

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier l'Université Paris 13 et l'Ecole doctorale Galilée pour m'avoir octroyé le Contrat Doctoral, supplémenté de la mission d'enseignement, ce qui m'a permis de réaliser mes travaux de recherche, mais également de me perfectionner en pédagogie et communication scientifique.

Ce travail de recherche a été réalisé dans l'équipe Spectroscopies des Biomolécules et des Milieux Biologiques (SBMB), du laboratoire Chimie, Structures, Propriétés des Biomatériaux et des Agents Thérapeutiques (CSPBAT), dont la direction est assurée par le Professeur Véronique Migonney, je la remercie pour son accueil au sein du laboratoire.

Je remercie tout particulièrement le Docteur Milena Salerno qui a assuré la direction scientifique de ma thèse. Sous sa direction, j'ai beaucoup appris tant au niveau professionnel que personnel.

Je remercie également, pour leur collaboration professionnelle ainsi que leur aide précieuse, le Professeur Heloisa Beraldo, le Docteur Pierre Dorlet, le Professeur Arlette Garnier-Suillerot et madame Nicole Lièvre.

J'adresse mes remerciements et ma reconnaissance à tous les membres de l'Ecole Doctorale Galilée, toujours en poste ou non, tout particulièrement à son directeur, monsieur Vincent Lorent.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude aux membres du jury, présidé par le Professeur Florence Le Moyec, et les remercie très sincèrement de l'intérêt qu'ils ont montré pour cette thèse ainsi que pour leur disponibilité.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe SBMB (les Professeurs Edith Hantz, et Philippe Savarin, les Docteurs Nadia Bouchemal, Mohamed Triba, Carole Marbeuf-Gueye, et Rolland Amathieu) pour leur aide et leur amitié au quotidien, avec une pensée toute particulière pour Nadia et Mohammed.

Que tous les doctorants ou étudiants qui, d'une manière ou d'une autre, m'ont accompagné dans mon travail ou dans ma vie dans le laboratoire trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance, tout particulièrement Souad Kachbi, Caroline de Montferrand, Soucounda Lessim, Ivan Bello, Nicolas Guillot, Emilie Duvallet, Hayette Menif et Johanne Seguin.

Abréviations

A β	Peptide β -amyloïde
ADN	Acide désoxyribonucléique
AICD	Domaine intracellulaire de l'APP
ApoE	Protéine Apolipoprotéine E
APP	Amyloid precursor protein ou protéine précurseur de l'amyloïde
APPs	Fragment sécrété de l'APP
ATP	Adénosine triphosphate
ATP7A ou B	ATPase de type A ou B
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CTF	Fragment C-terminal de l'APP
Ctrl	Transporteur de cuivre de type 1
[Cu(ats)]	Diacétyl-bis(thiosemicarbazone) de cuivre(II)
[Cu(atse)]	Diacétyl-bis(N(4)-éthylthiosemicarbazone) de cuivre(II)
[Cu(atsm)]	Diacétyl-bis(N(4)-méthylthiosemicarbazone) de cuivre(II)
[Cu(atsp)]	Diacétyl-bis(N(4)-phénylthiosemicarbazone) de cuivre(II)
[Cu(gts)]	Glyoxaldéhyde bis(thiosemicarbazone) de cuivre(II)
[Cu(gtse)]	Glyoxaldéhyde bis(N(4)-éthylthiosemicarbazone) de cuivre(II)
[Cu(gtsp)]	Glyoxaldéhyde bis(N(4)-phénylthiosemicarbazone) de cuivre(II)
DDSA	Dodécényl anhydride succinique
DMP30	Tris – (diméthylaminométhyl)phénol
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EBM	Endothelial Basal Medium
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
EGCg	Gallate d'épigalocatéchine
ϵ 1, 2, 3 ou 4	Allèle 1, 2, 3 ou 4 du gène <i>APOE</i>
FCCP	Carbonyl cyanide p-(trifluorométhoxy) phenylhydrazone
FDG	(¹⁸ F) 2-fluoro-2-déoxy-D-glucose
GABAA	Récepteur ionique GABA de type A
GSK-3	Glycogène synthase kinase-3
GWAS	Genome – wide association studies

hCMEC/D3	Cellules endothéliales cérébrales humaines
HEPES	[4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazine-éthane-sulfonique
IDE	Insulin degrading enzyme
IRM	Imagerie par résonance magnétique
LCR	Liquide céphalorachidien
MAP	Microtubule associated protein
MDR	Multi Drug Resistance ou résistance multi-drogue
MET	Microscopie électronique en transmission
MNA	Anhydride nadique de méthyle
NaN ₃	Azoture de sodium
NEAA	Mélange d'acides aminés non-essentiels
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
p3	Fragment N-terminal du peptide A β
PAF	Paraformaldéhyde
PBS	Tampon phosphate salin
P-gp	P-glycoprotéine
PIB	Pittsburgh compound-B
Pira	Pirarubicine
PSEN	Protéine préséniline
RCT	Randomized clinical trial
ROS	Reactive oxygen species ou espèces réactives de l'oxygène
RPE	Résonance paramagnétique électronique
SAA	Spectroscopie d'absorption électronique
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SNP	Single nucleotid polymorphism
TEP	Tomographie par émission de positons
λ_{ex}	Longueur d'onde d'excitation
λ_{em}	Longueur d'onde d'émission
$\Delta\Psi_{mit}$	Variation du potentiel de la membrane mitochondriale

Table des matières

Introduction.....	7
Chapitre I : La maladie d'Alzheimer.....	10
A- La maladie d'Alzheimer à l'échelle sociale.....	11
A-1 Historique.....	11
A-2 Impacts sociaux-économiques.....	12
A-3 Epidémiologie.....	13
B- La maladie d'Alzheimer à l'échelle de l'individu.....	13
B-1 Signes cliniques et évolution.....	14
B-2 Diagnostic.....	15
B-2-a Les bilans neuropsychologiques.....	15
B-2-b L'imagerie cérébrale.....	16
B-2-c Les marqueurs biologiques.....	18
B-3 Facteurs de risque et prévention.....	20
B-3-a Facteurs biologiques et environnementaux.....	20
B-3-b Facteurs génétiques.....	22
Les gènes impliqués dans la forme familiale.....	22
Le gène APP.....	23
Les gènes PSEN1 et PSEN2.....	24
Les gènes impliqués dans la forme tardive de la maladie d'Alzheimer.....	24
B-3-c Prévention.....	26
C-La maladie d'Alzheimer à l'échelle moléculaire.....	27
C-1 Le peptide A β	27
C-2 Toxicité du peptide A β	30
C-3 La cascade amyloïde.....	30
C-4 La protéine Tau et les dégénérescences neurofibrillaires.....	32
D- La maladie d'Alzheimer, approche thérapeutique.....	33
D-1 Les inhibiteurs des cholinestérases.....	33
D-2 Les antagonistes des récepteurs N-methyl-D-aspartate.....	34
D-3 Stratégies thérapeutiques ciblant les causes de la maladie.....	34
D-3-a Stratégies thérapeutiques ciblant la protéine Tau.....	34
D-3-b Stratégies thérapeutiques ciblant le peptide amyloïde.....	35

Diminution de la production du peptide A β , régulation des sécrétases.....	35
Inhibition de l'agrégation d'A β	37
Élimination du peptide A β	37
D-4 Stratégies thérapeutiques ciblant la dérégulation de l'homéostasie du cuivre.....	38
D-4-a Rôle du cuivre au niveau physiologique.....	39
Cuivre et cerveau.....	40
Le cuivre dans les neurones.....	40
D-4-b Le cuivre et la maladie d'Alzheimer.....	42
Le stress oxydant.....	42
Le cuivre et la protéine Tau.....	42
Le cuivre et la protéine APP.....	43
Le cuivre et le peptide A β	44
Chapitre II : Matériel et méthodes.....	47
A- Matériel.....	48
A-1 Les appareils.....	48
Le Spectromètre d'Absorption Atomique (SAA)	48
Le Spectromètre à Résonance Paramagnétique Électronique (RPE)	48
Le Spectrophotomètre d'Absorption UV – visible.....	48
Le Spectrofluorimètre.....	48
La Microscopie Electronique en Transmission (MET)	49
Le Compteur de cellules.....	49
Les Centrifugeuses.....	49
Le pH-mètre.....	49
A-2 Produits utilisés et préparation.....	49
Les complexes de cuivre.....	49
Les anthracyclines.....	52
Les produits utilisés pour la préparation des échantillons pour la microscopie électronique en transmission.....	52
Les solutions tampons.....	52
Autres produits.....	53
A-3 Les lignées cellulaires.....	54
Les lignées K562.....	54
Les cellules hCMEC/D3.....	54

Les cellules SH-SY5Y.....	55
La culture cellulaire.....	55
Test de viabilité des cellules.....	56
B- Méthodes.....	56
B-1 Transport des complexes de cuivre dans les cellules : étude par spectroscopie d'absorption atomique.....	56
B-1-a Incorporation des complexes de cuivre dans les cellules K562, K562/ADR, hCMEC/D3 et SH-SY5Y.....	56
Incorporation des complexes [Cu(gts)] et [Cu(gtse)] dans les cellules K562 sans énergie.....	57
Effet des potentiels membranaires sur l'incorporation intracellulaire des complexes.....	58
- potentiel membranaire mitochondrial et FCCP.....	58
- potentiel membranaire lysosomal et CCA.....	58
B-1-b Etude de l'efflux des complexes [Cu(gts)] et [Cu(atSm)] dans les cellules K562 et K562/ADR.....	58
B-2 Etude des complexes de cuivre par RPE.....	59
B-2-a Spectres RPE des complexes de cuivre en solution.....	59
B-2-b Spectres RPE des complexes de cuivre dans la suspension cellulaire.....	59
B-3 Spectres d'absorption électronique des complexes de cuivre.....	60
B-4 La microscopie électronique en transmission.....	60
B-5 Evaluation de la résistance de la lignée cellulaire K562/ADR.....	61
Chapitre III : Résultats.....	64
A- Caractérisation spectroscopique des complexes de cuivre.....	65
A-1 Spectres d'absorption électronique des complexes de cuivre.....	65
A-1-a Spectres d'absorption électronique des complexes de cuivre en solution dans le DMSO.....	65
A-1-b Spectres d'absorption électronique des complexes de cuivre en "solution" dans le tampon HEPES/Na ⁺	68
A-2 Spectres RPE des complexes de cuivre.....	68
A-2-a Spectres RPE des complexes de cuivre à l'état solide.....	68
A-2-b Spectres RPE des complexes de cuivre en solution dans le DMSO.....	68
A-2-c Spectres RPE des complexes de cuivre en "solution" dans le tampon HEPES/Na ⁺	70
B- Accumulation des complexes de cuivre dans différents modèles cellulaires : détermination par spectroscopie d'absorption atomique (SAA).....	74

B-1 Témoins.....	74
B-2 Accumulation des complexes de cuivre dans les cellules.....	74
B-2-a Accumulation des complexes de cuivre dans les cellules K562 et K562/ADR	74
B-2-b Etude de l'efflux des complexes [Cu(gts)] et [Cu(astm)] dans les cellules K562 et K562/ADR	78
B-2-c Accumulation des complexes [Cu(gts)] et [Cu(gtse)] dans les cellules K562 et K562/ADR, en absence de potentiel membranaire, de gradient de pH ou d'énergie.....	79
Effet de l'inhibition du potentiel membranaire mitochondrial sur l'accumulation intracellulaire des complexes de cuivre dans les cellules K562.....	79
Effet de la variation du pH intracellulaire sur l'accumulation des complexes dans les cellules K562.....	80
Effet de la déplétion en énergie des cellules K562 sur l'accumulation intracellulaire des complexes de cuivre	81
B-3 Accumulation des complexes de cuivre dans les cellules hCMEC/D3.....	81
B-4 Accumulation des complexes de cuivre dans les cellules SH-SY5Y.....	84
C- Accumulation des complexes de cuivre dans les cellules K562 : étude par RPE.....	85
D- Accumulation des complexes de cuivre dans les cellules K562 : étude par microscopie électronique en transmission.....	86
Chapitre IV : Discussion et conclusions.....	88
Chapitre V : Bibliographie.....	97

Introduction

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative évolutive et fatale. Elle représente 70% des cas de démence sénile dans le monde. Elle a été découverte il y a plus de 100 ans et pourtant, il n'existe toujours pas de traitement curatif contre cette maladie.

La maladie d'Alzheimer résulte de la rencontre de deux processus dégénératifs différents, qui se conjuguent pour provoquer la mort des cellules nerveuses.

Le premier processus, l'amyloïdogénèse, correspond au dysfonctionnement du métabolisme d'une protéine, nommée APP, dont la fonction physiologique n'est pas encore connue. Cette protéine APP étant présente dans toutes les cellules de toutes les espèces, son rôle est néanmoins présumé important. Il semblerait que dans le tissu cérébral, cette protéine soit vraisemblablement un facteur de survie neuronale. L'amyloïdogénèse induit la synthèse de peptides amyloïdes β (peptides A β) de 39 à 43 acides aminés, issus du clivage protéolytique de l'APP par des sécrétases. Ces peptides A β s'agrègent et forment des plaques amyloïdes au niveau extracellulaire.

Le deuxième processus, la dégénérescence neurofibrillaire, correspond à l'hyperphosphorylation de la protéine Tau, qui induit l'apparition de filaments pathologiques au niveau intracellulaire dans les neurones.

Ces deux processus dégénératifs, se potentialisent et provoquent la dégénérescence qui va consommer, progressivement mais inexorablement, la presque totalité des cellules nerveuses impliquées dans la mémoire et les fonctions intellectuelles supérieures. Ce sont les deux processus pathologiques majeurs mais la maladie d'Alzheimer est une maladie multifactorielle et d'autres processus semblent entrer en jeu. En effet, il semblerait que la dérégulation de l'homéostasie des métaux, et plus particulièrement celle du cuivre, soit étroitement liée à la pathogénèse de la maladie et à ses dépôts caractéristiques de peptides A β .

Néanmoins, les événements physiologiques initiateurs de ces processus pathologiques ne sont pas encore connus. Dans ce contexte, la prise en charge pharmacologique de la maladie d'Alzheimer est encore balbutiante.

Toutefois, des pistes ont été proposées. Le cuivre est étroitement lié à différents acteurs de la maladie d'Alzheimer tels que le peptide A β , une sécrétase de

la voie amyloïdogénique ou les enzymes de dégradation du peptide A β . Ces observations ont conduit à proposer la régulation de l'homéostasie du cuivre comme thérapie potentielle pour la maladie d'Alzheimer. Certains complexes du cuivre et de bis(thiosemicarbazones) ont alors été suggérés comme médicaments. Les molécules candidates pour le traitement de la maladie d'Alzheimer doivent pouvoir passer la barrière hémato-encéphalique (BHE), très peu perméable aux molécules exogènes. Grâce à leur faible poids moléculaire, leur neutralité et leur lipophilie, ces complexes peuvent diffuser librement à travers la BHE. Le mécanisme d'action proposé pour ces molécules stipule qu'une fois dans les neurones, ces complexes subissent une réduction intracellulaire, ainsi Cu²⁺ se réduit en Cu⁺, ce qui promeut la libération du cuivre de son ligand. Le cuivre libéré pourrait alors à nouveau assurer ses fonctions biologiques normales dont l'activation des enzymes de dégradation du peptide A β . Ce type de mécanisme d'action a été proposé par plusieurs équipes de recherche sans apport toutefois de preuve directe (Donnelly *et al.*, 2008; Crouch *et al.*, 2009). Dans cette thèse nous nous sommes attachés à déterminer si ce mécanisme était réellement possible dans les cellules.

Ainsi, dans un premier chapitre nous allons décrire la pathologie de la maladie d'Alzheimer et les thérapies envisagées pour lutter contre cette maladie, dont la régulation de l'homéostasie du cuivre. Le chapitre suivant décrira le matériel et les méthodes utilisés. Le troisième chapitre sera consacré à l'analyse des résultats expérimentaux. Enfin, nous discuterons nos résultats et conclurons dans un dernier chapitre.

Chapitre I

La Maladie d'Alzheimer

Chapitre I : La maladie d'Alzheimer

A- La maladie d'Alzheimer à l'échelle sociale

A-1 Historique

Le 19^{ème} siècle marque un tournant dans la compréhension des maladies neurodégénératives. Si les démences séniles étaient connues de tous et considérées comme un symptôme normal du vieillissement, la relation entre le psychique et le cerveau était inconnue et les personnes souffrant de démence ne se voyaient pas proposer de traitement. Le changement est apparu lorsque certains psychiatres se sont intéressés à l'étude histologique post-mortem des cerveaux de patients ayant souffert de démence (Holstein M. 1997). En 1906, lors d'une réunion de psychiatres allemands à Tübingen, le docteur Aloïs Alzheimer présenta le résultat de ses recherches concernant un cas de démence chez une patiente "jeune" (âgée d'une cinquantaine d'années). Il avait suivi et décrit précisément l'évolution des symptômes de cette patiente pendant quatre ans environ avant son décès. Grâce à des techniques de coloration appliquées aux coupes histologiques du cerveau de cette patiente, il a pu observer les plaques séniles (connues alors sous le nom de plaques de Fisher) associées à des lésions intracellulaires jusqu'alors inconnues, les dégénérescences neurofibrillaires. Cette démence "pré-sénile" a alors été nommée maladie d'Alzheimer, la communauté scientifique de l'époque distinguant ainsi la démence chez le patient "jeune" de celle observée chez les patients âgés (Moller et Graeber 1998). Pendant les 60 années qui ont suivi, nos connaissances sur la maladie n'ont pas vu de grande évolution jusqu'à la fin des années 60, lorsque Blessed et collaborateurs établissent le lien entre la pathologie observée par le Dr. Alzheimer chez le sujet jeune et certaines formes de démences observées communément chez le sujet âgé. Ceci marque le passage vers la définition actuelle de la maladie d'Alzheimer, c'est-à-dire une maladie neurodégénérative évolutive et fatale, communément observée chez les patients âgés de plus de 70 ans mais qui peut survenir dans de rares cas chez des personnes de moins de 60 ans. Depuis, l'évolution des techniques utilisées pour

étudier cette pathologie (microscopie électronique, biochimie des protéines, imagerie, génétique...) ont permis d'identifier les principaux acteurs de la maladie (peptide A β , la protéine Tau...) et par là même, l'élaboration d'hypothèses sur le développement de la maladie dont l'hypothèse de la cascade amyloïde (que nous définirons avec plus de précision ultérieurement), base de travail pour la plupart des chercheurs de nos jours (Selkoe *et al.*, 2012).

Après plus de 100 ans de recherche sur la maladie d'Alzheimer, aucun traitement n'est disponible. L'augmentation et le vieillissement de la population mondiale font de cette maladie une urgence de santé publique.

A-2 Impacts sociaux-économiques

La maladie d'Alzheimer est une maladie à évolution lente et longue et n'a pas de traitement curatif. La détérioration des fonctions cognitives des patients entraîne également une perte d'autonomie sévère ce qui implique des soins médicaux lourds mais aussi un investissement important de personnel non médical (ou les "aidants", personnes de l'entourage du patient bien souvent qui lui viennent en aide). Ainsi, l'impact socio-économique de la maladie est considérable. La plupart des études mesurant l'impact socio-économique au niveau mondial des démences prennent en compte toutes les démences à la fois sans distinction, mais il faut savoir que la maladie d'Alzheimer en représente la plus grande part, à hauteur de 70% des cas environ. En Europe en 2008, le coût de la prise en charge des démences a été estimé à environ 177 milliards d'euros, avec un coût annuel par personne estimé à environ 20 000€, montant supérieur au coût annuel par personne attribué aux maladies cardiovasculaires ou au cancer (Hampel *et al.*, 2011). La part supportée par les aidants est difficile à évaluer, selon les études elle varie de 36 à 85% du coût total et cette variabilité est liée aux politiques de santé publique établies dans chaque pays (infrastructures, personnel formé, moyens financier attribués) et aux cultures (soins à domicile, prise en charge par les familles). Au quotidien, les aidants pallient silencieusement aux besoins des malades et plus la maladie avance et plus les aidants sont obligés de s'impliquer d'où une détérioration de leur propre santé (dépression, maladie) et de leur vie sociale (enfermement, arrêt de travail) (Wimo *et al.*, 2011).

A-3 Epidémiologie

La notion d'épidémie en référence à la maladie d'Alzheimer a été évoquée dès les années 70 (Selkoe *et al.*, 2012). En 2001, la prévalence des démences dans le monde chez les personnes âgées de plus de 60 ans était estimée à plus de 24 millions de personnes. Les prédictions considèrent que ce nombre va doubler tous les 20 ans, ce qui totalisera plus de 80 millions de malades en 2040 (Hampel *et al.*, 2011). La prévalence parmi la population âgée de 60 ans et plus est la plus forte pour l'Amérique du Nord (6.4%) et l'Europe de l'ouest (5.4%) mais elle est suivie de près par celles des régions émergentes telles que l'Amérique latine (4.9%) et la Chine et ses pays voisins du Pacific ouest (4.0%). L'incidence annuelle (rapportée à 1000 habitants) pour ces quatre régions est de 10.5 pour l'Amérique du Nord, de 8.8 pour l'Europe de l'ouest, de 9.2 pour l'Amérique latine et de 8.0 pour la Chine et ses pays voisins du Pacific ouest. Prévalence et incidence de la maladie d'Alzheimer augmentent exponentiellement avec l'âge dans toutes ces régions (Reitz *et al.*, 2011). En 2040, il est estimé que l'augmentation du nombre de personnes qui seront atteintes par la maladie d'Alzheimer ne sera pas homogène puisqu'elle touchera plus durement les pays en voie de développement tels que l'Amérique Latine (393%), l'Afrique du Nord et Moyen Orient (385%) et la Chine et ses pays voisins du Pacific ouest (336%) tandis que l'Europe de l'Ouest (102%) et l'Amérique du Nord (172%) auront une augmentation moins importante (Ferri *et al.*, 2005).

B- La maladie d'Alzheimer à l'échelle de l'individu

Les premières signes de la maladie d'Alzheimer se manifestent le plus souvent par des troubles de la mémoire qui vont concerner le rappel d'événements récents survenus dans les heures, les jours précédents mais ces troubles peuvent également être linguistiques (ex : difficulté à trouver le mot adéquat), gnosiques (ex : difficulté à reconnaître les personnes ou objets familiers) ou bien praxiques (ex : difficulté dans la réalisation de gestes connus) (Saint-Aubert *et al.*, 2012). Ces premiers symptômes vont amener les personnes à consulter. Le diagnostic de la maladie d'Alzheimer est probabiliste c'est-à-dire que l'état actuel de nos connaissances sur la maladie ne

permet pas un diagnostic de certitude, seul l'examen histologique post-mortem du cerveau le permet.

B-1 Signes cliniques et évolution

L'identification et la nomination des différentes étapes de l'évolution de la maladie d'Alzheimer ne sont pas encore arrêtées mais il est possible d'établir au moins trois phases principales dénommées comme suit : la phase préclinique, la phase prodromique et la phase de démence (Dubois *et al.*, 2007, Dubois *et al.*, 2010).

La phase préclinique est également définie comme pré-démentielle (Saint-Aubert *et al.*, 2012) ou asymptomatique (Hampel *et al.*, 2011). C'est une longue période pendant laquelle les mécanismes neuropathologiques se mettent en place avec l'agrégation et la déposition de peptides amyloïdes (ou peptides A β). Ces peptides vont s'organiser en agrégats hydrophobes, les plaques amyloïdes. Cette phase est cliniquement silencieuse, certainement grâce à la mise en place par le cerveau de mécanismes de compensation (Saint-Aubert *et al.*, 2012). De ce fait, son évolution est parfois même supposée être réversible (Hampel *et al.*, 2011).

La phase prodromique de la maladie est la phase pendant laquelle débutent les symptômes cliniques (Dubois *et al.*, 2007), avec l'apparition notamment de pertes de mémoire épisodiques (souvenirs récents), décelables par le patient et par son entourage. Ces symptômes conduisent les personnes à consulter et selon l'avancement du patient dans cette phase de la maladie, il est possible de mesurer les premiers indicateurs de la maladie par des examens neuropsychologiques ou par imagerie, bien qu'il soit souvent difficile à ce stade et en routine de différencier ces symptômes de ceux des autres démences (Hampel *et al.*, 2011). Cette phase est probablement peu ou pas réversible (Hampel *et al.*, 2011).

Enfin, durant la phase finale de démence (Saint-Aubert *et al.*, 2012) ou de neurodégénération (Hampel *et al.*, 2011), le tableau clinique présente un syndrome démentiel croissant et plus caractéristique de la maladie d'Alzheimer. Au niveau physiologique, les atrophies cérébrales régionales sont visibles en imagerie. A ce

stade, la progression de la maladie est irréversible, malgré la délivrance de traitements symptomatiques (Hampel *et al.*, 2011).

B-2 Diagnostic

Aujourd'hui encore, le diagnostic de la maladie d'Alzheimer survient que tardivement, lorsque les premiers symptômes de perte de mémoire épisodique apparaissent. Or ces symptômes cliniques sont le reflet de la rupture de compensation du cerveau face au développement de la maladie (Saint-Aubert *et al.*, 2012). En France, le délai moyen entre les premiers symptômes de démence de type Alzheimer et le diagnostic est de 24 mois. (Gallez C. pour l'office Parlementaire d'Evaluation des Politiques Publiques, 2005). Le diagnostic est pluridisciplinaire et allie des tests neuropsychologiques, un bilan neurologique, de l'imagerie cérébrale et un bilan biologiques (classique et spécifique). Il est primordial de pouvoir écarter les autres causes de démences telles que la démence vasculaire, la démence avec corps de Lewy (dépôts anormaux d' α -synucléine dans les cellules nerveuses du cerveau), la démence associée à la maladie de Parkinson, la démence fronto-temporale (maladie neurodégénérative atteignant les lobes frontaux et temporaux du cerveau) ou les démences réversibles (secondaire à une pathologie bien souvent soignable) (Castellani *et al.*, 2010).

B-2-a Les bilans neuropsychologiques

La maladie d'Alzheimer n'est pas caractérisée par un trouble neurologique spécifique. En effet, le bilan neurologique est souvent normal en début de maladie : il permet de déceler d'éventuels troubles neurologiques annexes, sans lien avec la maladie, tels que déficit sensoriel, hémiparésie, déficit du champ visuel et/ou de la coordination. Tous ces troubles peuvent cependant être associés à la maladie d'Alzheimer. Les tests neuropsychologiques s'effectuent sous forme de séries de questions ou de tâches simples à accomplir, et permettent ainsi d'évaluer les fonctions cognitives telles que la mémorisation, le langage, la compréhension, le raisonnement, la planification, etc. Les tests sont adaptés au patient, à leur niveau

socio-culturel et au stade d'évolution de leur maladie. C'est la méthode qui permet de détecter les symptômes le plus tôt. Les questions seront d'autant plus précises que le diagnostic est réalisé tôt, afin de mettre en évidence des troubles qui pourraient passer inaperçus. A un stade très évolué de la maladie, il n'est plus possible de faire passer ces tests.

B-2-b L'imagerie cérébrale

L'imagerie cérébrale a permis de faire des progrès considérables dans le diagnostic de la maladie d'Alzheimer ainsi que dans l'étude de l'évolution du cerveau lors de processus de vieillissement normal ou pathologique du cerveau, aux niveaux anatomique et fonctionnel. Il est ainsi possible de mesurer des changements significatifs de structure du cerveau, chez les sujets au stade de démence mais également à des stades plus précoces (Hampel *et al.*, 2011). Les deux techniques utilisées principalement sont l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la tomographie par émission de positrons (TEP).

L'utilisation de l'IRM dans le cadre de la maladie d'Alzheimer peut être structurale ou fonctionnelle. L'IRM structurale est utile, dans un premier temps, pour éliminer d'autres pathologies (accident vasculaire cérébral, tumeurs) dont les symptômes pourraient être confondus avec une démence (Association France Alzheimer). Grâce à la mesure des variations de volume et d'aspect des structures cérébrales, l'IRM peut, de par l'identification de la région cérébrale touchée, différencier la maladie d'Alzheimer d'une autre démence. Ainsi, l'atrophie cérébrale débute au niveau de l'hippocampe puis s'étend à toute la zone corticale et enfin atteint la zone sub-corticale. La zone la plus gravement touchée est le lobe temporal médian, ce qui semble être caractéristique de la maladie d'Alzheimer (Hampel *et al.*, 2012). Il est également possible de mesurer l'atrophie de l'hippocampe. Cependant, bien qu'étant un paramètre de mesure sensible, elle semble peu spécifique puisqu'elle est également observable dans le cas de dégénérescences lobaires fronto-temporales ou lors de démences vasculaires (Saint-Aubert *et al.*, 2012). L'utilisation de l'IRM peut être aussi fonctionnelle c'est-à-dire qu'elle permet de suivre une fonction biologique cérébrale. Des études montrent que la connectivité entre les neurones,

témoin de leur activité, est altérée chez les sujets atteints de la maladie d'Alzheimer. D'autres études ont mis en évidence une hyperactivation dans les régions qui commencent à être touchées par l'atrophie ce qui a conduit à émettre une hypothèse selon laquelle un mécanisme de compensation du cerveau s'effectue en réponse à l'installation de la pathologie (Saint-Aubert *et al.*, 2012).

La TEP est une technique d'imagerie médicale qui permet la visualisation de la distribution d'un composé radioactif dans tout le corps. Le PiB (en anglais Pittsburgh Compound B) marque spécifiquement les dépôts d'A β fibrillaire (Klunk *et al.*, 2004) ainsi lorsqu'il est radiomarqué (^{11}C -PiB) et injecté chez des patients, il permet la visualisation des régions d'accumulation d'A β fibrillaire. Les dépôts ainsi observés chez les patients ont été corrélés avec les examens post-mortem effectués chez les patients diagnostiqués avec la maladie d'Alzheimer (Klunk *et al.*, 2004). Néanmoins, la validité de la mesure utilisant le PiB pour le suivi de l'évolution de la maladie n'est pas prouvée : des examens effectués pendant plusieurs années sur des patients supposés atteints de la maladie d'Alzheimer en stade de démence ne montrent pas une augmentation de la charge globale en PiB en parallèle de l'évolution de la maladie (Clifford *et al.*, 2009). Ceci démontre que la charge globale en plaques amyloïdes n'augmente pas proportionnellement et que ces dernières ne sont pas les meilleurs indicateurs de l'évolution de la maladie.

La TEP permet également de mesurer une autre altération physiologique caractéristique du début de la maladie qui est la détérioration de l'activité synaptique et ceci grâce à l'injection du ^{18}F -2-fluoro-2-déoxy-D-glucose (FDG). A l'aide de cette molécule il est possible de mesurer le métabolisme du glucose du cerveau et le flux sanguin cérébral, tous deux marqueurs de la dysfonction synaptique. Au stade de démence de la maladie, il est possible de visualiser un hypométabolisme dans la région temporale du cortex, impliquée dans la mémoire épisodique (Hampel *et al.*, 2012).

B-2-c Les marqueurs biologiques

Les marqueurs biologiques sont des mesures objectives qui sont essentiels au diagnostic et au suivi de l'évolution de la maladie.

Une personne qui consulte pour des troubles cognitifs légers se verra prescrire tout d'abord un bilan biologique classique (Tableau I-1) afin de déceler si ceux-ci sont dus à des troubles cognitifs réversibles. En effet, les pertes de mémoire ou d'orientation peuvent être dues à certaines pathologies de nature épisodique telles qu'une carence en vitamines ou en hormones, une déshydratation, une infection, une intoxication ou bien par des pathologies permanentes parmi lesquelles les maladies cardiaques ou les déficits sensoriels (vue, audition). Le bilan biologique classique peut déceler ces pathologies et si le traitement adéquat est rapidement mis en place, ces troubles cognitifs peuvent alors être réversibles (Blennow *et al.*, 2010).

Bilan	Examens systématiques	Examens non systématiques
Biologique	<ul style="list-style-type: none"> - Hémogramme, - Ionogramme sanguin incluant une calcémie - Glycémie - Albuminémie - Bilan rénal - TSH (thyroid stimulating hormon) - Protéine C-réactive (CRP) 	<ul style="list-style-type: none"> - Bilan hépatique - Dosage vit B 12, folates - Sérologie syphilitique, VIH, de la maladie de Lyme - Ponction lombaire avec analyse standard du LCR - Ponction lombaire avec analyse spécifique du LCR (tau total, p-Tau et Aβ42)
Imagerie	<ul style="list-style-type: none"> - Imagerie cérébrale par résonance magnétique (IRM) avec coupes coronales passant par les hippocampes et des temps T1, T2, T2* et FLAIR 	<ul style="list-style-type: none"> - Tomodensitométrie cérébrale sans injection de produit de contraste
Neuro-psychologique	En évaluation initiale	En suivi, en fonction du contexte clinique.
Électro-encéphalogramme	Non	En fonction du contexte clinique.
Électro-cardiogramme	Non	En fonction du contexte clinique.

Tableau I-1 : Bilan biologique et examens médicaux prescrits aux personnes consultant pour un diagnostic de maladie d'Alzheimer en France (d'après la Haute Autorité de Santé 2012).

Pour les cas avérés de démence, d'autres outils diagnostiques sont utilisés comme de l'imagerie ou une recherche ciblée de protéines spécifiques de la maladie d'Alzheimer dans le liquide céphalo rachidien (LCR). Ce dernier semble être le liquide biologique de prédilection pour la mesure des marqueurs biologiques de la maladie d'Alzheimer puisqu'il est en contact direct avec le milieu extracellulaire du cerveau et reflète les altérations subies par ce dernier. Les marqueurs biologiques recherchés sont liés au processus dégénératif de la maladie (Hampel *et al.*, 2012).

Les plaques amyloïdes et le peptide amyloïde (et notamment le peptide A β 42, le plus abondant dans les plaques et le plus toxique) sont caractéristiques de la maladie d'Alzheimer, pouvoir les mesurer est donc primordial. Au cours de la maladie, la quantité d'A β 42 dans le LCR diminue ce qui a amené à considérer la baisse d'A β 42 dans le LCR comme un marqueur biologique de l'évolution de la maladie (Hampel *et al.*, 2012).

La protéine Tau et sa version hyperphosphorylée p-Tau sont des protéines cytosoliques considérées comme des marqueurs de la maladie d'Alzheimer. Dans ce contexte, celles-ci se retrouvent dans le LCR, peut être du fait de la mort neuronale (Mandelkowitz et Mandelkowitz 2012). Il a été démontré que la charge totale de protéine Tau (t-Tau) dans le LCR est corrélée avec les dégénérescences axonale et neuronale (Blennow *et al.*, 2010) alors que la charge de p-Tau se révèle être un marqueur des dégénérescences neurofibrillaires, plus spécifique donc de la maladie d'Alzheimer. Il n'en est pas de même dans d'autres pathologies associées à Tau, telles que la maladie de Creutzfeldt-Jakob et l'accident vasculaire cérébral, pour lesquelles la charge en t-Tau est élevée tandis que la charge en p-Tau reste normale. Ainsi, la protéine Tau, et plus particulièrement sa version hyperphosphorylée p-Tau, semblent être deux bons candidats en tant que marqueurs biologiques spécifiques de l'évolution de la maladie d'Alzheimer (Hampel *et al.*, 2012).

Malgré le manque de traitement curatif, le diagnostic précoce est essentiel. En effet, il permettrait la mise en place d'accompagnement médical et social adaptés qui pourraient, dans un premier temps, retarder l'entrée des patients dans les institutions spécialisées et à plus longue échéance, trouver un traitement pour la maladie.

B-3 Facteurs de risque et prévention

Les facteurs de risques sont des éléments qui peuvent favoriser le développement d'une maladie. Ils peuvent être endogènes au patient (génétique, état de santé, etc) ou bien exogènes (hygiène de vie, situation socio-économique, etc). Pour les maladies dont la cause reste inconnue, telles que la maladie d'Alzheimer, les facteurs de risques sont susceptibles d'être identifiés et leur incidence calculée grâce à des études épidémiologiques à grande échelle. Grâce à ce type d'études, il est possible de déterminer quels sont les facteurs de risques suffisamment forts pour servir éventuellement de marqueurs pour le diagnostic. Plusieurs facteurs de risque ont été identifiés pour la maladie d'Alzheimer, tels que les facteurs biologiques et environnementaux ainsi que les facteurs génétiques (Reitz *et al.*, 2011). Agir sur ces facteurs – lorsque c'est possible - de manière à réduire leur impact sur notre santé représente une mesure de prévention.

B-3-a Facteurs biologiques et environnementaux

La plupart des facteurs de risque biologiques et environnementaux sont modifiables, bien qu'il existe toujours des exceptions. Les deux principaux facteurs de risque biologiques des démences non modifiables sont l'âge et le sexe respectivement. La prévalence de la démence, c'est-à-dire le nombre d'individus atteints par la maladie sur le nombre total d'individus de la population à un moment donné augmente exponentiellement avec l'âge. Ainsi, en Europe de l'ouest, la prévalence double chaque 6,3 années à partir de 60 ans, passant de 1,6 pour l'intervalle d'âge 60-64 ans à 43,1 pour les plus de 90 ans. La prévalence est inférieure chez les hommes de 19 à 29%, lorsque tous les intervalles d'âge sont considérés (Alzheimer's Disease International 2009).

Tout élément ayant un impact sur l'environnement des acteurs principaux de la maladie d'Alzheimer (tels que le peptide A β , la protéine Tau...) peut potentiellement être un facteur de risque de la maladie. Les principaux facteurs de risques sont les mêmes que pour les maladies cardiovasculaires : tabagisme, hypertension, cholestérol, diabète, et obésité (Sosa-Ortiz *et al.*, 2012). Les problèmes

cardiovasculaires et ses facteurs de risque associés (diabète, cholestérol, hypertension) engendrent une mauvaise intégrité du réseau vasculaire, ce qui peut perturber l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique impliquant une libération anormale de protéines dans le cerveau. Cette dernière peut alors engendrer des dommages dans les tissus, dans les fonctions neuronales et synaptiques voire une apoptose des neurones et une accumulation d'A β au niveau extracellulaire, conduisant à la détérioration cognitive (Reitz *et al.*, 2011). Ainsi, plusieurs données dans la bibliographie suggèrent que les risques liés aux maladies cardiovasculaires prédisposent à la démence, à la maladie d'Alzheimer ou à la démence vasculaire. 7.4% des patients ayant subi un premier accident vasculaire cérébral développent une démence par la suite (Reitz *et al.*, 2011). De même, le tabagisme et le diabète augmentent le risque de développer toute forme de démence dont la maladie d'Alzheimer.

Les facteurs de risque environnementaux, en lien notamment avec le mode vie, sont des facteurs hautement modifiables et comprennent l'activité physique, intellectuelle, la consommation d'alcool ou bien l'état psychologique. L'adage "un esprit sain dans un corps sain" est plus que jamais confirmé. Plusieurs études de cohorte montrent que faire du sport a un effet positif fort. De même, un haut niveau d'études, entretenu tout au long de la vie par des activités intellectuelles de "loisir" et/ou professionnelles, est supposé alimenter une réserve cognitive qui permettrait de palier aux premiers signes physiologiques de la maladie d'Alzheimer, retardant ainsi son apparition. *A contrario*, des précédents de dépression sont corrélés positivement avec toutes les formes de démence. Enfin, une consommation légère voire modérée d'alcool semble être protectrice contre la maladie tandis qu'une grande consommation d'alcool a l'effet opposé (Sosa-Ortiz *et al.*, 2012).

Il est estimé que ces facteurs de risques peuvent être responsables de la moitié des cas de maladie d'Alzheimer dans le monde (Tableau I-2).

Facteur de risque	Prévalence
Diabète	6,4%
Hypertension	8,9%
Obésité	3,4%
Dépression	13,2%
Inactivité physique	17,7%
Tabagisme	27,4%
Faible niveau d'étude	40,0%

Tableau I-2 : Prévalence de la maladie d'Alzheimer au niveau mondial attribuable à des facteurs de risques modifiables (d'après Barnes et Yaffe 2011).

B-3-b Facteurs génétiques

La maladie d'Alzheimer se manifeste essentiellement sous deux formes : la forme dite "familiale" à début précoce qui a une forte composante génétique et représente moins de 5% des cas, et la forme dite "sporadique" à début tardif qui est de loin la plus fréquente. Les formes génétiques héréditaires ont été les premières à être découvertes grâce aux techniques de biologie moléculaire. Ces découvertes ont aussi apporté un éclairage sur la physiopathologie de la maladie en identifiant des gènes codant pour les protéines jouant un rôle central dans la maladie (Tanzi RE 2012). C'est ainsi qu'il a été déterminé que le peptide A β est issu du clivage protéique de sa protéine précurseur, l'APP (en anglais amyloid precursor protein), par deux sécrétases successivement : la β sécrétase puis la γ -sécrétase.

Les gènes impliqués dans la forme familiale

Certaines formes génétiques de la maladie d'Alzheimer sont des formes autosomales dominantes. Les personnes atteintes de ces formes développent la maladie plus tôt que la moyenne de la population c'est-à-dire avant l'âge de 60 ans, les cas les plus précoces apparaissant dès l'âge de 30 ans. Les enfants dont au moins un des deux parents est atteint par cette forme précoce de la maladie ont ainsi 50% de chance de la développer. A partir des années 80, trois gènes dominants à

transmission autosomale ont été identifiés : *APP*, *PSEN1*, *PSEN2*. Néanmoins, les formes familiales de la maladie d'Alzheimer engendrées par la mutation d'un de ces gènes ne représentent que 30 à 50% des formes autosomales dominantes (Cruts *et al.*, 2012) ce qui suggère qu'il reste d'autres gènes à découvrir (Schellenberg et Montine 2012).

Le gène *APP*. Le premier gène à être mis en relation avec la forme précoce de la maladie d'Alzheimer a été le gène codant pour la protéine précurseur du peptide amyloïde (*APP*). Le peptide amyloïde existe sous différentes isoformes dont la plus toxique est A β 42 (constituée de 42 acides aminés) et la plus commune, mais moins toxique est A β 40 (constituée de 40 acides aminés). Aujourd'hui, 24 mutations et 9 duplications dans *APP* ont été répertoriées (Cruts *et al.*, 2012). Ces altérations génétiques sont fortement pénétrantes c'est-à-dire que les porteurs de ces versions modifiées du gène *APP* ont de fortes probabilités d'exprimer le phénotype de la maladie d'Alzheimer (Goate *et al.*, 1991). Elles engendrent pour la plupart une augmentation du ratio A β 42/A β 40, indicateur de l'évolution de la maladie (Tanzi et Bertram 2005), et la charge en peptides A β au niveau synaptique (Hooli *et al.*, 2012). Elles sont toutes situées à proximité de la séquence d'*APP* codant pour le peptide A β (Schellenberg et Montine 2012). Il était généralement suggéré que les duplications d'*APP* engendraient une pénétrance complète (c'est-à-dire l'expression obligatoire du phénotype de la maladie à un âge donné) néanmoins la récente identification de quelques rares cas de personnes porteuses d'une duplication ou d'une mutation d'*APP* et exprimant une pénétrance partielle (à un âge donné, ces personnes n'ont pas les symptômes de la maladie) conduisent à penser que d'autres facteurs, à effet protecteur, compenseraient l'effet délétère de la duplication ou de la mutation (Hooli *et al.*, 2012; Cruchaga *et al.*, 2012). Quoiqu'il en soit, les mutations et duplications dans le gène *APP* ne comptabilisent que de rares cas, moins de 0,1% des formes précoces de la maladie d'Alzheimer (Reitz *et al.*, 2011). Les variants génétiques d'*APP* quant à eux, n'ont probablement aucune influence sur la forme sporadique de la maladie (Hooli *et al.*, 2012).

Les gènes *PSEN1* et *PSEN2*. Les gènes *PSEN1* et *PSEN2*, situés sur les chromosomes 14 et 1 respectivement, codent pour des protéines homologues qui composent (l'une ou l'autre) le complexe protéique de la γ -sécrétase avec les protéines nicastrine, APH1 et PEN2. La γ -sécrétase catalyse le clivage de diverses protéines membranaires (De Strooper *et al.*, 2012). La mutation dans un de ces deux gènes induit l'apparition précoce des symptômes de la maladie d'Alzheimer. Cela engendre un changement de conformation dans le site catalytique de l'enzyme. Ainsi, APP clivée par la γ -sécrétase native clive A β préférentiellement en position 40 tandis que la γ -sécrétase mutée clive A β préférentiellement en position 42 libérant ainsi l'isoforme la plus amyloïdogénique du peptide (Jayadev *et al.*, 2010). Plus de 185 mutations sont répertoriées dans le gène *PSEN1* (Cruts *et al.*, 2012). La pénétrance des mutations de *PSEN1* est complète à 60-65 ans ce qui correspond à une forme précoce du développement de la maladie. Quant au gène *PSEN2*, plus de 13 mutations dans ce gène sont connues (Cruts *et al.*, 2012) mais sa pénétrance est plus variable puisque l'apparition des symptômes peut avoir lieu entre 40 et 80 ans (Schellenberg et Montine 2012). La plupart des mutations sont des substitutions de nucléotides mais parfois ce peut être des délétions et insertion nucléotidiques (Reitz *et al.*, 2011).

Les gènes impliqués dans la forme tardive de la maladie d'Alzheimer

La détermination des gènes impliqués dans les formes tardives de la maladie d'Alzheimer s'effectue par des études d'association pangénomiques ou GWAS (en anglais genome-wide association studies), dans lesquelles les fréquences pour le polymorphisme allélique situées près ou dans un gène soupçonné d'intervenir dans la maladie sont comparées avec celles de témoins. Les gènes sont définis comme facteur de risque lorsque les fréquences entre ces deux groupes diffèrent significativement.

Il n'existe pas de consensus à l'heure actuelle sur le nombre et l'identité des gènes considérés comme facteurs génétiques de la maladie d'Alzheimer, sauf pour le gène *APOE* (Tanzi 2012, Schellenberg et Montine 2012). *APOE* est un gène situé sur le chromosome 19 qui code pour l'apolipoprotéine E (ApoE), une protéine très largement étudiée pour son rôle dans le transport lipidique, le transport d'A β , la fonction synaptique, la régulation immunitaire et la signalisation intracellulaire

(Mahley *et al.*, 2009). Des études génétiques dans différentes familles porteuses du phénotype de la maladie d'Alzheimer ont démontré que le polymorphisme dans le gène *APOE* était lié à la maladie (Strittmatter *et al.*, 1993). Ce gène possède trois allèles, tous liés à la maladie d'Alzheimer : $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$. Leur polymorphisme vient de deux SNPs (en anglais single nucleotid polymorphism) contenus dans la séquence du gène *APOE*. L'allèle $\epsilon 4$ est corrélé avec le plus fort risque de développer la maladie, l'allèle $\epsilon 3$ est le plus commun et le plus neutre et enfin, l'allèle $\epsilon 2$ est associé avec un risque plus faible. Les personnes atteintes par la maladie voient leurs symptômes apparaître plus tôt si elles sont porteuses de l'allèle $\epsilon 4$ et plus tardivement si elles sont porteuses de l'allèle $\epsilon 2$ (Corder *et al.*, 1993). Les risques pour chaque allèle s'ajoutent, en conséquence le génotype $\epsilon 4/\epsilon 4$ augmente plus le risque de développer la maladie (facteur dix) que l'allèle $\epsilon 4$ seul (facteur quatre) tandis que le génotype $\epsilon 2/\epsilon 2$ est plus protecteur que l'allèle $\epsilon 2$ seul. Néanmoins, être porteur de l'allèle $\epsilon 4$ du gène *APOE* reste un facteur de risque uniquement, ce n'est pas un facteur suffisant pour développer la maladie d'Alzheimer (Tanzi 2012) (Tableau I-3).

Autres facteurs génétiques. Une douzaine des GWAS ont été répertoriés concernant la maladie d'Alzheimer et environ un million de marqueurs SNP sont utilisés. Ces études ont permis d'identifier environ onze gènes potentiellement liés à la maladie (cf Tableau I-3)(Tanzi 2012).

Gène	Modification du risque
<i>APOE</i>	~400%-1500%
<i>CD33</i>	~10%
<i>CLU</i>	~10%
<i>CR1</i>	~15%
<i>PICALM</i>	~15%
<i>BIN1</i>	~15%
<i>ABCA7</i>	~20%
<i>CD2AP</i>	~10%
<i>EPHA1</i>	~10%
<i>MS4A6A/MS4A4E</i>	≈10%
<i>ATXN1</i>	NA

Tableau I-3 : Gènes impliqués dans la forme tardive de la maladie d'Alzheimer et estimation de leur contribution au risque global de développer la maladie d'après des études GWA (d'après Tanzi 2012).

B-3-c Prévention

Il est estimé que la moitié des cas de maladie d'Alzheimer sont en lien avec des facteurs de risque modifiables. La régulation des effets de ces facteurs de risque sur notre organisme ne réduit pas d'autant la prévalence mais peut retarder l'apparition des premiers symptômes ou bien diminuer la vitesse d'évolution de la maladie. L'hygiène de vie, l'activité sportive et l'activité intellectuelle sont les principaux facteurs sur lesquels il est possible d'agir. D'après les études épidémiologiques réalisées sur les facteurs de risque alimentaires, un régime alimentaire protecteur contre la maladie d'Alzheimer serait de type méditerranéen, c'est à dire avec une consommation importante en fruits et légumes, beaucoup de poisson et peu de viande, une consommation modérée d'alcool et l'utilisation d'huile d'olive comme matière grasse. Les effets directs de ce régime sur la maladie d'Alzheimer sont l'apport des vitamines, aux propriétés antioxydantes, qui peuvent entre autres réduire la peroxydation des lipides induite par le peptide A β ou bien des acides gras polyinsaturés qui ont un effet bénéfique sur les fonctions neuronales et vasculaires. Indirectement, ce régime réduit les risques de maladies vasculaires cérébrales ou de diabète, elles-mêmes facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer. L'activité physique

est supposée avoir un effet direct sur la maladie en activant la circulation sanguine, le transport d'oxygène, la consommation du glucose et la vascularisation du cerveau. Enfin, l'activité intellectuelle, qu'elle soit acquise ou induite par des activités telles que l'apprentissage, la lecture ou les jeux, semble être un facteur qui diminue le risque développer la maladie d'Alzheimer. Toutefois, une fois l'altération cognitive initiée, ce facteur semble ne plus avoir d'effet protecteur (Reitz *et al.*, 2011).

C - La maladie d'Alzheimer à l'échelle moléculaire

En microscopie, les coupes histologiques de cerveaux de patients décédés de la maladie d'Alzheimer présentent au niveau du cortex et de l'hippocampe, deux lésions caractéristiques: i) les plaques amyloïdes (ou plaques séniles) extracellulaires constituées essentiellement d'agrégats du peptide (peptide A β) et ii) les dégénérescences neurofibrillaires intracellulaires. N'étant pas éliminées, ces lésions cellulaires s'accumulent, ce qui engendre la mort massive des neurones atteints et la perte des fonctions cognitives qui y sont associées (Haass et Selkoe 2007).

C-1 Le peptide A β

La principale sous-unité composant les plaques amyloïdes est le peptide amyloïde A β . Il a été dénommé ainsi suite aux premières colorations au rouge Congo réalisées sur des coupes histologiques des cerveaux de patients décédés de la maladie d'Alzheimer. En effet, ce colorant était initialement connu pour marquer les protéines insolubles des "amyloses", maladies impliquant le dépôt de protéines non solubles et dont la structure comporte des feuillet β . Ces protéines, une fois marquées au rouge Congo sont réfringentes en microscopie en lumière polarisée. Les peptides dans les coupes histologiques réagissant ainsi à ce colorant ont donc été dénommés peptides amyloïdes β (A β) (Glennner et Wong 1984, Haass et Selkoe 2007).

Ces peptides sont issus du clivage de l'APP par différentes sécrétases. L'APP est une glycoprotéine transmembranaire ubiquitaire, présente dans les membranes plasmiques et les membranes des organelles (Kepp 2012), dont la taille peut varier de 100 à 130 kDa, soient 695 à 770 acides aminés environ, et dont le gène se situe sur le

chromosome 21 (Fodero-Tavoletti *et al.*, 2011). Les fonctions physiologiques de l'APP sont encore inconnues, bien qu'elle soit pressentie jouer un rôle primordial dans le développement du système nerveux, dans la structure et la fonction des synapses ainsi que dans la migration neuronale (Thinakaran et Koo 2008).

L'APP peut être clivée par trois sécrétases - nommées ainsi car elles libèrent des fragments qui seront sécrétés - selon deux voies de clivage qui se distinguent de par le type de produit libéré. La voie amyloïdogénique fait intervenir tout d'abord la β -sécrétase qui digère l'APP libérant ainsi le fragment APPs β (peptide d'APP sécrété β) et le fragment β -CTF (le fragment C-terminal β) puis la γ -sécrétase, qui digère le fragment β -CTF, libérant ainsi les peptides amyloïde et l'AICD (le domaine intracellulaire d'APP). La voie non-amyloïdogénique fait intervenir l' α -sécrétase qui digère l'APP, libérant ainsi le fragment APPs α (peptide d'APP sécrété α) et le fragment α -CTF (le fragment C-terminal α) puis la γ -sécrétase qui digère le fragment α -CTF, libérant ainsi le fragment p3 (fragment N-terminal du peptide A β) et le fragment AICD (Figure I-1) (Thinakaran et Koo 2008).

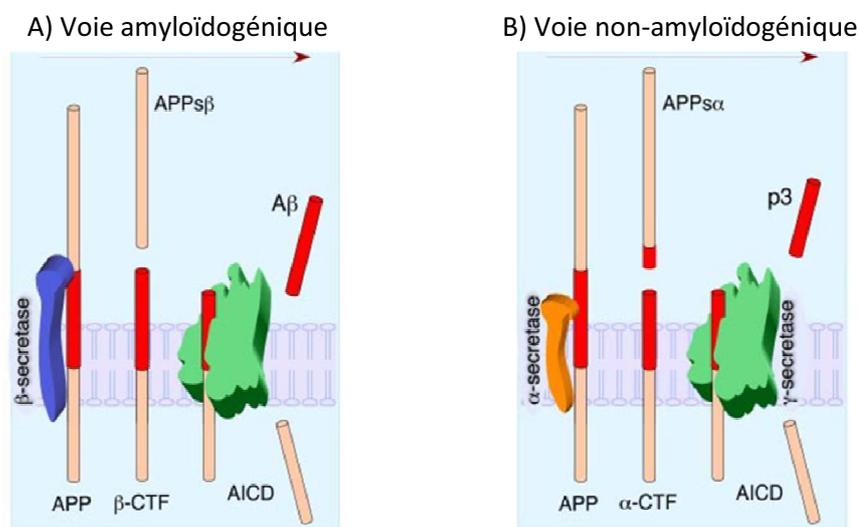


Figure I-1 : Processus protéolytique de l'APP par les sécrétases membranaires. A) La voie amyloïdogénique fait intervenir tout d'abord la β -sécrétase (en bleu) qui digère l'APP libérant le fragment APPs β et le fragment β -CTF ; puis la γ -sécrétase (en vert) qui digère le fragment β -CTF libérant ainsi les peptides amyloïde (en rouge) et AICD. B) La voie non-amyloïdogénique fait intervenir l' α -sécrétase (en orange) qui digère l'APP libérant le fragment APPs α et le fragment α -CTF; puis la γ -sécrétase qui digère le fragment α -CTF libérant le fragment p3 (coupant au milieu de la séquence du peptide amyloïde) et le fragment AICD (d'après Thinakaran et Koo 2008).

Les peptides A β sont des peptides d'environ 4 kDa, dont la taille varie entre 38 et 43 acides aminés. Ils sont synthétisés dans le cerveau mais sont également excrétés dans les fluides extracellulaires au niveau du liquide céphalo-rachidien (LCR) et du plasma (Fodero-Tavoletti *et al.*, 2011) (Figure I-2).

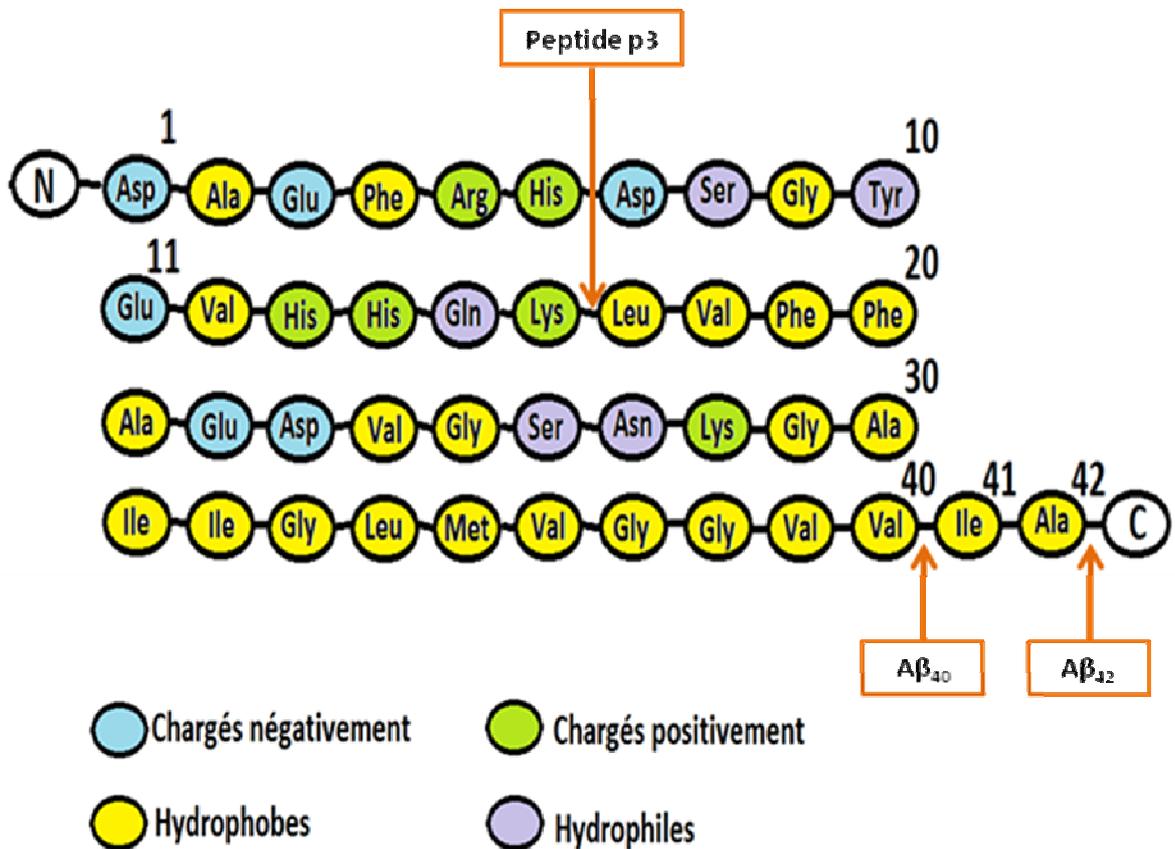


Figure I-2: Séquence primaire des peptides amyloïdes de 40 et 42 acides aminés.

Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, l'isoforme A β_{42} , la plus hydrophobe, est produite préférentiellement. Ainsi les plaques séniles sont composées majoritairement de peptide A β_{42} et les plaques diffuses du peptide A β_{40} , l'autre isoforme la plus abondante d'A β . Il semblerait que le rapport A β_{42} /A β_{40} soit plus révélateur de l'état de l'avancement de la maladie que le dosage des isoformes individuellement, ce rapport augmentant au cours du temps (Karran *et al.*, 2011).

Si le rôle physiologique normal du peptide A β reste encore inconnu, de nombreuses avancées ont été faites sur l'origine de sa toxicité.

C-2 Toxicité du peptide A β

Les premiers résultats d'expérimentation avec le peptide A β présentaient la forme fibrillaire comme la forme toxique. En effet, des études avaient démontré qu'une induction de l'agrégation de A β entraînait une augmentation de son activité neurotoxique suggérant que la toxicité était liée à la formation des fibrilles (Picke *et al.*, 1993).

Par la suite, il a été démontré que la forme oligomérique d'A β était plus en corrélation avec l'évolution des symptômes de la maladie que les plaques amyloïdes (McLean *et al.*, 1999, Mc Donald *et al.*, 2010). Aujourd'hui la plupart des chercheurs s'accordent à travailler sur l'isoforme A β 42 dans sa forme soluble non fibrillaire qui est considérée comme la forme toxique majeure (Lambert *et al.*, 1998 ; Walsh *et al.*, 2002 ; Smith *et al.*, 2007 ; Glabe CG 2008).

Une relation a été établie entre la toxicité de A β et la présence des formes dimériques et trimériques (Walsh *et al.*, 2002). Par ailleurs, selon Jin et collaborateurs, la forme dimérique serait la forme la plus abondante dans le cerveau des personnes atteintes de la maladie (Jin *et al.*, 2011). Ces auteurs ont prélevé ces dimères à partir du cortex de patients et ont montré qu'à des concentrations subnanomolaires, ils induisaient l'hyperphosphorylation de Tau dans des neurones hippocampiques, puis la perturbation du cytosquelette et enfin la dégénération des neurites. Et tout cela, sans passer par la forme fibrillaire (Jin *et al.*, 2011).

C-3 La cascade amyloïde

La cascade amyloïde (Figure I-3) a pour acteur central le peptide amyloïde et stipule que c'est un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation du peptide amyloïde qui conduit à son accumulation puis à son agrégation, d'abord sous forme oligomérique puis sous forme de plaques. S'en suit une cascade d'évènements de type inflammatoires et de dysfonctionnements cellulaires tels que la toxicité cellulaire, la gliose, le stress oxydant, des dysfonctions synaptiques et neuronales qui conduisent à la mort des neurones et à la disparition des fonctions qui y sont associées (Haass et Selkoe 2007).

Comme nous l'avons vu, le peptide amyloïde est le produit normal du clivage protéolytique de sa protéine précurseur APP par les β - et γ -sécrétases. En temps normal, production et élimination du peptide A β se compensent. Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, il semblerait qu'il y ait un déséquilibre du métabolisme en faveur de sa production. Les mécanismes d'élimination du peptide étant multiples, les causes de sa perturbation le sont également (Kepp KP 2012, Saido et Leissring 2012). Le peptide A β est éliminé principalement par des protéases, telles que l'enzyme de dégradation de l'insuline (en anglais IDE insulin-degrading enzyme), l'enzyme de conversion de l'angiotensine ou bien les métallo-protéinases de la matrice extracellulaire (principalement 2 et 9) mais la plus importante reste la néprilysine. Elle est capable d'éliminer les formes oligomériques et monomériques (Kepp KP 2012). Les autres mécanismes à entrer en jeu sont le transport d'A β à travers les membranes et la barrière hémato-encéphalique, les interactions protéines-protéines, l'agrégation et le dépôt. Tous ces mécanismes agissent simultanément, en association complexe, et peuvent varier tant au niveau tissulaire qu'au niveau subcellulaire (Saido et Leissring 2012).

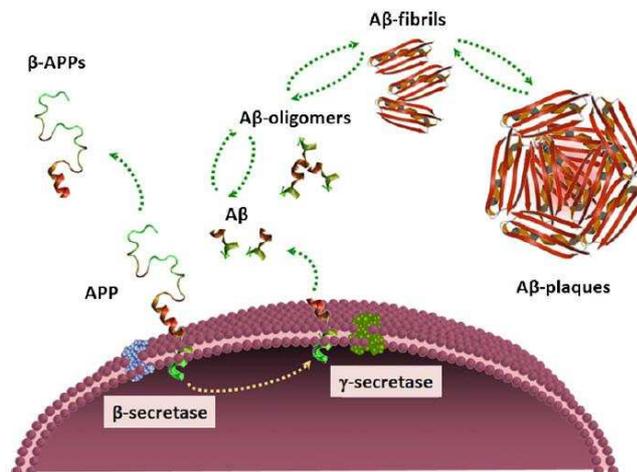


Figure I-3 : Schéma représentant la voie amyloïdogénique de la cascade amyloïde. L'APP, clivée au niveau de la membrane par les β - puis γ -sécrétases, libère le peptide amyloïde (rubans). Ces derniers se structurent en oligomères puis en fibrilles et enfin en plaques amyloïdes extracellulaires (d'après Fodero-Tavoletti *et al.*, 2011).

C-4 La protéine Tau et les dégénérescences neurofibrillaires

Dans le cytoplasme des neurones en dégénérescence neurofibrillaire, des fibrilles pathologiques sont présentes dans les corps cellulaires et les terminaisons nerveuses. Ces fibrilles, des filaments hélicoïdaux appariés, sont composées essentiellement de protéines Tau hyperphosphorylées (p-Tau).

La protéine Tau est une phosphoprotéine cytosolique, exprimée principalement dans les neurones et qui fait partie de la famille des protéines associées aux microtubules (MAPs, en anglais microtubule associated proteins). Une des fonctions des protéines MAPs est de promouvoir l'assemblage de la tubuline en microtubules et de stabiliser le réseau de microtubules, ces derniers ayant pour fonction, entre autres, de stabiliser la structure de la cellule, la mitose ou bien le transport intracellulaire (Mandelkow et Mandelkow 2012).

Bien que Tau soit une protéine cytosolique et hydrophile, dans le cas de la maladie d'Alzheimer, son hyperphosphorylation va engendrer des changements de conformation (oligomérique, fibrillaire) qui ne lui permettent plus d'assurer ses fonctions de stabilisation du réseau des microtubules essentiellement (Iqbal *et al.*, 2010). L'hyperphosphorylation de Tau est due à un déséquilibre dans la balance d'activité entre kinases et phosphatases (Iqbal *et al.*, 2010).

A des stades précoces de la maladie d'Alzheimer, Tau et p-Tau sont mesurables à des concentrations élevées dans le LCR. Ces deux formes de la protéine Tau servent ainsi de marqueur biologique de la maladie. La raison de cette sortie de Tau et p-Tau du cytosol reste inconnue mais l'hypothèse avancée est qu'elle serait libérée suite à la mort des neurones porteurs de la dégénérescence neurofibrillaire les libérant ainsi dans le milieu extracellulaire (Mandelkow et Mandelkow 2012). Il semble probable aujourd'hui que la pathologie de Tau survienne consécutivement à celle d'A β (Hardy et Selkoe 2002).

D- La maladie d'Alzheimer, approche thérapeutique

A l'heure actuelle, il n'y a pas de traitement curatif de la maladie d'Alzheimer, seul existent des traitements palliatifs qui en freinent l'évolution mais dont l'efficacité est limitée dans le temps. Ces traitements symptomatiques sont proposés aux patients diagnostiqués porteurs de la maladie d'Alzheimer, c'est-à-dire qu'ils ne soignent que certains des effets secondaires. Mis à part les neuroleptiques et antidépresseurs pour lutter contre les troubles comportementaux, seulement deux classes de médicaments sont utilisées : les inhibiteurs des cholinestérases et les antagonistes des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA), qui vont potentialiser la transmission du signal nerveux. Ils améliorent l'état général du patient et leurs fonctions cognitives de manière modeste mais significative.

D-1 Les inhibiteurs des cholinestérases

L'acétylcholine est le principal neurotransmetteur rencontré dans les fentes synaptiques des zones du cerveau associées à la mémoire. La physiopathologie de la maladie d'Alzheimer implique une destruction massive des neurones cholinergiques et une diminution de la quantité d'enzymes participant à la synthèse de l'acétylcholine et de la choline acétyltransférase. Les inhibiteurs des cholinestérases (les enzymes de dégradation de l'acétylcholine) empêchent la dégradation de l'acétylcholine, ce qui augmente sa concentration dans les fentes synaptiques et favorise la transmission de signal entre les neurones cholinergiques indemnes (Hermann *et al.*, 2011). En France, trois inhibiteurs des cholinestérases sont autorisés et prescrits aux stades légers et modérés de la maladie : le donepezil, la galantamine et la rivastigmine. Il en existe un quatrième, la tacrine, mais qui est rarement utilisé du fait d'un effet secondaire toxique sur le foie (interdit en France) (Gallez C. pour l'office Parlementaire d'Evaluation des Politiques Publiques, 2005).

Des études récentes suggèrent que l'effet thérapeutique des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase serait potentiellement multiple, agissant sur d'autres cibles thérapeutiques (ex : activation de différentes isoformes d'acétylcholine, effet sur le

métabolisme de l'APP, atténuation de la toxicité d'A β) mais leur utilisation survient trop tard dans le développement de la maladie (**Hermann *et al.*, 2011**).

D-2 Les antagonistes des récepteurs N-méthyl-D-aspartate

Dans un contexte métabolique normal, la fixation du glutamate (et du co-substrat la glycine) sur les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium dans les neurones. Une trop grande sollicitation des récepteurs NMDA induit une entrée excessive d'ions calcium et une neurotoxicité. C'est ce qui a été observé dans le cas de la maladie d'Alzheimer, dès lors des thérapies basées sur des inhibiteurs des récepteurs NMDA se sont développés. Aujourd'hui, la seule molécule de cette classe à être couramment prescrite dans le cadre de la maladie d'Alzheimer est la Mémantine (Witt *et al.*, 2004). En France, elle est préconisée aux stades modérés à sévères de la maladie (Gallez C. pour l'office Parlementaire d'Évaluation des Politiques Publiques, 2005).

Ces traitements retardent l'évolution de la maladie mais ne la guérissent pas car ils n'agissent pas sur l'étiologie de la maladie.

D-3 Stratégies thérapeutiques ciblant les causes de la maladie

La maladie d'Alzheimer est une maladie multifactorielle. Les stratégies thérapeutiques se développent pour la plupart autour du peptide A β et la protéine Tau. Cependant, comme nous le verrons plus loin, d'autres stratégies sont proposées pour agir sur la régulation des ions métalliques qui sont supposés être impliqués dans l'évolution de cette maladie.

D-3-a Stratégies thérapeutiques ciblant la protéine Tau

L'hyperphosphorylation de la protéine Tau engendre une déstabilisation des microtubules, ce qui participe à la formation des dégénérescences neurofibrillaires. Les stratégies thérapeutiques se développant autour de la protéine Tau, s'intéressent donc soit à sa phosphorylation soit aux fibrilles de protéines Tau.

La phosphorylation de Tau est effectuée, entre autres, par la protéine kinase GSK-3. Trois inhibiteurs de GSK-3 sont en cours d'étude : au niveau mondial, le lithium et le valproate (dont les résultats ne sont pas très encourageants) et au niveau européen, le tideglusib (actuellement en phase IIb). Quant aux fibrilles de Tau, elles peuvent être dissoutes par le bleu de méthylène *in vitro*. L'administration de ce traitement à des patients au stade modéré de la maladie à différentes doses pendant 50 semaines (essai clinique de phase II) a démontré une amélioration significative aux tests cognitifs à la dose de 60 mg trois fois par jour. Des essais de phase III en RCT (en anglais randomized clinical trial) sont en cours sur une molécule de seconde génération, plus biodisponible, le chlorure de tétraméthylthionine (Herrmann *et al.*, 2011). Il est également envisagé des traitements qui activeraient les phosphatases et stabiliseraient le réseau des microtubules ou bien de l'immunothérapie. Néanmoins, aucun de ces traitements n'est disponible en clinique à l'heure actuelle (Mandelkow et Mandelkow 2012).

D-3-b Stratégies thérapeutiques ciblant le peptide amyloïde

Le peptide amyloïde est un peptide normalement synthétisé dans notre organisme mais un déséquilibre dans son métabolisme apparaît lors de la maladie d'Alzheimer. Les stratégies thérapeutiques proposent alors de réguler le métabolisme de ce peptide, au niveau de sa synthèse, de son agrégation et de son élimination (Herrmann *et al.*, 2011).

Diminution de la production du peptide A β , régulation des sécrétases

Comme il l'a été mentionné auparavant, le peptide A β est issu du clivage protéolytique de son précurseur, l'APP, par la voie dite amyloïdogène qui fait intervenir successivement la β puis la γ -sécrétase. Pour réduire la production d'A β , il est alors envisagé soit d'inhiber l'action de ces sécrétases de la voie amyloïdogène, soit d'activer la voie non amyloïdogène (Herrmann *et al.*, 2011).

La première sécrétase à entrer en jeu dans la voie amyloïdogène est la β -sécrétase. Son clonage puis la détermination de son site actif, il y a une dizaine

d'années, ont permis le développement d'inhibiteurs potentiels. Bien qu'il semble qu'inhiber la β -sécrétase soit relativement sûr (son blocage dans les modèles animaux ne semble perturber que la production d'A β) beaucoup de molécules ont été testées, peu sont arrivées jusqu'aux essais cliniques de phase I. La seule rendue publique a été l'inhibiteur CTS-21166. Un premier essai clinique de phase I par injection unique de l'inhibiteur (à différentes doses) à des jeunes volontaires mâles sains a démontré que le traitement, au-delà d'être bien supporté, montrait une baisse d'A β plasmatique dépendante de la dose et une inhibition de β -sécrétase de 80% aux plus fortes doses (225 mg). Des résultats similaires ont été obtenus avec une seconde étude de phase I avec prise orale de 200 mg de CTS-21166 (Ghosh *et al.*, 2012).

Il a été également envisagé d'inhiber la γ -sécrétase. Cette démarche est bien plus délicate, car la γ -sécrétase est une enzyme entrant en jeu dans divers processus métaboliques, dont celui du récepteur Notch qui intervient dans le métabolisme neuronal (signalisation et développement) (Lewis *et al.*, 2003). Le produit le plus largement étudié est le Semagacestat. Deux essais cliniques de phase III ont dû être arrêtés car non seulement les patients voyaient l'évolution de leur maladie accélérer par rapport aux témoins mais en plus s'ajoutait le risque de développer un cancer de la peau. A présent, le développement des inhibiteurs de la γ -sécrétase tente de cibler plus spécifiquement le site de liaison de l'enzyme à APP, pour éviter les réactions croisées (Herrmann *et al.*, 2011).

L'entrée dans la voie non amyloïdogène se fait à travers l'action de l' α -sécrétase et par la libération d'un fragment soluble : l' α -APP (APP α). Ce peptide, à la différence du peptide amyloïde, est non toxique, s'agrège peu et a même des propriétés neuroprotectrices, initiatrices de mémoire et anti-apoptotiques. Diverses molécules pouvant agir sur l'activité de l' α -sécrétase existent, par exemple : l'étazolate, un modulateur spécifique du récepteur GABA qui active l' α -sécrétase et promeut la production de la APP α ; la bryostatine1, activateur de la phosphokinase C, elle-même activatrice de la transcription de l' α -sécrétase. Aucune de ces deux molécules n'est arrivée en phase III d'essai clinique (Herrmann *et al.*, 2011).

Inhibition de l'agrégation d'A β

Comme il a été mentionné auparavant, la forme toxique d'A β semble être l'oligomère soluble et non pas les plaques séniles (Haass et Selkoe 2007). Les thérapies potentielles ciblent la forme toxique d'A β soit pour empêcher l'agrégation d'A β soit pour déstabiliser sa forme oligomérique soluble.

Ainsi, certaines molécules ont été proposées : le tramiprosate qui se lie aux isoformes A β 40 et A β 42 et empêche le changement de conformation nécessaire à l'oligomérisation et à l'apparition des fibrilles et des plaques (Gervais *et al.*, 2007). Lors d'un essai clinique en phase III, il a été observé une amélioration de la mémoire, du langage et des capacités pratiques (Herrmann *et al.*, 2011).

Une autre molécule à effet prometteur sur l'oligomérisation d'A β est le gallate d'épigallocatechine (EGCg), un flavonoïde du thé vert qui se lie à A β 42 et il a été démontré des propriétés protectrices contre ses effets neurotoxiques, *in vitro* (Herrmann *et al.*, 2011).

L'inhibition de l'agrégation est également envisagée par immunothérapie. En effet, la liaison d'anticorps à A β peut prévenir l'agrégation d'A β dans les plaques (Delrieu *et al.*, 2012).

Élimination du peptide A β

La stratégie d'élimination du peptide A β s'appuie principalement sur l'immunothérapie c'est-à-dire l'élimination du peptide A β toxique et/ou agrégé par le système immunitaire. Pour cela, trois voies ont été proposées : i) l'immunisation active par des injections de peptides A β 42 synthétiques entiers ; ii) l'immunisation active par des injections de fragments d'A β conjugués avec des protéines de transport ; iii) l'immunisation passive par injection d'anticorps monoclonaux dirigés contre A β (Delrieu *et al.*, 2012).

L'immunisation directe par des injections de peptides A β 42 synthétiques entiers a été une des premières immunothérapies mis en place. Cependant, cette approche présente certains inconvénients majeurs: encéphalo-méningites ; réponse anticorps faible, reconnaissant peu les auto-antigènes des patients les plus âgés, non

contrôlée ; risque de réaction croisée avec APP et enfin, c'est un mécanisme non réversible fatal pour le patient (Delrieu *et al.*, 2012). C'est ainsi qu'une deuxième génération d'immunothérapies a été élaborée : l'immunisation directe par des injections de fragments d'A β conjugués avec des protéines de transport. Cette technique permet d'éviter une activation incontrôlée des cellules T et augmente la production d'anticorps, sans pour autant améliorer les autres désavantages liés à la première technique (Delrieu *et al.*, 2012).

L'immunisation passive par injection d'anticorps monoclonaux dirigés contre A β a pour avantage de court-circuiter la production d'anticorps par le patient et ainsi d'avoir une meilleure maîtrise de la réponse immune. Cela reste une technique à risques : œdème cérébral vasogénique, microhémorragies, et risque de réponse secondaire anti-idiotypique conséquence des injections répétées (Delrieu *et al.*, 2012).

Deux types d'anticorps ont été largement étudiés récemment : le bapineuzumab (anticorps monoclonal reconnaissant la partie N-terminale d'A β , contenant l'épitope qui active les lymphocytes B) et le solanezumab (anticorps monoclonal humanisé reconnaissant A β soluble) (Delrieu *et al.*, 2012).

Par ailleurs, l'activation des cellules de la microglie pour éliminer le peptide A β a également été envisagée. Les cellules de la microglie constituent un type de cellules gliales qui sont les macrophages du cerveau et en tant que tels, sont les premières et principales formes de système de défense immunitaire du système nerveux central. Cependant, l'activation des cellules de la microglie entourant les plaques dans les cerveaux atteints de la maladie d'Alzheimer peut être une épée à double tranchant: si d'une part, les cellules de la microglie actives peuvent éliminer les A β toxiques, elles peuvent également relâcher des substances inflammatoires (Krstic et Knuesel 2012).

D-4 Stratégies thérapeutiques ciblant la dérégulation de l'homéostasie du cuivre

Comme nous venons de le voir tout au long de ce chapitre, les bases moléculaires de la maladie d'Alzheimer sont loin d'être clairement établies. Cependant, une dérégulation de l'homéostasie de certains ions métalliques dans le

cerveau, en particulier du cuivre et du zinc, semble être impliquée dans la pathogénèse de cette maladie et les caractéristiques neuropathologiques du peptide β amyloïde. Cette observation a conduit en 2008 Bush et collaborateurs à développer une hypothèse, parallèle à celle de la cascade amyloïde, impliquant un rôle aux métaux de transition dans la maladie d'Alzheimer (Bush et Tanzi 2008).

D-4-a Rôle du cuivre au niveau physiologique

Le cuivre est, après le fer et le zinc, le métal de transition le plus abondant dans le corps humain et, en particulier, dans le cerveau (Que *et al.*, 2008). Il est un élément essentiel que nous retrouvons dans notre alimentation. L'absorption du cuivre a lieu essentiellement au niveau des cellules de la muqueuse intestinale. Il est ensuite transporté vers le foie par la veine porte, lié bien souvent à l'albumine et dans une moindre mesure, à des acides aminés ou à des peptides. Le foie est le principal organe de régulation de l'homéostasie du cuivre, et en contient la plus grande quantité, c'est-à-dire 9% de la charge totale de cuivre dans l'organisme (Gagelli *et al.*, 2006). Arrivé dans le foie, le cuivre est transféré à la céruloplasmine qui le transporte dans le plasma pour une distribution aux autres organes. Le cuivre en excès, arrive dans la bile via les canaux biliaires puis est excrété dans les fèces (Hung *et al.*, 2010).

Le cuivre est un métal de transition qui existe essentiellement dans deux états d'oxydation différents : l'ion cuivreux (Cu^+) et l'ion cuivrique (Cu^{2+}). Il se fixe aisément aux protéines et aux enzymes. Il est le cofacteur de diverses enzymes, aux rôles physiologiques primordiaux, telles que la cytochrome c oxydase, la superoxyde dismutase, la tyrosinase, etc. (Hung *et al.*, 2010).

Cependant, étant donné ses propriétés d'oxydo-réduction, le cuivre peut participer au processus de stress oxydant, ce qui en fait un élément potentiellement nocif pour la cellule (Donnelly *et al.*, 2007).

Cuivre et cerveau

Le cerveau est le second organe quant à la charge globale en cuivre puisqu'il en contient 7%, ce qui en fait également un organe clé dans la régulation de l'homéostasie en cuivre. Les mesures de concentration en cuivre dans le cerveau, au niveau intracellulaire ou extracellulaire sont disparates et parfois contradictoires. Ainsi, dans la matière grise, la concentration en cuivre peut être deux à trois fois plus importante que celle de la matière blanche, la concentration extracellulaire en Cu^{2+} dans le sérum est de l'ordre de 10-25 μM tandis qu'elle est de 0,5-2,5 μM dans le liquide céphalo-rachidien, enfin elle est d'environ 15 μM dans la fente synaptique glutamatergique du cortex et de l'hippocampe. Les métaux (plus particulièrement le cuivre, le fer et le zinc) sont essentiels pour le cerveau puisqu'ils jouent des rôles clés dans les activités neuronales telles que la neurotransmission, la synaptogénèse, la neurogénèse, la croissance des neurites, la synthèse des neurotransmetteurs, la phosphorylation oxydante et le transport de l'oxygène (Que *et al.*, 2008, Hung *et al.*, 2010).

Le cuivre dans les neurones

La pénétration du cuivre dans le cerveau se fait par le plexus choroïde (Choi et Zeng 2009), et dans les neurones grâce au transporteur Ctr1. La protéine Ctr1 est exprimée de façon ubiquitaire, avec une présence plus forte au niveau du plexus choroïde. Cette protéine est présente dans le milieu extracellulaire jusqu'à ce qu'un déficit en cuivre induise sa délocalisation dans la membrane. A l'inverse, lorsque la concentration en cuivre est trop forte, Ctr1 est internalisée et dégradée.

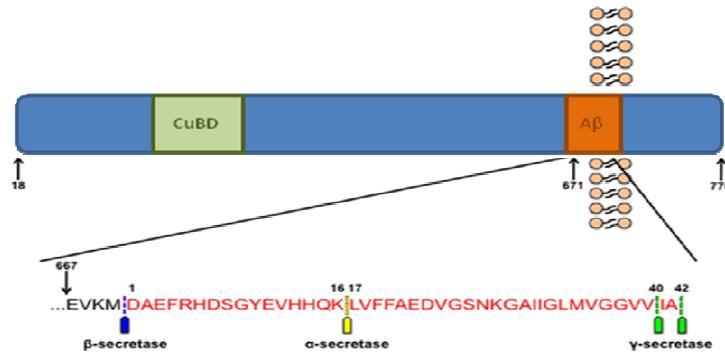


Figure I-4 : Structure de l'APP montrant la localisation du domaine de liaison au cuivre (vert clair) et du peptide A β (orange). L'agrandissement montre la séquence en acides aminés (en rouge) du peptide A β avec les zones de clivage de la β -sécrétase (en bleu), l' α -sécrétase (en jaune) et de la γ -sécrétase (vert) (d'après Lazarov et Demars 2012).

Le cuivre peut également se lier, dès son entrée dans la cellule, au glutathion puis aux métallothionéines, des protéines aux rôles multiples dont la régulation des métaux et des espèces réactives de l'oxygène (Que et al 2008). Dans le contexte de la maladie d'Alzheimer, la métallothionéine 3 joue un rôle important puisqu'une fois sécrétée dans la fente synaptique des neurones, elle va moduler la disponibilité du cuivre relargué lors de la neurotransmission. Elle est également capable de capter le cuivre complexé au peptide A β et participe ainsi à la diminution de la création d'espèces réactives de l'oxygène (Que *et al.*, 2008, Hung *et al.*, 2010).

Deux ATPases sont en charge de l'efflux du cuivre à partir des neurones : l'ATP7A et l'ATP7B. Ce sont des protéines homologues cependant leur expression et distribution sont distinctes. L'ATP7A est exprimée partout dans l'organisme sauf dans le foie et sa fonction principale est de transférer le cuivre aux enzymes à cuivre. L'ATP7B, quant à elle, est exprimée préférentiellement au niveau du foie, du rein, du placenta et dans certaines régions du cerveau et a pour fonction de transférer le cuivre à la céruloplasmine, pour une redistribution du cuivre vers les autres tissus ou bien à la bile pour excréation en cas de détoxification (Hung *et al.*, 2010).

D-4-b Le cuivre et la maladie d'Alzheimer

Le lien entre maladie d'Alzheimer et métaux est connu depuis la découverte de cette maladie et de ses plaques amyloïdes caractéristiques. Il a été montré que le cuivre était présent en grande quantité dans les plaques amyloïdes (Lovell *et al.*, 1998). Cependant, dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, le cuivre est présent en faible quantité (Deibel *et al.*, 1996) et ceci se confirme dans les modèles transgéniques murins (Bayer *et al.*, 2003). Par ailleurs, le cerveau a un métabolisme oxydant intense, ce qui en fait le plus gros consommateur d'oxygène de l'organisme (20% du total), bien qu'il ne représente que 2% de la masse totale du corps et paradoxalement, son activité anti oxydante est réduite (Hung *et al.*, 2010). Cette dualité fait du cerveau un candidat idéal pour le stress oxydant, d'autant plus dans le cadre de la maladie d'Alzheimer.

Le stress oxydant

Le stress oxydant est le résultat d'une rupture de l'équilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène ou ROS (en anglais Reactive Oxygen Species) telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'ion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le radical hydroxyle (HO^{\cdot}) et les mécanismes de défense antioxydants de l'organisme. Le cuivre participe à diverses voies métaboliques dans les organismes vivants et du fait de sa capacité d'oxydo-réduction, il peut également participer à la production de ROS (Halliwell et Gutteridge 1984). Les ROS peuvent réagir avec la plupart des molécules dans une cellule et conduire à des dommages importants dans les fonctions cellulaires par la peroxydation des lipides des membranes, l'oxydation des protéines et la coupure des acides nucléiques (Halliwell et Gutteridge 1984).

Le cuivre et la protéine Tau

In vitro, la protéine Tau peut se lier au cuivre et ainsi participer à des réactions d'oxydo-réduction contribuer au stress oxydant (Ma *et al.*, 2006). Toutefois, le mécanisme exact par lequel le cuivre réussit à agréger Tau reste inconnu.

Les résultats obtenus *in vivo* sont assez contradictoires. L'apport en cuivre sous forme de CuSO_4 dans l'alimentation pendant 9 mois à des souris triple-transgéniques modèles de la maladie d'Alzheimer augmente la quantité d'une isoforme de p-Tau (Kitazawa *et al.*, 2009). Au contraire, le traitement de modèles double-transgéniques avec des complexes de cuivre montrent une réduction significative de la quantité de p-Tau (Crouch *et al.*, 2009).

Le cuivre et la protéine APP

L'APP possède deux domaines de liaison au cuivre, le premier situé à son extrémité N-terminale fixe le cuivre avec une grande affinité et possède une activité de réductase pour Cu^{2+} (Figure I-4). La fonction biologique de cette réductase reste inconnue à l'heure actuelle (Hung *et al.*, 2010). Le deuxième site de fixation est situé dans la séquence correspondant au peptide A β .

Il a été observé que dans des modèles transgéniques cellulaires et animaux de la maladie d'Alzheimer, la modification génétique d'APP provoquait une variation des concentrations en cuivre (Bayer *et al.*, 2003 ; Maynard *et al.*, 2002 ; Phinney *et al.*, 2003 ; Bellingham *et al.*, 2004) : dans le cerveau des animaux transgéniques surexprimant APP, les concentrations en cuivre sont significativement plus basses que dans les témoins (Maynard *et al.*, 2002, Phinney *et al.*, 2003). Ceci se confirme dans les modèles ne surexprimant que les 100 derniers acides aminés de l'APP du côté C-terminal contenant la région d'A β . L'association entre la surexpression d'APP et la déficience en cuivre a conduit à l'hypothèse selon laquelle APP participerait à la chélation du cuivre et peut être à son efflux (Maynard *et al.*, 2002). Cette hypothèse a été vérifiée avec des modèles knockout de souris transgéniques et des cultures cellulaires (Bellingham *et al.*, 2004; Hung *et al.*, 2010).

Inversement, il semble que le cuivre ait une influence sur le métabolisme d'APP : i) en régulant l'expression de la β -sécrétase qui, possédant un domaine de liaison de haute affinité au cuivre dans son domaine C-terminal, peut entrer en compétition avec les enzymes à cuivre telle que la superoxyde dismutase ; ii) par ailleurs, le cuivre en liaison avec la β -sécrétase peut réguler la voie amyloïdogène du

métabolisme d'APP. Ensuite, la concentration intracellulaire en cuivre peut influencer la quantité produite d'APP. Une déficience cellulaire en cuivre promeut la voie amyloïdogène du métabolisme d'APP. Inversement, l'augmentation de cuivre intracellulaire par des modifications du régime alimentaire, l'administration de molécules pharmaceutiques ou des manipulations génétiques favorise le clivage d'APP par l' α -sécrétase tandis que la génération d'A β est atténuée (Hung *et al.*, 2010).

Le cuivre et le peptide A β

Le peptide A β se complexe au cuivre. Il possède en effet, dans sa région N-terminale, des résidus histidines qui constituent un site de fixation très fort pour le cuivre. Cette complexation module l'agrégation du peptide, la formation de plaques, sa neurotoxicité liée aux ROS (Atwood *et al.*, 2004, Hung *et al.*, 2010). La proportion du cuivre par rapport au peptide A β détermine l'espèce oligomérique formée : i) si $Cu^{2+}/A\beta < 1$, les agrégats d'A β sont très stables, résistants aux détergents de type SDS (dodécyl sulfate de sodium) et ont une structure amyloïde, ii) si $Cu^{2+}/A\beta > 1$, les oligomères sont solubles et toxiques pour des cultures cellulaires de neurones (Smith *et al.*, 2007).

En conclusion, nous venons de voir que le cuivre peut avoir deux facettes dans le contexte de la maladie d'Alzheimer. Dans certains cas, il est soupçonné d'avoir un rôle néfaste sur le développement de la maladie d'Alzheimer et dans d'autres cas, un rôle positif. Dans ce contexte, différentes thérapies ont été proposées.

Considérant le cuivre comme aggravant le processus pathologique de la maladie, des thérapies faisant intervenir des chélateurs des métaux de transition ont été proposées, et des résultats prometteurs ont été obtenus. Ces chélateurs sembleraient agir comme des ionophores en fixant le cuivre extracellulaire pour former des complexes métalliques perméables au travers des membranes, diminuant ainsi l'agrégation d'A β au niveau extracellulaire et réduisant la génération de ROS. Parmi ces chélateurs, le clioquinol a été proposé (Figure I-5). Dans le cerveau de souris

transgéniques modèles de la maladie, le clioquinol diminue la formation de plaques amyloïdes et retire le peptide amyloïde des plaques déjà formées (Tardito *et al.*, 2012). L'étude de ce chélateur s'est poursuivie jusqu'en essai clinique de phase II, dont les résultats étaient encourageants, mais du fait d'effets secondaires indésirables et de la difficulté à réguler l'effet chélateur de ces composés, ces essais ont dû être interrompus (Donnelly *et al.*, 2008 ; Cherny *et al.*, 2001).

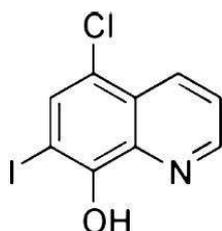


Figure I-5 : Schéma représentant la structure du clioquinol (5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoline) (d'après Crouch et Barnham 2012).

A l'inverse, d'autres thérapies proposent d'augmenter la concentration de cuivre dans l'organisme. Ainsi, une nouvelle approche dans la modulation de l'homéostasie des ions métalliques propose le complexe de cuivre et de bis(thiosemicarbazone), le Cu(gtsm), pour moduler la distribution intracellulaire du cuivre (Figure I-6). Le traitement de cellules modèles de la maladie avec Cu(gtsm) a montré une activation des voies de signalisation cellulaires telles les voies de dégradation de A β ou bien l'augmentation de la phosphorylation de la glycogène synthase kinase 3 β (GSK3 β), impliquée dans la phosphorylation de Tau (Crouch et Barnham 2012). Cette approche a été étendue à un modèle de souris transgénique de la maladie et des effets similaires ont été observés *in vivo* dans les cerveaux des souris modèles ainsi qu'une réduction de la quantité de protéine Tau phosphorylée. Il est important de noter que ce traitement résulte en une amélioration de la cognition de l'animal traité. Il est proposé que le complexe Cu(gtsm), très perméables au travers des membranes, augmente la biodisponibilité intracellulaire du cuivre grâce à la réduction intracellulaire du cuivre qui le dissocie de son ligand et le rend à nouveau biodisponible pour activer des voies neuroprotectrices.

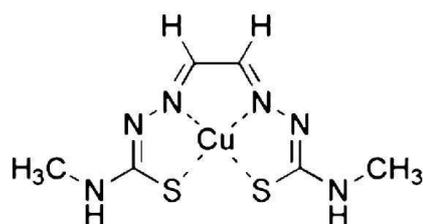


Figure 1-6 : Schéma représentant la structures du Cu(gtsm) (glyoxalbis(N(4)-methylthiosemicarbazone) (d'après Crouch et Barnham 2012).

Dans ce contexte et afin de mieux connaître le mécanisme d'action intracellulaire des bis(thiosemicarbazones) en tant que molécules proposées pour le traitement de la maladie d'Alzheimer, l'objectif de ce travail est de répondre aux questions suivantes:

1. Quelle est la concentration intracellulaire de cuivre lorsque les cellules sont incubées avec différents complexes de bis(thiosemicarbazones)?
2. Quelle est la force motrice responsable de l'accumulation des complexes dans les cellules?
3. Où s'accumulent ces complexes dans les cellules?
4. Est-ce que ces complexes sont substrats de P-glycoprotéine (P-gp), un transporteur de la famille ABC présent au niveau de la BHE et qui participe à la faible perméabilité de cette barrière ?
5. Y a-t-il une réduction intracellulaire détectable des ions cuivriques dans les cellules?

Chapitre II

Matériel et Méthodes

A- Matériel

A-1 Les appareils

Le Spectromètre d’Absorption Atomique (SAA)

Les concentrations de cuivre ont été déterminées au moyen d’un spectromètre d’absorption atomique de type Zeeman SpectrAA-220Z (Varian).

Le Spectromètre à Résonance Paramagnétique Électronique (RPE)

Les spectres RPE ont été enregistrés sur un spectromètre RPE Bruker ELEXSYS 500, fonctionnant à fréquence constante ($\nu \sim 9.4$ GHz, bande X), équipé d’une cavité TE standard (Bruker), d’un cryostat à flux continu d’hélium liquide (Oxford Instrument) à une température de -223°C . Les échantillons ont été placés dans des tubes RPE en quartz de 4 mm.

Le Spectrophotomètre d’Absorption UV - visible

Les spectres d’absorption dans le visible ont été enregistrés à température ambiante à l’aide d’un spectrophotomètre Cary 300 Scan (Varian) à double faisceau.

Le Spectrofluorimètre

Les spectres de fluorescence et les cinétiques d’évolution du signal fluorescent en fonction du temps ont été enregistrés à l’aide d’un spectrofluorimètre Perkin Elmer LS50B couplé à un thermostat Thermomix 1441/Frigomix 1495 afin de maintenir la température à 37°C . Les échantillons sont placés dans une cuve de quartz de 1 cm^2 de section et un système d’agitation magnétique a permis le maintien des cellules en suspension homogène.

La Microscopie Electronique en Transmission (MET)

Les expériences de microscopie électronique en transmission ont été réalisées avec un microscope Philips CM10 80 kV (FEI, Oregon, USA) et les coupes ultra-fines (100 nm) des échantillons ont été faites avec un microtome (Reichert-Jung Ultracut E).

Le Compteur de cellules

Les cellules ont été comptées au moyen d'un Coulter Counter Z2 (Beckman).

Les Centrifugeuses

Les centrifugations ont été réalisées avec une centrifugeuse Eppendorf modèle 5702R ou avec des micro-centrifugeuses, CAPSULE TOMY, modèle HF-120.

Le pH-mètre

Les mesures de pH ont été effectuées à température ambiante avec un pH mètre Cyber Scan pH 500 (Eutech Instruments) combiné à une microélectrode.

A-2 Produits utilisés et préparation

Les complexes de cuivre

Les complexes de cuivre et de bis(thiosemicarbazones) ou [Cu(btsc)] nous ont été fournis par le Professeur Heloisa Beraldo, de l'Université Fédérale de Minas Gerais (Brésil). Nous avons étudié sept complexes qui se différenciaient de par la nature de leurs groupements latéraux, identiques deux à deux (R1 et R2) (Figures II-1 et II-2). Les complexes de cuivre ont été divisés en deux séries. Dans la série "g", R1 = H et dans la série "a", R1 = CH₃. Les complexes de cuivre ont été dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) et la concentration des solutions déterminée par spectrométrie d'absorption atomique. Toutes les solutions stocks ont ensuite été diluées à une concentration finale de 2 mM. Le volume de DMSO utilisé dans les expériences a toujours été inférieur à 1,5 % du volume final.

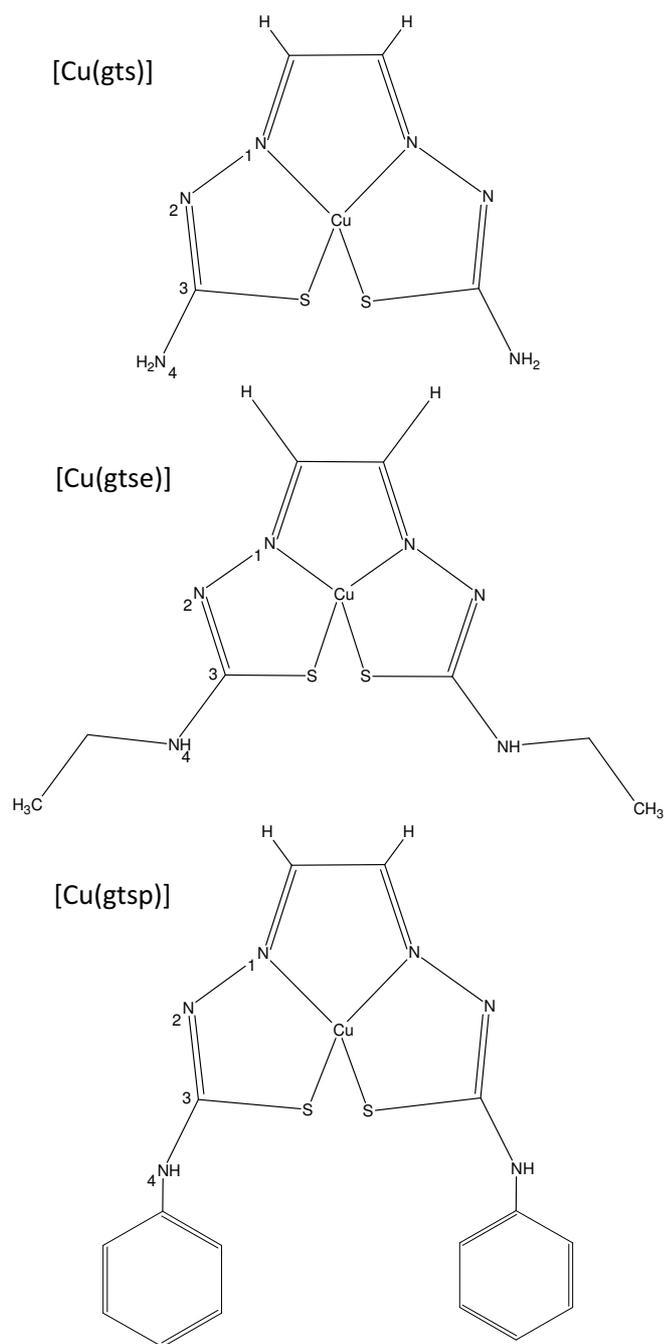


Figure II-1 : Complexes de cuivre [Cu(btsc)] série "g" : [Cu(gts)] = glyoxaldéhyde bis(thiosemicarbazone) de cuivre(II) ; [Cu(gtse)] = glyoxaldéhyde bis(*N*(4)-éthylthiosemicarbazone) de cuivre(II) ; [Cu(gtsp)] = glyoxaldéhyde bis(*N*(4)-phénylthiosemicarbazone) de cuivre(II).

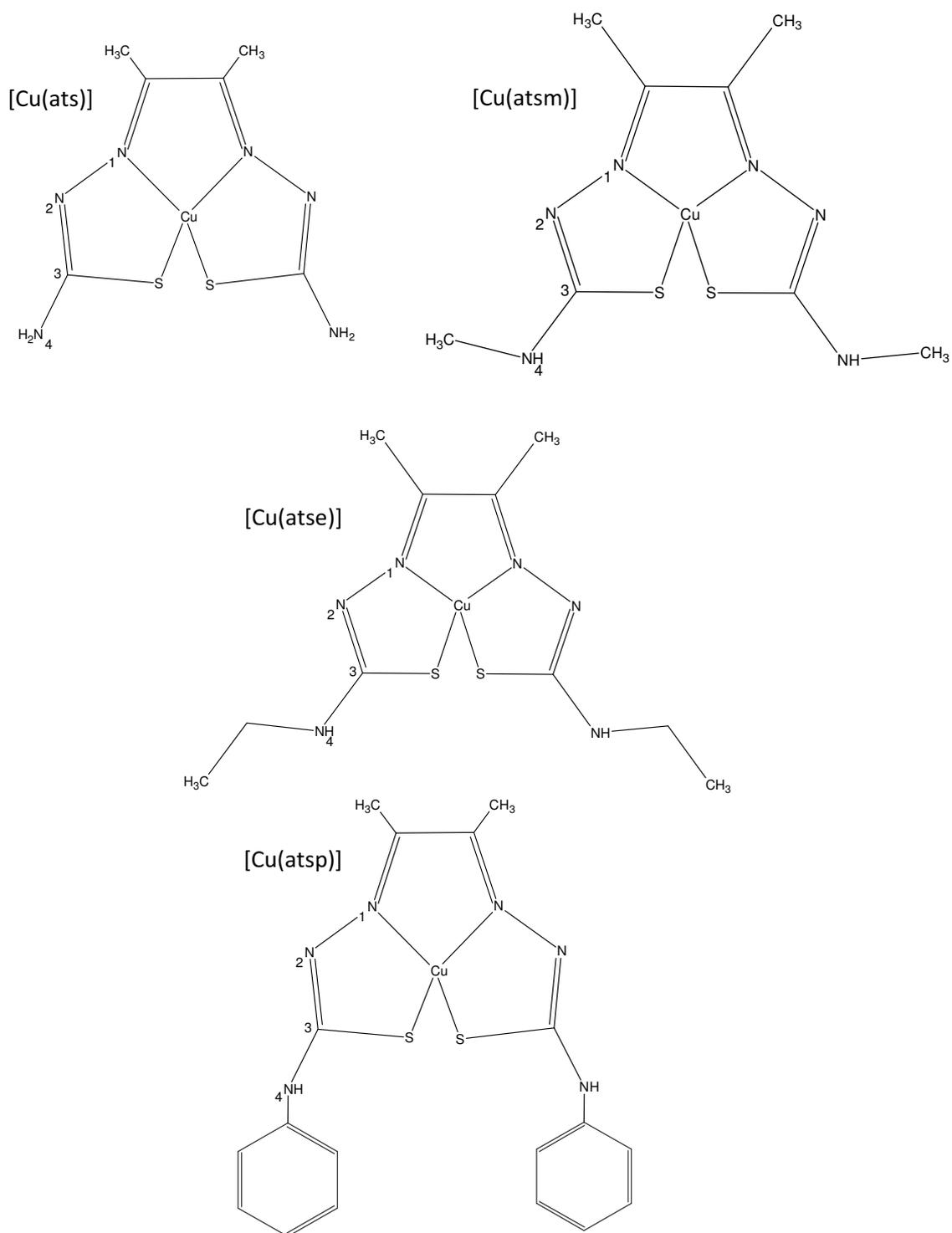


Figure II-2 : Complexes de cuivre [Cu(btsc)] série "a" : [Cu(ats)] = diacétyl-bis(thiosemicarbazone) de cuivre(II) ; [Cu(atism)] = diacétyl-bis(*N*(4)-méthylthiosemicarbazone) de cuivre(II) ; [Cu(atse)] = diacétyl-bis(*N*(4)-éthylthiosemicarbazone) de cuivre(II) ; [Cu(atsp)] = diacétyl-bis(*N*(4)-phénylthiosemicarbazone) de cuivre(II).

Les anthracyclines

Les anthracyclines utilisées sont la doxorubicine (Teva) et la pirarubicine (Theprubicine, Aventis). Les solutions d'anthracyclines ont été préparées avec de l'eau ultra-pure juste avant leur utilisation. La concentration des solutions en anthracyclines a été déterminée par absorption dans le visible sachant que le coefficient d'absorption à 480 nm des anthracyclines est $11500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Les produits utilisés pour la préparation des échantillons pour la microscopie électronique en transmission

Le tampon de Karnovsky est utilisé pour fixer les cellules. Il est composé de 4% de paraformaldéhyde (PAF, Euromedex), 5% de glutaraldéhyde (Euromedex) et 4,5 mM de chlorure de sodium (NaCl_2) en tampon cacodylate de sodium 0,2 M.

Le tétr oxyde d'osmium 1% est utilisé comme fixateur et agent contrastant en microscopie électronique en transmission. Pour obtenir cette solution, une ampoule de tétr oxyde d'osmium à 2% (Electron Microscopy Sciences) est diluée de moitié dans du tampon cacodylate de sodium 0,2 M.

L'inclusion des échantillons en microscopie électronique en transmission s'effectue dans une résine époxy constituée de 25% de dodécényl anhydride succinique (DDSA, Biovalley), de 25% d'anhydride nadique de méthyle (MNA, Biovalley) et de 50% de résine Epon 812 (Biovalley). Quelques gouttes d'un agent accélérateur, le tris-(diméthylaminométhyl)phénol (DMP30, Euromedex) sont ajoutées au dernier moment (200 μL pour 100 mL).

L'oxyde de propylène ainsi que les capsules d'inclusion (BEEM embedding capsules, taille 3) proviennent de chez Electron Microscopy Sciences.

Les solutions tampons

Dans toutes nos expériences d'incubation avec les cellules, nous avons utilisé le tampon HEPES/ Na^+ , composé de : NaCl (132 mM), KCl (3,5 mM), MgCl_2 (0,5 mM), CaCl_2 (1mM), HEPES (20 mM). Cette solution tampon, complétée par 5 mM de glucose,

permet la survie des cellules durant les expériences. L'HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethane-sulfonique] provient de chez Sigma-Aldrich. Les autres constituants du tampon HEPES/Na⁺ proviennent de chez Carlo Erba.

Le tampon cacodylate de sodium est utilisé lors des expériences en microscopie électronique en transmission, à une concentration finale de 0,2 mM pour la préparation des solutions et de 0,1 mM pour les lavages. Le cacodylate de sodium (Electron Microscopy Sciences) est dilué dans de l'eau ultra-pure et le pH est ajusté à 7,2-7,4 avec du HCl à 0,1 N.

Autres produits

Le bleu de Trypan 0,1 % (Sigma-Aldrich) a été solubilisé dans l'eau ultra-pure. Il permet de tester la viabilité des cellules.

Le FCCP (carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy) phenyl hydrazone, Sigma-Aldrich) est un protonophore découpleur de la phosphorylation oxydante des mitochondries. A des concentrations de l'ordre du micromolaire, le FCCP est capable de dépolariiser la membrane mitochondriale (Tretter et al., 1998; Smith et al., 1999). Le FCCP a été dissous dans l'éthanol à une concentration de 1 M et conservé à -20°C.

La concanamycine A (Sigma-Aldrich) est un inhibiteur spécifique de la pompe H⁺-ATPases. La concanamycine A a été dissoute dans l'éthanol à une concentration finale de 1 M et conservée à -20°C.

Le volume d'éthanol utilisé dans les expériences a toujours été inférieur à 0,5 % du volume final.

Le Triton X-100 (Sigma-Aldrich), dissous dans l'eau ultra-pure (4 %, w/v), a été utilisé pour perméabiliser les membranes cellulaires.

La solution standard de cuivre Spectro Pure provient de chez Varian.

Les solvants utilisés proviennent de chez Carlo Erba.

A-3 Les lignées cellulaires

Les cellules K562 et K562/ADR

La lignée cellulaire K562 est une lignée érythrolymphoblastique d'origine humaine isolée à partir d'une leucémie myéloïde (Lozzio et Lozzio 1975). Nous avons disposé de la lignée sensible (K562) et de la lignée résistante (K562/ADR). Les cellules K562/ADR surexpriment la P-gp, protéine membranaire responsable du phénotype MDR (résistance multi-drogue). Ces deux lignées nous ont été fournies par le Pr. J.P. Marie (Hôpital de l'hôtel Dieu, Paris). Les cellules K562/ADR tout comme les K562 sont des cellules cultivées en suspension ne formant pas d'agrégats.

Les cellules K562 ont été cultivées en milieu RPMI 1640 Glutamax (GIBCO) supplémenté avec 10% de sérum de veau nouveau-né décomplémenté (GIBCO) et 0,1 g/L d'un mélange de pénicilline et de streptomycine (GIBCO). La culture est initialisée avec 10^5 cellules/mL tous les trois jours. La veille de l'expérience, les cellules sont mises en culture à $5 \cdot 10^5$ cellules/mL afin d'avoir des cellules en phase exponentielle de croissance lors de la manipulation.

La résistance des K562/ADR a été entretenue par traitement à la doxorubicine (400 μ M) toutes les trois semaines et vérifiée par spectrofluorimétrie. Pour cela, les cellules K562 et K562/ADR sont incubées avec une molécule fluorescente, la pirarubicine, substrat de la P-gp et dont la fluorescence s'éteint lorsqu'elle entre dans le noyau et s'intercale dans les paires de base de l'ADN. La méthode de vérification de la résistance sera décrite postérieurement.

Les cellules hCMEC/D3

Les cellules hCMEC/D3 nous ont été fournies par le Dr. Pierre Olivier Couraud (Institut Curie, Paris). Ces cellules, sont des cellules endothéliales de cerveau humain immortalisées à partir d'une culture primaire après transduction par des vecteurs de type lentivirus codant pour la sous-unité catalytique de la télomérase humaine et l'antigène du SV40 T. Elles ont été cultivées dans du milieu de culture EBM 2 (Endothelial Basal Medium) (Lonza) complémenté de 5% de sérum de veau foetal, 1,4 μ M d'hydrocortisone, 5 μ g/mL d'acide ascorbique, 10 mM d'HEPES, 1 ng/mL bFGF (en

anglais basic fibroblast growth factor), de 1% de concentré de lipides et de 0,1 g/L d'un mélange de pénicilline et de streptomycine (GIBCO).

Les cellules SH-SY5Y

Les cellules SH-SY5Y (ATCC®) sont des neuroblastomes de troisième génération issus d'une culture primaire de métastases de moelle osseuse pouvant se différencier en cellules neuronales lorsque le nombre de passages dépasse les 20 ou en utilisant de l'acide rétinoïque. Les SH-SY5Y sont des cellules adhérentes, ainsi le passage et l'utilisation des cellules SH-SY5Y pour les expériences se font au troisième jour de culture.

Leur milieu de culture est composé d'un volume de milieu Milieu Essentiel Minimum d'Eagle (MEME, Sigma-Aldrich) pour un volume de milieu HAM F12 (Sigma-Aldrich), supplémentés de 0,1 mM d'un mélange d'acides aminés non-essentiels (NEAA 100X, Sigma-Aldrich), de 2 mM de L-glutamine, de 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (GIBCO) et de 0,1 g/L d'un mélange de pénicilline et de streptomycine (GIBCO). Le milieu de culture est refait régulièrement car certains composants, tel que la L-Glutamine, se dégradent vite.

La culture cellulaire

Toutes les cellules sont cultivées sous atmosphère humide à 5 % de CO₂.

Les cellules adhérentes hCMEC/D3 et SH-SY5Y ont été placées dans des flacons de culture T 25 cm², à confluence les cellules sont repiquées : l'ancien milieu de culture est enlevé, les cellules sont lavées une fois avec du PBS stérile puis détachées après incubation avec 1 mL de trypsine-EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique), diluée au tiers dans du tampon phosphate salin (PBS) stérile, pendant 5 min à 37°C pour les hCMEC/D3 et 2 min à température ambiante pour les SH-SY5Y. L'action de la trypsine est arrêtée avec 3 mL de milieu de culture contenant du sérum de veau fœtal. Lorsque les cellules sont bien homogénéisées par passages répétitifs à la pipette, 100 µL de la suspension cellulaire sont prélevés pour comptage avec le compteur de cellules et le reste de la suspension cellulaire est centrifugé 10 min à 1000

tours/minutes (environ $1,6 \cdot 10^{-3}$ g) à 25°C. Le culot cellulaire est finalement resuspendu dans du milieu de culture à $0,3 \cdot 10^6$ cellules/mL pour les cellules hCMEC/D3 et $0,2 \cdot 10^6$ cellules/mL pour les cellules SH-SY5Y.

Test de viabilité des cellules

Afin de vérifier la viabilité des cellules durant les expériences, un test d'exclusion du bleu de Trypan est fait à chaque expérience. A cet effet, un volume de la suspension cellulaire est dilué de moitié avec un volume de la solution de bleu de Trypan 0,1 %, et les cellules sont comptées à l'aide d'une cellule de Malassez. Les cellules mortes sont colorées en bleu, car leur membrane est devenue perméable au bleu de Trypan. Le pourcentage des cellules mortes est calculé et les cellules sont considérées viables quand ce pourcentage est inférieur à 5 %.

B-Méthodes

B-1 Transport des complexes de cuivre dans les cellules: étude par spectroscopie d'absorption atomique

K562/ADR, hCMEC/D3 et SH-SY5Y

Toutes les expériences d'étude de l'incorporation des complexes de cuivre dans les cellules suivent les mêmes protocoles d'incubation et de dosage par spectroscopie d'absorption atomique.

Le prélèvement des cellules adhérentes (hCMEC/D3 et SH-SY5Y) se réalise selon les mêmes conditions établies pour leur culture respective, en utilisant la trypsine. Les cellules sont ensuite centrifugées et lavées une fois dans le tampon HEPES/Na⁺. Le prélèvement des cellules en suspension (K562 et K562/ADR) se fait directement puis les cellules sont centrifugées, lavées et resuspendues dans le tampon HEPES/Na⁺.

Les cellules (10^6 cellules/mL) sont incubées à 37°C sous agitation constante dans le tampon HEPES/ Na^+ contenant 5 mM de glucose. Le début de la cinétique d'incubation est marqué par l'ajout de 30 μM de complexes de cuivre. Au temps zéro ($t=0$) et après des intervalles de temps choisis, 1 mL de la suspension cellulaire (soit 10^6 cellules) est prélevé et centrifugé 30 secondes afin de séparer le culot cellulaire du surnageant. Les culots sont lavés deux fois puis mis à incuber toute la nuit à 4°C dans 300 μL d'acide nitrique 65%. Le lendemain, les culots sont complétés avec de l'eau ultra-pure, jusqu'à 1 mL de volume final et gardés à 4°C jusqu'à leur dosage en spectroscopie atomique d'absorption. Les surnageants sont directement gardés à 4°C jusqu'à leur dosage en spectroscopie atomique d'absorption le lendemain.

La concentration en cuivre dans chaque échantillon a été mesurée par spectroscopie d'absorption atomique après avoir réalisé une gamme d'étalonnage (0 ; 0,1 ; 0,2 et 0,4 μM) à partir de la solution de cuivre standard. La gamme est réalisée dans les mêmes conditions que celles des échantillons c'est-à-dire dans de l'eau ultra-pure contenant 30 % d'acide nitrique. La concentration en cuivre mesurée dans les surnageants correspond à la concentration extracellulaire C_e . La concentration en cuivre mesurée dans les culots et rapportée au volume moyen d'une cellule (10^{-12} L) correspond à la concentration intracellulaire C_i . Le rapport $C_i/(C_e + C_i)$ a été calculé et présenté en fonction du temps.

L'incorporation des sept complexes de cuivre a été testée sur les cellules K562, K562/ADR et hCMEC/D3 tandis que seuls les complexes $[\text{Cu}(\text{gts})]$ et $[\text{Cu}(\text{atse})]$ ont été testés sur les cellules SH-SY5Y. Ces derniers ont été choisis comme représentants de leur série.

Incorporation des complexes $[\text{Cu}(\text{gts})]$ et $[\text{Cu}(\text{gtse})]$ dans les cellules K562 sans énergie

Les cellules K562 et K562/ADR (10^6 cellules/mL) ont été incubées, à 37°C, dans le tampon HEPES/ Na^+ mais cette fois-ci sans glucose et en présence de 5 mM d'azoture de sodium (NaN_3) et de 5 mM du 2-déoxyglucose, ces cellules seront appelées par la suite "cellules sans énergie". En effet, le traitement simultané de NaN_3 et de 2-

déoxyglucose déplete les cellules en ATP provenant de la voie mitochondriale ou de la glycolyse permettant ainsi de bloquer le fonctionnement de pompes membranaires nécessitant l'ATP. Après 30 min d'incubation avec NaN_3 et le 2-déoxyglucose, 30 μM de complexes de cuivre ont été ajoutés à la suspension cellulaire. L'étude de l'incorporation se fait comme indiqué auparavant.

Effet des potentiels membranaires sur l'incorporation intracellulaire des complexes

Afin d'étudier l'influence du potentiel membranaire des mitochondries et l'effet du gradient de pH des lysosomes sur l'incorporation des complexes de cuivre dans les cellules, l'incorporation des complexes de cuivre dans les cellules K562 a été suivie par spectroscopie d'absorption atomique dans des conditions de potentiel membranaire et de gradient de pH intacts ou annulés.

- potentiel membranaire mitochondrial et FCCP

Les cellules K562 ont été incubées dans le tampon HEPES/ Na^+ plus 5 mM de glucose additionné au préalable d'1 μM de FCCP qui permet d'éliminer le gradient de potentiel membranaire mitochondrial (condition où $\Delta\psi_{\text{mit}} = 0$). Les prélèvements s'effectuent ensuite comme indiqué dans le protocole commun.

- potentiel membranaire lysosomal et CCA

La concanamycine A est un inhibiteur des pompes H^+ -ATPases, elle annule donc le gradient de pH entre la lumière des lysosomes (compartiment acide) et le cytosol. Les cellules K562 ont été mises à incuber comme indiqué ci-dessus dans le tampon d'incubation complété de 20 nM de concanamycine A. Les prélèvements s'effectuent ensuite comme indiqué dans le protocole commun.

B-1-b Etude de l'efflux des complexes [Cu(gts)] et [Cu(at-sm)] dans les cellules K562 et K562/ADR

Après incubation d'une heure avec les complexes, les cellules sont centrifugées, lavées dans du tampon froid et remises à incuber à 37°C sous agitation constante dans le même volume de tampon HEPES/Na⁺, contenant 5 mM de glucose uniquement. Au temps zéro (t=0) et après des intervalles de temps choisis, 1 mL de la suspension cellulaire (soit 10⁶ cellules) est prélevé et centrifugé 30 secondes afin de séparer le culot cellulaire du surnageant.

B-2 Etude des complexes de cuivre par résonance paramagnétique électronique (RPE)

Les études par résonance paramagnétique électronique ont concerné les cellules K562 incubées avec les complexes de cuivre [Cu(gts)] et [Cu(at-sm)]. Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec le Dr. Pierre Dorlet du CEA de Saclay.

B-2-a Spectres RPE des complexes de cuivre en solution

Les complexes de cuivre ont été dilués à une concentration finale de 30 μM, soit dans leur solvant (DMSO) soit dans le tampon (HEPES/Na⁺). Des aliquots sont transférés dans des tubes RPE en quartz de 4 mm et congelés dans l'azote liquide à différents temps. Les tubes sont gardés dans l'azote liquide jusqu'à la mesure par résonance paramagnétique électronique.

B-2-b Spectres RPE des complexes de cuivre dans la suspension cellulaire

Les cellules (10⁶ cellules/mL) sont incubées à 37°C sous agitation dans le tampon HEPES/Na⁺ contenant 5 mM de glucose et 30 μM du complexe à tester. Après des intervalles de temps choisis, 1 mL de la suspension cellulaire est prélevé puis immédiatement congelé dans l'azote liquide. Les tubes sont gardés dans l'azote liquide jusqu'à la mesure en RPE.

B-3 Spectres d'absorption électronique des complexes

Les spectres d'absorption des complexes de cuivre dans le tampon, en présence ou absence de cellules, ont été enregistrés par spectroscopie en UV – visible, entre 250 et 750 nm. Ainsi, dans une cuve contenant 2 mL de tampon HEPES /Na⁺, avec (2.10^6 de cellules K562) ou sans cellules, 30 µM de complexes de cuivre ont été ajoutés et les spectres d'absorption ont été enregistrés à différents temps.

B-4 La microscopie électronique en transmission

Les cellules (4 mL à 1.10^6 cellules/mL) ont été incubées pendant une heure à 37°C sous agitation dans du tampon HEPES/Na⁺ contenant 5 mM de glucose et 30 µM de chaque complexe de cuivre. Les cellules K562 témoins ont subi les mêmes conditions d'incubation sans les complexes de cuivre. Les cellules ont ensuite été centrifugées et resuspendues dans 1 mL de tampon HEPES/Na⁺ froid puis transférées dans un tube de 1,5 mL et mises dans la glace.

La fixation des culots cellulaires se réalise en plusieurs étapes. Une première étape consiste à fixer les culots cellulaires avec le tampon de Karnovsky. Pour cela, une préfixation est effectuée en ajoutant 100 µL de tampon de Karnovsky 0,2 M aux suspensions cellulaires puis en laissant incubé 2 min dans la glace. Puis, les suspensions cellulaires sont centrifugées, les surnageants jetés et 500 µL de tampon de Karnovsky (500µL) sont ajoutés directement aux culots préfixés et le tout est incubé 2h dans la glace. Les culots sont ensuite lavés trois fois dans le tampon cacodylate de sodium 0,1 M. La dernière étape de fixation des échantillons est une étape de fixation et de marquage des membranes cellulaires grâce au tétr oxyde d'osmium (OsO₄) pendant laquelle les culots cellulaires sont mis à incubé 1 h dans la glace en présence de 500 µL d'OsO₄ 1%. Les culots sont alors lavés trois fois dans le tampon cacodylate de sodium 0,1 M.

S'en suivent différentes étapes de déshydratation des échantillons. Durant la première étape, les échantillons sont mis à incubé toute la nuit à 4°C avec de l'éthanol 30%. Les étapes suivantes se réalisent à température ambiante, les culots sont alors incubés 20 min avec des solutions à pourcentages volumiques croissants

d'éthanol : 50%, 60%, 70%, 80%, 90% et 100%. Entre chaque changement de solution d'éthanol, les échantillons sont rincés dans la solution d'éthanol à concentration supérieure. La dernière incubation dans l'éthanol 100% se fait deux fois.

Après lavage des culots avec l'oxyde de propylène absolu, ces derniers sont mis à incuber 20 min à température ambiante dans 500 µL oxyde de propylène absolu.

Enfin, les culots sont inclus dans une résine Epon. Pour cela, une première étape de transition est effectuée en incubant les échantillons dans 500 µL d'un mélange oxyde de propylène – Epon (1 :1) pendant la nuit en laissant le tube ouvert. L'oxyde de propylène s'évapore et il ne reste plus que l'échantillon dans l'Epon. Une goutte d'Epon est déposée au fond des capsules d'inclusion à fond conique puis le culot y est introduit avec une spatule et enfin le tout est recouvert d'Epon. Après 1 h de repos à température ambiante, les capsules sont mises dans un incubateur pendant 48 h à 60°C. Les coupes des échantillons de 100 nm d'épaisseur sont montées sur une grille en cuivre 200 mesh puis observées au microscope électronique en transmission.

B-5 Evaluation de la résistance de la lignée cellulaire K562/ADR

Afin d'évaluer la résistance des cellules K562/ADR, nous avons suivi par spectrofluorimétrie l'accumulation de la pirarubicine (Pira) qui est un substrat de la P-gp. La Pira a été choisie pour la réalisation de ces essais parce qu'elle possède une vitesse d'influx plus importante comparée aux autres anthracyclines telle que la doxorubicine (Tarasiuk *et al.*, 1989; Pereira *et al.*, 1994).

Les anthracyclines ont la propriété de s'intercaler entre les paires de bases de l'ADN produisant un effet antimétabolique, en inhibant la topoisomérase II, d'où leur utilisation en chimiothérapie anti-cancéreuse. Elles sont par ailleurs fluorescentes. Ainsi, leur entrée dans les cellules est suivie par leur accumulation dans le noyau et leur intercalation entre les paires de base de l'ADN, ce qui provoque une extinction de leur signal fluorescent. Cette propriété est utilisée pour suivre l'incorporation de ces molécules, telle que la Pira, en fonction du temps par spectrofluorimétrie (Frezard et Garnier-Suillerot 1991). La concentration de drogue accumulée dans les cellules peut être quantifiée puisque le signal fluorescent est proportionnel à la concentration de

drogue.

La variation du signal de fluorescence en fonction du temps a été enregistrée à la longueur d'onde d'émission maximale de la Pira ($\lambda_{em} = 590 \text{ nm}$ et $\lambda_{ex} = 480 \text{ nm}$) (Figure II-3).

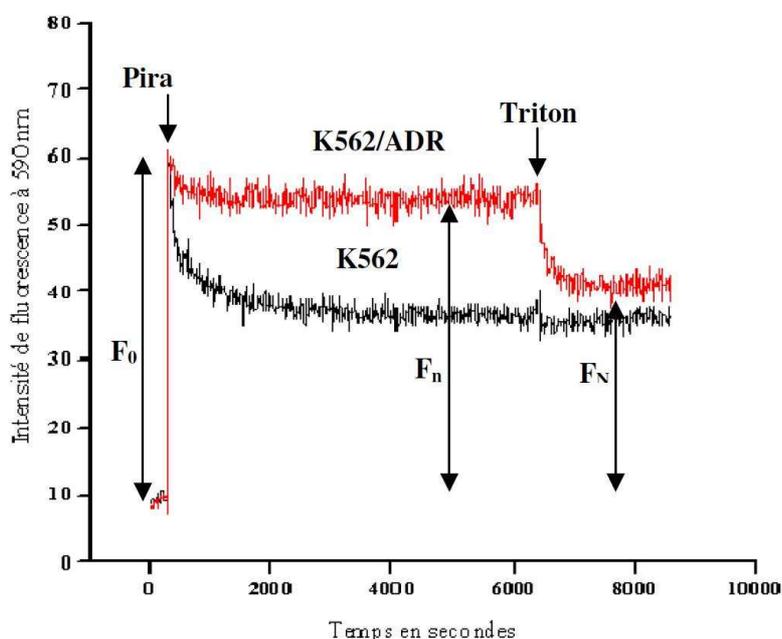


Figure II-3 : Cinétique d'entrée de la Pirarubicine ($1\mu\text{M}$) dans les cellules K562 sensibles (K562) et résistantes (K562/ADR). La variation de l'intensité de fluorescence a été enregistrée à 590 nm ($\lambda_{ex}= 480 \text{ nm}$).

En pratique, les cellules (10^6 cellules/mL) sont incubées dans un tampon HEPES/ Na^+ contenant 5mM de glucose dans une cuvette de quartz de 1cm^2 de section. La cuvette est placée sous agitation, à une température de 37°C , dans le compartiment du spectrofluorimètre. Au temps $t=0$, $1\mu\text{M}$ de Pira, correspondant à la concentration totale de drogue, est additionné aux cellules et le signal de fluorescence enregistré au temps $t=0$ est alors F_0 (Figure II-3). Une diminution du signal fluorescent (F) est observée en fonction du temps jusqu'à atteindre un état stationnaire après environ 30 min où l'intensité de fluorescence est F_n . Sachant que le signal F mesuré est proportionnel à la concentration de drogue extracellulaire, la concentration de Pira intercalée dans le noyau (C_n) peut être donc déterminée: $C_n = C_T (F_0 - F_n) / F_0$.

Le Triton 4% est ajouté aux cellules à l'état stationnaire car il perméabilise les membranes et supprime ainsi l'effet de la compartimentation, amenant ainsi

l'incorporation de la Pira à l'état d'équilibre. Le signal fluorescent est alors F_N et la concentration de Pira intercalée dans le noyau est $C_N = C_T (F_0 - F_N) / F_0$.

Les cellules résistantes K562/ADR incorporent moins de Pira que les cellules sensibles K562 et c'est seulement après l'ajout du Triton que le taux de Pira incorporée devient équivalent dans les deux lignées cellulaires (Figure II-3). Cette moindre accumulation de la Pira dans les cellules résistantes a été expliquée par une modification au niveau de son transport membranaire et plus spécialement par son efflux par la P-gp (Frezard et Garnier-Suillerot 1991).

Chapitre III

Résultats

A- Caractérisation spectroscopique des complexes de cuivre

A-1 Spectres d'absorption électronique des complexes de cuivre

A-1-a Spectres d'absorption électronique des complexes de cuivre en solution dans le DMSO

Tous ces complexes sont parfaitement solubles dans le DMSO, les solutions sont limpides et leurs spectres d'absorption peuvent être très aisément enregistrés.

La Figure III-1 montre les spectres d'absorption enregistré entre 250 et 700 nm des complexe [Cu(btsc)] en solution dans le DMSO à une concentration de 2 mM. Ces spectres sont très similaires avec des bandes de forte intensité respectivement à 520 nm (épaulement), ~ 470 nm, ~354 nm (épaulement) et ~310 nm. Ces spectres n'évoluent pas en fonction du temps. Les spectres des ligands seuls présentent tous une bande de forte intensité à ~340 nm (Figure III-2).

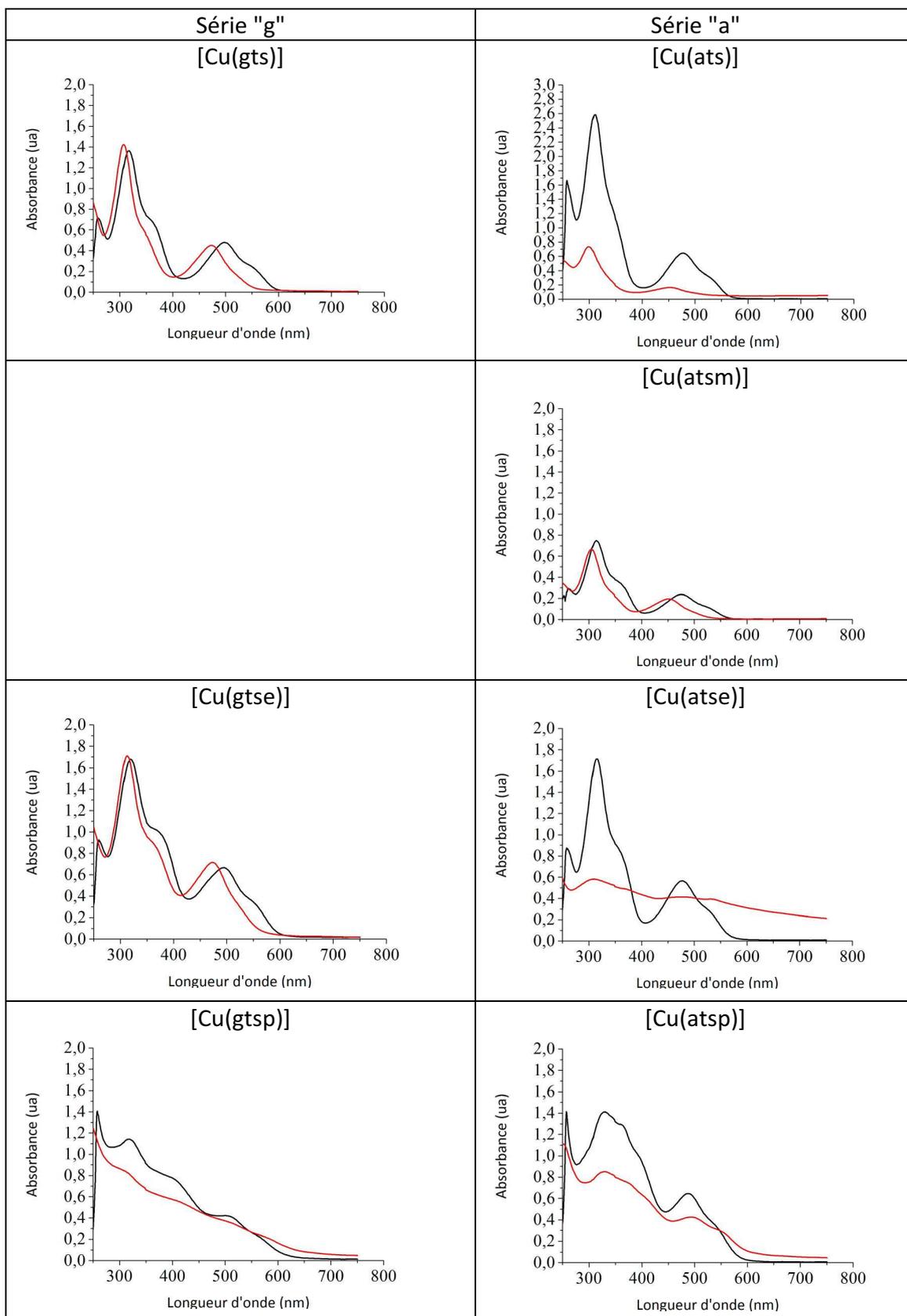


Figure III-1 : Spectres d'absorption électronique des complexes en solution dans le DMSO (en noir) et en "solution" dans le tampon HEPES/Na⁺ après 10 min d'incubation (en rouge).

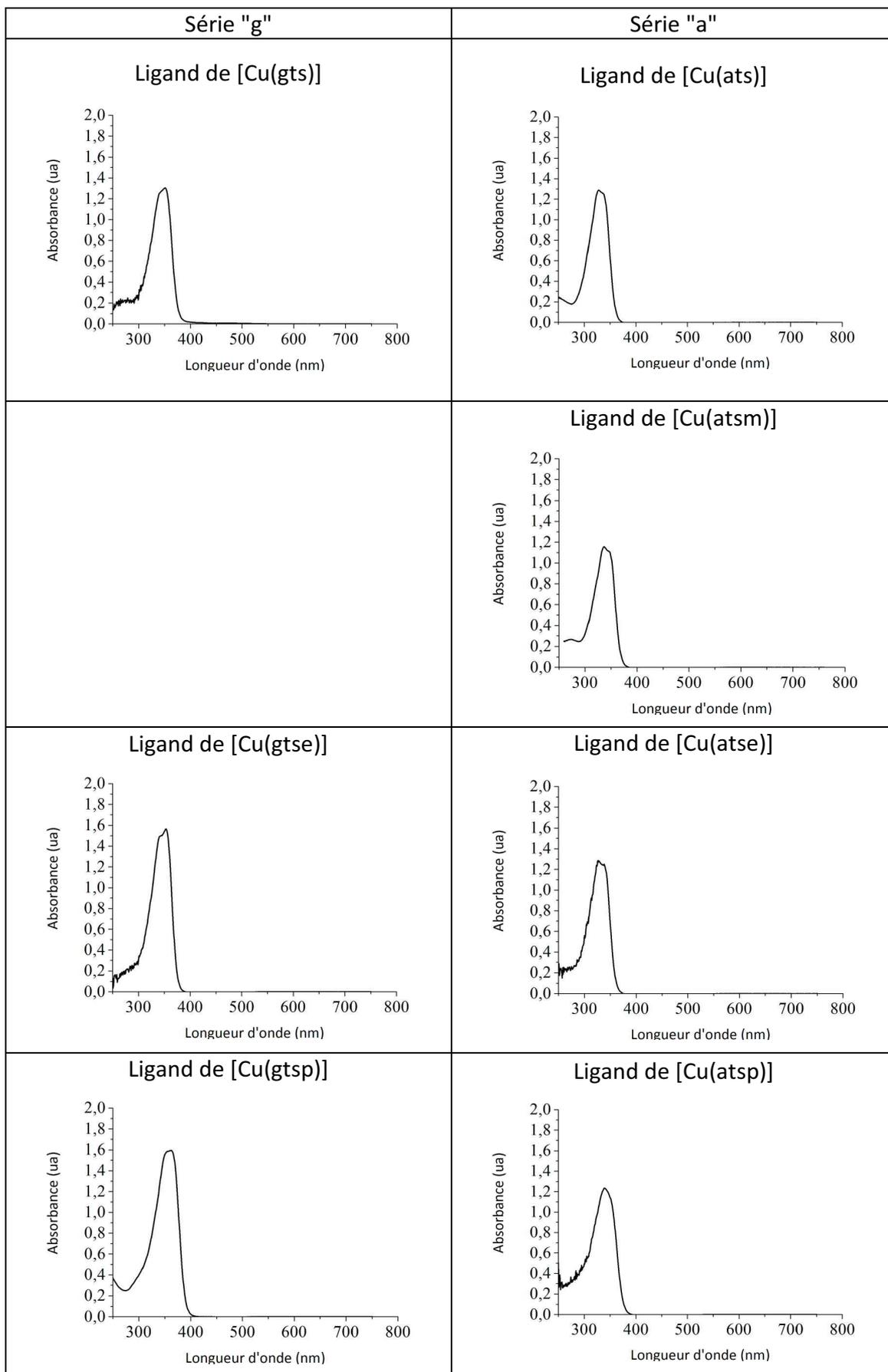


Figure III-2 : Spectres d'absorption électronique des ligands en solution dans le DMSO.

A-1-b Spectres d'absorption électronique des complexes de cuivre en "solution" dans du tampon HEPES/Na⁺

Ces complexes sont insolubles en milieu aqueux. Cependant, des solutions "aqueuses" de ces complexes, nécessaires pour les expériences avec les cellules, ont été obtenues de la manière suivante : 30 µL de la solution 2mM du complexe dans le DMSO sont ajoutés à 2 mL d'une solution tampon HEPES/Na⁺ soit une concentration finale de 30µM. La solution devient progressivement turbide et des agrégats se forment. Des spectres ont été enregistrés en fonction du temps 0, 5, 10, 30 min. Dans la mesure où les solutions deviennent turbides et que nous sommes en présence d'un phénomène de diffusion de la lumière, il est illusoire de parler de "spectre", cependant le signal enregistré nous donne une idée de l'évolution de la solution suite à la "dilution" du complexe dans le tampon HEPES/Na⁺ (Figure III-1).

A-2 Spectres RPE des complexes de cuivre

A-2-a Spectres RPE des complexes de cuivre à l'état solide

La Figure III-3 présente le spectre RPE de [Cu(gts)] à l'état solide. Ce spectre a la forme symétrique de la dérivée d'une Lorentzienne et ne présente pas de structure. Dans la suite, nous qualifierons ce spectre de type "S". Tous nos complexes présentent à l'état solide un spectre de ce type.

A-2-b Spectres RPE des complexes de cuivre en solution dans le DMSO

La Figure III-4 présente le spectre RPE de [Cu(gts)] en solution dans le DMSO. Ce spectre est caractéristique d'un ion Cu²⁺ dans un environnement plan carré distordu avec une structure hyperfine partiellement résolue. Dans la suite, nous qualifierons ce spectre de type "A". Ces spectres, enregistrés après différents temps de mise en solution du complexe, ne présentent pas d'évolution. Les spectres des solutions dans le DMSO des autres complexes sont tout à fait semblables.

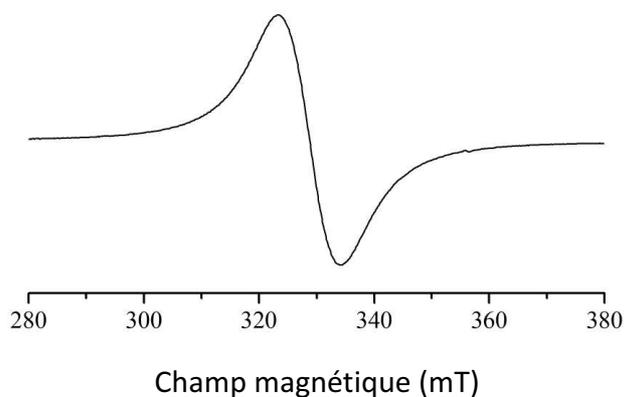


Figure III-3 : Spectre RPE de [Cu(gts)] à l'état solide (spectre de type S). Conditions expérimentales : fréquence de microondes 9,5 GHz, puissance des microondes 1,6 mW, amplitude du champ de modulation 0,7 mT, constante de temps 164 ms, temps de conversion 164 ms, un scan, température 50 K.

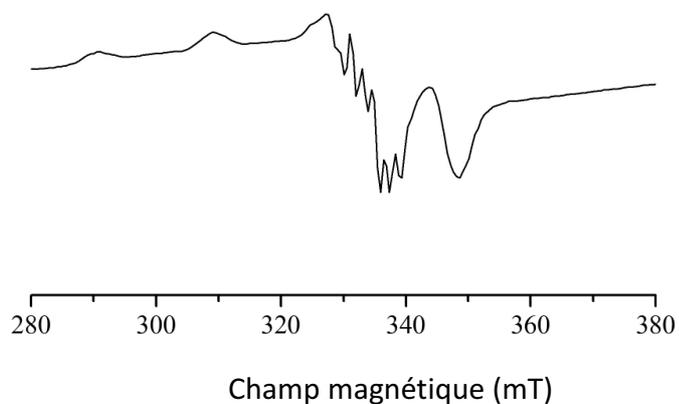


Figure III-4 : Spectres RPE de [Cu(gst)] solubilisé dans le DMSO à 2 mM (spectre de type A). Conditions expérimentales : fréquence de microondes 9,5 GHz, puissance des microondes 1,6 mW, amplitude du champ de modulation 0,5 mT, constante de temps 82 ms (b), temps de conversion 164 ms, un scan, température 50 K.

A-2-c Spectres RPE des complexes de cuivre en "solution" dans le tampon HEPES/Na⁺

Comme nous l'avons dit précédemment, les "solutions aqueuses" sont préparées par addition de 30 μL de la solution 2mM du complexe dans le DMSO à une solution tampon HEPES/Na⁺. Ces solutions deviennent, en fonction du temps progressivement turbides. La Figure III-5 montre les spectres RPE d'une solution de [Cu(gt_s)] : immédiatement après sa préparation le spectre obtenu est de type "A" et aucun agrégat n'est alors détectable, 10 min après sa préparation, la solution devient turbide, après 30 min le spectre n'évolue plus en fonction du temps et est de type "S". L'encart de la Figure III-5, présente la variation, en fonction du temps, de l'amplitude du signal RPE et en parallèle, la concentration de cuivre dans la solution mesurée par absorption atomique pour bien montrer que l'évolution du signal n'est pas due à une variation de la concentration en cuivre.

Un comportement similaire est observé avec les autres complexes de la série "g", c'est-à-dire [Cu(gt_{se})] et [Cu(gt_{sp})] mais aussi avec un complexe de la série "a" : [Cu(at_{sp})].

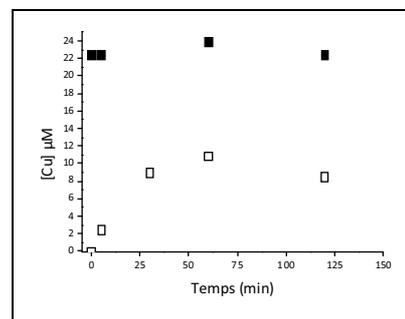
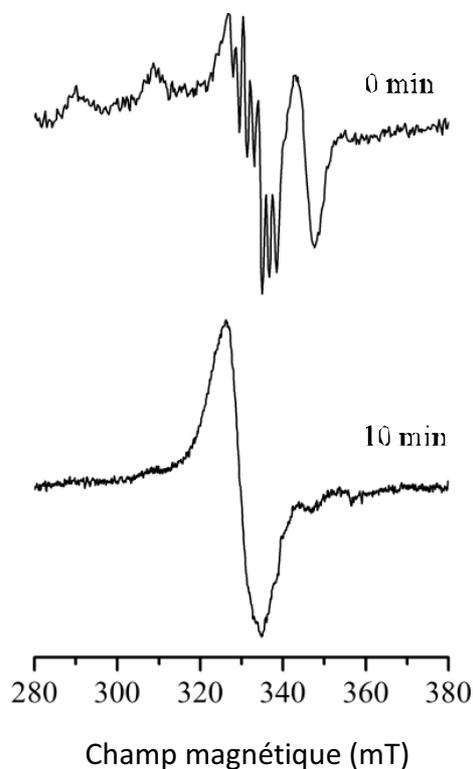


Figure III-5: Spectres RPE de [Cu(gts)] en "solution" dans le tampon HEPES/Na⁺ immédiatement après l'ajout de la solution stock en DMSO dans le tampon (0 min) ou après 10 minutes d'incubation (10 min). Conditions expérimentales : fréquence de microondes 9,5 GHz, puissance des microondes 0,25 mW (0 min) et 6,4 mW (10 min), amplitude du champ de modulation 0,5 mT (0 min) et 1,0 mT (10 min), constante de temps 164 ms, temps de conversion 164 ms, 12 scans (0 min) et 1 scan (10 min), température 20 K (0 min) et 50 K (10 min). Encart : variation en fonction du temps, de l'amplitude du signal RPE (□), en parallèle de la concentration de cuivre (■), dans la solution mesurée par absorption atomique.

Lorsque la même expérience est faite avec les composés de la série "a", à l'exception de [Cu(atasp)], l'évolution des spectres RPE n'est pas la même que pour ceux de la série "g" : immédiatement après la préparation des solutions, c'est à dire, la dilution de la solution organique dans le tampon aqueux, nous observons le spectre de type "A" correspondant au complexe soluble. Ce spectre évolue, en fonction du temps, en un signal étroit de type axial avec des valeurs de $g_{//} = 2,12$ et $g_{\perp} = 2,03$. Dans la suite, nous nommerons "R" ce type de spectre. D'autres signaux de plus faible intensité, différents de ceux du spectre de type "A", sont également observés dans la même région. La Figure III-6 présente ces spectres dans le cas du complexe [Cu(atasm)]. Comme dans le cas précédent, au temps "0" le spectre est de type "A" correspondant au complexe en solution dans le DMSO. L'encart de la Figure III-6 présente la variation, en fonction du temps, de l'amplitude du signal RPE et en parallèle, la concentration de cuivre dans la solution mesurée par absorption atomique pour bien montrer que l'évolution du signal n'est pas due à une variation de la concentration en cuivre.

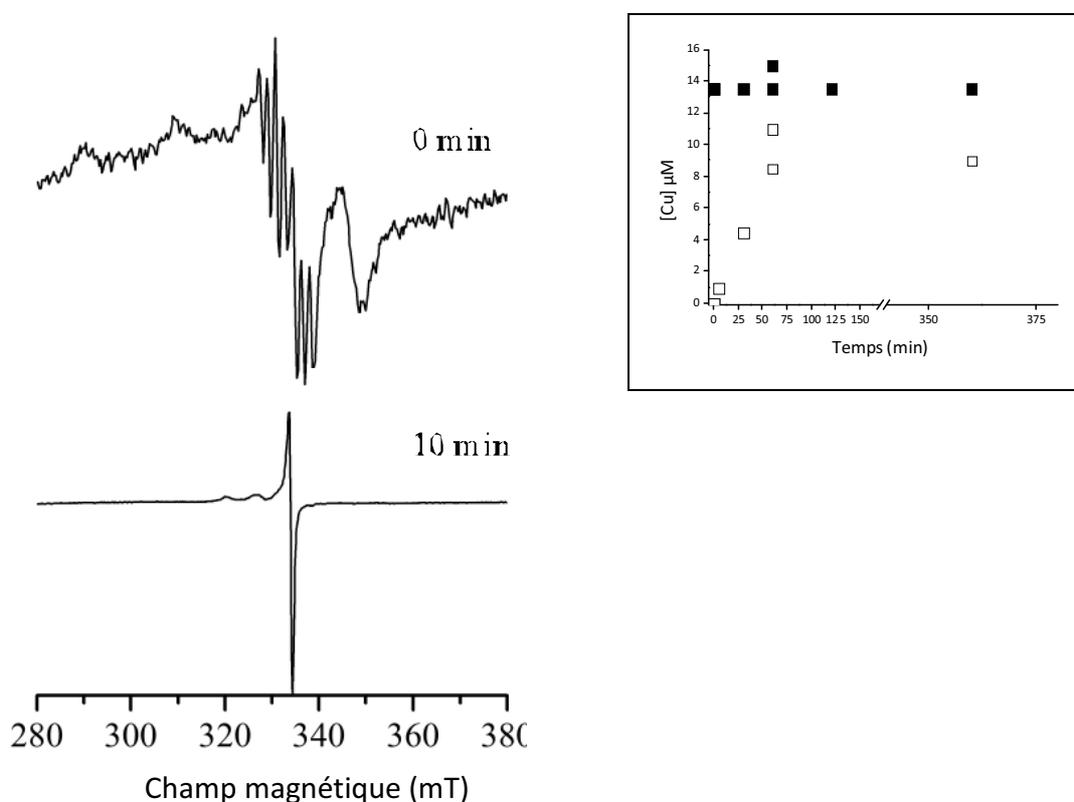


Figure III-6 : Spectres RPE de [Cu(atsm)] dans le tampon HEPES/Na⁺ immédiatement après l'ajout de la solution stock en DMSO dans le tampon (0 min) ou après 10 minutes d'incubation (10 min). Conditions expérimentales : fréquence de microondes 9,5 GHz, puissance des microondes 0,25 mW (0 min) et 6,4 mW (10 min), amplitude du champ de modulation 0,5 mT (0 min) et 1,0 mT (10 min), constante de temps 164 ms, temps de conversion 164 ms, 12 scans (0 min) et 1 scan (10 min), température 20 K (0 min) et 50 K (10 min). Les scans ont été normalisés entre -1 et +1. Encart : variation en fonction du temps, de l'amplitude du signal RPE (□), en parallèle de la concentration de cuivre (■) dans la solution mesurée pas absorption atomique.

B- Accumulation des complexes de cuivre dans différents types cellulaires : détermination par spectroscopie d'absorption atomique

B-1 Témoins

La concentration de cuivre dans les cellules sans traitement a été déterminée, elle est de l'ordre de $0,04 \pm 0,02 \mu\text{M}$.

Les cellules ont été incubées avec $30 \mu\text{M}$ de Cu SO_4 en présence de DMSO afin d'être dans les mêmes conditions expérimentales que lors des expériences avec les complexes. La concentration ainsi déterminée est du même ordre de grandeur que celle déterminée par la mesure précédente, c'est à dire, dans les cellules intactes en absence de cuivre ajouté.

B-2 Accumulation des complexes de cuivre dans les cellules K562

B-2-a Accumulation des complexes de cuivre dans les cellules K562 et K562/ADR

Dans un premier temps, nous avons étudié l'incorporation des complexes de cuivre dans les cellules K562 et K562/ADR (surexprimant la P-gp), nous permettant de mettre en évidence l'éventuelle prise en charge des complexes par la P-gp. Dans chaque cas, quatre expériences indépendantes ont été réalisées.

Les cellules sont incubées dans le tampon HEPES/ Na^+ en présence de $30 \mu\text{M}$ de complexe. Ensuite, un volume v de cellules est prélevé, centrifugé et la concentration de cuivre est déterminée dans le culot et dans le surnageant comme indiqué dans la partie expérimentale. A cette concentration, les cellules sont bien vivantes et ce pendant tout le temps d'incubation de 0 à 3 heures.

A titre d'exemple, la Figure III-7 montre, dans le cas des cellules K562 incubées avec $[\text{Cu}(\text{gts})]$, la fraction de cuivre total, après des temps d'incubation de 0 et 60 minutes, mesurée dans le surnageant après une première centrifugation, après un premier lavage et une deuxième centrifugation, après un deuxième lavage et une troisième centrifugation et finalement, la fraction de cuivre dans le culot après les deux lavages.

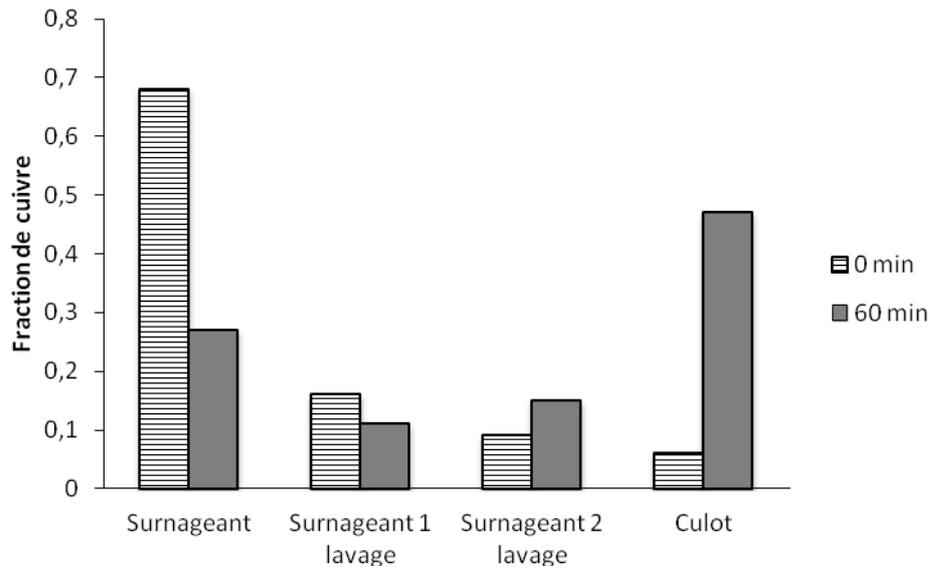


Figure III-7 : Fraction de cuivre total, après des temps d’incubation de 0 (barres horizontales) et 60 (barres grises) minutes.

La Figure III-8 montre l’accumulation des différents complexes dans les cellules K562 et K562/ADR. Cette accumulation est représentée sous forme du paramètre $f = C_i / (C_i + C_e)$, qui représente la fraction de cuivre incorporé dans les cellules, C_i étant la concentration de cuivre dans les cellules et C_e la concentration de cuivre dans le milieu extracellulaire. La concentration intracellulaire de cuivre est calculée en tenant compte que le volume d’une cellule est en moyenne 1×10^{-12} L et le nombre de cellules par litre égal à 10^9 , le volume occupé par les cellules est alors de 10^{-3} L par litre de suspension cellulaire.

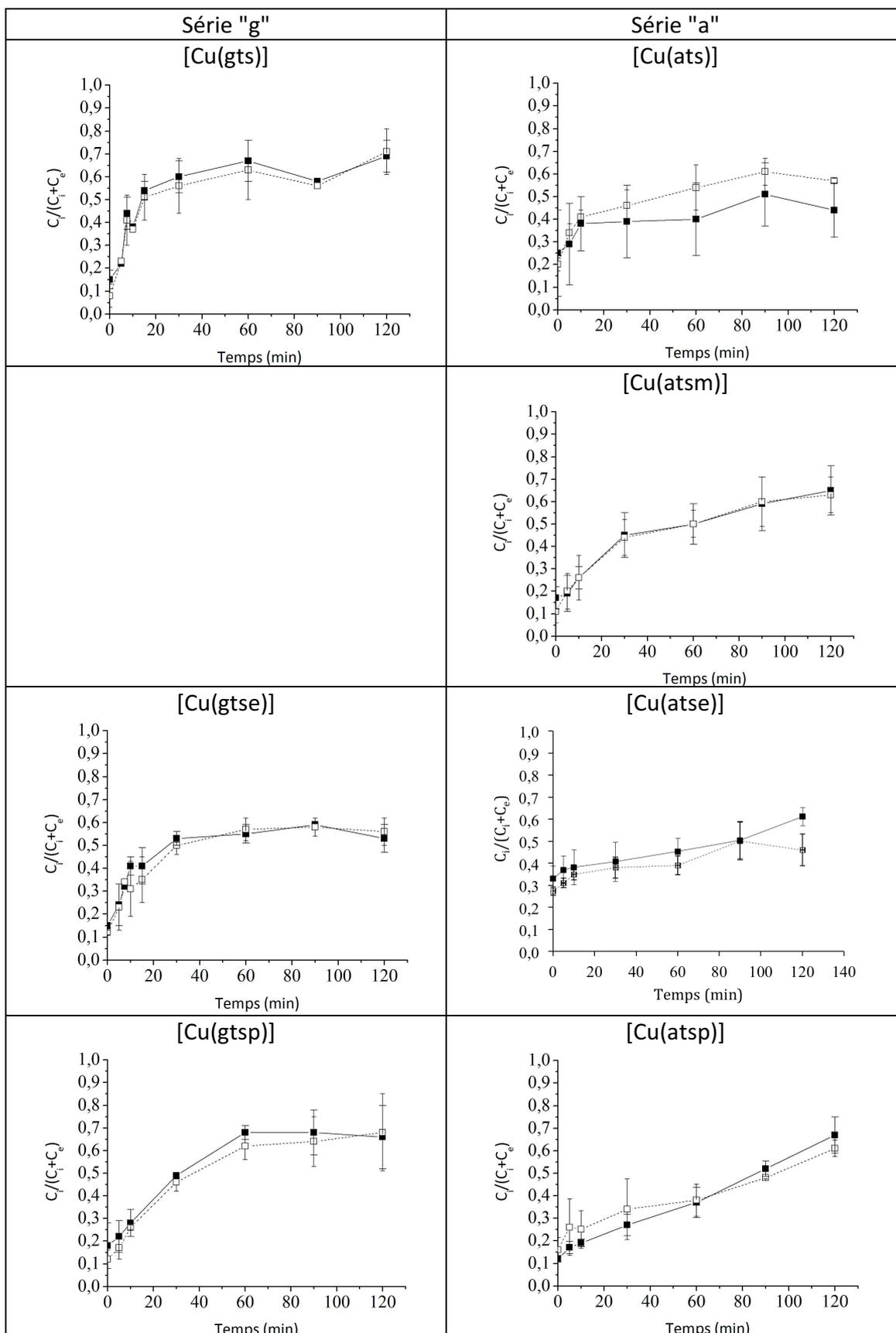


Figure III-8 : Accumulation $f = C_i/(C_i+C_e)$ des complexes de cuivre (30 μ M) dans les cellules K562 (■) et K562/ADR (□) en fonction du temps.

Le facteur f a été déterminé en fonction du temps d'incubation. Comme nous pouvons le voir sur la Figure III-8, la valeur de f augmente assez rapidement, 50% de sa valeur étant atteinte après environ 10 min. Les valeurs de f au plateau sont indiquées dans le Tableau III-1. Ces mesures ont été effectuées dans le cas des cellules K562 et K562/ADR et aucune différence significative n'a été observée entre les deux types cellulaires.

Série "g"	f	Série "a"	f
[Cu(gt _s)]	0,70 ± 0,1	[Cu(at _s)]	0,5 ± 0,1
[Cu(gt _{sm})]	ND	[Cu(at _{sm})]	0,5 ± 0,2
[Cu(gt _{se})]	0,5 ± 0,1	[Cu(at _{se})]	0,4 ± 0,1
[Cu(gt _{sp})]	0,7 ± 0,1	[Cu(at _{sp})]	0,5 ± 0,1

Tableau III-1 : Valeurs à l'état stationnaire du paramètre $f = C_i / (C_i + C_e)$ caractéristiques de l'accumulation des complexes dans les cellules K562 et/ou K562/ADR.

B-2-b Etude de l'efflux des complexes [Cu(gts)] et [Cu(atsm)] dans les cellules K562 et K562/ADR

Après 1h d'incubation en présence des complexes, les cellules sont centrifugées, lavées dans du tampon froid et remises à incuber à 37°C sous agitation constante dans le même volume de tampon HEPES/Na⁺, contenant 5 mM de glucose uniquement. Au temps zéro (t=0) et après des intervalles de temps choisis, 1 mL de la suspension cellulaire (soit 10⁶ cellules) est prélevé et centrifugé 30 secondes afin de séparer le culot cellulaire du surnageant. La Figure III-9 montre la variation de f en fonction du temps : nous observons que la valeur de f décroît de 1 jusqu'à 0,7±0,1 montrant qu'à l'état stationnaire la valeur de f est la même considérant l'incorporation ou l'efflux.

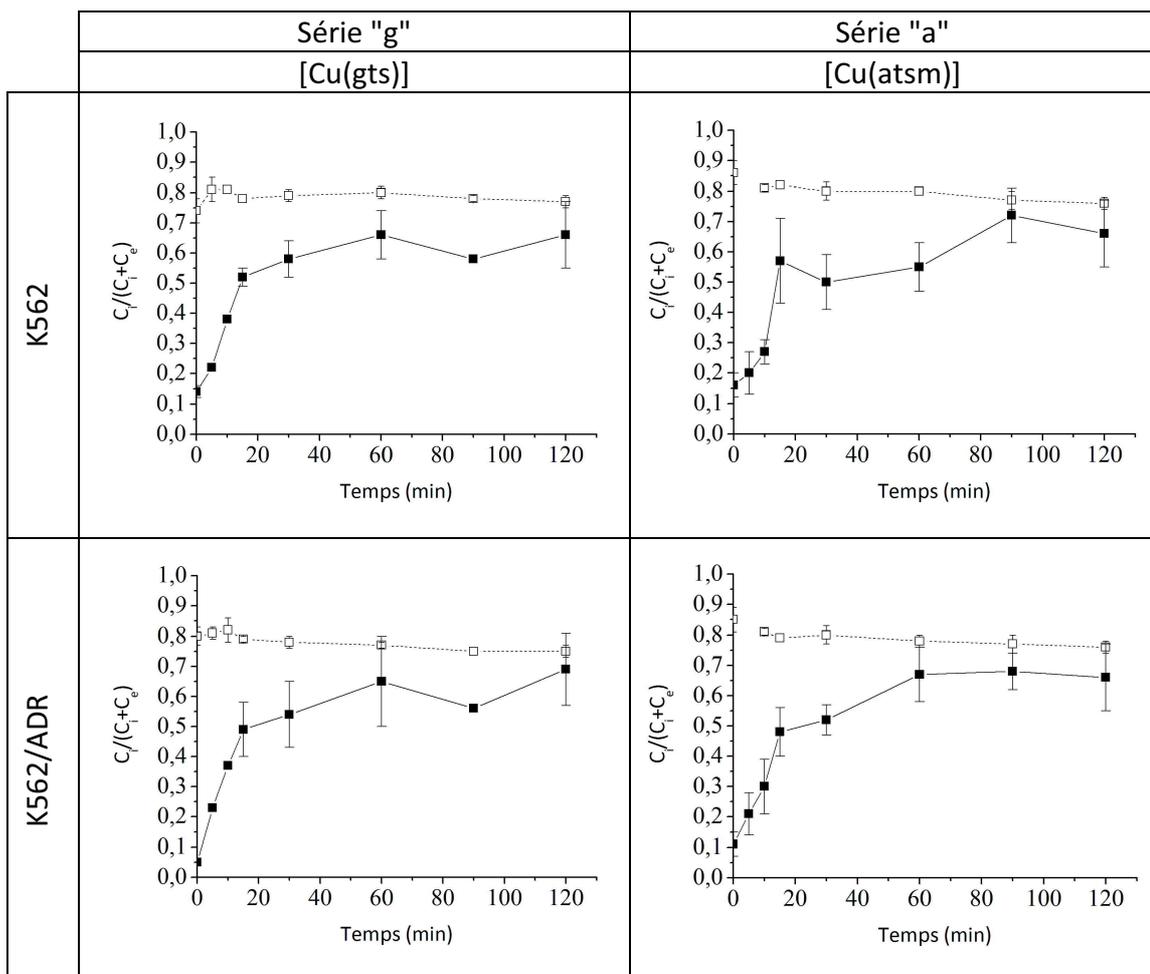


Figure III-9 : Accumulation (■) et efflux (□) des complexes de cuivre dans les cellules K562 et K562/ADR en fonction du temps.

B-2-c Accumulation des complexes de cuivre dans les cellules K562 et K562/ADR, en absence de potentiel membranaire, de gradient de pH ou d'énergie.

Effet de l'inhibition du potentiel membranaire mitochondrial sur l'accumulation intracellulaire des complexes dans les cellules K562

Afin d'étudier le rôle du potentiel membranaire mitochondrial sur l'accumulation intracellulaire de nos complexes dans les cellules, l'accumulation des complexes [Cu(gtse)] et [Cu(gtse)] (30 μ M) a été suivie dans les cellules K562 incubées dans du tampon HEPES/Na⁺ en présence de 1 μ M de FCCP, un protonophore qui annule le gradient de potentiel membranaire mitochondrial. L'accumulation a été enregistrée en fonction du temps par spectroscopie d'absorption atomique. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure III-10.

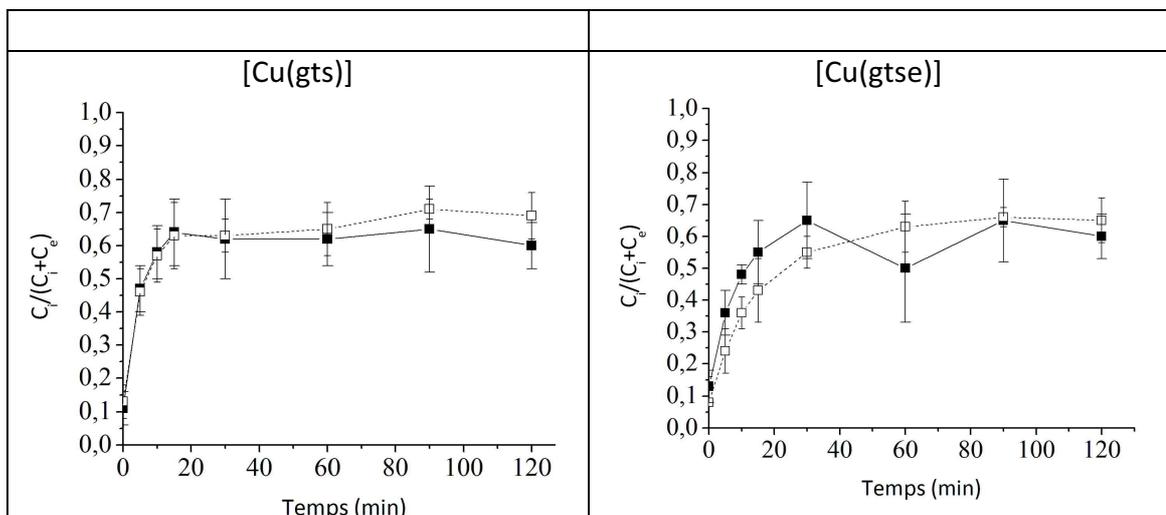


Figure III-10 : Accumulation de [Cu(gtse)] et [Cu(gtse)] dans les cellules K562 en condition de potentiel membranaire mitochondrial intact (■) ou annulé (□).

Les résultats montrent que l'accumulation augmente au cours du temps d'incubation atteignant un plateau pour f autour de $0,65 \pm 0,1$. Cette valeur est atteinte avant 10 minutes d'incubation. L'accumulation de [Cu(gtse)] et [Cu(gtse)] dans les cellules K562 est du même ordre en condition de potentiel mitochondrial intact ou

annulé, elle ne se fait donc pas dans les mitochondries, en tous cas pas de manière significative.

Effet de la variation du pH intracellulaire sur l'accumulation des complexes dans les cellules K562

Les cellules K562 ont été incubées avec les complexes [Cu(gts)] ou [Cu(gtse)] (30 μ M) en présence ou non de concanamycine A (20nM), un inhibiteur spécifique de la pompe H⁺-ATPase. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure III-11.

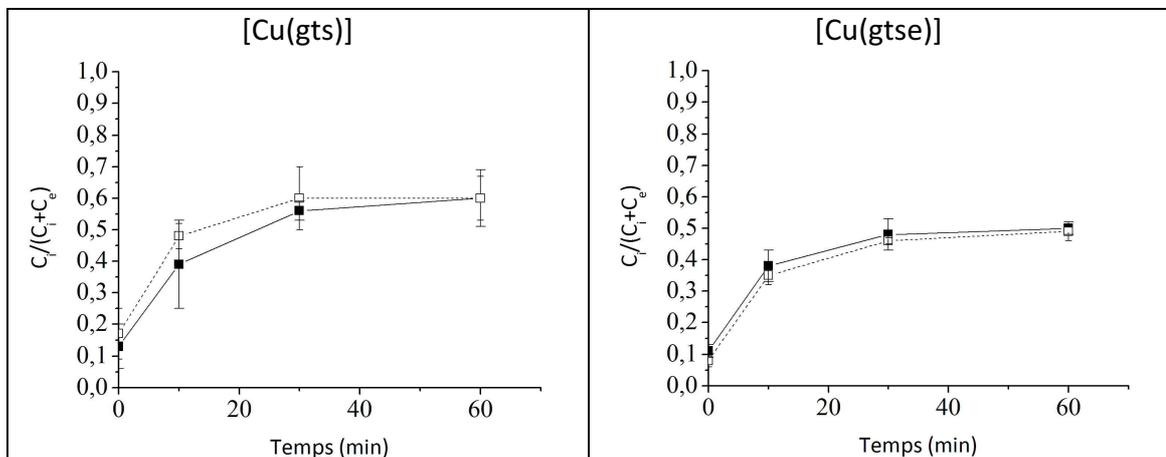


Figure III-11 : Accumulation de [Cu(gts)] et [Cu(gtse)] dans les cellules K562 en condition de gradient de pH intact (■) ou annulé (□).

Les résultats montrent que l'accumulation augmente au cours du temps d'incubation atteignant un plateau à environ $0,55 \pm 0,1$. Cette valeur est atteinte avant 15 minutes d'incubation. L'accumulation de [Cu(gts)] et [Cu(gtse)] dans les cellules K562 est du même ordre en condition de gradient de pH intact ou annulé, elle ne se fait donc pas dans les lysosomes, en tout cas pas de manière significative.

Effet de la déplétion en énergie des cellules K562 sur l'accumulation intracellulaire des complexes de cuivre

L'incorporation des complexes de cuivre [Cu(gts)] et [Cu(gtse)] dans les cellules K562 a été réalisée en conditions de déplétion en énergie ce qui permet de déterminer le rôle joué par les transporteurs dépendants de l'ATP, tel que la P-gp, dans l'incorporation. Pour cela, les cellules (K562 et K562/ADR) ont été incubées avec de l'azoture de sodium (NaN_3), un inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale qui diminue de plus de 90% le taux d'ATP intracellulaire (Kimmich *et al.*, 1975), et avec du 2-déoxyglucose (2-deoxy-D-arabino-hexose), un analogue synthétique du glucose, qui bloque la production de l'ATP provenant de la glycolyse, en entrant en compétition avec le glucose pour les principales enzymes.

Dans ces conditions, la quantité d'ATP est tellement réduite que les transporteurs Dépendants de l'ATPs ne peuvent plus transporter leurs substrats.

Dans ces conditions expérimentales, concernant les complexes étudiés aucune influence de ces paramètres, sur leur accumulation dans les cellules, n'a été observée.

B-3 Accumulation des complexes dans les cellules hCMEC/D3

La Figure III-12 montre la variation de $f = C_i/(C_i+C_e)$ en fonction du temps lors de l'incubation des cellules hCMEC/D3 avec différents complexes. L'accumulation augmente au cours du temps et atteint un état stationnaire. Ce dernier est atteint beaucoup plus rapidement que lors des expériences similaires effectuées avec cellules K562 et K562/ADR. Les valeurs de f au plateau sont indiquées dans le Tableau III-2.

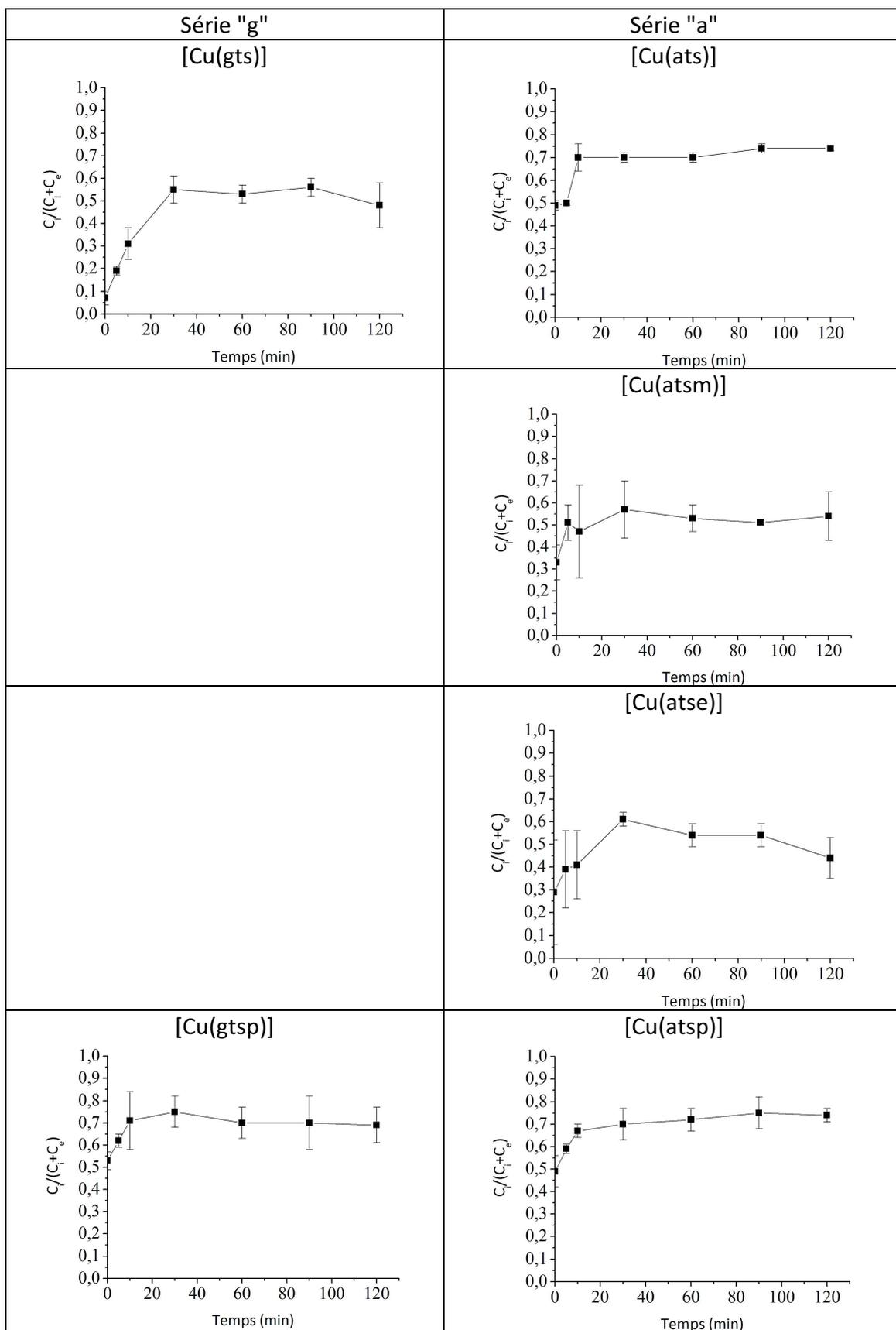


Figure III-12 : Accumulation $f = C_i/(C_i+C_e)$ des [Cu(btsc)] (30 μ M) dans les cellules hCMEC/D3 en fonction du temps.

Série "g"	<i>f</i>	Série "a"	<i>f</i>
[Cu(gts)]	0,50 ± 0,1	[Cu(ats)]	0,75 ± 0,1
[Cu(gtsm)]		[Cu(atasm)]	0,55 ± 0,1
[Cu(gtse)]		[Cu(atse)]	0,45 ± 0,1
[Cu(gtsp)]	0,70 ± 0,1	[Cu(gtsp)]	0,75 ± 0,1

Tableau III-2 : Valeurs à l'état stationnaire de l'accumulation $f = C_i/(C_i+C_e)$ des complexes de cuivre dans les cellules hCMEC/D3.

B-4 Accumulation des complexes de cuivre dans les cellules SH-SY5Y

La Figure III-13 montre l'incorporation des complexes [Cu(gts)] et [Cu(at-sm)] dans les cellules SH-SY5Y récapitule les valeurs du paramètre $f = C_i / (C_i + C_e)$ mesurée à l'état stationnaire.

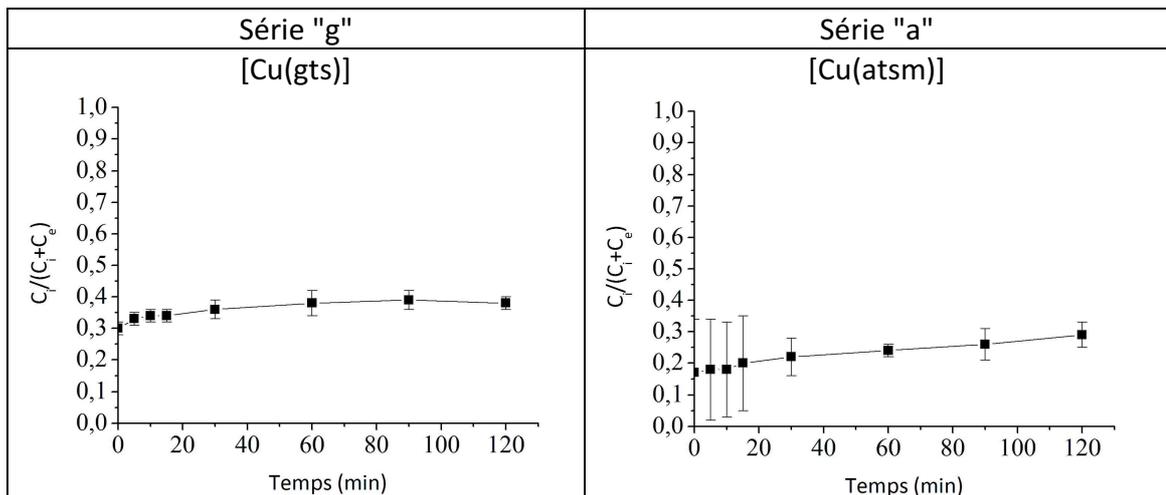


Figure III-13 : Incorporation en fonction du temps des complexes [Cu(gts)] et [Cu(at-sm)] dans les cellules SH-SY5Y.

Nous remarquerons que la quantité de complexe incorporée dans ce type cellulaire est plus faible que celle incorporée dans les autres cellules.

**C- Accumulation des complexes de cuivre dans les cellules K562 :
étude par RPE**

Le complexe [Cu(gts)] (30 μ M) a été ajouté à une suspension de cellules K562 et les spectres ont été enregistrés en fonction du temps. A $t \sim 0$, le spectre RPE est semblable à celui observé dans le DMSO c'est-à-dire celui que nous avons nommé type "A". Ensuite, le spectre évolue vers un spectre de type "S" et la Figure III-14a présente ce spectre obtenu après une heure d'incubation. En bref, le spectre du complexe à l'intérieur des cellules est le même que celui obtenu en "solution", le tampon HEPES/Na⁺.

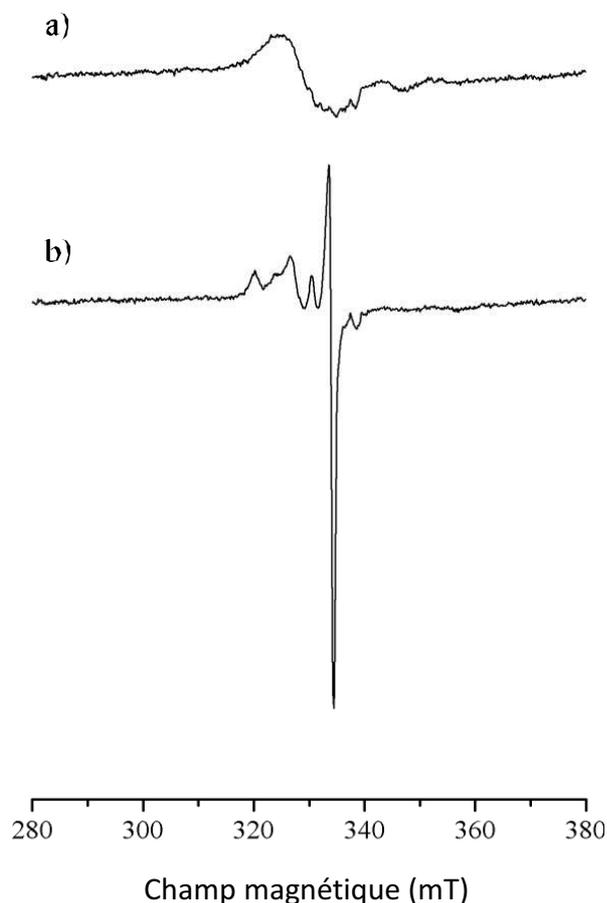


Figure III-14 : Spectre de [Cu(gts)] (a) et [Cu(atm)] (b) en présence de cellules après 1h d'incubation. Conditions expérimentales : fréquence de microondes 9,5 GHz, puissance des microondes 6,4 mW (10 min), amplitude du champ de modulation 1,0 mT, constante de temps 164 ms, temps de conversion 164 ms, un scan, température 50 K.

Des résultats similaires ont été obtenus pour les autres complexes de la série "g" ainsi que le complexe [Cu(atasp)] de la série "a", dans les deux lignées cellulaires K562 et K562/ADR.

Quand des expériences analogues sont effectuées avec les complexes de la série "a" excepté [Cu(atasp)], le spectre évolue depuis celui de forme "A" à $t=0$ vers un spectre de type "R" après 1 h d'incubation (Figure III-14b).

A noter que les spectres enregistrés pour les culots lavés sont semblables aux spectres des cellules en suspension démontrant, une fois de plus, que les complexes ont été incorporés dans les cellules.

D- Accumulation des complexes de cuivre dans les cellules K562 : étude par microscopie électronique en transmission

Précédemment, nous avons déterminé que les [Cu(btsc)] s'accumulent de manière importante dans les cellules, que l'inhibition du potentiel membranaire mitochondrial, du gradient de pH ou bien la déplétion en énergie de la cellule ne modifient aucunement l'accumulation des complexes, ce qui suggère que l'accumulation ne se fait pas de façon préférentielle dans un de ces compartiments intracellulaires particuliers. De plus, nous avons déterminé que les complexes en solution aqueuse s'agrègent.

Par la suite, nous avons effectué des expériences en microscopie électronique en transmission afin de vérifier les résultats précédemment obtenus. Les complexes [Cu(gts)] et [Cu(atasm)] ($30\mu\text{M}$) ont été incubés avec les cellules K562 dans les mêmes conditions que lors des expériences d'accumulation intracellulaire. Les résultats sont présentés dans la Figure III-15. L'image en A montre les cellules K562 sans traitement. Il est possible de distinguer clairement les différents organites intracellulaires et l'intégrité de la membrane cellulaire. En B et C, nous observons les images des cellules incubées avec les complexes [Cu(gts)] et [Cu(atasm)] respectivement. Ces images montrent clairement des agrégats, apparaissant très foncés, de tailles différentes, dispersés pour une partie de manière aléatoire et non spécifique dans toute la cellule (cytosol) tandis que le reste des agrégats est localisé à la bordure des gouttelettes

lipidiques. Ces images montrent que les complexes s'agrègent dans un environnement aqueux (cytosol) et sont présents autour des gouttelettes lipidiques. La quantité des précipités observable tend à prouver que l'agrégation est le principal mécanisme d'action intracellulaire mis en jeu. Ces résultats viennent conforter les résultats obtenus précédemment en spectroscopie.

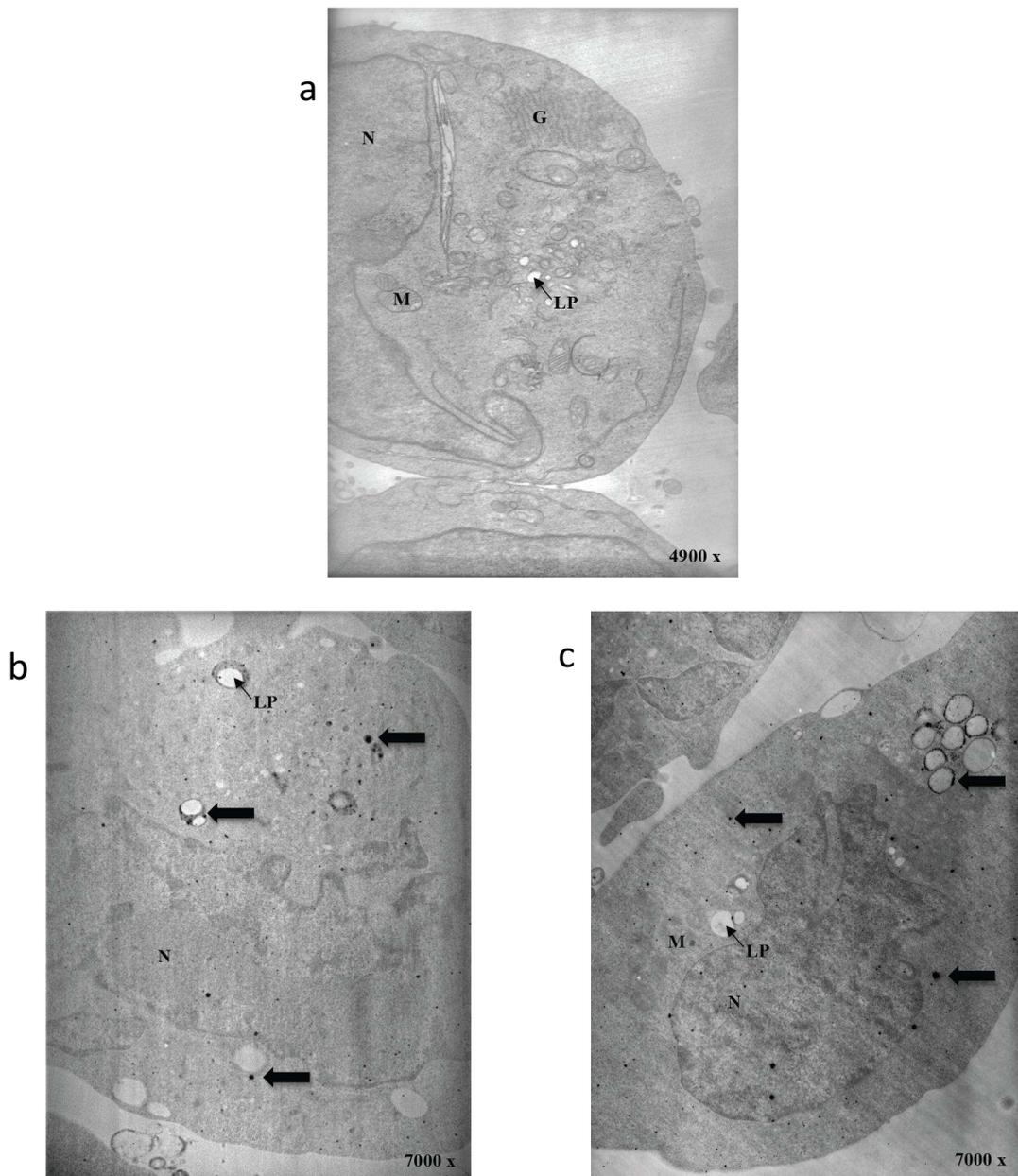


Figure III-15: Images de microscopie électronique en transmission des cellules K562 : a) sans traitement, b) après 1h incubation avec [Cu(gts)], c) après 1h incubation avec [Cu(atm)]. N = noyau ; G = appareil de Golgi ; M = mitochondrie ; LP = Gouttelettes lipidiques ; les flèches noires pointent vers les agrégats de complexes.

Chapitre IV

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les thiosemicarbazones présentent un large spectre d'activité (Beraldo et Gambino 2004), leur chimie ainsi que leurs implications pharmacologiques ont fait l'objet de nombreuses recherches.

En général, les ligands sont faciles à synthétiser et leur structure peut être modifiée de multiples façons. Dans certains cas, de petites modifications entraînent des changements importants de leur chimie permettant une conception rationnelle de leur stabilité, de leur potentiel redox, de leur perméabilité membranaire et enfin de leur activité biologique.

Dans la littérature sont apparues plusieurs revues autour des différents aspects de ces composés tels que les méthodes de préparation de ces composés, leur stéréochimie, leur complexation aux ions métalliques, leurs caractéristiques spectrales, etc. Cependant, peu de revues ont été dédiées à leur large spectre d'applications biologiques et thérapeutiques.

Les propriétés biologiques des thiosemicarbazones sont souvent liées à leur propriété de coordination aux ions métalliques. Tout d'abord, leur lipophilie qui contrôle la vitesse d'entrée dans les cellules, est modifiée par la coordination (Farrel N 2002). Par ailleurs, le complexe peut présenter une activité biologique qui n'existe pas chez le ligand libre : d'une part le complexe métallique peut être plus actif que le ligand libre et, d'autre part, quelques effets secondaires peuvent, de par la complexation, être diminués.

Les thiosemicarbazones et leurs complexes métalliques présentent un large spectre d'activité antibactérienne (Chandra *et al.*, 2013) et leur action sur différentes souches bactériennes a été largement étudiée. Un des mécanismes proposés pour expliquer l'activité antibactérienne implique un transfert d'électron et/ou un stress oxydant produisant des espèces oxygénées actives capables de détruire l'envahisseur. Leur effet n'est pas systémique et permet ainsi une sélection précise de l'organisme contre lequel il faut lutter. Ainsi, un composé peut être capable d'inhiber la croissance d'une bactérie gram-positive sans incidence sur une bactérie gram-négative (exemple: les complexes de 2-acétylpyridine-thiosemicarbazones et de platine sont létaux envers les bactéries gram-positives mais inactifs envers des bactéries gram-négatives), un autre pourra détruire une souche gram-négative (exemple : les 2-formylpyridine-

thiosemicarbazones complexés à l'oxovanadium contre *Escherichia coli*), un dernier s'attaquera plutôt à un parasite (exemple : N4-o-vanilline-thiosemicarbazones complexé au platine toxique pour les amibes) (Beraldo et Gambino 2004). Cependant, la plupart de ces composants a été testée *in vitro*, directement sur les pathogènes, et peu d'études concernent le traitement de ces pathogènes dans leur environnement naturel c'est-à-dire chez leur hôte et peu est connu sur leur mécanisme d'action intracellulaire (Beraldo et Gambino 2004, Ramachandran *et al.*, 2009, Zhao *et al.*, 2012, Lessa *et al.*, 2012).

De nombreux articles de la littérature rapportent également l'activité anti fongique des thiosemicarbazones et de leurs complexes métalliques.

L'activité antifongique des thiosemicarbazones et de leurs complexes métalliques a été étudiée dès le début des années 1960. Si initialement, les études se sont essentiellement focalisées sur des espèces fongiques pathogènes pour les plantes (Beraldo et Gambino 2004), la recrudescence de souches pathogènes pour l'homme et résistantes aux traitements existants a incité l'élargissement de ces études (Parrilha *et al.*, 2011). Dans la majorité des cas, ce sont les complexes métalliques qui sont les plus efficaces. En effet, considérant par exemple les N4-alkyl et N4-dialkyl-2-acétylpyridine-thiosemicarbazones, leurs complexes de cuivre sont plus efficaces envers *Aspergillus niger* tandis que leurs complexes de nickel sont, eux, plus efficaces envers *Paecilomyces variotii* (Beraldo et Gambino 2004). Plus récemment, l'action de complexes de pyridine-thiosemicarbazones et d'étain contre différentes souches de *Candida*, champignons pathogènes pour l'homme, a été étudiée. Un des complexes étudiés s'est avéré aussi efficace que le fluconazole (molécule de référence pour le traitement des candidoses) pour lutter contre trois des quatre souches étudiées (*C. albicans*, *C. parapsilosis* et *C. glabrata*) et plus efficace même pour lutter contre la dernière souche testée (*C. krusei*). Les molécules contenant de l'étain ont diverses activités pharmacologiques intéressantes mais sont également très toxiques. Il semblerait que la complexation de l'étain avec des ligands thiosemicarbazones permettrait d'atténuer sa toxicité et par la même, son utilisation dans le développement de nouvelles molécules thérapeutiques (Parrilha *et al.*, 2011). De la même façon que pour les études sur l'activité antimicrobienne de ces composés, rares

sont les études qui s'intéressent à leur mécanisme d'action intracellulaire (Beraldo et Gambino 2004, Bastos *et al.*, 2010, Ramachandran *et al.*, 2009, Parrilha *et al.*, 2011). Il a été cependant proposé que les complexes de bis(thiosemicarbazones), en agissant comme chélateurs de métaux, inhiberaient l'activité des métalloenzymes, conduisant ainsi à la mort des pathogènes par altération de la synthèse protéique (Beraldo et Gambino 2004).

Les thiosemicarbazones et leurs complexes métalliques présentent également une activité antitumorale. L'activité antitumorale des bis(thiosemicarbazones) fut l'objet de nombreuses études et elle a été évaluée dans différents modèles cellulaires et animaux (Beraldo et Gambino 2004 ; Matesanz *et al.*, 2012). Là encore, il a été démontré que la présence de Cu(II) est essentielle à l'activité antitumorale (Milunovic *et al.*, 2012). En 1958, French et collaborateurs ont démontré que l'administration orale de glyoxal-bis(thiosemicarbazones) et de ses dérivés pouvait inhiber la croissance de tumeurs (sarcome 180) inoculées dans des modèles murins (souris Swiss) (French et Freedmann 1958). L'activité de chélation des métaux de ces ligands était connue et très vite, il a été démontré que l'action des bis(thiosemicarbazones) dépendait du cuivre. Ainsi, des rats traités contre un carcinome avec des bis(thiosemicarbazones) perdaient l'effet bénéfique du traitement lorsque le cuivre était éliminé de la nourriture (Petering *et al.*, 1967). Dès lors, la recherche s'est développée autour des complexes métalliques de bis(thiosemicarbazones) et autour de l'étude de leur mécanisme d'action. Selon les composés, les mécanismes d'action proposés sont l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques, la perturbation de la respiration cellulaire et de la production d'ATP, la perturbation de l'équilibre oxydant ou de la phosphorylation oxydante de la cellule (Paterson et Donnelly 2011). En tous les cas, leur effet cytotoxique est corrélé à la nature de leurs groupements latéraux et diffère selon les modèles cellulaires (Beraldo et Gambino 2004).

Dans les années 1980, suite aux résultats encourageants obtenus pour les complexes de cuivre et de bis(thiosemicarbazones) [Cu(btsc)] en tant que molécules anticancéreuses, des études pour déterminer leur biodistribution ont été réalisées dans les modèles animaux. Certains de ces complexes ont démontré une accumulation préférentielle dans les tissus hypoxiques. Cette sélectivité semble

dépendre du potentiel d'oxydoréduction des complexes. La recherche s'est alors intéressée à ces complexes comme de potentiels agents d'imagerie par tomographie d'émission de positrons (TEP) des tissus hypoxiques tels que les tumeurs et les ischémies. Dans ce contexte, un bon agent doit pouvoir transiter par la circulation sanguine, sans précipiter ni adhérer aux protéines (entre autres), et s'arrêter dans les tissus en manque d'oxygène et non pas dans les tissus dont l'oxygénation est normale (Beraldo et Gambino 2004). Les complexes de ^{62}Cu et de diacétyl-bis(N4-méthylthiosemicarbazones) [$^{62}\text{Cu}(\text{at-sm})$] ont été testés sur des modèles murins de l'ischémie du cœur et ont démontré une accumulation et une élimination rapides ainsi qu'un potentiel d'oxydoréduction faible qui ne permettait pas leur rétention dans les mitochondries (Fujibayashi *et al.*, 1997). D'autres molécules d'intérêt sont le $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{at-sm})$ comme agent pour l'imagerie de l'hypoxie du myocarde (testée sur des rats) et le [$^{62}\text{Cu}(\text{pt-sm})$] (pyruvaldéhyde-bis(N4-méthylthiosemicarbazone) qui, quant à lui, a été proposé comme agent de TEP pour l'imagerie de perfusion du myocarde pour le diagnostic de maladie coronarienne (testé sur des patients) (Beraldo et Gambino 2004). Le mécanisme d'action proposé suppose que les complexes [$^{62}\text{Cu}(\text{bt-sc})$] ayant un potentiel oxydoréducteur très faible, ne peuvent être réduits que dans les mitochondries des tissus hypoxiques où ils se trouvent majoritairement sous forme réduite (Fujibayashi *et al.*, 1997, Paterson et Donnelly 2011). Actuellement, des essais cliniques chez l'homme ont été réalisés avec [$^{60}\text{Cu}(\text{at-sm})$] et les premiers résultats démontrent une corrélation entre la rétention du complexe et des marqueurs de l'hypoxie ainsi qu'une bonne tolérance du composé. Néanmoins, la sélectivité des complexes [$^{62}\text{Cu}(\text{bt-sc})$] pour les tissus hypoxiques varie selon les molécules, selon le tissu considéré et leur teneur en oxygène, ce qui suppose d'autres mécanismes d'action possibles (Paterson et Donnelly 2011).

Les [$\text{Cu}(\text{bt-sc})$] ont également été étudiés comme molécules pour de la radiothérapie. Chez des hamsters porteurs de tumeurs humaines, le traitement avec [$^{64}\text{Cu}(\text{at-sm})$] augmente le temps de survie des animaux (Lewis *et al.*, 2001) et le traitement avec [$^{64}\text{Cu}(\text{pt-sm})$] empêche l'implantation de la tumeur et sa croissance (Lewis *et al.*, 2002).

Dans ce contexte, voyons maintenant quelle est notre contribution.

Quelle est l'accumulation des complexes dans les cellules ?

Minkel et Petering ont observé une rapide et importante accumulation des complexes 3-ethoxy-2-oxobutyraldehyde bis(thiosemicarbazonato) Cu(II) ou [Cu(kts)] dans de cellules ascitiques d'Ehrlich : à peu près 95 % du complexe ajouté à la suspension cellulaire pénètre dans les cellules en moins de 10 min. C'est également ce que nous observons lors de l'incubation de nos complexes avec les cellules K562, c'est-à-dire que dans les deux cas, de fortes concentrations intracellulaires, de l'ordre du mM, sont mesurées (Minkel et Petering 1978).

Cependant, en 2008 Donnelly et collaborateurs, rapportent une accumulation intracellulaire relativement faible de ces complexes puisqu'ils disent avoir observé une augmentation de l'ordre de 200 fois la concentration intracellulaire témoin de cuivre. Comment expliquer une telle différence ? Il faut remarquer que dans les expériences de Donnelly et collaborateurs, les mesures sont effectuées après environ 6h d'incubation, ce qui peut amener à se demander si l'intégrité des cellules a pu être conservée.

Quelle est la localisation des complexes ?

En ce qui concerne la localisation, il a été reporté que les complexes [Cu(gts)] étaient localisés de façon diffuse dans le cytosol de certains types de cellules (Cowley *et al.*, 2005 ; Pascu *et al.*, 2010). Il a aussi été proposé qu'ils se localisaient dans la bicouche lipidique des membranes cellulaires et qu'ainsi, ils seraient protégés des agents réducteurs (John et Green 1990 ; Subczynski *et al.*, 1990). Price et collaborateurs ont proposé que [Cu(at-sm)] et [Cu(gt-sm)] pouvaient être incorporés dans les cellules par des mécanismes passifs et facilités (Price *et al.*, 2011b). Ces auteurs n'apportent pas de preuves de la participation de transporteurs dans l'accumulation de ces composés. Néanmoins, ils ont proposé que ces complexes étaient rapidement efflués des cellules par un mécanisme actif.

Price et collaborateurs, ont également étudié la localisation subcellulaire du [Cu(at-sm)] en utilisant un dérivé fluorescent comportant un groupement pyrène fixé au complexe. Le résultat qu'ils mettent en avant est que le complexe [Cu(at-sm)] serait localisée dans des vésicules d'origine lysosomale et autophagique (Price *et al.*, 2011a).

Nos résultats montrent, sans ambiguïté, que ces complexes pénètrent très rapidement, par diffusion passive, dans les cellules et ne sont pris en charge par aucun transporteur actif, en particulier la P-gp.

Par ailleurs, les résultats que nous avons obtenus en utilisant la microscopie électronique en transmission montrent également que ces complexes précipitent dans le milieu essentiellement aqueux qui est à l'intérieur des cellules. Les agrégats se localisent essentiellement en bordure des gouttelettes lipidiques.

Maintenant abordons le point qui est peut-être le plus important:

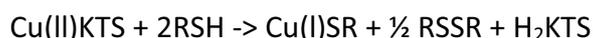
Y a-t-il une réduction intracellulaire des complexes ?

Plusieurs études ont rapporté que lorsque ces complexes sont mis en présence de cellules, une réduction du cuivre de l'état cuivrique à l'état cuivreux est observée.

A notre connaissance, il n'existe aucune preuve directe de la réduction intracellulaire d'aucun de ces complexes. La plupart des propositions reposent sur des études de modèles à partir desquelles il a été spéculé que, dans les cellules, le comportement était le même. Cependant, Minkel et Petering rapportent avoir observé une réduction intracellulaire du cuivre de Cu(II) à Cu(I) lors de leurs expériences avec les cellules ascitiques d'Ehrlich traitées avec le complexe [Cu(kts)].

Cependant, lors de nos études un tel phénomène n'a pas été observé. Qu'en est-il : ces auteurs ont-ils vraiment détecté une réduction du cuivre ? Pour essayer de comprendre la différence entre nos résultats et les leurs, nous avons analysé leurs méthodes expérimentales.

Dans leur étude, Minkel et Petering, ont proposé : i) que ce complexe, en présence de cellules, subissait une décomposition du pseudo-premier ordre, les ligands thiosemicarbazones étant relargués de leur sites de fixation au cuivre ; ii) que les thiols étaient impliqués dans cette réaction, selon l'équation suivante :



Voici quelles sont les conditions expérimentales utilisées par ces auteurs: les complexes sont dissous dans le DMSO à une concentration finale de 10^{-2} M. Lors des mesures de spectrophotométrie d'absorption, une suspension de cellules de 3 mL est

placée dans la cuve du spectrophotomètre. La densité optique à 469 nm est alors enregistrée jusqu'à ce que la ligne de base soit stable. Il faut remarquer qu'il n'est pas rapportée d'agitation donc il est fort probable que les cellules sédimentent au fond de la cuve. Ensuite, 30 μL de la solution de $[\text{Cu}(\text{kts})]$ (10^{-2} M) dans le DMSO sont ajoutés aux cellules ; la densité optique à 469nm est à nouveau enregistrée jusqu'à ce qu'un nouveau signal stable soit obtenu. La densité optique diminue rapidement. Une interprétation possible est que le complexe pénètre dans les cellules qui sont au fond de la cuve, car il n'y a pas d'agitation, d'où une disparition du signal du complexe ; d'ailleurs les auteurs dosent le surnageant et observent bien une disparition du complexe. Les auteurs proposent une réaction du complexe à la surface ou à l'intérieur de la cellule.

Lors des expériences en RPE, un spectre caractéristique du complexe en solution est mesuré et ce spectre est similaire à celui que nous avons observé pour nos complexes. L'intensité du signal RPE diminue en fonction du temps, les auteurs attribuent cela à une réduction de $\text{Cu}(\text{II})$ en $\text{Cu}(\text{I})$. Là encore, il n'est pas mentionné s'il y a ou non agitation, la même interprétation que pour l'absorption électronique peut alors être faite, à savoir que le signal est mesuré à partir d'aliquots prélevés dans le surnageant des cellules et que la diminution du signal est due à une diminution de la concentration de complexe dans le surnageant. Dans nos expériences, nous avons observé que dans le surnageant des cellules, dû à la présence de petite quantité de lipide relargué par les cellules, les complexes ne s'agrègent pas et que le spectre obtenu est le même que pour le complexe en solution dans le DMSO.

L'analyse de cet article nous conduit à conclure qu'il y a un artefact dans les expériences.

Par ailleurs, en ce qui concerne les travaux de Donnelly et collaborateurs, aucune preuve tangible de la réduction du cuivre de $\text{Cu}(\text{II})$ à $\text{Cu}(\text{I})$ n'est présentée (Donnelly *et al.*, 2008).

En conclusion, dans notre travail, utilisant une preuve directe, la RPE, nous n'avons pas détecté de réduction des complexes de cuivre. En effet, tous nos spectres ont été enregistrés sur des volumes similaires (100 μL) et les mêmes concentrations de $\text{Cu}(\text{II})$ initiales. Bien entendu, la RPE ne peut pas détecter le $\text{Cu}(\text{I})$, cependant la double

intégration du signal observé à $g = 2$ indique, le même nombre de spins dans toutes les expériences, par conséquent il n'y a pas de diminution significative du signal RPE susceptible d'être interprétée comme une réduction formelle de Cu(II) à Cu(I). Dans le cas des complexes de la série "g" et [Cu(atsp)], il n'y a pas de réduction de Cu(II) à Cu(I). Dans le cas des complexes de la série "a", à l'exception de [Cu(atsp)], d'après l'allure des spectres nous pouvons dire qu'au moins une partie du Cu(II) passe à Cu(I) avec génération d'un radical probablement thiyl. Globalement, la charge du complexe n'est pas modifiée, il y a seulement une modification de la répartition des charges. Il faut bien insister sur le fait que tout ceci est observé en absence aussi bien qu'en présence de cellules.

Chapitre V

Bibliographie

- Alzheimer's Disease International. World Alzheimer Report. 2009.
<http://www.alz.co.uk/research/files/WorldAlzheimerReport.pdf>
- Association France Alzheimer. <http://www.francealzheimer.org/>
- Atwood CS, Perry G, Zeng H, Kato Y, Jones WD, Ling KQ, Huang X, Moir RD, Wang D, Sayre LM, Smith MA, Chen SG, Bush AI. Copper mediates dityrosine cross-linking of Alzheimer's amyloid-beta. *Biochemistry*, 2004;43(2):560-568.
- Barnes DE et Yaffe K. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurol.*, 2011;10(9):819-828.
- Bastos Tde O, Soares BM, Cisalpino PS, Mendes IC, dos Santos RG, Beraldo H. Coordination to gallium(III) strongly enhances the potency of 2-pyridineformamide thiosemicarbazones against *Cryptococcus opportunistic fungi*. *Microbiol Res.*, 2010;165(7):573-577.
- Bayer TA, Schäfer S, Simons A, Kemmling A, Kamer T, Tepest R, Eckert A, Schüssel K, Eikenberg O, Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Staufenbiel M, Multhaup G. Dietary Cu stabilizes brain superoxide dismutase 1 activity and reduces amyloid A β production in APP23 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003 Nov 25;100(24):14187-14192.
- Bellingham SA, Ciccotosto GD, Needham BE, Fodero LR, White AR, Masters CL, Cappai R, Camakaris J. Gene knockout of amyloid precursor protein and amyloid precursor-like protein-2 increases cellular copper levels in primary mouse cortical neurons and embryonic fibroblasts. *J Neurochem.*, 2004;91(2):423-428.
- Beraldo H et Gambino D. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. *Mini Rev Med Chem.*, 2004;4(1):31-39.
- Blennow K, Hampel H, Weiner M, Zetterberg H. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.*, 2010;6(3):131-144.
- Bush AI et Tanzi RE. Therapeutics for Alzheimer's disease based on the metal hypothesis. *Neurotherapeutics*. 2008;5(3):421-432.
- Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA. Alzheimer disease. *Dis Mon.*, 2010;56(9):484-546.
- Chandra S, Bargujar S, Nirwal R, Yadav N. Synthesis, spectral characterization and biological evaluation of copper(II) and nickel(II) complexes with thiosemicarbazones derived from a bidentate Schiff base. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2013;106:91-98.
- Choi BS et Zheng W. Copper transport to the brain by the blood-brain barrier and blood-CSF barrier. *Brain Res.*, 2009;1248:14-21.

- Clifford DB, Fagan AM, Holtzman DM, Morris JC, Teshome M, Shah AR, Kauwe JS. CSF biomarkers of Alzheimer disease in HIV-associated neurologic disease. *Neurology*, 2009;73(23):1982-1987.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein-E type-4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 1993;261(5123):921-923.
- Cowley AR, Davis J, Dilworth JR, Donnelly PS, Dobson R, Nightingale A, Peach JM, Shore B, Kerr D, Seymour L. Fluorescence studies of the intra-cellular distribution of zinc bis(thiosemicarbazone) complexes in human cancer cells. *Chem Commun (Camb)*, 2005;(7):845-847.
- Crouch PJ et Barnham KJ. Therapeutic redistribution of metal ions to treat Alzheimer's disease. *Acc Chem Res*, 2012;45(9):1604-1611.
- Crouch PJ, Hung LW, Adlard PA, Cortes M, Lal V, Filiz G, Perez KA, Nurjono M, Caragounis A, Du T, Laughton K, Volitakis I, Bush AI, Li QX, Masters CL, Cappai R, Cherny RA, Donnelly PS, White AR, Barnham KJ. Increasing Cu bioavailability inhibits Abeta oligomers and tau phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009;106(2):381-386.
- Cruchaga C, Haller G, Chakraverty S, Mayo K, Vallania FL, Mitra RD, Faber K, Williamson J, Bird T, Diaz-Arrastia R, Foroud TM, Boeve BF, Graff-Radford NR, St Jean P, Lawson M, Ehm MG, Mayeux R, Goate AM; NIA-LOAD/NCRAD Family Study Consortium. Rare variants in APP, PSEN1 and PSEN2 increase risk for AD in late-onset Alzheimer's disease families. *PLoS One*, 2012;7(2):e31039.
- Cruts M, Theuns J, Van Broeckhoven C. Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases. *Hum Mutat*, 2012;33(9):1340-1344.
- De Strooper B, Iwatsubo T, Wolfe MS. Presenilins and γ -secretase: structure, function and role in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012;2(1):a006304.
- Deibel MA, Ehmman WD, Markesbery WR. Copper, iron, and zinc imbalances in severely degenerated brain regions in Alzheimer's disease: possible relation to oxidative stress. *J Neurol Sci*, 1996;143(1-2):137-142.
- Delrieu J, Ousset PJ, Caillaud C, Vellas B. 'Clinical trials in Alzheimer's disease': immunotherapy approaches. *J Neurochem*. 2012 Jan;120 Suppl 1:186-193.
- Donnelly PS, Caragounis A, Du T, Laughton KM, Volitakis I, Cherny RA, Sharples RA, Hill AF, Li QX, Masters CL, Barnham KJ, White AR. Selective intracellular release of copper and zinc ions from bis(thiosemicarbazone) complexes reduces levels of Alzheimer disease amyloid-beta peptide. *J Biol Chem*, 2008;283(8):4568-4577.
- Donnelly PS, Xiao Z, Wedd AG. Copper and Alzheimer's disease. *Curr Opin Chem Biol*, 2007;11(2):128-133.

- Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Cummings JL, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, Delacourte A, Frisoni G, Fox NC, Galasko D, Gauthier S, Hampel H, Jicha GA, Meguro K, O'Brien J, Pasquier F, Robert P, Rossor M, Salloway S, Sarazin M, de Souza LC, Stern Y, Visser PJ, Scheltens P. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol.*, 2010;9(11):1118-1127.
- Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, Cummings J, Delacourte A, Galasko D, Gauthier S, Jicha G, Meguro K, O'brien J, Pasquier F, Robert P, Rossor M, Salloway S, Stern Y, Visser PJ, Scheltens P. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol.*, 2007;6(8):734-746.
- Farrell N. Biomedical uses and applications of inorganic chemistry. An overview. *Coord. Chem. Rev.*, 2002;232:1-4.
- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Sczufca M, Alzheimer's Disease International. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*, 2005;366(9503):2112-2117.
- Fodero-Tavoletti MT, Villemagne VL, Rowe CC, Masters CL, Barnham KJ, Cappai R. Amyloid- β : the seeds of darkness. *Int J Biochem Cell Biol.*, 2011;43(9):1247-1451.
- French FA et Freedlander BI. Carcinostatic action of polycarbonyl compounds and their derivatives: IV. Glyoxal bis (thiosemicarbazone) and derivatives. *Cancer Res.*, 1958;18(11):1290-1300.
- Frezard F et Garnier-Suillerot A. Comparison of the membrane transport of anthracycline derivatives in drug-resistant and drug-sensitive K562 cells. *Eur J Biochem.*, 1991;196(2):483-491.
- Frezard F et Garnier-Suillerot A. Determination of the osmotic active drug concentration in the cytoplasm of anthracycline-resistant and -sensitive K562 cells. *Biochim Biophys Acta*, 1991;1091(1):29-35.
- Fujibayashi Y, Taniuchi H, Yonekura Y, Ohtani H, Konishi J, Yokoyama A. Copper-62-ATSM: a new hypoxia imaging agent with high membrane permeability and low redox potential. *J Nucl Med.*, 1997;38(7):1155-1160.
- Gaggelli E, Kozlowski H, Valensin D, Valensin G. Copper homeostasis and neurodegenerative disorders (Alzheimer's, prion, and Parkinson's diseases and amyotrophic lateral sclerosis). *Chem Rev.*, 2006;106(6):1995-2044.
- Gallez C. Rapport sur la maladie d'Alzheimer et les maladies apparentées. Office Parlementaire d'Evaluation des Politiques de Santé, 2005.
- Gervais F, Paquette J, Morissette C, Krzywkowski P, Yu M, Azzi M, Lacombe D, Kong X, Aman A, Laurin J, Szarek WA, Tremblay P. Targeting soluble A β peptide with Tramiprosate for the treatment of brain amyloidosis. *Neurobiol Aging*, 2007;28(4):537-547.

- Ghosh AK, Brindisi M, Tang J. Developing β -secretase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease. *J Neurochem.*, 2012;120 Suppl 1:71-83.
- Glabe CG. Structural classification of toxic amyloid oligomers. *J Biol Chem.*, 2008;283(10):29639–29643.
- Glenner GG et Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. 1984. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2012;425(3):534-539.
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, Mant R, Newton P, Rooke K, Roques P, Talbot C, Pericak-Vances M, Roses A, Williamson R, Rossor M, Owen M, Hardy J. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 1991;349(6311):704-706.
- Haass C et Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2007;8(2):101-112.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.*, 1984;219(1):1-14.
- Hampel H, Lista S, Khachaturian ZS. Development of biomarkers to chart all Alzheimer's disease stages: the royal road to cutting the therapeutic Gordian Knot. *Alzheimers Dement.*, 2012;8(4):312-336.
- Hampel H, Prvulovic D, Teipel S, Jessen F, Luckhaus C, Frölich L, Riepe MW, Dodel R, Leyhe T, Bertram L, Hoffmann W, Faltraco F, German Task Force on Alzheimer's Disease. The future of Alzheimer's disease: the next 10 years. *Prog Neurobiol.*, 2011;95(4):718-728.
- Hardy J et Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 2002;297(5580):353-356. Erratum in *Science*, 2002;297(5590):2209.
- Haute Autorité de Santé. Actes et Prestations, Affection de longue durée, Maladie d'Alzheimer et autres démences. www.has-sante.fr. Juillet 2012.
- Herrmann N, Chau SA, Kircanski I, Lanctôt KL. Current and emerging drug treatment options for Alzheimer's disease: a systematic review. *Drugs*, 2011;71(15):2031-2065.
- Holstein M. Alzheimer's disease and senile dementia, 1885-1920: an interpretive history of disease negotiation. *Journal of Aging Studies*, 1997;11(1): 1-13.
- Hooli BV, Mohapatra G, Mattheisen M, Parrado AR, Roehr JT, Shen Y, Gusella JF, Moir R, Saunders AJ, Lange C, Tanzi RE, Bertram L. Role of common and rare APP DNA sequence variants in Alzheimer disease. *Neurology*, 2012;78(16):1250-1257.

- Hung YH, Bush AI, Cherny RA. Copper in the brain and Alzheimer's disease. *J Biol Inorg Chem.* 2010;15(1):61-76.
- Iqbal K, Liu F, Gong CX, Grundke-Iqbal I. Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Curr Alzheimer Res.* 2010;7(8):656-664.
- Jayadev S, Leverenz JB, Steinbart E, Stahl J, Klunk W, Yu CE, Bird TD. Alzheimer's disease phenotypes and genotypes associated with mutations in presenilin 2. *Brain* 2010;133(4):1143–1154.
- Jin M, Shepardson N, Yang T, Chen G, Walsh D, Selkoe DJ. Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA,* 2011;108(14):5819–5824.
- John EK et Green MA. Structure-activity relationships for metal-labeled blood flow tracers: comparison of keto aldehyde bis(thiosemicarbazone)copper(II) derivatives. *J Med Chem.,* 1990;33(6):1764-1770.
- Karran E, Mercken M, De Strooper B. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.,* 2011;10(9):698-712.
- Kepp KP. Bioinorganic chemistry of Alzheimer's disease. *Chem Rev.,* 2012;112(10):5193-5239.
- Kimmich GA, Randles J, Brand JS. Assay of picomole amounts of ATP, ADP, and AMP using the luciferase enzyme system. *Anal Biochem.,* 1975;69(1):187-206.
- Kitazawa M, Cheng D, Laferla FM. Chronic copper exposure exacerbates both amyloid and tau pathology and selectively dysregulates cdk5 in a mouse model of AD. *J Neurochem.,* 2009;108(6):1550-1560.
- Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP, Bergström M, Savitcheva I, Huang GF, Estrada S, Ausén B, Debnath ML, Barletta J, Price JC, Sandell J, Lopresti BJ, Wall A, Koivisto P, Antoni G, Mathis CA, Langstrom B. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol.,* 2004;55(3):306-319.
- Lambert C, Beraldo H, Lievre N, Garnier-Suillerot A, Dorlet P, Salerno M. Bis(thiosemicarbazone) copper complexes: mechanism of intracellular accumulation. *J Biol Inorg Chem.,* 2013;18(1):59-69.
- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1–42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA,* 1998;95(11):6448–6453.
- Lessa JA, Reis DC, Da Silva JG, Paradizzi LT, da Silva NF, Carvalho Mde F, Siqueira SA, Beraldo H. Coordination of thiosemicarbazones and bis(thiosemicarbazones) to

- bismuth(III) as a strategy for the design of metal-based antibacterial agents. *Chem Biodivers.*, 2012;9(9):1955-1966.
- Lewis HD, Pérez Revuelta BI, Nadin A, Neduvelil JG, Harrison T, Pollack SJ, Shearman MS. Catalytic site-directed gamma-secretase complex inhibitors do not discriminate pharmacologically between Notch S3 and beta-APP cleavages. *Biochemistry*, 2003;42(24):7580-7586.
- Lewis J, Laforest R, Buettner T, Song S, Fujibayashi Y, Connett J, Welch M. Copper-64-diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone): An agent for radiotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001;98(3):1206-1211.
- Lewis JS, Connett JM, Garbow JR, Buettner TL, Fujibayashi Y, Fleshman JW, Welch MJ. Copper-64-pyruvaldehyde-bis(N(4)-methylthiosemicarbazone) for the prevention of tumor growth at wound sites following laparoscopic surgery: monitoring therapy response with microPET and magnetic resonance imaging. *Cancer Res.*, 2002;62(2):445-449.
- Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL, Markesbery WR. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci.*, 1998;158(1):47-52.
- Lozzio CB et Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cellline with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, 1975;45(3): 321-334.
- Ma Q, Li Y, Du J, Liu H, Kanazawa K, Nemoto T, Nakanishi H, Zhao Y. Copper binding properties of a tau peptide associated with Alzheimer's disease studied by CD, NMR, and MALDI-TOF MS. *Peptides*, 2006;27(4):841-849.
- Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *J Lipid Res.*, 2009;50(Suppl):S183-S188.
- Mandelkow EM et Mandelkow E. Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, 2012;2(7):a006247.
- Maynard CJ, Cappai R, Volitakis I, Cherny RA, White AR, Beyreuther K, Masters CL, Bush AI, Li QX. Overexpression of Alzheimer's disease amyloid-beta opposes the age-dependent elevations of brain copper and iron. *J Biol Chem.*, 2002;277(47):44670-44676.
- Mc Donald JM, Savva GM, Brayne C, Welzel AT, Forster G, Shankar GM, Selkoe DJ, Ince PG, Walsh DM; Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study. The presence of sodium dodecyl sulphate-stable Abeta dimers is strongly associated with Alzheimer-type dementia. *Brain*, 2010;133(5):1328-1341.
- McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.*, 1999;46(6), 860-866.
- Milunovic MN, Enyedy É, Nagy NV, Kiss T, Trondl R, Jakupec MA, Keppler BK, Krachler R, Novitschi G, Arion VB. L- and D-proline thiosemicarbazone conjugates:

- coordination behavior in solution and the effect of copper(II) coordination on their antiproliferative activity. *Inorg Chem.*, 2012;51(17):9309-9321.
- Minkel DT et Petering DH. Initial reaction of 3-ethoxy-2-oxobutylaldehyde bis(thiosemicarbazonato) copper(II) with Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Res.*, 1978;38(1):117-123.
- Moller HJ et Graeber MB. The case described by Alois Alzheimer in 1911. Historical and conceptual perspectives based on the clinical record and neurohistological sections. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.*, 1998;248(3):111-122.
- Parrilha GL, da Silva JG, Gouveia LF, Gasparoto AK, Dias RP, Rocha WR, Santos DA, Speziali NL, Beraldo H. Pyridine-derived thiosemicarbazones and their tin(IV) complexes with antifungal activity against *Candida spp.* *Eur J Med Chem.*, 2011;46(5):1473-1482.
- Pascu SI, Waghorn PA, Kennedy BW, Arrowsmith RL, Bayly SR, Dilworth JR, Christlieb M, Tyrrell RM, Zhong J, Kowalczyk RM, Collison D, Aley PK, Churchill GC, Aigbirhio FI. Fluorescent copper(II) bis(thiosemicarbazones): synthesis, structures, electron paramagnetic resonance, radiolabeling, in vitro cytotoxicity and confocal fluorescence microscopy studies. *Chem Asian J.* 2010;5(3):506-519.
- Paterson BM et Donnelly PS. Copper complexes of bis(thiosemicarbazones): from chemotherapeutics to diagnostic and therapeutic radiopharmaceuticals. *Chem Soc Rev.*, 2011;40(5):3005-3018.
- Pereira E, Borrel MN, Fiallo M, Garnier-Suillerot A. Noncompetitive inhibition of P-glycoprotein-associated efflux of THPadriamycin by verapamil in living K562 leukemia cells. *Biochim Biophys Acta*, 1994;1225(2):209-216.
- Petering HG, Buskirk HH, Crim JA. The effect of dietary mineral supplements of the rat on the antitumor activity of 3-ethoxy-2-oxobutylaldehyde bis(thiosemicarbazone). *Cancer Res.*, 1967;27(6):1115-1121.
- Phinney AL, Drisaldi B, Schmidt SD, Lugowski S, Coronado V, Liang Y, Horne P, Yang J, Sekoulidis J, Coomaraswamy J, Chishti MA, Cox DW, Mathews PM, Nixon RA, Carlson GA, St George-Hyslop P, Westaway D. In vivo reduction of amyloid-beta by a mutant copper transporter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003;100(24):14193-14198.
- Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW. Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J Neurosci.*, 1993;13(4):1676-1687.
- Price KA, Crouch PJ, Lim S, Paterson BM, Liddell JR, Donnelly PS, White AR. Subcellular localization of a fluorescent derivative of Cull(atSm) offers insight into the neuroprotective action of Cull(atSm). *Metallomics*, 2011;3(12):1280-1290.
- Price KA, Crouch PJ, Volitakis I, Paterson BM, Lim S, Donnelly PS, White AR. Mechanisms controlling the cellular accumulation of copper bis(thiosemicarbazonato) complexes. *Inorg Chem.*, 2011;50(19):9594-9605.

- Que EL, Domaille DW, Chang CJ. Metals in neurobiology: probing their chemistry and biology with molecular imaging. *Chem Rev.*, 2008;108(5):1517-1549. Erratum in: *Chem Rev.*, 2008;108(10):4328..
- Ramachandran R, Rani M, Kabilan S. Design, synthesis and biological evaluation of novel 2-[(2,4-diaryl-3-azabicyclo[3.3.1]nonan-9-ylidene)hydrazono]-1,3-thiazolidin-4-ones as a new class of antimicrobial agents. *Bioorg Med Chem Lett.*, 2009;19(10):2819-2823.
- Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* 2011;7(3):137-152.
- Saido T et Leissring MA. Proteolytic degradation of amyloid β -protein. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, 2012;2(6):a006379.
- Saint-Aubert L, Puel M, Chollet F, Pariente J. Early diagnosis of Alzheimer's disease. *Rev Neurol (Paris)*, 2012;168(11):825-832.
- Schellenberg GD et Montine TJ. The genetics and neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.*, 2012;124(3):305-323.
- Selkoe D, Mandelkow E, Holtzman D. Deciphering Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012, 2(1):a011460.
- Smith DP, Ciccotosto GD, Tew DJ, Fodero-Tavoletti MT, Johanssen T, Masters CL, Barnham KJ, Cappai R. Concentration dependent Cu^{2+} induced aggregation and dityrosine formation of the Alzheimer's disease amyloid-beta peptide. *Biochemistry*, 2007;46(10):2881-2891.
- Smith PA, Proks P, Moorhouse A. Direct effects of tolbutamide on mitochondrial function, intracellular Ca^{2+} and exocytosis in pancreatic betacells. *Pflugers Arch.*, 1999;437(4): 577-588.
- Sosa-Ortiz AL, Acosta-Castillo I, Prince MJ. Epidemiology of dementias and Alzheimer's disease. *Arch Med Res.*, 2012;43(8):600-608.
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. Apolipoprotein-E: high-avidity binding to beta amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993;90(5):1977-1981.
- Subczynski WK, Antholine WE, Hyde JS, Kusumi A. Microimmiscibility and three-dimensional dynamic structures of phosphatidylcholine-cholesterol membranes: translational diffusion of a copper complex in the membrane. *Biochemistry*, 1990;29(34):7936-7945.
- Tanzi RE et Bertram L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* 2005;120(4):545-555.

- Tanzi RE et Bertram L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell*, 2005;120(4):545-555.
- Tanzi RE. The genetics of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, 2012;2(10):a006296.
- Tarasiuk J, Frezard F, Garnier-Suillerot A, Gattegno L. Anthracycline incorporation in human lymphocytes. Kinetics of uptake and nuclear concentration. *Biochim Biophys Acta*, 1989;1013(2): 109-117.
- Tardito S, Barilli A, Bassanetti I, Tegoni M, Bussolati O, Franchi-Gazzola R, Mucchino C, Marchiò L. Copper-dependent cytotoxicity of 8-hydroxyquinoline derivatives correlates with their hydrophobicity and does not require caspase activation. *J Med Chem.*, 2012;55(23):10448-10459.
- Thinakaran G et Koo EH. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem.* 2008;283(44):29615-29619.
- Tretter L, Chinopoulos C, Adam-Vizi V. Plasma membrane depolarization and disturbed Na⁺ homeostasis induced by the protonophore carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenyl-hydrazon in isolated nerve terminals. *Mol Pharmacol.*, 1998;53(4):734-741.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Nature*, 2002;416(6880):535–539.
- Wimo A, Jönsson L, Gustavsson A, McDaid D, Ersek K, Georges J, Gulácsi L, Karpáti K, Kenigsberg P, Valtonen H. The economic impact of dementia in Europe in 2008—cost estimates from the Eurocode project. *Int J Geriatr Psych.*, 2011;26(8):825–832.
- Witt A, Macdonald N, Kirkpatrick P. Memantine hydrochloride. *Nat Rev Drug Discov.*, 2004;3(2):109-110.
- Zhao Z, Shi Z, Liu M, Liu X. Microwave-assisted synthesis and *in vitro* antibacterial activity of novel steroidal thiosemicarbazone derivatives. *Bioorg Med Chem Lett.*, 2012;22(24):7730-7734.

Complexes de cuivre pour le traitement de la maladie d'Alzheimer : étude de leur accumulation intracellulaire

Résumé

Les bases moléculaires de la maladie d'Alzheimer n'ont pas encore été clairement établies mais il semblerait que la dérégulation de l'homéostasie des métaux, et plus particulièrement celle du cuivre, soit étroitement liée à la pathogénèse de la maladie et à ses dépôts caractéristiques de peptide amyloïde (A β). Des thérapies basées sur la modulation de l'homéostasie en cuivre ont vu le jour. Dans ce contexte, les complexes de cuivre et de bis(thiosemicarbazones) ([Cu(btsc)]) ont été proposés pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. En effet, ces complexes sont supposés moduler la concentration en cuivre et modifier la production du peptide A β dans les neurones. Par ailleurs, il est proposé que les complexes [Cu(btsc)] puissent être réduits dans la cellule. Cependant, à notre connaissance, la réduction intracellulaire de ces composés n'a jamais pas été démontrée. Ainsi, le but de notre étude était d'améliorer la compréhension du mécanisme d'accumulation intracellulaire des complexes de [Cu(btsc)]. Nos résultats révèlent que l'accumulation intracellulaire du cuivre dans les cellules est très élevée et que ces composés ne sont pas substrats de la P-glycoprotéine. Cette protéine est un élément clé dans la faible perméabilité de la barrière hémato-encéphalique. Par ailleurs, nous n'avons pas détecté de réduction intracellulaire des ions cuivriques. Enfin, une fois dans la cellule, les complexes subissent une agrégation, ce qui suggère fortement que l'agrégation des complexes est la force motrice responsable de leur accumulation intracellulaire. Leur localisation intracellulaire est en partie diffuse mais une quantité non négligeable se localise autour des gouttelettes lipidiques.

Copper complexes for the treatment of Alzheimer disease: study of their intracellular accumulation

Summary

The molecular basis of Alzheimer's disease has not been clearly established, but disruption of brain metal ion homeostasis, particularly copper and zinc, might be closely involved in the pathogenesis of this disease and its characteristic β -amyloid neuropathological features. The use of complexes of copper with bis(thiosemicarbazones) ([Cu(btsc)]) has been proposed for the treatment of Alzheimer's disease. Their mode of action could involve the modulation of the concentration of copper or zinc, and it has been suggested that these compounds can modulate the production of β -amyloid peptide at the neuron level. Furthermore, it has been reported that [Cu(btsc)] complexes can be reduced inside the cells. However, to our knowledge the intracellular reduction of these compounds has never been demonstrated. Thus, the goal of our study was to increase understanding of the mechanism of intracellular accumulation of [Cu(btsc)] complexes. Our results reveal that the intracellular concentration of copper inside the cells is very high and that these compounds are not P-glycoprotein substrates. This protein is a key element of the low permeability of the blood-brain barrier. Furthermore, no intracellular reduction of cupric ions was detected. Finally, once inside the cells, the complexes undergo aggregation, strongly suggesting that aggregation of complexes is the driving force responsible for their intracellular accumulation. Their intracellular localization is partly scattered but a significant amount is localized around lipid droplets.

Mots clés : Maladie d'Alzheimer ; Cu(bis(thiosemicarbazones)) ; accumulation intracellulaire; agrégation.

Discipline : Biologie

Laboratoire CSPBAT, équipe SBMB, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, CNRS (UMR 7244), UFR-SMBH, 74 rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny, France
