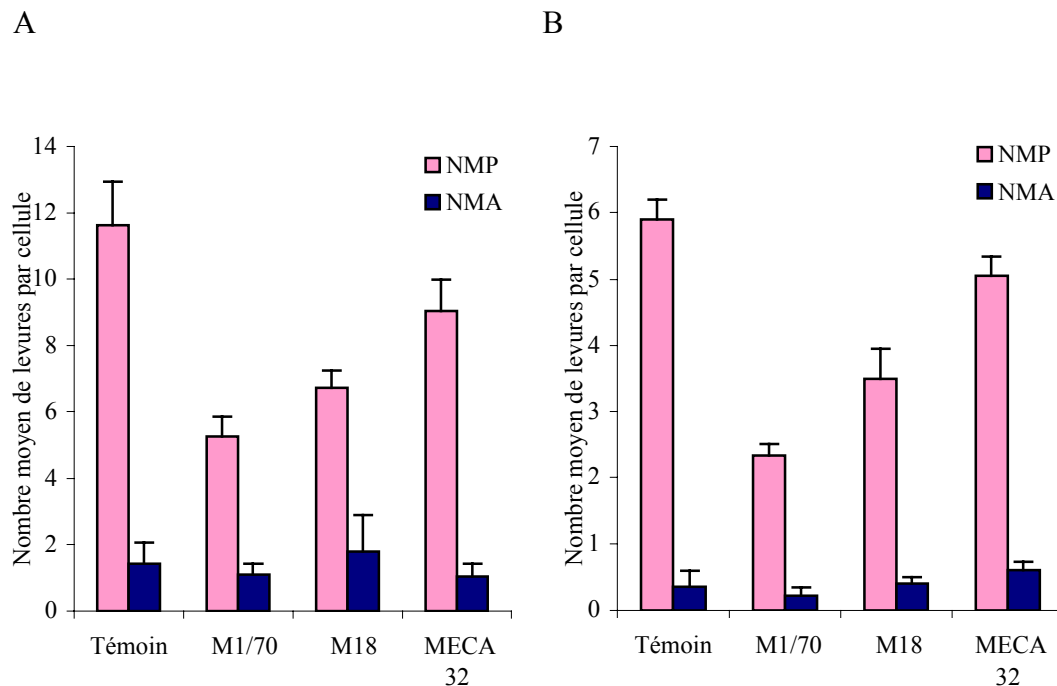
Des AcMo, utilisés sous la forme de surnageants bruts de culture d'hybridome, ou bien purifiés (les AcMo ont été aimablement purifiés par le Dr Yves Lombard ; leur solution mère est diluée 10 fois dans du PBS), dirigés contre les sous-unités de ce récepteur ont donc été ajoutés aux cultures avant l'administration des LA. Les AcMo utilisés sont le M1/70 (AcMo de Rat dirigé contre la sous-unité CD11b du CR3), le M18/2a (AcMo de Rat dirigé contre la sous-unité CD18 [Mac1] du CR3), et le MECA32 (AcMo de Rat dirigé contre les cellules endothéliales de Souris, utilisé comme témoin négatif).

Quel que soit le type de particules utilisées, LA 1-40 ou LA 1-42, la phagocytose est fortement diminuée. En présence de surnageant contenant l'AcMo M18/2a, dirigé contre la sous-unité β du CR3, le NMP des LA 1-40 diminue de 40 % ; il passe de 11,63 à 6,72 et le NMP des LA 1-42 passe de 5,9 à 3,5. En présence de surnageant contenant l'AcMo M1/70, dirigé contre la sous-unité CD11b du CR3, la diminution est plus forte : elle atteint 50 % ; le NMP des LA 1-40 passe de 11,63 à 5,27 et celui des LA 1-42, de 5,9 à 2,33. Ces résultats montrent que la sous-unité CD18 et surtout la sous-unité CD11b du CR3 sont impliquées dans la phagocytose des LA 1-40 et LA 1-42. Ce récepteur, du reste, joue un rôle important dans l'inflammation qui accompagne la MA. Il est donc impliqué probablement dans l'élimination

des PS artificielles dans le modèle de cocultures utilisé ici. Afin de confirmer ces observations, les AcMo ont été purifiés, et l'on a étudié leur effet sur la phagocytose des levures opsonisées (Figure 3.5).

FIGURE 3.5.

Effet de divers anticorps monoclonaux (surnageants de culture d'hybridome) dirigés contre le récepteur 3 du complément, sur la phagocytose des levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42.

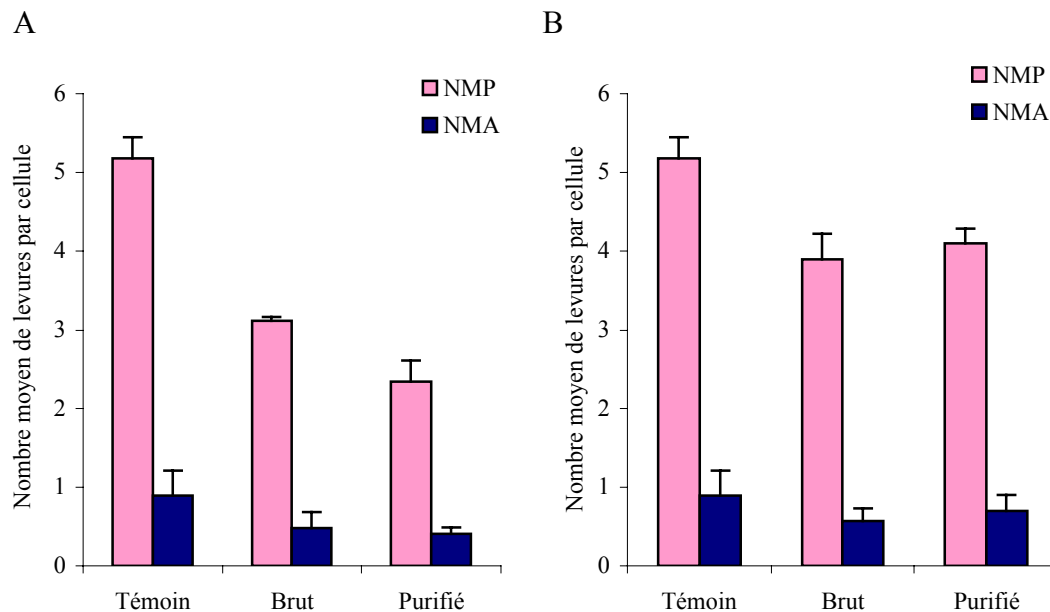


Phagocytose des LA 1-40 [A] et LA 1-42 [B] en présence de surnageants de culture d'hybridome, contenant des AcMo dirigés contre Mac1, contre le CD11b et contre les cellules endothéliales (témoin négatif). *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$. Les Ac sont ajoutés 20 min avant les levures. Après 10 min, ils sont aspirés et l'on ajoute les inhibiteurs de lectinophagocytose.

En présence des surnageants bruts on observe une forte diminution de la phagocytose. Celle-ci est plus prononcée en présence de l'AcMo purifié, dirigé contre la sous-unité CD11b du CR3 dans le cas de la phagocytose des LA 1-40 que dans le cas de l'AcMo purifié, dirigé contre la sous-unité CD18. En effet, aucun effet supplémentaire n'est observé en présence de cet AcMo. Il semble donc que l'AcMo anti-CD11b purifié soit plus efficace, et que la sous-unité CD11b soit plus fortement impliquée dans la phagocytose (Figure 3.6). Aucune diminution n'est observée en présence de l'AcMo MECA32 brut ou purifié. Les

AcMo dirigés contre les sous-unités du CR3 agissent donc d'une manière spécifique (Figure 3.8).

FIGURE 3.6.
Comparaison de l'effet des anticorps monoclonaux anti-CD11b et anti-CD18 bruts et purifiés sur la phagocytose des levures opsonisées par le peptide A β 1-40.



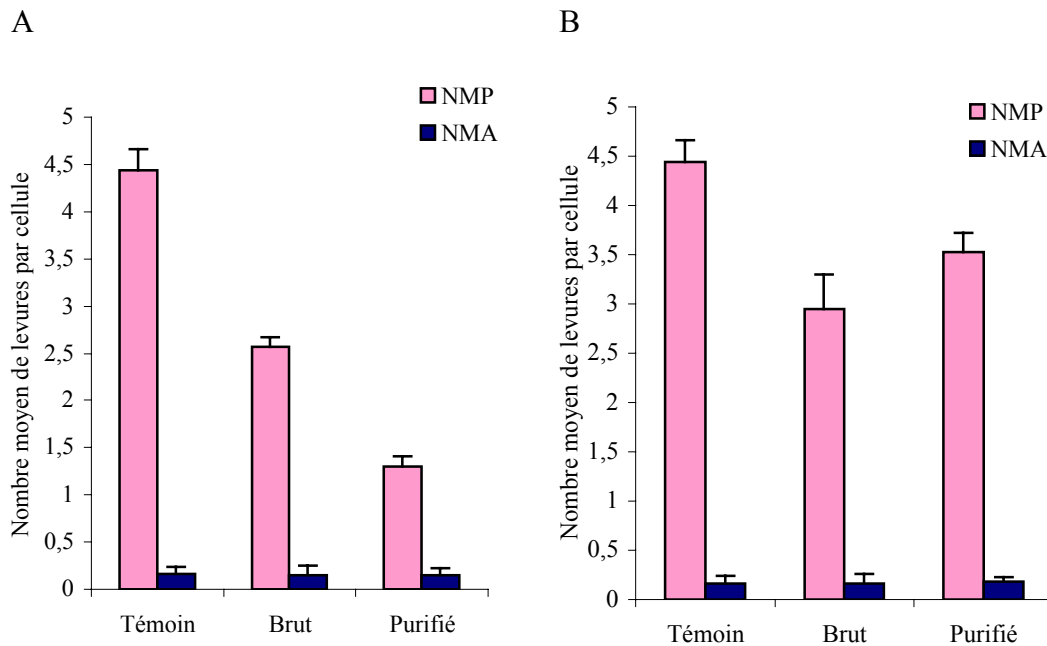
Phagocytose des LA 1-40 en présence d'AcMo bruts et purifiés, dirigés contre les sous-unités CD11b [A] et CD18 [B] du récepteur CR3. ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$. Les Ac sont ajoutés 20 min avant les levures. Après 10 min, ils sont aspirés et l'on ajoute les inhibiteurs de lectinophagocytose.

Le même profil est observé en présence de l'AcMo brut ou purifié, dirigé contre la sous-unité CD11b et l'AcMo dirigé contre la sous-unité CD18, lors la phagocytose des LA 1-42. Une plus forte diminution du NMP est observée avec l'AcMo purifié anti-CD11b qu'avec l'AcMo brut. L'AcMo purifié anti-CD18 n'est pas plus actif que l'AcMo brut (Figure 3.7).

Aucun effet significatif n'a été observé en présence d'AcMo MECA 32, dirigé contre les cellules endothéliales, qu'il soit brut ou purifié. Cette observation montre que les AcMo agissent aussi d'une manière spécifique dans le cas de la phagocytose des LA 1-42 (Figure 3.8).

FIGURE 3.7.

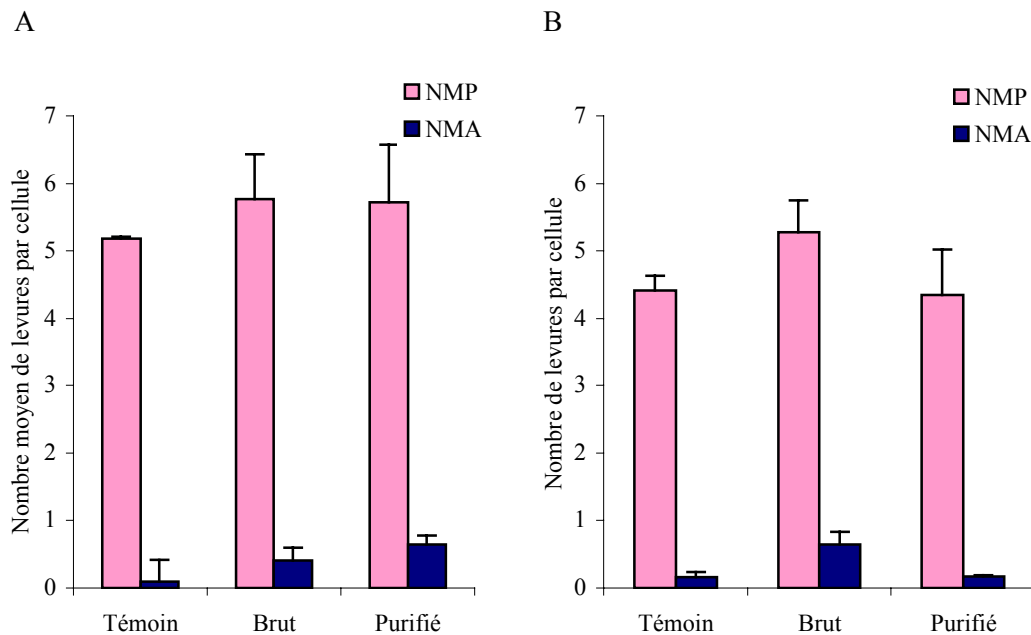
Comparaison de l'effet des anticorps monoclonaux anti-CD11b et anti-CD18 bruts et purifiés sur la phagocytose des levures opsonisées par le peptide A β 1-42.



Phagocytose des LA 1-42 en présence d'AcMo bruts et purifiés, dirigés contre les sous-unités CD11b [A] et CD 18 [B] du récepteur CR3. *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$. Les Ac sont ajoutés 20 min avant les levures. Après 10 min, ils sont aspirés et l'on ajoute les inhibiteurs de lectinophagocytose.

FIGURE 3.8.

Effet de l'anticorps monoclonal MECA 32 sur la phagocytose des levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42.



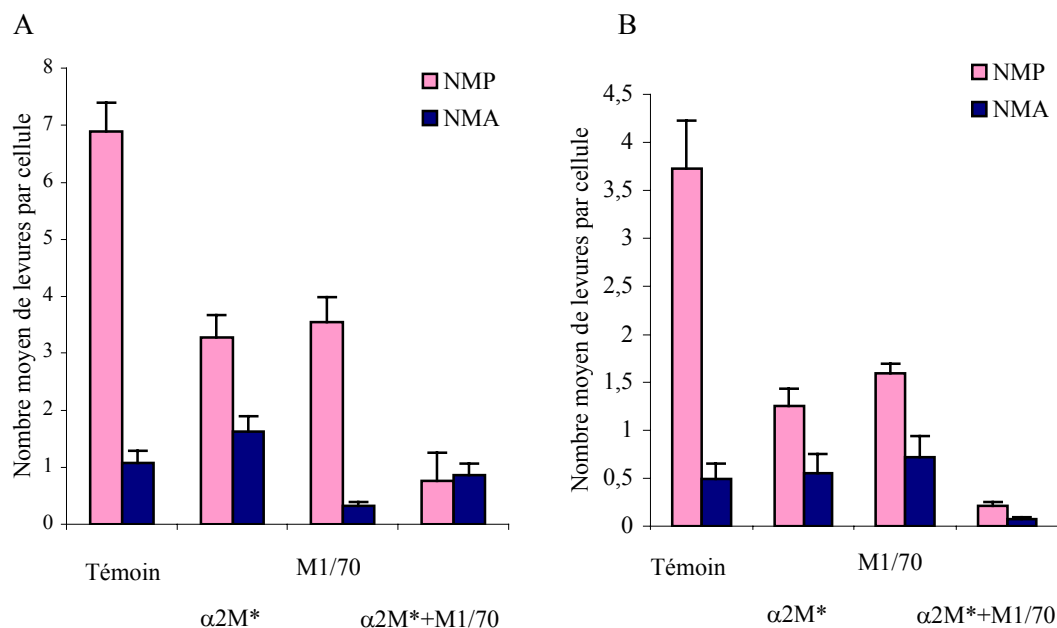
Phagocytose des LA 1-40 [A] et LA 1-42 [B] en présence d'AcMo bruts et purifiés MECA 32, dirigés contre les cellules endothéliales. Les Ac sont ajoutés 20 min avant les levures. Après 10 min, ils sont aspirés et l'on ajoute les inhibiteurs de lectinophagocytose.

Afin de savoir si d'autres récepteurs en plus du CR3 et du LRP sont impliqués dans la phagocytose des LA 1-40 et LA 1-42, on a effectué une phagocytose en la présence conjointe des inhibiteurs des 2 récepteurs déjà identifiés.

Comme on peut s'y attendre, la phagocytose diminue significativement en présence de chacun des inhibiteurs utilisés séparément. Mais cette diminution est plus forte en présence des 2 inhibiteurs utilisés conjointement que ce soit avec les LA 1-40 ou avec les LA 1-42.

Ainsi, le LRP et le CR3 sont probablement les 2 seuls récepteurs impliqués dans la phagocytose des LA 1-40 et LA 1-42 par les cellules microgliales (Figure 3.9).

FIGURE 3.9.
Effet de l' α 2-macroglobuline activée et de l'anticorps monoclonal M1/70 (anti-CD11b) sur la phagocytose des levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42.



Phagocytose des LA 1-40 [A] et LA 1-42 [B] en présence d' α 2M* et d'AcMo M1/70 provenant de surnageants bruts. *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$. Les Ac sont ajoutés 20 min avant les levures. Après 10 min, ils sont aspirés et l'on ajoute les inhibiteurs de lectinophagocytose et l' α 2M.*

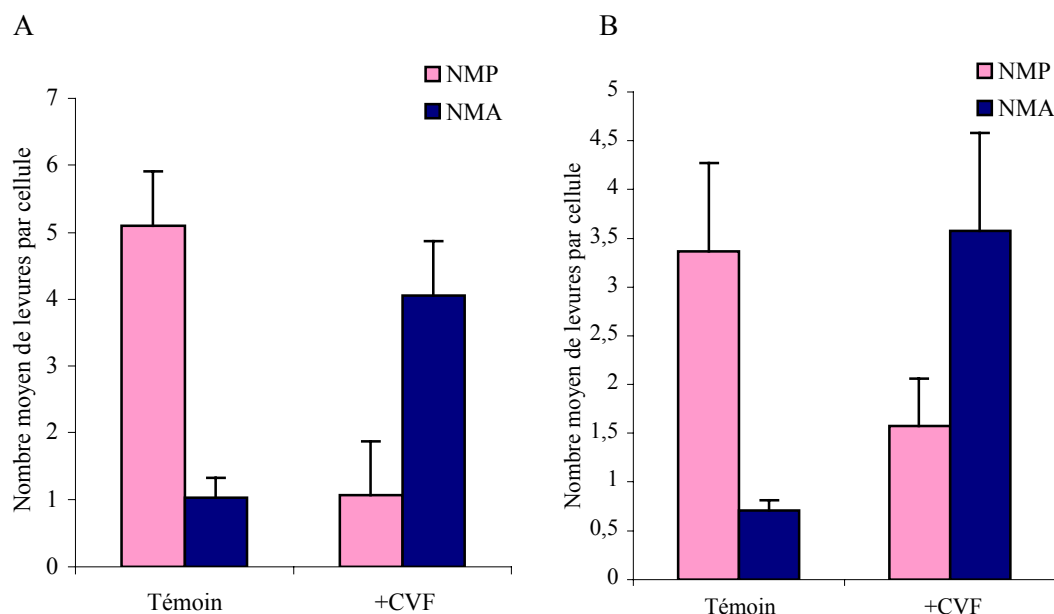
En présence de la toxine de Cobra [CVF], toxine qui dégrade les protéines du complément présentes dans le milieu, on observe une diminution significative de la phagocytose. Cette toxine qui agit comme une convertase affecte la phagocytose des LA 1-40. Si la phagocytose diminue, l'adhérence en revanche augmente. Il se pourrait donc que les protéines du complément (surtout le C3) viennent se fixer aux LA 1-40, et promeuvent ainsi

leur phagocytose par le LRP — structure qui est capable de reconnaître et d’ingérer les protéines du complément —, et/ou par le CR3 (Figure 3.10).

La phagocytose des LA 1-42 diminue de 50 % lorsque le système du complément est inactivé. Les composants et fragments du système du complément ont sans doute moins d’importance dans l’internalisation des LA 1-42 que dans celle des LA 1-40 (Figure 3.10).

Afin de savoir si la phagocytose convoyée par le CR3 fait intervenir les protéines du complément qui viendraient opsoniser les LA 1-40 et LA 1-42 avant qu’elles ne soient ingérées par la voie du LRP, nous avons étudié la phagocytose en la présence simultanée de CVF et de l’Ac dirigé contre la sous-unité CD11b du CR3.

FIGURE 3.10.
Effet de la toxine de Cobra sur la phagocytose de levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42, en absence de d’anticorps.



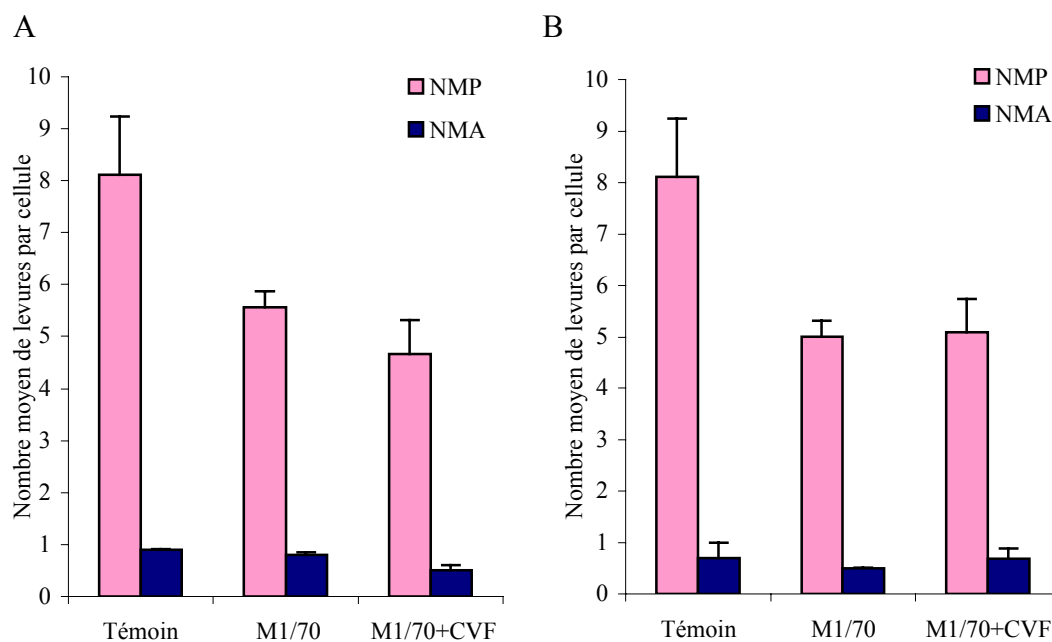
Phagocytose des LA 1-40 [A] et LA 1-42 [B] en présence de CVF (2,5 U/mL) qu’on laisse au contact des cellules pendant 1 h. Le milieu est aspiré. On ajoute alors les inhibiteurs de la lectinophagocytose, puis, 10 min plus tard, les levures. *** : $p < 0,001$; * : $p < 0,05$

En présence de l’Ac anti-CD11b, on observe une diminution de la phagocytose d’environ 50 %. En présence de l’Ac et de la CVF, c’est-à-dire dans des conditions où le CR3 est bloqué et les protéines du système du complément sont clivées, on n’observe de modification de la phagocytose qu’en présence de l’Ac tout seul. Ces résultats suggèrent que

dans les conditions où le LRP est actif et le CR3 est bloqué les protéines du système du complément n'interviennent pas. Par conséquent, il est vraisemblable que ces dernières n'interviennent pas durant la phagocytose des LA 1-40 et LA 1-42 convoyée par le LRP (Figure 3.11).

FIGURE 3.11.

Effet de la toxine de Cobra sur la phagocytose de levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42 en présence de l'anticorps dirigé contre la sous-unité CD11b du récepteur 3 du complément.



Phagocytose des LA 1-40 [A] et LA 1-42 [B] en présence de 2,5 U/mL de CVF qu'on laisse au contact des cellules pendant 1 h. Le milieu est aspiré et l'on ajoute l'AcMo M1/70 non purifié pendant 10 min. Il est aspiré et l'on ajoute alors les inhibiteurs de la lectinophagocytose. *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$.

33-Rôle des ions calcium et magnésium dans la reconnaissance et la phagocytose de levures opsonisées par les peptides amyloïdes.

Nous étudions ici le rôle des ions calcium et magnésium dans la phagocytose des levures opsonisées par les peptides amyloïdes. En effet, il a été montré que le LRP possède un domaine liant les ions calcium (Dolmer *et al.*, 1998). Les propriétés de liaison de ces ions au LRP ont été étudiées à pH 7,4 et 5 (Gettins *et al.*, 2001). Les ions calcium sont fortement impliqués dans la MA, notamment dans les phénomènes d'apoptose (Huber *et al.*, 2004) et de

neurotoxicité (Veinberg *et al.*, 2002). En outre, des protéines dépendantes des ions calcium jouent un rôle important dans la phagocytose (Arora *et al.*, 2004). Ces ions interviennent en effet dans le réarrangement des filaments d'actine (Kohsaka *et al.*, 2004), dans la maturation des phagosomes (Tejle *et al.*, 2002), et dans la phagocytose convoyée par le récepteur CR3 (Dewett *et al.*, 2003).

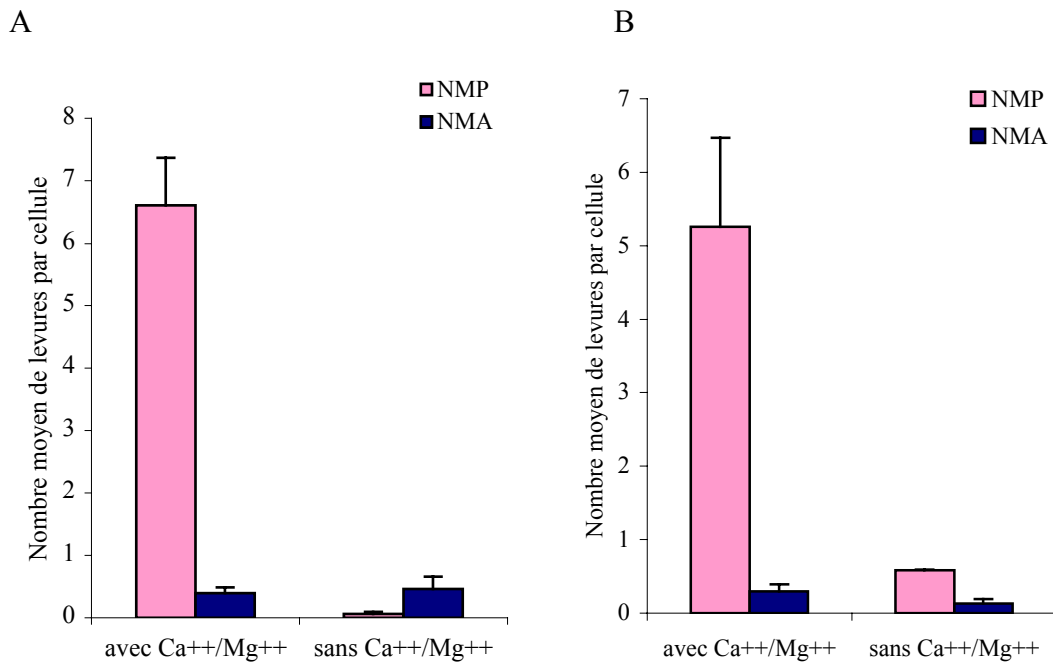
Afin d'évaluer le rôle des ions calcium et magnésium dans la phagocytose des LA1-40 et des LA 1-42, les épreuves de phagocytose ont été conduites en absence de ces ions ; les levures sont mises en suspension dans du PBS⁻, après plusieurs lavages dans ce tampon. De plus, différentes molécules, utilisées à différentes concentrations sont ajoutées pendant la phagocytose. Il s'agit de l'EDTA — un chélateur bien connu des ions calcium et magnésium extracellulaires —, utilisé à 3 concentrations (1 mmol/L, 5 mmol/L et 10 mmol/L), et de l'EGTA — chélateur préférentiel des ions calcium extracellulaires —, utilisé à 3 concentrations (1 mmol/L, 5 mmol/L et 10 mmol/L). Ces 2 chélateurs sont utilisés seuls (travaux et résultats de Vincent Laporte) ou en présence de cytochalasine B à 20 µg/mL pendant 30 min. La cytochalasine B bloque la phagocytose et permet donc d'étudier le rôle des ions chélatés dans la reconnaissance des levures opsonisées par les peptides amyloïdes (Figure 3.12).

Après plusieurs lavages avec un milieu exempt d'ions calcium et de magnésium on observe une diminution forte et significative de la phagocytose. Cette diminution est observée aussi bien dans le cas des LA 1-40 que des LA 1-42. Ces résultats montrent le rôle essentiel que les ions calcium et magnésium jouent éventuellement dans le mécanisme de reconnaissance et surtout d'ingestion des levures opsonisées (Figure 3.12 bis).

L'EDTA est un chélateur très efficace des ions calcium et magnésium alors que l'EGTA complexe essentiellement les ions calcium. Il ne chélate les ions magnésium que de façon négligeable. Classiquement, les épreuves de phagocytose se déroulent en présence de ces 2 ions. Afin d'évaluer leur rôle dans la reconnaissance des LA 1-40 et des LA 1-42, différentes concentrations d'EDTA et d'EGTA ont été ajoutés aux inhibiteurs de lectinophagocytose lors des épreuves de phagocytose. L'EGTA inhibe la phagocytose des LA 1-40 de façon dépendante de la dose (Figure 3.12 bis). A 10 mmol/L, la diminution observée est de l'ordre de 50 %. A la même concentration, l'EDTA inhibe complètement l'ingestion des LA 1-40 (Figure 3.12 bis). Ces observations suggèrent que la totalité de la phagocytose des LA 1-40 dépend des ions calcium et/ou magnésium. L'analyse de ces

FIGURE 3.12.

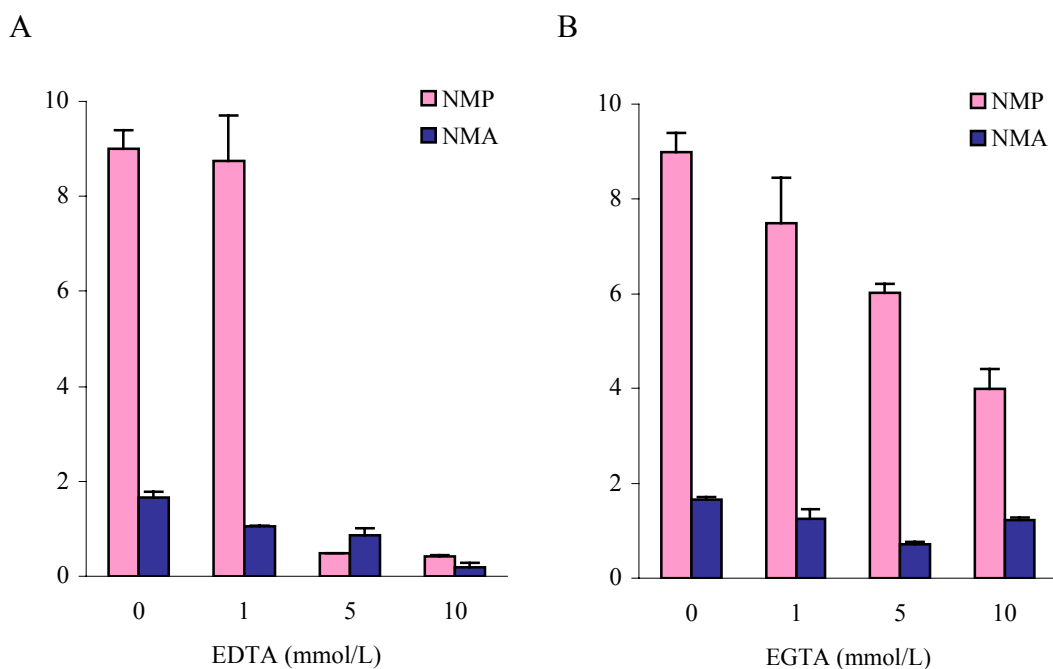
Phagocytose de levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42 dans une solution saline tamponnée aux phosphates, dépourvues d'ions calcium et magnésium.



Phagocytose des LA 1-40 [A] et des LA 1-42 [B], en présence (PBS) ou en absence (PBS⁻) d'ions calcium et magnésium. *** : p < 0,001 ; ** : p < 0,01 ; * : p < 0,05.

FIGURE 3.12 bis.

Effet de l'EGTA et de l'EDTA sur la phagocytose de levures opsonisées par le peptide A β 1-40. (Résultats de Vincent Laporte).



Phagocytose des LA 1-40 en présence de concentrations croissantes d'EDTA [A] et d'EGTA [B]. *** : p < 0,001 ; ** : p < 0,01 ; * : p < 0,05. EDTA et EGTA sont ajoutés en même temps que les inhibiteurs de la lectinophagocytose.

résultats et notamment la différence d'efficacité des 2 chélateurs, donne à penser que la phagocytose des LA 1-40 pourrait impliquer au moins 2 récepteurs distincts. Le premier dépendrait essentiellement des ions calcium ; ses propriétés rendent compte de la moitié de la phagocytose des LA 1-40. Leur liaison à ce récepteur est perturbée par l'EGTA et l'EDTA. Il est intéressant de noter qu'en présence d'EGTA, le NMA reste pratiquement inchangé quelle que soit la concentration de chélateur utilisée. Ce fait indique qu'une fraction constante de sites de liaison y est insensible. Le second récepteur serait dépendant des ions magnésium ; son interaction fonctionnelle avec les LA 1-40 n'est modifiée que par l'EDTA. A 5 mmol/L, ce chélateur inhibe totalement la phagocytose ; il bloque le fonctionnement des 2 récepteurs car il complexe indistinctement les ions calcium et magnésium.

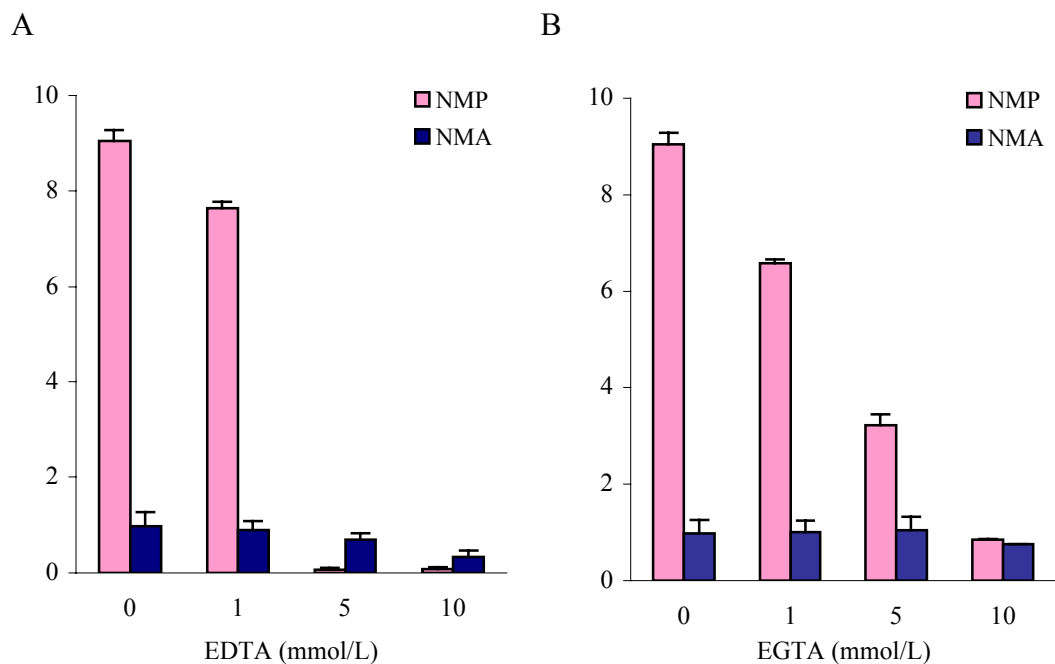
La complexation des ions calcium est suffisante pour diminuer de moitié la phagocytose ; on peut imaginer que la chélation des ions magnésium est responsable de l'effet spectaculaire de l'EDTA comparé à l'effet plus modeste de l'EGTA. Le nombre de types de récepteurs liant les LA 1-40 est inconnu ; il est donc possible qu'il en existe plusieurs formes. Certains appartiendraient à la classe des récepteurs dépendants des ions calcium et d'autres à celles des récepteurs dépendants des ions magnésium. Il est impossible de les distinguer les uns des autres par les expériences qui viennent d'être décrites.

Les profils de phagocytose des LA 1-42 à concentrations croissantes d'EDTA et d'EGTA sont identiques (Figure 3.12 ter). En effet, à la plus forte concentration utilisée pour l'un et l'autre chélateur, la phagocytose des LA 1-42 est presque totalement bloquée. En outre, les effets observés dépendent de la concentration utilisée. Ainsi, seuls les ions calcium semblent être nécessaires à la phagocytose des LA 1-42 ; ils seraient à tout le moins prépondérants ; la quasi-totalité des récepteurs des LA 1-42 dépendrait des ions calcium. Il convient de noter cependant qu'à des concentrations croissantes d'EGTA, le NMA reste constant. Il existerait donc une fraction infime de sites de liaison (et non forcément de récepteurs) des LA 1-42 qui ne dépendraient pas des ions calcium

Ces expériences ne permettent pas de savoir si les ions calcium et magnésium agissent sur la reconnaissance des levures opsonisées ou sur leur ingestion. Pour répondre à cette question, l'ingestion a été complètement bloquée par la cytochalasine B (20 µg/mL) avant l'adjonction des chélateurs.

FIGURE 3.12 ter.

Effet de l'EGTA et de l'EDTA sur la phagocytose de levures opsonisées par le peptide A β 1-42. (Résultats de Vincent Laporte)



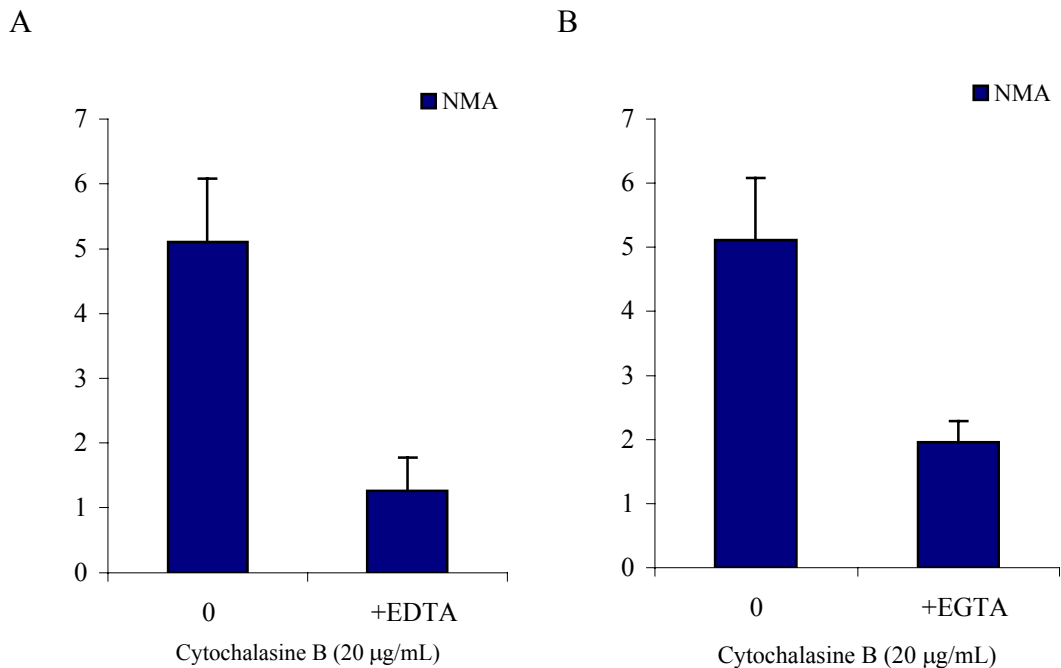
Phagocytose des LA 1-42 en présence de concentrations croissantes d'EDTA [A] et d'EGTA [B].
*** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$. EDTA et EGTA sont ajoutés en même temps que les inhibiteurs de la lectinophagocytose.

Dans ces conditions et en présence d'EDTA et d'EGTA, on observe une diminution du NMA. Avec les LA 1-40, celui-ci diminue significativement : il passe de 5,11 à 1,26 en présence d'EDTA et de 5,11 à 1,96 en présence d'EGTA. Ces résultats montrent que la reconnaissance des levures opsonisées par les récepteurs impliqués, dont le récepteur LRP, pourrait être dépendante des ions calcium et magnésium (Figure 3.13).

La reconnaissance des LA 1-42, est fortement diminuée en présence d'EDTA — le NMA passe de 2,38 à 0,61 —, ainsi qu'en présence d'EGTA — le NMA passe de 2,38 à 0,66. Ce sont donc très probablement les ions calcium qui sont impliqués dans la reconnaissance des LA 1-42 (Figure 3.14).

FIGURE 3.13.

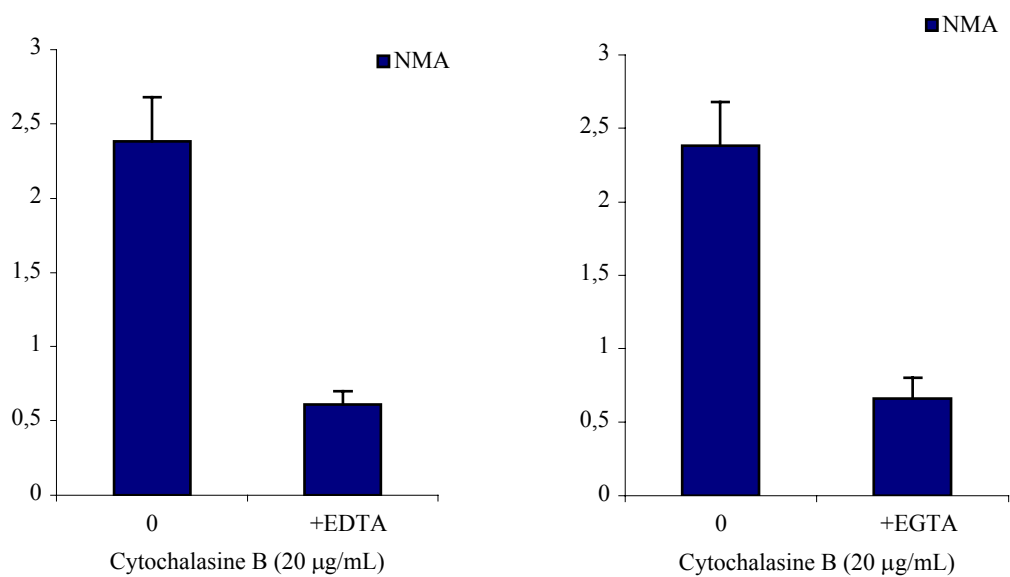
Effet de l'EGTA et de l'EDTA sur la reconnaissance de levures opsonisées par le peptide A β 1-40.



Phagocytose des LA 1-40 en présence de cytochalasine B (20 μ g/mL) et de 10 mmol/L d'EDTA [A] et d'EGTA [B]. ** : $p < 0,01$. La cytochalasine est ajoutée 30 min avant les levures. Elle est aspirée après 30 min de contact. On ajoute alors l'EDTA ou l'EGTA en même temps que les inhibiteurs de la lectinophagocytose.

FIGURE 3.14.

Effet de l'EGTA et de l'EDTA sur la reconnaissance de levures opsonisées par le peptide A β 1-42.

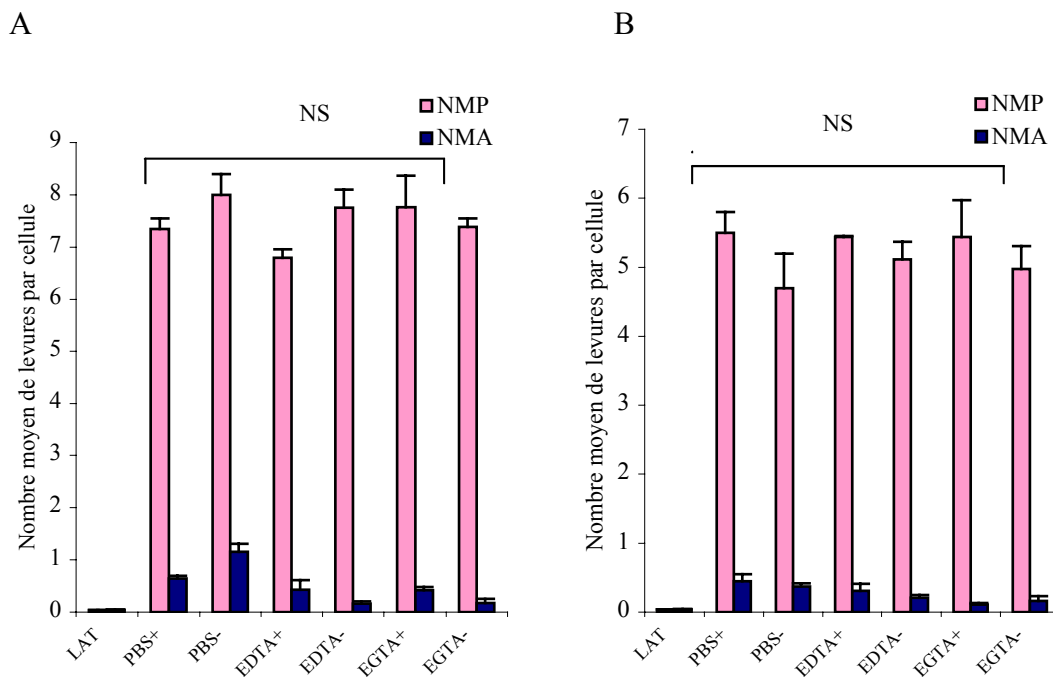


Phagocytose des LA 1-42 en présence de cytochalasine B (20 μ g/mL) et de 10 mmol/L d'EDTA [A] et d'EGTA [B]. ** : $p < 0,01$. La cytochalasine est ajoutée 30 min avant les levures. Elle est aspirée après 30 min de contact. On ajoute alors l'EDTA ou l'EGTA en même temps que les inhibiteurs de la lectinophagocytose.

Afin de s'assurer que les peptides A β ne sont pas élués en présence d'EDTA ou d'EGTA, 3 expériences comparatives ont été conduites avec les LA 1-40 et les LA 1-42 (Figure 3.15). Des LA 1-40 ou 1-42 ont été rincées 3 fois dans du PBS⁻, resuspendues dans du PBS⁻ et ajoutées aux cellules microgliales (PBS⁻). D'autres suspensions de LA 1-40 ou 1-42 en PBS ont été additionnées d'EDTA ou d'EGTA (10 mmol/L) pendant 10 min puis rincées (EDTA⁺ ou EGTA⁺) et reprises dans du PBS, ou non rincées (EDTA⁻ ou EGTA⁻), et ajoutées aux cellules microgliales. Un témoin de levures non opsonisées est inclus dans ces expériences.

FIGURE 3.15.

Effet du lavage préalable en solution saline tamponnée aux phosphates, dépourvues d'ions calcium, ou traitées par de l'EDTA ou de l'EGTA avant adjonctions aux cellules microgliales, sur la phagocytose des levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42.



LA 1-40 [A] et LA 1-42 [B]. LAT : levures non opsonisées, en présence d' α -mannanes et de laminarine ; PBS : levures opsonisées suspendues dans du PBS ; PBS⁻ : levures opsonisées suspendues dans du PBS⁻. EDTA⁺ : levures opsonisées, suspendues dans du PBS et traitées pendant 10 min avec de l'EDTA (10 mmol/L) puis rincées dans du PBS ; EGTA⁺ : levures opsonisées, suspendues dans du PBS et traitées pendant 10 min avec de l'EGTA (10 mmol/L) puis rincées dans du PBS. EDTA⁻ et EGTA⁻ : même traitement préalable non suivi de rinçage.

Dans des conditions où la phagocytose de levures non opsonisées est complètement inhibée par le mélange d' α -mannanes et de laminarine (colonnes témoins), les LA 1-40 et 1-42 sont ingérées par les cellules microgliales, qu'il y ait ou non des ions calcium et magnésium dans le milieu de phagocytose (colonnes PBS et PBS⁻). Leur ingestion est donc nécessairement convoyée par d'autres récepteurs que les récepteurs de type lectine. En outre, quand les LA opsonisées sont traitées pendant 10 min par de l'EDTA ou de l'EGTA, puis rincées dans du PBS (colonnes EDTA+ et EGTA+), elles sont encore ingérées et dans les mêmes proportions que les LA 1-40 et LA 1-42 non soumises aux traitements par des chélateurs. Elles sont là encore reconnues par d'autres récepteurs que les récepteurs de type lectine. Le maintien des chélateurs pendant l'épreuve de phagocytose (colonnes EDTA- et EGTA-) conduit aux mêmes résultats. Il apparaît donc que l'EDTA et l'EGTA ne provoquent probablement pas d'éluion des peptides amyloïdes de leur support. Enfin, à supposer qu'il y ait une éluion même minime, elle n'interfère sans doute pas avec la phagocytose. En effet, il a été montré au laboratoire (Laporte *et al.*, 2004) que les peptides fibrillaires A β 1-40 et 1-42 n'entrent pas en compétition avec les LA 1-40 et 1-42.

Ces résultats ont conduit à étudier l'importance des mouvements calciques intracellulaires dans l'ingestion des LA 1-40 et 1-42. Dans cette perspective, 2 outils pharmacologiques ont été utilisés : le BAPTA-AM qui est un chélateur des ions calcium intracellulaires, et la thapsigargine qui est un inhibiteur de l'ATPase à ions calcium du réticulum endoplasmique (Figure 3.16, Figure 3.17).

Le BAPTA-AM est un chélateur de calcium intracellulaire qui rentre librement dans le cytoplasme des cellules ; il y est hydrolysé par les acétyl estérases cytoplasmiques et engendre du BAPTA, chélateur hydrophile. Le traitement des cellules par le BAPTA-AM à 3 concentrations croissantes ne modifie pas le NMP des LA1-40. Le NMA, de même, reste constant, quelle que soit la concentration de chélateur utilisée.

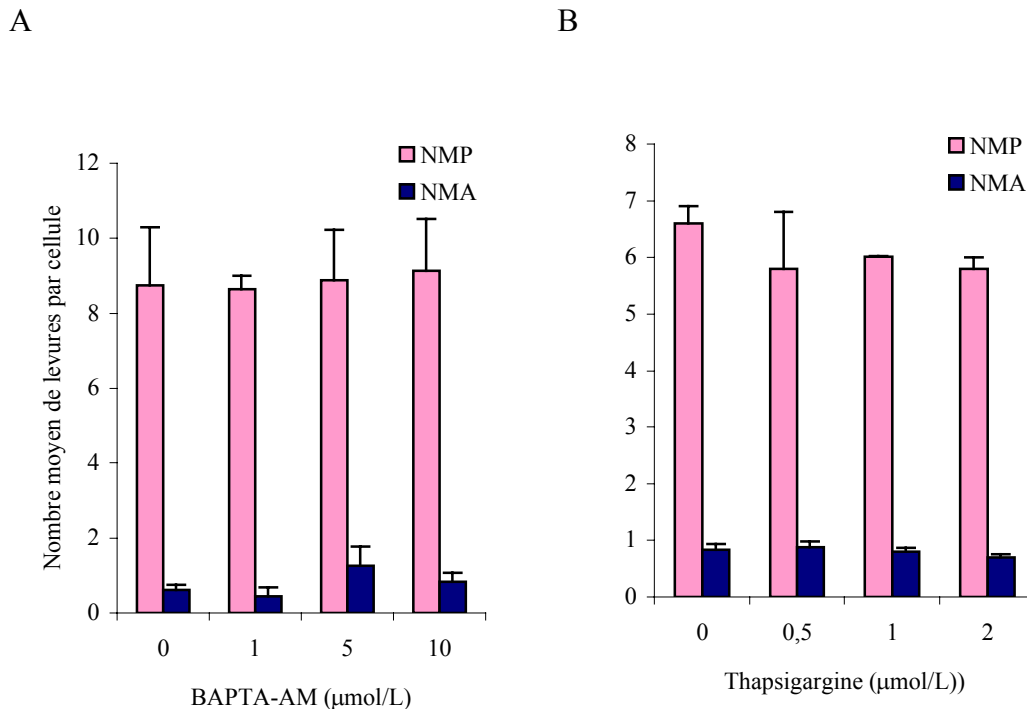
La phagocytose est aussi étudiée en présence de thapsigargine. En présence de thapsigargine à 3 concentrations croissantes. Dans ces conditions, on n'observe aucun effet sur la phagocytose des LA 1-40. Ces résultats sont à rapprocher des résultats obtenus en présence du BAPTA-AM ; ils montrent que la phagocytose des LA 1-40 ne nécessite pas une mobilisation des ions calcium intracellulaires.

Contrairement aux résultats obtenus avec les LA 1-40, qui peuvent être ingérées sans intervention des ions calcium provenant du réticulum endoplasmique, la phagocytose des LA 1-42 nécessite la présence de ces derniers pour l'être normalement. En présence de doses croissantes de BAPTA-AM, on note une diminution du NMP, diminution qui dépend de la

dose et qui atteint son maximum à 10 $\mu\text{mol/L}$ (à 25 $\mu\text{mol/L}$, on observe le même résultat ; données non présentées).

FIGURE 3.16.

Effet du BAPTA-AM et de la thapsigargine sur la phagocytose de levures opsonisées par le peptide A β 1-40.



Phagocytose des LA 1-40 par des cellules microgliales en présence de concentrations croissantes de BAPTA-AM [A] et de thapsigargine [B]. *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$. BAPTA-AM et thapsigargine sont ajoutés 40 min avant les levures. Après 30 min, on ajoute les inhibiteurs de la lectinophagocytose, puis, 10 min plus tard, les levures.

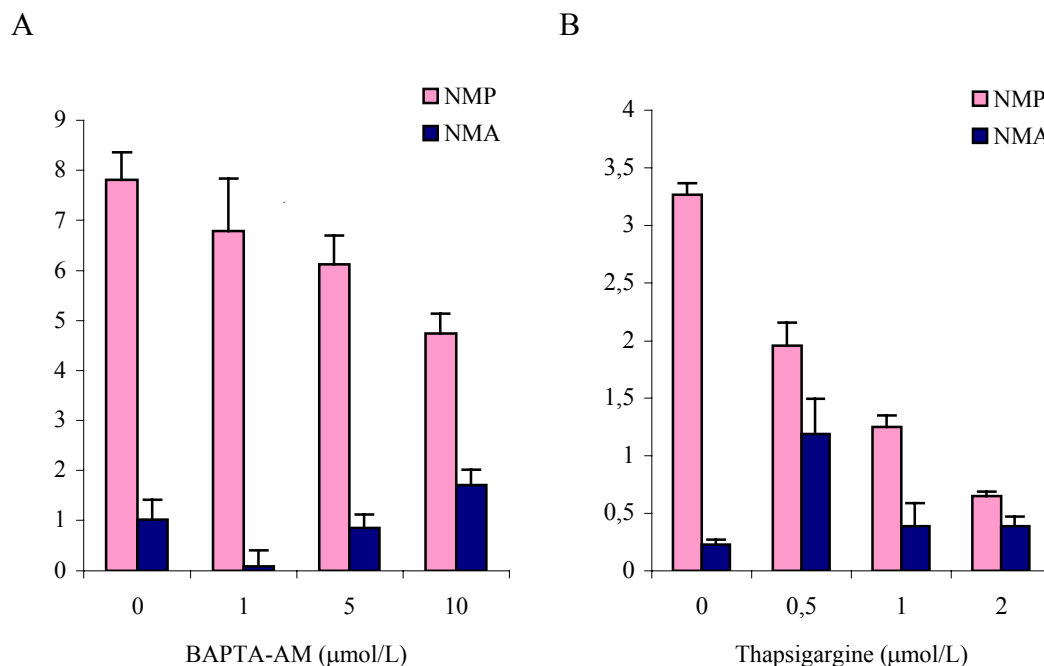
En présence de la thapsigargine à 3 concentrations (0,5 $\mu\text{mol/L}$, 1 $\mu\text{mol/L}$ et 2 $\mu\text{mol/L}$), on observe une diminution de la phagocytose dépendante de la dose d'inhibiteur. Le NMP diminue significativement en comparaison du NMP témoin : il passe de 3,27 à 0,65. Ainsi, la phagocytose des LA 1-42 semble fortement dépendante des ions calcium du réticulum endoplasmique.

La phagocytose d'un élément figuré et sa reconnaissance par un phagocyte relèvent de 2 mécanismes différents, et les récepteurs impliqués dans la reconnaissance ne sont pas forcément impliqués dans l'ingestion et la signalisation intracellulaire associée à la phagocytose. Les 2 types de levures opsonisées ont besoin d'ions calcium et magnésium pour

se lier à la surface des cellules. Il reste toutefois une petite fraction de LA 1-40 et LA 1-42 qui n'est pas sensible à l'effet des 2 chélateurs ; il existe donc probablement un ou plusieurs types de récepteurs qui reconnaissent les levures opsonisées d'une manière indépendante des ions calcium et magnésium.

FIGURE 3.17.

Effet du BAPTA-AM et de la thapsigargine sur la phagocytose de levures opsonisées par le peptide A β 1-42.



Phagocytose des LA 1-42 par des cellules microgliales en présence de concentrations croissantes de BAPTA-AM [A] et de thapsigargine [B]. *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$. BAPTA-AM et thapsigargine sont ajoutés 45 min avant les levures. Après 30 min, on ajoute les inhibiteurs de la lectinophagocytose, puis, 10 min plus tard, les levures.

La phagocytose des LA 1-42 nécessite une mobilisation des ions calcium intracellulaires. Il a été montré que les peptides amyloïdes sont capables d'induire la libération des ions calcium des stocks intracellulaires de neurones en culture primaire (Ferreiro *et al.*, 2004). Une mobilisation des ions calcium intracellulaires survient aussi dans le cas de la phagocytose convoyée par les FcR (Young *et al.*, 1984). Les ions calcium sont impliqués de la polymérisation de l'actine, phénomène essentiel pour la phagocytose et la fusion entre phagosome et lysosome (Bengtsson *et al.*, 1993). Les ions calcium nécessaires à la phagocytose peuvent agir sur la polymérisation des filaments d'actine en activant la

gelsoline, protéine dépendante des ions calcium et responsable de l'élongation et de la stabilisation de l'extrémité barbée du filament (Jaconi *et al.*, 1990).

La phagocytose des LA 1-40 ne nécessite pas l'intervention des ions calcium et magnésium. Une situation analogue a été observée dans d'autres modèles ; c'est le cas de la phagocytose convoyée par le CR3 dans les neutrophiles. La phagocytose est ici indépendante des changements de concentration des ions calcium intracellulaires (Della Bianca *et al.*, 1990). Dans les macrophages, la phagocytose convoyée par les FcR et la fusion du phagosome avec le lysosome semblent être des phénomènes indépendants des ions calcium (Zimmerli *et al.*, 1996).

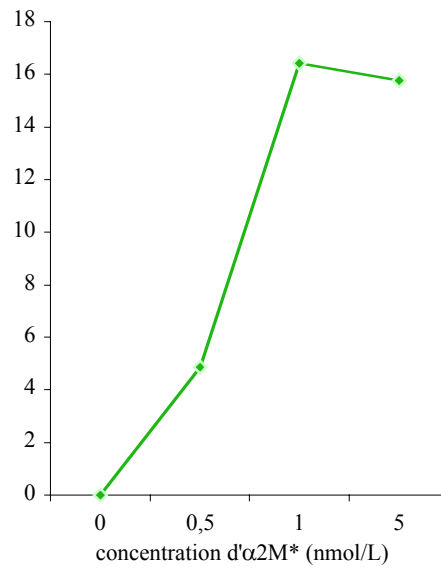
34-Signalisation intracellulaire associée à la phagocytose des levures opsonisées par les peptides A β 10-40 et A β 1-42.

Le LRP, nous l'avons montré, semble bien être impliqué dans la phagocytose des levures opsonisées par les peptides amyloïdes et surtout des LA 1-42. Il est donc intéressant d'étudier les propriétés endocytaires du LRP dans le modèle cellulaire utilisé ici. La signalisation déclenchée par l'engagement endocytaire du LRP est bien étudiée, et en particulier celle qui l'est après engagement par l' α 2M*. Il semble bien que l'activation de la PKA et non celle de la PKC soit nécessaire dans cette situation (Goretzki et Mueller, 1995).

C'est pourquoi l'on a cherché à vérifier s'il en était de même dans le cas des cellules microgliales en coculture. De l' α 2M* radio-iodée a été ajoutée à concentrations croissantes aux cultures, de façon à déterminer la concentration optimale à utiliser dans l'étude de l'endocytose déclenchée après l'engagement du LRP par l' $^{125}\text{I}\alpha$ 2M* : il s'agit de la plus petite concentration de ligand donnant un signal d'ingestion maximal, en l'occurrence 1 nmol/L d' $^{125}\text{I}\alpha$ 2M* (Figure 3.18). Cette concentration est retenue pour les expériences ultérieures.

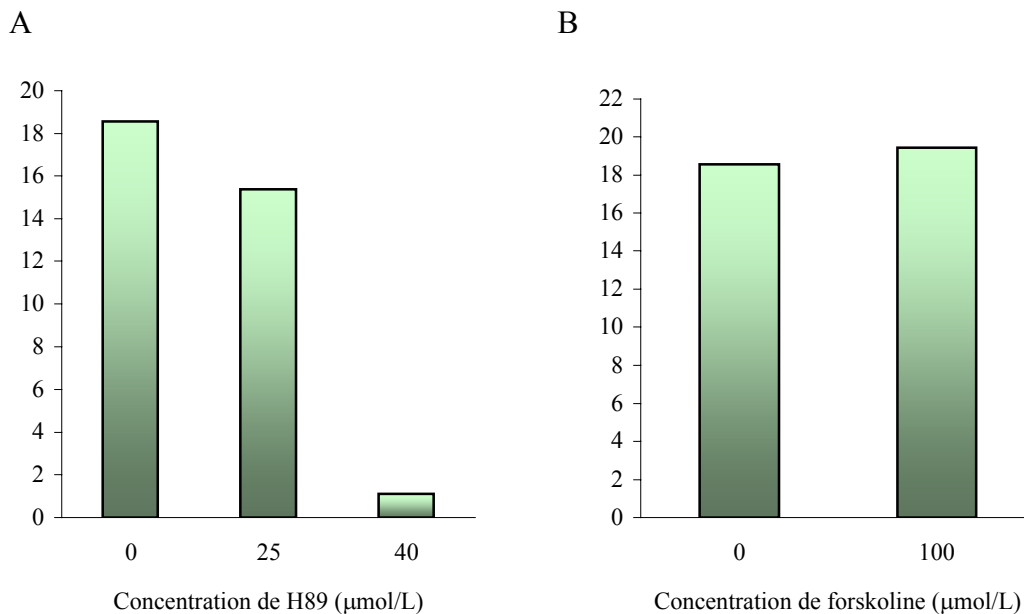
Différentes molécules susceptibles d'interférer avec la cascade de signalisation putativement déclenchée lors de l'endocytose de l' $^{125}\text{I}\alpha$ 2M* ont été ajoutées à concentrations croissantes aux cultures, en même temps que ce ligand. Le H89, un inhibiteur de la PKA, est utilisé à 25 $\mu\text{mol/L}$ et 40 $\mu\text{mol/L}$, et la forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase, l'est à 100 $\mu\text{mol/L}$ (Figure 3.19).

FIGURE 3.18.
Endocytose de différentes concentrations de l' α 2-macroglobuline activée radio-iodée.



Les résultats sont exprimés en terme de rapport de la radioactivité extracellulaire à la radioactivité associée aux cellules [Intra/Extra] (cf. SECTION 243 du CHAPITRE 2).

FIGURE 3.19.
Effet du H89 et de la forskoline sur l'endocytose de l' α 2-macroglobuline activée radio-iodée convoyée par la *low density lipoprotein receptor-related protein*.



Endocytose de $^{125}\text{I}\alpha$ 2M* en présence de concentrations croissantes de H89 [A] et de 100 micromolar de forskoline [B].

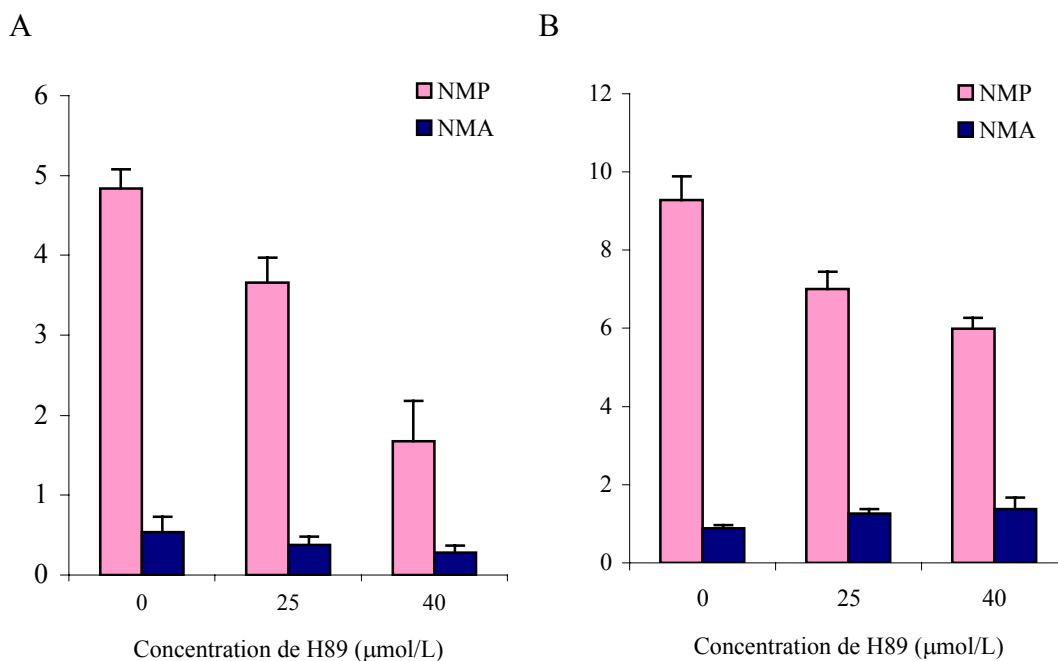
L'endocytose de l' $^{125}\text{I}\alpha 2\text{M}^*$ diminue de manière dépendante de la dose d'inhibiteur utilisée : un maximum de diminution est observé après traitement avec 40 $\mu\text{mol/L}$. En présence de la forskoline, on observe une légère augmentation de l'endocytose, mais elle n'est pas significative.

L'endocytose de l' $^{125}\text{I}\alpha 2\text{M}^*$ par les cellules microgliales fait donc très vraisemblablement intervenir la PKA. A cet égard, les présents résultats sont en accord avec les données de la littérature (Goretzki et Mueller, 1995).

Afin de comparer les capacités endocytaires et phagocytaires du LRP dans les cocultures, différents inhibiteurs de molécules impliquées dans la cascade de signalisation intracellulaire associée à l'endocytose et à la phagocytose ont été utilisés. Les cibles choisies ont été la PKA, la PKC, la PI3K, et la protéine Gs.

FIGURE 3.20.

Effet du H89 sur la phagocytose des levures opsonisées par les peptides $\text{A}\beta$ 1-40 et $\text{A}\beta$ 1-42.



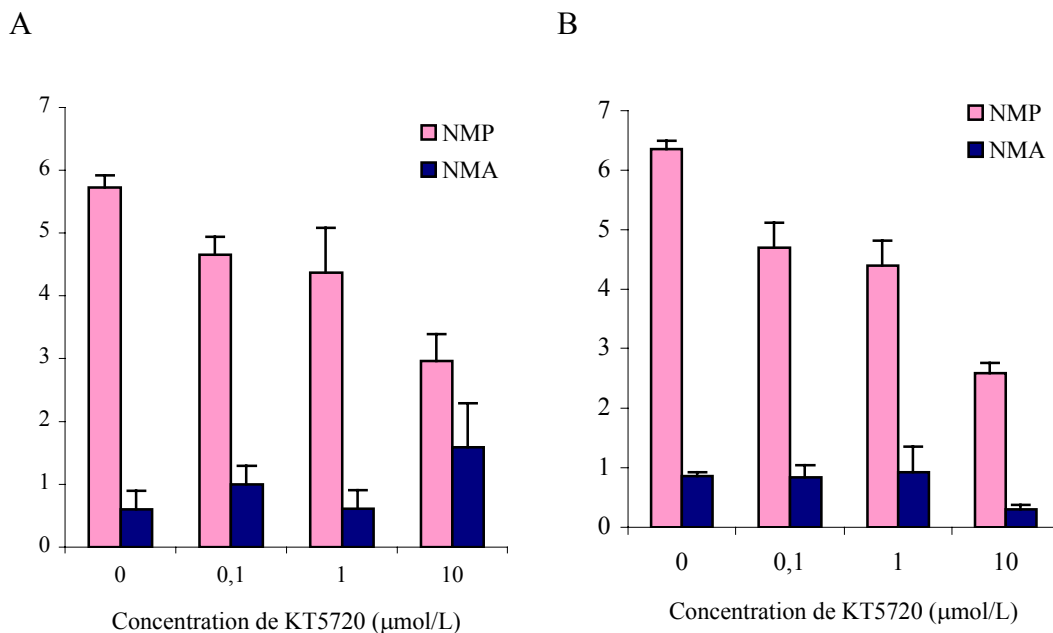
Phagocytose des LA 1-40 [A] et LA 1-42 [B] en présence de H89. **: $p < 0,01$; * : $p < 0,05$. Le H89 est ajouté 40 min avant les levures, et 30 min avant les inhibiteurs de la lectinophagocytose.

Afin d'étudier le rôle de la PKA dans la signalisation intracellulaire associée à la phagocytose des LA 1-40 et LA 1-42, le H89 a été utilisé aux mêmes concentrations que dans

les expériences d'endocytose de l' $^{125}\text{I}\alpha 2\text{M}^*$ (25 $\mu\text{mol/L}$ et 40 $\mu\text{mol/L}$). Dans ces conditions, le NMP est diminué significativement et de manière dépendante de la dose, aussi bien avec les LA 1-40 qu'avec les LA 1-42 (Figure 3.20). Ces résultats suggèrent que la PKA doit être activée pour qu'il y ait phagocytose de ces 2 types de levures.

Cependant, les concentrations de H89 utilisées sont élevées et l'effet observé peut être non spécifique. Afin de vérifier ce point, et de confirmer ces résultats, un deuxième inhibiteur de la PKA, le KT5720, a été ajouté aux cellules, à 3 concentrations différentes : 0,1 $\mu\text{mol/L}$, 1 $\mu\text{mol/L}$ et 10 $\mu\text{mol/L}$ (Figure 3.21).

FIGURE 3.21.
Effet du KT5720 sur la phagocytose des levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42.



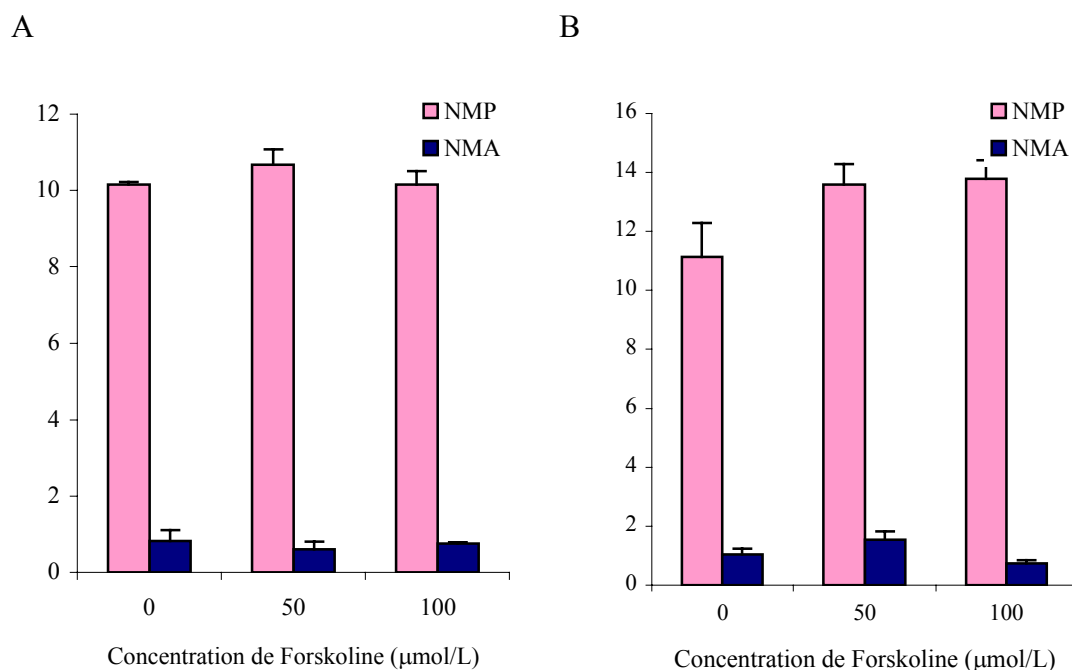
Phagocytose des LA 1-40 [A] et LA 1-42 [B] en présence de KT5720. *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$. Le KT5720 est ajouté 40 min avant les levures, et 30 min avant les inhibiteurs de la lectinophagocytose.

En présence de KT5720, on note une diminution significative et dépendante de la dose de la phagocytose des LA 1-40 et LA 1-42. Ces résultats tendent à confirmer l'implication de la PKA dans la phagocytose des levures opsonisées par les peptides amyloïdes.

En revanche, en présence de chacun des inhibiteurs, H89 et KT5720 et aux plus fortes concentrations, la phagocytose n'est jamais totalement inhibée. Il existe donc vraisemblablement des récepteurs capables de reconnaître les LA 1-40 et LA 1-42 et d'entraîner ensuite leur phagocytose sans faire intervenir la PKA.

Une légère augmentation de la phagocytose est observée en présence de forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase, enzyme qui active à son tour la PKA. L'activation de la PKA est ici indirecte, et comme dans le cas de l'endocytose de l' $^{125}\text{I}\alpha 2\text{M}^*$, aucun effet significatif n'est observé (Figure 3.22).

FIGURE 3.22.
Effet de la forskoline sur la phagocytose des levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42.



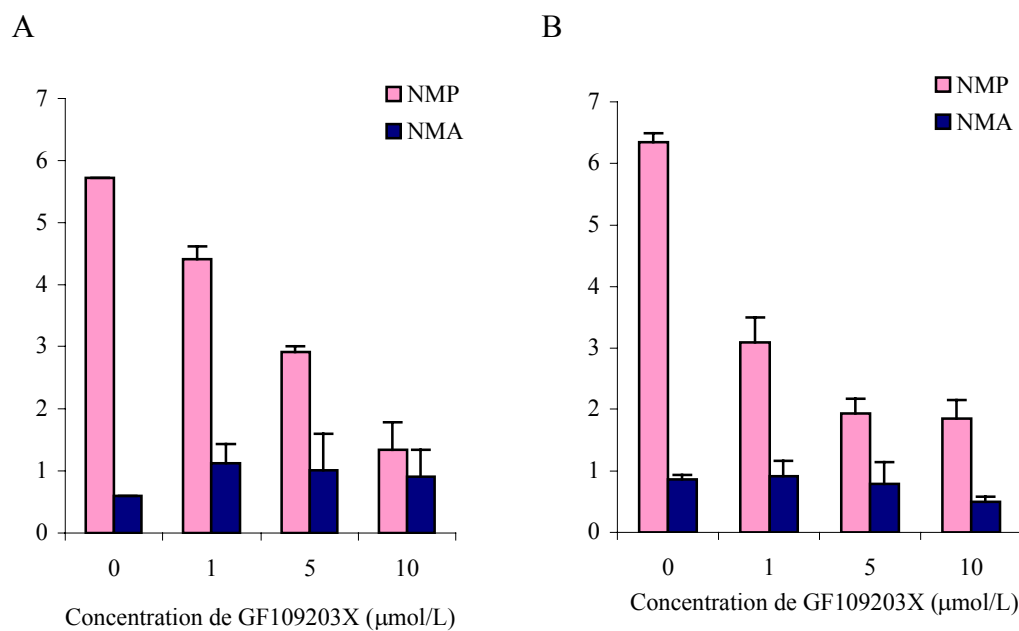
Phagocytose des LA 1-40 [A] et LA 1-42 [B] en présence de forskoline. La forskoline est ajoutée 40 min avant les levures, et 30 min avant les inhibiteurs de la lectinophagocytose.

Il a été démontré que la queue intracytoplasmique du LRP interagit avec une protéine hétérotrimérique liant le GTP — cette interaction est suivie d'une activation de la PKA (Goretzki *et al.*, 1998) — et avec 2 adaptateurs protéiques appelés FE65 et Dab-1 ainsi

qu'avec le domaine intracellulaire de l'APP (Kinoshita *et al.*, 2003 ; Trommsdorff *et al.*, 1998). Les présents résultats sont en accord avec cette observation.

La PKC joue un rôle important dans la phagocytose, en particulier dans la réorganisation du cytosquelette (Sheterline *et al.*, 1986), en phosphorylant des protéines comme MARCKS (Hartwing *et al.*, 1992) ou comme la plekstrine exprimée aussi bien par les plaquettes que par les macrophages (Brumell *et al.*, 1999). La famille des PKC est constituée, nous l'avons vu, de 4 membres, les PKC- δ , ϵ , η , et θ . Les différentes isoformes contrôlent divers aspects de la phagocytose convoyée par les Fc γ R (Larsen *et al.*, 2000). La PKC- ϵ est impliquée dans la phagocytose de particules opsonisées par des IgG et convoyée par les Fc γ R. (Zheng *et al.*, 1995).

FIGURE 3.23.
Effet du GF109203X sur la phagocytose des levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42.



Phagocytose des LA 1-40 [A] et LA 1-42 [B] en présence de GF109203X. *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$. Le GF109203X est ajouté 40 min avant les levures, et 30 min avant les inhibiteurs de la lectinophagocytose.

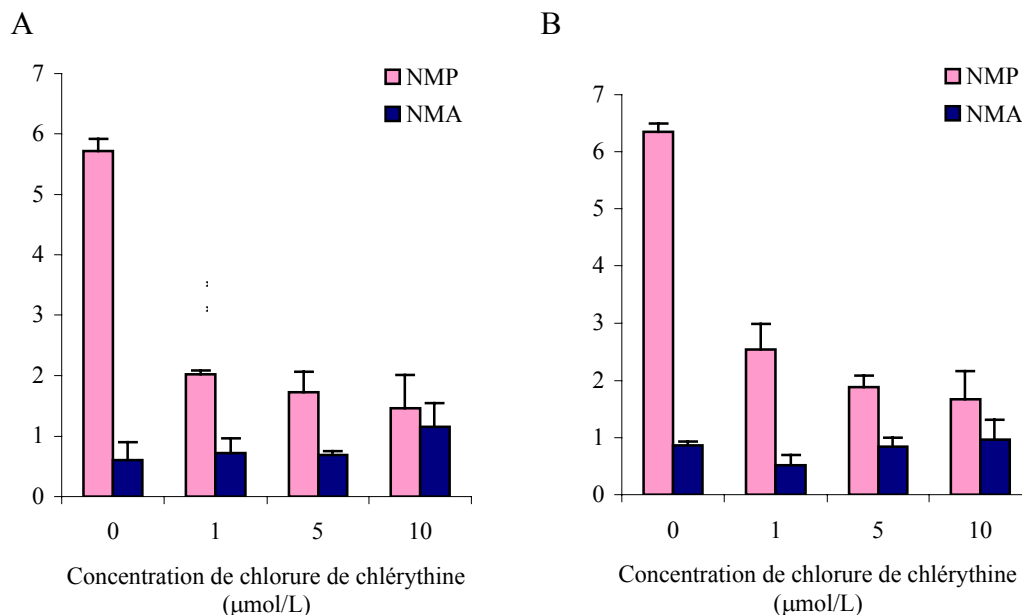
La queue intracytoplasmique du LRP est phosphorylée par une PKC α sur les résidus Ser et Thr. Sa phosphorylation réduit son association avec des protéines intracellulaires comme Shc et augmente son interaction avec Dab-1 et CED-6/GULP impliqués dans l'endocytose (Raganathan *et al.*, 2004) ainsi que dans la phagocytose de cellules apoptotiques convoyée par le LRP (Su *et al.*, 2002).

De façon à vérifier la possible implication de la PKC dans la phagocytose des LA 1-40 et des LA 1-42, on a étudié l'effet du GF109203X — un inhibiteur général de toutes les isoformes de PKC — sur ce phénomène (Figure 3.23). Cette molécule inhibe effectivement la phagocytose comme en témoigne la diminution significative et dépendante de la dose du NMP. Le NMA n'est pas affecté par le traitement.

Un deuxième inhibiteur de la PKC diminue lui aussi significativement et de manière dépendante de la dose la phagocytose des LA 1-40 et des LA 1-42. Ces résultats joints à ceux obtenus avec le GF109203X confirment l'implication de la PKC dans la phagocytose des levures opsonisées.

FIGURE 3.24.

Effet du chlorure de chlérythine sur la phagocytose des levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42.



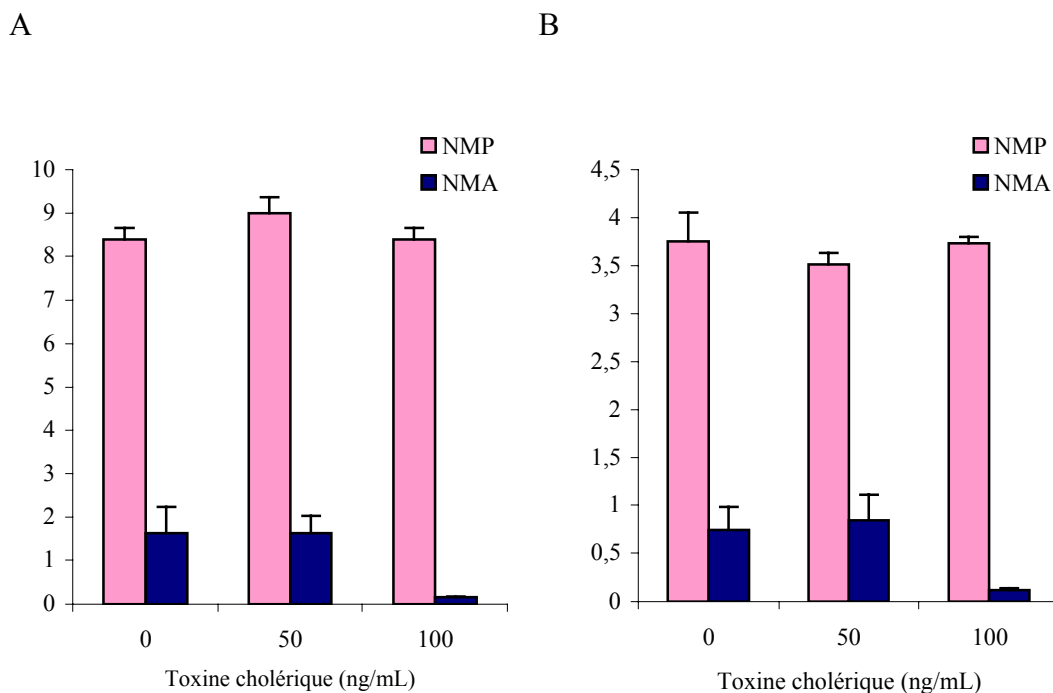
Phagocytose des LA 1-40 [A] et LA 1-42 [B] en présence de chlorure de chlérythine. *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$. Le chlorure de chlérythine est ajouté 40 min avant les levures, et 30 min avant les inhibiteurs de la lectinophagocytose.

Afin de déterminer si la PKA et la PKC sont activées consécutivement à une activation de la protéine Gs, on a étudié l'effet d'un activateur de la protéine Gs — la toxine cholérique — sur la phagocytose des levures opsonisées, aux concentrations de 50 ng/mL et 100 ng/mL.

La toxine n'exerce pas d'effet significatif sur la phagocytose des levures opsonisées par les peptides amyloïdes. L'hypothèse d'une activation indirecte ne semble donc pas vérifiée. Cependant, ces résultats doivent être interprétés avec prudence. En effet, lors de la phagocytose, la sous-unité Gs peut être déjà à son activité maximale, de sorte qu'aucun effet ne peut être observé sous l'effet de l'un de ses activateurs (Figure 3.25).

FIGURE 3.25.

Effet de la toxine cholérique sur la phagocytose des levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42.



Phagocytose des LA 1-40 [A] et LA 1-42 [B] en présence de toxine cholérique. La toxine est ajoutée 2 h avant les inhibiteurs de la lectinophagocytose.

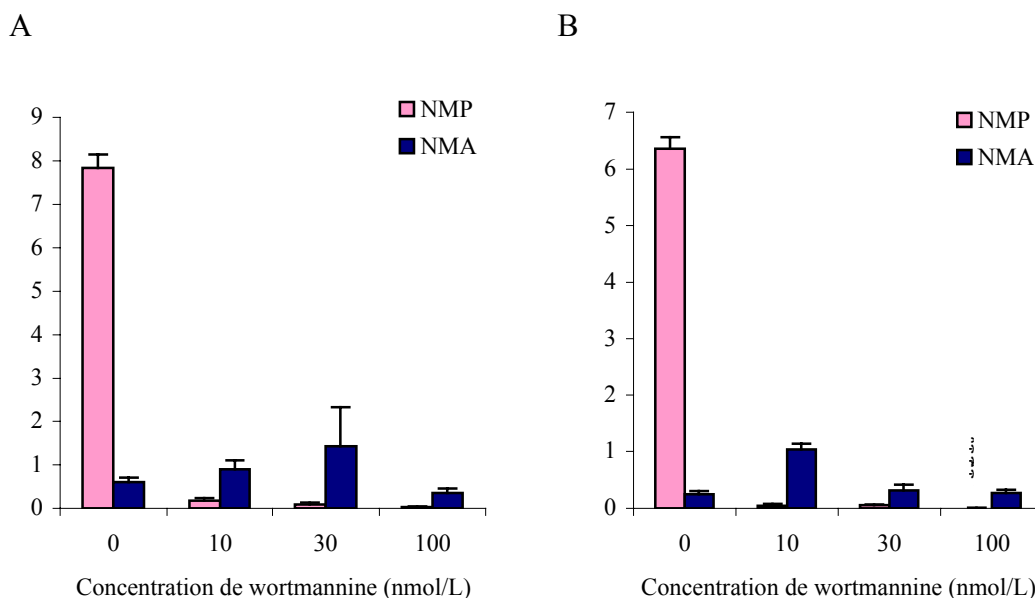
Enfin, l'implication de la PI3K dans la phagocytose des levures opsonisées a également été explorée. En effet, cette enzyme joue un rôle important dans la réorganisation du cytosquelette.

La PI3K transfère un phosphate de l'ATP sur le carbone 3' de l'inositol des phosphatidylinositols membranaires. L'action de la PI3K sur les phospholipides membranaires conduit à plusieurs effets : (a) translocation des transporteurs GLUT4 vers la membrane, où ils faciliteront le passage du glucose dans la cellule ; (b) activation de la protéine kinase B [PKB/Akt], point de départ d'une cascade (Akt, S6 kinase) activant des enzymes cibles du cytoplasme.

En présence de la wortmannine — un inhibiteur puissant de la PI3K — utilisée à 3 concentrations différentes (10 nmol/L, 30 nmol/L et 100 nmol/L) on note une forte diminution de la phagocytose, et ce, déjà à la plus faible concentration. Cette observation suggère fortement que la PI3K est impliquée dans la réorganisation du cytosquelette des cellules microgliales lors de la phagocytose des LA 1-40 et des LA 1-42 (Figure 3.26).

La PI3K joue un rôle dans la phagocytose en modulant la polymérisation de l'actine. Ses produits, la PIP2 et la PIP3, forment des complexes avec la profiline et la gelsoline et promeuvent ainsi la polymérisation de l'actine et la formation de pseudopodes

FIGURE 3.26.
Effet de la wortmannine sur la phagocytose des levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42.



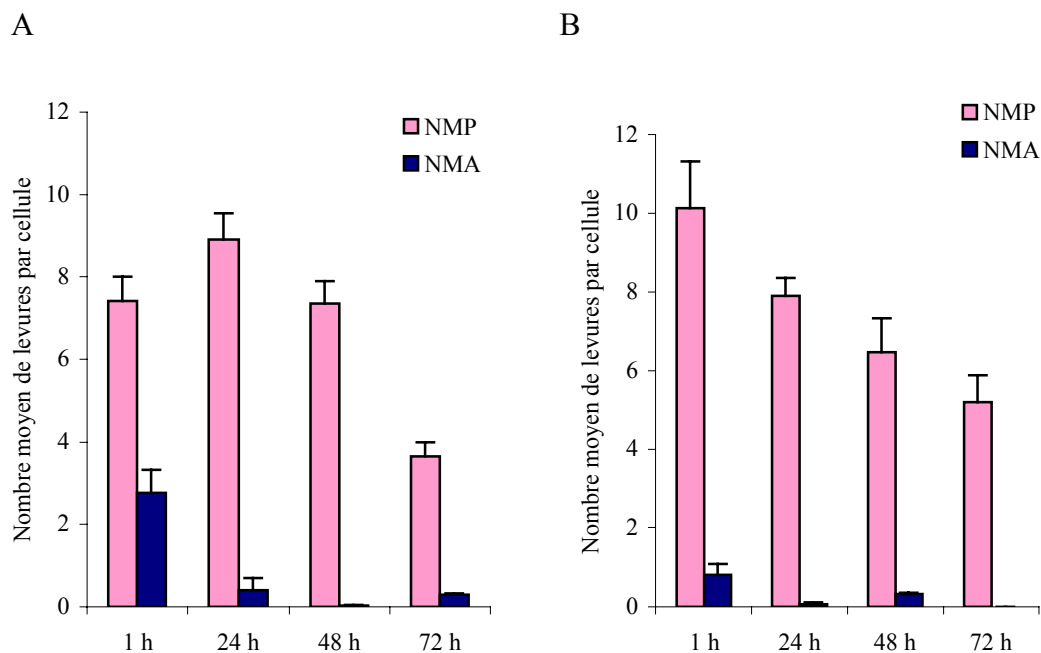
Phagocytose des LA 1-40 [A] et LA 1-42 [B] en présence de wortmannine. *** : $p < 0,001$. La wortmannine est ajoutée 30 min avant les inhibiteurs de la lectinophagocytose.

(Toker *et al.*, 1997). Elle joue aussi un rôle dans la fermeture des phagosomes (Araki *et al.*, 1996). Elle pourrait être impliquée dans la MA, car son inhibition dans les cerveaux de Rat induit une augmentation de l'hyperphosphorylation de la protéine Tau (Xu *et al.*, 2005).

35-Digestion des levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42.

Afin de déterminer si les cellules microgliales sont capables de digérer les levures opsonisées par les peptides β -amyloïdes. Pour cela nous avons étudié la persistance des levures opsonisées par les peptides amyloïdes jusqu'à 3 jours après la phagocytose (Figure 3.27).

FIGURE 3.27.
Persistance des levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42 après phagocytose.



NMP de LA 1-40 [A] et LA 1-42 [B] 1 h, 24 h, 48 h et 72 h après l'introduction des levures. ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$.

Dans le cas de LA 1-40, le NMP diminue de 50 % en 72 h. Il passe de 7,4 à 3,6. Avec les LA 1-42, le NMP diminue dans les mêmes proportions, il passe de 10,12 à 5,2 à

72 h. Ces résultats suggèrent donc que les cellules microgliales sont capables de digérer les levures opsonisées après qu'elles ont été phagocytées et que 50 % d'entre elles disparaissent dans les 72 h suivant la phagocytose. Les cellules microgliales de Rat peuvent éliminer le peptide A β fibrillaire (Shaffer *et al.*, 1995). On le retrouve dans des phagosomes (Ard *et al.*, 1996) et il peut y persister jusqu'à 20 jours après ingestion (Frackowiak *et al.*, 1992). Le peptide A β 1-42 fibrillaire est partiellement résistant à la dégradation lysosomique et persiste dans les endosomes des cellules microgliales pendant au moins 12 jours (Paresce *et al.*, 1997). Nos résultats montrent que 50 % des LA 1-40 et LA 1-42 disparaissent au bout de 72 h. Néanmoins, il est difficile de comparer nos résultats avec ceux des auteurs. Il est probable en effet que l'acidification survenant lors de la maturation des endosomes a pour effet d'éluer, ne fût-ce que partiellement, les peptides A β de la paroi des levures ; ces dernières deviennent alors directement accessibles à la dégradation comme le sont les levures non opsonisées ingérées par la voie des récepteurs de type lectine. Les levures non opsonisées ne sont pratiquement pas phagocytées en présence des inhibiteurs de la lectinophagocytose, de sorte que ce témoin n'est pas présenté dans la Figure 3.27. Bien qu'aucune étude systématique de la digestion des levures ingérées par la voie des récepteurs de type lectine n'ait été conduite sur les cellules microgliales, la comparaison que l'on peut faire avec la digestion des levures ingérées au moyen de cette voie par les macrophages péritonéaux de Souris, suggère que ces dernières y sont dégradées beaucoup plus rapidement (Giannis, résultats du laboratoire non publiés ; Makaya-Kumba, résultats du laboratoire non publiés)

36-Toxicité des levures opsonisées par les peptides amyloïdes pour les cellules microgliales.

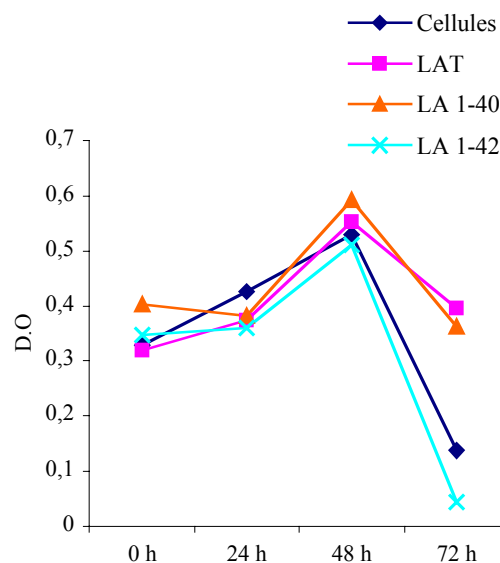
Le peptide amyloïde active les cellules microgliales et induit la production de divers médiateurs de l'inflammation comme le TNF α et des IL. C'est pourquoi la toxicité des LA 1-40 et des LA 1-42 pour les cellules microgliales a été étudiée au moyen de l'épreuve de viabilité au XTT. L'étude s'est déroulée sur 72 h (Figure 3.28).

Les LA 1-40 et les LA 1-42 ne présentent aucun effet toxique particulier pour les cellules microgliales. Les courbes de viabilité, en effet, sont identiques pour les 48 premières heures : la densité optique [D.O] de la solution du formazan produit par la transformation mitochondriale du XTT augmente avec le temps, ce qui montre que les cellules prolifèrent. A

72 h, on observe une diminution de cette D.O dans toutes le conditions. Elle est plus importante dans le cas des cellules seules et dans celui des cellules ayant phagocyté des LA 1-42. Mais cette différence n'a pas de signification.

A cet égard, il est intéressant de noter que le peptide A β , fibrillaire ou non, exerce un effet toxique sur les neurones en culture, lorsqu'il est utilisé à fortes concentrations (Yankner *et al.*, 1990 ; Pillot *et al.*, 1999).

FIGURE 3.28.
Toxicité des levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42.

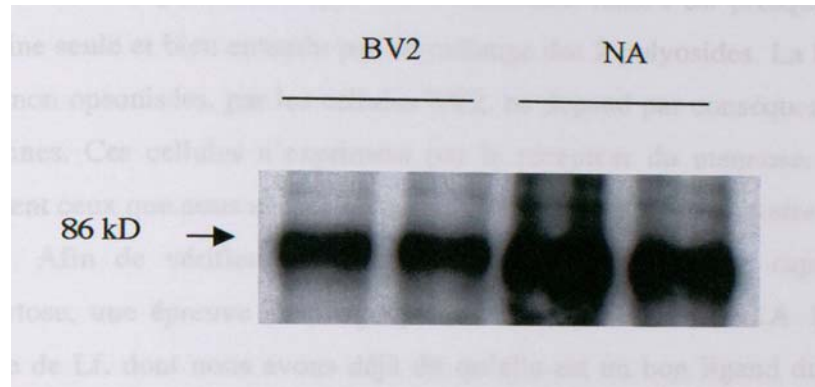


37-La lignée BV2, un autre modèle d'étude de l'élimination des plaques séniles artificielles.

La présence de la protéine LRP dans les cocultures et dans les cellules BV2 — lignée de cellules microgliales de Souris — a été vérifiée, de façon à déterminer s'il était possible d'utiliser pour le suite de nos travaux ces cellules en lignée, d'un maniement plus aisé, au lieu et place des cocultures. La lignée BV2 a été bien caractérisée dans notre laboratoire (Muller *et al.*, 1994). Elle exprime fortement le récepteur des β -glucannes mais n'exprime pas le récepteur du mannose. Fort heureusement, les cellules BV2 expriment le LRP (Figure 3.29) et elles sont capables de phagocyter les levures non opsonisées (Figure 3.30).

FIGURE 3.29.

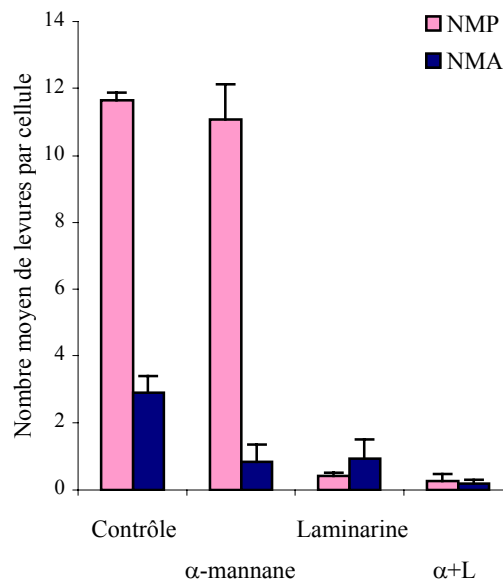
Mise en évidence de la *low density lipoprotein receptor-related protein* par immunopreinte de type *western*.



BV2 : cellules microgliales de Souris en lignée continue ; NA : cocultures non activée de cellules microgliales.

FIGURE 3.30.

État des récepteurs impliqués dans la phagocytose des levures non opsonisées par les cellules BV2.



Phagocytose des levures autoclavées en présence d' α -mannane (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$), de laminarine (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et des 2 ensemble. *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$.

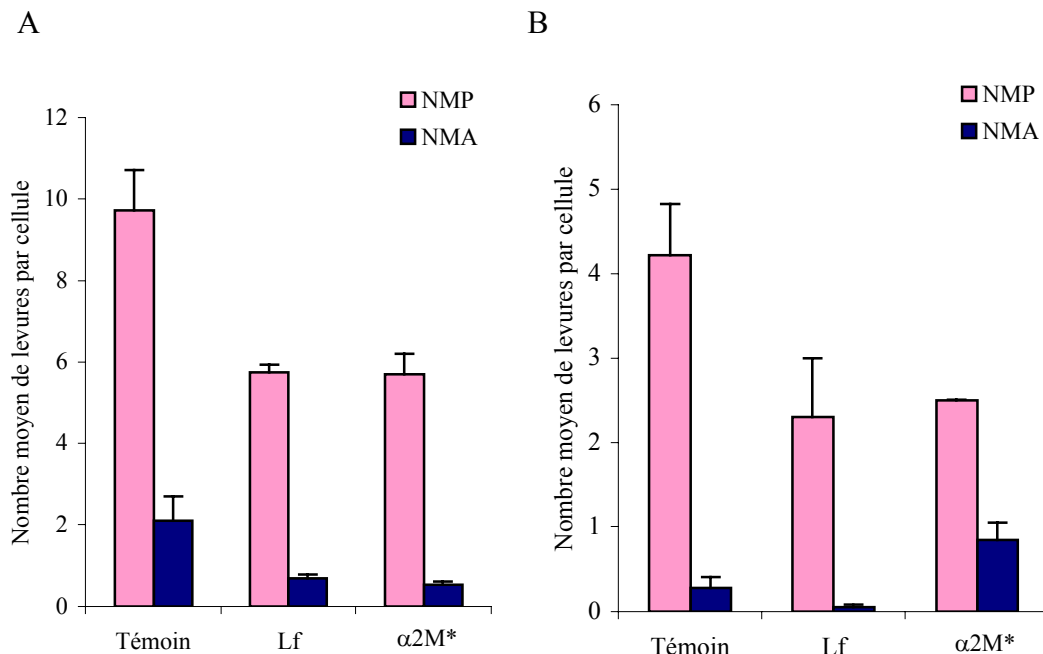
Les bandes de 86 kD observées dans les cellules BV2 et dans les cellules microgliales des cocultures correspondent à la partie intracellulaire du LRP. Elles sont très

fortement exprimées par les 2 types de cellules. Ce résultat légitime donc que l'on utilise les cellules BV2 pour étudier l'implication du LRP dans la phagocytose des LA 1-40 et des LA 1-42.

Les levures autoclavées non opsonisées sont très facilement ingérées. Leur phagocytose n'est pas inhibée par les α -mannanes, mais l'est presque complètement par la laminarine seule et bien entendu par un mélange des 2 polysides. La lectinophagocytose des levures non opsonisées, par les cellules BV2, ne dépend par conséquent que du récepteur des β -glucannes. Ces cellules n'expriment pas le récepteur du mannose. Les présents résultats confirment ceux que nous avons obtenus antérieurement au laboratoire (Muller *et al.*, 1994).

Afin de vérifier que le LRP des cellules BV2 est capables de convoier la phagocytose, une épreuve de phagocytose des LA 1-40 et des LA 1-42 a été conduite en présence de Lf, dont nous avons déjà dit qu'elle est un bon ligand du LRP, ou d' α 2M*, un autre ligand de ce récepteur (Figure 3.31).

FIGURE 3.31.
Effet de la lactoferrine et de l' α 2-macroglobuline activée sur la phagocytose des levures opsonisées par les peptides A β 1-40 et A β 1-42 en cellules BV2.



Phagocytose des LA 1-40 [A] et des LA 1-42 [B] par les cellules BV2 traitées à la Lf (0,1 mg/mL) ou à l' α 2M* (300 nmo/L) ajoutés pendant 10 min en même temps que les inhibiteurs de la lectinophagocytose ; *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$.

La phagocytose des LA 1-40 et des LA 1-42 diminue significativement en présence de chacun des ligands du LRP. Dans le cas des LA 1-40, la diminution est de 40 % en

présence de Lf ou d' α 2M*. Dans ces mêmes conditions, la diminution de la phagocytose des LA 1-42 atteint 50 %. Ces résultats montrent que le LRP des cellules BV2 est bien impliqué dans la phagocytose des LA 1-40 et des LA 1-42, bien qu'à des degrés divers selon le peptide en cause. Quoiqu'il en soit, ces résultats confirment l'implication du LRP dans les phénomènes de phagocytose en général, et confortent les observations obtenues en cocultures avec les LA 1-40 et 1-42 en particulier.

Les cellules BV2 étant validées comme modèle d'étude de l'ingestion des PS convoyée par le LRP, il était intéressant d'étudier l'effet de substances connues pour activer ou inactiver les cellules microgliales (a) sur l'ingestion des LA 1-40 et des LA 1-41, et (b) sur le niveau d'expression du mRNA du LRP.

Nombre de ces substances sont connues pour modifier la morphologie des phagocytes mononucléés, et la faire correspondre à l'état qu'elles y induisent. C'est donc ce premier point que nous avons vérifié dans le cas des cellules BV2 (Figure 3.32).

En présence du LPS, les cellules BV2 prennent une morphologie activée (cf. Laurenzi *et al.*, 2001) : elles ont un diamètre plus grand ; certaines d'entre elles adhèrent moins fortement au support et passent en suspension. En présence de la dexaméthasone, les cellules sont plus étalées. Enfin, en présence d' $\text{INF}\gamma$, les cellules microgliales sont activées ; elles sont moins grandes que les cellules traitées au LPS, mais on retrouve plus de cellules en suspension en présence d' $\text{INF}\gamma$ qu'en présence de LPS.

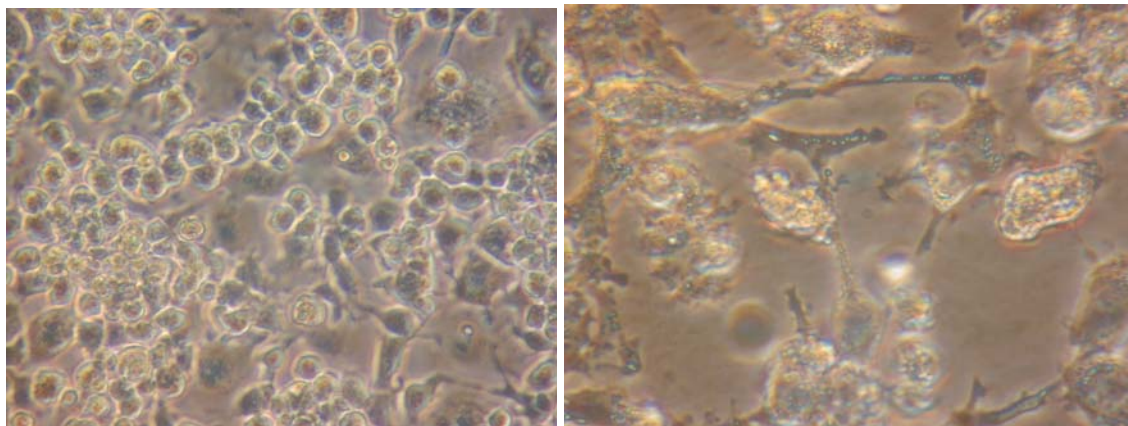
L'effet de ces différentes substances sur l'expression du mRNA du récepteur LRP a alors été étudiée.

En présence de LPS et d' $\text{INF}\gamma$ qui sont des activateurs classiques des cellules microgliales en culture, on observe une diminution de l'expression du mRNA du LRP. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature qui montrent que le LPS et l' $\text{INF}\gamma$ induisent une diminution de l'expression du mRNA de ce récepteur (LaMarre *et al.*, 1993). En revanche, les données de la littérature indiquent que l'expression du mRNA du LRP est augmentée après traitement avec l'anti-inflammatoire de choix qu'est la dexaméthasone (Kancha et Hussain, 1996) alors qu'en cellules BV2 et dans les cocultures, la dexaméthasone régule négativement l'expression du mRNA du LRP. La modulation de l'expression du LRP par des substances pro et anti-inflammatoires montre que ce dernier joue un rôle important au cours du processus inflammatoire. Cette expression est diminuée dans le cerveau des sujets atteints de MA, consécutivement à l'inflammation. On conçoit l'intérêt qu'il y aurait à mettre en œuvre des traitements anti-inflammatoires appropriés pour augmenter l'expression du LRP et favoriser l'élimination des PS (Breitner, 1996). Cependant,

l'expression du LRP par les cellules microgliales peut diminuer en cas d'inflammation afin de faciliter leur migration. Il faut donc conduire des études plus approfondies pour exploiter cette voie thérapeutique, et faire preuve de prudence et de discernement dans le choix des anti-inflammatoires utilisés ou préconisés.

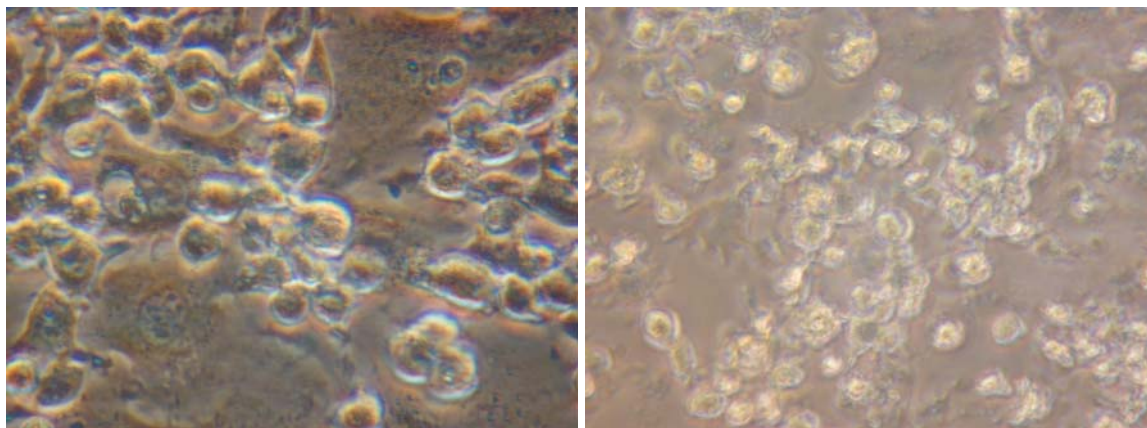
FIGURE 3.32

Effet du lipopolysaccharide, de l'interferon γ et de la dexaméthasone sur la morphologie des cellules BV2.



Témoins

LPS



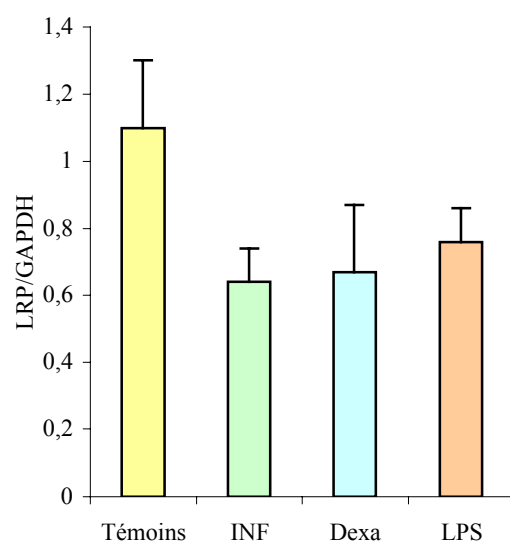
Dexaméthasone

IFN γ

Les cellules sont préincubées pendant 48 h avec l'INF γ ou la dexaméthasone, pendant 72 h avec le LPS. Elles sont observées au microscope juste avant d'effectuer la lyse et d'extraire les RNA pour pratiquer la RT-PCR.

FIGURE 3.33.

Effet du lipopolysaccharide, de l'interferon γ et de la dexaméthasone sur l'expression des mRNA de la *low density liprotein receptor-related protein* en cellules BV2.



RT-PCR des mRNA des cellules BV2 traitées pendant 48 h avec 200 U/mL d'INF γ ou 10⁻⁶ mol/L de dexaméthasone [Dexa], ou pendant 72 h avec 1 μ g/mL de LPS.

4-CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.

Des travaux précédents conduits au laboratoire ont montré la validité et l'originalité de notre modèle d'étude (Laporte *et al.*, 2004). Il implique l'usage de levures opsonisées par le peptide A β fibrillaire. Ces levures miment les PS artificielles car leur paroi est enduite de peptide amyloïde A β 1-40 ou A β 1-42 qui en sont les composants majeurs ; en outre elles en ont sensiblement la taille. Nous avons étudié l'ingestion de ces levures opsonisées par des cellules microgliales en coculture caractérisées de manière approfondie (Laporte *et al.*, 2005).

Nous avons pu étudier certains des mécanismes moléculaires de la phagocytose et montrer qu'en plus du LRP, un autre récepteur, le CR3, serait impliqué dans l'élimination des LA 1-40 et LA 1-42. Ce point du reste soulève question. Les épreuves de phagocytose sont conduites en milieu sans sérum. Par conséquent les composants du système du complément impliqués dans le phénomène ne peuvent avoir pour origine que les cellules de la coculture. Les conditions expérimentales sont telles qu'on ne peut exclure que les peptides amyloïdes eux-mêmes activent directement le complément par une voie qui ressemblerait à la voie alterne. La reconnaissance et l'ingestion des levures est dépendante des ions calcium et magnésium au moins pour ce qui est des LA 1-42. L'étude de la signalisation intracellulaire accompagnant et/ou permettant la phagocytose était difficile à réaliser en raison de la complexité du système cellulaire et du phénomène étudié lui-même, mais nous avons pu montrer l'implication de plusieurs enzymes intracellulaires dans la phagocytose des LA 1-40 et des LA 1-42. Ces enzymes sont des cibles thérapeutiques potentielles. On peut imaginer que l'induction spécifique de leur expression dans les cellules microgliales cérébrales pourra faciliter l'ingestion des PS.

Les mécanismes moléculaires qui président à l'ingestion des levures opsonisées par le peptide amyloïde sont extrêmement complexes et la complexité de ces mécanismes ainsi que les phénomènes de compensation qui peuvent survenir quand on bloque certains récepteurs rendent invalides toute généralisation hâtive des présents résultats. Bien que les LA opsonisées soient un modèle très simplifié de PS, les cocultures elles-mêmes constituent un modèle complexe et incomplètement maîtrisé. En outre, plus de 50 molécules entrent dans la composition des PS, et l'on ne connaît pas l'effet biologique qu'exercerait l'association de ces molécules à notre modèle de levures opsonisées. Cependant, l'usage des cellules BV2, dont nous avons montré la validité, permet de simplifier considérablement le modèle d'étude. Et l'on pourra envisager aussi d'associer aux levures opsonisées elles-mêmes d'autres molécules majoritaires de la PS.

La modulation de l'interaction du peptide β amyloïde avec les cellules microgliales offre certainement une perspective thérapeutique nouvelle et inespérée de la MA, et ce, encore

plus, depuis que l'on a prouvé qu'il était possible de promouvoir cette élimination via le Fc γ R après injection d'Ac dirigés contre le peptide amyloïde, à des Souris transgéniques exprimant le gène de l'APP muté (Bard *et al.*, 2000). Mais les essais de vaccination conduits chez l'homme ont été un échec. Aucune efficacité thérapeutique n'a été démontrée et plusieurs cas de méningite se sont déclarés.

Une bonne solution pour éliminer les PS des cerveaux des sujets atteints de MA serait de promouvoir ou de faciliter l'interaction des cellules microgliales et des peptides amyloïdes à hauteur de récepteurs plus spécifiques. L'intérêt de notre modèle vient de ce qu'il permet d'identifier les récepteurs impliqués dans la phagocytose des peptides en conformation fibrillaire (comme dans la PS), et fixés à un support qui est la levure autoclavée. Dans le cerveau des malades, en effet, le peptide fibrillaire n'est pas libre, et les auteurs, dont nous-mêmes, ont montré que l'interaction du peptide fibrillaire libre avec la cellule microgliale est différente de celle qu'entretient avec elle du peptide immobilisé.

L'étude des mécanismes moléculaires de la phagocytose des PS permet d'identifier plus finement le type d'interaction entre le peptide immobilisé et les récepteurs responsables de son ingestion. La cascade de signalisation intracellulaire qui accompagne et permet cette élimination indique que la phagocytose des LA opsonisées est un phénomène complexe et qu'elle fait intervenir différents récepteurs dont l'engagement n'aboutit pas forcément à mobiliser les mêmes voies de signalisation intracellulaires. Il en résulte que l'engagement d'un récepteur peut avoir des effets qui diffèrent selon sa nature, et notamment des effets pathogènes. Parmi ces récepteurs, nous avons pu identifier le LRP, qui est exprimé faiblement dans les cerveaux des malades atteints de MA (Kang *et al.*, 2000) et le CR3 qui est un récepteur phagocytaire bien connu. On peut considérer ces 2 récepteurs sont des cibles thérapeutiques très intéressantes. En les activant ou en induisant leur expression dans les cellules microgliales, on peut espérer augmenter leur capacité à phagocyter les fibres amyloïdes.

5-BIBLIOGRAPHIE.

- Acarin, L., Vela, J.M., Gonzalez, B., Castellano, B. (1994) Demonstration of poly-N-acetyl lactosamine residues in ameboid and ramified microglial cells in rat brain by tomato lectin binding. *J Histochem Cytochem* **42**, 1033-1041.
- Abraham, C.R., Potter, H. (1989) Alpha 1-antichymotrypsin in brain aging and disease. *Prog Clin Biol Res* **317**, 1037-1048.
- Aderem, A.A., Scott, W.A., Cohn, Z.A. (1986) Evidence for sequential signals in the induction of the arachidonic acid cascade in macrophages. *J Exp Med* **163**, 139-154.
- Akassoglou, K., Probert, L., Kontogeorgos, G., Kollias, G. (1997) Astrocyte-specific but not neuron-specific transmembrane TNF triggers inflammation and degeneration in the central nervous system of transgenic mice. *J Immunol* **158**, 438-445.
- Akiyama, H., Arai, T., Kondo, H., Tanno, E., Haga, C., Ikeda, K. (2000) Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **14 Suppl 1**, S47-53.
- Akiyama, H., Ikeda, K., Kondo, H., McGeer, P.L. (1992) Thrombin accumulation in brains of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **146**, 152-154.
- Akiyama, H., Schwab, C., Kondo, H., Mori, H., Kametani, F., Ikeda, K., McGeer, P.L. (1996) Granules in glial cells of patients with Alzheimer's disease are immunopositive for C-terminal sequences of beta-amyloid protein. *Neurosci Lett* **206**, 169-172.
- Aktories, K. (1990) ADP-ribosylation of actin. *J Muscle Res Cell Motil* **11**, 95-7.
- Albright, A.V., Shieh, J.T., Itoh, T., Lee, B., Pleasure, D., O'Connor, M.J., Doms, R.W., Gonzalez-Scarano, F. (1999) Microglia express CCR5, CXCR4, and CCR3, but of these, CCR5 is the principal coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 dementia isolates. *J Virol* **73**, 205-213.
- Allen, J.N., Moore, S.A., Liao, Z., Wewers, M.D. (1997) Changes in mononuclear phagocyte microtubules after endotoxin stimulation. I. Changes in microtubule stability. *Am J Respir Cell Mol Biol* **16**, 119-126.
- Allen, L.A., Aderem, A. (1996) Mechanisms of phagocytosis. *Curr Opin Immunol* **8**, 36-40.
- Allen, L.H., Aderem, A. (1995) A role for MARCKS, the alpha isozyme of protein kinase C and myosin I in zymosan phagocytosis by macrophages. *J Exp Med* **182**, 829-840.
- Alliot, F., Godin, I., Pessac, B. (1999) Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res Dev Brain Res* **117**, 145-152.
- Alliot, F., Lecain, E., Grima, B., Pessac, B. (1991) Microglial progenitors with a high proliferative potential in the embryonic and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 1541-1545.
- Aloisi, F., Penna, G., Cerase, J., Menendez Iglesias, B., Adorini, L. (1997) IL-12 production by central nervous system microglia is inhibited by astrocytes. *J Immunol* **159**, 1604-1612.

- Alonso, A., Zaidi, T., Novak, M., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. (2001) Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6923-6928.
- Ampe, C., Markey, F., Lindberg, U., Vandekerckhove, J. (1988) The primary structure of human platelet profilin: reinvestigation of the calf spleen profilin sequence. *FEBS Lett* **228**, 17-21.
- Annaert, W., De Strooper, B. (2002) A cell biological perspective on Alzheimer's disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**, 25-51.
- Araki, N., Johnson, M.T., Swanson, J.A. (1996) A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J Cell Biol* **135**, 1249-1260.
- Ard, M.D., Cole, G.M., Wei, J., Mehrle, A.P., Fratkin, J.D. (1996) Scavenging of Alzheimer's amyloid beta-protein by microglia in culture. *J Neurosci Res* **43**, 190-202.
- Ariizumi, K., Shen, G.L., Shikano, S., Xu, S., Ritter, R., 3rd, Kumamoto, T., Edelbaum, D., Morita, A., Bergstresser, P.R., Takashima, A. (2000) Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *J Biol Chem* **275**, 20157-20167.
- Armstrong, P.B., Armstrong, M.T., Quigley, J.P. (1993) Involvement of alpha 2-macroglobulin and C-reactive protein in a complement-like hemolytic system in the arthropod, *Limulus polyphemus*. *Mol Immunol* **30**, 929-34.
- Arora, P.D., Glogauer, M., Kapus, A., Kwiatkowski, D.J., McCulloch, C.A. (2004) Gelsolin mediates collagen phagocytosis through a rac-dependent step. *Mol Biol Cell* **15**, 588-599.
- Ashwell, K. (1990) Microglia and cell death in the developing mouse cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res* **55**, 219-230.
- Ashwell, K. (1991) The distribution of microglia and cell death in the fetal rat forebrain. *Brain Res Dev Brain Res* **58**, 1-12.
- Aspenstrom, P. (1999) The Rho GTPases have multiple effects on the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res* **246**, 20-5.
- Athlin, L., Domellof, L., Norberg, B.O. (1986) The phagocytosis of yeast cells by monocytes: effects of colchicine, beta-lumicolchicine, and gamma-lumicolchicine. *Lymphology* **19**, 130-135.
- Austyn, J.M., Gordon, S. (1981) F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol* **11**, 805-815.
- Axline, S.G., Reaven, E.P. (1974) Inhibition of phagocytosis and plasma membrane mobility of the cultivated macrophage by cytochalasin B. Role of subplasmalemmal microfilaments. *J Cell Biol* **62**, 647-59.

- Badie, B., Schartner, J., Vorpahl, J., Preston, K. (2000) Interferon-gamma induces apoptosis and augments the expression of Fas and Fas ligand by microglia in vitro. *Exp Neurol* **162**, 290-296.
- Bamburg, J.R. (1999) Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 185-230.
- Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R.L., Games, D., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Lieberburg, I., Motter, R., Nguyen, M., Soriano, F., Vasquez, N., Weiss, K., Welch, B., Seubert, P., Schenk, D., Yednock, T. (2000) Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med* **6**, 916-919.
- Barger, S.W., Harmon, A.D. (1997) Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. *Nature* **388**, 878-881.
- Barnes, H., Ackermann, E.J., van der Geer, P. (2003) v-Src induces Shc binding to tyrosine 63 in the cytoplasmic domain of the LDL receptor-related protein 1. *Oncogene* **22**, 3589-3597.
- Barrow, C.J., Yasuda, A., Kenny, P.T., Zagorski, M.G. (1992) Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid beta-peptides of Alzheimer's disease. Analysis of circular dichroism spectra. *J Mol Biol* **225**, 1075-1093.
- Basi, G., Frigon, N., Barbour, R., Doan, T., Gordon, G., McConlogue, L., Sinha, S., Zeller, M. (2003) Antagonistic effects of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzymes 1 and 2 on beta-amyloid peptide production in cells. *J Biol Chem* **278**, 31512-31520.
- Benard, M., Gonzalez, B.J., Schouft, M.T., Falluel-Morel, A., Vaudry, D., Chan, P., Vaudry, H., Fontaine, M. (2004) Characterization of C3a and C5a receptors in rat cerebellar granule neurons during maturation. Neuroprotective effect of C5a against apoptotic cell death. *J Biol Chem* **279**, 43487-43496.
- Bengtsson, T., Jaconi, M.E., Gustafson, M., Magnusson, K.E., Theler, J.M., Lew, D.P., Stendahl, O. (1993) Actin dynamics in human neutrophils during adhesion and phagocytosis is controlled by changes in intracellular free calcium. *Eur J Cell Biol* **62**, 49-58.
- Benveniste, E.N., Huneycutt, B.S., Shrikant, P., Ballestas, M.E. (1995) Second messenger systems in the regulation of cytokines and adhesion molecules in the central nervous system. *Brain Behav Immun* **9**, 304-314.
- Benzing, W.C., Mufson, E.J. (1995) Apolipoprotein E immunoreactivity within neurofibrillary tangles: relationship to Tau and PHF in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* **132**, 162-171.
- Billings, L.M., Oddo, S., Green, K.N., McGaugh, J.L., Laferla, F.M. (2005) Intraneuronal A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* **45**, 675-688.

- Bjermer, L., von Schoultz, E., Norberg, B., Henriksson, R. (1988) Estramustine inhibits monocyte phagocytosis. *Prostate* **13**, 49-55.
- Blystone, S.D., Graham, I.L., Lindberg, F.P., Brown, E.J. (1994) Integrin alpha v beta 3 differentially regulates adhesive and phagocytic functions of the fibronectin receptor alpha 5 beta 1. *J Cell Biol* **127**, 1129-1137.
- Bohatschek, M., Kloss, C.U., Kalla, R., Raivich, G. (2001) In vitro model of microglial deramification: ramified microglia transform into amoeboid phagocytes following addition of brain cell membranes to microglia-astrocyte cocultures. *J Neurosci Res* **64**, 508-522.
- Boya, J., Calvo, J., Prado, A. (1979) The origin of microglial cells. *J Anat* **129**, 177-186.
- Boya, J., Calvo, J.L., Carbonell, A.L., Borregon, A. (1991) A lectin histochemistry study on the development of rat microglial cells. *J Anat* **175**, 229-236.
- Boya, J., Carbonell, A.L., Calvo, J.L., Borregon, A. (1991) Microglial cells in the central nervous system of the rabbit and rat: cytochemical identification using two different lectins. *Acta Anat (Basel)* **140**, 250-253.
- Braak, H., Braak, E. (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl)* **82**, 239-259.
- Brown, G.D., Taylor, P.R., Reid, D.M., Willment, J.A., Williams, D.L., Martinez-Pomares, L., Wong, S.Y., Gordon, S. (2002) Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Exp Med* **196**, 407-12.
- Brumell, J.H., Howard, J.C., Craig, K., Grinstein, S., Schreiber, A.D., Tyers, M. (1999) Expression of the protein kinase C substrate pleckstrin in macrophages: association with phagosomal membranes. *J Immunol* **163**, 3388-3395.
- Buxbaum, J.D., Thinakaran, G., Koliatsos, V., O'Callahan, J., Slunt, H.H., Price, D.L., Sisodia, S.S. (1998) Alzheimer amyloid protein precursor in the rat hippocampus: transport and processing through the perforant path. *J Neurosci* **18**, 9629-9637.
- Buyon, J.P., Slade, S.G., Reibman, J., Abramson, S.B., Philips, M.R., Weissmann, G., Winchester, R. (1990) Constitutive and induced phosphorylation of the alpha- and beta-chains of the CD11/CD18 leukocyte integrin family. Relationship to adhesion-dependent functions. *J Immunol* **144**, 191-197.
- Cajal, S. (1913) Sobre un nuevo proceder de impregnacion de la neuroglia y sus resultados en los centros nerviosos del hombre y animals. *Trab. Lab. Invest. Biol.* **11**, 219-223.
- Carrier, M.F., Didry, D., Erk, I., Lepault, J., Van Troys, M.L., Vandekerckhove, J., Perelroizen, I., Yin, H., Doi, Y., Pantaloni, D. (1996) Tbeta 4 is not a simple G-actin sequestering protein and interacts with F-actin at high concentration. *J Biol Chem* **271**, 9231-9239.

- Carrier, M.F., Jean, C., Rieger, K.J., Lenfant, M., Pantaloni, D. (1993) Modulation of the interaction between G-actin and thymosin beta 4 by the ATP/ADP ratio: possible implication in the regulation of actin dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 5034-5038.
- Casella, J.F., Torres, M.A. (1994) Interaction of Cap Z with actin. The NH₂-terminal domains of the alpha 1 and beta subunits are not required for actin capping, and alpha 1 beta and alpha 2 beta heterodimers bind differentially to actin. *J Biol Chem* **269**, 6992-6998.
- Cassimeris, L.U., Wadsworth, P., Salmon, E.D. (1986) Dynamics of microtubule depolymerization in monocytes. *J Cell Biol* **102**, 2023-2032.
- Castellano, B., Gonzalez, B., Dalmau, I., Vela, J.M. (1991) Identification and distribution of microglial cells in the cerebral cortex of the lizard: a histochemical study. *J Comp Neurol* **311**, 434-444.
- Chamak, B., Mallat, M. (1991) Fibronectin and laminin regulate the in vitro differentiation of microglial cells. *Neuroscience* **45**, 513-527.
- Chang, J.Y., Liu, L.Z. (1999) Manganese potentiates nitric oxide production by microglia. *Brain Res Mol Brain Res* **68**, 22-28.
- Chang, R.C., Hudson, P.M., Wilson, B.C., Liu, B., Abel, H., Hong, J.S. (2000) High concentrations of extracellular potassium enhance bacterial endotoxin lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in glia-neuron mixed cultures. *Neuroscience* **97**, 757-764.
- Chapman, P.F., White, G.L., Jones, M.W., Cooper-Blacketer, D., Marshall, V.J., Irizarry, M., Younkin, L., Good, M.A., Bliss, T.V., Hyman, B.T., Younkin, S.G., Hsiao, K.K. (1999) Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci* **2**, 271-276.
- Chartier-Harlin, M.C., Crawford, F., Houlden, H., Warren, A., Hughes, D., Fidani, L., Goate, A., Rossor, M., Roques, P., Hardy, J., et al. (1991) Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* **353**, 844-846.
- Chatila, T.A., Geha, R.S., Arnaout, M.A. (1989) Constitutive and stimulus-induced phosphorylation of CD11/CD18 leukocyte adhesion molecules. *J Cell Biol* **109**, 3435-3444.
- Chen, W.J., Goldstein, J.L., Brown, M.S. (1990) NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* **265**, 3116-3123.
- Chung, H., Brazil, M.I., Soe, T.T., Maxfield, F.R. (1999) Uptake, degradation, and release of fibrillar and soluble forms of Alzheimer's amyloid beta-peptide by microglial cells. *J Biol Chem* **274**, 32301-32308.
- Cirillo, J.D., Cirillo, S.L., Yan, L., Bermudez, L.E., Falkow, S., Tompkins, L.S. (1999) Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **67**, 4427-4434.

- Conese, M., Blasi, F. (1995) Urokinase/urokinase receptor system: internalization/degradation of urokinase-serpin complexes: mechanism and regulation. *Biol Chem Hoppe Seyler* **376**, 143-155.
- Cong, F., Schweizer, L., Varmus, H. (2004) Wnt signals across the plasma membrane to activate the beta-catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP. *Development* **131**, 5103-5115.
- Coraci, I.S., Husemann, J., Berman, J.W., Hulette, C., Dufour, J.H., Campanella, G.K., Luster, A.D., Silverstein, S.C., El-Khoury, J.B. (2002) CD36, a class B scavenger receptor, is expressed on microglia in Alzheimer's disease brains and can mediate production of reactive oxygen species in response to beta-amyloid fibrils. *Am J Pathol* **160**, 101-112.
- Cossmann, P.H., Eggli, P.S., Christ, B., Kurz, H. (1997) Mesoderm-derived cells proliferate in the embryonic central nervous system: confocal microscopy and three-dimensional visualization. *Histochem Cell Biol* **107**, 205-213.
- Cox, D., Chang, P., Zhang, Q., Reddy, P.G., Bokoch, G.M., Greenberg, S. (1997) Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes. *J Exp Med* **186**, 1487-1494.
- Cox, D., Dale, B.M., Kashiwada, M., Helgason, C.D., Greenberg, S. (2001) A regulatory role for Src homology 2 domain-containing inositol 5'-phosphatase (SHIP) in phagocytosis mediated by Fc gamma receptors and complement receptor 3 (alpha(M)beta(2); CD11b/CD18). *J Exp Med* **193**, 61-71.
- Cramer, D.V., Wu, G.D., Chapman, F.A., Cajulis, E., Wang, H.K., Makowka, L. (1992) Lymphocytic subsets and histopathologic changes associated with the development of heart transplant arteriosclerosis. *J Heart Lung Transplant* **11**, 458-466.
- Cuadros, M.A., Martin, C., Coltey, P., Almendros, A., Navascues, J. (1993) First appearance, distribution, and origin of macrophages in the early development of the avian central nervous system. *J Comp Neurol* **330**, 113-129.
- Cuadros, M.A., Moujahid, A., Martin-Partido, G., Navascues, J. (1992) Microglia in the mature and developing quail brain as revealed by a monoclonal antibody recognizing hemopoietic cells. *Neurosci Lett* **148**, 11-14.
- Cuadros, M.A., Moujahid, A., Quesada, A., Navascues, J. (1994) Development of microglia in the quail optic tectum. *J Comp Neurol* **348**, 207-224.
- Cuadros, M.A., Rodriguez-Ruiz, J., Calvente, R., Almendros, A., Marin-Teva, J.L., Navascues, J. (1997) Microglia development in the quail cerebellum. *J Comp Neurol* **389**, 390-401.
- Czop, J.K., Austen, K.F. (1985) A beta-glucan inhibitable receptor on human monocytes: its identity with the phagocytic receptor for particulate activators of the alternative complement pathway. *J Immunol* **134**, 2588-2593.

- Daeron, M. (1997) Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol* **15**, 203-234.
- Dalmau, I., Vela, J.M., Gonzalez, B., Castellano, B. (1997) Expression of LFA-1alpha and ICAM-1 in the developing rat brain: a potential mechanism for the recruitment of microglial cell precursors. *Brain Res Dev Brain Res* **103**, 163-170.
- Darby, C., Geahlen, R.L., Schreiber, A.D. (1994) Stimulation of macrophage Fc gamma RIIIA activates the receptor-associated protein tyrosine kinase Syk and induces phosphorylation of multiple proteins including p95Vav and p62/GAP-associated protein. *J Immunol* **152**, 5429-5437.
- Dartigues, J.F., Helmer, C., Dubois, B., Duyckaerts, C., Laurent, B., Pasquier, F., Touchon, J. (2002) [Alzheimer's disease: a public health problem: yes, but a priority?]. *Rev Neurol (Paris)* **158**, 311-315.
- Das, S., Potter, H. (1995) Expression of the Alzheimer amyloid-promoting factor antichymotrypsin is induced in human astrocytes by IL-1. *Neuron* **14**, 447-456.
- Davis, J.B., McMurray, H.F., Schubert, D. (1992) The amyloid beta-protein of Alzheimer's disease is chemotactic for mononuclear phagocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **189**, 1096-1100.
- De Groot, C.J., Huppes, W., Sminia, T., Kraal, G., Dijkstra, C.D. (1992) Determination of the origin and nature of brain macrophages and microglial cells in mouse central nervous system, using non-radioactive in situ hybridization and immunoperoxidase techniques. *Glia* **6**, 301-309.
- De Strooper, B. (2003) Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* **38**, 9-12.
- Del Rio Hortega, P. (1958) [Studies on the centrosome of nerve cells & neuroglia of vertebrates; normal & abnormal forms.]. *Arch Histol Norm Patol* **7**, 77-114.
- Della Bianca, V., Grzeskowiak, M., Rossi, F. (1990) Studies on molecular regulation of phagocytosis and activation of the NADPH oxidase in neutrophils. IgG- and C3b-mediated ingestion and associated respiratory burst independent of phospholipid turnover and Ca²⁺ transients. *J Immunol* **144**, 1411-1417.
- Dennis, E.A. (1997) The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem Sci* **22**, 1-2.
- Derman, M.P., Toker, A., Hartwig, J.H., Spokes, K., Falck, J.R., Chen, C.S., Cantley, L.C., Cantley, L.G. (1997) The lipid products of phosphoinositide 3-kinase increase cell motility through protein kinase C. *J Biol Chem* **272**, 6465-6470.
- DeWitt, D.A., Perry, G., Cohen, M., Doller, C., Silver, J. (1998) Astrocytes regulate microglial phagocytosis of senile plaque cores of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* **149**, 329-340.

- DeWitt, D.A., Silver, J., Canning, D.R., Perry, G. (1993) Chondroitin sulfate proteoglycans are associated with the lesions of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* **121**, 149-152.
- Dewitt, S., Laffafian, I., Hallett, M.B. (2003) Phagosomal oxidative activity during beta2 integrin (CR3)-mediated phagocytosis by neutrophils is triggered by a non-restricted Ca²⁺ signal: Ca²⁺ controls time not space. *J Cell Sci* **116**, 2857-2865.
- Dolmer, K., Huang, W., Gettins, P.G. (1998) Characterization of the calcium site in two complement-like domains from the low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) and comparison with a repeat from the low-density lipoprotein receptor. *Biochemistry* **37**, 17016-17023.
- Doyle, A.G., Herbein, G., Montaner, L.J., Minty, A.J., Caput, D., Ferrara, P., Gordon, S. (1994) Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: comparison with interleukin-4 and interferon-gamma. *Eur J Immunol* **24**, 1441-1445.
- Du, Y., Bales, K.R., Dodel, R.C., Liu, X., Glinn, M.A., Horn, J.W., Little, S.P., Paul, S.M. (1998) Alpha2-macroglobulin attenuates beta-amyloid peptide 1-40 fibril formation and associated neurotoxicity of cultured fetal rat cortical neurons. *J Neurochem* **70**, 1182-1188.
- Du Yan, S., Zhu, H., Fu, J., Yan, S.F., Roher, A., Tourtellotte, W.W., Rajavashisth, T., Chen, X., Godman, G.C., Stern, D., Schmidt, A.M. (1997) Amyloid-beta peptide-receptor for advanced glycation endproduct interaction elicits neuronal expression of macrophage-colony stimulating factor: a proinflammatory pathway in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5296-5301.
- Duyckaerts, C., Hauw, J.J. (1997) Diagnosis and staging of Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* **18**, S33-42.
- Edwards, D.C., Sanders, L.C., Bokoch, G.M., Gill, G.N. (1999) Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol* **1**, 253-259.
- Eglitis, M.A., Mezey, E. (1997) Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4080-4085.
- Eikelenboom, P., Stam, F.C. (1982) Immunoglobulins and complement factors in senile plaques. An immunoperoxidase study. *Acta Neuropathol (Berl)* **57**, 239-242.
- El Hachimi, K.H., Foncin, J.F. (1994) Do microglial cells phagocyte the beta/A4-amyloid senile plaque core of Alzheimer disease? *C R Acad Sci III* **317**, 445-451.
- El Khoury, J., Hickman, S.E., Thomas, C.A., Cao, L., Silverstein, S.C., Loike, J.D. (1996) Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. *Nature* **382**, 716-719.
- Elkabes, S., DiCicco-Bloom, E.M., Black, I.B. (1996) Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J Neurosci* **16**, 2508-2521.

- Esler, W.P., Kimberly, W.T., Ostaszewski, B.L., Diehl, T.S., Moore, C.L., Tsai, J.Y., Rahmati, T., Xia, W., Selkoe, D.J., Wolfe, M.S. (2000) Transition-state analogue inhibitors of gamma-secretase bind directly to presenilin-1. *Nat Cell Biol* **2**, 428-434.
- Evangelista, M., Klebl, B.M., Tong, A.H., Webb, B.A., Leeuw, T., Leberer, E., Whiteway, M., Thomas, D.Y., Boone, C. (2000) A role for myosin-I in actin assembly through interactions with Vrp1p, Bee1p, and the Arp2/3 complex. *J Cell Biol* **148**, 353-362.
- Evin, G., Weidemann, A. (2002) Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptides. *Peptides* **23**, 1285-1297.
- Exton, J.H. (1997) Phospholipase D: enzymology, mechanisms of regulation, and function. *Physiol Rev* **77**, 303-320.
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Konowal, A., Freed, P.W., Westcott, J.Y., Henson, P.M. (1998) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* **101**, 890-898.
- Fallman, M., Gullberg, M., Hellberg, C., Andersson, T. (1992) Complement receptor-mediated phagocytosis is associated with accumulation of phosphatidylcholine-derived diglyceride in human neutrophils. Involvement of phospholipase D and direct evidence for a positive feedback signal of protein kinase. *J Biol Chem* **267**, 2656-2663.
- Farmery, M.R., Tjernberg, L.O., Pursglove, S.E., Bergman, A., Winblad, B., Naslund, J. (2003) Partial purification and characterization of gamma-secretase from post-mortem human brain. *J Biol Chem* **278**, 24277-24284.
- Ferreiro, E., Oliveira, C.R., Pereira, C. (2004) Involvement of endoplasmic reticulum Ca²⁺ release through ryanodine and inositol 1,4,5-triphosphate receptors in the neurotoxic effects induced by the amyloid-beta peptide. *J Neurosci Res* **76**, 872-880.
- Ferrer, I., Bernet, E., Soriano, E., del Rio, T., Fonseca, M. (1990) Naturally occurring cell death in the cerebral cortex of the rat and removal of dead cells by transitory phagocytes. *Neuroscience* **39**, 451-458.
- Fiala, M., Zhang, L., Gan, X., Sherry, B., Taub, D., Graves, M.C., Hama, S., Way, D., Weinand, M., Witte, M., Lorton, D., Kuo, Y.M., Roher, A.E. (1998) Amyloid-beta induces chemokine secretion and monocyte migration across a human blood-brain barrier model. *Mol Med* **4**, 480-489.
- Fitzer-Attas, C.J., Lowry, M., Crowley, M.T., Finn, A.J., Meng, F., DeFranco, A.L., Lowell, C.A. (2000) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis in macrophages lacking the Src family tyrosine kinases Hck, Fgr, and Lyn. *J Exp Med* **191**, 669-682.
- Fitzjohn, S.M., Morton, R.A., Kuenzi, F., Rosahl, T.W., Shearman, M., Lewis, H., Smith, D., Reynolds, D.S., Davies, C.H., Collingridge, G.L., Seabrook, G.R. (2001) Age-related impairment of synaptic transmission but normal long-term potentiation in transgenic mice that overexpress the human APP695SWE mutant form of amyloid precursor protein. *J Neurosci* **21**, 4691-4698.

- Flugel, A., Schwaiger, F.W., Neumann, H., Medana, I., Willem, M., Wekerle, H., Kreutzberg, G.W., Graeber, M.B. (2000) Neuronal FasL induces cell death of encephalitogenic T lymphocytes. *Brain Pathol* **10**, 353-364.
- Frackowiak, J., Wisniewski, H.M., Wegiel, J., Merz, G.S., Iqbal, K., Wang, K.C. (1992) Ultrastructure of the microglia that phagocytose amyloid and the microglia that produce beta-amyloid fibrils. *Acta Neuropathol (Berl)* **84**, 225-233.
- Frautschy, S.A., Cole, G.M., Baird, A. (1992) Phagocytosis and deposition of vascular beta-amyloid in rat brains injected with Alzheimer beta-amyloid. *Am J Pathol* **140**, 1389-1399.
- Fujimoto, E., Miki, A., Mizoguti, H. (1987) Histochemical studies of the differentiation of microglial cells in the cerebral hemispheres of chick embryos and chicks. *Histochemistry* **87**, 209-216.
- Fujita, H., Tanaka, J., Toku, K., Tateishi, N., Suzuki, Y., Matsuda, S., Sakanaka, M., Maeda, N. (1996) Effects of GM-CSF and ordinary supplements on the ramification of microglia in culture: a morphometrical study. *Glia* **18**, 269-281.
- Fujita, S., Tsuchihashi, Y., Kitamura, T. (1981) Origin, morphology and function of the microglia. *Prog Clin Biol Res* **59A**, 141-169.
- Fukumoto, H., Asami-Odaka, A., Suzuki, N., Iwatsubo, T. (1996) Association of A beta 40-positive senile plaques with microglial cells in the brains of patients with Alzheimer's disease and in non-demented aged individuals. *Neurodegeneration* **5**, 13-17.
- Ganter, S., Northoff, H., Mannel, D., Gebicke-Harter, P.J. (1992) Growth control of cultured microglia. *J Neurosci Res* **33**, 218-230.
- Gasque, P., Dean, Y.D., McGreal, E.P., VanBeek, J., Morgan, B.P. (2000) Complement components of the innate immune system in health and disease in the CNS. *Immunopharmacology* **49**, 171-186.
- Ghazizadeh, S., Bolen, J.B., Fleit, H.B. (1994) Physical and functional association of Src-related protein tyrosine kinases with Fc gamma RII in monocytic THP-1 cells. *J Biol Chem* **269**, 8878-8884.
- Giaimis, J., Lombard, Y., Fonteneau, P., Muller, C.D., Levy, R., Makaya-Kumba, M., Lazdins, J., Poindron, P. (1993) Both mannose and beta-glucan receptors are involved in phagocytosis of unopsonized, heat-killed *Saccharomyces cerevisiae* by murine macrophages. *J Leukoc Biol* **54**, 564-571.
- Giulian, D., Woodward, J., Young, D.G., Krebs, J.F., Lachman, L.B. (1988) Interleukin-1 injected into mammalian brain stimulates astrogliosis and neovascularization. *J Neurosci* **8**, 2485-2490.
- Glabinski, A.R., Ransohoff, R.M. (1999) Chemokines and chemokine receptors in CNS pathology. *J Neurovirol* **5**, 3-12.

- Gollin, P.A., Kalaria, R.N., Eikelenboom, P., Rozemuller, A., Perry, G. (1992) Alpha 1-antitrypsin and alpha 1-antichymotrypsin are in the lesions of Alzheimer's disease. *Neuroreport* **3**, 201-203.
- Goretzki, L., Mueller, B.M. (1997) Receptor-mediated endocytosis of urokinase-type plasminogen activator is regulated by cAMP-dependent protein kinase. *J Cell Sci* **110 (Pt 12)**, 1395-1402
- Goretzki, L., Mueller, B.M. (1998) Low-density-lipoprotein-receptor-related protein (LRP) interacts with a GTP-binding protein. *Biochem J* **336 (Pt 2)**, 381-386.
- Greenberg, S., Chang, P., Wang, D.C., Xavier, R., Seed, B. (1996) Clustered syk tyrosine kinase domains trigger phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1103-1107.
- Griffin, W.S., Sheng, J.G., Royston, M.C., Gentleman, S.M., McKenzie, J.E., Graham, D.I., Roberts, G.W., Mrazek, R.E. (1998) Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression. *Brain Pathol* **8**, 65-72.
- Hammad, S.M., Ranganathan, S., Loukinova, E., Twal, W.O., Argraves, W.S. (1997) Interaction of apolipoprotein J-amyloid beta-peptide complex with low density lipoprotein receptor-related protein-2/megalin. A mechanism to prevent pathological accumulation of amyloid beta-peptide. *J Biol Chem* **272**, 18644-18649.
- Hao, C., Richardson, A., Fedoroff, S. (1991) Macrophage-like cells originate from neuroepithelium in culture: characterization and properties of the macrophage-like cells. *Int J Dev Neurosci* **9**, 1-14.
- Hardy, J.A., Higgins, G.A. (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **256**, 184-185.
- Hardy, M.M., Feder, J., Wolfe, R.A., Bu, G. (1997) Low density lipoprotein receptor-related protein modulates the expression of tissue-type plasminogen activator in human colon fibroblasts. *J Biol Chem* **272**, 6812-6817.
- Harper, J.D., Lieber, C.M., Lansbury, P.T., Jr. (1997) Atomic force microscopic imaging of seeded fibril formation and fibril branching by the Alzheimer's disease amyloid-beta protein. *Chem Biol* **4**, 951-9.
- Harris, N., Super, M., Rits, M., Chang, G., Ezekowitz, R.A. (1992) Characterization of the murine macrophage mannose receptor: demonstration that the downregulation of receptor expression mediated by interferon-gamma occurs at the level of transcription. *Blood* **80**, 2363-2373.
- Hartwig, J.H., Thelen, M., Rosen, A., Janmey, P.A., Nairn, A.C., Aderem, A. (1992) MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature* **356**, 618-622.
- Heese, K., Hock, C., Otten, U. (1998) Inflammatory signals induce neurotrophin expression in human microglial cells. *J Neurochem* **70**, 699-707.

- Herz, J., Hamann, U., Rogne, S., Myklebost, O., Gausepohl, H., Stanley, K.K. (1988) Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *Embo J* **7**, 4119-4127.
- Herz, J., Kowal, R.C., Ho, Y.K., Brown, M.S., Goldstein, J.L. (1990) Low density lipoprotein receptor-related protein mediates endocytosis of monoclonal antibodies in cultured cells and rabbit liver. *J Biol Chem* **265**, 21355-21362.
- Hetier, E., Ayala, J., Deneffe, P., Bousseau, A., Rouget, P., Mallat, M., Prochiantz, A. (1988) Brain macrophages synthesize interleukin-1 and interleukin-1 mRNAs in vitro. *J Neurosci Res* **21**, 391-397.
- Heyser, C.J., Masliah, E., Samimi, A., Campbell, I.L., Gold, L.H. (1997) Progressive decline in avoidance learning paralleled by inflammatory neurodegeneration in transgenic mice expressing interleukin 6 in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1500-1505.
- Hickey, W.F., Kimura, H. (1988) Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* **239**, 290-292.
- Hide, I., Tanaka, M., Inoue, A., Nakajima, K., Kohsaka, S., Inoue, K., Nakata, Y. (2000) Extracellular ATP triggers tumor necrosis factor-alpha release from rat microglia. *J Neurochem* **75**, 965-972.
- Hilbich, C., Kisters-Woike, B., Reed, J., Masters, C.L., Beyreuther, K. (1991) Aggregation and secondary structure of synthetic amyloid beta A4 peptides of Alzheimer's disease. *J Mol Biol* **218**, 149-163.
- Hiltunen, T.P., Luoma, J.S., Nikkari, T., Yla-Herttuala, S. (1998) Expression of LDL receptor, VLDL receptor, LDL receptor-related protein, and scavenger receptor in rabbit atherosclerotic lesions: marked induction of scavenger receptor and VLDL receptor expression during lesion development. *Circulation* **97**, 1079-1086.
- Hoek, R.M., Ruuls, S.R., Murphy, C.A., Wright, G.J., Goddard, R., Zurawski, S.M., Blom, B., Homola, M.E., Streit, W.J., Brown, M.H., Barclay, A.N., Sedgwick, J.D. (2000) Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science* **290**, 1768-1771.
- Howlett, D.R., Jennings, K.H., Lee, D.C., Clark, M.S., Brown, F., Wetzel, R., Wood, S.J., Camilleri, P., Roberts, G.W. (1995) Aggregation state and neurotoxic properties of Alzheimer beta-amyloid peptide. *Neurodegeneration* **4**, 23-32.
- Howlett, D.R., Simmons, D.L., Dingwall, C., Christie, G. (2000) In search of an enzyme: the beta-secretase of Alzheimer's disease is an aspartic proteinase. *Trends Neurosci* **23**, 565-570.
- Hull, M.H., Fiebich, B.L., Lieb, K. (2000) Strategies to delay the onset of Alzheimer's disease. *Exs* **89**, 211-225.

- Hume, D.A., Perry, V.H., Gordon, S. (1983) Immunohistochemical localization of a macrophage-specific antigen in developing mouse retina: phagocytosis of dying neurons and differentiation of microglial cells to form a regular array in the plexiform layers. *J Cell Biol* **97**, 253-257.
- Hung, A.Y., Haass, C., Nitsch, R.M., Qiu, W.Q., Citron, M., Wurtman, R.J., Growdon, J.H., Selkoe, D.J. (1993) Activation of protein kinase C inhibits cellular production of the amyloid beta-protein. *J Biol Chem* **268**, 22959-22962.
- Hurley, S.D., Streit, W.J. (1995) Griffonia simplicifolia II lectin labels a population of radial glial cells in the embryonic rat brain. *Dev Neurosci* **17**, 324-334.
- Huse, J.T., Liu, K., Pijak, D.S., Carlin, D., Lee, V.M., Doms, R.W. (2002) Beta-secretase processing in the trans-Golgi network preferentially generates truncated amyloid species that accumulate in Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem* **277**, 16278-16284.
- Hussain, I., Powell, D., Howlett, D.R., Tew, D.G., Meek, T.D., Chapman, C., Gloger, I.S., Murphy, K.E., Southan, C.D., Ryan, D.M., Smith, T.S., Simmons, D.L., Walsh, F.S., Dingwall, C., Christie, G. (1999) Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci* **14**, 419-427.
- Hutchins, K.D., Dickson, D.W., Rashbaum, W.K., Lyman, W.D. (1990) Localization of morphologically distinct microglial populations in the developing human fetal brain: implications for ontogeny. *Brain Res Dev Brain Res* **55**, 95-102.
- Imamoto, K., Fujiwara, R., Nagai, T., Maeda, T. (1982) Distribution and fate of macrophagic ameboid cells in the rat brain. *Arch Histol Jpn* **45**, 505-518.
- Innocenti, G.M., Clarke, S. (1983) Multiple sets of visual cortical neurons projecting transitorily through the corpus callosum. *Neurosci Lett* **41**, 27-32.
- Inoue, S., Kuroiwa, M., Kisilevsky, R. (1999) Basement membranes, microfibrils and beta amyloid fibrillogenesis in Alzheimer's disease: high resolution ultrastructural findings. *Brain Res Brain Res Rev* **29**, 218-231.
- Inoue, S., Kuroiwa, M., Saraiva, M.J., Guimaraes, A., Kisilevsky, R. (1998) Ultrastructure of familial amyloid polyneuropathy amyloid fibrils: examination with high-resolution electron microscopy. *J Struct Biol* **124**, 1-12.
- Iwamoto, N., Nishiyama, E., Ohwada, J., Arai, H. (1994) Demonstration of CRP immunoreactivity in brains of Alzheimer's disease: immunohistochemical study using formic acid pretreatment of tissue sections. *Neurosci Lett* **177**, 23-26.
- Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Watanabe, K., Sekiguchi, M., Hosoki, E., Kawashima-Morishima, M., Lee, H.J., Hama, E., Sekine-Aizawa, Y., Saido, T.C. (2000) Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med* **6**, 143-150.

- Jaconi, M.E., Lew, D.P., Carpentier, J.L., Magnusson, K.E., Sjogren, M., Stendahl, O. (1990) Cytosolic free calcium elevation mediates the phagosome-lysosome fusion during phagocytosis in human neutrophils. *J Cell Biol* **110**, 1555-1564.
- Jaconi, M.E., Theler, J.M., Schlegel, W., Appel, R.D., Wright, S.D., Lew, P.D. (1991) Multiple elevations of cytosolic-free Ca²⁺ in human neutrophils: initiation by adherence receptors of the integrin family. *J Cell Biol* **112**, 1249-1657.
- Jarrett, J.T., Berger, E.P., Lansbury, P.T., Jr. (1993) The C-terminus of the beta protein is critical in amyloidogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **695**, 144-148.
- Jefferis, R., Lund, J., Pound, J.D. (1998) IgG-Fc-mediated effector functions: molecular definition of interaction sites for effector ligands and the role of glycosylation. *Immunol Rev* **163**, 59-76.
- Jensen, P.H., Christensen, E.I., Ebbesen, P., Gliemann, J., Andreasen, P.A. (1990) Lysosomal degradation of receptor-bound urokinase-type plasminogen activator is enhanced by its inhibitors in human trophoblastic choriocarcinoma cells. *Cell Regul* **1**, 1043-1056.
- Ji, Z.S., Mahley, R.W. (1994) Lactoferrin binding to heparan sulfate proteoglycans and the LDL receptor-related protein. Further evidence supporting the importance of direct binding of remnant lipoproteins to HSPG. *Arterioscler Thromb* **14**, 2025-2031.
- Jiang, Y., Salafranca, M.N., Adhikari, S., Xia, Y., Feng, L., Sonntag, M.K., deFiebre, C.M., Pennell, N.A., Streit, W.J., Harrison, J.K. (1998) Chemokine receptor expression in cultured glia and rat experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* **86**, 1-12.
- Johnstone, M., Gearing, A.J., Miller, K.M. (1999) A central role for astrocytes in the inflammatory response to beta-amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced. *J Neuroimmunol* **93**, 182-193.
- Jonakait, G.M., Luskin, M.B., Wei, R., Tian, X.F., Ni, L. (1996) Conditioned medium from activated microglia promotes cholinergic differentiation in the basal forebrain in vitro. *Dev Biol* **177**, 85-95.
- Kancha, R.K., Hussain, M.M. (1996) Up-regulation of the low density lipoprotein receptor-related protein by dexamethasone in HepG2 cells. *Biochim Biophys Acta* **1301**, 213-220.
- Kang, D.E., Pietrzik, C.U., Baum, L., Chevallier, N., Merriam, D.E., Kounnas, M.Z., Wagner, S.L., Troncoso, J.C., Kawas, C.H., Katzman, R., Koo, E.H. (2000) Modulation of amyloid beta-protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor-related protein pathway. *J Clin Invest* **106**, 1159-66.
- Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K., Muller-Hill, B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* **325**, 733-736.
- Kannan, Y., Matsuda, H., Ushio, H., Kawamoto, K., Shimada, Y. (1993) Murine granulocyte-macrophage and mast cell colony formation promoted by nerve growth factor. *Int Arch Allergy Immunol* **102**, 362-367.

- Kaur, C., Ling, E.A., Wong, W.C. (1985) Transformation of amoeboid microglial cells into microglia in the corpus callosum of the postnatal rat brain. An electron microscopical study. *Arch Histol Jpn* **48**, 17-25.
- Kaur, C., Ling, E.A., Wong, W.C. (1987) Localisation of thiamine pyrophosphatase in the amoeboid microglial cells in the brain of postnatal rats. *J Anat* **152**, 13-22.
- Kaur, C., Wu, C.H., Wen, C.Y., Ling, E.A. (1994) The effects of subcutaneous injections of glucocorticoids on amoeboid microglia in postnatal rats. *Arch Histol Cytol* **57**, 449-459.
- Keller, H.U., Naef, A., Zimmermann, A. (1984) Effects of colchicine, vinblastine and nocodazole on polarity, motility, chemotaxis and cAMP levels of human polymorphonuclear leukocytes. *Exp Cell Res* **153**, 173-185.
- Kimberly, W.T., LaVoie, M.J., Ostaszewski, B.L., Ye, W., Wolfe, M.S., Selkoe, D.J. (2003) Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6382-6387.
- Kimberly, W.T., Xia, W., Rahmati, T., Wolfe, M.S., Selkoe, D.J. (2000) The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for gamma-secretase activity and amyloid beta-protein generation. *J Biol Chem* **275**, 3173-3178.
- Kimura, T., Takamatsu, J., Araki, N., Goto, M., Kondo, A., Miyakawa, T., Horiuchi, S. (1995) Are advanced glycation end-products associated with amyloidosis in Alzheimer's disease? *Neuroreport* **6**, 866-868.
- Kinoshita, A., Shah, T., Tangredi, M.M., Strickland, D.K., Hyman, B.T. (2003) The intracellular domain of the low density lipoprotein receptor-related protein modulates transactivation mediated by amyloid precursor protein and Fe65. *J Biol Chem* **278**, 41182-41188.
- Kitamura, T., Miyake, T., Fujita, S. (1984) Genesis of resting microglia in the gray matter of mouse hippocampus. *J Comp Neurol* **226**, 421-433.
- Klegeris, A., McGeer, P.L. (1994) Rat brain microglia and peritoneal macrophages show similar responses to respiratory burst stimulants. *J Neuroimmunol* **53**, 83-90.
- Kloss, C.U., Kreutzberg, G.W., Raivich, G. (1997) Proliferation of ramified microglia on an astrocyte monolayer: characterization of stimulatory and inhibitory cytokines. *J Neurosci Res* **49**, 248-254.
- Knauer, M.F., Orlando, R.A., Glabe, C.G. (1996) Cell surface APP751 forms complexes with protease nexin 2 ligands and is internalized via the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *Brain Res* **740**, 6-14.
- Ko, L.W., Ko, E.C., Nacharaju, P., Liu, W.K., Chang, E., Kenessey, A., Yen, S.H. (1999) An immunochemical study on tau glycation in paired helical filaments. *Brain Res* **830**, 301-313.

- Kobayashi, K., Takahashi, K., Nagasawa, S. (1995) The role of tyrosine phosphorylation and Ca²⁺ accumulation in Fc gamma-receptor-mediated phagocytosis of human neutrophils. *J Biochem (Tokyo)* **117**, 1156-1161.
- Koike, H., Tomioka, S., Sorimachi, H., Saido, T.C., Maruyama, K., Okuyama, A., Fujisawa-Sehara, A., Ohno, S., Suzuki, K., Ishiura, S. (1999) Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem J* **343 Pt 2**, 371-375.
- Koistinaho, M., Kettunen, M.I., Goldsteins, G., Keinanen, R., Salminen, A., Ort, M., Bures, J., Liu, D., Kauppinen, R.A., Higgins, L.S., Koistinaho, J. (2002) Beta-amyloid precursor protein transgenic mice that harbor diffuse A beta deposits but do not form plaques show increased ischemic vulnerability: role of inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1610-1615.
- Koppal, T., Petrova, T.V., Van Eldik, L.J. (2000) Cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) acts as a general inhibitor of inflammatory responses in activated BV-2 microglial cells. *Brain Res* **867**, 115-121.
- Koppel, H., Innocenti, G.M. (1983) Is there a genuine exuberancy of callosal projections in development? A quantitative electron microscopic study in the cat. *Neurosci Lett* **41**, 33-40.
- Kounnas, M.Z., Moir, R.D., Rebeck, G.W., Bush, A.I., Argraves, W.S., Tanzi, R.E., Hyman, B.T., Strickland, D.K. (1995) LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation. *Cell* **82**, 331-340.
- Kounnas, M.Z., Morris, R.E., Thompson, M.R., FitzGerald, D.J., Strickland, D.K., Saelinger, C.B. (1992) The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds and internalizes Pseudomonas exotoxin A. *J Biol Chem* **267**, 12420-12423.
- Kowal, R.C., Herz, J., Goldstein, J.L., Esser, V., Brown, M.S. (1989) Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5810-5814.
- Kowalska, A. (2003) Amyloid precursor protein gene mutations responsible for early-onset autosomal dominant Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol* **41**, 35-40.
- Krall, W.J., Challita, P.M., Perlmutter, L.S., Skelton, D.C., Kohn, D.B. (1994) Cells expressing human glucocerebrosidase from a retroviral vector repopulate macrophages and central nervous system microglia after murine bone marrow transplantation. *Blood* **83**, 2737-2748.
- Krieger, M., Herz, J. (1994) Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem* **63**, 601-637.
- Kuentzel, S.L., Ali, S.M., Altman, R.A., Greenberg, B.D., Raub, T.J. (1993) The Alzheimer beta-amyloid protein precursor/protease nexin-II is cleaved by secretase in a trans-Golgi secretory compartment in human neuroglioma cells. *Biochem J* **295 (Pt 2)**, 367-378.

- Kumar-Singh, S., Dewachter, I., Moechars, D., Lubke, U., De Jonghe, C., Ceuterick, C., Checler, F., Naidu, A., Cordell, B., Cras, P., Van Broeckhoven, C., Van Leuven, F. (2000) Behavioral disturbances without amyloid deposits in mice overexpressing human amyloid precursor protein with Flemish (A692G) or Dutch (E693Q) mutation. *Neurobiol Dis* **7**, 9-22.
- Kusner, D.J., Hall, C.F., Schlesinger, L.S. (1996) Activation of phospholipase D is tightly coupled to the phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis or opsonized zymosan by human macrophages. *J Exp Med* **184**, 585-595.
- LaMarre, J., Wolf, B.B., Kittler, E.L., Quesenberry, P.J., Gonias, S.L. (1993) Regulation of macrophage alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein by lipopolysaccharide and interferon-gamma. *J Clin Invest* **91**, 1219-1224.
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., Fahrenholz, F. (1999) Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3922-3927.
- Laporte, V., Levy-Benezra, R., Lombard, Y., Choucair, N., Tranchant, C., Gies, J-P, Poindron, P. (2005) Characterization of long-term cultured cell lines of murine microglia called MAMI. *Biovalley monographs* **1**, 14-28.
- Laporte, V., Lombard, Y., Levy-Benezra, R., Tranchant, C., Poindron, P., Warter, J.M. (2004) Uptake of Abeta 1-40- and Abeta 1-42-coated yeast by microglial cells: a role for LRP. *J Leukoc Biol* **76**, 451-461.
- Larsen, E.C., DiGennaro, J.A., Saito, N., Mehta, S., Loegering, D.J., Mazurkiewicz, J.E., Lennartz, M.R. (2000) Differential requirement for classic and novel PKC isoforms in respiratory burst and phagocytosis in RAW 264.7 cells. *J Immunol* **165**, 2809-2817.
- Lawson, L.J., Perry, V.H., Dri, P., Gordon, S. (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* **39**, 151-170.
- Lawson, L.J., Perry, V.H., Gordon, S. (1992) Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* **48**, 405-415.
- Lazar, G., Pal, E. (1996) Removal of cobalt-labeled neurons and nerve fibers by microglia from the frog's brain and spinal cord. *Glia* **16**, 101-107.
- Le, Y., Hu, J., Gong, W., Shen, W., Li, B., Dunlop, N.M., Halverson, D.O., Blair, D.G., Wang, J.M. (2000) Expression of functional formyl peptide receptors by human astrocytoma cell lines. *J Neuroimmunol* **111**, 102-108.
- Le, Y., Iribarren, P., Zhou, Y., Gong, W., Hu, J., Zhang, X., Wang, J.M. (2004) Silencing the formylpeptide receptor FPR by short-interfering RNA. *Mol Pharmacol* **66**, 1022-1028.
- Lee, E.B., Zhang, B., Liu, K., Greenbaum, E.A., Doms, R.W., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M. (2005) BACE overexpression alters the subcellular processing of APP and inhibits Abeta deposition in vivo. *J Cell Biol* **168**, 291-302.

- Lee, J., Hur, J., Lee, P., Kim, J.Y., Cho, N., Kim, S.Y., Kim, H., Lee, M.S., Suk, K. (2001) Dual role of inflammatory stimuli in activation-induced cell death of mouse microglial cells. Initiation of two separate apoptotic pathways via induction of interferon regulatory factor-1 and caspase-11. *J Biol Chem* **276**, 32956-32965.
- Lee, S.C., Liu, W., Brosnan, C.F., Dickson, D.W. (1994) GM-CSF promotes proliferation of human fetal and adult microglia in primary cultures. *Glia* **12**, 309-318.
- Lee, S.C., Liu, W., Roth, P., Dickson, D.W., Berman, J.W., Brosnan, C.F. (1993) Macrophage colony-stimulating factor in human fetal astrocytes and microglia. Differential regulation by cytokines and lipopolysaccharide, and modulation of class II MHC on microglia. *J Immunol* **150**, 594-604.
- Lennartz, M.R. (1999) Phospholipases and phagocytosis: the role of phospholipid-derived second messengers in phagocytosis. *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 415-430.
- Lennartz, M.R., Brown, E.J. (1991) Arachidonic acid is essential for IgG Fc receptor-mediated phagocytosis by human monocytes. *J Immunol* **147**, 621-626.
- Lennartz, M.R., Yuen, A.F., Masi, S.M., Russell, D.G., Buttle, K.F., Smith, J.J. (1997) Phospholipase A2 inhibition results in sequestration of plasma membrane into electronlucent vesicles during IgG-mediated phagocytosis. *J Cell Sci* **110 (Pt 17)**, 2041-2052.
- Leppanen, P., Luoma, J.S., Hofker, M.H., Havekes, L.M., Yla-Herttuala, S. (1998) Characterization of atherosclerotic lesions in apo E3-leiden transgenic mice. *Atherosclerosis* **136**, 147-152.
- Levitan, D., Lee, J., Song, L., Manning, R., Wong, G., Parker, E., Zhang, L. (2001) PS1 N- and C-terminal fragments form a complex that functions in APP processing and Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12186-12190.
- Lewandowska, E., Bertrand, E., Kulczycki, J., Lipczynska-Lojkowska, W., Lechowicz, W., Stankiewicz, J. (1999) Microglia and neuritic plaques in familial Alzheimer's disease induced by a new mutation of presenilin-1 gene. An ultrastructural study. *Folia Neuropathol* **37**, 243-246.
- Li, J.P., Galvis, M.L., Gong, F., Zhang, X., Zcharia, E., Metzger, S., Vlodaysky, I., Kisilevsky, R., Lindahl, U. (2005) In vivo fragmentation of heparan sulfate by heparanase overexpression renders mice resistant to amyloid protein A amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 6473-6477.
- Li, R., Shen, Y., Yang, L.B., Lue, L.F., Finch, C., Rogers, J. (2000) Estrogen enhances uptake of amyloid beta-protein by microglia derived from the human cortex. *J Neurochem* **75**, 1447-1454.
- Li, Y., Lu, W., Marzolo, M.P., Bu, G. (2001) Differential functions of members of the low density lipoprotein receptor family suggested by their distinct endocytosis rates. *J Biol Chem* **276**, 18000-18006.

- Li, Y.M., Lai, M.T., Xu, M., Huang, Q., DiMuzio-Mower, J., Sardana, M.K., Shi, X.P., Yin, K.C., Shafer, J.A., Gardell, S.J. (2000) Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6138-6143.
- Linder, S., Heimerl, C., Fingerle, V., Aepfelbacher, M., Wilske, B. (2001) Coiling phagocytosis of *Borrelia burgdorferi* by primary human macrophages is controlled by CDC42Hs and Rac1 and involves recruitment of Wiskott-Aldrich syndrome protein and Arp2/3 complex. *Infect Immun* **69**, 1739-1746.
- Linehan, S.A., Martinez-Pomares, L., Stahl, P.D., Gordon, S. (1999) Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: In situ expression of mannose receptor by selected macrophages, endothelial cells, perivascular microglia, and mesangial cells, but not dendritic cells. *J Exp Med* **189**, 1961-1972.
- Ling, EA, Penney D, L.C. (1980) Use of carbon labeling to demonstrate the role of blood monocytes as precursors of the amoeboid cells present in the corpus callosum of postnatal rats. *J Comp Neurol* **193**, 631-657.
- Ling, E.A. (1977) Light and electron microscopic demonstration of some lysosomal enzymes in the amoeboid microglia in neonatal rat brain. *J Anat* **123**, 637-648.
- Ling, E.A. (1979) Ultrastructure and origin of epiplexus cells in the telencephalic choroid plexus of postnatal rats studied by intravenous injection of carbon particles. *J Anat* **129**, 479-492.
- Ling, E.A. (1981) Ultrastructure and mode of formation of epiplexus cells in the choroid plexus in the lateral ventricles of the monkey (*Macaca fascicularis*). *J Anat* **133**, 555-569.
- Ling, E.A. (1981) Ultrastructure and peroxidase cytochemistry of macrophages present in the retina of postnatal rats. *Arch Histol Jpn* **44**, 167-176.
- Ling, E.A. (1982) Influence of cortisone on amoeboid microglia and microglial cells in the corpus callosum in postnatal rats. *J Anat* **134 (Pt 4)**, 705-717.
- Ling, E.A., Kaur, C., Wong, W.C. (1982) Light and electron microscopic demonstration of non-specific esterase in amoeboid microglial cells in the corpus callosum in postnatal rats: a cytochemical link to monocytes. *J Anat* **135 (Pt 2)**, 385-394.
- Ling, E.A., Kaur, L.C., Yick, T.Y., Wong, W.C. (1990) Immunocytochemical localization of CR3 complement receptors with OX-42 in amoeboid microglia in postnatal rats. *Anat Embryol (Berl)* **182**, 481-486.
- Ling, Y., Morgan, K., Kalsheker, N. (2003) Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* **35**, 1505-1535.
- Liva, S.M., Kahn, M.A., Dopp, J.M., de Vellis, J. (1999) Signal transduction pathways induced by GM-CSF in microglia: significance in the control of proliferation. *Glia* **26**, 344-352.

- Lomakin, A., Chung, D.S., Benedek, G.B., Kirschner, D.A., Teplow, D.B. (1996) On the nucleation and growth of amyloid beta-protein fibrils: detection of nuclei and quantitation of rate constants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1125-1129.
- Lopez-Perez, E., Seidah, N.G., Checler, F. (1999) Proprotein convertase activity contributes to the processing of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein in human cells: evidence for a role of the prohormone convertase PC7 in the constitutive alpha-secretase pathway. *J Neurochem* **73**, 2056-2062.
- Lorenzo, A., Yankner, B.A. (1996) Amyloid fibril toxicity in Alzheimer's disease and diabetes. *Ann N Y Acad Sci* **777**, 89-95.
- Lowe, J., MacLennan, K.A., Powe, D.G., Pound, J.D., Palmer, J.B. (1989) microglial cells in human brain have phenotypic characteristics related to possible function as dendritic antigen presenting cells. *J Pathol* **159**, 143-149.
- Lue, L.F., Rydel, R., Brigham, E.F., Yang, L.B., Hampel, H., Murphy, G.M., Jr., Brachova, L., Yan, S.D., Walker, D.G., Shen, Y., Rogers, J. (2001) Inflammatory repertoire of Alzheimer's disease and nondemented elderly microglia in vitro. *Glia* **35**, 72-79.
- Lue, L.F., Walker, D.G., Brachova, L., Beach, T.G., Rogers, J., Schmidt, A.M., Stern, D.M., Yan, S.D. (2001) Involvement of microglial receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in Alzheimer's disease: identification of a cellular activation mechanism. *Exp Neurol* **171**, 29-45.
- Luo, Y., Bolon, B., Kahn, S., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Denis, P., Fan, W., Kha, H., Zhang, J., Gong, Y., Martin, L., Louis, J.C., Yan, Q., Richards, W.G., Citron, M., Vassar, R. (2001) Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat Neurosci* **4**, 231-232.
- Luoma, J., Hiltunen, T., Sarkioja, T., Moestrup, S.K., Gliemann, J., Kodama, T., Nikkari, T., Yla-Herttuala, S. (1994) Expression of alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and scavenger receptor in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* **93**, 2014-2021.
- Ma, Z., Thomas, K.S., Webb, D.J., Moravec, R., Salicioni, A.M., Mars, W.M., Gonias, S.L. (2002) Regulation of Rac1 activation by the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Cell Biol* **159**, 1061-1070.
- Mackenzie, I.R., Hao, C., Munoz, D.G. (1995) Role of microglia in senile plaque formation. *Neurobiol Aging* **16**, 797-804.
- Mackenzie, I.R., Munoz, D.G. (1998) Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and Alzheimer-type pathology in aging. *Neurology* **50**, 986-990.
- Mahley, R.W., Ji, Z.S. (1999) Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res* **40**, 1-16.
- Mallat, M., Calvo, C.F., Dobbertin, A. (1997) Migration and proliferation of mononuclear phagocytes in the central nervous system. *Adv Exp Med Biol* **429**, 99-108.

- Mander, T.H., Morris, J.F. (1996) Development of microglia and macrophages in the postnatal rat pituitary. *Cell Tissue Res* **286**, 347-355.
- Mann, D.M., Iwatsubo, T., Fukumoto, H., Ihara, Y., Odaka, A., Suzuki, N. (1995) Microglial cells and amyloid beta protein (A beta) deposition; association with A beta 40-containing plaques. *Acta Neuropathol (Berl)* **90**, 472-477.
- Mannoji, H., Yeger, H., Becker, L.E. (1986) A specific histochemical marker (lectin Ricinus communis agglutinin-1) for normal human microglia, and application to routine histopathology. *Acta Neuropathol (Berl)* **71**, 341-343.
- Marin-Teva, J.L., Almendros, A., Calvente, R., Cuadros, M.A., Navascues, J. (1998) Tangential migration of amoeboid microglia in the developing quail retina: mechanism of migration and migratory behavior. *Glia* **22**, 31-52.
- Marodi, L., Korchak, H.M., Johnston, R.B., Jr. (1991) Mechanisms of host defense against *Candida* species. I. Phagocytosis by monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Immunol* **146**, 2783-2789.
- Martinez-Pomares, L., Reid, D.M., Brown, G.D., Taylor, P.R., Stillion, R.J., Linehan, S.A., Zamze, S., Gordon, S., Wong, S.Y. (2003) Analysis of mannose receptor regulation by IL-4, IL-10, and proteolytic processing using novel monoclonal antibodies. *J Leukoc Biol* **73**, 604-613.
- Marzolo, M.P., von Bernhardi, R., Bu, G., Inestrosa, N.C. (2000) Expression of alpha(2)-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) in rat microglial cells. *J Neurosci Res* **60**, 401-411.
- May, R.C., Caron, E., Hall, A., Machesky, L.M. (2000) Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by Fc gamma R or CR3. *Nat Cell Biol* **2**, 246-248.
- Mazzoni, I.E., Kenigsberg, R.L. (1997) Microglia from the developing rat medial septal area can affect cholinergic and GABAergic neuronal differentiation in vitro. *Neuroscience* **76**, 147-157.
- McCluskey, L.P., Lampson, L.A. (2001) Local immune regulation in the central nervous system by substance P vs. glutamate. *J Neuroimmunol* **116**, 136-146.
- McComb, R.D., Miller, K.A., Carson, S.D. (1991) Tissue factor antigen in senile plaques of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **139**, 491-494.
- McGeer, P.L., Akiyama, H., Itagaki, S., McGeer, E.G. (1989) Immune system response in Alzheimer's disease. *Can J Neurol Sci* **16**, 516-527.
- McGough, A. (1998) F-actin-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* **8**, 166-176.
- McKanna, J.A., Zhang, M.Z. (1997) Immunohistochemical localization of lipocortin 1 in rat brain is sensitive to pH, freezing, and dehydration. *J Histochem Cytochem* **45**, 527-538.

- McLarnon, J.G., Wang, X., Bae, J.H., Kim, S.U. (1999) Endothelin-induced changes in intracellular calcium in human microglia. *Neurosci Lett* **263**, 9-12.
- McMenamin, P.G. (1999) Distribution and phenotype of dendritic cells and resident tissue macrophages in the dura mater, leptomeninges, and choroid plexus of the rat brain as demonstrated in wholemount preparations. *J Comp Neurol* **405**, 553-562.
- Meagher, L.C., Savill, J.S., Baker, A., Fuller, R.W., Haslett, C. (1992) Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of thromboxane B₂. *J Leukoc Biol* **52**, 269-73.
- Meda, L., Baron, P., Scarlato, G. (2001) Glial activation in Alzheimer's disease: the role of Abeta and its associated proteins. *Neurobiol Aging* **22**, 885-893.
- Meda, L., Bernasconi, S., Bonaiuto, C., Sozzani, S., Zhou, D., Otvos, L., Jr., Mantovani, A., Rossi, F., Cassatella, M.A. (1996) Beta-amyloid (25-35) peptide and IFN-gamma synergistically induce the production of the chemotactic cytokine MCP-1/JE in monocytes and microglial cells. *J Immunol* **157**, 1213-1218.
- Meda, L., Cassatella, M.A., Szendrei, G.I., Otvos, L., Jr., Baron, P., Villalba, M., Ferrari, D., Rossi, F. (1995) Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature* **374**, 647-650.
- Medvedev, A.E., Flo, T., Ingalls, R.R., Golenbock, D.T., Teti, G., Vogel, S.N., Espevik, T. (1998) Involvement of CD14 and complement receptors CR3 and CR4 in nuclear factor-kappaB activation and TNF production induced by lipopolysaccharide and group B streptococcal cell walls. *J Immunol* **160**, 4535-4542.
- Meilinger, M., Gschwentner, C., Burger, I., Haumer, M., Wahrmann, M., Szollar, L., Nimpf, J., Huettinger, M. (1999) Metabolism of activated complement component C3 is mediated by the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha(2)-macroglobulin receptor. *J Biol Chem* **274**, 38091-38096.
- Merz, P.A., Wisniewski, H.M., Somerville, R.A., Bobin, S.A., Masters, C.L., Iqbal, K. (1983) Ultrastructural morphology of amyloid fibrils from neuritic and amyloid plaques. *Acta Neuropathol (Berl)* **60**, 113-124.
- Michikawa, M., Fan, Q.W., Isobe, I., Yanagisawa, K. (2000) Apolipoprotein E exhibits isoform-specific promotion of lipid efflux from astrocytes and neurons in culture. *J Neurochem* **74**, 1008-1016.
- Milligan, C.E., Cunningham, T.J., Levitt, P. (1991) Differential immunochemical markers reveal the normal distribution of brain macrophages and microglia in the developing rat brain. *J Comp Neurol* **314**, 125-135.
- Minami, M., Satoh, M. (2000) [Chemokines as mediators for intercellular communication in the brain]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* **115**, 193-200.

- Minghetti, L., Nicolini, A., Polazzi, E., Greco, A., Perretti, M., Parente, L., Levi, G. (1999) Down-regulation of microglial cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by lipocortin 1. *Br J Pharmacol* **126**, 1307-1314.
- Miyakawa, T., Katsuragi, S., Watanabe, K., Shimoji, A., Ikeuchi, Y. (1986) Ultrastructural studies of amyloid fibrils and senile plaques in human brain. *Acta Neuropathol (Berl)* **70**, 202-208.
- Moestrup, S.K., Gliemann, J., Pallesen, G. (1992) Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues. *Cell Tissue Res* **269**, 375-382.
- Moller, T., Hanisch, U.K., Ransom, B.R. (2000) Thrombin-induced activation of cultured rodent microglia. *J Neurochem* **75**, 1539-1547.
- Morishima-Kawashima, M., Hasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Titani, K., Ihara, Y. (1993) Ubiquitin is conjugated with amino-terminally processed tau in paired helical filaments. *Neuron* **10**, 1151-1160.
- Moujahid, A., Navascues, J., Marin-Teva, J.L., Cuadros, M.A. (1996) Macrophages during avian optic nerve development: relationship to cell death and differentiation into microglia. *Anat Embryol (Berl)* **193**, 131-144.
- Muller, C.D., Bocchini, V., Giaimis, J., Guerrieri, P., Lombard, Y., Poindron, P. (1994) Functional beta-glucan receptor expression by a microglial cell line. *Res Immunol* **145**, 267-275.
- Muta, T., Kurosaki, T., Misulovin, Z., Sanchez, M., Nussenzweig, M.C., Ravetch, J.V. (1994) A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of Fc gamma RIIB modulates B-cell receptor signalling. *Nature* **369**, 340.
- Myones, B.L., Dalzell, J.G., Hogg, N., Ross, G.D. (1988) Neutrophil and monocyte cell surface p150,95 has iC3b-receptor (CR4) activity resembling CR3. *J Clin Invest* **82**, 640-651.
- Nabi, I.R. (1999) The polarization of the motile cell. *J Cell Sci* **112 (Pt 12)**, 1803-1811.
- Nagata, K., Takei, N., Nakajima, K., Saito, H., Kohsaka, S. (1993) Microglial conditioned medium promotes survival and development of cultured mesencephalic neurons from embryonic rat brain. *J Neurosci Res* **34**, 357-363.
- Naito, M., Umeda, S., Yamamoto, T., Moriyama, H., Umezu, H., Hasegawa, G., Usuda, H., Shultz, L.D., Takahashi, K. (1996) Development, differentiation, and phenotypic heterogeneity of murine tissue macrophages. *J Leukoc Biol* **59**, 133-138.
- Nakajima, K., Kohsaka, S. (1993) Functional roles of microglia in the brain. *Neurosci Res* **17**, 187-203.
- Nakamura, Y., Si, Q.S., Kataoka, K. (1999) Lipopolysaccharide-induced microglial activation in culture: temporal profiles of morphological change and release of cytokines and nitric oxide. *Neurosci Res* **35**, 95-100.

- Namba, Y., Tomonaga, M., Kawasaki, H., Otomo, E., Ikeda, K. (1991) Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res* **541**, 163-166.
- Narindrasorasak, S., Lowery, D., Gonzalez-DeWhitt, P., Poorman, R.A., Greenberg, B., Kisilevsky, R. (1991) High affinity interactions between the Alzheimer's beta-amyloid precursor proteins and the basement membrane form of heparan sulfate proteoglycan. *J Biol Chem* **266**, 12878-12883.
- Narita, M., Bu, G., Olins, G.M., Higuchi, D.A., Herz, J., Broze, G.J., Jr., Schwartz, A.L. (1995) Two receptor systems are involved in the plasma clearance of tissue factor pathway inhibitor in vivo. *J Biol Chem* **270**, 24800-24804.
- Narita, M., Holtzman, D.M., Schwartz, A.L., Bu, G. (1997) Alpha2-macroglobulin complexes with and mediates the endocytosis of beta-amyloid peptide via cell surface low-density lipoprotein receptor-related protein. *J Neurochem* **69**, 1904-1911.
- Navascues, J., Moujahid, A., Almendros, A., Marin-Teva, J.L., Cuadros, M.A. (1995) Origin of microglia in the quail retina: central-to-peripheral and vitreal-to-scleral migration of microglial precursors during development. *J Comp Neurol* **354**, 209-228.
- Neels, J.G., Bovenschen, N., van Zonneveld, A.J., Lenting, P.J. (2000) Interaction between factor VIII and LDL receptor-related protein. Modulation of coagulation? *Trends Cardiovasc Med* **10**, 8-14.
- Neumann, H., Misgeld, T., Matsumuro, K., Wekerle, H. (1998) Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: involvement of the p75 neurotrophin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5779-5784.
- Newman, S.L., Mikus, L.K., Tucci, M.A. (1991) Differential requirements for cellular cytoskeleton in human macrophage complement receptor- and Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Immunol* **146**, 967-974.
- Nguyen, D.G., Hildreth, J.E. (2003) Involvement of macrophage mannose receptor in the binding and transmission of HIV by macrophages. *Eur J Immunol* **33**, 483-493.
- Niewohner, J., Weber, I., Maniak, M., Muller-Taubenberger, A., Gerisch, G. (1997) Talin-null cells of Dictyostelium are strongly defective in adhesion to particle and substrate surfaces and slightly impaired in cytokinesis. *J Cell Biol* **138**, 349-61.
- Nigou, J., Zelle-Rieser, C., Gilleron, M., Thurnher, M., Puzo, G. (2001) Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J Immunol* **166**, 7477-7485.
- Ninomiya, N., Hazeki, K., Fukui, Y., Seya, T., Okada, T., Hazeki, O., Ui, M. (1994) Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in Fc gamma receptor signaling. *J Biol Chem* **269**, 22732-22737.
- Nishida, E. (1985) Opposite effects of cofilin and profilin from porcine brain on rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry* **24**, 1160-1164.

- Nishida, E., Maekawa, S., Sakai, H. (1984) Cofilin, a protein in porcine brain that binds to actin filaments and inhibits their interactions with myosin and tropomyosin. *Biochemistry* **23**, 5307-5313.
- Nitsch, R.M., Slack, B.E., Wurtman, R.J., Growdon, J.H. (1992) Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* **258**, 304-307.
- Nunan, J., Small, D.H. (2002) Proteolytic processing of the amyloid-beta protein precursor of Alzheimer's disease. *Essays Biochem* **38**, 37-49.
- O'Riordan, D.M., Standing, J.E., Limper, A.H. (1995) Pneumocystis carinii glycoprotein A binds macrophage mannose receptors. *Infect Immun* **63**, 779-784.
- Ohno, K., Suzumura, A., Sawada, M., Marunouchi, T. (1990) Production of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor by cultured astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **169**, 719-724.
- Orth, K., Willnow, T., Herz, J., Gething, M.J., Sambrook, J. (1994) Low density lipoprotein receptor-related protein is necessary for the internalization of both tissue-type plasminogen activator-inhibitor complexes and free tissue-type plasminogen activator. *J Biol Chem* **269**, 21117-21122.
- Paresce, D.M., Chung, H., Maxfield, F.R. (1997) Slow degradation of aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein by microglial cells. *J Biol Chem* **272**, 29390-29397.
- Paresce, D.M., Ghosh, R.N., Maxfield, F.R. (1996) Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor. *Neuron* **17**, 553-565.
- Patel, M., Morrow, J., Maxfield, F.R., Strickland, D.K., Greenberg, S., Tabas, I. (2003) The cytoplasmic domain of the low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein, but not that of the LDL receptor, triggers phagocytosis. *J Biol Chem* **278**, 44799-44807.
- Pearson, H.E., Payne, B.R., Cunningham, T.J. (1993) Microglial invasion and activation in response to naturally occurring neuronal degeneration in the ganglion cell layer of the postnatal cat retina. *Brain Res Dev Brain Res* **76**, 249-255.
- Peitsch, M.C., Polzar, B., Stephan, H., Crompton, T., MacDonald, H.R., Mannherz, H.G., Tschopp, J. (1993) Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). *Embo J* **12**, 371-377.
- Perez, R.G., Soriano, S., Hayes, J.D., Ostaszewski, B., Xia, W., Selkoe, D.J., Chen, X., Stokin, G.B., Koo, E.H. (1999) Mutagenesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including Abeta42. *J Biol Chem* **274**, 18851-18856.
- Perlmutter, L.S., Barron, E., Chui, H.C. (1990) Morphologic association between microglia and senile plaque amyloid in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **119**, 32-36.

- Perlmutter, L.S., Barron, E., Saperia, D., Chui, H.C. (1991) Association between vascular basement membrane components and the lesions of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* **30**, 673-681.
- Perry, G., Siedlak, S.L., Richey, P., Kawai, M., Cras, P., Kalara, R.N., Galloway, P.G., Scardina, J.M., Cordell, B., Greenberg, B.D., et al. (1991) Association of heparan sulfate proteoglycan with the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *J Neurosci* **11**, 3679-3683.
- Perry, V.H., Hume, D.A., Gordon, S. (1985) Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* **15**, 313-326.
- Pillot, T., Drouet, B., Queille, S., Labeur, C., Vandekerckhove, J., Rosseneu, M., Pincon-Raymond, M., Chambaz, J. (1999) The nonfibrillar amyloid beta-peptide induces apoptotic neuronal cell death: involvement of its C-terminal fusogenic domain. *J Neurochem* **73**, 1626-1634.
- Platt, N., da Silva, R.P., Gordon, S. (1998) Class A scavenger receptors and the phagocytosis of apoptotic cells. *Biochem Soc Trans* **26**, 639-644.
- Pollard, T.D., Cooper, J.A. (1986) Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu Rev Biochem* **55**, 987-1035.
- Pontow, S.E., Kery, V., Stahl, P.D. (1992) Mannose receptor. *Int Rev Cytol* **137B**, 221-244.
- Pope, B., Maciver, S., Weeds, A. (1995) Localization of the calcium-sensitive actin monomer binding site in gelsolin to segment 4 and identification of calcium binding sites. *Biochemistry* **34**, 1583-1588.
- Prat, E., Baron, P., Meda, L., Scarpini, E., Galimberti, D., Ardolino, G., Catania, A., Scarlato, G. (2000) The human astrocytoma cell line U373MG produces monocyte chemotactic protein (MCP)-1 upon stimulation with beta-amyloid protein. *Neurosci Lett* **283**, 177-180.
- Pring, M., Weber, A., Bubb, M.R. (1992) Profilin-actin complexes directly elongate actin filaments at the barbed end. *Biochemistry* **31**, 1827-1836.
- Provis, J.M., Diaz, C.M., Penfold, P.L. (1996) Microglia in human retina: a heterogeneous population with distinct ontogenies. *Perspect Dev Neurobiol* **3**, 213-222.
- Pyo, H., Joe, E., Jung, S., Lee, S.H., Jou, I. (1999) Gangliosides activate cultured rat brain microglia. *J Biol Chem* **274**, 34584-34589.
- Qiu, W.Q., Walsh, D.M., Ye, Z., Vekrellis, K., Zhang, J., Podlisny, M.B., Rosner, M.R., Safavi, A., Hersh, L.B., Selkoe, D.J. (1998) Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J Biol Chem* **273**, 32730-32738.
- Qiu, Z., Strickland, D.K., Hyman, B.T., Rebeck, G.W. (1999) Alpha2-macroglobulin enhances the clearance of endogenous soluble beta-amyloid peptide via low-density lipoprotein receptor-related protein in cortical neurons. *J Neurochem* **73**, 1393-1398.

- Rabchevsky, A.G., Streit, W.J. (1997) Grafting of cultured microglial cells into the lesioned spinal cord of adult rats enhances neurite outgrowth. *J Neurosci Res* **47**, 34-48.
- Raghavan, M., Bjorkman, P.J. (1996) Fc receptors and their interactions with immunoglobulins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 181-220.
- Ranganathan, S., Liu, C.X., Migliorini, M.M., Von Arnim, C.A., Peltan, I.D., Mikhailenko, I., Hyman, B.T., Strickland, D.K. (2004) Serine and threonine phosphorylation of the low density lipoprotein receptor-related protein by protein kinase Calpha regulates endocytosis and association with adaptor molecules. *J Biol Chem* **279**, 40536-40544.
- Rebeck, G.W., Harr, S.D., Strickland, D.K., Hyman, B.T. (1995) Multiple, diverse senile plaque-associated proteins are ligands of an apolipoprotein E receptor, the alpha 2-macroglobulin receptor/low-density-lipoprotein receptor-related protein. *Ann Neurol* **37**, 211-217.
- Rezaie, P., Patel, K., Male, D.K. (1999) Microglia in the human fetal spinal cord--patterns of distribution, morphology and phenotype. *Brain Res Dev Brain Res* **115**, 71-81.
- Robinson, J.M., Vandre, D.D. (1995) Stimulus-dependent alterations in macrophage microtubules: increased tubulin polymerization and detyrosination. *J Cell Sci* **108 (Pt 2)**, 645-655.
- Rogers, J., Lue, L.F. (2001) Microglial chemotaxis, activation, and phagocytosis of amyloid beta-peptide as linked phenomena in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* **39**, 333-340.
- Rogove, A.D., Siao, C., Keyt, B., Strickland, S., Tsirka, S.E. (1999) Activation of microglia reveals a non-proteolytic cytokine function for tissue plasminogen activator in the central nervous system. *J Cell Sci* **112 (Pt 22)**, 4007-4016.
- Roher, A.E., Chaney, M.O., Kuo, Y.M., Webster, S.D., Stine, W.B., Haverkamp, L.J., Woods, A.S., Cotter, R.J., Tuohy, J.M., Krafft, G.A., Bonnell, B.S., Emmerling, M.R. (1996) Morphology and toxicity of Abeta-(1-42) dimer derived from neuritic and vascular amyloid deposits of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* **271**, 20631-20635.
- Roubey, R.A., Ross, G.D., Merrill, J.T., Walton, F., Reed, W., Winchester, R.J., Buyon, J.P. (1991) Staurosporine inhibits neutrophil phagocytosis but not iC3b binding mediated by CR3 (CD11b/CD18). *J Immunol* **146**, 3557-3562.
- Ruben, G.C., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Johnson, J.E., Jr. (1993) The organization of the microtubule associated protein tau in Alzheimer paired helical filaments. *Brain Res* **602**, 1-13.
- Ruben, G.C., Iqbal, K., Wisniewski, H.M., Johnson, J.E., Jr., Grundke-Iqbal, I. (1993) Alzheimer neurofibrillary tangles contain 2.1 nm filaments structurally identical to the microtubule-associated protein tau: a high-resolution transmission electron microscope study of tangles and senile plaque core amyloid. *Brain Res* **602**, 164-179.
- Ruggieri, S., Erickson-Viitanen, S., Horecker, B.L. (1983) Thymosin beta arg10, a major variant of thymosin beta 10 in rabbit tissues. *Arch Biochem Biophys* **226**, 388-392.

Russo-Marie, F. (1992) Macrophages and the glucocorticoids. *J Neuroimmunol* **40**, 281-6.

Ryu, J., Pyo, H., Jou, I., Joe, E. (2000) Thrombin induces NO release from cultured rat microglia via protein kinase C, mitogen-activated protein kinase, and NF-kappa B. *J Biol Chem* **275**, 29955-29959.

Sampath, R., Gallagher, P.J., Pavalko, F.M. (1998) Cytoskeletal interactions with the leukocyte integrin beta2 cytoplasmic tail. Activation-dependent regulation of associations with talin and alpha-actinin. *J Biol Chem* **273**, 33588-33594.

Santha K, J.A. (1933) Weitere untersuchungen uber entwicklung der Hortegaschen mikroglia. *Arch Psychiat Nervenkr* **98**, 598-613.

Sanz, J.M., Di Virgilio, F. (2000) Kinetics and mechanism of ATP-dependent IL-1 beta release from microglial cells. *J Immunol* **164**, 4893-4898.

Sasaki, A., Yamaguchi, H., Ogawa, A., Sugihara, S., Nakazato, Y. (1997) Microglial activation in early stages of amyloid beta protein deposition. *Acta Neuropathol (Berl)* **94**, 316-322.

Sasaki, N., Toki, S., Chowei, H., Saito, T., Nakano, N., Hayashi, Y., Takeuchi, M., Makita, Z. (2001) Immunohistochemical distribution of the receptor for advanced glycation end products in neurons and astrocytes in Alzheimer's disease. *Brain Res* **888**, 256-262.

Sasaki, N., Fukatsu, R., Tsuzuki, K., Hayashi, Y., Yoshida, T., Fujii, N., Koike, T., Wakayama, I., Yanagihara, R., Garruto, R., Amano, N., Makita, Z. (1998) Advanced glycation end products in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Am J Pathol* **153**, 1149-1155.

Sawada, M., Suzumura, A., Yamamoto, H., Marunouchi, T. (1990) Activation and proliferation of the isolated microglia by colony stimulating factor-1 and possible involvement of protein kinase C. *Brain Res* **509**, 119-124.

Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q. (1991) Comparative epitope analysis of neuronal cytoskeletal proteins in Alzheimer's disease senile plaque neurites and neuropil threads. *Lab Invest* **64**, 352-357.

Schreiber, S., Stenson, W.F., MacDermott, R.P., Chappel, J.C., Teitelbaum, S.L., Perkins, S.L. (1991) Aggregated bovine IgG inhibits mannose receptor expression of murine bone marrow-derived macrophages via activation. *J Immunol* **147**, 1377-1382.

Sedgwick, J.D., Schwender, S., Imrich, H., Dorries, R., Butcher, G.W., ter Meulen, V. (1991) Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7438-7442.

Serpell, L.C., Sunde, M., Blake, C.C. (1997) The molecular basis of amyloidosis. *Cell Mol Life Sci* **53**, 871-887.

- Serrander, L., Fallman, M., Stendahl, O. (1996) Activation of phospholipase D is an early event in integrin-mediated signalling leading to phagocytosis in human neutrophils. *Inflammation* **20**, 439-450.
- Shaffer, L.M., Dority, M.D., Gupta-Bansal, R., Frederickson, R.C., Younkin, S.G., Brunden, K.R. (1995) Amyloid beta protein (A beta) removal by neuroglial cells in culture. *Neurobiol Aging* **16**, 737-745.
- Shang, S.Q., Chen, G.X., Shen, J., Yu, X.H., Wang, K.Y. (2005) The binding of MBL to common bacteria in infectious diseases of children. *J Zhejiang Univ Sci B* **6**, 53-56.
- Sheng, J.G., Mrak, R.E., Griffin, W.S. (1997) Neuritic plaque evolution in Alzheimer's disease is accompanied by transition of activated microglia from primed to enlarged to phagocytic forms. *Acta Neuropathol (Berl)* **94**, 1-5.
- Sheng, J.G., Mrak, R.E., Rovnaghi, C.R., Kozłowska, E., Van Eldik, L.J., Griffin, W.S. (1996) Human brain S100 beta and S100 beta mRNA expression increases with age: pathogenic implications for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **17**, 359-363.
- Shepherd, V.L., Hoidal, J.R. (1990) Clearance of neutrophil-derived myeloperoxidase by the macrophage mannose receptor. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2**, 335-340.
- Sheterline, P., Rickard, J.E., Boothroyd, B., Richards, R.C. (1986) Phorbol ester induces rapid actin assembly in neutrophil leucocytes independently of changes in $[Ca^{2+}]_i$ and pHi. *J Muscle Res Cell Motil* **7**, 405-412.
- Shi, B., Raina, J., Lorenzo, A., Busciglio, J., Gabuzda, D. (1998) Neuronal apoptosis induced by HIV-1 Tat protein and TNF- α : potentiation of neurotoxicity mediated by oxidative stress and implications for HIV-1 dementia. *J Neurovirol* **4**, 281-290.
- Shibata, M., Yamada, S., Kumar, S.R., Calero, M., Bading, J., Frangione, B., Holtzman, D.M., Miller, C.A., Strickland, D.K., Ghiso, J., Zlokovic, B.V. (2000) Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest* **106**, 1489-1499.
- Si, Q., Nakamura, Y., Kataoka, K. (2000) A serum factor enhances production of nitric oxide and tumor necrosis factor- α from cultured microglia. *Exp Neurol* **162**, 89-97.
- Si, Q.S., Nakamura, Y., Kataoka, K. (1997) Albumin enhances superoxide production in cultured microglia. *Glia* **21**, 413-418.
- Sievers, J., Schmidtmer, J., Parwaresch, R. (1994) Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells when cultured on astrocytes. *Ann Anat* **176**, 45-51.
- Simonovic, M., Dolmer, K., Huang, W., Strickland, D.K., Volz, K., Gettins, P.G. (2001) Calcium coordination and pH dependence of the calcium affinity of ligand-binding repeat CR7 from the LRP. Comparison with related domains from the LRP and the LDL receptor. *Biochemistry* **40**, 15127-15134.

- Simpson, J., Rezaie, P., Newcombe, J., Cuzner, M.L., Male, D., Woodroffe, M.N. (2000) Expression of the beta-chemokine receptors CCR2, CCR3 and CCR5 in multiple sclerosis central nervous system tissue. *J Neuroimmunol* **108**, 192-200.
- Sinha, S., Anderson, J.P., Barbour, R., Basi, G.S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H.F., Frigon, N., Hong, J., Jacobson-Croak, K., Jewett, N., Keim, P., Knops, J., Lieberburg, I., Power, M., Tan, H., Tatsuno, G., Tung, J., Schenk, D., Seubert, P., Suomensaaari, S.M., Wang, S., Walker, D., Zhao, J., McConlogue, L., John, V. (1999) Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* **402**, 537-540.
- Snow, A.D., Mar, H., Nochlin, D., Kimata, K., Kato, M., Suzuki, S., Hassell, J., Wight, T.N. (1988) The presence of heparan sulfate proteoglycans in the neuritic plaques and congophilic angiopathy in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **133**, 456-463.
- Snow, A.D., Mar, H., Nochlin, D., Kresse, H., Wight, T.N. (1992) Peripheral distribution of dermatan sulfate proteoglycans (decorin) in amyloid-containing plaques and their presence in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *J Histochem Cytochem* **40**, 105-113.
- Snow, A.D., Sekiguchi, R.T., Nochlin, D., Kalaria, R.N., Kimata, K. (1994) Heparan sulfate proteoglycan in diffuse plaques of hippocampus but not of cerebellum in Alzheimer's disease brain. *Am J Pathol* **144**, 337-347.
- Snow, D.M., Watanabe, M., Letourneau, P.C., Silver, J. (1991) A chondroitin sulfate proteoglycan may influence the direction of retinal ganglion cell outgrowth. *Development* **113**, 1473-1485.
- Sorokin, S.P., McNelly, N.A., Blunt, D.G., Hoyt, R.F., Jr. (1992) Macrophage development: III. Transformation of pulmonary macrophages from precursors in fetal lungs and their later maturation in organ culture. *Anat Rec* **232**, 551-571.
- Stahl, P.D., Rodman, J.S., Miller, M.J., Schlesinger, P.H. (1978) Evidence for receptor-mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates, and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 1399-1403.
- Stalder, M., Deller, T., Staufenbiel, M., Jucker, M. (2001) 3D-Reconstruction of microglia and amyloid in APP23 transgenic mice: no evidence of intracellular amyloid. *Neurobiol Aging* **22**, 427-434.
- Stalder, M., Phinney, A., Probst, A., Sommer, B., Staufenbiel, M., Jucker, M. (1999) Association of microglia with amyloid plaques in brains of APP23 transgenic mice. *Am J Pathol* **154**, 1673-84.
- Stein, M., Keshav, S., Harris, N., Gordon, S. (1992) Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* **176**, 287-292.
- Steiner, H., Winkler, E., Edbauer, D., Prokop, S., Basset, G., Yamasaki, A., Kostka, M., Haass, C. (2002) PEN-2 is an integral component of the gamma-secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. *J Biol Chem* **277**, 39062-39065.

- Stolz, B., Erulkar, S.D., Kuffler, D.P. (1991) Macrophages direct process elongation from adult frog motoneurons in culture. *Proc Biol Sci* **244**, 227-231.
- Streit, W.J., Kreutzberg, G.W. (1987) Lectin binding by resting and reactive microglia. *J Neurocytol* **16**, 249-260.
- Strickland, D.K., Ashcom, J.D., Williams, S., Burgess, W.H., Migliorini, M., Argraves, W.S. (1990) Sequence identity between the alpha 2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. *J Biol Chem* **265**, 17401-17404.
- Su, H.P., Nakada-Tsukui, K., Tosello-Tramont, A.C., Li, Y., Bu, G., Henson, P.M., Ravichandran, K.S. (2002) Interaction of CED-6/GULP, an adapter protein involved in engulfment of apoptotic cells with CED-1 and CD91/low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *J Biol Chem* **277**, 11772-11779.
- Sun, H.Q., Kwiatkowska, K., Yin, H.L. (1996) beta-Thymosins are not simple actin monomer buffering proteins. Insights from overexpression studies. *J Biol Chem* **271**, 9223-9230.
- Sung, L.A., Fan, Y., Lin, C.C. (1996) Gene assignment, expression, and homology of human tropomodulin. *Genomics* **34**, 92-96.
- Suzuki, T. (1991) Signal transduction mechanisms through Fc gamma receptors on the mouse macrophage surface. *Faseb J* **5**, 187-193.
- Suzumura, A., Sawada, M., Yamamoto, H., Marunouchi, T. (1990) Effects of colony stimulating factors on isolated microglia in vitro. *J Neuroimmunol* **30**, 111-120.
- Takahashi, K., Yamamura, F., Naito, M. (1989) Differentiation, maturation, and proliferation of macrophages in the mouse yolk sac: a light-microscopic, enzyme-cytochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study. *J Leukoc Biol* **45**, 87-96.
- Takahashi, M., Tsujioka, Y., Yamada, T., Tsuboi, Y., Okada, H., Yamamoto, T., Liposits, Z. (1999) Glycosylation of microtubule-associated protein tau in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol (Berl)* **97**, 635-641.
- Takayama, Y., May, P., Anderson, R.G., Herz, J. (2005) Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) controls endocytosis and c-CBL-mediated ubiquitination of the platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFRbeta). *J Biol Chem* **280**, 18504-18510.
- Tan, J., Town, T., Paris, D., Mori, T., Suo, Z., Crawford, F., Mattson, M.P., Flavell, R.A., Mullan, M. (1999) Microglial activation resulting from CD40-CD40L interaction after beta-amyloid stimulation. *Science* **286**, 2352-2355.
- Tanaka, J., Maeda, N. (1996) Microglial ramification requires nondiffusible factors derived from astrocytes. *Exp Neurol* **137**, 367-375.
- Tanaka, J., Toku, K., Sakanaka, M., Maeda, N. (1999) Morphological differentiation of microglial cells in culture: involvement of insoluble factors derived from astrocytes. *Neurosci Res* **34**, 207-215.

- Tanaka, S., Nakamura, S., Ueda, K., Kameyama, M., Shiojiri, S., Takahashi, Y., Kitaguchi, N., Ito, H. (1988) Three types of amyloid protein precursor mRNA in human brain: their differential expression in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* **157**, 472-479.
- Tejle, K., Magnusson, K.E., Rasmusson, B. (2002) Phagocytosis and phagosome maturation are regulated by calcium in J774 macrophages interacting with unopsonized prey. *Biosci Rep* **22**, 529-540.
- Terry, R.D., Gonatas, N.K., Weiss, M. (1964) The ultrastructure of the cerebral cortex in Alzheimer's disease. *Trans Am Neurol Assoc* **89**, 12.
- Thomas, A., Gasque, P., Vaudry, D., Gonzalez, B., Fontaine, M. (2000) Expression of a complete and functional complement system by human neuronal cells in vitro. *Int Immunol* **12**, 1015-1023.
- Tiffany, H.L., Lavigne, M.C., Cui, Y.H., Wang, J.M., Leto, T.L., Gao, J.L., Murphy, P.M. (2001) Amyloid-beta induces chemotaxis and oxidant stress by acting at formylpeptide receptor 2, a G protein-coupled receptor expressed in phagocytes and brain. *J Biol Chem* **276**, 23645-23652.
- Tooyama, I., Kawamata, T., Akiyama, H., Moestrup, S.K., Gliemann, J., McGeer, P.L. (1993) Immunohistochemical study of alpha 2 macroglobulin receptor in Alzheimer and control postmortem human brain. *Mol Chem Neuropathol* **18**, 153-160.
- Trommsdorff, M., Borg, J.P., Margolis, B., Herz, J. (1998) Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* **273**, 33556-33560.
- Tsuchihashi, Y., Kitamura, T., Fujita, S. (1981) Immunofluorescence studies of the monocytes in the injured rat brain. *Acta Neuropathol (Berl)* **53**, 213-219.
- Tuominen, E.K., Holopainen, J.M., Chen, J., Prestwich, G.D., Bachiller, P.R., Kinnunen, P.K., Janmey, P.A. (1999) Fluorescent phosphoinositide derivatives reveal specific binding of gelsolin and other actin regulatory proteins to mixed lipid bilayers. *Eur J Biochem* **263**, 85-92.
- Tyler, S.J., Dawbarn, D., Wilcock, G.K., Allen, S.J. (2002) alpha- and beta-secretase: profound changes in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* **299**, 373-376.
- Ulery, P.G., Beers, J., Mikhailenko, I., Tanzi, R.E., Rebeck, G.W., Hyman, B.T., Strickland, D.K. (2000) Modulation of beta-amyloid precursor protein processing by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence that LRP contributes to the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* **275**, 7410-7415.
- Ulvestad, E., Williams, K., Vedeler, C., Antel, J., Nyland, H., Mork, S., Matre, R. (1994) Reactive microglia in multiple sclerosis lesions have an increased expression of receptors for the Fc part of IgG. *J Neurol Sci* **121**, 125-131.
- Valiron, O., Caudron, N., Job, D. (2001) Microtubule dynamics. *Cell Mol Life Sci* **58**, 2069-2084.

- Vallat, A.V., De Girolami, U., He, J., Mhashilkar, A., Marasco, W., Shi, B., Gray, F., Bell, J., Keohane, C., Smith, T.W., Gabuzda, D. (1998) Localization of HIV-1 co-receptors CCR5 and CXCR4 in the brain of children with AIDS. *Am J Pathol* **152**, 167-178.
- Van Gool, D., De Strooper, B., Van Leuven, F., Triau, E., Dom, R. (1993) alpha 2-Macroglobulin expression in neuritic-type plaques in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **14**, 233-237.
- Van Muiswinkel, F.L., Raupp, S.F., de Vos, N.M., Smits, H.A., Verhoef, J., Eikelenboom, P., Nottet, H.S. (1999) The amino-terminus of the amyloid-beta protein is critical for the cellular binding and consequent activation of the respiratory burst of human macrophages. *J Neuroimmunol* **96**, 121-130.
- Van Muiswinkel, F.L., Veerhuis, R., Eikelenboom, P. (1996) Amyloid beta protein primes cultured rat microglial cells for an enhanced phorbol 12-myristate 13-acetate-induced respiratory burst activity. *J Neurochem* **66**, 2468-2476.
- Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M.A., Biere, A.L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J.C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., Citron, M. (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* **286**, 735-741.
- Veinbergs, I., Everson, A., Sagara, Y., Masliah, E. (2002) Neurotoxic effects of apolipoprotein E4 are mediated via dysregulation of calcium homeostasis. *J Neurosci Res* **67**, 379-387.
- Vincent, V.A., Tilders, F.J., Van Dam, A.M. (1997) Inhibition of endotoxin-induced nitric oxide synthase production in microglial cells by the presence of astroglial cells: a role for transforming growth factor beta. *Glia* **19**, 190-198.
- Voll, R.E., Herrmann, M., Roth, E.A., Stach, C., Kalden, J.R., Girkontaite, I. (1997) Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* **390**, 350-351.
- Vonsattel, J.P., Myers, R.H., Hedley-Whyte, E.T., Ropper, A.H., Bird, E.D., Richardson, E.P., Jr. (1991) Cerebral amyloid angiopathy without and with cerebral hemorrhages: a comparative histological study. *Ann Neurol* **30**, 637-649.
- Walker, D.G., Kim, S.U., McGeer, P.L. (1995) Complement and cytokine gene expression in cultured microglial derived from postmortem human brains. *J Neurosci Res* **40**, 478-493.
- Walker, D.G., Lue, L.F., Beach, T.G. (2002) Increased expression of the urokinase plasminogen-activator receptor in amyloid beta peptide-treated human brain microglia and in AD brains. *Brain Res* **926**, 69-79.
- Walsh, D.M., Lomakin, A., Benedek, G.B., Condron, M.M., Teplow, D.B. (1997) Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *J Biol Chem* **272**, 22364-22372.

- Wang, C.C., Wu, C.H., Shieh, J.Y., Wen, C.Y., Ling, E.A. (1996) Immunohistochemical study of amoeboid microglial cells in fetal rat brain. *J Anat* **189** (Pt 3), 567-574.
- Wang, X., Bae, J.H., Kim, S.U., McLarnon, J.G. (1999) Platelet-activating factor induced Ca(2+) signaling in human microglia. *Brain Res* **842**, 159-165.
- Warshawsky, I., Bu, G., Schwartz, A.L. (1993) Identification of domains on the 39-kDa protein that inhibit the binding of ligands to the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* **268**, 22046-22054.
- Weber, A., Pennise, C.R., Pring, M. (1994) DNase I increases the rate constant of depolymerization at the pointed (-) end of actin filaments. *Biochemistry* **33**, 4780-4786.
- Webster, S.D., Yang, A.J., Margol, L., Garzon-Rodriguez, W., Glabe, C.G., Tenner, A.J. (2000) Complement component C1q modulates the phagocytosis of Aβ by microglia. *Exp Neurol* **161**, 127-138.
- Welch, M.D., Iwamatsu, A., Mitchison, T.J. (1997) Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature* **385**, 265-269.
- Willnow, T.E., Goldstein, J.L., Orth, K., Brown, M.S., Herz, J. (1992) Low density lipoprotein receptor-related protein and gp330 bind similar ligands, including plasminogen activator-inhibitor complexes and lactoferrin, an inhibitor of chylomicron remnant clearance. *J Biol Chem* **267**, 26172-26180.
- Wisniewski, H.M., Wen, G.Y. (1985) Substructures of paired helical filaments from Alzheimer's disease neurofibrillary tangles. *Acta Neuropathol (Berl)* **66**, 173-176.
- Witting, A., Muller, P., Herrmann, A., Kettenmann, H., Nolte, C. (2000) Phagocytic clearance of apoptotic neurons by Microglia/Brain macrophages in vitro: involvement of lectin-, integrin-, and phosphatidylserine-mediated recognition. *J Neurochem* **75**, 1060-1070.
- Wolf, B.B., Lopes, M.B., VandenBerg, S.R., Gonias, S.L. (1992) Characterization and immunohistochemical localization of alpha 2-macroglobulin receptor (low-density lipoprotein receptor-related protein) in human brain. *Am J Pathol* **141**, 37-42.
- Wolfe, M.S. (2003) Gamma-secretase--intramembrane protease with a complex. *Sci Aging Knowledge Environ* **2003**, PE7.
- Wolfe, M.S., Esler, W.P., Das, C. (2002) Continuing strategies for inhibiting Alzheimer's gamma-secretase. *J Mol Neurosci* **19**, 83-87.
- Wolfe, M.S., Xia, W., Ostaszewski, B.L., Diehl, T.S., Kimberly, W.T., Selkoe, D.J. (1999) Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* **398**, 513-517.
- Wright, S.D., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., Ramos, R.A. (1989) Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. *J Exp Med* **170**, 1231-1241.

- Xu, G.G., Deng, Y.Q., Liu, S.J., Li, H.L., Wang, J.Z. (2005) Prolonged Alzheimer-like tau hyperphosphorylation induced by simultaneous inhibition of phosphoinositol-3 kinase and protein kinase C in N2a cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **37**, 349-354.
- Yamada, A., Dileepan, K.N., Stechschulte, D.J., Suzuki, T. (1989) Regulation of Fc gamma 2a receptor-mediated phagocytosis by a murine macrophage-like cell line, P388D1: involvement of casein kinase II activity associated with Fc gamma 2a receptor. *J Mol Cell Immunol* **4**, 191-9; discussion 199-201.
- Yan, R., Bienkowski, M.J., Shuck, M.E., Miao, H., Tory, M.C., Pauley, A.M., Brashier, J.R., Stratman, N.C., Mathews, W.R., Buhl, A.E., Carter, D.B., Tomasselli, A.G., Parodi, L.A., Heinrikson, R.L., Gurney, M.E. (1999) Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* **402**, 533-537.
- Yang, D.S., Small, D.H., Seydel, U., Smith, J.D., Hallmayer, J., Gandy, S.E., Martins, R.N. (1999) Apolipoprotein E promotes the binding and uptake of beta-amyloid into Chinese hamster ovary cells in an isoform-specific manner. *Neuroscience* **90**, 1217-1226.
- Yang, N., Higuchi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, A., Kangawa, K., Nishida, E., Mizuno, K. (1998) Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* **393**, 809-812.
- Yankner, B.A., Caceres, A., Duffy, L.K. (1990) Nerve growth factor potentiates the neurotoxicity of beta amyloid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 9020-9023.
- Yasuhara, O., Walker, D.G., McGeer, P.L. (1994) Hageman factor and its binding sites are present in senile plaques of Alzheimer's disease. *Brain Res* **654**, 234-240.
- Yazawa, H., Yu, Z.X., Takeda, Le, Y., Gong, W., Ferrans, V.J., Oppenheim, J.J., Li, C.C., Wang, J.M. (2001) Beta amyloid peptide (A β 42) is internalized via the G-protein-coupled receptor FPRL1 and forms fibrillar aggregates in macrophages. *Faseb J* **15**, 2454-2462.
- Yonezawa, N., Nishida, E., Iida, K., Yahara, I., Sakai, H. (1990) Inhibition of the interactions of cofilin, destrin, and deoxyribonuclease I with actin by phosphoinositides. *J Biol Chem* **265**, 8382-8386.
- Young, J.D., Ko, S.S., Cohn, Z.A. (1984) The increase in intracellular free calcium associated with IgG gamma 2b/gamma 1 Fc receptor-ligand interactions: role in phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 5430-5434.
- Zhang, J., Zhu, J., Imrich, A., Cushion, M., Kinane, T.B., Koziel, H. (2004) Pneumocystis activates human alveolar macrophage NF-kappaB signaling through mannose receptors. *Infect Immun* **72**, 3147-3160.
- Zhang, L., Liu, B. (1992) [Composition and distribution of lipid and apolipoprotein in plasma lipoproteins of endogenous hypertriglyceridemia]. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao* **23**, 117-21.
- Zheng, L., Zomerdijk, T.P., Aarnoudse, C., van Furth, R., Nibbering, P.H. (1995) Role of protein kinase C isozymes in Fc gamma receptor-mediated intracellular killing of Staphylococcus aureus by human monocytes. *J Immunol* **155**, 776-784.

Zhou, X., Li, J., Kucik, D.F. (2001) The microtubule cytoskeleton participates in control of beta2 integrin avidity. *J Biol Chem* **276**, 44762-44769.

Zimmerli, S., Majeed, M., Gustavsson, M., Stendahl, O., Sanan, D.A., Ernst, J.D. (1996) Phagosome-lysosome fusion is a calcium-independent event in macrophages. *J Cell Biol* **132**, 49-61.

Zlokovic, B.V., Martel, C.L., Matsubara, E., McComb, J.G., Zheng, G., McCluskey, R.T., Frangione, B., Ghiso, J. (1996) Glycoprotein 330/megalin: probable role in receptor-mediated transport of apolipoprotein J alone and in a complex with Alzheimer disease amyloid beta at the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4229-4234.