

Rafts, flotilline-1 et maladie d'Alzheimer

par Nadège Girardot*, Bernadette Allinquant**, Charles Duyckaerts*

* Laboratoire de Neuropathologie Raymond Escourolle et Inserm U106, Hôpital de La Salpêtrière, Paris

** CNRS UMR 8542, Ecole Normale Supérieure, 46 rue d'Ulm, 75005 Paris

Correspondance : charles.duyckaerts@psl.ap-hop-paris.fr

Reçu le 15 avril 2003

RÉSUMÉ

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par l'accumulation de peptide A β (dans l'espace extracellulaire du cortex cérébral) et de protéine tau (dans le corps cellulaire de populations spécifiques de neurones). Le peptide A β provient d'une molécule précurseur transmembranaire de type 1, l'APP (Amyloid Precursor Protein), qui, dans les expériences d'ultracentrifugation, sédimente dans une fraction de faible densité riche en cholestérol. Ces caractéristiques définissent les « rafts », les radeaux lipidiques qui flottent sur la membrane plasmique.

Nous avons confirmé à l'aide de la filipine, une

sonde fluorescente, la richesse en cholestérol du cœur de la plaque sénile. Nous avons pu mettre en évidence l'accumulation neuronale d'un marqueur des rafts, la flotilline-1, et nous avons pu montrer qu'elle se produisait dans des vésicules lysosomales. Cette accumulation était liée à la présence de dégénérescences neurofibrillaires. Ces données laissent penser que le peptide A β , peu hydrosoluble, est libéré dans le milieu extracellulaire associé à des lipides (probablement membranaires) et que les rafts sont directement impliqués dans le métabolisme du peptide A β et donc dans sa pathologie.

SUMMARY Lipid rafts, flotillin-1 and Alzheimer disease

A β peptide accumulates in the extracellular space during Alzheimer's disease. It is the cleavage product of APP (Amyloid Precursor Protein), a large transmembrane protein. After ultracentrifugation, APP is found in a low-density fraction, enriched in cholesterol. These properties are characteristic of lipid rafts, which are microdomains that « float » like rafts on the plasma membrane.

We have confirmed the presence of cholesterol in the

core of the senile plaque, using the fluorescent probe filipin. In addition, we have shown that flotillin-1, a marker of rafts, accumulated in lysosomes of neurons in Alzheimer's disease. In most cases (76 % of the flotillin-1 positive neurons), the accumulation was associated with the presence of neurofibrillary tangles. Our data suggest that the A β peptide, which is poorly soluble in water, is actually linked with cholesterol, possibly from cellular membranes, in the extracellular space.

INTRODUCTION

La maladie d'Alzheimer est une démence dégénérative caractérisée par la présence de dégénérescences neurofibrillaires et de plaques séniles. La dégénérescence neurofibrillaire (DNF) est la conséquence de l'accumulation de protéine tau (Brion *et al.*, 1985; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986) hyperphosphorylée (Flament *et al.*, 1989). La plaque sénile est composée d'un cœur amyloïde et d'une couronne de prolongements dégénérés. Le cœur amyloïde

est enrichi en peptide A β (40 ou 42 acides aminés), issu du clivage d'une longue protéine transmembranaire de type 1, l'APP (Amyloid Precursor Protein) (Kang *et al.*, 1987). La production de ce peptide est la conséquence de deux activités enzymatiques, β et γ sécrétase (Citron *et al.*, 1995). L'activité α -sécrétase clive l'APP au milieu de la séquence correspondant au peptide A β et prévient la formation de peptide amyloïde.

Le cœur de la plaque sénile comporte, outre le peptide A β , de nombreux constituants, fractions du complément, composant P de l'amyloïde, héparane sulfate, par

exemple (Dickson, 1997; Hauw *et al.*, 1991). Il a été récemment, montré qu'il était riche en cholestérol (Mori *et al.*, 2001) – observation qui suggère que la formation des dépôts amyloïdes n'est pas une accumulation extracellulaire de peptide A β pur; celui-ci pourrait être associé à des lipides, peut-être d'origine membranaire.

La membrane cellulaire est constituée de 3 catégories de lipides : les glycérophospholipides, les sphingolipides et le cholestérol. Selon le modèle de la mosaïque fluide établi par Singer et Nicholson (1972), la membrane est organisée en bicouche dans laquelle s'enchaînent les protéines. Ce modèle a été modifié ces dernières années pour tenir compte de l'hétérogénéité des composés lipidiques membranaires. A 37°C, les glycérophospholipides, au-dessus de leur point de fusion (généralement inférieur à 0°C), sont à l'état de « cristal liquide » (appelé Lc) alors que les sphingolipides, en dessous de leur point de fusion (généralement de l'ordre de 80°C), sont à l'état solide, sous une forme physico-chimique proche de celle d'un gel (appelée L0). Glycérophospholipides et sphingolipides ne se mélangent pas. Les sphingolipides forment des « microdomaines ». L'arrangement de leurs chaînes d'acides gras, à température physiologique, ménage un espace dans lequel les molécules de cholestérol sont insérées (Fantini *et al.*, 2002). Les microdomaines riches en sphingolipides et cholestérol sont à la fois plus « solides » et moins denses que les glycérophospholipides. Ils « flottent » à la surface de la membrane plasmique ce qui justifie le terme de radeau lipidique (ou lipid raft) qui leur a été appliqué. Leur richesse en lipides explique qu'ils sédimentent dans les fractions de faible densité en gradient de saccharose; ils ont en outre la propriété de résister au détergent Triton® X-100 (Octyl phénol éthoxylate), à 4°C, ce qui facilite leur isolement biochimique.

Les cavéoles sont aussi enrichies en cholestérol et sphingolipides et sont, à ce titre, parfois rangées parmi les rafts; il s'agit d'invaginations de la membrane plasmique, identifiées depuis longtemps en microscopie électronique (Ghadially, 1988; Yamada, 1955). La présence de l'invagination est liée à l'expression de protéines particulières, les cavéolines. Les cavéoles sont abondantes dans de nombreux tissus périphériques, en particulier dans les pneumocytes et dans les cellules endothéliales; elles n'ont pas été observées dans les neurones mais des structures similaires sont présentes dans les astrocytes (Cameron *et al.*, 1997). Elles interviennent dans la transduction du signal cellulaire (Schlegel *et al.*, 1998). Cinq à 10 % de l'APP neuronal se trouve à la surface membranaire dans les rafts (Bouillot *et al.*, 1996).

Les rafts sont des microdomaines mobiles : leur déplacement à la surface de la membrane plasmique a pu être mesuré grâce à des billes fluorescentes couplées à des anticorps dirigés contre des protéines présentes dans les rafts (Pralle *et al.*, 2000). L'APP se déplace rapidement dans la membrane cellulaire de l'axone et est ensuite transférée aux dendrites (Koo *et al.*, 1990). Dans des axones périphériques, ce mouvement est lié à la kinésine I, un moteur moléculaire qui se meut le long des neurotubules; l'APP pourrait servir de lien entre la kinésine et

le microdomaine lipidique de la membrane plasmique (Kamal *et al.*, 2001).

Nous avons entrepris une étude sur des prélèvements post-mortem provenant de patients atteints de maladie d'Alzheimer ou de témoins sans maladie neurologique connue, pour tenter de préciser les rapports entre la membrane plasmique et ses radeaux lipidiques, la plaque sénile, le peptide A β et son précurseur, l'APP. Nous rapportons ici nos premiers résultats concernant le contenu en cholestérol du cœur de la plaque sénile et les modifications d'un marqueur des rafts, la flotilline-1 (Bickel *et al.*, 1997).

SUJETS, MATÉRIEL ET MÉTHODES

Cas

Treize sujets atteints de maladie d'Alzheimer ont été étudiés. Dix étaient sporadiques (âge moyen = 80.2 ans \pm 2.57 erreur standard) et 3 familiaux (âge moyen = 46,3 ans \pm 4.70), conséquence d'une mutation du gène de la préséniline 1 (Campion *et al.*, 1996). Les prélèvements issus de ces patients ont été comparés à ceux de 6 sujets de contrôle (sans antécédents de démence ou d'autre affection neurologique; âge moyen = 71 ans \pm 3.44).

Prélèvements

Les cerveaux ont été fixés dans une solution de formaldéhyde (10 % de la solution du commerce). Un prélèvement de néocortex a été plongé dans une solution de PBS (Phosphate Buffer Saline) contenant 2 % de saccharose et coupé au vibratome à une épaisseur nominale de 30 μ m. Des prélèvements d'hippocampe, d'amygdale temporale et de néocortex (aire 22 de Brodmann) ont été inclus en paraffine et coupés à 7 μ m d'épaisseur.

Marquage à la filipine

Les préparations coupées au vibratome ont été incubées toute la nuit à 4°C dans un bain de PBS contenant de la filipine (Sigma) à 4,2 % sous agitation. La filipine est excitée à 338 nm et émet à 480 nm. Les coupes ont été examinées au microscope à fluorescence pourvu d'un filtre UV. Des doubles marquages ont été réalisés avec les anticorps suivants : anti-tau (Dako®), anti-A β (Dako®), anti-CD68 (Dako®), anti-ApoE (Leroy *et al.*, 1988; Uchihara *et al.*, 1995) (voir tableau 1).

Immunohistochimie de la flotilline-1

Anticorps anti-flotilline-1

Nous avons utilisé l'anticorps anti-flotilline-1 de Transduction Laboratory®, dont les caractéristiques ont été publiées (Bickel *et al.*, 1997).

TABLEAU 1. – Anticorps utilisés lors des expériences d'immunohistochimie.

Antigène	Epitope	Clonalité	Origine de l'anticorps	Dilution	Prétraitement
Flotilline-1	Acides aminés 312 à 428 (C-terminal)	Monoclonal	Transduction Laboratories® (Bickel <i>et al.</i> , 1997)	1/1 000	Autoclave et acide orthopériodique
Aβ 6F/3D	Acides aminés 8 à 17	Monoclonal	Dako®	1/200	Acide formique
ApoE	Non connu	Monoclonal	(Leroy <i>et al.</i> , 1988)	1/200	Pas de prétraitement
APP 22C11	N-terminal de la séquence précédant celle du peptide Aβ	Monoclonal	Chemicon International®	1/200	Micro-ondes
Cathepsine-D	Non connu	Polyclonal	Dako®	1/1 000	Micro-ondes
CD68	Granules lysosomaux des macrophages	Monoclonal	Dako®	1/300	Micro-ondes
Cox 2	Sous unité 2 du complexe IV de la chaîne respiratoire	Polyclonal	A. Lombes (U153)	1/500	Pas de prétraitement
Grp78 (anti-réticulum)	EEDTSEKDEL (acides aminés 645 à 654)	Polyclonal	StressGen Biotechnologies Corp®	1/100	Pas de prétraitement
MG 160 (anti-Golgi)	Non connu	Polyclonal	N. Gonatas (Philadelphie) (Tascos <i>et al.</i> , 1995)	1/1000	Micro-ondes
Tau	4 répétitions impliquées dans l'interaction avec les micro-tubules (C-terminal)	Polyclonal	Dako®	1/100	Acide formique

Clonalité : les anticorps monoclonaux ont été produits chez la souris, les polyclonaux chez le lapin.

Dilution : vol / vol

Prétraitement :

Autoclave : 2 litres de tampon citrate à pH 7 ont été portés à ébullition. Les préparations ont été plongées dans la solution et mises sous pression dans l'autoclave pendant 10 minutes.

Acide orthopériodique : les préparations ont été disposées dans une solution à 1 % d'acide orthopériodique pendant 15 minutes.

Acide formique : les préparations ont été disposées dans de l'acide formique pur pendant 5 minutes.

Micro-ondes : les préparations ont été portées à ébullition dans une solution de tampon citrate à pH 7, 2 fois 10 minutes à 400 W.

Simple marquage

Après déparaffinage, les lames ont été prétraitées à l'autoclave dans un tampon citrate à pH 7 pendant 10 minutes puis dans une solution d'acide orthopériodique à 1 % durant 15 minutes. Les peroxydases endogènes ont été bloquées dans une solution d'acide méthylrique (20 %) et d'H₂O₂ (3 %) pendant 10 minutes. Pour éviter le marquage non spécifique, de l'albumine sérique bovine a été appliquée pendant une heure sur la préparation dans une solution contenant une faible quantité de détergent (tampon tris salin additionné de polyéthylène glycol sorbitan monolaurate = Tween® 20) à 0,1 % et d'albumine sérique bovine à 2 %. L'anticorps anti-flotilline-1 a été incubé pendant 18 heures à température ambiante. L'anticorps secondaire, anti-immunoglobuline de Souris, couplé à la peroxydase a été appliqué pendant 30 minutes. Sa présence a été visualisée en utilisant le Novared® comme chromogène.

Double marquage

Des doubles marquages ont été réalisés et examinés au microscope confocal (Leica TCS®). L'anticorps mono-

clonal de Souris dirigé contre la flotilline-1 a été appliqué en même temps qu'un anticorps polyclonal de Lapin. Celui-ci était dirigé contre la protéine tau (principal constituant des DNF), la cathepsine D (une enzyme présente dans les lysosomes), GRP 78 (une protéine contenant le motif KDEL qui la maintient dans le reticulum endoplasmique), MG160 (une sialoglycoprotéine de l'appareil de Golgi) ou COX2 (une protéine de la chaîne respiratoire localisée dans la mitochondrie). L'anticorps secondaire anti-immunoglobuline de Souris était couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), Sigma-Aldrich® excité par la raie de 488 nm du laser argon-krypton. L'anticorps dirigé contre les immunoglobulines de Lapin était couplé à la cyanine 3 (Cy3), Jackson Laboratory®, excité par la raie 568 nm. Les anticorps secondaires ont été appliqués sur les préparations pendant 1 heure à l'obscurité. Pour diminuer l'autofluorescence de la lipofuscine, les coupes ont été plongées pendant 5 minutes, à l'obscurité, dans une solution d'éthanol à 70° saturée au noir Soudan (Delatour *et al.*, 2001 ; Schnell *et al.*, 1999). Elles ont été montées dans un milieu aqueux (Immunomount, Shandon).

RÉSULTATS

Mise en évidence du cholestérol

Sur les préparations coupées au vibratome, le cœur des plaques séniles était rendu fortement fluorescent par la filipine (fig 1, -1); il était aussi marqué par l'anticorps anti-A β et anti-ApoE. L'anticorps CD68 révélait les macrophages dont le cytoplasme pouvait contenir du matériel marqué par la filipine. La filipine ne se fixait ni aux DNFs, mises en évidence par l'anticorps anti-tau, ni aux neurites dystrophiques marqués par l'anticorps anti-APP.

Localisation de la flotilline-1

Dans les échantillons provenant de maladie d'Alzheimer, l'anticorps anti-flotilline-1 marquait des granules intracytoplasmiques dans le corps cellulaire de quelques neurones (fig. 1, vues 2 et 3). Ces granules étaient observés dans toutes les régions étudiées (hippocampe, amygdale temporale et aire 22 de Brodmann). Ils avaient un diamètre d'environ 2 μ m, étaient isolés ou plus souvent agrégés par 2 ou 3. Les doubles marquages ont montré qu'ils étaient souvent présents dans les neurones qui contenaient une DNF mais DNF et granules n'étaient pas colocalisés (fig. 1, vues 4, 5 et 6). La proportion de profils neuronaux contenant des corps granulaires flotilline-1 positifs était statistiquement liée à la densité des dégénérescences neurofibrillaires dans les trois régions étudiées ($r = 0,66$, $p < 0,004$ pour l'hippocampe; $r = 0,7$, $p < 0,002$ pour l'amygdale temporale; $r = 0,48$, $p < 0,04$ pour l'aire 22 de Brodmann). Soixante-seize pour cent des neurones contenant des granules flotilline-1 positifs étaient porteurs d'une DNF. Les doubles marquages, réalisés au moyen d'anticorps anti-flotilline-1 et d'anticorps dirigés contre la cathepsine D (marqueur des lysosomes), ont montré que les deux épitopes étaient présents dans les granules flotilline-1 positifs dans les cas de maladie d'Alzheimer (fig. 1, vues 7, 8 et 9). Aucune colocalisation n'a été observée avec les anticorps dirigés contre GRP-78 (reticulum endoplasmique), Cox 2 (mitochondries) et MG-160 (appareil de Golgi) (Girardot *et al.*, 2003).

DISCUSSION

Nous avons confirmé que le cœur de la plaque sénile est riche en cholestérol, une observation due à Mori *et al.* (Mori *et al.*, 2001) et qui permet de penser que le peptide A β , en partie hydrophobe, n'est pas sécrété seul dans le milieu extracellulaire mais accroché au microdomaine membranaire auquel il est attaché. Nous avons en outre montré que la flotilline-1 s'accumulait dans le cytoplasme des neurones, préférentiellement dans ceux porteurs d'une DNF. La présence de flotilline-1 dans le cerveau humain avait été mentionnée et une augmentation de son expression signalée au cours de la maladie d'Alzheimer

(Kokubo *et al.*, 2000). La flotilline-1 est considérée comme un marqueur des rafts (Bickel, *et al.*, 1997). Ces « radeaux lipidiques » sont des microdomaines plus « solides » que le reste de la membrane plasmique sur laquelle ils semblent flotter (Fantini, *et al.*, 2002). Ils sont riches en cholestérol et en sphingolipides et sédimentent dans la fraction Triton X-100 insoluble.

Existe-t-il des raisons de penser que les rafts sont effectivement impliqués dans la pathogénie de la maladie d'Alzheimer? De nombreuses données plaident en faveur d'une réponse positive. La première tient à la topologie cellulaire de l'APP, la protéine précurseur du peptide A β qui s'accumule au centre des plaques. Cette protéine, enchâssée dans la membrane, circule en effet le long de l'axone (Koo *et al.*, 1990) et des dendrites (Caporaso *et al.*, 1994; Simons *et al.*, 1995). Elle est située dans un compartiment membranaire qui a les caractéristiques des rafts (Bouillot *et al.*, 1996) et elle pourrait être indispensable à la liaison du raft à la kinésine I, en tout cas dans le système nerveux périphérique (Kamal *et al.*, 2001; Kamal *et al.*, 2000). C'est donc par l'intermédiaire de l'APP que la kinésine I pourrait rendre le raft mobile.

Un second argument en faveur du rôle des rafts dans la maladie d'Alzheimer est l'implication du cholestérol, l'un des constituants de ces microdomaines, suggérée par plusieurs types de données : des études épidémiologiques laissent penser qu'un régime riche en cholestérol (Kalmijn *et al.*, 1997) constitue un facteur de risque pour la maladie. L'hypercholestérolémie accélère la formation des dépôts amyloïdes chez la souris transgénique (Refolo *et al.*, 2000). Au contraire, les activités β - (Runz *et al.*, 2002) et γ -sécrétase (Wahrle *et al.*, 2002) sont inhibées si la membrane est appauvrie en cholestérol par l'action de la méthyl- β -cyclodextrine ou si le trafic intracellulaire de cholestérol est bloqué par le U18666A (Wahrle, *et al.*, 2002). Les statines, qui modifient le métabolisme du cholestérol, pourraient avoir une action préventive sur la maladie d'Alzheimer (Crisby *et al.*, 2002), notamment en modifiant la teneur en cholestérol des membranes cellulaires (Fassbender *et al.*, 2001). Le cholestérol s'accumule dans le cœur des plaques séniles (Mori *et al.*, 2001). Enfin, l'allèle $\epsilon 4$ de l'apolipoprotéine E, un de ses transporteurs, est un facteur de risque de la maladie d'Alzheimer (Corder *et al.*, 1993).

La β -sécrétase (BACE) qui clive l'APP du côté C-terminal, intravésiculaire ou extracellulaire, est aussi localisée dans des rafts. Des données récentes laissent penser que la fusion de microdomaines membranaires pourraient réguler l'activité de cette enzyme, qui serait déclenchée par la colocalisation de l'APP et de BACE sur le même raft (Ehehalt *et al.*, 2003).

Nous avons été surpris de constater, chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, l'accumulation de flotilline-1, marqueur des rafts, dans des corps granulaires, visibles même sur des coupes incluses en paraffine (c'est à dire passées par des solvants des graisses). Ces granules étaient fréquemment localisés dans les neurones contenant une dégénérescence neurofibrillaire (76 % des neurones contenant des granulations marquées par l'anticorps anti-flotilline-1 contenaient une DNF). Leur nature a été

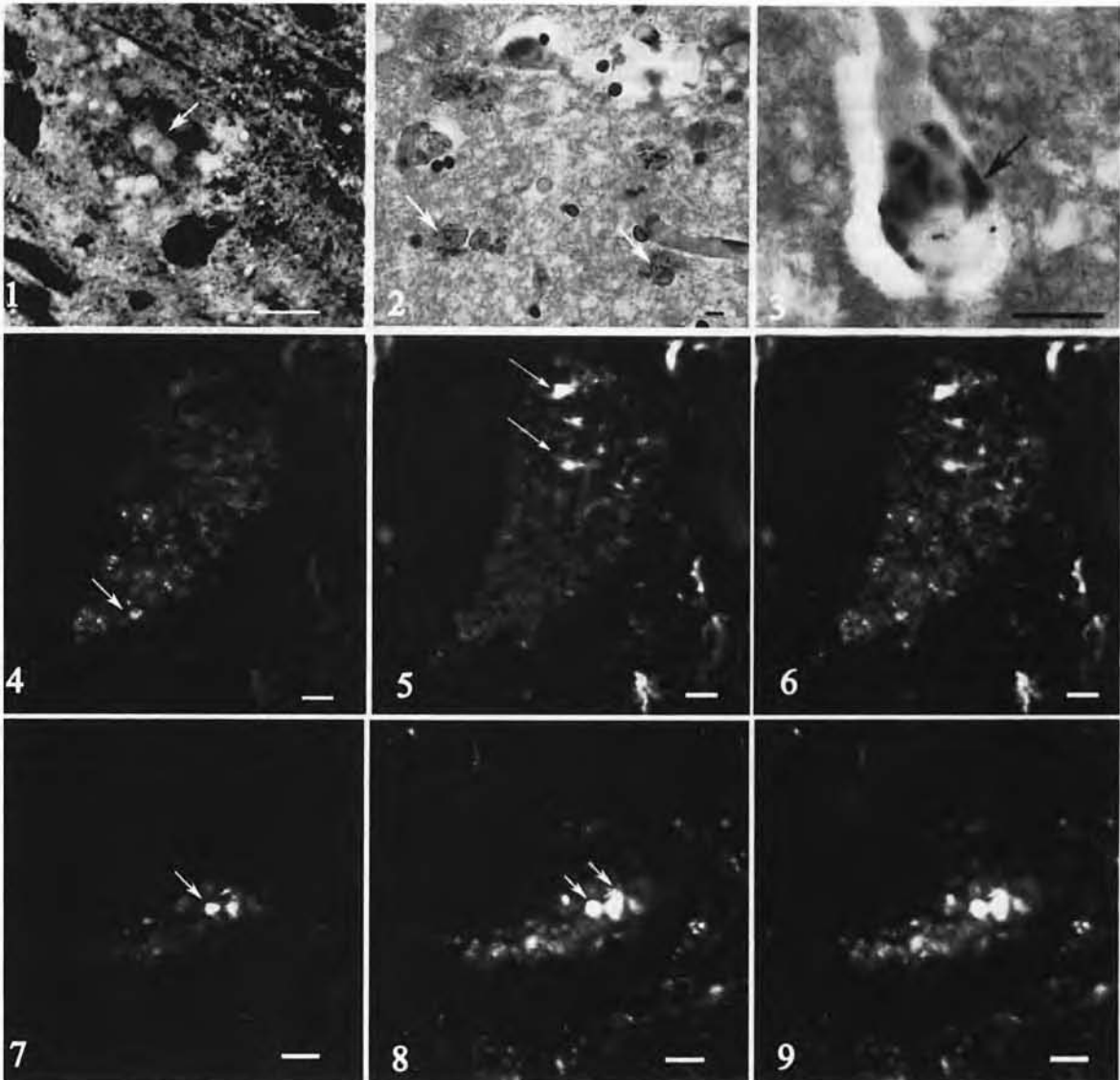


FIG. 1.

1. Cholestérol mis en évidence au moyen de la filipine dans le cortex cérébral d'un patient atteint de maladie d'Alzheimer.

L'observation a été réalisée au microscope à fluorescence pourvu d'un filtre à ultra-violet. La flèche blanche indique l'accumulation de cholestérol dans le cœur d'une plaque sénile. Barre = 10 μ m.

2. Immunohistochimie de la flotilline-1 sur un échantillon d'amygdale temporale d'un patient atteint de maladie d'Alzheimer.

Les flèches indiquent l'accumulation granulaire de l'immunoréactivité flotilline-1 dans le corps cellulaire des neurones. Technique streptavidine-biotine-peroxydase utilisant le Novared® comme chromogène. Barre = 10 μ m.

3. Immunohistochimie de la flotilline-1 sur un échantillon de cortex temporal d'un patient atteint de maladie d'Alzheimer.

L'accumulation de flotilline-1 dans un neurone pyramidal est indiquée par une flèche noire.

Barre = 10 μ m.

4, 5, 6. Double marquage examiné en microscopie confocale d'un échantillon de la corne d'Ammon, chez un patient atteint de maladie d'Alzheimer.

4 : anticorps anti-flotilline-1 ; révélation par un anticorps anti-immunoglobuline de souris couplé à la fluorescéine (canal vert) ; la flèche désigne un corps granulaire marqué par l'anticorps anti-flotilline situé dans le corps cellulaire du neurone. 5 : anticorps anti-tau ; révélation par un anticorps anti-immunoglobuline de lapin couplé à la carbocyanine 3 (canal rouge) ; les 2 flèches indiquent des accumulations de protéine tau. 6 : superposition des 2 images ; absence de colocalisation.

Barre = 3 μ m.

7, 8, 9. Double marquage examiné en microscopie confocale d'un échantillon de la corne d'Ammon, chez un patient atteint de maladie d'Alzheimer.

7 : anticorps anti-flotilline-1 ; révélation par un anticorps anti-immunoglobuline de souris couplé à la fluorescéine (canal vert) ; la flèche désigne un corps granulaire marqué par l'anticorps anti-flotilline situé dans le corps cellulaire du neurone. 8 : anticorps anti-cathepsine D (marqueur des lysosomes) ; révélation par un anticorps anti-immunoglobuline de lapin couplé à la carbocyanine 3 (canal rouge) ; les deux flèches pointent sur des lysosomes marqués. 9 : superposition des 2 images ; colocalisation des immunoréactivités flotilline-1 et cathepsine D, indiquant la présence de flotilline-1 dans les lysosomes.

Barre = 10 μ m.

précisée par les doubles localisations en microscopie confocale. L'immunohistochimie de la cathepsine D, un marqueur des lysosomes, était fortement positive dans les granulations. Parmi les nombreuses hypothèses qui pourraient être formulées pour tenter d'expliquer l'accumulation de flotilline-1 dans des compartiments lysosomaux, l'une des plus plausibles nous paraît être la suivante : l'excès de protéine tau dans le corps cellulaire du neurone s'associe à une diminution importante de tubuline polymérisée (Hempen et Brion, 1996). Des arguments récents montrent que c'est sur les neurotubules que se déplace la kinésine I qui sert de moteur moléculaire aux rafts. La désorganisation du réseau neurotubulaire pourrait donc provoquer la mauvaise circulation des rafts et donc l'accumulation de leurs marqueurs (comme la flotilline-1). Cependant, on ne peut pas exclure qu'un mécanisme différent, indépendant de l'accumulation de protéine tau, puisse être en œuvre dans la mise en place et la circulation des rafts puisque 24 % des neurones contenant des granulations flotilline-1 positives ne contenaient pas de DNF.

En conclusion, les microdomaines lipidiques rafts jouent probablement un rôle dans la maladie d'Alzheimer, dont l'importance reste à déterminer. Nous avons débuté l'étude du contenu protéique et lipidique de la fraction triton insoluble chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer et l'analyse d'autres marqueurs de rafts (gangliosides). L'apport des souris transgéniques dans cette étude se révélera indispensable : nous comptons avoir recours à des souris transgéniques (APPxPS1) et tau.

Remerciements. – Les travaux de N. Girardot sont financés par l'association France Alzheimer. Nous remercions Laurent Pradier (Aventis Pharma) de sa collaboration. Merci à Anne Lombes et N. Gonatas de nous avoir donné des anticorps anti-COX2 (AL) et anti-Golgi (NG).

Merci aux techniciennes du laboratoire notamment B. Verneau et A. Matos pour la réalisation des techniques d'immunohistochimie.

BIBLIOGRAPHIE

- Bickel P., Scherer P., Schnitzer J., Phil O., Lisanti M. & Lodish H. Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 13793-13802.
- Bouillot C., Prochiantz A., Rougon G. & Allinquant B. Axonal amyloid precursor protein expressed by neurons *in vitro* is present in a membrane fraction with caveolae-like properties. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 7640-7644.
- Brion J.P., Passareiro H., Nunez J. & Flament-Durand J. Mise en évidence immunologique de la protéine tau au niveau des lésions de dégénérescence neurofibrillaire de la maladie d'Alzheimer. *Arch. Biol. (Brux)*, 1985, 95, 229-235.
- Cameron P., Ruffin J., Bollag R., Rasmussen H. & Cameron R.S. Identification of caveolin and caveolin-related proteins in the brain. *J. Neurosci.*, 1997, 17, 9520-9535.
- Campion D., Brice A., Dumanchin C., Puel M., Baulac M., De la Sayette V., Hannequin D., Duyckaerts C., Michon A., Martin C., Moreau V., Penet C., Martinez M., Clerget-Darpoux F., Agid Y. & Frebourg T. A novel presenilin 1 mutation resulting in familial Alzheimer's disease with an onset age of 29 years. *Neuroreport*, 1996, 7, 1582-1584.
- Caporaso G.L., Takei K., Gandy S.E., Matteoli M., Mundigl O., Greengard P. & De Camilli P. Morphologic and biochemical analysis of the intracellular trafficking of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein. *J. Neurosci.*, 1994, 14, 3122-3138.
- Citron M., Teplow D.B. & Selkoe D.J. Generation of amyloid beta protein from its precursor is sequence specific. *Neuron*, 1995, 14, 661-670.
- Corder E.H., Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D.E., Gaskell P.C., Small G.W., Roses A.D., Haines J.L. & Pericak-Vance M.A. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 1993, 261, 921-923.
- Crisby M., Carlson L.A. & Winblad B. Statins in the prevention and treatment of Alzheimer disease. *J. Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, 2002, 16, 131-136.
- Delatour B., Mercken L., El Hachimi K.H., Colle M.A., Pradier L. & Duyckaerts C. FE65 in Alzheimer's disease : neuronal distribution and association with neurofibrillary tangles. *Am. J. Pathol.*, 2001, 158, 1585-1591.
- Dickson D.W. The pathogenesis of senile plaques. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1997, 56, 321-339.
- Ehehalt R., Keller P., Haass C., Thiele C. & Simons K. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J. Cell Biol.*, 2003, 160, 113-123.
- Fantini J., Garmy N., Mafhoud R. & Yahi N. Lipid rafts : structure, function and role in HIV, Alzheimer's and prion diseases. *Expert Rev. Mol. Med.*, 2002, ,
- Fassbender K., Simons M., Bergmann C., Stroick M., Lutjohann D., Keller P., Runz H., Kuhl S., Bertsch T., von Bergmann K., Hennerici M., Beyreuther K. & Hartmann T. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta-amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, 98, 5856-5861.
- Flament S., Delacourte A., Hemon B. & Defossez A. Démonstration directe d'une phosphorylation anormale des protéines microtubulaires tau au cours de la maladie d'Alzheimer. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 1989, 208, 77-82.
- Ghadially F.N. Ultrastructural pathology of the cell and matrix. A text and atlas of physiological and pathological alterations in the fine structure of cellular and extracellular components. Sous la direction de London : Butterworths, 1988 pp. 1138-1139.
- Girardot N., Allinquant B., Langui D., El Hachimi K.H., Dubois B., Hauw J.-J. & Duyckaerts C. Accumulation of flotillin-1 in tangle-bearing neurones of Alzheimer's disease. *J. Neuro-path Appl Neurobiol*, 2003 (sous presse).
- Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Tung Y.C., Quinlan M., Wisniewski H.M. & Binder L.I. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 4913-4917.
- Hauw J.-J., Duyckaerts C. & Delaère P. Alzheimer's disease. In : *The pathology of the aging human nervous system*. Sous la direction de S. Duckett. Baltimore : Lea & Fibiger, 1991 pp. 113-147.
- Hempen B. & Brion J.P. Reduction of acetylated alpha-tubulin immunoreactivity in neurofibrillary tangle-bearing neurons in Alzheimer's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1996, 55, 964-972.
- Kalmijn S., Launer L., Ott A., Witteman J., Hofman A. & Breterler M. Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. *Ann. Neurol.*, 1997, 42, 776-82.
- Kamal A., Almenar-Queralt A., LeBlanc J.F., Roberts E.A. & Goldstein L.S. Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature*, 2001, 414, 643-648.

- Kamal A., Stokin G.B., Yang Z., Xia C.H. & Goldstein L.S. Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. *Neuron*, 2000, 28, 449-459.
- Kang J., Lemaire H.-G., Unterbeck A., Salbaum J.M., Masters C.L., Grzeschik K.H., Multhaup G., Beyreuther K. & Muller-Hill B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, 1987, 325, 733-736.
- Kokubo H., Lemere A. & Yamaguchi H. Localization of flotillins in human brain and their accumulation with the progression of Alzheimer's disease pathology. *Neurosci. Lett.*, 2000, 290, 93-96.
- Koo E.H., Sisodia S.S., Archer D.R., Martin L.J., Weidemann A., Beyreuther K., Fischer P., Masters C.L. & Price D.L. Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1990, 87, 1561-1565.
- Leroy A., Vu-dac N., Koffigan M., Clavey V. & Fruchart J.C. Characterization of a monoclonal antibody that binds to apolipoprotein E and to lipoprotein of human plasma containing apoE. Applications to ELISA quantification of plasma apoE. *J. Immunoassay*, 1988, 9, 309-334.
- Mori T., Paris D., Town T., Rojiani A.M., Sparks D.L., Delle-donne A., Crawford F., Abdullah L.I., Humphrey J.A., Dickson D.W. & Mullan M.J. Cholesterol accumulates in senile plaques of Alzheimer disease patients and in transgenic APP(SW) mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 2001, 60, 778-785.
- Pralle A., Keller P., Florin E., Simons K. & Horber J. Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J. Cell. Biol.*, 2000, 148, 997-1008.
- Refolo L.M., Malester B., LaFrancois J., Bryant-Thomas T., Wang R., Tint G., Sambamurti K., Duff K. & Pappolla M. Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol. Dis.*, 2000, 7, 321-331.
- Runz H., Rietdorf J., Tomic I., de Bernard M., Beyreuther K., Pepperkok R. & Hartmann T. Inhibition of intracellular cholesterol transport alters presenilin localization and amyloid precursor protein processing in neuronal cells. *J. Neurosci.*, 2002, 22, 1679-1689.
- Schlegel A., Volonte D., Engelman J.A., Galbiati F., Mehta P., Zhang X.L., Scherer P.E. & Lisanti M.P. Crowded little caves : structure and function of caveolae. *Cell. Signal.*, 1998, 10, 457-463.
- Schnell S.A., Staines W.A. & Wessendorf M.W. Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. *J. Histochem. Cytochem.*, 1999, 47, 719-730.
- Simons M., Ikonen E., Tienari P.J., Cid-Arregui A., Monning U., Beyreuther K. & Dotti C.G. Intracellular routing of human amyloid protein precursor : axonal delivery followed by transport to the dendrites. *J. Neurosci. Res.*, 1995, 41, 121-128.
- Singer S.J. & Nicolson G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 1972, 175, 720-731.
- Tascos N., Mourelatos Z. & Gonatas N. On the significance and reproducibility of the fragmentation of the Golgi apparatus of motor neurons in human spinal cords. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1995, 54, 331-338.
- Uchihara T., Duyckaerts C., He Y., Kobayashi K., Seilhan D., Amouyel P. & Hauw J.J. ApoE immunoreactivity and microglial cells in Alzheimer's disease brain. *Neurosci. Lett.*, 1995, 195, 5-8.
- Wahrle S., Das P., Nyborg A.C., McLendon C., Shoji M., Kawarabayashi T., Younkin L.H., Younkin S.G. & Golde T.E. Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiol. Dis.*, 2002, 9, 11-23.
- Yamada E. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1955, 1, 445-458.