

d'Alzheimer

Le cerveau humain enregistre une grande variété d'expériences sensorielles, traite et stocke ces informations, puis les rappelle au bon moment : un ordinateur organique en somme ! Aussi, la maladie d'Alzheimer a été comparée à l'effacement d'un disque dur, commençant par les fichiers les plus récents et remontant dans le temps. Un signe précoce de la maladie est souvent l'oubli d'événements récents, telle une conversation téléphonique, la visite d'un réparateur, alors que le rappel de souvenirs plus anciens reste intact. La maladie progressant, ce sont cependant les mémoires tant à long terme qu'à court terme qui disparaissent progressivement, jusqu'à ce que la personne atteinte ne reconnaisse plus ses proches. La crainte devant la maladie d'Alzheimer n'est pas tant l'anticipation de douleurs et de souffrances physiques, mais la perte inexorable des souvenirs de toute une vie, qui constituent l'identité même d'une personne.

La comparaison avec l'ordinateur s'arrête là : on ne peut pas réinitialiser le cerveau humain et recharger les fichiers et les programmes. La maladie d'Alzheimer n'efface pas seulement les informations, elle détruit le support physique qui les stockait, le cerveau, constitué de 100 milliards de neurones reliés entre eux par 1 000 fois plus de connexions. La plupart des médicaments actuels contre la maladie d'Alzheimer sont fondés sur le fait qu'un grand nombre des neurones perdus libère de l'acétylcholine : ces médicaments bloquent une enzyme, l'acétylcholinestérase, responsable de la dégradation de ce neurotransmetteur, et en augmentent ainsi la durée de vie. Il en résulte une stimulation des neurones et une pensée plus claire, mais ces médicaments deviennent inefficaces après 6 à 12 mois, car ils ne préviennent pas la destruction des neurones. La mémorisation ralentirait le déclin cognitif de certains malades en diminuant l'activité excessive d'un autre neurotransmetteur, le glutamate, mais on ignore encore si les effets du médicament durent plus d'un an.

Au début des années 1990, les perspectives de vaincre la maladie d'Alzheimer n'incitaient guère à l'optimisme. On en savait peu sur la biologie de la maladie et l'on pensait ses causes et son traitement désespérément complexes. Toutefois, ces dernières années, des progrès notables ont été accomplis dans la compréhension des événements moléculaires sous-jacents à la maladie. La plupart de ces avancées ont conduit à diverses stratégies dont on espère qu'elles ralentiront (voire supprimeront) ces mécanismes destructeurs.

1. La maladie d'Alzheimer détruit le « disque dur » du cerveau : les mémoires à court et à long termes s'effacent irrémédiablement.

Les deux caractéristiques principales de la maladie, identifiées pour la première fois par le neurologue allemand Aloïs Alzheimer au début du XX^e siècle, sont des plaques et des amas de protéines dans le cortex cérébral et les régions du mésencéphale, qui sont le siège des fonctions cognitives supérieures. Les plaques sont des dépôts situés à l'extérieur des neurones et constitués essentiellement d'une petite protéine nommée bêta-amyloïde. Quant aux amas, dits neurofibrillaires, ils sont présents dans les ramifications (les axones et les dendrites) des neurones : ils sont composés de filaments d'une protéine nommée tau. Ces dépôts ont longtemps été au cœur d'un débat : les plaques et les amas neurofibrillaires sont-ils la cause ou la conséquence de la dégénérescence des neurones ? Sont-ils de simples marqueurs des régions où la mort cérébrale s'est déjà produite ? Divers résultats obtenus depuis une dizaine d'années font pencher la balance en faveur de l'hypothèse de la cascade amyloïde, selon laquelle les deux protéines, bêta-amyloïde et tau, participent au déclenchement de la maladie d'Alzheimer, la protéine bêta-amyloïde étant la première à entrer en scène dans la chronologie de la maladie.

L'hypothèse de la protéine amyloïde

La protéine bêta-amyloïde est un petit peptide, isolé et caractérisé pour la première fois en 1984 par George Glenner et Cai'ne Wong, de l'Université de Californie, à San Diego. Ce peptide dérive d'une protéine plus grande, la protéine précurseur de la protéine bêta-amyloïde, enrobée dans la membrane (voir la figure 2). Deux protéases (des enzymes qui coupent les protéines), la bêta-sécrétase et la gamma-sécrétase, excisent la protéine bêta-amyloïde de la protéine précurseur, un processus qui se déroule normalement dans presque toutes les cellules du corps. On ignore pourquoi les cellules fabriquent la protéine bêta-amyloïde, mais des indices révèlent que le processus ferait partie d'une voie de signalisation. La maladie d'Alzheimer surviendrait quand la protéine bêta-amyloïde est produite en trop grande quantité ou bien sous la forme d'un peptide particulièrement prompt à s'agréger.

Une partie de la région bêta-amyloïde de la protéine précurseur est dans la membrane cellulaire. Les membranes étant constituées de lipides hydrophobes, les régions des protéines qui traversent les membranes contiennent souvent des acides aminés hydrophobes. Lorsque la protéine bêta-amyloïde est détachée de la protéine précurseur par les sécrétases et libérée dans le milieu aqueux extérieur, les régions hydrophobes des différentes molécules s'associent et conduisent à la formation de petits assemblages solubles, ceux-ci se réunissant ensuite en filaments insolubles.

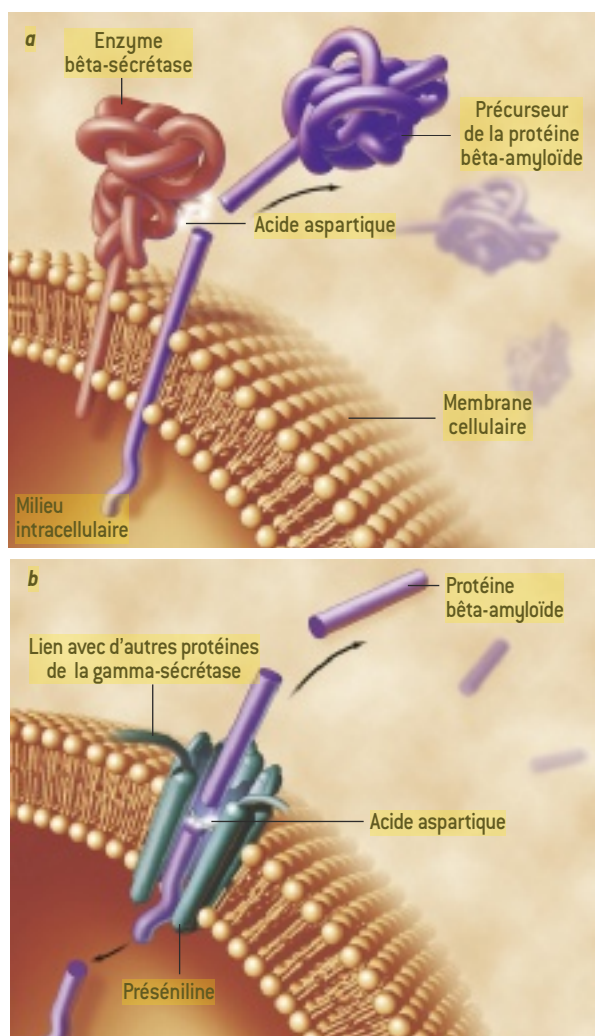
Au début des années 1990, on a montré qu'à des concentrations suffisamment élevées, les molécules de protéine bêta-amyloïde se réunissent, *in vitro*, en structures fibreuses semblables à celles trouvées dans les plaques caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. Les assemblages solubles, ainsi que les fibres de protéine bêta-amyloïde sont toxiques

pour les neurones, du moins en culture, et les premiers interfèrent avec l'apprentissage et la mémoire chez les souris.

Ces résultats ont étayé l'hypothèse de la cascade amyloïde, mais l'indice le plus fort a été fourni par des études menées chez des familles où le risque de la maladie d'Alzheimer est accru. Des membres de ces familles sont porteurs de mutations génétiques rares qui les prédisent à la maladie à un âge relativement jeune, le plus souvent avant 60 ans. En 1991, on a découvert que de telles mutations sont situées sur le gène de la protéine précurseur de la protéine bêta-amyloïde, en particulier dans les régions qui codent la protéine bêta-amyloïde mature, et à proximité. Ces mutations augmentent la production soit de la protéine bêta-amyloïde normale, soit du variant qui forme facilement des dépôts. En outre, les trisomiques (leurs cellules sont dotées de trois exemplaires du chromosome 21 au lieu de deux) contractent inévitablement la maladie d'Alzheimer s'ils vivent jusqu'à 50 ans. Le chromosome 21 contenant le gène de la protéine précurseur de la protéine bêta-amyloïde, les trisomiques fabriquent plus de protéine bêta-amyloïde dès la naissance et l'on peut trouver des dépôts amyloïdes dans leur cerveau dès l'âge de 12 ans.

D'autres liens entre la maladie d'Alzheimer et les gènes qui participent à la production de la protéine bêta-amyloïde ont été mis au jour. En 1995, Peter St George-Hyslop et ses collègues de l'Université de Toronto ont identifié des mutations dans deux gènes, *Préséniline 1* et 2, responsables de formes précoces et fulgurantes de la maladie d'Alzheimer : elle apparaît le plus souvent vers la trentaine ou la quarantaine. D'autres études ont montré que ces mutations augmentent la quantité de la protéine bêta-amyloïde qui s'assemble en amas. Nous savons aujourd'hui que les protéines codées par les gènes *Préséniline* sont intégrées dans l'enzyme gamma-sécrétase.

Ainsi, parmi les trois gènes dont les mutations favorisent la maladie d'Alzheimer à un âge précoce, l'un code le précurseur de la protéine bêta-amyloïde et les deux autres des composants d'une enzyme qui contribue à la fabrication du peptide nocif. De plus, les porteurs d'un certain variant du gène codant l'apolipoprotéine E (une protéine qui favorise les assemblages de protéines bêta-amyloïde) ont un risque élevé d'être atteints de la maladie d'Alzheimer. Divers facteurs génétiques jouent probablement un rôle dans l'apparition de la maladie, chacun y contribuant pour une petite part, et des études menées chez la souris montrent que des facteurs environnementaux, tel l'exercice, peuvent aussi modifier la sensibilité des individus.

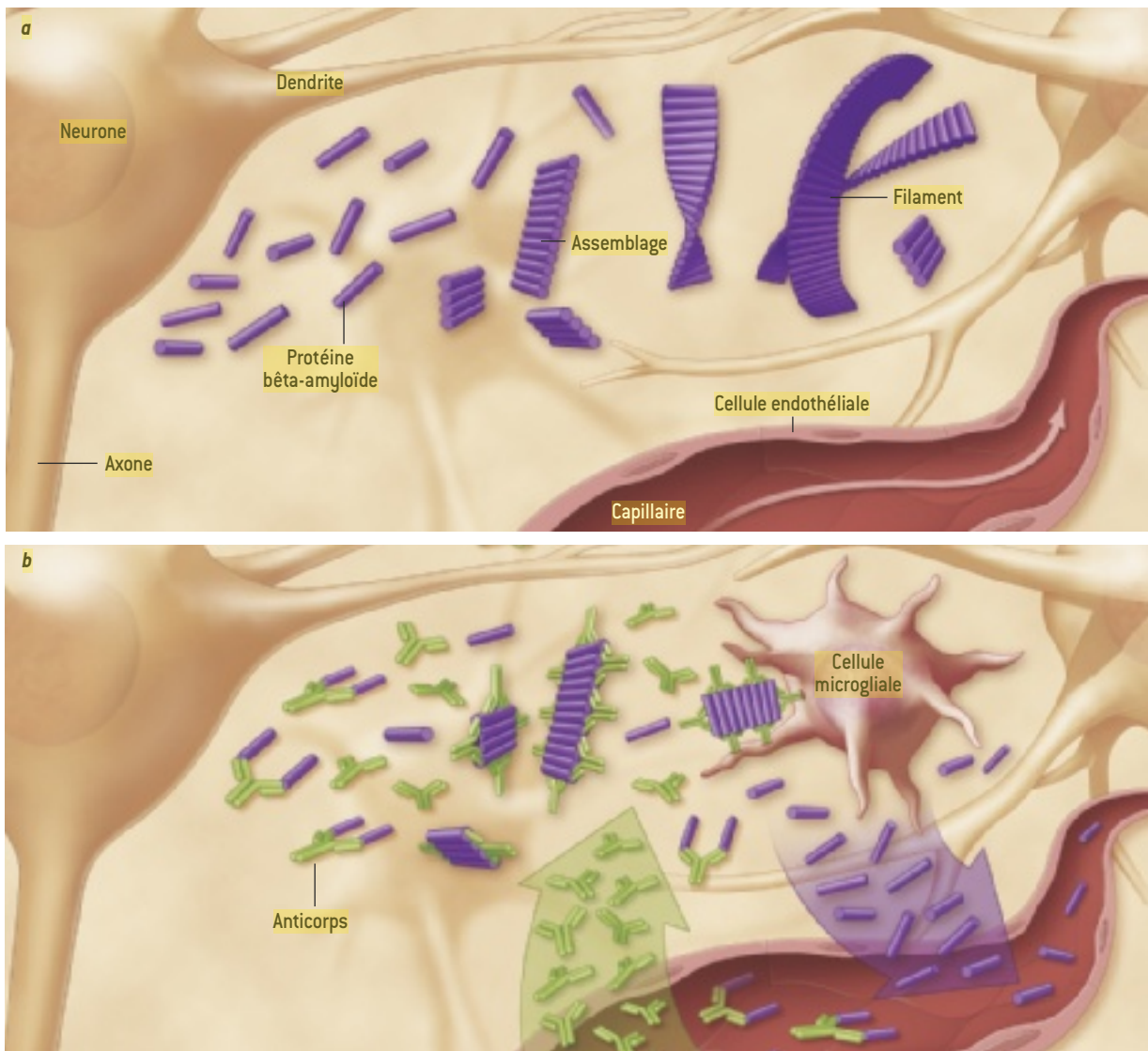


Sauf mention contraire, toutes les illustrations sont de Tami Tojima

2. La cascade amyloïde est une hypothèse selon laquelle la maladie d'Alzheimer commence par la production excessive de protéine bêta-amyloïde (ou d'un variant qui s'agrège facilement) à partir de son précurseur (*en violet*) enchâssé dans la membrane. Lors de la première étape (*a*), une enzyme, nommée bêta-sécrétase (*en marron*), coupe la protéine précurseur de la protéine bêta-amyloïde à l'extérieur de la membrane, à l'aide de deux molécules d'acide aspartique. Ensuite, la protéine préséniline (*en vert*), un élément de la gamma-sécrétase, coupe le « moignon restant » à l'intérieur de la membrane, libérant ainsi la protéine bêta-amyloïde (*b*). Là encore, cette opération s'effectue grâce à deux molécules d'acide aspartique.

Les premiers ciseaux moléculaires

On ignore encore comment les assemblages solubles et les filaments insolubles de protéines bêta-amyloïde perturbent les neurones et les détruisent. Néanmoins, des indices montrent que les agrégats de protéines bêta-amyloïde en dehors des neurones déclencheraient une cascade d'événements conduisant notamment à l'altération des protéines tau à l'intérieur des cellules. Les agrégats de protéines bêta-amyloïde modifieraient l'activité d'enzymes, des kinases, qui ajoutent

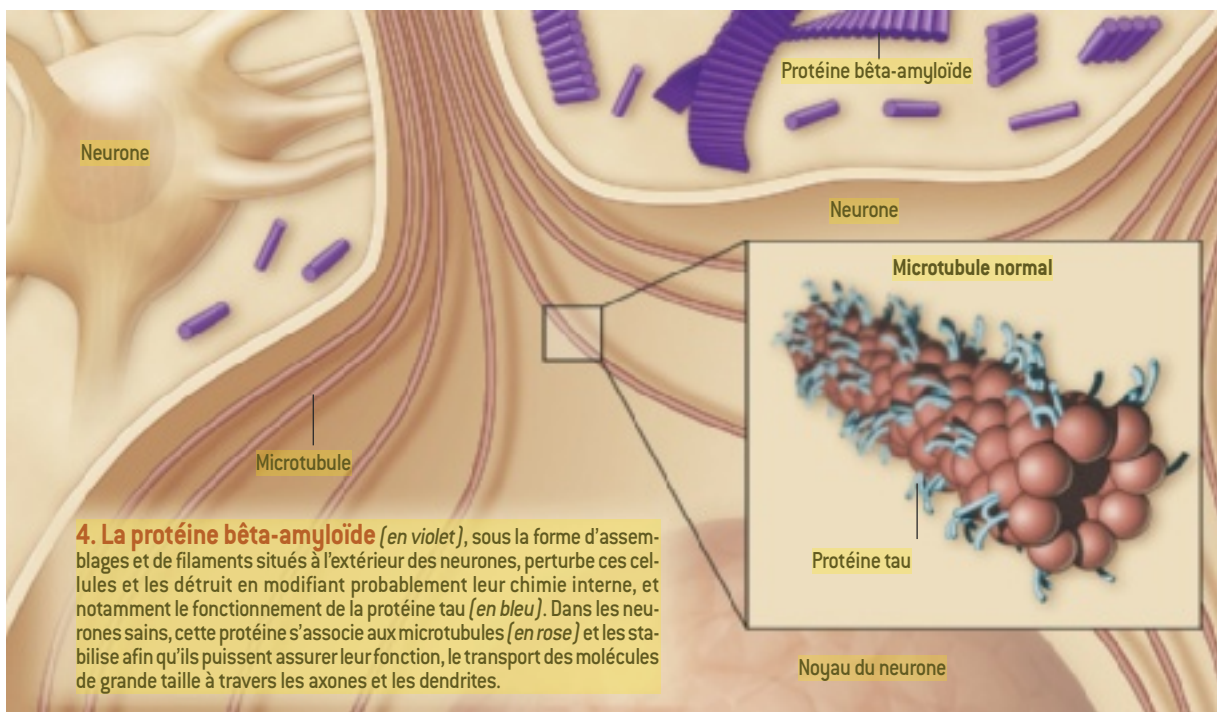


3. La protéine bêta-amyloïde (en violet) libérée dans le milieu extracellulaire constitue progressivement des assemblages solubles, puis de longs filaments insolubles [a] qui détruisent les neurones. Un traitement possible de la maladie d'Alzheimer serait une molécule qui ralentit, voire empêche, l'agrégation de la protéine bêta-amyloïde. Une approche prometteuse [b] consiste à introduire des anticorps (en vert) reconnaissant la protéine bêta-amyloïde. Ces anticorps, une fois dans

le cerveau [flèche verte], stimuleraient les cellules immunitaires du système nerveux central, les cellules de la microglie, à attaquer les agrégats de protéine bêta-amyloïde. Les anticorps n'ont peut-être pas besoin de pénétrer dans le cerveau : l'élimination de la protéine bêta-amyloïde dans le reste du corps [ici dans un vaisseau sanguin] obligerait le peptide à diffuser [flèche violette] des régions où il est abondant, le cerveau, vers celles où il est plus rare, car détruit.

des groupes phosphate aux protéines. Ici, les kinases ajouteraient trop de groupes phosphate aux protéines tau, altérant leurs propriétés chimiques : elles s'organiseraient en filaments torsadés, les amas neurofibrillaires. Les protéines tau modifiées détruisent les neurones, peut-être parce qu'elles ne remplissent plus leur rôle consistant à stabiliser les microtubules (voir la figure 4) qui transportent des protéines et d'autres molécules de grande taille à travers les axones et les dendrites. Des mutations dans le gène tau lui-même entraînent également la formation d'amas de protéines tau, source d'autres types de maladies dégénératives, différentes de la maladie d'Alzheimer (il n'y a pas de plaques amyloïdes). Ainsi, la formation d'amas neurofibrillaires de protéines tau serait un événement plus général conduisant à la mort des neurones, alors que la protéine bêta-amyloïde serait le déclencheur spécifique de la maladie d'Alzheimer.

Compte tenu du rôle essentiel de la protéine bêta-amyloïde dans le processus de la maladie, les protéases qui fabriquent ce peptide sont des cibles privilégiées pour d'éventuels médicaments. En outre, les inhibiteurs de protéases sont efficaces pour traiter d'autres maladies, telles que le SIDA et l'hypertension. La première étape de la formation de la protéine bêta-amyloïde est effectuée par la bêta-sécrétase, une protéase qui coupe la partie globuleuse de la protéine précurseur, juste à l'extérieur de la membrane. En 1999, cinq groupes différents ont découvert indépendamment cette enzyme, qui est particulièrement abondante dans les neurones du cerveau. Bien que la bêta-sécrétase soit insérée dans la membrane, elle ressemble beaucoup à plusieurs protéases trouvées, à l'état soluble, dans les milieux intra- et extracellulaires, dont celle nécessaire à la réplication du VIH. Ces enzymes sont des aspartylprotéases, c'est-à-dire qu'elles



utilisent de l'acide aspartique, un acide aminé, pour couper les protéines. Toutes les protéases utilisent de l'eau pour couper leurs protéines cibles et les aspartylprotéases mettent en jeu deux molécules d'acide aspartique pour activer une molécule d'eau et effectuer l'hydrolyse.

La bêta-sécrétase appartenant à cette famille, les biologistes ont exploité les nombreuses connaissances relatives à ces protéases afin d'en comprendre les mécanismes détaillés et la façon dont on peut les bloquer. Les cristallographes ont élucidé la structure tridimensionnelle de la bêta-sécrétase qui a été utilisée comme guide pour la conception informatisée d'inhibiteurs. Des études révèlent que le blocage de l'activité de l'enzyme n'aura pas d'effets secondaires nocifs : l'élimination du gène codant la bêta-sécrétase chez la souris supprime la formation de la protéine bêta-amyloïde dans le cerveau des rongeurs sans entraîner de conséquences négatives apparentes. Toutefois, les inhibiteurs de la bêta-sécrétase ne sont pas encore prêts pour les essais cliniques.

Le principal défi à relever est la conception de molécules efficaces suffisamment petites pour franchir la barrière hémato-encéphalique et pénétrer dans le cerveau. En effet, à l'inverse des vaisseaux sanguins des autres parties de l'organisme, les capillaires du cerveau sont tapissés de cellules endothéliales serrées. En l'absence d'espaces entre ces cellules, les inhibiteurs de la protéase doivent traverser les cellules pour atteindre les tissus cérébraux, ce dont la plupart des molécules de grande taille sont incapables.

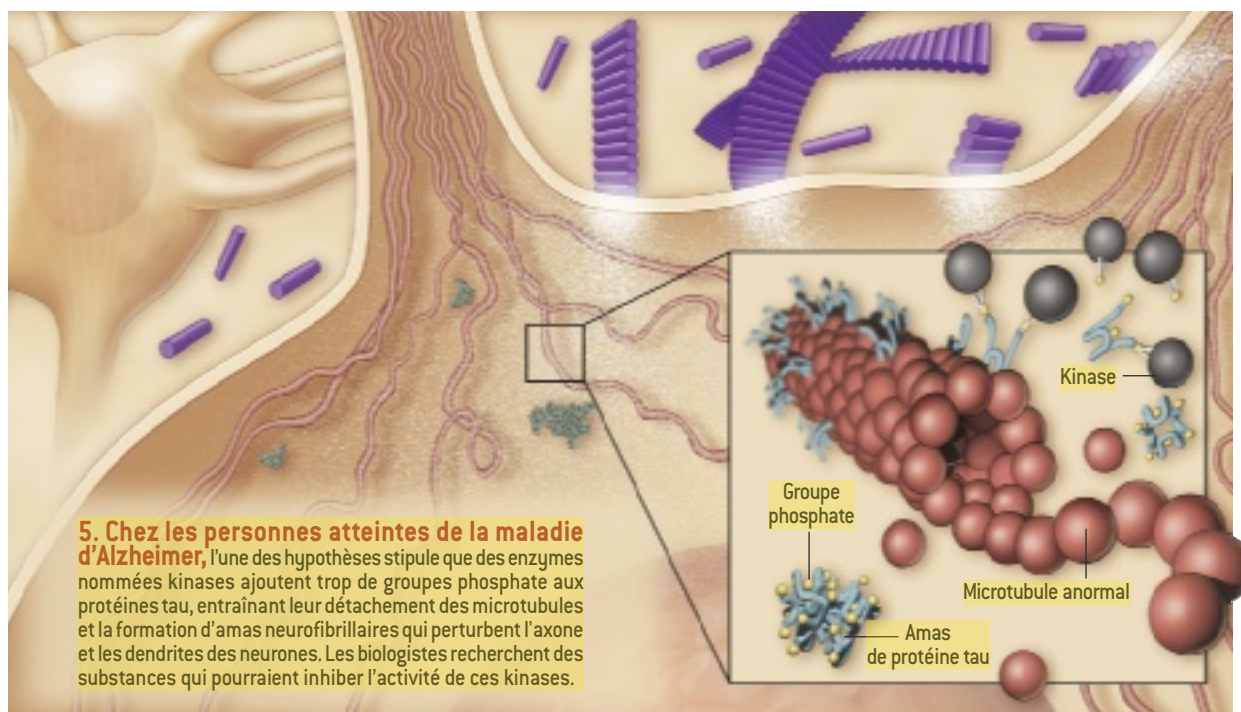
La gamma-sécrétase est l'enzyme qui accomplit la seconde étape de la formation de la protéine bêta-amyloïde : elle coupe le « moignon » de la protéine précurseur après le clivage par la bêta-sécrétase. La gamma-sécrétase effectue cette opération en utilisant de l'eau bien qu'elle soit dans un environnement normalement hydrophobe, la membrane cellulaire. Deux indices importants ont été essentiels pour

comprendre cette protéase. D'abord, l'élimination des gènes *Préséniline* chez la souris supprime le découpage de la protéine précurseur de la protéine bêta-amyloïde par la gamma-sécrétase, confirmant que la protéine codée par ces gènes est indispensable au fonctionnement de l'enzyme. Ensuite, nous avons montré que des composés apparentés aux inhibiteurs classiques des aspartylprotéases pouvaient bloquer le découpage de la protéine précurseur par la gamma-sécrétase dans les cellules. La gamma-sécrétase, comme la bêta-sécrétase, a donc aussi recours à une paire de molécules d'acide aspartique pour accomplir sa fonction.

Seconds ciseaux moléculaires

Nous avons proposé que la préséniline soit une aspartylprotéase inhabituelle insérée dans la membrane cellulaire. Peu après, nous avons identifié deux acides aspartiques dans la préséniline dont nous avons montré qu'ils sont tous deux indispensables au clivage par la gamma-sécrétase aboutissant à la protéine bêta-amyloïde. Ensuite, nous-mêmes et d'autres équipes avons mis en évidence que les inhibiteurs de la gamma-sécrétase s'associent à la préséniline et que trois autres protéines insérées dans la membrane sont recrutées par la préséniline pour qu'elle puisse exercer son action catalytique. Aujourd'hui, la gamma-sécrétase est reconnue comme le prototype d'une nouvelle classe de protéases, qui utiliseraient de l'eau à l'intérieur des membranes cellulaires pour remplir leur rôle. Enfin, les inhibiteurs de la gamma-sécrétase sont des molécules plutôt petites qui traversent les membranes : elles ne sont pas retenues par la barrière hémato-encéphalique.

Le blocage des enzymes qui fabriquent la protéine amyloïde est une piste que nous explorons pour mettre au point de nouveaux médicaments contre la maladie d'Alzheimer.



Cependant, que se passera-t-il si ces enzymes jouent un rôle normal essentiel ? Le problème est réel : les possibilités que la gamma-sécrétase offre en tant que cible thérapeutique sont tempérées par le fait que cette enzyme joue un rôle crucial dans la différenciation cellulaire, par exemple, celle des cellules souches de la moelle osseuse en plaquettes sanguines et en lymphocytes. La gamma-sécrétase coupe spécifiquement une protéine de surface, le récepteur Notch, dont la partie détachée de la membrane et libérée à l'intérieur de la cellule envoie un signal au noyau qui contrôle le destin de la cellule. Des doses élevées d'inhibiteurs de la gamma-sécrétase ont des effets toxiques chez la souris, dus à la perturbation du signal Notch. Néanmoins, un médicament candidat développé par la Société Eli Lilly a passé les tests de sécurité chez des volontaires sains. Le composé est désormais prêt pour les essais cliniques de phase II, chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer. En outre, des biologistes ont identifié des molécules qui contrôlent la gamma-sécrétase de façon à bloquer la production de la protéine bêta-amyloïde sans perturber le clivage de Notch. Ces molécules n'interagissent pas avec les molécules d'acide aspartique de la gamma-sécrétase, mais se lient à un autre endroit de l'enzyme et modifient sa forme.

D'autres inhibiteurs diminuent la fabrication de la version de la protéine bêta-amyloïde qui s'agrège facilement, et seul un peptide plus court et moins toxique est libéré. L'un de ces médicaments, le flurizan, s'est révélé prometteur chez des patients au premier stade de la maladie d'Alzheimer et est aujourd'hui en phase III d'essais cliniques qui incluront au total plus de 1000 personnes.

Une autre stratégie pour combattre la maladie d'Alzheimer consiste à débarrasser le cerveau des assemblages toxiques de la protéine bêta-amyloïde. L'une des méthodes est l'immunisation active, où le propre système immuni-

taire du malade est sollicité pour attaquer la protéine bêta-amyloïde. En 1999, Dale Schenk et ses collègues de la Société *Elan Pharmaceuticals* montrèrent que l'injection de protéine bêta-amyloïde dans la circulation sanguine de souris génétiquement modifiées pour développer des plaques amyloïdes déclenche une réaction immunitaire empêchant les plaques de se former dans le cerveau de jeunes souris, et élimine les plaques déjà présentes chez des souris plus âgées. Les souris produisent des anticorps qui reconnaissent la protéine bêta-amyloïde et stimulent les cellules immunitaires du cerveau, les cellules de la microglie, lesquelles attaquent les agrégats de peptide (voir la figure 3). Ces résultats obtenus chez la souris ont conduit à des essais chez l'être humain.

Supprimer les plaques amyloïdes

Malheureusement, bien que l'injection de protéine bêta-amyloïde ait passé les tests de sécurité, plusieurs malades à un stade plus avancé ont développé lors des essais de phase II une encéphalite (une inflammation du cerveau) entraînant un arrêt prématuré de l'étude en 2002. Des travaux complémentaires ont indiqué que le traitement pourrait avoir causé l'inflammation en incitant les lymphocytes T à attaquer la protéine bêta-amyloïde dans les vaisseaux sanguins du cerveau. Néanmoins, de nombreux malades produisent des anticorps contre la protéine bêta-amyloïde et, lorsque c'est le cas, leur mémoire, leur attention et leur concentration s'améliorent.

Les inquiétudes relatives à l'immunisation active ont amené certains biologistes à se tourner vers l'immunisation passive, qui vise à éliminer le peptide en injectant aux malades des anticorps produits par des cellules hybrides