AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

DB 11281

UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY I

1998

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE ET SANTE"

THESE

Présentée et soutenue publiquement

le 09 juin 1998

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
HENRI POINCARE - NANCY I
Mention Sciences du Médicament

par

Corinne JOLIVALT

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies
National de Toxicologie

BIBLIOTHÈQUE
PHARMACIE
ODONTOLOGIE
NANCY

Sujet :

Oxydation des 3 isoformes d'apolipoprotéine E humaine.

Rôle protecteur des antioxydants et implication dans la maladie d'Alzheimer.

MEMBRES DU JURY

Juges : Pr. Siest G., Professeur (Nancy)
Dr. Christen Y., (Paris)
Dr. Leininger-Muller B., Maître de Conférences, (Nancy)
Rapporteurs : Dr. Blache D., Directeur de recherche INSERM, (Dijon)
Dr. Chapman J., Directeur de recherche INSERM, (Paris)
Pr. Descomps B., Professeur (Montpellier)

104 031752 8

FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

UNIVERSITE Henri Poincaré - NANCY I

Membres du personnel enseignant

Doyen : C. VIGNERON
Vice Doyen : G. CATAU

PROFESSEURS HONORAIRES

M. BERNANOSE André
Mle BESSON Suzanne
Mle GIRARD Thérèse
M. MEUNIER André
M. MIRJOLET Marcel
M. PIERFITTE Maurice
M. SOLEIL Jean

PROFESSEURS

M.	ASTIER Alain	Pharmacie Clinique
M.	ATKINSON Jeffrey	Pharmacodynamie
M.	BAGREL Alain	Biochimie fondamentale et clinique, Biotechnologies
Mle	BATT Anne Marie	Toxicologie
M.	BLOCK Jean Claude	Santé et Environnement
M.	BONALY Roger	Biochimie microbienne
Mme	FINANCE Chantal	Microbiologie moléculaire
Mle	GALTEAU Marie Madeleine	Biochimie
M.	HENRY Max	Biologie végétale
M.	HOFFMAN Maurice	Pharmacie clinique
M.	JACQUE Michel	Pharmacodynamie
M.	LABRUDE Pierre	Physiologie
M.	LALLOZ Lucien	Chimie organique
M.	LECTARD Pierre	Biologie végétale et Cryptogamie
M.	LOPPINET Vincent	Chimie thérapeutique
M.	MAINCENT Philippe	Pharmacie galénique
M.	MARSURA Alain	Chimie thérapeutique
M.	MARTIN Jean Armand	Chimie minérale et Minéralogie
M.	MORTIER François	Pharmacognosie
M.	NICOLAS Alain	Chimie analytique et Bromatologie
Mme	SCHWARTZBROD Janine	Bactériologie - Parasitologie
M.	SCHWARTZBROD Louis	Virologie - Immunologie
M.	SIEST Gérard	Chimie Biologique
M.	SIMON Jean Michel	Droit et Economie de la Santé
M.	VIGNERON Claude	Hématologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme	ALBERT Monique	Bactériologie - Virologie
M.	BAUDOT Philippe	Toxicologie
Mme	BENOIT Emmanuelle	Chimie Analytique
M.	BONNEAUX François	Chimie Thérapeutique
M.	CATAU Gérald	Pharmacodynamie
M.	CHEVIN Jean Claude	Chimie minérale
M.	COLLIN Jean François	Pôle européen
Mme	COLLOMB Jocelyne	Parasitologie
M.	COULON Joël	Biochimie
M.	DECOLIN Dominique	Chimie analytique
Mme	FAIVRE-FIORINA Béatrice	GBM - Hématologie
M.	FERRARI Luc	Biochimie
Mme	FRIANT-MICHEL Pascale	Biophysique et Mathématiques
Mme	FUZELLLIER Marie Claude	Pharmacognosie
M.	GHERMANI Nour-Eddine	Biophysique - Biomathématiques
Mle	HASENFRATZ Marie Paule	Biologie Végétale
Mle	HINZELIN Françoise	Biologie végétale et Pharmacognosie
M.	HUMBERT Thierry	Interactions moléculaires
Mle	IMBS Marie Andrée	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme	KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie Galénique
Mme	LARTAUD-IDJOUADIENE Isabelle	Pharmacologie
Mme	LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
M.	LEROY Pierre	Chimie analytique
Mme	LETOT Michèle	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme	LIVERTOUX Marie Hélène	Toxicologie
Mme	MARCHAND-ARVIER Monique	Immunologie - Hématologie
M.	MENU Patrick	Physiologie
M.	MIGNOT Bernard	Physique
M.	MONAL Jean Louis	Chimie Thérapeutique
M.	NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme	PAULUS Francine	Informatique
Mme	PERDICAKIS Christine	Chimie organique
Mme	PICHON Virginie	Biophysique et Mathématiques
Mme	POCHON Marie France	Chimie analytique
Mme	ROVEL Anne	Immunologie - Hématologie
M.	VISVIKIS Athanase	Toxicologie
Mme	WELLMAN-ROUSSEAU Maria Monika	Biochimie
Mme	ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

ASSISTANTS

Mme	BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
M.	DANGIEN Bernard	Botanique
Mme	MOREAU Blandine	Pharmacognosie
Mme	PAVIS Annie	Parasitologie
M.	TROCKLE Gabriel	Pharmacodynamie

PROFESSEUR AGREGE

M.	COCHAUD Christophe	Anglais

Ce travail a été réalisé au

Centre du Médicament
UPRES EA
(Directeur : Pr. G. Siest)
Faculté de Pharmacie, Université Henri Poincaré Nancy I
30 rue Lionnois
54000 NANCY

et financé par l'

Institut Ipsen
24 rue Erlanger
75000 PARIS

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur G. SIEST pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et donné les moyens de mener à bien ce travail.
Que la confiance qu'il m'a accordée trouve écho dans ce travail.

Je remercie Monsieur le Docteur Y. CHRISTEN de l'Institut Ipsen pour m'avoir accordé sa confiance en me proposant ce travail de plus de trois ans.
Sa participation au Jury m'honore.
Je souhaiterais également remercier l'Institut IPSEN pour le financement de ces travaux.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur B. DESCOMPS, Monsieur le Docteur J. CHAPMAN ainsi que Monsieur le Docteur D. BLACHE pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Madame le Docteur B. LEININGER-MULLER pour avoir suivi ce travail de thèse et pour l'aide qu'elle m'a accordée tout au long de ces années.
Qu'elle trouve dans ce travail toute ma considération et le résultat de plus de trois ans d'étroite collaboration.

J'adresse mes vifs remerciements à Monsieur le Docteur P. BERTRAND pour son aide, les discussions scientifiques, et l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail.
Qu'il soit assuré de mon profond respect.

Je remercie Madame le Docteur M.H. LIVERTOUX pour m'avoir aidée par ses conseils au cours de mon travail de DEA.

Je tiens à remercier Madame le Docteur R. HERBER pour son aide, son soutien moral ainsi que Madame le Docteur M. CHAT pour son aide, sa disponibilité et sa sympathie.

Je voudrais également remercier toutes les personnes qui ont contribué à ce travail (Dr R. Drozdz, Dr. A. Dergunov, A. Hoy, M. Starck) ainsi que tous les membres du laboratoire du Centre du Médicament.

A toute ma famille, plus particulièrement à mes parents et ma soeur,
sans qui tout ce chemin n'aurait pas été possible.

A tous mes amis.

BIBLIOTHÈQUE PHARMACIE ODONTOLOGIE NANCY

Page

Liste des abréviations i

Liste des figures iii

Liste des tableaux v

Situation du sujet

I. L'apolipoprotéine E 1

1. Structure 2

2. Fonctions de l'apolipoprotéine E dans le cerveau 4

3. Polymorphisme génétique et conséquences fonctionnelles et pathologiques 7

4. Apolipoprotéine E et maladie d'Alzheimer 9

4.1. Aspect clinique de la maladie d'Alzheimer 9

4.2. Implication du polymorphisme de l'apolipoprotéine E dans la maladie d'Alzheimer 11

4.3. Apolipoprotéine E et régénérescence neuronale 12

4.4. Apolipoprotéine E et amyloïdose 13

4.5. Apolipoprotéine E et dégénérescence neurofibrillaire 15

II. La maladie d'Alzheimer et les théories du vieillissement 17

1. Les théories du vieillissement 17

2. Le vieillissement cérébral 19

3. Implication du stress oxydant dans la maladie d'Alzheimer 20

III. Production de radicaux libres dans le cerveau 22

1. Les espèces réactives dérivées de l'oxygène 22

SOMMAIRE

1.1. L'ion superoxyde 23

1.2. Le peroxyde d'hydrogène 23

1.3. Le radical hydroxyle 24

2. Systèmes de production de radicaux libres 25

2.1. Par réactions chimiques non enzymatiques 25

2.1.1. En présence de fer 26

2.1.2. En présence de cuivre 28

2.1.3. En présence d'ion vanadyle 29

2.2. Par réactions enzymatiques 29

2.2.1. La xanthine oxydase 30

2.2.2. Les monoamines oxydases 30

2.2.3. La NADPH-cytochrome P450 réductase 31

2.2.4. Les cytochromes P450 32

2.2.5. La myéloperoxydase 34

2.2.5.1. L'enzyme et sa fonction 34

2.2.5.2. Le système oxydant 36

IV. Oxydation des protéines 37

1. Modification des acides aminés 38

1.1. Formation de ponts disulfure 39

1.2. Modification de charge 39

1.3. Perte de tryptophane 39

1.4. Formation de bityrosine 40

1.5. Groupements carbonyle 41

1.6. Formation d'adduits 42

2. Modification de structure 43

2.1. Agrégation 43

2.2. Fragmentation 43

2.3. Protéolyse 44

V. Marqueurs biologiques de l'oxydation des protéines 45

VI. Protection contre les radicaux libres 46

1. Systèmes enzymatiques cérébraux 48

1.1. La superoxyde dismutase 48

1.2. La catalase 48

1.3. La glutathion peroxydase 49

1.4. Les glutathion *S*-transférases 49

2. Systèmes non enzymatiques cérébraux 50

2. 1. La vitamine E 50

2.2. La vitamine C 51

2.3. Le glutathion 52

2.4. L'acide urique 52

2.5. La bilirubine 53

2.6. La mélatonine 53

3. Applications thérapeutiques et études cliniques 54

3.1. Les médicaments du système cardio-vasculaire 55

3.2. Les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens 55

3.3. Les oestrogènes 56

3.4. Les antioxydants 57

3.4.1. Traitement par la sélégiline et la vitamine E 58

3.4.2. L'extrait de *Ginkgo biloba* 58

Objectifs du travail 61

Matériel et Méthodes 65

I. Production et purification des isoformes d'apo E recombinante 65

II. Systèmes *in vitro* d'oxydation de l'apo E 66

1. Système d'oxydation chimique 66
1.1. Principe 66
1.2. Protocole 67

2. Systèmes d'oxydation enzymatique 67

2.1. Système d'oxydation à pH 4,5 68
2.1.1. Principe 68
2.1.2. Protocole 68

2.2. Système d'oxydation à pH 7,4 68
2.2.1. Principe 68
2.2.2. Protocole 69

III. Incubation en présence de substances antioxydantes 70

IV. Analyses des protéines 70

1. Electrophorèse 70
1.1. Composition des gels et tampons 71
1.2. Conditions de migration 71

2. Transfert et immunorévélation 72

2.1. Protocole 72

2.2. Immunorévélation 73
2.2.1. Détection des groupements carbonyles 73
2.2.1.1. Principe 73
2.2.1.2. Protocole 74
2.2.2. Détection de l'apo E 75
2.2.3. Détection de la myéloperoxydase 75

V. Préparation de complexes lipoprotéiques 76

1. Principe 76

2. Protocole 76

VI. Analyses par chromatographie liquide haute performance en phase inverse 77

1. Principe 77

2. Protocole 78

VII. Mesure de la fibrillation d'Aβ 78

1. Principe 78

2. Protocole 79

VIII. Autres méthodes 79

1. Incubation en présence d'un excès d'acides aminés spécifiques 79

2. Hydrolyses enzymatiques 80

2.1. Par l'entérokinase 80
2.2. Par la thrombine 80

3. Fractionnement subcellulaire 81

4. Mesure de l'activité GST 83

5. Dosage des protéines 83

Résultats 84

I. Publication n°1 84

C. Jolivalt, B. Leininger-Muller, R. Drozdz, J.W. Naskalski, G. Siest (1996)
Apolipoprotein E is highly susceptible to oxidation by myeloperoxidase, an enzyme present in brain.
Neurosci. Lett., 210, 61-64

II. Publication n°2 88

C. Jolivalt, B. Leininger-Muller, P. Bertrand,R. Herber, Y. Christen, G. Siest
Oxidation of human apolipoprotein E: isoform susceptibility, interaction with phospholipids and amyloid β.
Soumis à J. Biol Chem.

III. Publication n°3 101

Oxidation of human apolipoprotein E: isoforms susceptibility and protection with *Ginkgo biloba* EGB 761 extract. (1998)
In L. Packer, Y. Christen (Eds), *Ginkgo biloba* extract (Egb 761) study: Lesson from cell biology. Advances in EGb 761 research, vol.7, Paris Elsevier, *sous presse*

IV. Publication n° 4 103

B. Leininger-Muller, **C. Jolivalt,** P. Bertrand, G. Siest (1998)
Oxidation of human apolipoprotein E and cerebral enzymatic systems.
Alzheimer's Report, *sous presse*

V. Résultats récents 106

Discussion 116

Conclusions et Perspectives 123

Références bibliographiques 129

LISTE DES ABREVIATIONS

Aβ : protéine béta-amyloïde

AGE : produit de glycation avancée

AINS : antiinflammatoire non stéroïdien

Apo : apolipoprotéine

APP : précurseur de la protéine amyloïde

BHE : barrière hématoencéphalique

CLHP : chromatographie liquide haute performance

CNDB : 1-chloro-2,4-dinitrobenzène

Cu : cuivre

DMPC : dimirisoyl phosphatidyl choline

DNF : dégénérescence neurofibrillaire

DNP : dinitrophényle

DNPH : dinitrophényl hydrazyne

DPPC : dipalmitoyl phosphatidyl choline

ECL : enhanced chimiluminescence

Fe : fer

GSSG : glutathion oxydé

GSH : glutathion

GSH-Px : glutathion peroxydase

HNE : 4-hydroxynonénal

HOCl : acide hypochlorique

HRP : horse radish peroxidase ou peroxidase du Raifort

HDL : lipoprotéine de haute densité

H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène

IDL : lipoprotéine de densité intermédiaire

LCR : liquide céphalo-rachidien

LDL : lipoprotéine de faible densité

MA : maladie d'Alzheimer

MAO : monoamine oxydase

MCO : oxydation catalysée par des métaux

MDA : malonedialdéhyde

NADP : nicotinamide dinucléotide phosphate

$O_2^{\cdot -}$: ion superoxyde

P450 : cytochrome P450

PMN : polymorphonucléaire neutrophile

PVDF : polyvinyl difluoride

RL : radicaux libres

SAB : sérumalbumine bovine

SDS : sodium dodecyl sulfate

SNC : système nerveux central

SOD : superoxyde dismutase

TBST : Tris buffer saline tween

TFA : acide trifluoroacétique

V : vanadium

VLDL : lipoprotéine de très faible densité

VO_3^- : ion vanadate

VO^{2+} : ion vanadyle

LISTE DES FIGURES

	Page
1. Domaine N-terminal de l'apo E.	2
2. Structure en 3 dimensions du domaine N-terminal en solution aqueuse et dans les lipides.	3
3. Rôle de l'apoliporpotéine E dans la régénération des nerfs périphériques.	6
4. Caractéristiques de chaque allèle codant pour les 3 isoformes d'apo E.	7
5. Distribution des apo E2, apo E3 et apo E4 parmi les lipoprotéines plasmatiques.	9
6. Implication de l'apolipoprotéine E dans la maladie d'Alzheimer sur un modèle de neurones.	14
7. Hypothèses de l'implication de l'apo E dans les processus conduisant à la Maladie d'Alzheimer.	16
8. Balance anti/prooxydante.	18
9. Augmentation des protéines oxydées détectées par leur groupements carbonyle dans le cerveau.	20
10. Mécanisme d'oxydation d'un résidu lysine par oxydation catalysée par le fer.	26
11. Production d'ion superoxyde au cours du cycle ischémie/réoxygénation	30
12. Réduction d'un composé X par la NADPH-cytochrome P450 réductase.	32
13. Cycle catalytique du cytochrome P450.	33
14. Modèle de la structure native de la myéloperoxydase.	34
15. Conséquences du métabolisme oxydant sur les protéines.	37
16. Oxydation d'un résidu méthionine.	38
17. Formation de bityrosine par oxydation.	40
18. Révélation des groupements carbonyle par réaction avec la dinitrophényle hydrazine.	41
19. Enzymes d'oxydation et de protection.	47
20. Action de la vitamine E (α-TO) sur une protéine R oxydée (R$^{\cdot}$).	51

21. Recyclage de la vitamine E par le glutathion. 51

22. Principales conséquences de l'oxydation de l'apoliporotéine E. 64

23. Principe de révélation par les anticorps anti-DNP. 74

24. Représentation shématique de la technique d'ultracentrifugation différentielle utilisée pour le fractionnement subcellulaire. 82

25. Oxydation de l'apo E3 et de l'apo E4 par le système chimique vanadyle/H_2O_2. 85

26. Profil électrophorétique de l'apo E4 hydrolysée par l'entérokinase. 91

27. Profil électrophorétique de l'apo AI, l'apo E3 et l'apo E4 incorporées dans les disques de DPPC après coloration au bleu de Coomassie. 94

28. Fluorescence de la thioflavine T en présence de Aβ et des 3 isoformes d'apo E incorporées dans des disques de DPPC, après 6 heures d'incubation. 98

29. Oxydation de l'apo E4 par le système MPO/H_2O_2/Cl^- en présence de méthionine (Met), tryptophane (Tryp) et de tyrosine (Tyr). 107

30. Profil électrophorétique, après coloration au bleu de Coomassie, de l'apo E4 hydrolysée par la thrombine. 108

31. Pourcentage de réduction du déplacement électrophorétique de la bande majeure d'apo E après oxydation par le système MPO/H_2O_2/Cl^-, en présence de l'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba.* 110

32. Profil CLHP de l'apo E4 avant et après oxydation, en présence ou en absence de l'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba.* 112

33. Pourcentage de réduction du déplacement électrophorétique de la bande majeure d'apo E après oxydation par le système MPO/H_2O_2/Cl^-, en présence de concentrations différentes en α-tocophérol 114

34. Pourcentage de réduction du déplacement électrophorétique de la bande majeure d'apo E après oxydation par le système MPO/H_2O_2/Cl^-, en présence de différentes concentrations en glutathion. 115

35. Hypothèse de l'implication de l'oxydation de l'apo E dans l'homéostasie lipidique participant à l'étiologie de la MA. 124

36. Hypothèse de l'implication de l'oxydation de l'apo E4 dans la formation des plaques séniles 125

LISTE DES TABLEAUX

	Page
I. Principaux récepteurs liant l'apo E localisés dans le cerveau.	5
II. Potentiel d'oxydo-réduction des espèces réactives dérivées de l'oxygène.	23
III. Produit d'oxydation de quelques acides aminés.	26
IV. Caractéristiques des échantillons cérébraux humains de l'étude.	81

SITUATION DU SUJET

BIBLIOTHÈQUE
PHARMACIE
ODONTOLOGIE
NANCY

I. L'apolipoprotéine E

Les apolipoprotéines (apo) sont des protéines qui s'associent aux lipides pour former des lipoprotéines. Actuellement, il existe différentes apolipoprotéines dont les principales sont les apo A, B, C, D, E, F, G, et J. Les lipoprotéines plasmatiques se différencient par leur densité et leur contenu en lipides et en protéines. Sur la base de leur densité, on distingue les chylomicrons, les VLDL (lipoprotéine de très faible densité), les LDL (lipoprotéine de faible densité), les IDL (lipoprotéine de densité intermédiaire) et les HDL (lipoprotéine de haute densité).

L'apo E a été décrite pour la première fois en 1974 (Shore et al., 1974) comme une "protéine riche en arginine" associée aux VLDL. C'est en 1975 que cette "protéine riche en arginine" fut désignée par le terme apo E (Utermann, 1975). Elle est initialement impliquée dans l'homéostasie lipidique. L'apo E est synthétisée principalement par le foie mais également par de nombreux autres tissus. Dans le cerveau, elle est synthétisée par les astrocytes (Boyles et al., 1985) ainsi que par les macrophages (Basu et al., 1982).

1. Structure

L'apo E est une protéine de 299 acides aminés et d'un poids moléculaire de 34,2 kDa (Weisgraber, 1994). Elle est constituée de 2 domaines principaux : le domaine N-terminal des acides aminés 1 à 191, et le domaine C-terminal des acides aminés 216 à 299 (Aggerbeck et al., 1988). Ces 2 domaines sont séparés par une région non-ordonnée de 23 acides aminés sensible à plusieurs protéases, notamment la thrombine. Le domaine N-terminal a été étudié par cristallographie et montre 4 hélices orientées de façon antiparallèle (Wilson et al., 1993) (Figure 1) alors que le domaine C-terminal n'a pas été cristallisé du fait de sa forte instabilité.

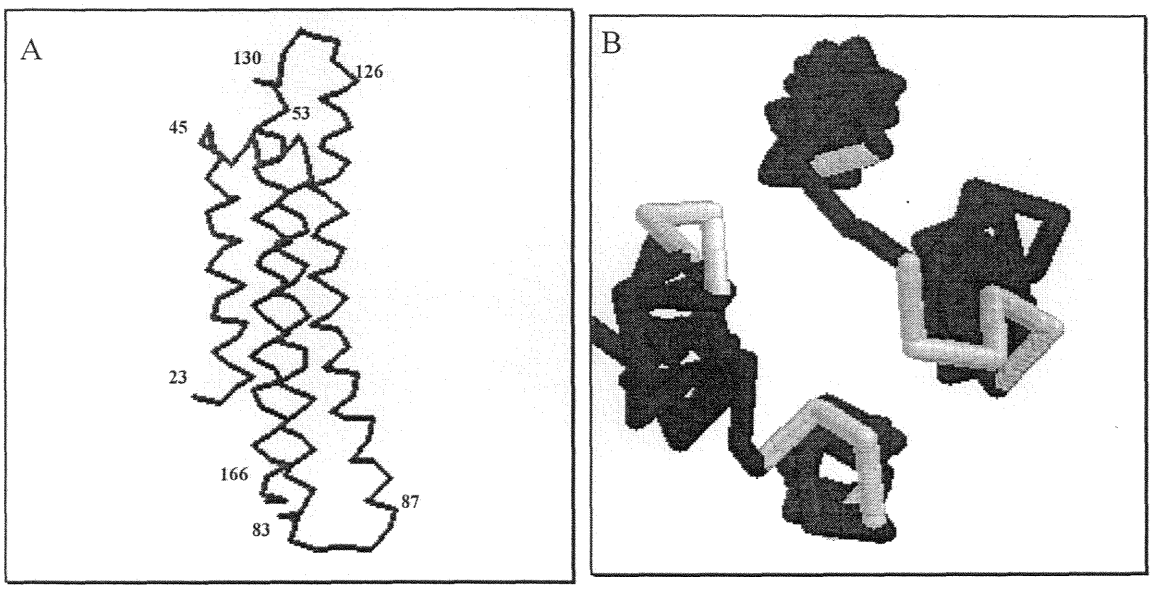


Figure 1 : Domaine N-terminal de l'apo E.
A: Fragment N-terminal obtenu d'après les données de cristallographie.
B: Vue de dessus de la partie N-terminale.

Dans la structure en hélice du domaine N-terminal, les acides aminés hydrophobes sont séquestrés à l'intérieur de la molécule alors que les acides aminés hydrophiles se trouvent

sur la face externe. L'apo E est globalement neutre, avec cependant une région chargée positivement au niveau des acides aminés 136 à 150, région correspondant au site de liaison aux récepteurs et à l'héparine (Weisgraber, 1994).

L'apo E se lie avec une forte affinité aux lipides par son domaine C-terminal, mais le domaine N-terminal peut également s'associer *in vitro* aux phospholipides (PL) sous forme de particules discoïdales (Innerarity et al., 1983). Cette incorporation de l'apo E dans les lipides provoque un changement de conformation par rapport à la structure décrite en solution aqueuse, exposant différemment certains acides aminés hydrophobes (Weisgraber, 1994) (Figure 2). L'apo E peut également se tétramériser en solution aqueuse par l'intermédiaire du domaine C-terminal (Yokayama et al., 1985 ; Wetterau et al., 1988 ; Aggerbeck et al., 1988).

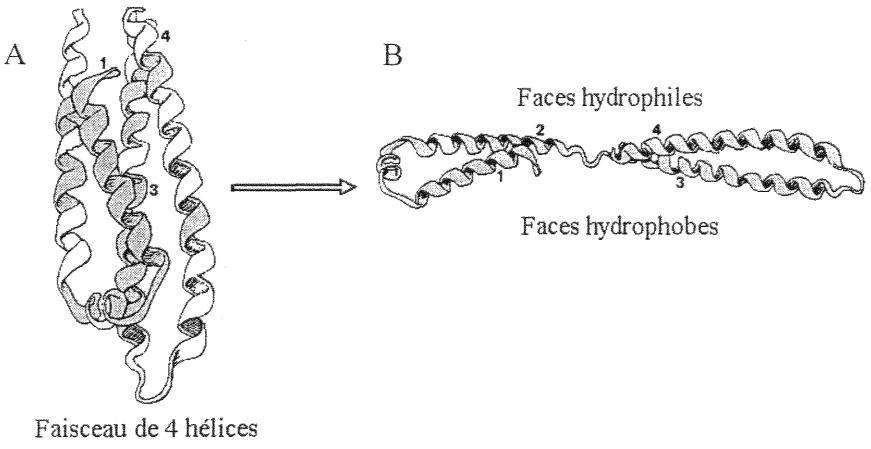


Figure 2 : Structure en 3 dimensions du domaine N-terminal en solution aqueuse (A) et dans les lipides (B).

2. Fonctions de l'apolipoprotéine E dans le cerveau

Le cerveau est le second site de production de l'apo E après le foie (Elshourabgy et al., 1985). Ce sont essentiellement les astrocytes qui supportent cette production (Boyles et al., 1985), représentant 1/3 des quantités observées dans le foie. Cette synthèse cérébrale d'apo E est augmentée d'un facteur 250 à 350 lors de lésions nerveuses (Ignatius et al., 1986).

Si aucune donnée n'existe concernant l'espace extracellulaire cérébral lui-même, dans le liquide céphalorachidien (LCR), l'apo E est essentiellement sous forme de particules proches des HDL. En effet, dans le LCR, l'apo E est retrouvée associée à des lipoprotéines de densités comprises entre 1,09 et 1,12 g/ml (densités des HDL plasmatiques : 1,06 à 1,21 g/ml) (Pitas et al., 1987a ; Borghini et al., 1995). Les lipoprotéines contenant l'apo E peuvent se lier au récepteur des LDL et participer ainsi à la redistribution des lipides et à l'homéostasie du cholestérol, synthétisé localement dans le cerveau (Pitas et al, 1987a).

L'apo E joue donc un rôle prépondérant dans le métabolisme lipidique par l'intermédiaire de plusieurs récepteurs. En effet, l'apo E des lipoprotéines est le ligand de différents récepteurs cellulaires qui permettent le métabolisme et le catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides (Goldstein et al., 1983 ; Beisiegel et al., 1989).

Il existe plusieurs récepteurs cellulaires qui régulent le catabolisme lipidique et le taux de cholestérol, et dont l'apo E est le ligand :

- le récepteur des LDL, caractérisé dans le foie, existe dans le système nerveux central (SNC) et a été localisé dans les cellules endothéliales constituant la barrière hématoencéphalique (BHE) (Méresse et al., 1989), les cellules gliales et les neurones,
- le récepteur LRP (LDL-related protein) ou récepteur de l'α2-macroglobuline est localisé au niveau du foie mais également dans les neurones (Tooyama et al., 1995) et dans les

astrocytes (Ishiguro et al., 1995)

- le récepteur des VLDL, peu présent au niveau du foie, est localisé essentiellement dans la microglie

- le récepteur "scavenger" (littéralement "éboueur") reconnaissant les lipoprotéines modifiées, est présent dans les macrophages et les cellules endothéliales de la BHE (de Vries et al., 1993) et dans la microglie.

Des récepteurs ont récemment été identifiés dans les neurones et au cours du développement du SNC (Kim et al., 1996 ; Jacobsen et al., 1996 ; Schneider et al., 1997) ; ce sont notamment les récepteurs LR7, LR8B ou LR11.

Les différents récepteurs présents au niveau cérébral sont répertoriés dans le tableau suivant (Tableau I) :

Tableau I : Principaux récepteurs liant l'apo E localisés dans le cerveau humain

Récepteurs	**Localisation dans le cerveau**
Récepteur des LDL	Neurones, glie, cellules endothéliales
Récepteur LRP	Neurones, astrocytes activés, cellules granulaires, plexus choroïde
Récepteur des VLDL	Microglie
Récepteur scavenger	Cellules endothéliales, microglie
Récepteur LR7, LR8B, LR11	Cortex cérébral, plexus choroïde, hippocampe

Par ailleurs, l'apo E joue un rôle important au niveau du cerveau, où elle participe à la régénération des neurones (Figure 3). Il a été montré que la synthèse d'apo E augmente après lésion des neurones périphériques (Snipes et al, 1986) et centraux (Poirier, 1991).

L'apo E transporterait les lipides provenant des neurones en dégénérescence vers les axones en régénération (Handelmann et al., 1992) mais également vers les cellules de Schwann, responsables de la remyélinisation (Goodrum, 1991).

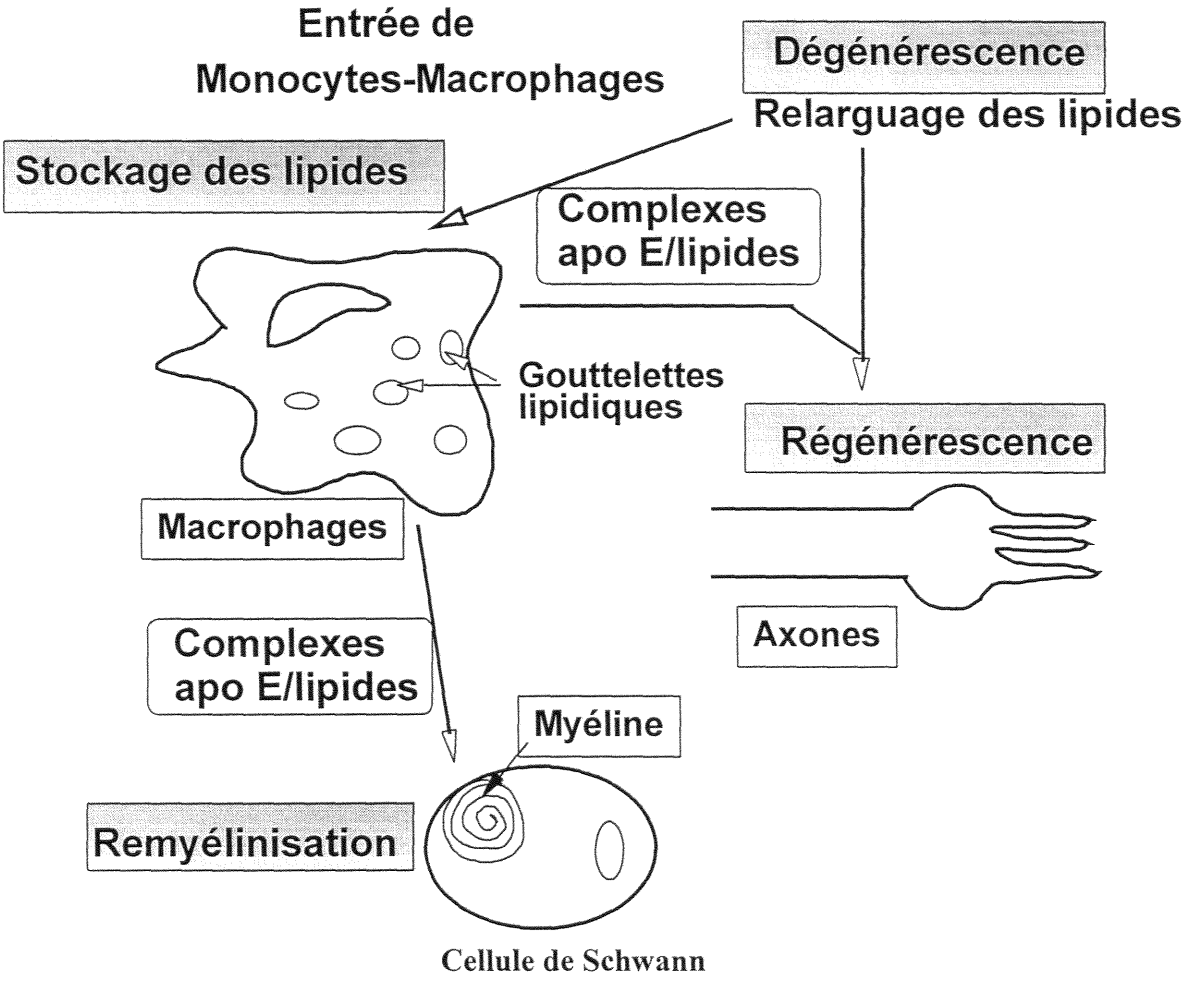


Figure 3 : Rôle de l'apolipoprotéine E dans la régénération des nerfs périphériques, d'après Mahley (1988).

3. Polymorphisme génétique et conséquences fonctionnelles et pathologiques

L'apo E est une protéine polymorphe, dont le locus est situé sur le chromosome 19. C'est en 1980 qu'Utermann décrit le polymorphisme de cette protéine, confirmé par Zannis et Breslow en 1981. Trois allèles majeurs ε2, ε3, ε4 codent pour 3 isoformes de la protéine se différenciant par un ou deux acides aminés. En effet, l'apo E2 possède 2 cystéines en position 112 et 158, alors que l'apo E3 possède une cystéine en position 112 et une arginine en position 158. L'apo E4 ne possède pas de cystéine mais deux arginines à ces positions (Weisgraber, 1994) (Figure 4).

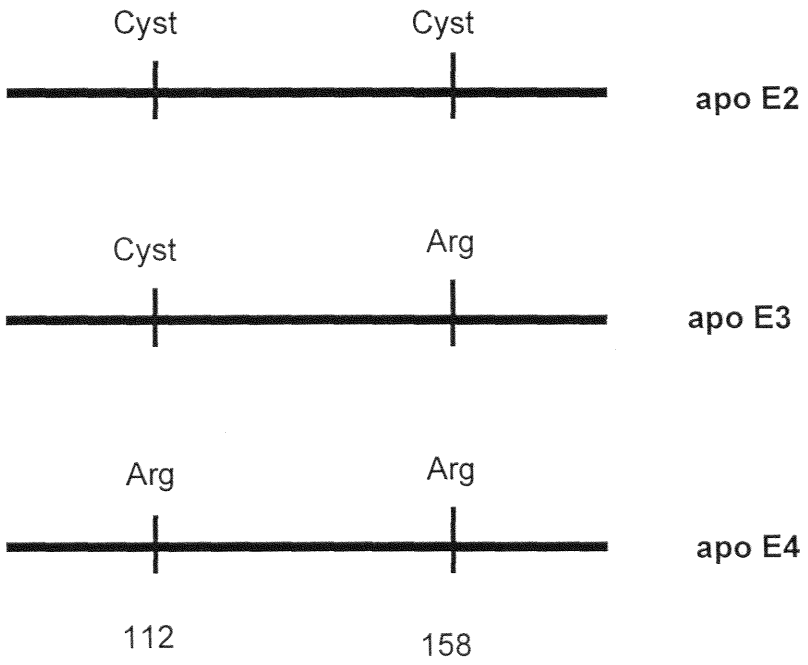


Figure 4 : Caractéristiques de chaque allèle codant pour les 3 isoformes d'apo E.

Ces 3 isoformes d'apo E se caractérisent par une différence de mobilité électrophorétique avec des points isoélectriques différents : pI = 5,7 pour l'apo E2, pI = 5,9 pour l'apo E3 et pI = 6,1 pour l'apo E4. Plus particulièrement dans le LCR, ces isoformes d'apo E peuvent être sialylées (désignées par un s en indice).

Par suite de l'existence de ces 3 isoformes, 6 phénotypes sont possibles : 3 homozygotes E2/E2 ; E3/E3 et E4/E4 et 3 hétérozygotes E2/E3 ; E2/E4 et E3/E4. Les 3 allèles présentent une fréquence différente selon les populations étudiées. En Europe, l'allèle ε3 est la plus fréquente avec 78,3 % de la population le portant contre 14,3 % pour l'allèle ε4 et 7,3 % pour l'allèle ε2 (Weisgraber, 1994). Pourtant, l'allèle ε4 semble être l'allèle ancestral. En effet, il est le plus fréquent dans les populations aborigènes et dans les espèces animales (Hanlon et Rubinsztein, 1995) alors que l'allèle ε3 n'est présent que chez l'Homme, les lapins et les bovins. Quant à l'allèle ε2, il n'est présent que chez l'Homme (Larsen et al., 1993).

Des différences de distribution des isoformes sont observées dans les lipoprotéines. En effet, l'apo E4 est associée préférentiellement aux VLDL et IDL alors que les apo E2 et E3 sont associées préférentiellement aux HDL (Steinmetz et al, 1989 ; Weisgraber et al., 1990) (Figure 5). Lors de l'apport d'apo AI, l'apo E des HDL est échangée avec les lipoprotéines riches en triglycérides.

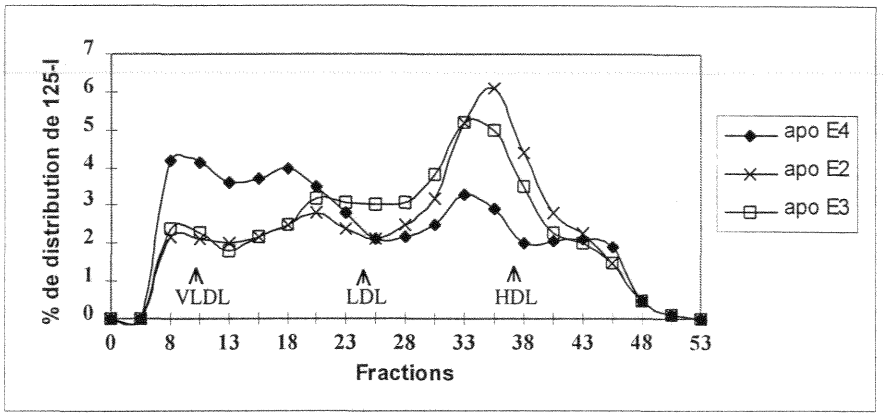


Figure 5 : Distribution des apo E2, apo E3 et apo E4 parmi les lipoprotéines plasmatiques.

L'interaction de l'apo E avec les différents récepteurs est également isoforme-dépendante ; l'apo E2 se lie très faiblement au récepteur des LDL et au récepteur LRP alors que l'apo E3 et l'apo E4 présentent une même affinité mais plus élevée pour ces récepteurs (Wilson et al., 1994, Dong et al., 1996).

Un autre rôle isoforme-dépendant a également été montré sur des modèles cellulaires cérébraux, où l'apo E3 favorise la croissance axonale et limite les développements des dendrites alors que l'apo E4 inhibe à la fois la croissance axonale et celles des dendrites (Nathan et al., 1994 ; Bellosta et al., 1995).

4. Apolipoprotéine E et maladie d'Alzheimer

4.1. Aspect clinique de la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative avec des formes familiales et des formes sporadiques. Cependant, il est souvent difficile de dater le début de cette maladie évoluant sur plusieurs années voire des décennies, car les symptômes sont

insidieux et commencent par se traduire par des troubles de la mémoire et une altération du jugement. De plus, le diagnostic de la MA n'est certain qu'après un examen *post-mortem* neuropathologique du cerveau.

Les lésions physiopathologiques sont de 3 types :

- (1) les plaques séniles extracellulaires constituées de substance amyloïde, avec des fibrilles de protéine β-amyloïde (Aβ),
- (2) une dégénérescence neurofibrillaire (DNF) dans le cytoplasme des neurones, caractérisée par un enchevêtrement de filaments hélicoïdaux dont l'élément majeur est la protéine Tau,
- (3) une angiopathie congophile qui correspond à des dépôts vasculaires amyloïdes.

La MA est encore caractérisée par une atrophie corticale accompagnée d'une diminution de neurones cholinergiques fonctionnels et de lésions identiques à celles du vieillissement cérébral normal, mais de densité cent à mille fois supérieure (Davies, 1983, Braak et Braak, 1994). Suite à la perte des neurones cholinergiques, on observe un déficit cholinergique mais également une forte diminution de la synthèse du neuromédiateur, l'acétylcholine, due au déficit de la choline acétyl transférase.

L'âge et la génétique, notamment le polymorphisme de l'apo E avec l'allèle ε4, sont des facteurs de risque de la MA (Strittmatter et al., 1993 ; Roses et al., 1993). D'autres gènes comme les gènes des préseniliines-1 et -2 interviennent dans l'étiologie de la MA. Le gène de la préseniline-1, récemment identifié (Sherrington et al., 1995) est muté, conférant ainsi une fonction anormale à la protéine, cette anomalie étant retouvée dans 70 % des cas de MA (Campion et al., 1995). Le gène de la préseniline-2 muté est essentiellement détecté dans un groupe de population réduit, les "Allemands de la Volga" et une famille italienne

(Levy-Lahad et al., 1995). Il semble que les mutations des gènes des présenilines aboutissent à une secrétion accrue de la forme longue du peptide Aβ (Scheuner et al., 1996) mais le rôle de ces protéines reste encore inconnu.

Récemment, en dehors des protéines majeures étudiées jusqu'à présent, une nouvelle protéine, nommée AMY, a été retrouvée dans des plaques distinctes des plaques amyloïdes dans les cerveaux de malades atteints de MA et ceux des patients atteints de trisomie 21. L'importance de ces plaques serait équivalente à celles des plaques amyloïdes (Schmidt et al., 1997 ; Dickson, 1997).

4.2. Implication du polymorphisme de l'apolipoprotéine E dans la maladie d'Alzheimer

C'est en 1993 qu'ont été rapportées les premières études épidémiologiques montrant l'implication du polymorphisme de l'apo E dans cette maladie multifactorielle qu'est la MA (Strittmatter et al., 1993 ; Corder et al., 1993 et 1994). La fréquence de l'allèle ε4 augmente chez les patients atteints de MA (Strittmatter et al., 1993). En effet, 46 à 52 % de malades d'Alzheimer sont porteurs de l'allèle ε4, comparé à 13 % chez les sujets âgés supposément sains, contre 44 à 46 % porteur de l'allèle ε3 et 4 à 8 % porteur l'allèle ε2.

L'apo E4 représente un facteur de risque alors que l'apo E2 jouerait un rôle protecteur dans le cas de la MA.

Le polymorphisme de l'apo E, et plus particulièrement l'allèle ε4, a été associé à la MA à différents niveaux :

- le risque de développer une MA est 3 à 15 fois supérieur pour les porteurs d'un ou 2 allèles ε4 alors que les porteurs de l'allèle ε2 présenteraient un risque plus faible et un âge

d'apparition de la maladie plus tardif (Corder et al., 1993 et 1994),

- les malades atteints de MA porteurs de l'allèle ε4 présentent plus de plaques amyloïdes (Schmechel et al., 1993 ; Berr et al., 1994 ; Hyman at al., 1995) et l'association de Aβ avec l'apo E4 serait plus importante et plus rapide qu'avec l'apo E3 (Strittmatter et al., 1993). De plus, la formation de complexe apo E-Aβ permettrait l'élimination du peptide Aβ extracellulaire par l'intermédiaire des récepteurs reconnaissant l'apo E. Les complexes apo E4-Aβ sont moins nombreux que ceux formés avec l'apo E3 dans les cellules neuronales en culture (Jordan et al., 1998). Ainsi, l'apo E4 ne jouerait pas un rôle efficace dans l'élimination d'Aβ contrairement à l'apo E2 et E3.

- de même, l'apo E4 se lie moins à la protéine Tau non phosphorylée que l'apo E3 (Strittmatter et al., 1994).

Depuis 1993, avec l'âge, l'apo E4 est donc apparue comme un facteur de risque majeur de développer la MA. Les différents niveaux d'association génétique et fonctionnels de l'apo E à la MA ne sont pas encore clairement établis et le grand nombre de données expérimentales, parfois contradictoires, reflète l'hétérogénéité de la maladie. Les différents niveaux d'implication de l'apo E dans les processus aboutissant à la MA sont décrits dans les sections suivantes.

4.3. Apolipoprotéine E et régénérescence neuronale

Le rôle de l'apo E dans la plasticité synaptique peut dépendre de son polymorphisme, avec des affinités différentes pour les lipoprotéines ou les récepteurs selon l'isoforme. Selon l'hypothèse d'une sensibilité plus grande des neurones cholinergiques à la dégénérescence, Wurtman (1992) suggère un apport plus important en lipides *via* les lipoprotéines

contenant l'apo E, en cas d'atteinte neuronale. Cet apport serait insuffisant en présence d'apo E4, ce qui expliquerait une apparition plus précoce de la maladie chez les porteurs de l'allèle ε4. En effet, Bertrand et al. (1995) ont montré une concentration en apo E inversement corrélée au nombre d'allèles ε4 au niveau du cortex et de l'hippocampe de patients atteints de MA. De plus, les sujets porteurs de l'allèle ε4 sont moins sensibles aux traitements de l'atteinte cholinergique, traitements de substitution de la choline, comme la tacrine (Poirier et al., 1995).

4.4. Apolipoprotéine E et amyloïdose

L'amyloïde β est un peptide de 39 à 42 acides aminés ayant la capacité de s'auto-associer pour former des fibrilles insolubles constituant le noyau des plaques séniles, retrouvées notamment dans les cerveaux de patients atteints de MA. C'est en 1991 que Namba et al. ont montré la présence d'apo E colocalisée avec Aβ dans les plaques séniles des patients atteints de MA. *In vitro*, l'apo E est capable de s'associer avec Aβ (Strittmatter et al., 1993 ; Wisniewski et al., 1993) et de catalyser la formation de fibrilles (Ma et al., 1994) (Figure 6). Cette affinité pour Aβ serait d'autant plus forte que l'apo E serait oxydée (Strittmatter et al., 1993). Plusieurs travaux ont montré une plus forte affinité et une plus grande rapidité de liaison de l'apo E4 avec Aβ par rapport à l'apo E3 (Sanan et al., 1994 ; Wisniewski et al., 1994 ; Castano et al., 1995a).

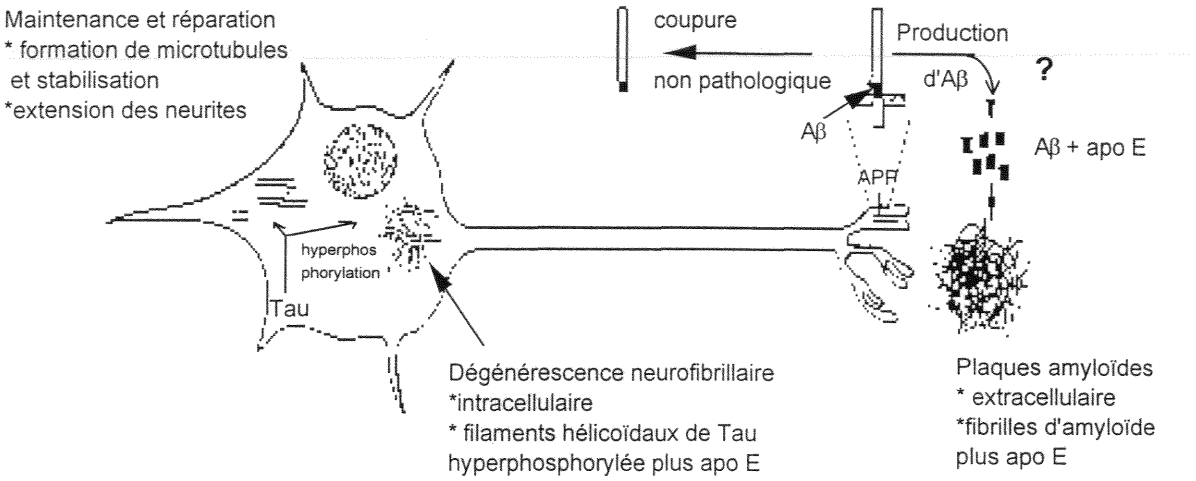


Figure 6 : Implication de l'apolipoprotéine E dans la maladie d'Alzheimer sur un modèle de neurones, d'après Strittmatter et al. (1994).

L'hypothèse selon laquelle l'apo E4 serait un facteur de risque de la MA en favorisant la fibrillogenèse d'Aβ est corroborée par le plus grand nombre de plaques séniles dans les cerveaux de patients atteints de MA, porteurs de l'allèle ε4 par rapport aux porteurs de l'allèle ε3 (Schmechel et al., 1993 ; Hyman et al., 1995).

Les fibrilles d'Aβ, elles-mêmes neurotoxiques par formation de radicaux libres (Mattson et al., 1995 ; Manelli et Puttfarchen, 1995), induisent leur propre fibrillogenèse (Rogers et al., 1995 ; Gitter et al., 1995), stimulent la production d'apo E (Mrak et al., 1995) et déclenchent un processus inflammatoire pouvant également être producteur de RL.

L'apo E serait donc une protéine chaperonne pathologique, conduisant notamment à la formation de fibrilles d'Aβ (Wisniewski et Frangione, 1992).

Cette hypothèse considérant l'apo E comme une protéine chaperonne pathologique par son association avec Aβ est appuyée par les résultats obtenus par Bales et al. (1997) sur des souris transgéniques. En effet, ces souris transgéniques pour le précurseur de la protéine

amyloïde (APP) et knock-out pour le gène de l'apo E présentent une réduction du dépôt amyloïde, suggérant que la présence d'apo E facilite la formation des dépôts.

4.5. Apolipoprotéine E et dégénérescence neurofibrillaire

Selon une hypothèse supplémentaire, l'apo E et son interaction différentielle avec la protéine Tau expliquerait son implication dans la MA. Outre les plaques séniles dans le cerveau, la MA est également caractérisée par les DNF, agrégats de filaments en double hélice contenant essentiellement la protéine Tau. Dans les conditions physiologiques, la protéine Tau non phosphorylée s'associe à la tubuline pour assurer le maintien du cytosquelette neuronal (Crowther, 1993). Dans les DNF, la protéine Tau est hyperphosphorylée et a perdu sa capacité de maintien du cytosquelette neuronal (Figure 7). Dès 1991, Namba et al. avaient montré la présence d'apo E dans les DNF, et en 1994, plusieurs travaux (Strittmatter et al., 1994 ; Huang et al., 1994) ont mis en évidence une interaction isoforme spécifique entre l'apo E et la protéine Tau. En effet, l'apo E2 et l'apo E3 s'associent aux microtubules, assurent leur stabilité et empêchent la phosphorylation de Tau alors que l'apo E4 ne protège pas la protéine Tau de la phosphorylation, aboutissant ainsi à la formation de DNF (Strittmatter et al., 1994).

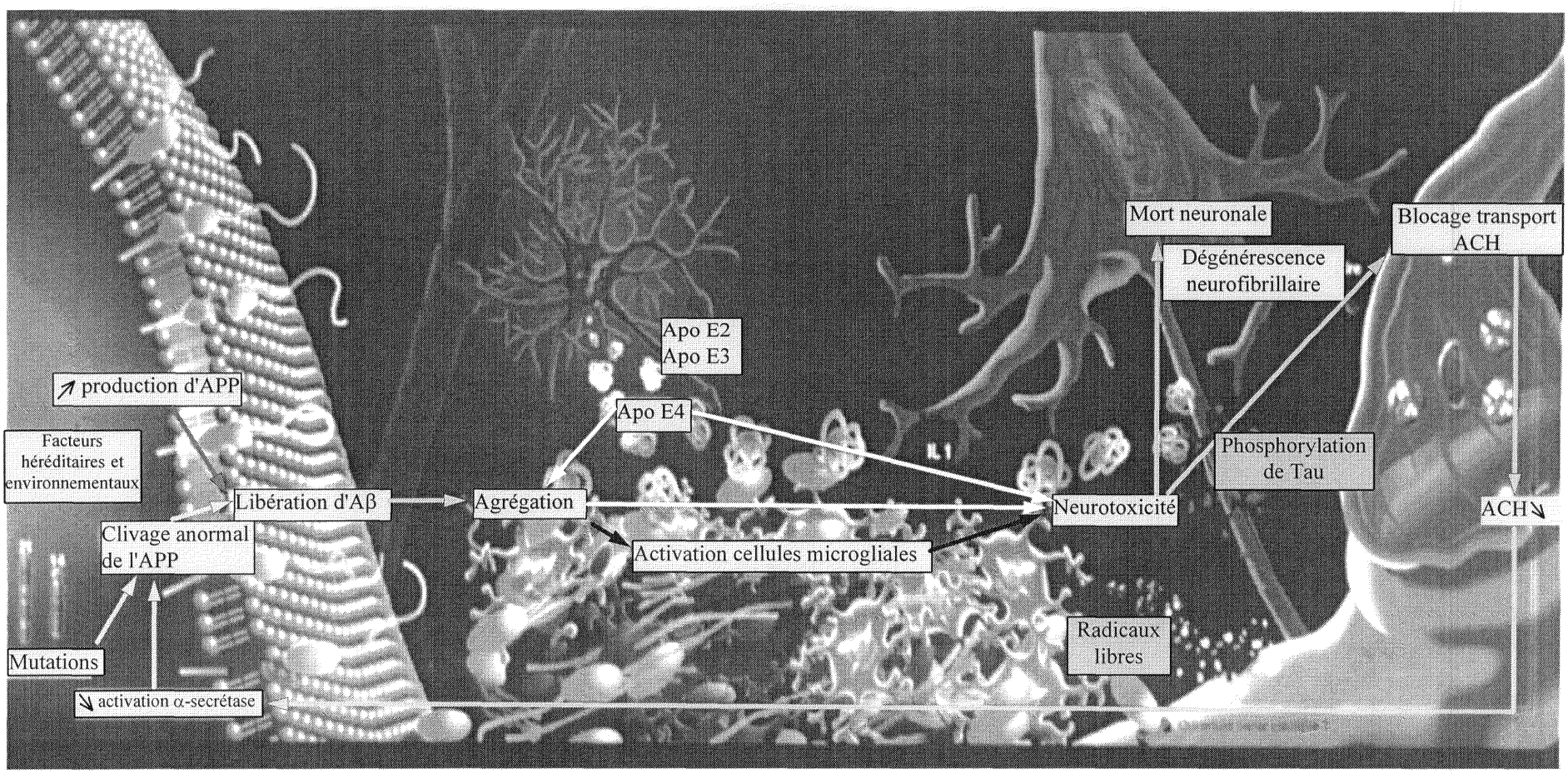


Figure 7 : Hypothèses de l'implication de l'apo E dans les processus conduisant à la Maladie d'Alzheimer.

II. La maladie d'Alzheimer et les théories du vieillissement

Si les caractéristiques de la MA ainsi que l'implication de plusieurs gènes sont connues, les mécanismes y aboutissant sont très discutés et laissent encore un large champ d'investigation.

Comme d'autres maladies neurodégénératives, la MA est une maladie caractérisée par un vieillissement pathologique résultant d'une accélération des processus de vieillissement accompagnée de complications, comme l'hypoxie ou différents traumatismes.

1. Les théories du vieillissement

Différentes hypothèses tentent d'expliquer le vieillissement cellulaire selon deux orientations principales qui sont (1) une accumulation d'erreurs ou de dommages au niveau de l'ADN, notamment l'ADN mitochondrial, de l'ARN, des protéines et des lipides, liées notamment à des défauts des mécanismes de réparation (Hayflick L., 1973 ; Mc Cormick et Campisi, 1991) et/ou (2) un évènement génétiquement programmé, l'apoptose (Danilevicius, 1973).

Pour notre part, nous nous sommes interessés aux dommages oxydatifs au niveau des protéines. En effet, dans les maladies liées à un vieillissement accéléré comme la maladie de Werner, la progeria ou la maladie d'Alzheimer, une augmentation des protéines oxydées est observée dans le cerveau (Oliver et al., 1987). Selon l'hypothèse radicalaire du vieillissement (Harman, 1992), il existerait un déséquilibre entre la production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène (ou radicaux libres, RL) et les mécanismes de défense, accompagné à terme de processus inflammatoires (Figure 8).

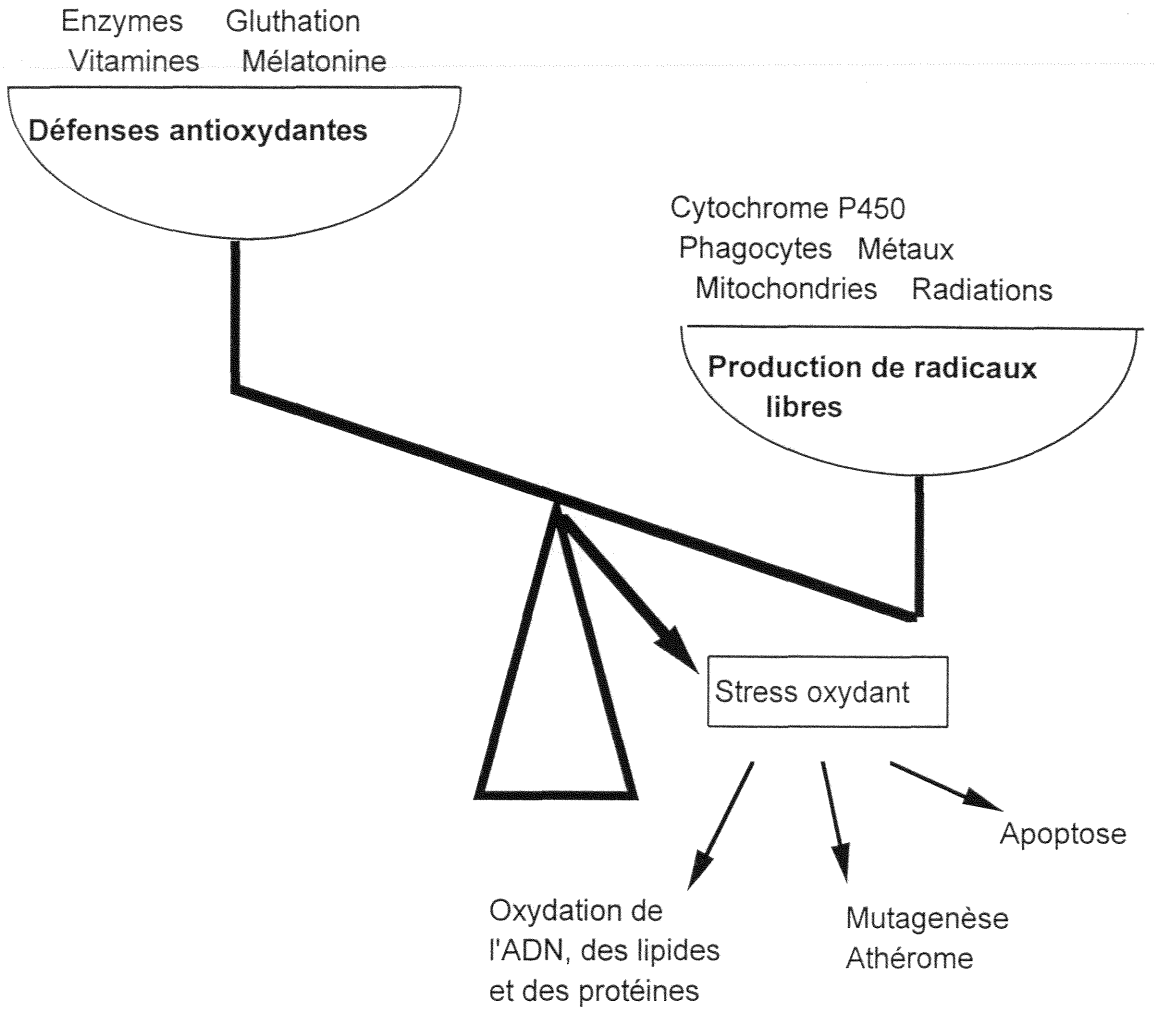


Figure 8 : Balance anti/prooxydante, d'après Favier et al. (1997).

Les sources de RL sont très nombreuses au niveau des cellules, notamment les cytochromes P450, la xanthine oxydase. Lors de l'inflammation, la production d'ions superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par les neutrophiles est accrue.

Les niveaux des enzymes de protection et des antioxydants endogènes varient selon les tissus, mais diminuent avec l'âge chez le rat (Sohal et al., 1990 ; Rao et al., 1990).

Ainsi, lorsque la concentration en espèces réactives de l'oxygène dépasse les capacités

antioxydantes de la cellule, les radicaux libres peuvent devenir toxiques et conduire au vieillissement cellulaire.

2. Le vieillissement cérébral

Ces phénomènes de vieillissement cellulaire sont surtout décrits au niveau de cellules fibroblastiques, mais peu d'études portent sur le vieillissement du tissu cérébral. Les données peu nombreuses concernant le métabolisme oxydant au niveau de cerveaux de sujets sains montrent une légère réduction des taux d'utilisation de l'oxygène et du glucose, ainsi que de la synthèse d'acétylcholine après 30 ans, cette diminution s'accentuant fortement après 80 ans (Hayer, 1995 ; Gibson et Peterson, 1981).

Dans le cortex cérébral, il a été montré qu'au cours du vieillissement normal, la quantité de protéines oxydées est augmentée (Carney et al., 1991) et que des enzymes sont inactivées par les RL produits par les systèmes d'oxydation catalysés par les métaux (MCO) (Fucci et al., 1983). Cette accumulation de protéines oxydées et d'enzymes inactivées par oxydation semble jouer un rôle crucial dans l'altération des fonctions et la perte cellulaire, caractéristiques du vieillissement cérébral. De plus, la formation d'ion superoxyde augmente plus précocément dans le cerveau que dans le coeur ou le foie (Sawada et al., 1992).

Le cerveau est d'autant plus vulnérable aux dommages oxydants liés au viellissement qu'il contient des acides gras oxydables en concentration élevée, que certaines régions sont riches en fer, métal impliqué dans les MCO produisant des RL, et que la consommation en oxygène y est élevée. De plus, il est faiblement doté en systèmes de détoxification des RL, enzymatiques ou non, (Reiter, 1995 ; Halliwell, 1992 ; Floyd, 1990), ceux-ci diminuant

avec l'âge.

3. Implication du stress oxydant dans la maladie d'Alzheimer

Comme citée précédemment, une augmentation des protéines oxydées est constatée au cours du vieillissement mais de façon plus marquée dans la maladie d'Alzheimer (Figure 9) (Volicer et Crino, 1990 ; Smith et al., 1991 ; Carney et Carney, 1994) où le stress oxydant, selon Jenner (1994) ne serait pas responsable de la dégénéréscence neuronale mais accompagnerait et amplifierait plutôt les dommages causés au niveau cellulaire.

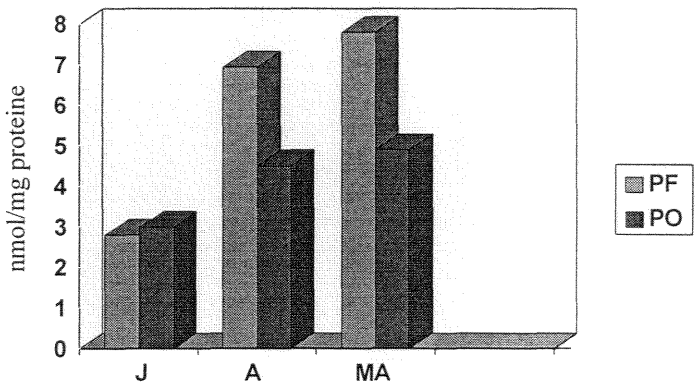


Figure 9 : Augmentation des protéines oxydées détectées par leur groupements carbonyle dans le cerveau, d'après Smith et al. (1991)
J : Jeune, A : âgé, MA : Maladie d'Alzheimer, PF : pole frontal, PO : pole occipital.

L'implication du stress oxydant dans la MA est appuyée par :

a) une altération du fonctionnement des mitochondries, qui se situerait au niveau du complexe IV de la chaîne respiratoire. En effet, l'activité catalytique du complexe IV est diminuée dans le cortex cérébral de patients atteints de MA (Parker et al., 1990 ; Simonian et Hyman, 1993), conduisant à une libération plus importante d'ion superoxyde.

b) un déséquilibre de l'activité superoxyde dismutase (SOD) (Zemlan et al., 1989) et de la monoamine oxydase B dans le cerveau (Nakamura et al., 1990), conduisant à une augmentation de la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

c) une altération de l'homéostasie du fer, suite à la prolifération de la microglie (Connor et al., 1992). Cette augmentation de la concentration ferrique, combinée à la présence de $O_2^{\cdot-}$ et de H_2O_2, peut donner naissance au radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$), radical le plus puissant (réaction de Fenton).

d) une agrégation du peptide Aβ, induite par les RL produits par les MCO, pouvant être inhibée par la vitamine C et la vitamine E (Dyrks et al., 1992). Une augmentation de la production d'Aβ peut entraîner son agrégation, conduisant à la formation de fibrilles (Citron et al., 1992 ; Selkoe, 1996). Ces fibrilles sont toxiques pour les neurones, astrocytes et microglie en culture (Pike et al., 1993 ; Lorenzo et Yankner, 1994). De plus, Hensley et al. (1994) ont montré qu'en se fragmentant la protéine Aβ peut générer elle-même des RL et favoriser la production de peroxyde et surtout d'H_2O_2 dans des cultures de cellules du SNC. La neurotoxicité d'Aβ pourrait être induite par cette production de RL (Behl et al., 1994)

f) une peroxydation des lipides menant à une altération des membranes (Pettegrew et al., 1994)

g) une oxydation des protéines (Smith et al., 1991 ; Stadtman, 1992). (voir chapitre suivant)

Une étude multicentrique de supplémentation en vitamine E, piégeur de RL et/ou en sélégiline, inhibiteur de monoamine oxydase a montré un ralentissement de la progression de la MA (Sano et al., 1997). Ces résultats, ajoutés à des observations récentes concernant

un autre antioxydant, l'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba* soutiennent l'implication du stress oxydant dans la MA (Kanowski et al., 1996).

III. Production de radicaux libres dans le cerveau

Toutes les molécules des êtres vivants semblent souffrir des effets délétères du vieillissement, mais tous les mécanismes de cette évolution ne sont pas encore connus. Dans le cas des protéines, deux processus dépendent du vieillissement : les clivages protéolytiques et les modifications structurales induites par les RL issus de réactions enzymatiques ou non.

Nous rappellerons d'abord brièvement quels sont les différents types de RL, ainsi que les réactions chimiques et enzymatiques les produisant. Après ces rappels théoriques, nous décrirons les conséquences de l'oxydation sur la stucture des protéines.

1. Les espèces réactives dérivées de l'oxygène

Les RL sont des espèces réactives dérivées de l'oxygène, instables, d'une durée de vie courte. Bien que des radicaux issus de la peroxydation lipidique, comme le radical peroxyle ($RO_2^{\bullet}$) et le radical alkoxyle ($RO^{\bullet}$) fassent également partie de ses espèces réactives, nous décrirons plus particulièrement l'ion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle, possédant des pouvoirs oxydants (potentiels redox) différents (Tableau II).

Tableau II : Potentiel d'oxydo-réduction des espèces réactives dérivées de l'oxygène

Réaction de réduction de l'oxygène	Potentiel d'oxydo-réduction (E à pH 7,0) (en volt)
$O_2 + 1\ e^- \xrightarrow{(+ H^+)} O_2^{\cdot -}$	-0,33
$O_2 + 2\ e^- \xrightarrow{(+ 2H^+)} H_2O_2$	0,93
$O_2 + 3\ e^- \xrightarrow{(+ 3H^+)} OH^{\cdot} + H_2O$	0,30
$O_2 + 4\ e^- \xrightarrow{(+ 4H^+)} 2\ H_2O$	2,34

1.1. L'ion superoxyde

L'ion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) est formé à partir de l'oxygène moléculaire par acquisition d'un électron supplémentaire, selon la réaction suivante :

$$O_2 + e^- \text{---> } \mathbf{O_2^{\cdot -}}$$

L'ion superoxyde est un intermédiaire de nombreuses réactions biochimiques, notamment lors de la conversion de la xanthine en acide urique par la xanthine oxydase, ou sa production par les leucocytes circulants (Robinson et Badwey, 1995),

Dans les conditions physiologiques, l'ion superoxyde est converti en peroxyde d'hydrogène par la SOD.

1.2. Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou eau oxygénée n'est pas un RL mais il est considéré comme tel. Il est produit par dismutation spontanée ou catalysée par la SOD à partir de l'ion superoxyde, selon la réaction suivante :

$$2\ O_2^{\cdot -} + 2\ H^+ \xrightarrow{SOD} O_2 + \mathbf{H_2O_2}$$

Le peroxyde d'hydrogène peut traverser les membranes et agir ainsi à distance de son lieu de production, contrairement aux autres RL qui agissent sur leur lieu de production.

Il est catabolisé par la catalase ou la glutathion peroxydase selon les réactions suivantes :

$$2\ H_2O_2 \xrightarrow{catalase} 2\ H_2O + O_2$$

$$H_2O_2 + 2\ GSH \xrightarrow{glutathion\ peroxydase} GSSG + 2\ H_2O$$

Le peroxyde d'hydrogène peut également conduire à la formation du radical hydroxyle.

1.3. Le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$) est le radical le plus puissant, avec le potentiel redox le plus bas (Tableau II), et peut réagir avec la majorité des molécules.

Le radical hydroxyle peut être formé à partir d'ion superoxyde et de H_2O_2 par une réaction d'Haber-Weiss, ou à partir de peroxyde d'hydrogène en présence de fer ferreux par une réaction de Fenton :

$$O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \dashrightarrow O_2 + OH^- + \mathbf{OH^{\cdot}}$$ (Réaction d'Haber-Weiss)

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \dashrightarrow Fe^{3+} + OH^- + \mathbf{OH^{\cdot}}$$ (Réaction de Fenton)

Il n'existe pas d'enzyme spécifique pour la prise en charge du radical hydroxyle.

2. Systèmes de production de radicaux libres

Différents systèmes non enzymatiques et enzymatiques peuvent produire des RL *in vivo*. La prépondérance de chaque système dépend, notamment, de la quantité de métaux pouvant participer aux réactions d'oxydation catalysées par les métaux (MCO), de la quantité de substrat pour les réactions enzymatiques ou du niveau d'expression de ces enzymes.

2.1. Par réactions chimiques non enzymatiques

Les MCO produisent des radicaux hydroxyle selon la réaction de Fenton. Plusieurs métaux de transition peuvent être impliqués dans cette réaction, notamment le fer, le cuivre et le vanadium.

Comme nous le verrons plus tard, les systèmes d'oxydation catalysés par les métaux peuvent également impliquer plusieurs enzymes (NADPH-cytochrome P450 réductase, cytochrome P450, xanthine oxydase, monoamine oxydase ...).

Les MCO oxydent plus particulièrement certains acides aminés qui sont l'histidine, l'arginine, la lysine, la proline, la méthionine et la cystéine (Stadtman, 1993). Les produits majeurs d'oxydation de ces acides aminés sont répertoriés dans le tableau suivant (Tableau III).

Tableau III : Produit d'oxydation de quelques acides aminés.

Résidu oxydé	Produit d'oxydation
Histidine	Aspartate, arginine
	2-oxoimidazoline
Arginine	Semialdéhyde glutamique
Lysine	2-amino-adipisemialdéhyde
Proline	Glutamate, 4-hydroxyproline
	2-pyrrolidone
Méthionine	Méthionine sulfoxyde
Cystéine	Pont disulfure
Tryptophane	N-formyl-cynurénine
Tyrosine	3-4-dihydroxyphénylalanine (DOPA)
	Bityrosine
Thréonine	Acide 2-amino-3-ketobutyrique
Leucine	Hydroxyleucine

2.1.1. En présence de fer

Les réactions faisant intervenir le fer (Fe) sont l'un des types de réactions impliquant les métaux de transition les plus étudiés avec celles faisant intervenir le cuivre.

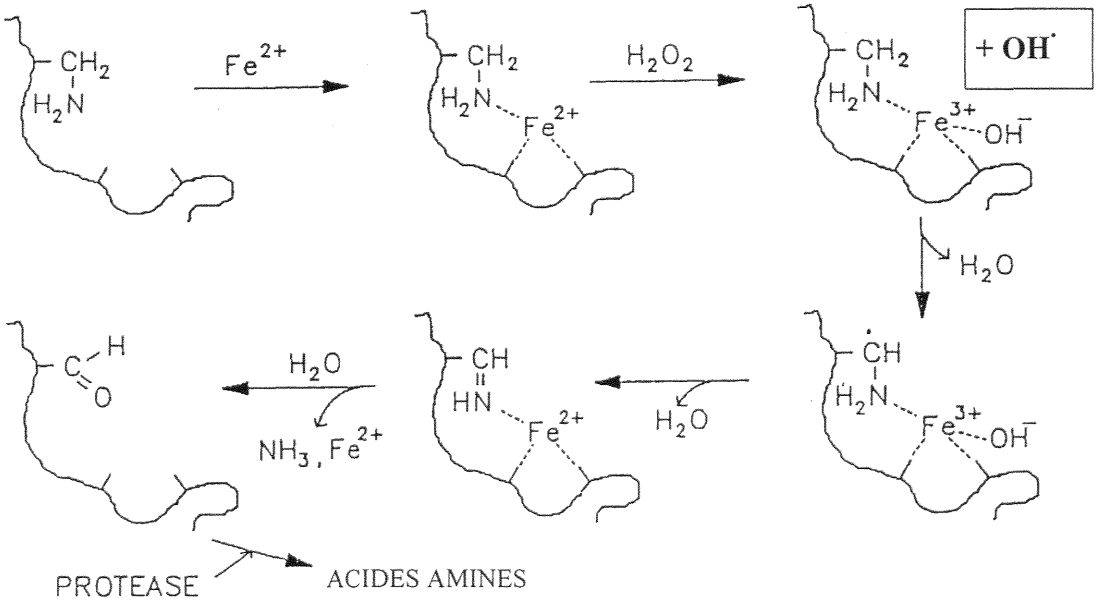


Figure 10 : Mécanisme d'oxydation d'un résidu lysine par oxydation catalysée par le fer, d'après Stadtman (1993).

La figure 10 schématise l'oxydation d'une lysine par les MCO faisant intervenir le fer ferreux selon la réaction suivante :

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \text{ ---> } Fe^{3+} + OH^- + \mathbf{OH^{\cdot}}$$

Cette réaction de Fenton peut alors, avec la réaction du fer ferrique et de l'ion superoxyde donner lieu à la réaction d'Haber-Weiss :

$$Fe^{3+} + O_2^{\cdot -} \text{ ---> } Fe^{2+} + O_2$$

et $$Fe^{2+} + H_2O_2 \text{ ---> } Fe^{3+} + OH^- + \mathbf{OH^{\cdot}}$$

soit globalement $$O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \text{ ---> } O_2 + OH^- + \mathbf{OH^{\cdot}}$$

Environ 4 g de fer sont présents dans l'organisme, compléxés à l'hémoglobine, encapsulés par la ferritine ou encore associés à une protéine de transport, la transferrine ou la lactoferrine. Pour participer à la réaction, le fer doit être sous forme libre ou sous forme catalytiquement active. Il peut être libéré de la ferritine sous l'action d'agents réducteurs comme la cystéine, les flavines réduites et l'acide ascorbique (Crichton and Charloteaux-Waters, 1987). Le fer est dissocié de la transferrine ou de la lactoferrine par le faible pH des lysosomes où les protéines ont été endocytosées (Crichton and Charloteaux-Waters, 1987). Certains xénobiotiques, comme le paraquat ou le diquat, peuvent également faciliter la libération du fer de la ferritine et faciliter ainsi la production de RL (Ryan et Aust, 1992).

Le fer est également présent dans le cerveau où sa concentration ainsi que celle en ferritine augmentent avec l'âge. Dans le cerveau de rat, il est localisé de façon préférentielle dans le cortex cérébral, le septum et le cervelet (Focht et al., 1997).

Chez l'Homme, la concentration en ferritine ainsi que celle en fer sont augmentées dans le cerveau de patients atteints de MA (Fleming et Joshi, 1987). De plus, la ferritine est présente dans la microglie associée aux plaques séniles (Grundke-Iqbal et al., 1990) et des astrocytes et des neurones riches en ferritine ont été décrits autour des plaques amyloïdes de malades d'Alzheimer (Robinson et al., 1995).

2.1.2. En présence de cuivre

Le cuivre (Cu) est un co-facteur de nombreuses enzymes dont des oxydases et des oxygénases (Gutteridge, 1984). Comme le fer, il peut participer à la formation de RL selon la réaction de Fenton :

$$Cu^{+} + H_2O_2 \text{ ---> } Cu^{2+} + OH^{-} + \mathbf{OH^{\cdot}}$$

Comme pour le fer, la résultante de cette réaction avec le cuivre cuivrique et l'ion superoxyde donne lieu à la réaction d'Haber-Weiss :

$$Cu^{2+} + O_2^{\cdot -} \text{ ---> } Cu^{+} + O_2$$

et $Cu^{+} + H_2O_2 \text{ ---> } Cu^{2+} + OH^{-} + \mathbf{OH^{\cdot}}$

soit globalement $2O_2^{\cdot -} + 2H^{+} \text{ ---> } \mathbf{H_2O_2} + O_2$

Le cuivre est présent dans l'ensemble du corps humain en quantité environ 50 fois moins importante que le fer, soit de l'ordre de 80 mg.

Le cuivre est véhiculé pour la majeure partie par la céruloplasmine et par l'albumine. Il est transporté associé à des acides aminés, plus particulièrement à l'histidine. La céruloplasmine est synthétisée dans différents tissus dont le cerveau. Sa concentration est plus élevée dans les maladies neurodégénératives, et plus particulièrement au niveau des neurones, astrocytes et plaques neuritiques (Loeffer et al., 1996). Le cuivre est libéré par

dégradation de la protéine à laquelle il est associé, ou en présence de réducteur dans des conditions de pH faible (Gutteridge et Stocks, 1981).

2.1.3. En présence d'ion vanadyle

Le vanadium (V) ou l'ion vanadyle (VO^{2+}) génèrent des RL par une réaction de Fenton plutôt que par une réaction d'Haber-Weiss (Keller et al., 1989 ; Ozawa et Hanaki, 1989 ; Shi et Dalal, 1993).

$$VO^{+} + O_2^{\cdot -} \text{---> } VO^{2+} + O_2$$

$$VO^{2+} + H_2O_2 \text{---> } VO^{+} + OH^{-} + \mathbf{OH^{\cdot}}$$

Le vanadium intracellulaire existe exclusivement sous forme d'ion vanadyle ou d'ion vanadate (VO_3^-) libre ou associé à des macromolécules (Ramasarma et Crane, 1981). L'ion vanadyle peut, comme le fer, être lié à la transferrine mais ne peut pas lier la transferrine déjà saturée en fer (Cannon et Chasten, 1975). Le vanadium est également présent dans le cerveau (Svoboda et al., 1984).

2.2. Par réactions enzymatiques

De nombreuses enzymes, qu'elles soient membranaires, peroxisomiales, mitochondriales, microsomiales ou cytoplasmiques produisent des RL dans des conditions normales, par déficit de co-facteur ou par défaut du cycle redox.

2.2.1. La xanthine oxydase

La xanthine oxydase (EC 1.1.1.204) catalyse l'oxydation des bases puriques provenant de la coupure de l'ADN, avec formation d'acide urique. Ce produit final du métabolisme des bases puriques, décrit plus loin, peut jouer un rôle de piégeur de RL et représente l'antioxydant plasmatique majeur chez l'Homme. Au cours de son cycle catalytique, la xanthine oxydase peut produire des espèces réactives dérivées de l'oxygène par réduction monoélectronique de l'oxygène.

C'est essentiellement au moment de la réoxygénation après un épisode ischémique que la xanthine oxydase, saturée d'hypoxanthine produite au cours de l'ischémie, génère une quantité importante de peroxyde d'hydrogène et d'ion superoxyde (Bukley, 1987) (Figure 11).

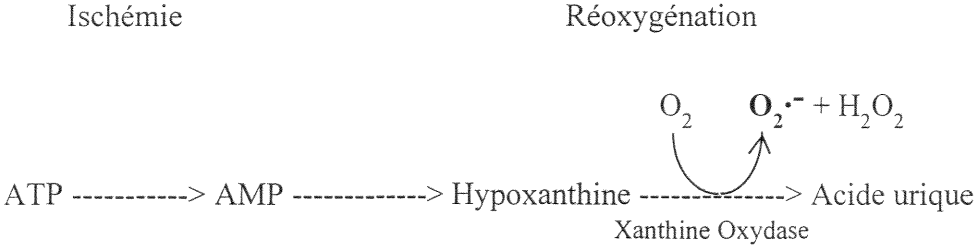


Figure 11 : Production d'ion superoxyde au cours du cycle ischémie/réoxygénation, d'après Martinez-Cayuela (1995).

2.2.2. Les monoamines oxydases

Les monoamines oxydases (MAO ; EC 14.3.4.) sont des enzymes mitochondriales qui existent sous 2 formes, la MAO A et la MAO B et se différencient par leur sensibilité à l'inhibition par la clorgyline (forme A) ou le L-deprenyl (forme B) et par leur spécificité de substrat (Johnston, 1968). La MAO A est localisée dans les neurones

catécholaminergiques et la MAO B est localisée dans les neurones sérotoninergiques et dans les astrocytes (Westlund et al., 1985 ; Jossan et al., 1989).

Les MAO catalysent la déamination oxydative des amines primaires, secondaires et tertaires telles que des neurotransmetteurs ou des hormones. Au cours de ces réactions, il se forme des aldéhydes, de l'ammoniac (NH_3) et du peroxyde d'hydrogène.

Fowler et al. (1980) ont montré que l'activité de la MAO B augmente avec l'âge et que cette activité accrue augmente la production d'H_2O_2 dans le cerveau. De plus, cette augmentation de l'activité de la MAO B dans le cerveau est accélérée dans les maladies neurodégénératives comme la MA (Adolfsson et al., 1980 ; Jossan et al., 1991), la sclérose amyotrophique latérale (Ekblom et al., 1992).

2.2.3. La NADPH-cytochrome P450 réductase

La NADPH-cytochrome P450 réductase (EC 1.6.2.4) est une enzyme membranaire microsomale présente essentiellement dans le foie (Guengerich et al., 1981 ; McManus et al., 1988) mais elle est également active dans le cerveau (Ravindranah et al., 1990 ; Ghersi-Egea et al., 1991). La NADPH-cytochrome P450 réductase assure le transport d'électrons vers le cycle des cytochromes P450 et catalyse la réduction de composés endogènes comme les stéroïdes, les acides gras et certains xénobiotiques comme les quinones ou les nitrohétérocycles (Figure 12). La réduction de ces xénobiotiques aboutit à la formation d'ion superoxyde selon le cycle d'oxydo-réduction suivant :

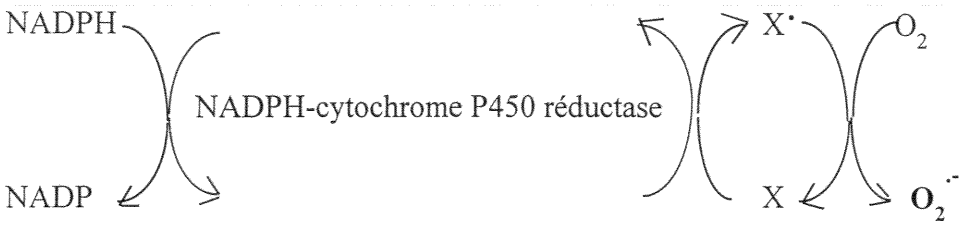


Figure 12 : Réduction d'un composé X par la NADPH-cytochrome P450 réductase.

La réduction monoélectronique du xénobiotique conduit à la formation du radical correspondant. Ce radical est oxydé en présence d'oxygène pour reformer la molécule parente, mais ce cycle d'oxydo-réduction donne également naissance à l'ion superoxyde.
Des travaux antérieurs de l'équipe ont permis la mesure de la production d'ion superoxyde par les microsomes de cerveau de rat au cours du métabolisme de la ménadione par la NADPH-cytochrome P450 reductase (Ghersi-Egea et al., 1991).

2.2.4. Les cytochromes P450

Les cytochromes P450 (P450 ; EC 1.14.14.1) représentent une grande famille d'enzymes multigénique qui peuvent produire des RL au cours de leur cycle catalytique (Figure 13). Elles catalysent l'oxydation de substrats endogènes ou exogènes pour leur élimination directe ou pour leur prise en charge et élimination par les enzymes dites de conjugaison, qui sont les sulfotransférases, les UDP-glucuronosyltransférases, les époxyde hydrolases et les glutathion *S*-transférases.

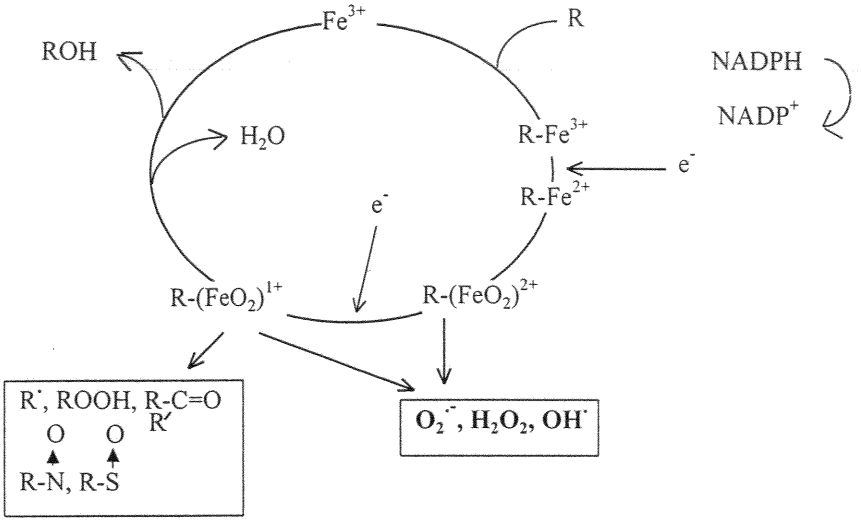


Figure 13 : Cycle catalytique du cytochrome P450.
Fe : site actif du cytochrome P450, R : substrat organique

Principalement localisés dans le foie, les P450 sont également actifs dans le cerveau. La localisation régionale et subcellulaire des activités dépendantes des P450 montre une augmentation significative de leur activité dans la BHE, d'autres zones d'interface comme les plexus choroïdes ainsi que dans les organes circumventriculaires dépourvus de BHE (Ghersi-Egea et al., 1994). Par ailleurs, nous avions également montré l'activité augmentée des P450 1A1 et 2B1 localisées dans les mitochondries de rat (Ghersi-Egea et al., 1993) ainsi que l'activité du P450 2D dans le cerveau de rat (Jolivalt et al., 1995).

Parmi d'autres P450 impliqués dans la génération de RL, le P450 2E1 produit des espèces dérivées de l'oxygène comme l'ion superoxyde, le radical hydroxyle et le peroxyde d'hydrogène dans le foie (Gorsky et al., 1984). Plus récemment, Montoliu et al. (1995) ont également observé une génération de RL par le P450 2E1 dans des cultures primaires d'astrocytes, après induction par l'éthanol.

2.2.5. La myéloperoxydase

Nous décrirons plus en détails la myéloperoxydase (MPO), enzyme-clé de notre modèle d'étude *in vitro* de l'oxydation de l'apo E.

2.2.5.1. L'enzyme et sa fonction

La myéloperoxydase (MPO ; EC 1.11.1.7) (Figure 14) est une glycoprotéine héminique (Schlutz, 1980) secrétée par les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) et les monocytes. Cette enzyme est synthétisée au stade promyélocyte de la cytodifférenciation des neutrophiles (Bainton et al., 1971). C'est une protéine tétramérique formée de 2 sous-unités légères de 11,5 kDa et de 2 sous-unités lourdes de 63 ou 57,5 kDa donnant lieu à plus de 3 isoenzymes (Pember et al., 1983). La protéine résultante a un poids moléculaire entre 120 et 160 kDa (Schlutz, 1980).

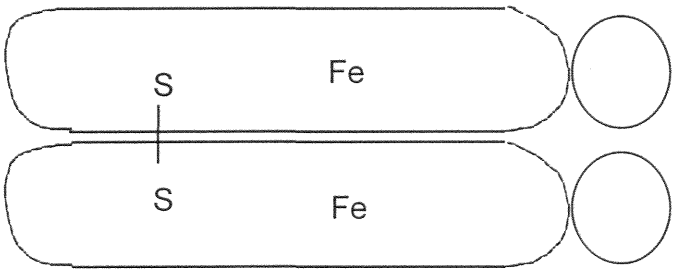


Figure 14 : Modèle de la structure native de la myéloperoxydase, d'après Andrews et Krinsky (1981).

La MPO génère l'acide hypochloreux en présence de peroxyde d'hydrogène et d'halogénure, généralement les ions chlorure (Cl^-) en concentration plasmatique (Agner, 1958), selon la réaction suivante:

$$MPO + H_2O_2 + Cl^- \text{--------} > HOCl + OH^-$$
$$HOCl + O_2^{\cdot -} \text{----------} > \mathbf{OH^\cdot} + Cl^- + O_2 \qquad \textbf{(1)}$$

La MPO a essentiellement un rôle bactéricide (Klebanoff, 1982). Au cours de l'inflammation, les neutrophiles activés subissent une modification du métabolisme oxydant et une dégranulation (Nauseef et al., 1988). Les neutrophiles consomment alors rapidement l'oxygène et génèrent des RL par l'intermédiaire du système $MPO/H_2O_2/Cl^-$ (Babior, 1978). Dans un même temps, les granules fusionnent avec la membrane plasmique, permettant la libération de leur contenu dans les lysosomes ayant phagocyté les microbes, créant ainsi un milieu toxique pour ces derniers. Il arrive que les neutrophiles libèrent leur contenu toxique dans leur environnement immédiat, du fait d'un défaut au niveau de la fermeture des phagolysosomes. Les composants cellulaires, notamment les protéines, deviennent alors les cibles des produits toxiques du système MPO/H_2O_2/halide (Nauseef et al., 1988).

La MPO peut également se coller à la surface des cellules, augmentant ainsi la concentration en acide hypochloreux à leur surface (Rosen et al., 1995). La MPO a été détectée dans les plaques d'athérome et colocalisée avec les macrophages spumeux, où elle peut oxyder *in vivo* les LDL (Daugherty et al., 1994 ; Hazell et al., 1996 ; Heinecke, 1997).

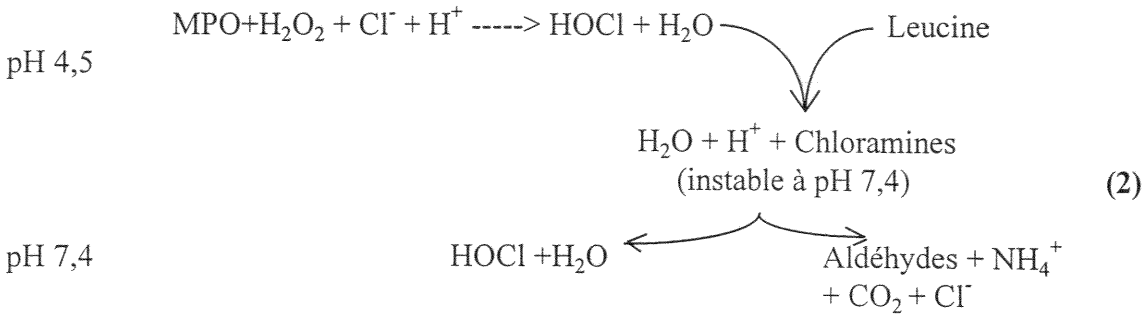
Il existe une déficience génétique en MPO dont l'effet le plus délétère est l'incapacité à détruire les levures *Candida albicans* (Nauseef , 1990).

Les patients déficients en MPO sont sujets à de sévères infections par *Candida*, souvent fatales, d'autant plus quand ces patients sont diabétiques (Kitahara et al., 1981).

2.2.5.2. Le système oxydant

L'acide hypochloreux produit par le système MPO/H_2O_2/Cl^- est un oxydant puissant, mais sa production est également accompagnée d'une augmentation d'ion superoxyde et d'ion hydroxyle (réaction 1). En l'absence d'ion métallique, cette réaction est 6 fois plus rapide que la réaction d'Haber-Weiss (Long et Bielski, 1980). Les effets cytotoxiques des oxydants produits sont nombreux : oxydation et/ou décarboxylation des protéines membranaires et des composants de la chaîne respiratoire des bactéries (Albrich et al., 1986), peroxydation des lipides membranaires (Winterbourn et al., 1992), inhibition de la synthèse d'ADN (Rosen et al., 1990), oxydation des protéines et plus spécifiquement des tyrosines en radical tyrosyle conduisant au "cross-linking" des protéines (Heinecke et al., 1993).

La MPO génère des RL selon la réaction 1 à pH 4,5, pH optimal de l'enzyme. En présence d'acides aminés dans des conditions acides, elle produit également des chloramines qui sont relarguées en dehors du lysosome et se décomposent à nouveau en HOCl, aldéhydes et ion ammonium à pH 7,4 (Zcliczynski et al., 1971), générant ainsi des espèces oxydantes à pH physiologique (réaction 2).



IV. Oxydation des protéines

Les protéines, tout comme les lipides, sont sensibles à l'attaque des RL. La peroxydation lipidique est un phénomène physiologiquement important et fait l'objet de beaucoup de travaux concernant notamment l'oxydation des LDL et des HDL comme mécanisme participant à l'étiologie de l'athérosclérose. Dans le cadre de la MA, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'oxydation des protéines dans le cerveau.

L'oxydation des protéines peut altérer différemment les acides aminés. Les conséquences en sont multiples : elles s'échelonnent de l'oxydation spécifique d'acides aminés à la dégradation de la protéine (Figure 15).

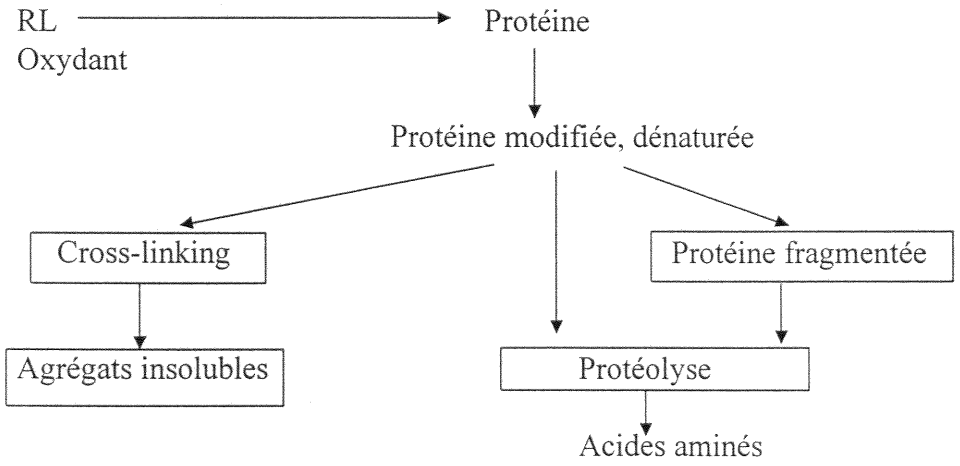


Figure 15 : Conséquences du métabolisme oxydant sur les protéines, d'après Pacifici et Davies (1990).

1. Modification d'acides aminés

Les résidus aminés tels que la cystéine, la méthionine, l'histidine et le tryptophane sont préférentiellement oxydés en acides sulfénique, sulfonique dans le cas de la méthionine et en histidine- et tryptophane-endoperoxydes. (Tableau III page 26).

L'oxydation des méthionines peut avoir lieu spontanément et de façon relativement sélective en milieu acide (Brot et Weissbach, 1983) (Figure 16).

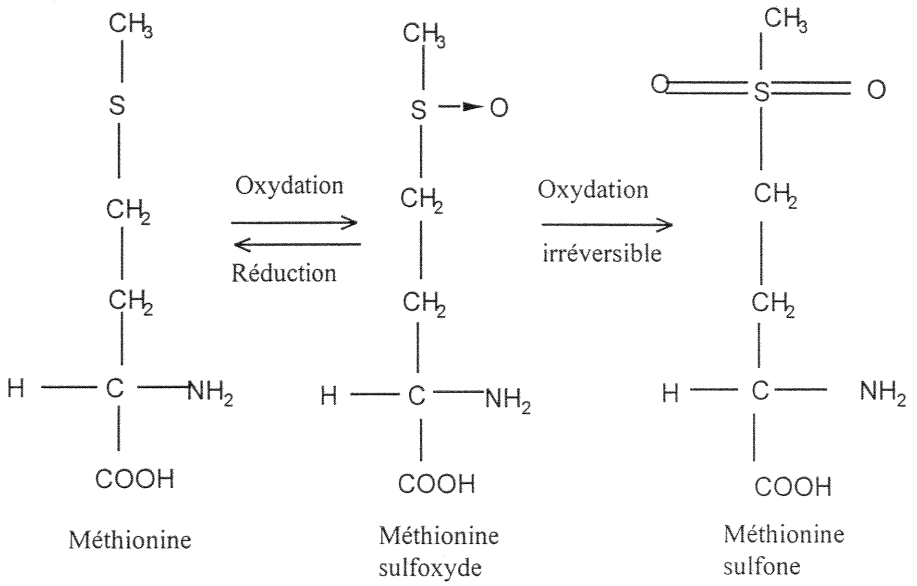


Figure 16 : Oxydation d'un résidu méthionine.

Les résidus cystéine et méthionine peuvent jouer un rôle protecteur contre l'oxydation des protéines. En effet, l'oxydation plus favorable de ces acides aminés répartis en des zones relativement exposées contribue à éviter l'oxydation d'acides aminés essentiels dans le site catalytique des enzymes (Levine et al., 1996).

1.1. Formation de ponts disulfure

Les résidus méthionine et cystéine sont les plus facilement oxydables. Cette oxydation des groupements sulfhydryle conduit à la formation de ponts disulfure intra ou intermoléculaires.

L'oxydation des groupements thiols est souvent impliquée dans la régulation de l'activité de certaines enzymes, comme la glucose 6-phosphate deshydrogénase ou l'adénylate cyclase dans le cerveau (Elstner, 1990).

1.2. Modification de charge

Une diminution du nombre des acides aminés basiques (lysine, arginine, histidine) entraîne une variation de la charge électrique de la protéine, conduisant à une diminution de son point isoélectrique (Stadtman, 1993). Cette modification de charge peut également être liée à l'oxydation des résidus méthionine (Vogt, 1995) ou des résidus histidine qui perdent leur pouvoir tampon après oxydation, comme dans le cas de la sérumalbumine bovine (SAB) (Davies, II, 1987).

La modification de charge des protéines peut être détectée par isoélectrofocalisation en gel.

1.3. Perte de tryptophane

L'oxydation des protéines peut se caractériser par une perte d'acides aminés et plus particulièrement de tryptophane (Davies, II, 1987). En fait, l'oxydation d'un résidu tryptophane conduit à la formation d'une cynurénine. Cette réduction du nombre de résidu tryptophane après oxydation est quantifiée par la mesure de la fluorescence avant et

après oxydation à des longueurs d'onde d'excitation de 340-350 nm et d'émission de 280 nm (Teale, 1960).

1.4. Formation de bityrosine

Les bityrosines sont issues de la réaction de deux radicaux tyrosyle, ou d'un radical tyrosyle et d'une tyrosine. Ces bityrosines peuvent être intra ou intermoléculaires, et conduisent au "cross-link" des protéines (Figure 17). Cette formation de radical tyrosyle puis de bityrosine est générée enzymatiquement par la MPO (Heinecke et al., 1993), la peroxydase du raifort et la lactoperoxydase (Boyse et al., 1972). Elle peut être utilisée comme marqueur des protéines oxydées par les neutrophiles lors d'une inflammation (Heinecke et al., 1993).

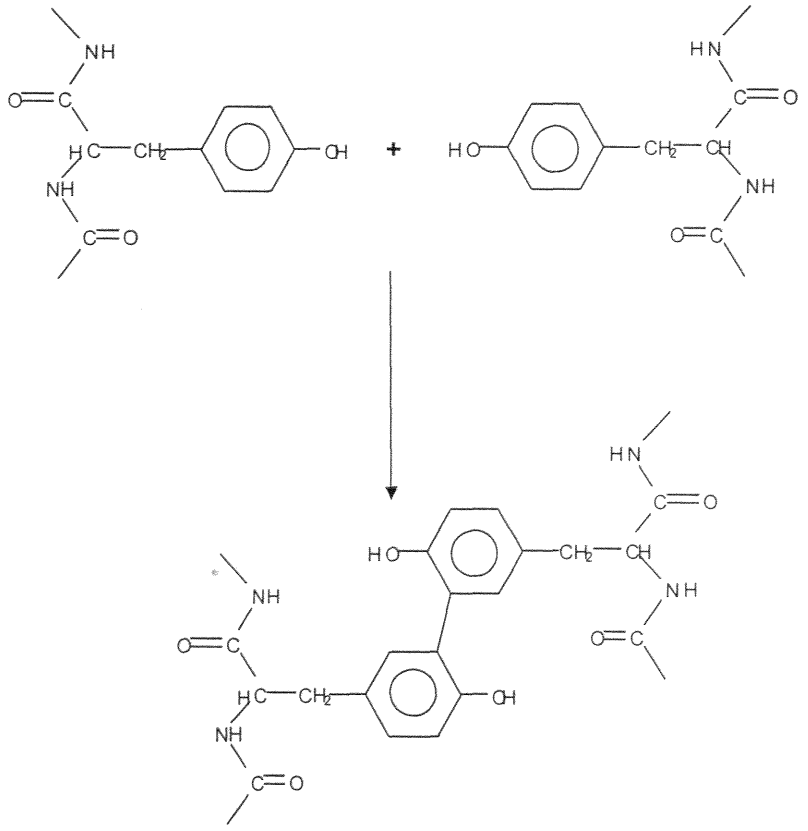


Figure 17 : Formation de bityrosine par oxydation.

1.5. Les groupements carbonyle

Après oxydation, les groupements carbonyle (C=O) sont surtout formés sur les résidus aminés tels que la proline, l'arginine et la lysine. Les résidus valine et isoleucine peuvent également former des groupements carbonyle alors que les résidus cystéine, méthionine et histidine n'en forment pas. Ces groupements peuvent être détectés par plusieurs méthodes, dont la plus employée est la méthode à la 2-4-dinitrophényle hydrazine (DNPH) (Levine et al., 1990). Le principe de cette réaction repose sur la formation d'une hydrazone stable, produit de la réaction entre le groupement carbonyle et l'hydrazine (Levine et al., 1990) (Figure 18). Cette hydrazone peut être mesurée par spectrophotométrie (Levine et al., 1990) ou par détection avec des anticorps anti-dinitrophényle (DNP) (Keller et al., 1993). Cette technique ne peut pas être employée pour les enzymes possédant un hème pour des problèmes de "quenching".

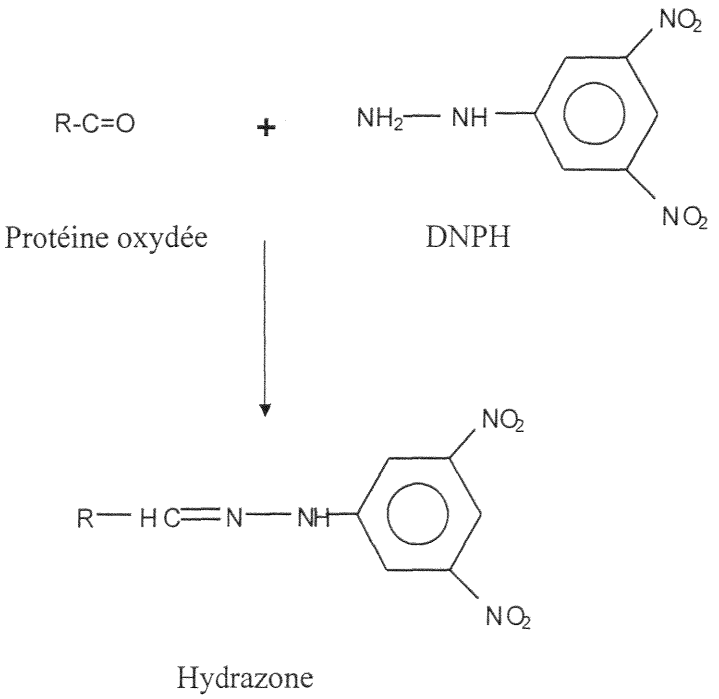


Figure 18 : Révélation des groupements carbonyle par réaction avec la dinitrophényle hydrazine (DNPH).

1.6. Formation d'adduits

Outre l'oxydation directe des protéines, les RL produits au cours du stress oxydant peuvent conduire à la glycoxydation et la peroxydation lipidique. Pour un rappel rapide, selon une bibliographie non exhaustive, nous décrirons quelques conséquences de ces 2 mécanismes au niveau des protéines.

Les produits de glycation avancée (AGE), comme la pentosidine, lient les protéines par liaison entre les résidus lysine et arginine. Ces "crosslinks" sont détectés dans les DNF (Smith et al., 1994).

En plus des modifications des protéines par les AGE, la glycation avancée produit des RL en présence de métal de transition (Smith et al., 1995). Cette production de RL augmente la production de malondialdéhyde (MDA) dans des cultures de neuroblastomes (Yan et al., 1994).

Le MDA et le 4-hydroxynonénal (HNE) sont des produits de la peroxydation lipidique qui peuvent former des adduits avec les protéines, essentiellement sur les résidus lysine par formation de base de Schiff (pour revue Esterbauer et al., 1991 ; Requenna et al., 1996). Les adduits de MDA et de HNE peuvent conduire au cross-link des protéines, notamment de la protéine Tau (Montine et al., 1996a), de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (Uchida et Stadtman, 1993), de l'apo E3 et de l'apo E4 (Montine et al. 1996b). Les adduits de MDA et de HNE sur les apo E3 et E4 donnent naissance à une protéine de 50 kDa détectée dans les cultures de cellules neurogliales et dans le LCR de sujets non déments et de patients atteints de MA (Montine et al., 1996b).

2. Modification de structure

Les différentes altérations oxydantes des acides aminés modifient la structure primaire des protéines et aboutissent à la modification des structures secondaire et tertiaire. Ces changements de conformation conduisent à l'agrégation et à la fragmentation des protéines, exposent de nouveaux sites protéolytiques et augmentent l'hydrophobicité des protéines.

2.1. Agrégation

L'agrégation des protéines résulte de la formation de liaisons covalentes intermoléculaires, comme la formation de bityrosine ou de ponts disulfure ou de liaisons covalentes au niveau des résidus histidine et lysine (Guptasarma et al., 1992). Elle peut également résulter de l'association hasardeuse de fragments protéiques par liaison non-covalente (c'est-à-dire des liaisons hydrophobes ou ioniques) (Davies, I, 1987).

Par exemple, le lyzozyme est une protéine particulièrement sensible à l'agrégation après oxydation par le système de la MPO et ces agrégats ne sont pas dissociés en présence de SDS et de β-mercaptoéthanol (Drozdz et aNaskalski., 1988).

Cette agrégation, conduisant à des complexes protéiques de haut poids moléculaire, rend en général les protéines inactives.

2.2. Fragmentation

La fragmentation des protéines se différencie de la dégradation par une scission ou cassure de la chaîne protéique par un mécanisme différent de l'hydrolyse peptidique due aux protéases (Davies, II, 1987). Le mécanisme de fragmentation implique la perte d'un

hydrogène en position α par le radical hydroxyle, suivie d'une réaction avec l'oxygène produisant des espèces peroxyles puis hydroperoxydes (Garrisson et al., 1962).

La fragmentation est un phénomène irréversible, au niveau des résidus proline, histidine et glycine, décrit pour la SAB, l'hémoglobine et la myoglobine par Puchala et Schuessler (1993 et 1995), Dean et al. (1986) et pour l'apo B par Bedwell et al. (1989).

2.3. Protéolyse

Les protéines modifiées par oxydation se révèlent être de bons substrats des protéases (Davies, 1987). Cette augmentation de la sensibilité des protéines oxydées à la protéolyse est probablement due à une dénaturation et à une augmentation de l'hydrophobicité des protéines (Pacifici et al., 1989). En fait, plusieurs travaux montrent une sensibilité à la protéolyse des protéines oxydées en 2 phases : une oxydation limitée conduirait à une augmentation de la sensibilité alors qu'une oxydation poussée serait associée à une augmentation de la résistance des protéines à la protéolyse (Dean et al., 1986 ; Davies et al., 1987 ; Grant et al., 1993). Ceci peut s'expliquer par le fait que les protéines "fortement" oxydées sont dénaturées et/ou agrégées, limitant ainsi l'accès des protéases (Dean et al., 1997). Dans des conditions pathologiques où le stress oxydant est particulièrement accru, la capacité protéolytique des cellules peut être insuffisante, expliquant ainsi le cross-link et l'agrégation des protéines oxydées au lieu de leur dégradation (Davies, 1997).

Cette dégradation protéolytique des protéines modifiées fournit *in vivo* des acides aminés pour la synthèse protéique *de novo*.

V. Marqueurs biologiques de l'oxydation des protéines

Comme nous l'avons vu précédemment, les RL peuvent être produits par de nombreux systèmes et avoir des conséquences multiples sur les protéines.

Dans le domaine de la recherche clinique, l'existence de marqueurs de l'oxydation peut permettre de déterminer si l'oxydation des protéines est un des mécanismes participant à l'étiologie de la maladie ainsi que d'évaluer le degré global d'oxydation (ou statut oxydant) au cours d'une pathologie. Définir un bon marqueur de l'oxydation des protéines s'avère difficile. Souvent, la mesure de l'oxydation des protéines ne peut se faire que partiellement sur des liquides biologiques.

La méthode la plus utilisée est la détection des groupements carbonyle des protéines. En effet, l'oxydation des protéines donne naissance à des dérivés carbonyle, révélés par la méthode colorimétrique utilisant la DNPH. Cette détection se fait essentiellement sur le plasma pour les protéines totales, mais également sur des homogénats tissulaires, par immunorévélation, méthode sensible mais semi-quantitative, par spectrophotométrie. La détection de groupements carbonyle peut également être réalisée par chromatographie liquide haute performance. Plus récemment, une méthode ELISA permettant de quantifier le contenu en groupements carbonyle d'un échantillon biologique a été décrite (Buss et al., 1997). La concentration en protéines oxydées est de l'ordre de 1 nmol/mg de protéine dans tous les tissus humains non pathologiques et supérieure à 8 nmol/mg de protéine dans des cerveaux pathologiques (Levine et al., 1994 ; Lyras et al., 1996).

La présence de tyrosine chlorée formée sur les protéines constitue un marqueur spécifique de l'oxydation par la MPO (Hazen et Heinecke, 1997). La détection des 3-chlorotyrosines

se fait sur des homogénats tissulaires par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Leeuwenburgh et al. (1997) ont détecté 4,2 chlorotyrosines pour 10 000 tyrosines dans des artères athérosclérotiques contre 0,8/10 000 pour des artères normales.

La diminution d'activité ou l'inactivation de certaines enzymes et leur accumulation peuvent être suivies et utilisées comme marqueur de l'oxydation des protéines. La mesure de l'activité de la glutamine synthétase et de la créatine kinase font partie des principaux biomarqueurs de l'oxydation des protéines cérébrales (Hensley et al., 1995). Ces 2 enzymes sont vulnérables à l'oxydation catalysée par les métaux ou, dans le cas de la glutamine synthétase, par le peptide Aβ (Aksenov et al., 1997).

La présence d'adduits modifiant chimiquement les protéines est également un indicateur de stress oxydant et plus particulièrement de la péroxydation lipidique. Les adduits MDA et HNE constituent des marqueurs de l'oxydation indirecte des protéines par l'intermédiaire de la peroxydation lipidique. Ceux-ci sont détectés immunologiquement ou par une méthode de chromatographie couplée à la spectrométire de masse (Requenna et al., 1996).

Enfin, le dosage des antioxydants endogènes, comme les vitamines E et C, le glutathion et l'acide urique, ou la mesure des activités de la SOD, de la catalase et la glutathion peroxydase sont des méthodes indirectes permettant de déterminer le degré d'oxydation.

VI. La protection contre les radicaux libres

Pour lutter contre la production excessive de RL, la cellule possède des moyens de défense enzymatiques et non enzymatiques.

Parmi les enzymes de protection, la superoxyde dismutase (SOD) permet l'élimination des ions superoxyde en formant du peroxyde d'hydrogène pris ensuite en charge par la catalase. La glutathion peroxydase, utilisant comme substrat le gluthation (GSH), est également une enzyme-clé dans la défense cellulaire (Figure 19).

Quant aux moyens de défense non enzymatiques, les vitamines E et C sont les plus efficaces, avec la vitamine E donnant facilement un proton qui neutralise les radicaux libres. La vitamine C est protectrice face aux agressions oxydantes, mais elle peut également produire des radicaux hydroxyle en présence de métaux de transition.

Il existe également des substances antioxydantes exogènes administrées dans des études de supplémentation en phase pré-clinique, notamment l'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba* qui sera au centre de notre étude.

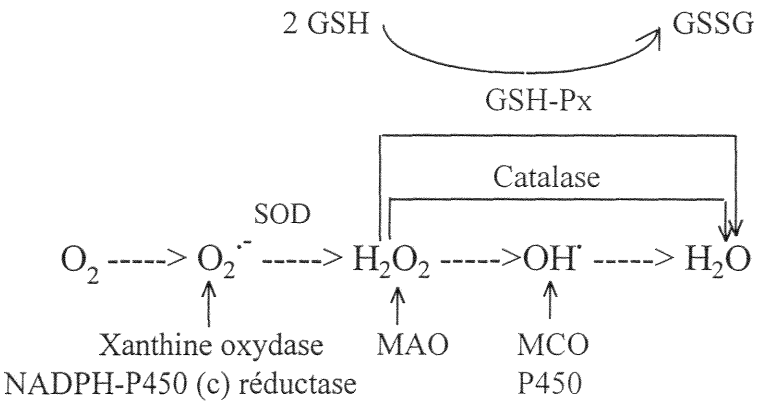


Figure 19 : Enzymes d'oxydation et de protection.

1. Systèmes enzymatiques cérébraux

Malgré une grande consommation d'oxygène et une forte génération de RL le cerveau est doté d'un faible pouvoir antioxydant. Ces enzymes sont essentiellement la SOD, la catalase, la glutathion peroxidase et les glutathion *S*-transférases.

1.1. La superoxyde dismutase

L'activité de la superoxyde dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1) est un des mécanismes de défense majeur contre la toxicité de l'oxygène (Fridovitch, 1983). Cette métallo-enzyme catalyse la réaction de conversion de l'ion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Elle est principalement associée au zinc ou au cuivre dans le cerveau (Marklund et al., 1983) et localisée plus particulièrement dans les neurones (Ceballos et al., 1991). La SOD est également associée au manganèse dans les astrocytes (Furuta et al., 1995). Dans le cerveau de patients atteints de MA, la SOD associée au manganèse est détectée dans les plaques séniles (Maeda et al., 1997). De plus, les niveaux de protéine et d'ARNm de la SOD sont plus élevés dans les cerveaux de patients atteints de MA comparés aux sujets témoins (Ceballos-Picot et al., 1992 ; Lovell et al., 1995).

Cependant, cette enzyme n'est efficace qu'en coopération avec la catalase ou la glutathion-peroxydase (GSH-Px) qui prennent en charge le peroxyde d'hydrogène formé (Figure 19).

1.2. La catalase

La catalase (EC 1.11.1.6) catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau (Figure 19). Dans le cerveau humain, cette activité catalase est limitée (Reiter, 1995) et c'est essentiellement la GSH-Px qui prend en charge H_2O_2. Cependant, l'activité catalase est

plus élevée dans l'hippocampe et le gyrus temporal de cerveaux de patients atteints de MA (Lovell et al., 1995).

1.3. La glutathion peroxydase

La GSH-Px (EC 1.11.1.9) est une enzyme sélénium-dépendante qui catalyse la dismutation de H_2O_2 en H_2O en présence de GSH (Figure 19). Elle est majoritairement responsable de cette réaction dans le cerveau (Sinet et al., 1980) et son activité est plus élevée dans l'hippocampe de cerveaux de patients atteints de MA par rapport à des sujets témoins (Lovell et al., 1995).

1.4. Les glutathion *S*-transférases

Les glutathion S-transférases (GST, EC 2.5.1.18) forment une famille multienzymatique qui catalyse la conjugaison de substances électrophiles au glutathion (GSH) (Mannervick, 1985). Ces enzymes sont essentiellement des enzymes de protection par leur rôle de détoxification de produits de la peroxydation lipidique (Mannervick, 1985) et de xénobiotiques. Elles sont également impliquées dans le transport intracellulaire d'hormones et d'autres composés endogènes ou exogènes (Listowsky et al., 1988).

Lors d'un déficit en sélénium, nécessaire à la GSH-Px, la GST assure la dégradation des hydroperoxydes (Pré, 1992). Lors d'un déficit en vitamine E et sélénium, l'activité de la GST augmente dans les différents tissus (Stone et Dratz, 1980).

Les GST peuvent être activées par un stress oxydant. En effet, Aniya et Anders (1989) ont montré une augmentation de l'activité GST dans des microsomes de foie de rat par l'ion superoxyde et H_2O_2, mais également *in vivo* chez des rats perfusés avec H_2O_2 (Aniya et

Nato, 1993).

Dans le cerveau humain adulte, les GST sont localisées dans les plexus choroïdes, les leptoméninges, l'endothélium vasculaire et les cellules gliales (Cammer et al., 1989) mais ne sont pas présentes dans les neurones (Carder et al., 1990).

2. Systèmes non enzymatiques cérébraux

2.1. La vitamine E

Le terme vitamine E représente un groupe majeur d'antioxydants naturels liposolubles, les tocophérols et les tocotriénols. L'α-tocophérol (α-TO), le plus souvent représenté, est concentré dans l'espace hydrophobe des membranes cellulaires. Sa concentration est de l'ordre de 10 à 40 μM dans le plasma. Cette concentration est significativement diminuée chez les patients atteints de MA (18,6 ± 3,6 μM pour les malades d'Alzheimer contre 30 ± 12 μM chez les sujets témoins) (Zaman et al., 1992). De même, dans le LCR, la concentration en α-TO est significativement diminuée de 23,6 ± 8 nM pour les sujets témoins à 12,8 ± 4 nM pour les patients atteints de MA (Toghi et al., 1994).

La vitamine E brise la chaîne réactionnelle de la peroxydation lipidique en piégeant les RL. Elle capte un électron et le radical α-TO$^{\cdot}$ alors formé est non réactif et moins hydrophobe (Figure 20). Il peut être dégradé ou recyclé en vitamine E par le glutathion (Figure 21) ou par la vitamine C, après s'être déplacé vers la face interne des membranes (Reiter, 1995).

La vitamine E est donc essentiellement un inhibiteur de la peroxydation lipidique. Sa concentration, mais également celle de l'acide ascorbique, diminuent dans le cerveau au

cours d'une exposition aux RL (Yoshida et al., 1982) alors que les produits de la peroxydation lipidique s'accumulent.

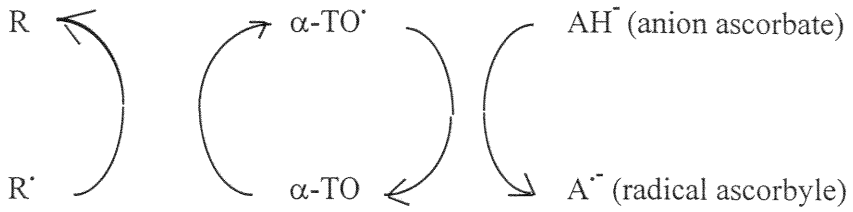


Figure 20 : Action de la vitamine E (α-TO) sur une protéine R oxydée (R˙).

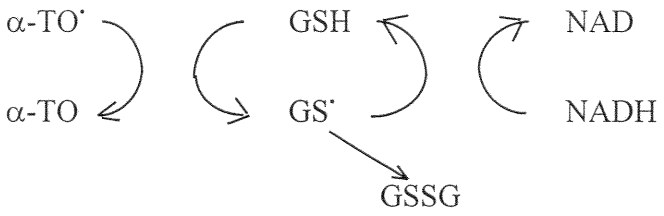


Figure 21 : Recyclage de la vitamine E par le glutathion (GSH)

2.2. La vitamine C

La vitamine C, ou acide ascorbique, est présente dans l'environnement aqueux du cytosol et sa concentration plasmatique est de l'ordre de 40 à 140 µM. Elle est présente dans le cerveau, où elle représente l'antioxydant cytosolique majoritaire. Dans le LCR, elle peut être 10 fois plus concentrée que dans le plasma (Spector et Eells, 1984).

L'acide ascorbique prévient la formation de RL, mais son rôle antioxydant est surtout lié à la régénération de l'α-tocophérol. La vitamine C réduit le radical issu de l'oxydation de la vitamine E en formant un radical ascorbyle non réactif (Figure 20). Par contre dans le

cerveau, la vitamine C, en concentration élévée, peut être prooxydante, conduisant à une peroxydation lipidique dépendante du fer (Andorn et al., 1996). En effet, la vitamine C peut réduire le fer ferrique en fer ferreux et favoriser la réaction de Fenton liée au fer.

Du fait de son rôle prooxydant, l'utilisation thérapeutique de la vitamine C doit être préconisée avec prudence pour des maladies du SNC, contrairement à la vitamine E pour laquelle aucun effet toxique n'a été reporté lors de supplémentations chez l'Homme (Biasi et al., 1994).

2.3. Le glutathion

Le GSH, présent dans le cerveau, joue un rôle antioxydant par conjugaison, par l'intermédiaire de la GST, mais également en agissant directement avec les RL pour former le glutathion oxydé (GSSG). Le GSSG est réduit à son tour par une glutathion réductase. Le GSH séquestre les ions superoxyde et protège essentiellement les groupements thiol (SH) des protéines. Il peut également régénérer, en les réduisant, d'autres antioxydants comme l'α-tocophérol et l'acide ascorbique (Meister et Anderson, 1983).

Le cerveau ne synthétise pas le GSH qui provient du sang par un mécanisme de transport situé dans la BHE (Kannan et al., 1990). Il est alors localisé dans l'endothélium vasculaire et l'astroglie avec des concentrations de l'ordre de la millimole (Slivka et al., 1987 ; Raps et al., 1989) et il peut être exporté des astrocytes vers les neurones (Pileblad et al., 1991).

2.4. L'acide urique

Produit de la dégradation des bases puriques par la xanthine oxydase, l'acide urique peut jouer un rôle protecteur lors d'une exposition du plasma à l'ozone ou à NO_2 mais ce rôle est

très réduit lors de l'exposition à HOCl (Halliwell, 1992). L'acide urique joue un rôle de piégeur de RL, notamment de l'ion superoxyde et du radical hydroxyle et sa concentration est élevée dans les fluides biologiques (160 à 450 µM dans le plasma). De plus, la concentration en acide urique est diminuée dans le LCR de patients atteints de démence de type Alzheimer par rapport aux sujets témoins, reflétant un problème métabolique au niveau cérébral (Tohgi et al., 1993). L'acide urique peut également former des complexes avec le fer (Davies et al., 1984), inhibant ainsi les réactions de Fenton basées sur le fer.

2.5. La bilirubine

La bilirubine est un produit du catabolisme de l'hème. La majeure partie de cette protéine est liée à l'albumine dans le sérum et ne peut pas traverser la BHE. Sous cette forme, la bilirubine n'est pas toxique. Cependant, une petite partie libre de la bilirubine peut passer la BHE et se déposer dans le cerveau. Chez l'adulte, la bilirubine est un antioxydant efficace au niveau cérébral. Son oxydation par les mitochondries permet son élimination du cerveau où son accumulation pourrait être toxique (Hansen et al., 1997 ; Scigliano et al., 1997). En revanche, l'accumulation de la bilirubine dans le cerveau qui se produit lors de l'ictère est neurotoxique, surtout chez le nouveau-né où elle peut conduire à une encéphalopathie (Hansen et al., 1994).

2.6. La mélatonine

La mélatonine ou N-acétyl-5-méthoxytryptamine est produite par la glande pinéale, traverse la BHE et entre dans les neurones et les cellules gliales où elle exerce une forte activité antioxydante (Reiter, 1991 ; Pieri et al., 1994).

Elle peut également être administrée comme médicament car elle pénètre facilement dans le cerveau où elle est alors distribuée dans tous les compartiments subcellulaires.
Cette substance est un piégeur de l'ion hydroxyle et probablement d'ion superoxyde mais elle stimule également l'activité cérébrale de la GSH-Px (Pablos et al., 1995). De plus, sa protection est plus efficace que le GSH (Pablos et al., 1995).

Les activités des systèmes enzymatiques de protection sont augmentées dans les cerveaux de patients atteints de MA pour contrecarrer l'augmentation de la production de RL dans le cerveau. Toutefois, cette augmentation d'activité n'est pas suffisante d'autant plus qu'elle est accompagnée d'une diminution de la concentration en différents antioxydants chimiques (vitamine E, acide urique). Une approche thérapeutique pour améliorer la protection contre les RL semble être nécessaire pour ralentir la progression de la MA.

3. Applications thérapeutiques et études cliniques

Depuis 1993, seuls 2 médicaments, la tacrine (ou Cognex) et le donépézil (ou Aricept), sont prescrits pour le traitement de la MA. Ces 2 substances thérapeutiques réduisent la perte d'acétylcholine, neuromédiateur agissant au niveau des fonctions cognitives. Mais, à ce jour, aucun médicament n'arrête la progression de la MA. La recherche de nouvelles substances pouvant contrecarrer l'évolution de la MA suit de nombreuses pistes correspondant à différents mécanismes pouvant intervenir dans la MA. Les substances antioxydantes font l'objet de nombreuses études.

3.1. Les médicaments du système cardio-vasculaire

Plusieurs médicaments prescrits pour le traitement de l'hypertension artérielle ou de l'insuffisance cardiaque possèdent une activité antioxydante. Le carvedilol, médicament à action antihypertensive, possède la capacité de réduire l'effet des RL sur les lipides membranaires en les piégeant et il préserve également le niveau de vitamine E endogène dans des homogénats cérébraux de rat. Le carvedilol est prescrit non seulement pour une thérapie antihypertensive mais pourrait également apporter des effets bénéfiques par protection contre les RL générés lors des ischémies cérébrales et des accidents vasculaires cérébraux (Yue et al., 1995).

Le captopril, un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, prescrit dans le traitement de l'hypertension possède des propriétés antioxydantes (Lapenna et Cuccurullo, 1995). Dans la même classe thérapeutique, l'énalapril est également protecteur contre l'oxydation des LDL (Clearfield et al., 1994), en augmentant l'activité de la SOD et de la GSH-Px (de Cavanagh et al., 1995). Contrairement à l'énalapril, le captopril, qui contient un groupement thiol dans sa structure, protège contre l'arythmie causée par le cycle ischémie/reperfusion (van Glist et al., 1986) ainsi que les cellules endothéliales contre l'attaque radicalaire (Mak et al., 1990).

3.2. Les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens

Tout comme dans la formation de la plaque d'athérome, l'inflammation semble être impliquée dans la MA (Kisilevski, 1994) plus précisément dans la genèse des dépôts amyloïdes.

Une étude longitudinale met en évidence un risque plus faible de développer la MA pour

les personnes traitées régulièrement par des médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) incluant l'ibuprofène, le naproxène et l'indométhacine. Ces résultats concernant l'effet protecteur des AINS corroborent les observations faites chez les patients atteints d'arthrite. En effet, une diminution de l'incidence de la MA est observée chez ces patients traités avec de fortes doses d'AINS (McGeer et al., 1996). A l'heure actuelle, la prise d'AINS pour prévenir la MA n'est pas réellement envisagée à cause des effets secondaires et par manque de connaissance de l'effet-dose.

Le mécanisme de cette action protectrice des AINS n'est pas clairement défini. A côté de leurs effets classiques, certains AINS comme le naproxène ou le flurbiprofène inhibent la formation d'ion superoxyde. D'autres comme l'acétaminophène convertissent les ions superoxyde en H_2O_2 (Kimura, 1997).

3.3. Les oestrogènes

Selon une étude américaine portant sur le suivi de femmes pendant 5 ans, la thérapie de substitution hormonale par les oestrogènes est associée à une réduction de l'incidence de la MA. En effet, pour les femmes traitées par les oestrogènes, l'incidence est de 2,7 % contre 8,4 % pour les femmes non traitées (Kawas et al., 1997).

Les oestrogènes pourraient donc limiter les risques de développer une MA et retarder l'âge du début symptomatique de la MA. Plus la prise d'oestrogènes est longue, plus les bénéfices sont importants. En effet, le risque de développer la MA diminue de 30 à 40 % lors d'un traitement par les oestrogènes sur une dizaine d'années. De plus, la prise d'oestrogènes augmente la réponse à la tacrine (Schneider et al., 1996). Ces résultats ont été confirmés par une seconde étude longitudinale (Resnik et al., 1997). Une autre étude

récente montre également une amélioration des résultats à des tests de performances cognitives chez les femmes traitées par des oestrogènes (Jacobs et al., 1998).

Les mécanisme expliquant cet effet bénéfique de la substitution hormonale sont encore inconnus et plusieurs hypothèses ont été proposées. Les oestrogènes pourraient jouer un rôle au niveau du métabolisme de l'APP, prévenant ainsi la formation de fibrilles d'Aβ (Chang et al., 1997), ainsi qu'un rôle antioxydant protégeant les cellules nerveuses (Behl et al, 1995).

3.4. Les antioxydants

Dans une autre classe thérapeutique, le propofol est un anesthésique possédant une structure chimique similaire à celle de l'α-tocophérol et agirait comme ce dernier en brisant la chaîne de la peroxydation lipidique (Aarts et al., 1995). De même, par analogie de structure avec l'α-tocophérol, le probucol agit comme un antioxydant en réagissant avec les radicaux peroxyles et en donnant un électron (Bisby et al., 1996). Le probucol agit uniquement sur les ions superoxyde contrairement à l'α-tocophérol qui est également protecteur contre le radical hydroxyle.

En plus des médicaments déjà sur le marché pouvant agir comme antioxydant, un grand nombre de composés sont à l'étude pour définir leur capacité antioxydante et plusieurs demandes de brevets ont été déposées pour des agents thérapeutiques, dont des composés antioxydants, à visée neurologique. Pour le premier trimestre 1997, plus de 450 demandes ont été déposées (Baudy, 1997).

De plus, dans le cadre de la MA, des études de traitement et de supplémentation en antioxydants exogènes sont menées en phase préclinique. Une étude de co-administration de sélégiline et de vitamine E et de nombreuses recherches concernant les flavonoïdes, et notamment l'extrait de *Ginkgo biloba,* apportent des résultats encourageants.

3.4.1. Traitement par la sélégiline et la vitamine E

Les effets antioxydants de certaines molécules observés *in vitro* sont aujourd'hui suivis en phase clinique pour le traitement de pathologies mettant en cause le stress oxydant. Dans cette optique, une étude en double aveugle a été conduite sur des patients atteints de MA avec la sélégiline, un inhibiteur sélectif des MAO, ou l'α-tocophérol ou les 2 simultanément, ou un placebo.

Au cours de cette étude, le traitement par la vitamine E (2 000 UI/l) ou la sélégiline (10 mg/j) retarde la progression de la maladie en terme d'hospitalisation (Sano et al., 1997). Cette protection par un inhibiteur de MAO suggère l'implication de ces enzymes dans la MA et notamment leur implication par la formation de RL au cours de leur activité, hypothèse corroborée par l'effet protecteur de la vitamine E, piègeur de RL.

3.4.1. L'extrait de Ginkgo biloba

L'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba* (EGb 761, Tanakan^{R}) est habituellement prescrit dans le traitement de la vasomotricité des vaisseaux, et de la correction des symptômes du déficit intellectuel pathologique du sujet âgé.

L'EGb 761 est extrait des feuilles du plus ancien arbre du monde, le *Ginkgo biloba.* Sa composition très complexe renferme des terpènes comme les ginkgolides et les bilobalides

qui représentent 6 % de l'extrait, ainsi que des flavonoïdes constituant 24 % de l'extrait total. L'extrait EGb 761 contient également une SOD (Duke et Salin, 1985) pouvant prendre en charge les ions superoxyde.

Depuis sa commercialisation en 1975, le champ d'application thérapeutique de l'extrait EGb 761 n'a cessé de progresser, complétant ainsi les indications thérapeutiques initiales. En effet, d'autres mécanismes d'action ont été démontrés, notamment la capacité de piéger les RL comme l'ion superoxyde et le radical hydroxyle (Pincemail et al., 1989). Son action sur la plasticité cérébrale a également été démontrée sur des modèles animaux par récupération fonctionnelle après lésion du nerf vestibulaire (Lacour et al., 1991).

L'EGb 761 intervient également dans la libération, le recaptage et le catabolisme de neuromédiateurs comme la dopamine, l'acétylcholine, ou dans leur capacité de liaisons avec des récepteurs membranaires. Il protège le tissu cérébral contre l'hypoxie et ce sont les ginkgolides et bilobalides qui sont essentiellement responsables de cette protection (Oberpichler et al., 1988). Les flavonoïdes sont d'efficaces piègeurs de RL, notamment d'ion superoxyde et sont des chélateurs d'ions ferreux (Robak et Gryglewski, 1988). Ils inhibent également différentes enzymes dont la cyclooxygénase, les lipoxygénases (Robak et Gryglewski, 1988) et la xanthine oxydase.

Des études utilisant l'un des composants de l'extrait montrent une efficacité de protection contre les RL plus faible ou similaire à l'extrait total. Ceci suggére une action synergique des différents constituants (Klein et al., 1997), la séquestration des ions superoxyde étant essentiellement due aux flavonoïdes (Pincemail et al., 1989). Les ginkgolides et les bilobalides présents dans l'extrait EGb 761 sont neuroprotecteurs avec, toutefois, une

spécificité des ginkgolides qui réagissent plus particulièrement sur les neurones alors que les bilobalides réagissent sur les neurones et les astrocytes (Kriegelstein et al., 1995). De plus, les ginkgolides possèdent un effet anti-ischémique alors que les bilobalides ont un effet anti-oedémateux (Chatterjee et al., 1986).

De plus, l'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba* favorise la sécrétion d'apo E dans des suspensions cellulaires d'hippocampe et de striatum de rat. Dans un même temps, la présence de l'extrait contrecarre la diminution du niveau d'apo E dans les supensions cellulaires d'hippocampe après oxydation par le système acide ascorbique/Fe^{2+} (Ramassamy et al., 1996).

Dans le cadre d'une récente étude clinique, les patients atteints de MA recevant de l'EGb 761 montrent une stabilisation voire une amélioration significative de leurs performances cognitives par rapport aux patients recevant un placebo (Le Bars et al., 1997). En effet, selon l'échelle ADAS-cog (Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive subscale), les patients recevant l'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba* ont un score plus élevé de 1,4 points ($p=0,04$) par rapport aux patients recevant un placebo. Et, selon l'évaluation GERRI (Geraitric Evaluation by Relative's Rating Instrument), 37 % des patients traités avec l'extrait EGb 761 présentent une amélioration contre 23 % des patients prenant un placebo ($p=0,003$). Le traitement par l'extrait de *Ginkgo biloba* permet donc une amélioration des paramètres cognitifs, contrairement à l'étude citée précédemment avec la vitamine E et la sélégiline, qui ne montrait qu'une amélioration de la qualité de vie ou de l'hospitalisation (Sano et al., 1997).

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Au cours du vieillissement, les processus oxydants sont accrus dans le cerveau, de façon d'autant plus importante que les sujets sont atteints de pathologies neurodégénératives, comme la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer (MA). Il en résulte une accumulation **d'espèces réactives dérivées de l'oxygène**, dont un sous groupe est plus communément appelées radicaux libres (RL). Ces RL s'accumulent d'autant plus que les mécanismes protecteurs enzymatiques (superoxyde dismutase, catalase...) ou non enzymatiques (vitamine C et E) sont physiologiquement assez pauvres dans le cerveau. Les RL sont produits par des réactions -(1)- chimiques catalysées par des métaux comme le fer, communément désignées par MCO (metal catalyzed oxidation), ou -(2)- enzymatiques (cytochrome P450, NADPH-P450 (c) reductase, myéloperoxidase (MPO)...). Si beaucoup de travaux ont été consacrés à l'étude globale des protéines oxydées dans le cerveau, peu d'études concernent l'oxydation de protéines spécifiques liées aux neuropathologies. Parmi les protéines retrouvées dans les dépôts amyloïdes de cerveaux de malades d'Alzheimer, l'**apolipoprotéine E** (apo E), synthétisée par les astrocytes, est une protéine polymorphe exprimée par 3 allèles d'un même gène codant pour 3 isoformes apo E2, apo E3 et apo E4.

L'oxydation pourrait être le dénominateur commun de la colocalisation de l'apo E et de la protéine amyloïde Aβ dans les plaques séniles. L'apo E lie Aβ et cette liaison apo E-Aβ serait favorisée par l'oxydation préalable de l'apo E. De plus, Aβ exerce des effets toxiques par

production de RL tandis que l'apo E, qui possède des propriétés antioxydantes protège les neurones en culture contre la toxicité d'Aβ. L'apo E pourrait donc prévenir l'oxydation médiée par Aβ, se retrouvant ainsi oxydée dans ce processus. Mais, un peu comme un effet entraineur, cette oxydation contribuerait à l'interaction apo E-Aβ, favorisant ainsi leur dépôt conjoint au sein des plaques séniles.

Si ce schéma se met en place dans le cerveau alzheimérien, d'autres fonctions de l'apo E pourraient être altérées, ce qui contribuerait encore à accélérer les processus neurodégénératifs. En plus de la diminution du niveau d'apo E dans le cerveau de patients atteints de MA, les conséquences fonctionnelles de l'oxydation de l'apo E peuvent être multiples : altérations de ses fonctions de transport du cholestérol, ainsi que celles impliquées dans la croissance axonale ou les processus de réparation. L'implication du polymorphisme de l'apo E et plus particulièrement l'augmentation de la fréquence de l'allèle ε4 dans la MA soulève la question d'une sensibilité différente à l'oxydation des 3 isoformes d'apo E. L'oxydation de ces 3 isoformes est susceptible de modifier leur capacité de liaison aux **phospholipides**, modifiant ainsi leur fonction.

Afin d'apporter des éléments de réponse quant au rôle joué par l'oxydation de l'apo E dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer, et tout en proposant une approche thérapeutique à travers l'utilisation de substances antioxydantes dans nos différents modèles d'étude, notre travail de thèse a consisté à étudier d'une part l'oxydation des 3 isoformes de l'apo E humaine et d'autre part ses conséquences fonctionnelles (Figure 22).

Notre hypothèse de travail est la suivante **: l'oxydation de l'apo E est un des mécanismes intervenant dans l'étiologie de la MA.**

Pour y répondre, nous avons étudié :

- la sensibilité différente des 3 isoformes d'apo E recombinante à l'oxydation. Nous présenterons les résultats obtenus par oxydation chimique utilisant le vanadyl comme métal, et par oxydation enzymatique par le système de la MPO, dont nous avons montré la présence dans le cerveau humain.

- le rôle de l'oxydation de l'apo E dans l'interaction avec les phospholipides. Ces résultats concernent l'incorporation de l'apo E dans des disques phospholipidiques avant et après oxydation de l'apolipoprotéine. L'influence de l'oxydation de l'apo E sur sa liaison aux phospholipides sera discutée ainsi que l'influence de l'environnement lipidique sur l'oxydation de l'apo E.

- l'interaction apo E-Aβ. Nous montrerons les conséquences de l'oxydation de l'apo E sur la fibrillation d'Aβ.

- la protection contre l'oxydation de l'apo E. Nous avons mesuré l'activité de plusieurs enzymes du métabolisme du médicament dans le cerveau de patients atteints de MA et de patients neurologiquement sains. Nous avons également comparé *in vitro* la protection contre l'oxydation de l'apo E par l'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba*, piégeur de radicaux libres, par rapport à des composés antioxydants classiques comme la vitamine E, le probucol et le glutathion.

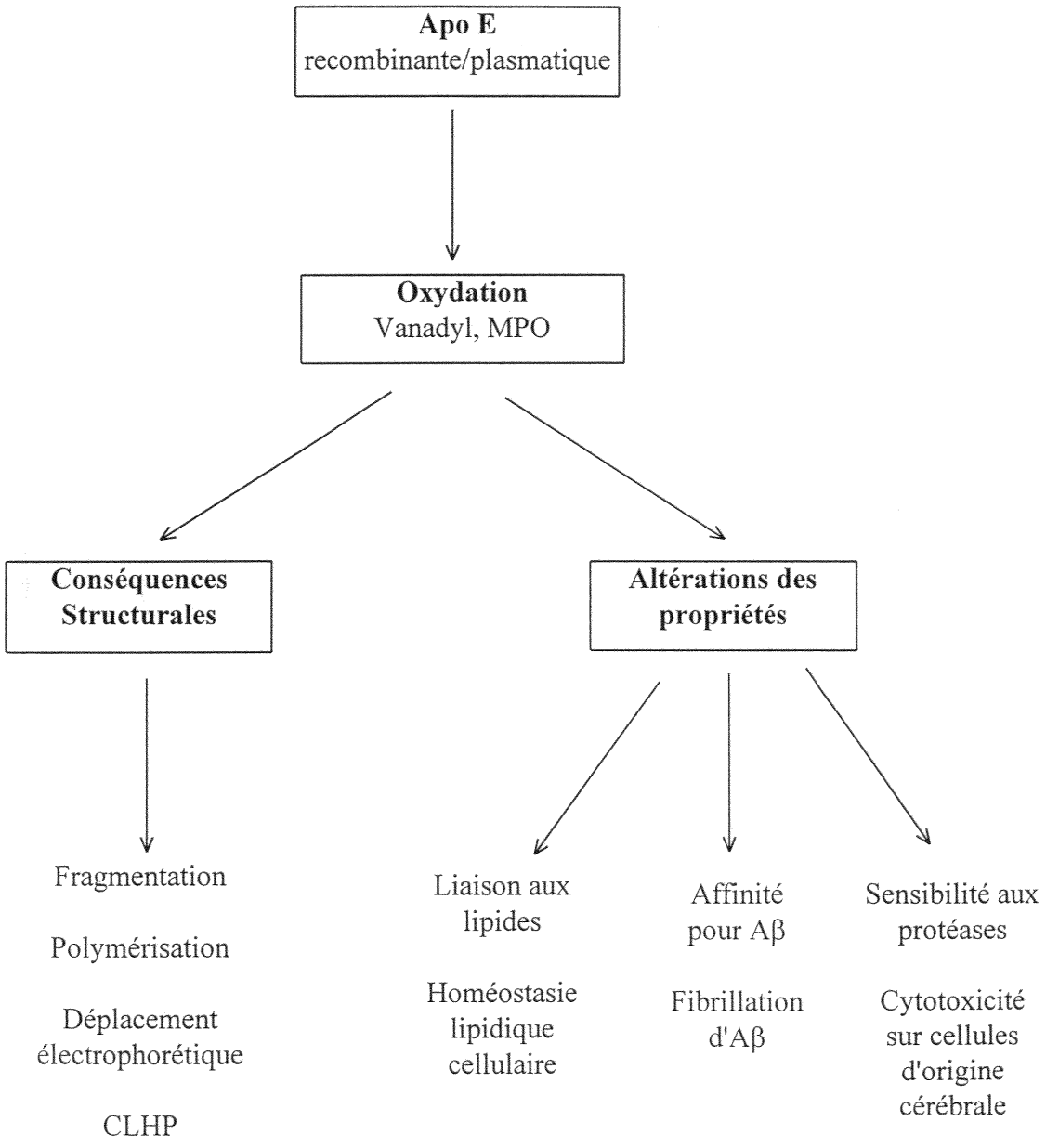


Figure 22 :Principales conséquences de l'oxydation de l'apolipoprotéine.

MATERIEL ET METHODES

I. Production et purification des isoformes d'apo E recombinante

Les 3 isoformes de l'apo E humaine recombinante sont produites au laboratoire dans un système bactérien. Leurs ADN complémentaires ont été clonés dans le vecteur d'expression pARHS-2 et introduits dans *Escherichia coli* BL21(DE3). Ces protéines possèdent un peptide de fusion de 4,5 kDa contenant un segment polyhistidine permettant leur purification par chromatographie d'affinité en une seule étape sur un gel de nickel (Barbier et al., 1997). Cette méthode de production permet d'obtenir des protéines pures à plus de 99 %.

Après purification, les 3 isoformes d'apo E recombinante sont lyophilisées, puis dénaturées pendant 2 heures à température ambiante dans un tampon guanidine (Guanidine-HCl 4 M, Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM, EDTA (pH 8,0) 1 mM, β-mercaptoéthanol 2 %) de façon à atteindre une concentration finale en apo E de 500 µg/ml.

Les échantillons sont ensuite dialysés contre une solution de bicarbonate d'ammonium (NH_4HCO_3 0,1M, pH 8,8) pendant 4 jours avec 3 changements de bain par jour.

Les solutions contenant les différentes isoformes d'apo E dans le tampon bicarbonate sont ensuite filtrées sur un filtre de 0,2 µM pour éliminer les agrégats. La concentration finale en apo E est calculée après lecture de l'absorbance à 280 nm ($\varepsilon=1.24.10^3$ $g^{-1}.cm^2$). L'augmentation de l'absorbance des solutions d'apo E à 340 nm nous indique si une agrégation significative apparaît.

Les 3 isoformes d'apo E recombinante sont ainsi conservées à 4 °C pendant 6 à 8 semaines, temps au bout duquel l'agrégation de l'apo E devient significative et se traduit par un comportement très hétérogène des protéines lors de l'analyse par CLHP en phase inverse.

II. Systèmes *in vitro* d'oxydation de l'apo E

Pour chacune des conditions d'oxydation, le volume d'incubation est de 5 µl, contenant 0,5 à 1 µg d'apo E.

1. Système d'oxydation chimique

Dans un premier temps, nous avons utilisé un système d'oxydation chimique de production de RL impliquant un métal de transition, le vanadium.

1.1. Principe

En présence de H_2O_2, l'ion vanadyle (VO^{2+}) est réduit en VO^+ en produisant des radicaux hydroxyle responsables de l'attaque radicalaire de l'apo E.

$$VO^{2+} + H_2O_2 \text{ ---> } VO^+ + OH^- + \mathbf{OH^{\cdot}}$$

1.2. Protocole

Le sulfate de vanadium (Prolabo) est dissout à une concentration de 1 M dans une solution de HCl 10^{-2}M. Cette solution mère est ensuite diluée dans la solution de HCl pour obtenir des concentrations variables en ion vanadyle (10, 8, 4 et 2 mM).

Après avoir vérifié la molarité de la solution commerciale de H_2O_2 (Sigma) à 240 nm (ε = 43,6 $M^{-1}.cm^{-1}$), celle-ci est diluée dans l'eau pour obtenir une solution stock à 100 mM.

Dans ce système oxydant, l'apo E, diluée dans un tampon Tris pH 7,4 (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Urée 20 mM) est mise en présence d'une concentration fixe de 0,1 mM H_2O_2 et de concentrations variables en ion vanadyle (concentrations finales : 200, 400, 800, 1000 µM). L'ajout du sulfate de vanadium déclenche la réaction d'oxydation. La durée de l'incubation est de 10 minutes à température ambiante. L'échantillon est alors placé dans la glace pendant 5 minutes avant l'ajout de DNPH et/ou de tampon de dénaturation (voir paragraphe Analyse des protéines).

2. Systèmes d'oxydation enzymatique

L'oxydation enzymatique de l'apo E est basée sur l'utilisation de la MPO qui produit des oxydants (HOCl, $OH^{\cdot}$) en présence de chlorure (en concentration physiologique) et de H_2O_2.

Nous avons utilisé ce système d'oxydation dans 2 conditions différentes de pH (pH 4,5 et pH 7,4).

2.1. Système d'oxydation à pH 4,5

2.1.1. Principe

La MPO (Calbiochem) en présence de H_2O_2 et de Cl^- produit de l'acide hypochlorique (HOCl) puis des radicaux hydroxyle selon la réaction :

$$MPO + H_2O_2 + Cl^- \text{--------} > HOCl + OH^- \quad (1)$$

$$HOCl + O_2^{\cdot -} \text{----------} > \mathbf{OH^\cdot} + Cl^- + O_2$$

2.1.2. Protocole

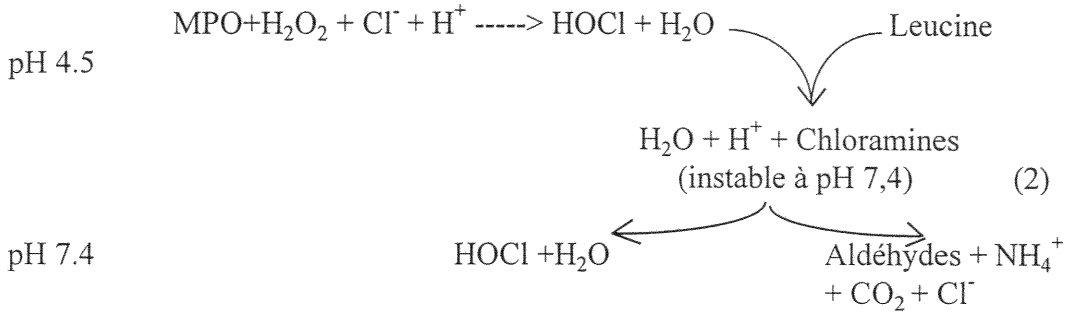
L'apo E est incubée en présence de MPO (10 µg/ml) dans le tampon citrate pH 4,5 (Acide citrique 50 mM, NaCl 100 mM) (Drozdz et Naskalski, 1988). La réaction d'oxydation est initiée par l'ajout d'H_2O_2 à des concentrations variables (dilution au 1/10, concentrations finales: 0 ; 0,025 ; 0,05 ; 0,16 ; 0,3 ; 0,5 et 0,8 mM). L'incubation est réalisée à température ambiante pendant 30 minutes. Un volume égal de DNPH et/ou de tampon de dénaturation est ajouté à l'incubation pour l'analyse des protéines en électrophorèse.

2.2. Système d'oxydation à pH 7,4

2.2.1. Principe

A pH 4,5, la MPO en présence de H_2O_2, Cl^- et d'un acide aminé, ici la leucine, catalyse la formation de chloramines. A pH 7,4, celles-ci sont instables et se dissocient à nouveau en HOCl d'une part, et aldéhydes plus ammoniac d'autre part (réaction 2). L'oxydation est alors médiée par HOCl, oxydant puissant qui peut donner naissance à des radicaux

hydroxyle selon la réaction 1. La formation d'adduits sur les protéines peut également avoir lieu dans ce système, par l'intermédiaire des aldéhydes.



2.2.2. Protocole

L'oxydation de l'apo E par la MPO à pH 7,4 se fait en 2 étapes selon la méthode adaptée de Zcliczynski et al. (1971) : formation des chloramines à pH 4,5 puis oxydation de l'apo E à pH 7,4.

La MPO (10 µg/ml final) est incubée pendant 7 minutes à température ambiante dans un tampon leucine pH 4,5 (NaH_2PO_4 55 mM, NaCl 100 mM, Leucine 10 mM) en présence de différentes concentrations d'H_2O_2 (0 ; 0,125 ; 0,8 ; 1,5 ; 2,5 ; 4 mM)

Les chloramines formées sont alors ajoutées à l'apo E diluée dans le tampon Tris pH 7,4 selon un rapport (v/v) solution oxydante/apo E de 1/5.

L'apo E est alors incubée pendant 30 minutes à température ambiante en présence de concentrations finales en oxydant de 0 ; 0,025 ; 0,16 ; 0,3 ; 0,5 ou 0,8 mM. De même que précédemment, un volume égal de DNPH ou de tampon de dénaturation est ajouté à l'incubation pour l'analyse des protéines en électrophorèse.

III. Incubation en présence de substances antioxydantes

L'apo E est incubée avec différentes substances antioxydantes (dilution au 1/5 dans un volume d'incubation final de 5 µl) avant l'ajout d'un des systèmes oxydants à pH 4,5 ou 7,4.

L'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba* (Ipsen) est dissout dans le tampon Tris pH 7,4 de façon à atteindre des concentrations finales variant de 100 à 600 µg/ml.

Le GSH (Sigma) est dissout dans l'eau pour obtenir des concentrations finales de 10 µM à 1 mM.

Le probucol (Sigma) et l'α-tocophérol (Sigma) sont dissous dans l'éthanol pour atteindre des concentrations finales variant de 0,5 à 10 mM et de 20 à 100 µM, respectivement.

IV. Analyse des protéines

L'étude de l'oxydation des isoformes de l'apo E est suivie par électrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes suivie d'une coloration du gel au bleu de Coomassie ou d'un transfert pour immunorévélation avec différents anticorps.

1. Electrophorèse

La technique d'électrophorèse est basée sur une méthode de séparation des protéines décrite par Laemmli (1970). Cette séparation des protéines se fait selon leur taille dans un gel de polyacrylamide. D'une manière générale, nous avons réalisé des électrophorèses discontinues en condition dénaturante, c'est-à-dire en présence de dodecyl sulfate de

sodium (SDS, AnalaR), à 12 % d'acrylamide pour le gel de séparation et 5 % pour le gel de concentration.

Les échantillons sont déposés dans les puits du gel de concentration après y avoir ajouté la moitié de leur volume de tampon de dénaturation et les avoir dénaturés 5 minutes à 100°C.

1.1. Compositions des gels et tampons

Gel de concentration (5%)		Gel de séparation (12%)	
H_2O	3,4 ml	H_2O	3,3 ml
Acrylamide/bisacrylamide 29,2 %/0,8 %	850 µl	Acrylamide/bisacrylamide 29,2 %/0,8 %	4 ml
Tris-HCl 0,5M (pH 6,8)	625 µl	Tris-HCl 1,5M (pH 8,8)	2,5 ml
SDS 10%	50 µl	SDS 10 %	100 µl
Persulfate d'ammonium 10 %	50 µl	Persulfate d'ammonium 10 %	100 µl
Temed	5 µl	Temed	4 µl

Tampon de dénaturation

Les solutions sont préparées dans le tampon Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8).

Bleu de bromophénol (0.1 %)	10 ml
Saccharose (40 %)	10 ml
SDS (20 %)	20 ml

Aliquoter et conserver à -20 °C.

1.2. Conditions de migration

La migration s'effectue dans un système Novex (Polylabo) avec un voltage compris entre 120 et 180 V pendant 1h30 à 2h dans le tampon d'électrophorèse (Glycine 190 mM, Tris-HCl 25 mM, SDS 0,1 %).

Après migration, le gel est coloré au bleu de Coomassie pendant 1 heure puis décoloré dans une solution eau/éthanol/acide acétique (80/10/10) ou transféré sur une membrane PVDF (Polyvinyl difluoride, Millipore ou Amersham) pour immunorévélation.

2. Transfert et immunorévélation

2.1. Protocole

Après migration, les protéines contenues dans le gel d'acrylamide sont transférées sur une membrane PVDF. Le transfert est réalisé avec un appareillage Novex en milieu liquide dans le tampon de transfert (Tris-HCl 48 mM, Glycine 39 mM, SDS 1,3 mM, Méthanol 20 %) pendant 1h30 sous une tension constante de 30 V.

Il est impératif de tremper la membrane PVDF dans le méthanol avant utilisation pour la rendre hydrophile. A la fin du transfert, la membrane est colorée au Rouge Ponceau (Acide trichloroacétique 3 %, Rouge Ponceau S (Sigma) 0,2 %) puis décolorée au méthanol.

Les protéines fixées sur la membrane sont détectées par une méthode de révélation dite en "sandwich". Un premier anticorps spécifique se fixe sur l'antigène, que sont les protéines recherchées, puis un anticorps secondaire marqué à la peroxydase du Raifort (HRP) se fixe sur le premier anticorps.

Les anticorps sont dilués dans la solution de TBST (Tris-HCl (pH 7.6) 20 mM, NaCl 137 mM, Tween 20 0,1 %)

Le schéma d'immunorévélation est le suivant : la membrane est incubée dans les différentes solutions sous agitation douce à température ambiante.

- Rouge Ponceau
- Méthanol
- Lavage TBST
- Solution de saturation pendant 1 heure : SAB ou lait à 5% dans le TBST
- Lavage TBST
- Incubation avec le premier anticorps spécifique pour la nuit
- Lavages TBST pendant 1h30
- Incubation avec l'anticorps secondaire marqué à la HRP pendant 1 heure
- Lavages TBST pendant 1h30.

La révélation se fait par chimiluminescence (ECL, Pierce). La peroxydase, en présence de son substrat, le luminol, émet de la lumière qui impressionne un film Hyperfilm ECL (Amersham).

2.2. Immunorévélation

Nous avons employé plusieurs anticorps selon l'antigène à révéler.

2.2.1. Détection des groupements carbonyles

2.2.1.1. Principe

L'oxydation de l'apo E est suivie par la formation des groupements carbonyle (C=O) détectés par dérivation par la dinitrophényle hydrazine (DNPH). Cette technique permet de déterminer immunologiquement l'oxydation des protéines par révélation des groupements carbonyles après formation d'hydrazones entre ces derniers et la DNPH (Keller et al., 1993).

Après séparation des protéines par électrophorèse et transfert, les anticorps anti-DNP reconnaissent la partie dinitrophényl des hydrazones formées et donc, indirectement, les groupements carbonyle (Figure 23).

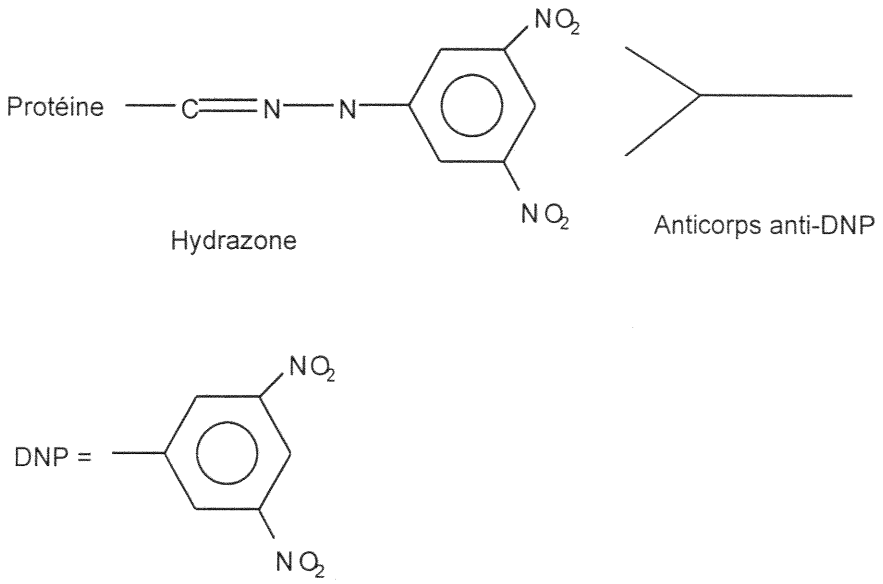


Figure 23 : Principe de révélation par les anticorps anti-DNP.

2.2.1.2. Protocole

Les protéines oxydées sont incubées 1 heure à l'obscurité en présence d'un volume égal de DNPH (Fluka) à 0,5 mM dans un tampon phosphate 0,1 M pH 6,3 (KH_2PO_4 1,05 g, K_2HPO_4 0,395 g). Les échantillons sont agités toutes les 15 minutes. A la fin de cette réaction, les échantillons sont dénaturés avec le tampon de dénaturation.

Après électrophorèse et transfert, les protéines oxydées sont révélées par des anticorps anti-DNP (Sigma) produits chez le lapin (dilution de 1/1000).

L'anticorps secondaire anti-lapin marqué à la HRP (Sigma) est dilué au 1/10 000.

2.2.2. Détection de l'apo E

Pour une révélation spécifique de l'apo E, le tampon de dénaturation est ajouté directement aux échantillons oxydés selon un rapport (v/v) 1/3.

Après électrophorèse et transfert, l'apo E est révélée par des anticorps anti-apo E polyclonaux (Euromedex) produits chez le mouton à une dilution de 1/5000.

L'anticorps secondaire anti-mouton marqué à la HRP (Sigma) est dilué au 1/10 000.

Nous avons également utilisé des anticorps anti-apo E monoclonaux (fournis par le Dr. Y. Marcel, Canada) dilués au 1/10 000. Ces anticorps reconnaissent 3 régions différentes de la séquence d'apo E : l'anticorps 7C9 reconnait l'épitope situé entre les acides aminés 1 à 13 de la région N-terminale, l'anticorps 1D7 l'épitope 140 à 150, et l'anticorps 3H1 l'épitope 243 à 273 de la région C-terminale. Ces 3 anticorps sont employés séparément ou en combinaison.

L'anticorps secondaire anti-souris marqué à la HRP (Sigma) est dilué au 1/10 000.

2.2.3. Détection de la myéloperoxydase

Après électrophorèse et transfert d'échantillons de LCR et d'homogénats de cerveau humain, obtenus par une technique de préparation décrite par Ghersi-Egea et al. (1993), la MPO est détectée par des anticorps anti-MPO (Calbiochem) produits chez le lapin, dilué au 1/1000. L'anticorps secondaire anti-lapin marqué à la HRP (Sigma) est dilué au 1/3000 dans le TBST.

V. Préparation de complexes lipoprotéiques

1. Principe

Les phospholipides (PL) sont dispersés dans le tampon I additionné de cholate de sodium, puis incubés avec les protéines. Les disques lipidiques se forment spontanément et sont isolés du détergent par adsorption. Ces complexes lipoprotéiques sont alors séparés des protéines libres et des PL libres par chromatographie d'exclusion ou filtration sur gel. Le phospholipide utilisé pour nos expériences est le dipalmitoyl phosphatidyl-choline (DPPC), classiquement utilisé pour les préparations de lipoprotéines modèles.

2. Protocole

Tampon I		Cholate de sodium	
Tris-HCl	50 mM	Dans le tampon I	
NaCl	150 mM	Acide cholique (Na)	50 mM
NaN_3	0,02 %		
EDTA	0,1 M		

Filtrer sur filtre HA 0,45 µM et dégazer.

Le DPPC, à une concentration de 6 mg/ml, est dispersé dans le tampon I contenant du cholate de sodium (Sigma) à 7,5 mM final. Ce PL est incubé avec les 3 isoformes d'apo E selon un rapport protéine/DPPC (p/p) de 1/3 et la concentration de détergent de l'incubation est amenée à 6 mM avec le tampon I. Après une nuit d'incubation à 37°C, la concentration en cholate est ramenée à 2,5 mM avec du tampon I. Les complexes apo E-

DPPC formés spontanément sont alors isolés par adsorption du cholate par des granules adsorbant les détergents (Bio Beads, Biorad).

Après 2 incubations de 3 heures à 37°C avec 50 mg/ml de Bio Beads sous rotation, le surnageant contenant les complexes est prélevé et conservé à 4°C.

Les complexes apo E-DPPC sont séparés des apo E libres et des PL libres par filtration sur gel sur une colonne Sephacryl HR 300 (16/70, Pharmacia). Ces complexes sont détectés par leur contenu protéique à 280 nm dans les fractions n°2 à 10. L'éluat correspondant au pic d'élution des complexes est collecté puis concentré par ultrafiltration sur Centriplus 100 (Amicon). Le contenu lipidique des complexes apo E-DPPC est mesuré par dosage enzymatique colorimétrique (coffret Boehringer Mannheim, MRP 2 691 844) et le contenu protéique est mesuré par lecture de l'absorbance à 280 nm.

VI. Analyse par chromatographie liquide haute performance en phase inverse

1. Principe

La chromatographie liquide haute performance en phase inverse (CLHP-PI) permet l'analyse des peptides et des protéines. La séparation des protéines se fait selon leur différence d'hydrophobicité, leur polarité et leur conformation. Ces paramètres déterminent l'interaction des protéines avec la phase stationnaire et leur élution par la phase mobile constituée d'un mélange eau/solvant organique souvent l'acétonitrile, en augmentant la concentration de la phase organique.

2. Protocole

20 µg d'apo E oxydée ou non sont injectées sur une colonne Vydac RP-C-4 (5µ, 300 Å de diamètre de pore, 4,6x15 mm, Vydac), sous un gradient eau (A)/acétonitrile (B) additionnés d'acide trifluoroacétique (TFA) avec un débit de 1 ml/min. La phase mobile (A) est constituée de 0,1 % de TFA (Sigma) dans l'eau et la phase mobile (B) de 0,085 % de TFA dans l'acétonitrile (BDH). Le gradient s'étale de 20 à 40 % de B pendant 10 minutes, puis de 40 à 60 % pendant 30 minutes avec un système de pompe 422 (Kontron). La détection se fait à 220 nm avec un spectrophotomètre Waters (Lambda Mae 480).

VII. Mesure de la fibrillation d'Aβ

1. Principe

La fibrillation d'Aβ est suivie par mesure de la fluorescence de la thioflavine T (thT ; Naiki et al., 1989 ; Wisniewski et al., 1994). La thT est un marqueur fluorescent s'intercalant dans les fibrilles d'Aβ. La thT est caractérisée par une fluorescence d'excitation (λex) à 350 nm et par une fluorescence d'émission (λem) à 438 nm. Lorsque la thT est intercalée dans les fibrilles, elle fluoresce avec un maximum d'excitation à 450 nm et un maximum d'émission à 482 nm. L'augmentation de la fluorescence à λex=450 nm reflète la formation de fibrilles d'Aβ.

2. Protocole

Le peptide $A\beta_{1-40}$ (Bachem) est pesé, aliquoté et conservé à -20 °C. Il est dilué dans l'eau au moment de l'expérience. $A\beta_{1-40}$ est incubé seul ou en présence d'apo E jusqu'à 48 heures, selon le rapport molaire apo E/Aβ de 1/100, à 20°C, l'apo E étant en solution dans le tampon bicarbonate.

Nous avons adapté le protocole initial sur microplaque. 7,5 µl d'échantillon sont alors ajoutés à 200 µl de thT 2 µM (Sigma) dans le tampon Glycine 50 mM (pH 9,0). Après 5 minutes d'incubation, la fluorescence est mesurée à λex = 440/20 nm et λem = 480/20 nm avec un spectrofluorimètre Cytofluor 2300 (Pharmacia).

VIII. Autres méthodes

1. Incubation en présence d'un excès d'acides aminés spécifiques

L'apo E est incubée en présence d'un excès de méthionine, tryptophane ou de tyrosine (Sigma) avant l'ajout du système oxydant.

La quantité d'acides aminés supplémentaire est calculée en fonction du nombre de résidus méthionine (12), tryptophane (7) et tyrosine (12) présents dans le séquence de l'apo E recombinante. Ces acides aminés sont ajoutés avec un rapport molaire acide aminé de l'apo E/acide aminé supplémentaire de 1/1 et de 1/5 soit pour la méthionine et la tyrosine 0,13 mM (1/1) et 0,65 mM (1/5) et pour le tryptophane 0,075 mM (1/1) et 0,38 mM (1/5).

2. Hydrolyses enzymatiques

2.1. Par l'entérokinase

L'entérokinase est une protéase dont le site de coupure se situe après un résidu lysine précédé de 2 à 4 résidus aspartate, [$(Asp)_4$↓Lys-X]. Cette hydrolyse coupe 83 % du peptide de fusion de l'apo E recombinante.

20 µg d'apo E sont incubés avec une unité d'entérokinase (Invitrogen) dans le tampon II (Tris-HCl (pH 8.0) 50 mM, $CaCl_2$ 1 mM, Tween 20 0,1 %, β-mercaptoéthanol 1 M) pendant 12 heures à température ambiante. La réaction est stoppée en plaçant l'échantillon dans la glace. Le peptide de fusion ainsi que le β-mercaptoéthanol sont éliminés par ultrafiltration et 2 lavages du rétentat contenant l'apo E par du tampon Tris pH 7,4 sur Centricon 30 (Amicon).

2.2. Par la thrombine

L'apo E possède une zone sensible à la coupure par la thrombine située dans la région non organisée entre les acides aminés 192 à 215.

Cette coupure après les résidus arginine donne naissance à 2 fragments de poids moléculaires apparents de 30, 10 kDa pour l'apo E recombinante.

20 µg d'apo E sont incubés en présence de thrombine (120 U/mg ; Boehringer Mannheim) avec un rapport protéine/enzyme de 50/1 (p/p) dans le tampon NH_4HCO_3 0,1 M pendant 24 heures à température ambiante. La réaction est stoppée en plaçant l'échantillon dans la glace.

3. Fractionnement subcellulaire

Des échantillons de cerveaux humains congelés ont été obtenus de la Kathleen Price Bryan Bank de l'Université de Duke (Durham, NC, EU). Trois régions cérébrales, le cortex, l'hippocampe et le cervelet ont été prélevées sur 13 patients confirmés Alzheimer après autopsie et 12 patients neurologiquement sains, excepté pour 6 cas pour lesquels l'hippocampe n'était pas disponible (Tableau IV)

Tableau IV : Caractéristiques des échantillons cérébraux humains de l'étude

N°	Age	Sexe	Génotype	Delai post-mortem (en heure)	Diagnostic
1	85	M	3/3	2	témoin
2	72	M	3/3	4,25	témoin
3	86	F	3/3	18	témoin
4	72	M	2/3	18	Alzheimer
5	75	M	3/3	19	témoin
6	77	M	3/3	2,75	témoin
7	85	F	3/3	15,75	témoin
8	86	M	3/3	18,5	témoin
9	61	F	3/4	4,25	Alzheimer
10	88	M	3/3	1,25	Alzheimer
11	102	F	3/3	3,75	Alzheimer
12	77	M	2/2	1,25	témoin
13	102	F	2/3	5	témoin
14	60	F	3/4	0,25	Alzheimer
15	83	F	3/3	3,75	Alzheimer
16	88	F	3/4	2,75	Alzheimer
17	71	M	4/4	2,75	Alzheimer
18	72	F	3/3	3,75	Alzheimer
19	87	F	4/4	2,5	Alzheimer
20	82	M	3/3	3,25	témoin
21	72	F	3/4	3	témoin
22	76	F	4/4	3,5	Alzheimer
23	60	M	2/3	5,75	Alzheimer
24	70	M	2/3	3;5	Alzheimer
25	67	M	3/4	3	Alzheimer

Après décongélation de chaque échantillons, les leptoméninges, les capillaires sanguins superficiels et la matière blanche sont retirés. Les échantillons sont alors homogénéisés manuellement avec un homogénéiseur en verre de type Dounce dans 3 volumes de tampon d'isolation (Saccharose 0,32 M, Tris 10 mM pH 7,4).

Les fractions cytosoliques et microsomales sont préparées par ultracentrifugation différentielle décrite par Ghersi-Egea et al. (1993) selon la figure 24.

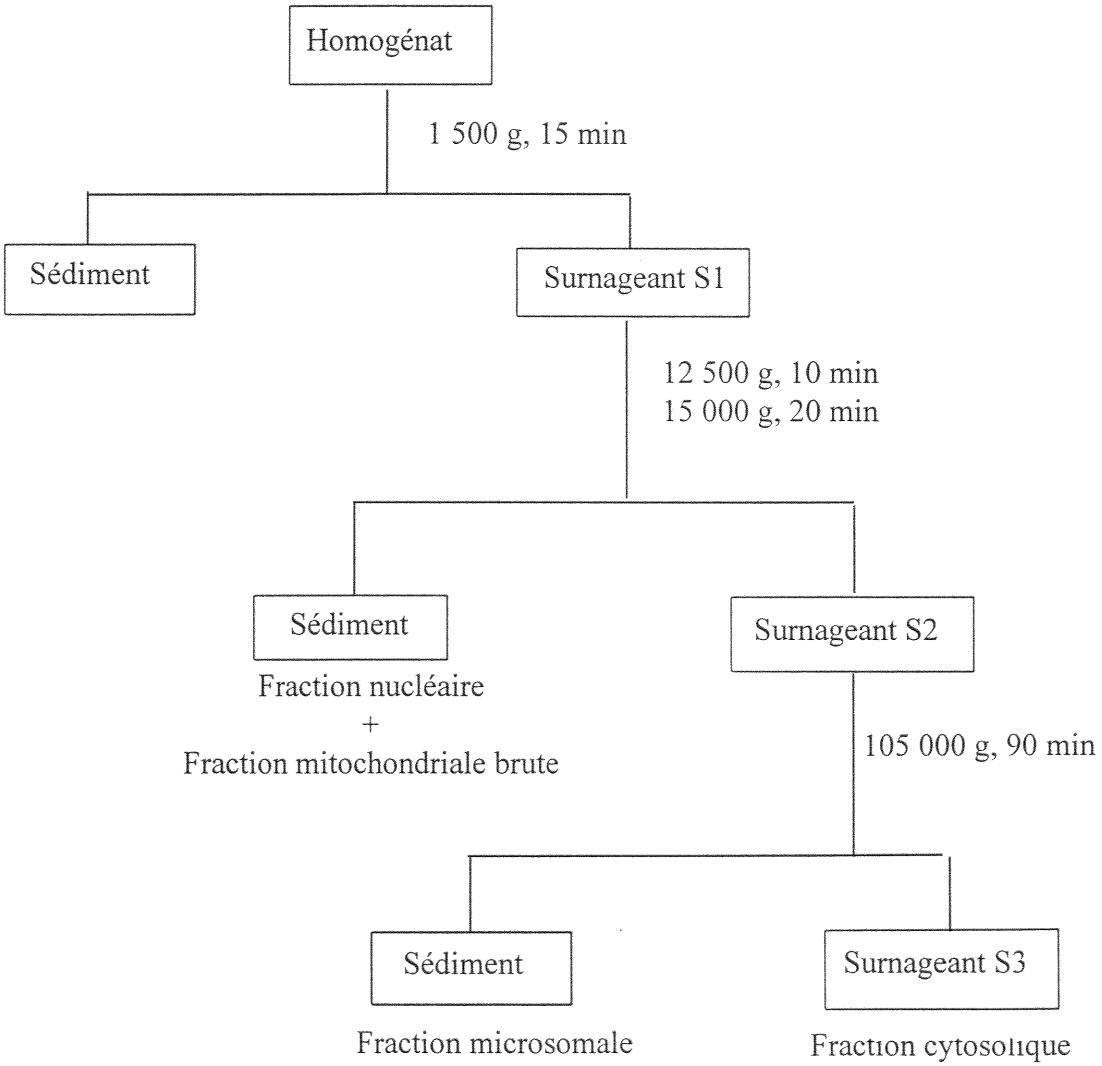


Figure 24 : Représentation shématique de la technique d'ultracentrifugation différentielle utilisée pour le fractionnement subcellulaire.

4. Mesure de l'activité GST

L'activité des GST est mesurée selon une méthode adaptée de Habig et al. (1974), sur la fraction cytosolique obtenues précédemment, en présence de 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) et de GSH en concentration équivalente. L'absorption du dinitrobenzoate libéré au cours de la réaction est suivie à 340 nm. L'échantillon prélevé sur la fraction soluble (20 µl) est incubé à 25°C pendant 30 secondes dans le tampon PBS-EDTA 1 mM pH 7,4 (940 µl), en présence de 50 mM de GSH dissout dans une solution d'acide métaphosphorique 0,1 %, EDTA 1 mM (20 µl). Puis, la réaction est initiée par l'ajout de 20 µl de CDNB à 50 mM dans l'éthanol absolu.

Le dosage est réalisé sur un spectrophotomètre Uvikon 860 (Kontron).

L'activité enzymatique des GST est exprimée en unité par litre, une unité correpondant à la quantité d'enzyme libérant 1 µmole de chromophore par minute à 25°C.

Cette activité est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Activité GST (U/l)} = 1000 \ \frac{(\Delta A/\text{min}) \times d \times Vt}{\varepsilon \times t \times Ve}$$

où d = facteur de dilution ; Vt = volume de la cuve (1 ml) ; Ve = volume de l'échantillon (20 µl) ; ε = coefficient d'extinction molaire (9,6 $mM^{-1}.cm^{-1}$) ; t = trajet optique (1 cm).

5. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées par la méthode usuelle de Lowry et al. (1951) en utilisant la SAB comme standard ou par mesure de l'absorbance à 280 nm. La loi de Beer-Lambert est alors appliquée avec un coefficient d'extinction molaire de $1{,}24.10^3$ $g^{-1}.cm^2$ pour l'apo E (Zorich et al., 1985).

RESULTATS

I. Publication n°1 :

Apolipoprotein E is highly susceptible to oxidation by myeloperoxidase, an enzyme present in brain. (1996)
Neurosci. Lett., 210, 61-64

Toutes les protéines ne présentent pas la même sensibilité à l'oxydation. Dans un premier temps, nous avons étudié les conséquences de l'oxydation de l'apo E recombinante par détection des groupements carbonyle par les anticorps anti-DNP puis en suivant les modifications de son profil électrophorétique après immunorévélation par les anticorps anti-apo E. Pour cela, nous avons mis au point 2 modèles d'oxydation *in vitro,* l'un chimique et l'autre basé sur une réaction enzymatique avec la MPO, après avoir localisé cette enzyme dans le cerveau humain (Publication n°1).

Dans le système chimique d'oxydation, le vanadium est utilisé comme métal de transition pour la formation de radical hydroxyle selon la réaction de Fenton, en présence de H_2O_2. Par rapport aux formes non oxydées, l'apo E3 et l'apo E4 oxydées par le système chimique présentent un profil différent qui varie en fonction des concentrations croissantes en ion vanadyle (Figure 25, et Leininger-Muller et al., 1996). En effet, après révélation avec les anticorps anti-DNP, l'intensité de la bande majeure correspondant à l'apo E augmente parallèlement à l'augmentation de la concentration en ion vanadyle. De plus, cette bande majeure est déplacée vers les hauts poids moléculaires. Cette variation de poids moléculaire est d'autant plus importante que la concentration en oxydant est élevée. Outre les variations de poids moléculaire, pour les concentrations maximales en ion vanadyle (supérieures à 400 µM), l'oxydation de l'apo E s'accompagne vraisemblablement d'une

polymérisation de l'apo E et/ou de fragments de l'apo E qui conduit à des bandes d'environ 84 kDa dont l'intensité s'accroît pour des concentrations en ion vanadyle de 800 et 1000 µM (Figure 25).

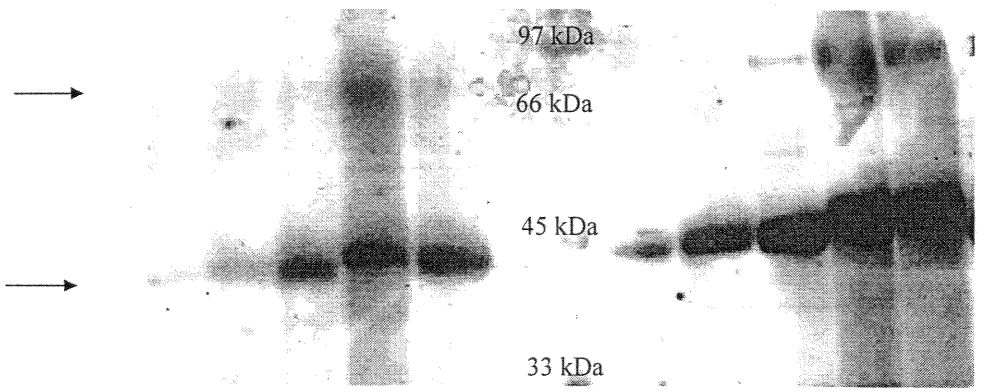


Figure 25: Oxydation de l'apo E3 et de l'apo E4 par le système chimique vanadyle/H_2O_2.

L'oxydation des apo E3 et E4 semble donc conduire à la formation de groupements carbonyle (augmentation de l'intensité des bandes après révélation avec les anticorps anti-DNP), à des modifications de mobilité électrophorétique (variation de poids moléculaire apparent) et à la formation de ponts disulfure et/ou bityrosine (produit de polymérisation). Ces modifications d'acides aminés aboutissent à des modifications de structure altérant la mobilité électrophorétique et conduisant, pour les conditions d'oxydation les plus fortes, à l'agrégation de l'apo E. L'intensité de la bande majeure d'apo E (44 kDa) ainsi que celle de la bande à 84 kDa est plus importante pour l'apo E4 que pour l'apo E3, suggérant une plus grande sensibilité de l'apo E4 à l'oxydation.

Pour étudier les conséquences de l'oxydation de l'apo E dans des situations se rapprochant des conditions physiologiques de production de RL, nous avons mis au point un système

d'oxydation enzymatique utilisant la MPO. Nous avons tout d'abord montré sa présence dans le cerveau humain. En effet, après immunorévélation par les anticorps anti-MPO, la protéine a été détectée dans des homogénats de cerveau humain et dans le LCR. Deux bandes ont été détectées : la première bande migre vers 120-137 kDa et correspond à la protéine native, la seconde, correspondant à la sous-unité lourde de la protéine, migre vers 55 kDa (Figure 1, publication n°1).

La MPO est une enzyme impliquée dans l'inflammation. Or, plusieurs travaux (Kisilevsky, 1994 ; Eikelenboom et al., 1994) ont montré l'implication des processus inflammatoires dans la formation des plaques séniles caractéristiques de la MA. La présence de la MPO dans le cerveau suggère donc un rôle de cette enzyme dans les processus biochimiques conduisant à la formation des dépôts amyloïdes.

L'oxydation de l'apo E par le système de la MPO représente donc un système cohérent pouvant prendre place dans le cerveau.

L'oxydation des apo E recombinantes est réalisée au pH optimal de la MPO, soit pH 4,5, avec des concentrations variables en H_2O_2. Dans ces conditions d'oxydation différente de l'oxydation chimique par les espèces oxydantes mises en jeu, l'apo E3 et l'apo E4 subissent des modifications variant en fonction des concentrations croissantes en H_2O_2 (Figure 2, publication n°1). En présence de concentrations faibles en H_2O_2 (0,05 et 0,16 mM), la bande majeure d'apo E est déplacée vers les hauts poids moléculaires alors que de nouvelles bandes apparaissent dans les zones de faibles poids moléculaires (20-21 kDa) correspondant vraisemblablement à des produits de dégradation. Lorsque la concentration en H_2O_2 atteint 0,5 et 0,8 mM, des produits d'oxydation de l'apo E de poids moléculaires

variant de 20 à 84 kDa sont formés. Les bandes détectées dans la zone de haut poids moléculaire pourraient correspondre à une polymérisation aléatoire des fragments issus de l'oxydation de l'apo E. De même, Drozdz et Naskalski (1988) ont montré la polymérisation d'une autre protéine, le lysozyme, après oxydation par le système $MPO/H_2O_2/Cl^-$. Cette polymérisation pourrait être le résultat de la formation de liaisons inter et intraprotéine par l'intermédiaire de bityrosine comme Heinecke et al. (1993) l'ont montré dans le cas de l'oxydation de l'albumine par la MPO.

Ces modifications ne sont observées qu'en présence du sytème $MPO/H_2O_2/Cl^-$ complet. En effet, en absence de MPO, le profil électrophorétique de l'apo E reste inchangé pour les concentrations en H_2O_2 utilisées. De même, aucune variation n'est observée après incubation avec la MPO sans ajout de H_2O_2.

Lorsque la SAB, utilisée comme protéine de référence, est oxydée dans les mêmes conditions, elle ne présente aucune modification d'intensité ou de profil électrophorétique après SDS-PAGE et immunorévélation par les anticorps anti-DNP. L'apo E présente donc une plus grande sensibilité à l'oxydation par la MPO que la SAB.

Les résultats contenus dans cette première publication nous ont permis :

a) de mettre en évidence la présence de MPO dans le cerveau humain,

b) de montrer que l'oxydation de l'apo E par le système enzymatique $MPO/H_2O_2/Cl^-$ conduit à une fragmentation suivie d'une polymérisation de la protéine, consécutive à l'augmentation de la concentration en oxydant,

c) de montrer que l'apo E est plus sensible à l'oxydation que la SAB, dont le profil électrophorétique reste inchangé.

ELSEVIER

Neuroscience Letters 210 (1996) 61–64

NEUROSCIENCE LETTERS

Apolipoprotein E is highly susceptible to oxidation by myeloperoxidase, an enzyme present in the brain

C. Jolivalt[a], B. Leininger-Muller[a], R. Drozdz[c], J.W. Naskalski[c], G. Siest[a,b,*]

[a]*URA CNRS 597, Centre du médicament, 30 rue Lionnois, 54000 Nancy, France*
[b]*Centre de Médecine Préventive, 2 rue du Doyen Jacques Parisot, 54500 Vandoeuvre, France*
[c]*Uniwersytet Jagiellonski, Collegium Medicum, Katedra Biochemii Klinicznej, 31-501Krakow, Poland*

Received 15 February 1996; revised version received 22 April 1996; accepted 23 April 1996

Abstract

Apolipoprotein E, the most common apolipoprotein found in the brain, is linked to several pathologies like Alzheimer's disease. Apolipoprotein E directly binds to β-amyloid with a strong affinity. Myeloperoxidase, a protein secreted by neutrophils and involved in the inflammatory process, is also present in the brain. In vitro myeloperoxidase oxidation of recombinant human apolipoprotein E leads to fragmentation of the protein with low concentrations of hydrogen peroxide and polymerization with higher concentrations. Comparison with bovine serum albumin shows a higher susceptibility of apolipoprotein E to myeloperoxidase oxidation, which may have importance in the Alzheimer's disease process.

Keywords: Apolipoprotein E; Oxidation; Alzheimer's disease; Myeloperoxydase; Human brain

Oxygen free radicals, superoxide ($O_2^{\cdot -}$) and the more reactive hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$), are inevitable byproducts of oxidative life [7] and their involvement in neurodegenerative disorders has been widely suggested.

The brain is particularly vulnerable to oxidative damage because it is rich in substrates highly susceptible to oxidation, like fatty acids and proteins. Moreover, it has a high rate of oxidative metabolism but contains low levels of antioxidant enzymes. Lipid peroxidation and its importance in brain aging are now well documented. In contrast, the list of papers related to the biological importance of protein oxidation has grown more recently. Protein oxidation in both normal aging and Alzheimer's disease (AD) brains has been reported [18]. Moreover, in two human diseases associated with premature aging, Werner syndrome and progeria, oxidized proteins increase at a much higher rate than normal [19].

In the case of AD, among the proteins which accumulate as amyloid deposits in the brain, β-amyloid protein (Aβ) and apolipoprotein E (apo E) are the most studied at present. The toxicity of Aβ toward neuronal cells is caused by oxidative damage which probably occurs through hydrogen peroxide (H_2O_2) accumulation resulting from the activation of a NADPH-linked oxidase similar to that found in neutrophils [1]. The free radicals produced have been shown to promote aggregation of Aβ itself [13]. Apo E is the major apolipoprotein in the nervous system where it is thought to maintain cholesterol homeostasis [13]. In the past 3 years, many reports have demonstrated that the ε4 allele is a major risk factor for the sporadic and familial late-onset AD [17]. Moreover, this apolipoprotein shows a strong affinity for Aβ, and this affinity seems to be isoform-dependent. Yet, if the relation with the oxidative process has been investigated for Aβ, nothing is known about the oxidation of apo E, except indirect evidence that it seems to have a higher affinity for Aβ when it is oxidized, as suggested by Strittmatter et al. [20] and by our preliminary data about oxidation of apo E with the vanadyl/H_2O_2 system [11].

The aim of this work was to investigate the consequences of the in vitro oxidation of apo E in the presence of myeloperoxidase (MPO). This polymorphonuclear neutrophil (PMN) MPO (H_2O_2-donor oxidoreductase, EC 1.11.1.7.) is a heme enzyme catalyzing oxidation of chloride to hypochlorite (HOCl) in the presence of H_2O_2 [4].

* Corresponding author. Tel.: +33 83 17 88 34; fax: +33 83 32 13 22; e-mail: siest@ctrmed.u-nancy.fr.

0304-3940/96/$12.00 © 1996 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved
PII: S0304-3940(96)12661-4

We assessed and confirmed the presence of this enzyme in human brain.

The recombinant apo E3 and E4 isoforms were produced in *Escherichia coli* BL21(DE3), and cDNA was cloned in modified pARHS-2. Purified recombinants were obtained after affinity chromatography on nickel gel. MPO used in this study was isolated from polymorphonuclear leukocytes of human chronic myelogenous leukemia as described by Naskalski [14].

Frozen human brain samples stemming from the Kathleen Bryan Price Brain Bank (Duke University, NC, USA) were gently disrupted with a manual, glass Dounce homogenizer in 0.32 M sucrose, 10 mM Tris–HCl, 0.5 mM K-EDTA (pH 7.4) buffer. Cerebrospinal fluid (CSF) samples were obtained by lumbar puncture. Proteins were measured by the method of Lowry et al. [12]. They were separated by sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis (SDS/PAGE) on a 12% gel and transferred to a polyvinyldifluoride (PVDF) membrane (Millipore). We determined the presence of MPO in brain using anti-MPO antibodies (Calbiochem), revealed by enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham) after incubation with horseradish peroxidase (HRP)-labelled anti-rabbit antibodies (Sigma) (diluted at 1:3000). Oxidation assays of purified apo E were performed at room temperature. Apo E3 and apo E4 (4 μg) were incubated separately with MPO (10 μg/ml) in 50 mM citrate buffer (pH 4.5), 100 mM NaCl [4]. The oxidation reaction was started by addition of H_2O_2 solution to final concentrations of 0, 0.05, 0.16, 0.29, 0.5 and 0.8 mM. Under the same experimental conditions, bovine serum albumin (BSA; Sigma) was used as a control protein.

The protein carbonyl content was measured by forming labelled protein hydrazone derivatives using 2,4-dinitrophenyl hydrazine (DNPH; Fluka). After 30 min incubation, proteins were derivatized with an equal volume of 0.5 mM DNPH in 0.1 M phosphate buffer (pH 6.3) for 1 h [9]. Proteins were separated by SDS/PAGE on a 12% gel (non-reducing conditions) and electrotransferred on PVDF membrane. The dinitrophenyl (DNP) moieties formed on apo E and BSA were revealed by ECL after incubation with rabbit anti-DNP antibodies (Sigma) (diluted at 1:1000) followed by incubation with HRP-labelled anti-rabbit antibodies (diluted at 1:3000). The same blots with apo E were revealed with mouse anti-apo E (kindly provided by Y. Marcel, Quebec, Canada) (diluted at 1:1000) coupled to HRP-labelled anti-mouse antibodies (Stabiligen, Nancy, France) (diluted at 1:3000).

According to the literature [15,16], the native MPO has a molecular weight of about 115–160 kDa. The immunoblot analysis of human brain MPO is shown Fig. 1. The antiserum to human MPO recognized MPO in both CSF and human brain homogenate with apparent molecular weights of 137 and 120 kDa, respectively, and a second band close to 55 kDa corresponding to the heavy

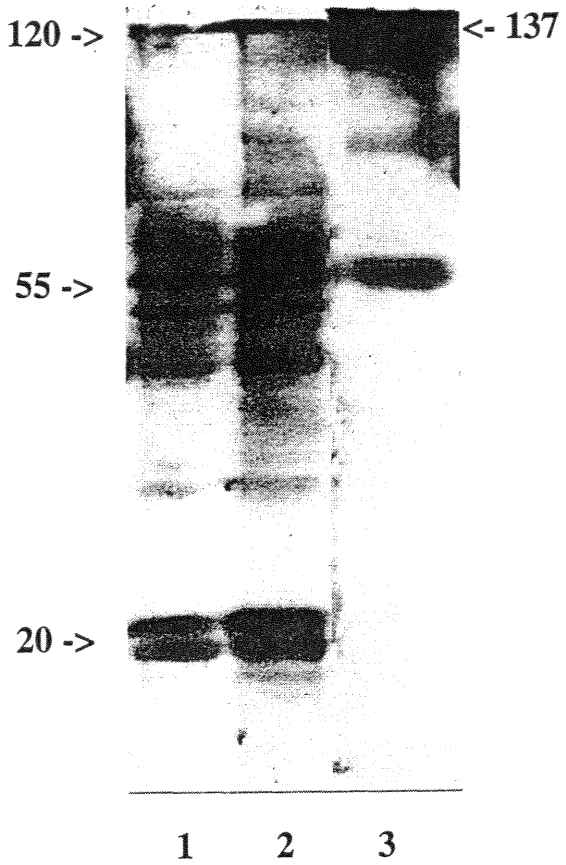


Fig. 1. Immunoblotting analysis of human brain homogenate and CSF using polyclonal anti-human MPO antibodies. Stacking and running gels were 5 and 12% acrylamide (w/v), respectively. Lanes 1 and 2, human brain homogenate (150 and 100 μg protein, respectively); lane 3, CSF (50 μg protein).

subunit of the protein [15]. An uncharacterized protein is visualized by an additional double band close to 20 kDa for human brain homogenate but not for CSF.

The formation of carbonyl groups after oxidation of apo E by the MPO system (MPO/H_2O_2/Cl^-), immunochemically detected with anti-DNP antibody, is shown in Fig. 2. Apo E4 undergoes oxidative modifications by the MPO system in several steps. At the first step of oxidation (H_2O_2 concentrations, 0.05 and 0.16 mM; H_2O_2/protein ratio, 4:1 and 12.8:1, respectively), the apo E-specific band shows a shift in molecular weight with simultaneous formation of 20–21 kDa low molecular weight degradation product. At 0.5 and 0.8 mM H_2O_2 concentrations (H_2O_2/protein ratio, 40:1 and 64:1, respectively), oxidized apo E derivatives with a wide range of molecular weights are formed, while the native form of apo E disappears. Excessive oxidation leads to high molecular weight polymerization products (84 kDa). The same modifications were observed with apo E3 (data not shown). As shown in Fig. 2, the staining intensity of aldehyde formed by oxidation increased with the H_2O_2 concentration.

Immunoblotting analysis of the same blots with a mix of three different monoclonal anti-apo E antibodies re-

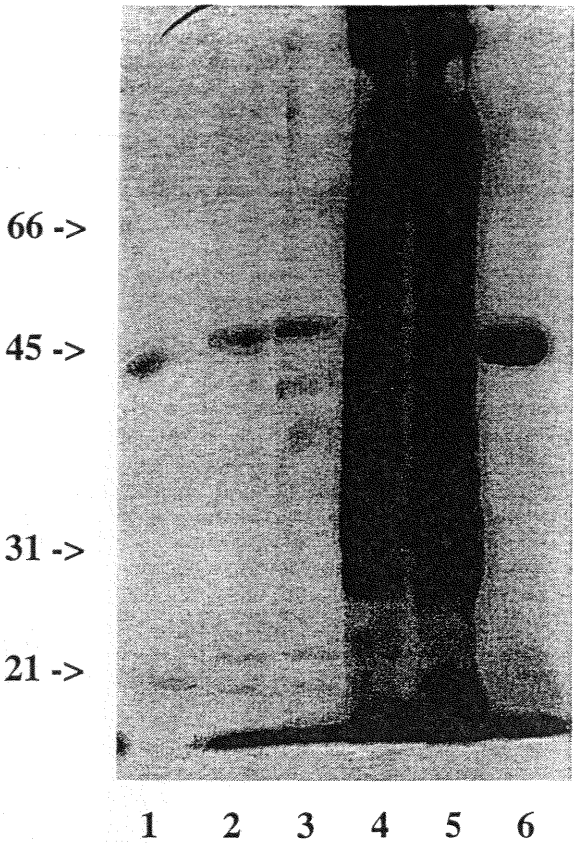


Fig. 2. Immunoblotting analysis of recombinant apo E after oxidation by the MPO/H_2O_2/Cl^- system using anti-DNP antibodies. Stacking and running gels were 5 and 12% acrylamide (w/v), respectively. Apo E4 (4 μg) was incubated with MPO (10 μg/ml) in 50 mM citrate buffer (pH 4.5), 100 mM NaCl and H_2O_2 at different final concentrations. Lane 1, no H_2O_2; lane 2, 0.05 mM H_2O_2; lane 3, 0.16 mM H_2O_2; lane 4, 0.5 mM H_2O_2; lane 5, 0.8 mM H_2O_2; lane 6, no MPO.

vealed the same bands, thus confirming that degradation and polymerization products are apo E derivatives.

For comparison, we performed oxidation of BSA under strictly the same conditions. The immunoblot profile observed is different from that obtained with apo E. Only bands of apparent molecular weight corresponding to BSA appear on the profile in Fig. 3.

To our knowledge, this is the first demonstration of the presence of MPO in human brain. The action of MPO occurs in inflammation reaction, and recent works point out the analogy between the mechanisms of inflammation and those governing the formation of amyloid deposits in AD brains [10]. Moreover, epidemiological studies have suggested that non-steroidal antiinflammatory drugs could protect patients from AD [2], and this effect is probably linked to their anti-reactive oxygen species property.

What is of interest is the demonstration of the high susceptibility of apo E to MPO oxidation. These oxidative modifications lead to a cleavage of the protein and then to polymerization products. For both apo E3 and apo E4 isoforms, when the concentration of oxidant was increased, the small fragments disappeared, and products appeared with higher molecular weights up to apparent dimers of apo E. However, products of high molecular weight are not necessarily dimers and may be a random set of fragments. Based on the similar analogy between inflammation and atherosclerosis, Cogny et al. [3] studied the impact of PMN degranulation and oxidation on high-density-lipoprotein (HDL) structure and showed a degradation of apo E present in HDL incubated with PMN. They concluded that the fragmentations observed were largely due to a proteolytic process and to a minor extent part to an oxidation process. We have shown that recombinant apo E degradation is due to oxidation through the MPO system, in the absence of protease.

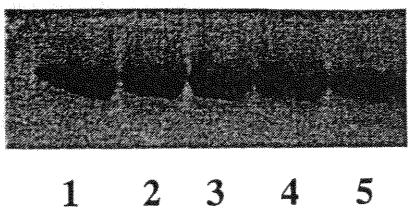


Fig. 3. Immunoblotting analysis of BSA after oxidation by the MPO/H_2O_2/Cl^- system using anti-DNP antibodies. Stacking and running gels were 5 and 12% acrylamide (w/v), respectively. Protein (4 μg) was incubated with MPO (10 μg/ml) in 50 mM citrate buffer (pH 4.5), 100 mM NaCl and H_2O_2 at different final concentrations. Lane 1, no H_2O_2; lane 2, 0.05 mM H_2O_2; lane 3, 0.16 mM H_2O_2; lane 4, 0.5 mM H_2O_2; lane 5, 0.8 mM H_2O_2.

Drozdz et al. showed a polymerization of egg lyzozyme after incubation with MPO but did not observe a cleavage of the protein prior to cross-linking [4]. The mechanism of cross-linking of apo E as a result of an excessive oxidation by MPO system is unclear. The observed high molecular weight fragments cannot result from the formation of a disulfide bridge because of the lack of cysteine in apo E4 [21]. Another possibility is the formation of bityrosine between two proteins, as first described by Gross and Sizer [6], and by Giulivi et al. [5] as a specific product of protein oxidation. The cross-linking of apo E by the formation of bityrosine is supported by the work of Heinecke et al. [8], who showed that MPO cross-links proteins by a mechanism involving a tyrosyl radical at physiological concentrations of chloride and amino acids.

When compared to apo E, BSA oxidized as a reference protein showed no fragmentation. Oxidative modifications of apo E may influence the binding of that apolipoprotein with Aβ and other proteins found in amyloid deposits. Moreover, it has been shown that the 10 kDa fragment of apo E could form amyloid-like fibrils [22], and it would be interesting to see if oxidative reactions are involved in the fibrillogenic property of that apo E domain. Functional studies of oxidized apo E binding with Aβ and investigations of cellular localization of MPO in the brain are underway.

This study was supported in part by a grant from Ipsen Foundation (Paris), P.I.R. (Pôle Interuniversitaire Régional, Recherche biologique médicale et santé) and the Région Lorraine. We acknowledge the Kathleen Bryan Price Brain Bank (Duke University, NC, USA) for providing autopsic brain samples, Prof. Y. Marcel (Quebec) for providing anti-apo E antibodies and Prof. C. Jeandel, (Service de Médecine B, CHU Nancy-Brabois, France) for providing CSF.

[1] Behl, C., Davis, J.B., Lesley, R. and Schubert, D. Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity, Cell, 77 (1994) 817–827.

[2] Breitner, J.C.S., Gau, B.A., Welsh, K.A., Plassman, B.L., McDonald, W.M., Helms, M.J. and Anthony, J.C., Inverse association of anti-inflammatory treatments and Alzheimer's disease, Neurology, 44 (1994) 227–232.

[3] Cogny, A., Paul, J.L., Atger, V., Soni, T. and Moatti, N. Structural changes of high-density-lipoprotein apolipoproteins following incubation with human polymorphonuclear cells, Eur. J. Biochem., 222 (1994) 965–973.

[4] Drozdz, R. and Naskalski, J.W., Action of myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system on the egg white lysozyme, Acta Biochim. Pol., 35 (1988) 277–286.

[5] Giulivi, C. and Davies, K.J.A., Dityrosine and tyrosine oxidation products are endogenous markers for the selective proteolysis of oxidatively modified red blood cell hemoglobin by (the 19 s) proteasome, J. Biol. Chem., 268 (1993) 8752–8759.

[6] Gross, A.J. and Sizer, I.W., The oxidation of tyramine, tyrosine and related compounds by peroxidase, J. Biol. Chem., 234 (1959) 1611–1614.

[7] Halliwell, B. and Gutteridge, J.M., Free Radicals in Biology and Medicine, Clarendon Press, Oxford, 1987.

[8] Heinecke, J.W., Li, W., Francis, G.A. and Golstein, J.A. Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase catalyzes the oxidative cross-linking of proteins, J. Clin. Invest., 91 (1993) 2866–2872.

[9] Keller, R.J., Halmes, N.C., Hinson, J.A. and Pumford, N.R., Immunochemical detection of oxidized proteins, Chem. Res. Toxicol., 6 (1993) 430–433.

[10] Kisilevsky, R., Inflammation-associated amyloidogenesis, Mol. Neurobiol., 8 (1993) 65–66.

[11] Leininger-Muller, B., Jolivalt, C., Pillot, T., Lagrange, P., Livertoux, M.H., Grassiot, M.C., Minn, A. and Siest, G., Apolipoprotein E oxidation and functional consequences. In A.D. Roses, K.H. Weisgraber and Y. Christen (Eds.), Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease, Springer-Verlag, Berlin, 1996, in press.

[12] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent, 193 (1951) 265–275.

[13] Mattson, M.P., Free radicals and disruption of neuronal ion homeostasis in AD: a role for amyloid β-peptide, Neurol. Aging, 16 (1995) 679–682.

[14] Naskalski, J.W., Simple procedure of isolation of myeloperoxidase from leukocytes, pus and bone marrow cells, Acta Med. Pol., 21 (1980) 129–137.

[15] Nauseef, W.M., Olsson, I. and Arnljots, K. Biosynthesis and processing of myeloperoxidase a marker for myeloid cell differentiation, Eur. J. Haematol., 110 (1987) 97–110..

[16] Pember, S.O., Shapira, R. and Kinkade, J.M., Multiple forms of myeloperoxidase from human neutrophilic granulocytes: evidences for differences in compartmentalization, enzymatic activity and subunit structure, Arch. Biochem. Biophys., 221 (1983) 391–403.

[17] Siest, G., Pillot, T., Regis-Bailly, A., Leininger-Muller, B., Steinmetz, J., Galteau, M.M. and Visvikis, S., Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine, Clin. Chem., 41 (1995) 1068–1086.

[18] Smith, C.D., Carney, J.M., Starke-Reed, P.E., Oliver, C.N., Stadtman, E.R., Floyd, R.A. and Markesbery, W.R., Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer's disease, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88 (1991) 10540–10543.

[19] Stadtman, E.R., Protein oxidation and aging, Science, 257 (1992) 1220–1224.

[20] Strittmatter, W.J., Weisgraber, K.H., Huang, D.Y., Dong, L., Salvesen, G.S., Pericack-Vance, M., Schmelchel, D., Saunders, A.M., Golgaber, D. and Roses, A.D., Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid β peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer diseases, Proc. Natl. Sci. Acad. USA, 90 (1993) 8098–8102.

[21] Weisgraber, K.H., Apolipoprotein E: structure-function relationships, Adv. Prot. Chem., 45 (1994) 163–171.

[22] Wisniewski, T., Lalowski, M., Golabek, A., Vogel, T. and Frangione, B., Is Alzheimer's disease an apolipoprotein E amyloidosis? Lancet, 345 (1995) 956–958.

II. Publication n°2:

Human apolipoprotein E isoforms are differentially oxidized by myeloperoxidase, a process which modulates apolipoprotein E interaction with phospholipids and amyloid β.
soumise à J. Biol. Chem.

Actuellement, plusieurs hypothèses biochimiques tentent d'apporter des bases moléculaires de l'implication du polymorphisme de l'apo E dans la MA. Par ailleurs, le lien avec l'oxydation de protéines spécifiques comme l'apo E reste incompris.

Dans cet article, nous avons complété l'étude comparative de la sensibilité à l'oxydation des 3 isoformes d'apo E, en utilisant le système enzymatique MPO/H_2O_2/Cl^- selon 2 conditions de pH correspondant à la production d'oxydant selon 2 types de réactions physiologiques. Afin de valider notre modèle d'oxydation, nous avons comparé l'oxydation de l'apo E recombinante à celle de l'apo E plasmatique et analysé l'apo E oxydée par CLHP en phase inverse pour confirmer les modifications observées après oxydation.

Dans les conditions physiologiques, l'apo E est principalement liée aux lipides au sein de particules de type HDL dans le LCR. De plus, elle ne peut exercer ses fonctions de transport et de redistribution du cholestérol et des PL qu'une fois associée à ceux-ci. L'association de l'apo E aux lipides induit un changement de conformation indispensable à la reconnaissance de l'apo E par les récepteurs membranaires (Mahley, 1988). En modifiant sa structure, l'oxydation de l'apo E pourrait conduire à une diminution de son affinité pour les PL ayant pour conséquence une altération de ses fonctions de transport des lipides. Nous avons donc étudié l'effet de l'oxydation de l'apo E sur sa capacité à interagir avec des complexes phospholipidiques. Enfin, nous avons étudié l'impact de l'oxydation des 3 isoformes d'apo E sur la fibrillation du peptide Aβ.

Sensibilité à l'oxydation des 3 isoformes d'apo E.

Le système d'oxydation enzymatique décrit dans la publication n°1 a été modifié afin de se placer à pH physiologique, pH adapté à la formation de complexes lipoprotéiques. Ici, la production de HOCl en présence de H_2O_2 et Cl^- à pH 4,5 a lieu en présence d'un acide aminé, la leucine, qui réagit avec HOCl pour former des chloramines. Ces chloramines, instables dans une solution à pH 7,4, donnent à nouveau naissance à HOCl d'une part, et à des aldéhydes et de l'ammoniac d'autre part.

Dans ces conditions, nous avons montré que les 3 isoformes d'apo E ne présentent pas les mêmes variations de profil électrophorétique (Figure 1a, b, c, publication n°2). En effet, après oxydation à pH 7,4 et immunorévélation (Figure 1a,b, publication n°2), la bande majeure d'apo E migre avec un poids moléculaire d'autant plus élevé que la concentration en oxydant augmente. Les variations de poids moléculaire correspondant à ce déplacement tendent vers un plateau pour les concentrations en oxydant supérieures à 0,12 mM (Figure 2, publication n°2). Cette variation de mobilité électrophorétique est détectée après révélation par les anticorps anti-DNP aussi bien que par les anticorps anti-apo E. Cette différence de mobilité a également été observée pour l'apo B des LDL oxydées chimiquement (Noguchi et al., 1994 ; Oorni et al., 1997). L'oxydation des protéines peut modifier les acides aminés qui à leur tour modifient la structure des protéines et/ou leur fonction. Effectivement, Davies (1987) décrit les altérations de la structure primaire dues à l'oxydation de 16 protéines et montre une distorsion des structures secondaire et tertiaire de la SAB après oxydation par les radicaux hydroxyle (Davies et Delsignore, 1987).

Aux faibles concentrations en oxydant, le déplacement de la bande majeure d'apo E est plus important pour l'apo E4 que pour l'apo E3, lui-même plus important que pour l'apo

E2. A des concentrations en oxydant plus élevées, cette variation du poids moléculaire apparent est plus importante, mais reste similaire pour l'apo E4 et l'apo E3. Le déplacement de la bande majeure d'apo E2 reste faible quelle que soit la concentration en oxydant (Figure 2, publication n° 2).

Sur la base des variations de poids moléculaire apparent, les 3 isoformes d'apo E présentent donc une sensibilité différente à l'oxydation, l'apo E4 étant l'isoforme la plus affectée et l'apo E2 la moins affectée.

La différence de sensibilité des 3 isoformes d'apo E à l'oxydation peut être liée à leur structure tertiaire exposant différemment les acides aminés sensibles à l'oxydation. En effet, une légère modification d'acides aminés peut entraîner une modification dans l'interaction isoforme-dépendante de l'apo E avec les lipides ou les récepteurs (Weisgraber, 1994 ; Dong et al., 1996). La structure primaire de l'apo E peut également être impliquée dans cette différence de sensibilité du fait du contenu en cystéine différent pour les 3 isoformes. En effet, l'apo E4 ne contient pas de cystéine dans sa structure contrairement à l'apo E2 qui en contient deux. Or, les résidus cystéine ainsi que les résidus méthionine peuvent jouer un rôle d'antioxydant en s'oxydant plus facilement, ce qui préviendrait ainsi les autres acides aminés de l'attaque par les RL (Levine et al., 1996). De telles propriétés peuvent être reliées aux propriétés antioxydantes de l'apo E (Miyata et Smith, 1996). En effet, ces auteurs montrent que l'apo E2 protège plus efficacement les neurones de rat des dégâts oxydants que l'apo E4. La différence d'efficacité de protection peut être corrélée à la différence de sensibilité à l'oxydation des 3 isoformes d'apo E. L'apo E2, isoforme la moins sensible à l'oxydation a un rôle protecteur plus efficace contrairement à l'apo E4 plus sensible à l'oxydation donc plus modifiée qui a perdu sa capacité protectrice.

A pH 4,5, la variation de poids moléculaire est plus nette et elle est accompagnée de l'apparition de bandes de hauts poids moléculaires vers 66 et 100 kDa (Figure 1a, publication n°2). Dans ces conditions d'oxydation plus drastiques, les modifications de la protéine sont plus importantes et conduisent à son agrégation.

Par ailleurs, nous avons vérifié l'impact du peptide de fusion sur la sensibilité à l'oxydation de l'apo E recombinante. Après oxydation, l'apo E recombinante sans peptide de fusion présente un profil électrophorétique similaire à celui de l'apo E recombinante. En effet, après oxydation, la bande correspondant à l'apo E4 hydrolysée par l'entérokinase est déplacée vers les hauts poids moléculaires et de façon plus marquée dans les conditions d'oxydation à pH 4,5 qu'à pH 7,4 (Figure 26).

Des résultats similaires de variation de poids moléculaires ont été obtenus pour l'apo E3 plasmatique. Les résultats obtenus lors de l'oxydation de l'apo E recombinante semblent donc refléter l'oxydation de l'apo E plasmatique, validant ainsi l'utilisation de l'apo E recombinante dans notre modèle d'étude de l'oxydation des apo E.

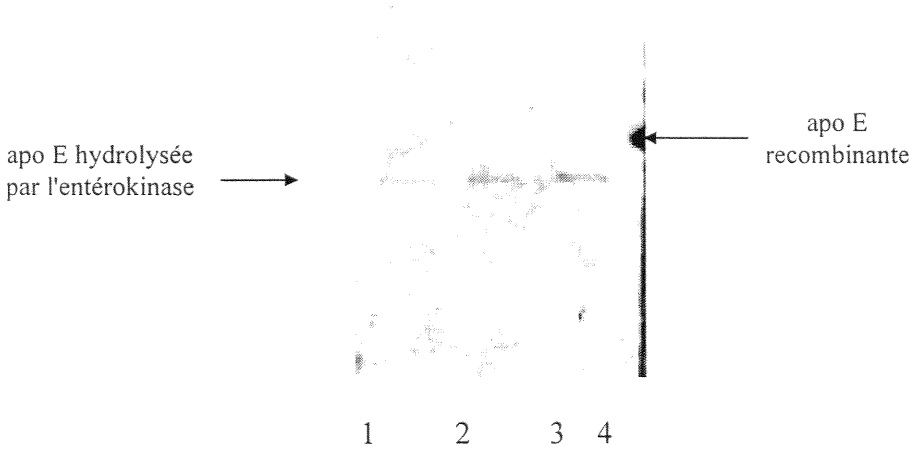


Figure 26 : Profil électrophorétique de l'apo E4 hydrolysée par l'entérokinase, avant (ligne 1) et après oxydation par le système MPO/H_2O_2/Cl^- à pH 7,4 (ligne 2) et à pH 4,5 (ligne 3). Ligne 4 : apo E4 recombinante.

Pour confirmer les modifications liées à l'oxydation se caractérisant par la variation de poids moléculaire après immunorévélation, nous avons analysé l'apo E oxydée par CLHP en phase inverse. Dans un premier temps, nous avons comparé le profil de chacune des 3 isoformes d'apo E et observé des temps de rétention différents. L'apo E2 tend à s'éluer avec un temps de rétention supérieur à ceux de l'apo E3 et de l'apo E4 qui sont similaires (TR=27,2 à 28,3 min pour l'apo E2, TR=26 à 26,7 min pour l'apo E3 et TR=25,6 à 26 min pour l'apo E4).

Après oxydation, les temps de rétention diminuent plus ou moins selon la condition de pH utilisée. Après oxydation à pH 4,5 pour 0,05 mM d'oxydant, le pic majeur d'apo E4 à 25,6 min disparaît complètement au profit d'un pic principal à 20 min (Figure 3b, publication n°2). A pH 7,4, en présence de la même concentration en oxydant, il reste environ 70 % du pic d'apo E4 non oxydée (25,6 min) et plusieurs pics apparaissent avec un temps de rétention plus court mais supérieur à 20 minutes. La réduction du temps de rétention est accentuée en présence de 0,15 mM d'oxydant. En effet, l'intensité du pic principal d'apo E atteint alors des valeurs proches de zéro pour donner naissance à plusieurs pics entre 20 et 24,5 min, pouvant correspondre à des différences de conformations résultant de niveaux d'oxydation variables.

Estimée par ce type d'analyse, l'oxydation des isoformes d'apo E présente également un caractère différentiel. En effet, après oxydation à pH 7,4 avec 0,15 mM d'oxydant, l'intensité du pic principal d'apo E4 diminue de façon plus importante (réduction de 80 %) que celui de l'apo E3 (réduction de 70 %), lui-même plus important que celui de l'apo E2 (réduction de 45 %). Ainsi, le profil CLHP des apo E3 et E4 est semblable, avec un pic

principal d'apo E atteignant les limites de détection, alors que le pic principal de l'apo E2 reste encore important (55 %).

La diminution du temps de rétention suggère une réduction de l'hydrophobicité des 3 isoformes d'apo E mais aussi un changement de conformation. Nos résultats sont en accord avec ceux de Anantharamaiah et al. (1988), qui ont montré par combinaison de la CLHP en phase inverse et d'hydrolyse par le bromure de cyanogène, que l'oxydation des méthionines de l'apo AI altère la structure secondaire de la protéine.

La différence d'intensité du pic principal des 3 isoformes d'apo E semble être due à la différence de sensibilité à l'oxydation de chacune des isoformes. L'apo E3 et E4 présentant une sensibilité à l'oxydation équivalente pour une concentration de 0.15 mM d'oxydant, leur pic principal présente une réduction similaire importante contrairement à l'apo E2 peu modifiée par l'oxydation.

Conséquences de l'oxydation de l'apo E sur son interaction avec les PL.

L'apo E circulante est essentiellement sous forme de complexe lipidique. Nous l'avons donc incorporée dans des complexes phospholipidiques afin d'étudier si l'oxydation de l'apo E influence son incorporation dans les lipides et si l'environnement lipidique modifie la sensibilité de l'apo E à l'oxydation. Les complexes apo E-DPPC préparés selon la méthode de reconstitution utilisant un détergent sont des particules discoïdales de dimension et de composition analogues aux particules discoïdales natives telles que les HDL (Jonas, 1984). Après filtration sur gel, les profils d'élution des particules contenant l'apo E sont plus hétérogènes que ceux observés avec les complexes formés à partir d'apo AI (Figure 5a, publication n°2). Des résultats similaires ont déjà été rapportés par Zorich et

al. (1985). En effet, les complexes apo AI-DPPC ne présentent qu'une seule bande vers 200 kDa après électrophorèse native sur gradient d'acrylamide, alors que les complexes apo E-DPPC présentent 2 à 3 bandes vers 300, 400 et 500 kDa, correspondant à un rayon de Stokes variant de 6 à 7 nm pour les 3 isoformes (Figure 27). Les pourcentages d'incorporation protéique sont de l'ordre de 65 % pour les 3 isoformes d'apo E et de 78 % pour l'apo AI.

L'apo E3 plasmatique présente également un profil d'élution hétérogène avec 2 types de complexes et un pourcentage d'incorporation protéique de 52 %. Le comportement de l'apo E recombinante face aux PL est proche de celui de l'apo E plasmatique, confirmant, par une autre approche, l'intérêt de l'utilisation de l'apo E recombinante comme modèle d'étude.

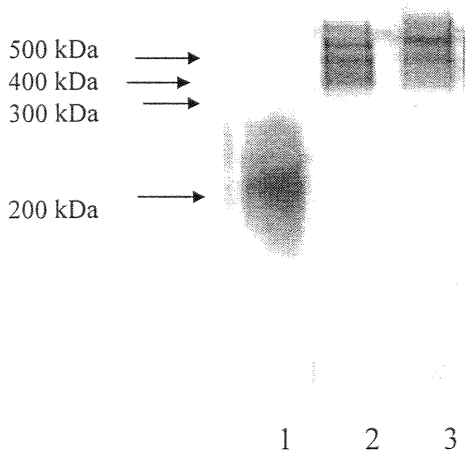


Figure 27 : Profil électrophorétique de l'apo AI, l'apo E3 et l'apo E4 incorporées dans les disques de DPPC après coloration au bleu de Coomassie.
Ligne 1 : apo AI-DPPC ; ligne 2 : apo E4-DPPC; ligne 3 : apo E3-DPPC

Lorsque l'apo E est oxydée par le système MPO/H_2O_2/Cl^-, les pourcentages d'incorporation protéique diminuent jusqu'à 33, 30 et 19 % pour l'apo E2, l'apo E3 et l'apo E4, respectivement (Figure 5b, publication n°2). Après oxydation, la diminution de la capacité

d'interaction de l'apo E avec les PL est accompagnée de la diminution des rapports DPPC/Protéine (Figure 5c, publication n°2), suggérant une faible proportion de DPPC par particule lipoprotéique ou plus vraisemblablement un grand nombre de molécules d'apo E par disque de DPPC. La diminution de l'incorporation de l'apo E oxydée dans les complexes est en accord avec les travaux d'Anantharamaiah et al. (1988), qui ont montré une incorporation réduite de l'apo AI oxydée dans des disques de dimirisoyl phosphatidyl choline (DMPC). L'état d'oxydation de l'apo AI détermine sa conformation, ce qui modifie ses capacités d'interaction avec les lipides (Roberts et al., 1997). Ces résultats suggèrent que les modifications dues à l'oxydation de l'apo E affectent sa liaison aux lipides. En effet, l'oxydation des résidus méthionine conduit à la formation de sulfoxydes, ces sulfoxydes sont hydrophiles et réduisent alors l'affinité de la protéine oxydée pour les lipides. De même, Oorni et al. (1997) ont montré que l'oxydation de l'apo B des LDL réduit leur liaison aux protéoglycanes et lorsque l'oxydation est forte, les LDL ne sont plus capables de les lier. Ces résultats coïncident avec les nôtres qui montrent que plus l'isoforme d'apo E est oxydée, plus sa capacité à lier les PL est diminuée.

L'oxydation de l'apo E diminue donc sa capacité à lier les PL, probablement du fait de modification d'acides aminés intervenant dans la liaison apo E-DPPC et d'un changement de conformation. Les modifications de structure de l'apo E causées par l'oxydation peuvent alors résulter en une mauvaise interaction de l'apo E avec les récepteurs et ainsi conduire à des défauts dans le métabolisme lipidique (Dergunov et Rosseneu, 1994).

L'oxydation modifie les capacités de l'apo E à lier les PL. Mais, qu'en est-il de l'oxydation de l'apo E après incorporation dans les complexes lipidiques ? Nous avons oxydé les complexes apo E-DPPC par le système de la MPO et les profils électrophorétiques obtenus

sont semblables à ceux obtenus avec l'apo E recombinante libre (Figure 6, publication n°2). L'apo E est sensible à l'oxydation et elle se comporte donc de façon similaire, qu'elle soit incorporée ou non dans les PL saturés. En effet, les apolipoprotéines peuvent être oxydées indépendamment de l'oxydation des lipides (Hunt et al., 1994 ; Noguchi et al., 1994). De même, il a été montré que l'apo B subit des modifications dues à l'oxydation des LDL par HOCl généré par la MPO, plus particulièrement sur les résidus lysine, méthionine et tryptophane (Yang et al., 1996) et que ces modifications ont lieu préférentiellement et plus rapidement que la peroxydation lipidique (Jerlich et al., 1998).

Par ailleurs, puisque l'apo E plasmatique et l'apo E recombinante d'une part, et l'apo E liée ou non aux PL d'autre part présentent le même profil électrophorétique, ces modifications sont indépendantes du petide de fusion et ont plus vraisemblablement lieu sur la partie N-terminale de la protéine, la partie C-terminale étant engagée dans les interactions protéine/lipide.

Impact de l'oxydation de l'apo E sur la fibrillation d'Aβ.

L'interaction apo E-Aβ serait favorisée par l'oxydation préalable de l'apo E (Strittmatter et al., 1993). Nous avons donc suivi la fibrillation d'Aβ par la mesure de la fluorescence de la thT, en absence ou en présence des 3 isoformes d'apo E non oxydée ou oxydée. La fibrillation d'Aβ est significativement inhibée en présence d'apo E2 et augmentée en présence d'apo E4, induction déjà rapportée par Ma et al. (1994). Par mesure de la turbidité, Pillot et al. (1997a) ont décrit une inhibition de l'agrégation d'Aβ en présence d'apo E2 et d'apo E3 alors que l'apo E4 n'a pas d'effet. La modulation différentielle de la fibrillation d'Aβ peut être due à la conformation différentes des 3 isoformes d'apo E

(Aleshkov et al., 1997). En effet, la substitution différente selon l'isoforme des acides aminés en position 112 et 158 modifie la conformation 3D de l'apo E, modifiant la réactivité des isoformes face à Aβ (Wilson et al., 1993 ; Dong et al., 1994).

L'oxydation des 3 isoformes d'apo E ne modifie pas leur effet sur la fibrillation d'Aβ, excepté pour l'apo E4 dont l'oxydation augmente significativement cette fibrillation (Figure 4, publication n°2). Ces résultats sont en accord avec le rôle de l'apo E4 comme facteur de risque et le rôle protecteur de l'apo E2 dans la MA. Ils sont également corrélés par l'observation faite sur les patients atteints de MA dont les dépôts amyloïdes sont plus nombreux dans les cerveaux des malades porteurs de l'allèle ε4 que dans ceux des malades porteurs de l'allèle ε3 (Schmechel et al., 1993). La fibrillation isoforme-dépendante d'Aβ serait due à la conformation différente des isoformes (Aleshkov et al., 1997). Nous avons montré que l'oxydation de l'apo E modifie sa structure. L'apo E4 étant l'isoforme la plus oxydée sa structure est donc la plus modifiée. De même, l'inhibition semblable de l'apo E2 non oxydée et oxydée sur la fibrillation d'Aβ peut s'expliquer par les faibles modifications de l'apo E2 après oxydation

Un des résultats marquants de cette étude est l'impact de l'incorporation de l'apo E dans les disques de PL sur la fibrillation d'Aβ. En effet, celle-ci est significativement augmentée, quelle que soit l'isoforme considérée incorporée dans les disques de DPPC. Des résultats similaires ont été rapportés par Berg et al. (1997) pour l'apo E3 et l'apo E4 liées aux lipides, contrairement à Farhangrazi et al. (1997) qui montrent une diminution de la toxicité d'Aβ en présence de HDL enrichies ou non en apo E. Toutefois, les HDL peuvent s'associer avec Aβ et ces complexes sont isolés du LCR (Koudinov et al., 1994 et 1996).

De même, Avdulov et al. (1997) ont montré que le peptide $A\beta_{1-40}$ se lie aux lipides seulement après 24 heures d'incubation, lorsque Aβ est agrégé. Ceci est en accord avec nos résultats. En effet, après 6 heures d'incubation avec les complexes apo E-DPPC, aucune variation significative de la fibrillation d'Aβ n'est observée (Figure 28) alors que toutes les préparations apo E-DPPC augmentent significativement cette fibrillation après 24 heures (Figure 7, publication n°2).

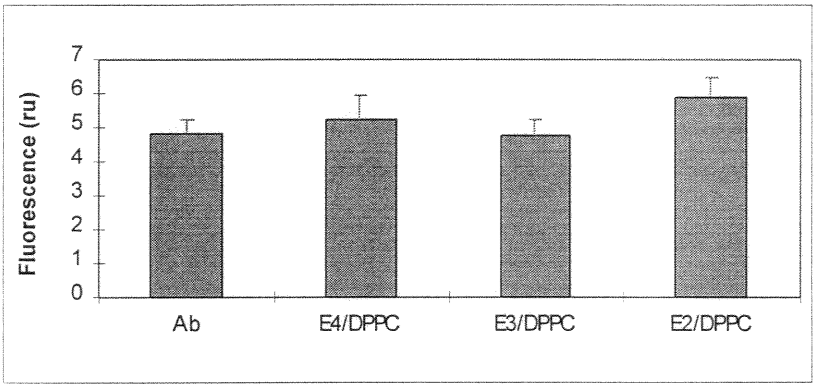


Figure 28 : Fluorescence de la thioflavine T en présence de Aβ et des 3 isoformes d'apo E incorporées dans des disques de DPPC, après 6 heures d'incubation.

La fibrillogenèse d'Aβ est induite en présence de l'apo E associée aux PL quelle que soit l'isoforme considérée alors que les DPPC seuls n'ont aucun effet propre sur la fibrillation d'Aβ. De plus, il a été montré que Aβ interagit avec les apo E3 et E4 des lipoprotéines permettant leur transport à l'intérieur des cellules neuronales par l'intermédiaire des récepteurs reconnaissant l'apo E (Beffert et al, 1998). L'absence d'effet différent entre les 3 isoformes d'apo E lorsqu'elles sont incluses dans les DPPC peut être due à la modification équivalente de la conformation des 3 isoformes d'apo E dans les particules lipidiques par rapport à la conformation en solution aqueuse. Ce changement de conformation peut alors modifier les conformations et interactions isoforme-spécifiques de chacune des isoformes d'apo E. Dans nos conditions, contrairement aux résultats de Aleshkov et al. (1997)

montrant une réactivité face à Aβ réduite de l'apo E commerciale (Pan Vera) complexée aux POPC (palmitoyl oléoyl phosphatidyl-choline) par rapport à l'apo E libre, l'incorporation de l'apo E recombinante dans les DPPC induit la fibrillation d'Aβ. Nos résultats sont en accord avec la stabilisation de la conformation du peptide Aβ en feuillet β par interaction avec les PL décrite par Seelig et al. (1995) et avec la détection de complexes stables apo E-Aβ *in vivo* chez des patients atteints de MA (Näslund et al., 1995; Permanne et al., 1997).

De plus, l'induction de la fibrillation d'Aβ n'est pas affectée par l'oxydation des complexes (Figure 7, publication n°2). L'incorporation de l'apo E dans les disques lipidiques semble modifier sa conformation, exposant similairement, pour les 3 isoformes, les résidus aminés nécessaires à la liaison avec Aβ. Cependant, ces acides aminés ne sont pas modifiés par l'oxydation. De plus, l'apo E peut induire une modification de l'organisation des DPPC dans les complexes, modification qui augmente alors l'interaction des PL avec Aβ, augmentant ainsi son agrégation (Pillot et al., 1997b ; Wilson et Binder, 1997).

Dans cet article, l'étude de l'oxydation des 3 isoformes d'apo E et de ses conséquences sur leur interaction avec les PL et le peptide Aβ nous a permis de montrer que :

a) la sensibilité de l'apo E à l'oxydation par le système d'oxydation $MPO/H_2O_2/Cl^-$ dans les 2 conditions de pH est différente pour les 3 isoformes. A faible concentration d'oxydant, l'apo E4 est plus sensible à l'oxydation que l'apo E3, elle-même plus sensible que l'apo E2,

b) l'oxydation de l'apo E diminue sa capacité d'interaction avec les PL. L'apo E3 et l'apo E4, isoformes les plus sensibles à l'oxydation présentent une capacité plus faible d'interagir avec les phospholipides.

c) la fibrillation d'Aβ est inhibée en présence d'apo E2 oxydée ou non, alors qu'elle est augmentée en présence d'apo E4 oxydée. En revanche, quelle que soit l'isoforme considérée, les 3 isoformes d'apo E incluses dans les disques lipidiques, oxydés ou non, augmentent la fibrillation d'Aβ.

Prepared for **J. Biol Chem**.

Human apolipoprotein E isoforms are differentially oxidized by myeloperoxidase, a process which modulates apolipoprotein E interaction with phospholipids and amyloid β.

C. JOLIVALT*, B. LEININGER-MULLER*, P. BERTRAND*, R. HERBER*, Y. CHRISTEN° and G. SIEST*

* Centre du Médicament, UPRES, Faculté de Pharmacie, Université Henri Poincaré Nancy I, 30 rue Lionnois, 54000 NANCY, France

° Institut Ipsen, 24 rue Erlanger, 75781 PARIS Cedex 16, France

Author to whom correspondence should be addressed :

G. SIEST. Centre du Médicament, Université Henri Poincaré Nancy I, 30 rue Lionnois, 54000 NANCY, F. Tel 33 (0) 3 83 17 88 34 ; Fax 33 (0) 3 83 32 13 22

Running Title:

Isoform-specific alterations of apo E properties by oxidation.

Summary

The accumulation of oxidized proteins has been demonstrated in Alzheimer's disease (AD) brain. Among the proteins found in cerebral amyloid deposits in AD, apolipoprotein (apo) E is a polymorphic protein whose one specific isoform, apo E4, has been widely associated with AD. Apo E may be linked with AD by its isoform-specific interaction with lipids or other proteins found in amyloid plaques. In agreement with our previous data, apo E provides a target for oxidative processes taking place in AD.

Using the myeloperoxidase system, we now report that the oxidation of the three recombinant apo E isoforms is differential : apo E4 is more susceptible than apo E3, itself much more than apo E2. Using apo E-phospholipid complexes, we observed that oxidation of apo E decreased its incorporation into phospholipids discs by about 50 % and modified the composition of the resulting complexes. In addition, only oxidation of apo E4 significantly enhanced amyloid-β fibrillogenesis.

The oxidation of apo E could thus lead to inefficient lipid recycling in the brain, more particularly for apo E3 and apo E4; while oxidation of apo E4 alone could enhance amyloid deposition. Taken all together, our results link and strengthen both the ε4 allele linkage with AD and the role of protein oxidation in AD. It now remains to assess *in vivo* the cerebral mechanisms underlying apo E oxidation and/or myeloperoxidase functions.

Introduction

Free radicals are inevitable by-products of biological redox reactions. It is widely accepted that the formation of free oxygen radicals in the central nervous system is one of the pathogenic mechanisms leading to neurodegenerative diseases (1, 2).

The brain is particularly vulnerable to oxidative damage because of its low level of protective enzymes or antioxidant compounds and its high oxygen consumption. Several forms of protein oxidation can occur including formation of carbonyls, attacks on particular amino acid residues and oxidation of sulfhydryl groups. Oxidation leads to crosslinking of proteins, increasing in protein susceptibility to proteolysis, conformational changes and loss of biological function (For a review, see ref. 3). An increase of oxidized protein in brain has been reported during normal aging and in neurodegenerative disorders such as Parkinson's and Alzheimer's diseases (AD) (4, 5).

No study related to the *in vitro* oxidation of specific target proteins implicated in AD has been reported to date. Apolipoprotein E (apo E) is one of the major proteins co-localized with amyloid-β peptide (Aβ) in senile plaques brains of patients with AD. Apo E/Aβ interactions have been proposed to be favored when apo E is oxidized (6). It is now generally accepted that Aβ aggregates could produce free radicals (7) and, therefore, the co-localized apo E could be a target for the attack of these radicals. Moreover, oxidation of lipid could give rise to reactive by-products, such as malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (HNE) which covalently modify and crosslink apo E, thus altering its metabolism (8). However, direct apolipoprotein oxidation is known to occur independently of lipid oxidation (9, 10). Human apo E is a polymorphic protein, whose three main isoforms, E2, E3 and E4 are the products of

three alleles ε2, ε3 and ε4, differing from each other by a single mutation (11). Apo E is implicated in lipid homeostasis and its main function in the brain is to locally recycle cholesterol and phospholipids (PL) in response to injury (12). Apo E came into the field of AD research more particularly after the demonstration of the linkage of ε4 allele with AD (for review, see refs. 12, 13). Apo E2 appears to be protective against AD (14). The relationship between AD and apo E is thus isoform-dependent. It may derive from an apo E isoform-specific interaction with Aβ, the principal constituent of senile plaques (6), with tau, the major constituent of tangles (15), as well as with lipids (16), or by its decreased levels in the AD brain (17). Contradictory results about the effect of apo E on Aβ fibrillogenesis have been reported (18, 19). The differential implication of apo E isoforms in AD may be reinforced or correlated with a differential degradation of apo E isoforms due to alterations by oxidative modifications. Such modifications could generate apo E fragments previously observed with several proteins (20). In addition, the 10 kDa thrombin cleavage C-terminal fragment of apo E was detected in senile plaques and shown to form fibrils (21). The 22 kDa N-terminal fragment of apo E4 is more neurotoxic than the apo E3 fragment (22).

We previously investigated the susceptibility of recombinant apo E3 and apo E4 to free radicals produced *in vitro* by a strong vanadyl/hydrogen peroxide oxidizing system. Under these conditions, both apo E isoforms were fragmented and/or polymerized (23). However, such a strong oxidation system does not correspond to the physiological conditions representative of the progressive accumulation of free radical species during aging. We consequently studied apo E oxidation in a more "physiological" manner with the milder myeloperoxidase (EC 1.11.1.7, MPO) oxidizing system (24). This enzyme, present in polymorphonuclear neutrophils and in monocytes, is involved in atherosclerosis *via* its implication in inflammatory processes (25). Inflammatory processes are also involved in the

formation of AD senile plaques (26) and we recently reported its presence in the human brain (27). In the presence of H_2O_2 and Cl^-, MPO catalyses the peroxidation of chloride to hypochloride which then rapidly interacts with oxidizable moieties of protein (24). Using this oxidizing system, lipid-free apo E3 was shown to be oxidized to a greater extent *in vitro* than albumin (27). However, most of the physiological apo E is complexed to lipids to form high density lipoprotein (HDL)-like particles in cerebrospinal fluid (28). Interaction of apo E with cellular lipoprotein receptors can only be achieved if apo E is embedded in an adequate lipid environment (11). Thus, we prepared associated apo E-PL complexes in order to mimic physiological conditions.

The aim of this study was to compare the susceptibility of the three major apo E isoforms to MPO oxidation, which could lead to their differential implication in AD. We also studied the consequences of apo E oxidation on its properties to modulate Aβ fibrillogenesis and to interact with PL.

Experimental procedures

Materials

The 3 recombinant human apo E (E2, E3, E4) cDNAs were cloned in a modified pARHS-2 vector and produced in *E. Coli* BL21 (DE3) as fusion proteins with an apparent molecular weight (MW) of about 43 kDa. The 43 kDa apo E results from the fusion of apo E with a peptide containing a polyhistidine sequence. This polyhistidine tag allows the recombinant proteins to be purified by single-step affinity chromatography on a nickel gel and does not modify the major properties of apo E isoforms (29).

$A\beta_{1-40}$ was purchased from Bachem. Aβ powder was weighed in aliquots and kept at -20°C. Prior to the experiment, Aβ was diluted in sterile water.

Enterokinase was from Invitrogen, MPO from Calbiochem. All other chemicals were from Sigma. Plasma apo AI was kindly provided by Dr V.V. Shuvaev (30).

Hydrolysis assays

Cleavage of the fusion peptide (4.5 kDa) was carried out by incubating 20 µg of apo E with 1 unit of enterokinase in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 1 mM $CaCl_2$, 0.1 % Tween 20, 1 M β-mercaptoethanol for 12 hours at room temperature. The reaction was stopped by placing the sample on ice. The sample was concentrated and washed on Centricon 30 (Amicon) in order to eliminate the fusion peptide and β-mercaptoethanol.

Oxidation assays

In vitro oxidation assays of the recombinant proteins with MPO isolated from polymorphonuclear neutrophils (31) were performed as previously described (27), with slight modifications in the pH adapted to the formation of apo E-PL discoidal complexes. Chloramines were formed by the reaction of MPO in 55 mM phosphate buffer (pH 4.5), 100 mM NaCl and 10 mM leucine with different concentrations of H_2O_2 (0, 0.625; 1.25; 3; 7.6;

12.5 mM). Then, native apo E was oxidized by the chloramines at physiological pH for 30 minutes at room temperature (32). Proteins were subjected to 12 % SDS-PAGE under non-reducing conditions and tranferred to PVDF (Millipore) membranes.

The protein carbonyl content was evaluated by forming labelled protein hydrazone derivatives using 2,4-dinitrophenyl hydrazine (DNPH) (33). The dinitrophenyl moieties formed on apo E were revealed by enhanced chemiluminescence (ECL, Pierce) after incubation of the blot with rabbit anti-DNP antibodies followed by incubation with HRP-labelled anti-rabbit antibodies. Alternatively, blots were incubated with monoclonal anti-apo E antibodies (kind gift from Dr. Y. Marcel, Canada) followed by incubation with secondary anti-mouse antibodies labelled with HRP, and then revealed by ECL.

Analysis of apparent MW was carried out on a Biomax 1D software (Kodak). Apparent molecular weights of the bands were calculated according to low MW protein standards from 97 kDa to 14 kDa (Biorad).

Separation of apo E by RP-HPLC

Oxidized and non-oxidized apo E were resolved by reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). RP-HPLC was performed on a RPC-4 column (5µ, 4.6x150 mm, Vydac) using a gradient of acetonitrile in 0.1% TFA at a flow rate of 1 ml/min, from 20 to 40 % for 10 mins, followed by a gradient from 40 to 60 % for 30 mins, on a HPLC pump 422 (Kontron) system. Peaks were detected at 220 nm using a spectrophotometer (Waters).

Preparation of discoidal complexes of apo E

Discoidal complexes were prepared by a detergent reconstitution method adapted from Jonas (34). The phospholipid used in the present study, dipalmitoyl phosphatidyl-choline (DPPC), was dispersed in sodium cholate and incubated with apo E according to a 3/1 (w/w) DPPC/protein ratio. The spontaneously formed discs were isolated by adsorption of the

cholate on Bio Beads (Biorad). The solution containing the complexes was subjected to gel filtration on a Sephacryl HR300 column (1.6x55 cm, Pharmacia) in order to separate the apo E-DPPC discs from free apo E and free phospholipids. Fractions of 2 ml were collected. Material eluted up to fraction 10 corresponds to the apo E-DPPC complexes. Subsequent fractions contained free apo E. The apo E-DPPC complexes were concentrated by centrifugation on a Centriplus 100 (Amicon). The apo E-DPPC complexes formed were detected at 280 nm for their protein content. The lipid content of the complexes was measured with an enzymatic colorimetric assay (Boehringer Mannheim). The same protocol was followed for plasma apo AI, used as a control. The complexes formed were submitted to non-denaturing gel gradient electrophoresis during 5H at 120 V and stained with Coomassie blue R.

Aβ aggregation assays.

$A\beta_{1-40}$ aggregation was followed using the thioflavine T (thT) fluorescent assay as previously described (35, 36). Experimental solutions were incubated for 6 to 24 hours with an apo E/Aβ molar ratio of 1/100. The incubated samples were added to 2 μM thT in a 50 mM glycine (pH 9) buffer. The protocol was established for a single measurement using a spectrofluorimeter (Hitachi F-2000) and was then adapted to a microtiter plate assay, with 7.5 μl of incubated sample added to 200 μl of 2 μM thT and incubated for 5 minutes. Emission spectra were then measured using a Cytofluor 2300 spectrofluorimeter (Pharmacia) with λex=440/20 and λem=480/20 nm.

Results

Differential oxidation of the 3 apo E isoforms.

The electrophoretic profiles of the apo E isoforms after oxidation by the MPO system are shown in Figure 1. Upon oxidation at pH 7.4, the apo E specific band migrated with a larger apparent MW. These shifts in the apparent MW increased to a plateau when the oxidant concentration was increased (Fig. 2). These shifts were visualized for the 3 apo E isoforms after detection with anti-DNP as well as with anti-apo E antibodies (Fig 1a,b); and the levels differed from one isoform to another. These shifts in the apparent MW of apo E were observed even in the absence of DNPH, thus suggesting they were not the result of DNP adducts. Since the background was less important on anti-apo E blots than on anti-DNP ones, we continued with only anti-apo E hybridization. The difference observed between the main apo E band before and after the strongest oxidation was similar for apo E4 (ΔkDa=2.0) and for apo E3 (ΔkDa=1.8), and much lower for apo E2 (ΔkDa=0.5) (Fig. 2). In addition, using a lower concentration of oxidant, it appeared that apo E4 is more readily oxidized than apo E3 and apo E2 (Fig. 2). After oxidation at a lower pH (pH 4.5), these shifts in the apparent MW of apo E were even more pronounced (ΔkDa=2.2 for apo E4, ΔkDa= 2.0 for apo E3 and ΔkDa=0.8 for apo E2) (Fig. 1c). Concomitantly, the intensity of the major apo E band decreased after oxidation and higher MW bands appeared.

The global decrease in the intensity of the apo E band after oxidation at pH 4.5 as well as at pH 7.4 could be due to technical limitations, due to decreased apo E binding to PVDF membrane and/or by oxidative modification of epitopes leading to lower recognition by antibodies, since we did not observe this decrease after Coomassie blue staining (data not shown). Using plasma apo E as well as recombinant apo E with the fusion peptide removed by enterokinase hydrolysis, similar shifts in the apparent MW of apo E were obtained after

oxidation (data not shown). The results obtained for recombinant apo E oxidation may reflect the oxidation of plasma apo E, thus validating the use of recombinant protein to investigate oxidative studies. It must be noted that the non-oxidized apo E isoforms were all labelled by anti-DNP antibodies (Fig 1b), suggesting that recombinant apo E was already partly oxidized either during the bacterial production or during the purification step on Ni^{++} gel. It must also be noted that the initial apo E2 preparation was partly aggregated (Fig 1b).

To confirm the oxidative modifications of apo E leading to the observed shift on immunoblots, we conducted RP-HPLC analysis. After oxidation at pH 7.4, the major peak corresponding to apo E partially disappeared and new peaks appeared at earlier retention times, suggesting a decreased hydrophobicity of the oxidized protein. Apo E retention time after oxidation was decreased for the 3 isoforms and the representative results are shown for apo E4 in Figure 3. After oxidation of apo E4 at pH 4.5 with 0.05 mM of oxidant, the major apo E peak at 25.6 min disappeared completely and was shifted to a main peak at 20 min (Fig 3b).When apo E4 was oxidized with 0.05 mM of oxidant at pH 7.4, about 70 % of the main apo E4 peak was not modified and small peaks appeared with an earlier retention time (Fig 3c). This decrease in retention time was enhanced with 0.15 mM of oxidant. Indeed the main apo E4 peak (RT= 25.6 min) decreased to give rise to several peaks with retention time between 20.5 and 24.5 min (Fig 3d). These peaks could correspond to several conformations due to a variable extent of oxidation of the protein.

Aβ fibrillation in presence of oxidized and non oxidized apo E isoforms.

Since it was proposed that the apo E-Aβ interaction would be favored by prior oxidation of apo E (6), we first determined whether oxidation of apo E was able to modify the effects of apo E upon Aβ fibrils formation (Fig 4). The consequences of apo E isoforms oxidation on Aβ aggregation were studied using the thT assay. Apo E alone did not modify basal thT

fluorescence. After addition of 0.9 μM of apo E, using an apo E/Aβ molar ratio of 1/100, Aβ fibrillogenesis was significantly inhibited in the presence of apo E2 (36%) while it was slightly enhanced (12 %) with apo E4. We did not detect any significant differences between the effects of non-oxidized and oxidized apo E isoforms on Aβ fibrils formation, except for apo E4 whose oxidation lead to a significant increase in Aβ aggregation (Fig 4).

Incorporation of apo E into PL discs.

Although lipid-free recombinant apo E seems to be a good model to investigate apo E oxidation, most of the physiological apo E is complexed to lipids. Therefore, we prepared apo E-DPPC complexes, since apo E interacts with DPPC discs to give rise to rather small discs, which could be used for further experiments as models for HDL (34). The elution profiles of apo E-DPPC complexes are shown in Figure 5a. Apo E-DPPC complexes formed by the sodium cholate reconstitution method were larger and more heterogeneous than well-characterized apo AI-DPPC complexes, as already reported by Zorich et al. (37). The profile of apo E-DPPC obtained after non denaturing gel gradient electrophoresis confirmed this heterogeneity : apo AI-DPPC complexes migrated as a single band of about 200 kDa, while apo E2-DPPC and apo E3-DPPC complexes showed 2 bands, and apo E4-DPPC 3 bands between 200 and 600 kDa, as visualized after Coomassie blue staining (data not shown). Apo E-DPPC discs had a similar DPPC/Protein ratio (w/w) between 2.15 for apo E3 to 2.44 for apo E4 (Fig. 5c). Each of the three isoforms was incorporated into the discs to a similar extent of 65 to 75 %. After oxidation, the ability of apo E to interact with DPPC was significantly decreased. The yields of protein complexed to DPPC were 33 and 30% for apo E2 and apo E3, respectively, and decreased to 19% in the case of apo E4 (Fig. 5b). The DPPC/protein ratio showed a dramatic decrease from 2.24 to 1.1 for apo E2, to 0.3 for apo E3 and to 0.34 for

apo E4 (Fig. 5c), suggesting a very low binding of oxidized apo E to lipids or a higher number of apo E molecules per DPPC disc.

Therefore, the oxidation of apo E decreased its capacity to form complexes with DPPC. Such modifications in the interaction of apo E with PL led us to study the apo E oxidative profile of oxidized apo E-DPPC complexes. Figure 6 illustrates that oxidation of apo E in DPPC discs gives a similar electrophoretic pattern of oxidation to those obtained using lipid-free apo E (see Fig. 1). Accordingly, the use of lipid-free recombinant apo E may reflect direct oxidation of apo E in its lipid environment, since the unsaturated PL used in this study could not generate reactive species consecutive to lipid peroxidation.

Influence of apo E-DPPC complexes on Aβ fibrillation.

Since most of the physiological apo E is complexed to PL, we also followed Aβ fibrils formation in the presence of apo E included into DPPC discs (Fig 7). Whatever the isoform used, apo E-DPPC significantly increased Aβ fibrillogenesis to a similar extent, while DPPC alone had no effect. Oxidation of apo E-DPPC complexes did not alter the effect of apo E-DPPC on Aβ fibrils formation. The general increase in Aβ fibrillogenesis by all 3 apo E-DPPC complexes was similar to the level of Aβ aggregation observed in the presence of oxidized apo E4 (Fig 4).

Discussion

The ε4 allele is associated with AD (6,38). Moreover, oxidative processes are increased in AD (1) of which apo E could be a target (8). Apo E could be oxidized as well as play itself an antioxidant role against the generation of Aβ free radical (39). The apo E allele specificity linked to pathological aging points to the differential susceptibility of apo E to oxidation. Indeed, we found that apo E4 is more susceptible to oxidation than apo E3, and both of these much more than apo E2. This differential oxidation is characterized by a differential mobility upon SDS-PAGE, as is also the case for apo B in oxidized LDL (10). Oxidation may modify amino acid residues, which in turn modify the function and/or the structure of the protein. Ten years ago, Davies (20) described oxidative alterations of the primary structure of 16 proteins and demonstrated distortion of the secondary and the tertiary structures of BSA after oxidation by hydroxyl radicals (40). As shown by Anantharamaiah et al. (41), through a combination of RP-HPLC and cyanogen bromide cleavage, oxidation of apo AI methionines alters the secondary structure of the protein. In the present work, using RP-HPLC, we also demonstrated that the modification of apo E induced by oxidation decreases its retention time, which suggests a decrease of its hydrophobicity and/or a modification of its conformation. Moreover, Heinecke et al. (42) showed crosslinking of albumin after oxidation by MPO, through formation of bityrosine. Under stronger conditions of oxidation at pH 4.5, we also showed that oxidative modification of apo E can lead to polymerization products (27). The different susceptibility to oxidation of the 3 apo E isoforms may be linked to their tertiary structure, due to a variable exposure of oxidizable amino acid residues. It is known that discrete amino acid residues may mediate isoform-specific conformational changes which alter the interaction of apo E with lipids or receptors (16, 43). The primary structure of apo E could also be involved as the 3 isoforms differ in their cysteine content. Cysteine residues

may act as antioxidants (44), and apo E4 is Arg112-Arg158, apo E3 is Arg112-Cys158, and apo E2 is Cys112-Cys158. In addition, methionine residues have recently been proposed to act as internal antioxidants in proteins (45). Depending on the exposure of the methionine residues (8 in apo E), we might expect a differential capacity of apo E isoforms to resist to reactive species attack. Such properties could be correlated with the differential antioxidant properties of apo E isoforms (39). Cyanogen bromide cleavage experiments are now in progress to assess the impact of methionine residues in apo E oxidation.

Since we observed modifications of apo E after oxidation, we checked the influence of apo E oxidation on Aβ fibrillogenesis. According to the literature, apo E has been proposed to inhibit or to increase Aβ fibrils formation (18, 19). These discrepancies may be linked to the use of different sources of purified apo E and Aβ (46). Moreover, the apo E/Aβ molar ratio differs from one work to another. It has been suggested that inhibition of Aβ fibrillogenesis results from apo E sequestration of soluble Aβ, thereby preventing its transition to the insoluble form (47). In addition, Jordan et al. (48) showed that apo E3 treatment prevents Aβ toxicity on neurons in culture by the formation of apo E/Aβ complexes, leading to the clearance of Aβ, due to uptake of these complexes by apo E receptors. Furthermore, several studies have demonstrated the preferential binding of apo E to Aβ with high β-sheet content (49, 50). Along with the known lot to lot variability of Aβ (51), we performed experiments with different lots of Aβ and we pooled all values. Hence, only apo E2 significantly inhibited Aβ fibrillogenesis while apo E3 had no effect. Apo E4 induced a not significant 12 % increase of Aβ fibrils formation, induction which has also been reported by Ma et al. (52). Using turbidity assays, apo E2 and apo E3 had an inhibitory capacity on Aβ aggregation while apo E4 had no effect (53). Oxidized apo E4 significantly enhanced Aβ fibrillogenesis by 52 % while the 2 other oxidized apo E isoforms had no effect on Aβ fibrils formation in comparison

with the representative non-oxidized isoform. These results are in agreement with the protective role of apo E2 and the role of apo E4 as a risk factor in AD (54). They also correlate with the observation that AD patients with the ε4 allele have more amyloid deposits than those carrying ε3 (55). Moreover, as shown by a recent study using cross-breeding of apo E-knock out and human amyloid protein precursor transgenic mice, apo E may favor amyloid deposition *in vivo* (56).

The oxidative alterations of apo E could modify some of its many functional properties. To examine the possible effects of apo E oxidation on its binding to lipid, we studied its ability to form protein-DPPC complexes. The decreased incorporation of oxidized apo E in DPPC is in agreement with the report of Anantharamaiah et al. (41), showing a reduced apo AI incorporation in DMPC complexes after oxidation. These results suggest that the oxidative modifications of apo E probably affect its lipid binding capacity. It must be kept in mind that apo E plays its role in lipid recycling by binding to several specific membrane receptors (11). This binding can only be achieved when apo E is embedded in an adequate lipid environment. Oxidation of apo E may then lead to alterations of its functional properties which could dramatically impair PL recycling in the brain. This hypothesis is in agreement with the known loss of cerebral cholesterol and PL in AD (57), with the decrease of neuron regeneration in the brains of patients with AD (58), as well as the decreased compensatory response of apo E knock-out mice to enthorhinal cortex lesions (59).

Incorporation of recombinant apo E into discoidal complexes did not affect its susceptibility to oxidation. This suggests that the changes in conformation that apo E undergoes upon unfolding in a PL phase may not modify the exposure of oxidizable amino acid moieties to free radicals. Further, it suggests that lipid-free recombinant apo E may be a good model for further studies based on oxidation.

Interaction between apo E and Aβ has been demonstrated by SDS-PAGE after incubation of Aβ with apo E from CSF or VLDL as well as with recombinant apo E (60). In our study, incorporation of apo E in protein-DPPC complexes, independently of the isoform, increased Aβ fibrils formation. Similar results have been reported for both lipid-bound apo E4 and apo E3 by Berg et al. (61). Incorporation of apo E in PL complexes is supposed to mimic effects of apo E-containing lipoproteins. Berg et al. (61) showed that apo E found in the human brain in clathrin coated vesicles in a lipid-bound state can promote the formation of Aβ oligomers. Avdulov et al. (50) showed that $A\beta_{1-40}$ binds lipid only after 24 h of incubation, when Aβ is aggregated. This is consistent with our data. Indeed, after 6h incubation with apo E-DPPC, there was no significant difference in Aβ fibrillogenesis whereas all the apo E-DPPC preparations significantly increased Aβ fibrils formation after 24 h of incubation. The Aβ fibrillogenesis is induced by the presence of apo E associated with DPPC, whatever the isoform considered, but not with DPPC alone. In addition, Aβ was shown to interact with both apo E3 and apo E4 lipoproteins (62). The oxidation of apo E-PL complexes did not affect the induction of Aβ fibrillogenesis by non-oxidized apo E-PL complexes. Incorporation into PL discs may modify apo E conformation, exposing amino acid residues required for Aβ interaction in the same way for the 3 isoforms but these amino acid residues may not be modified by oxidation. Alternatively, apo E may induce a modification in the organization of DPPC in the complexes which, in turn, non-specifically increase the known interaction of the PL with Aβ, thus promoting its aggregation (63).

In conclusion, *in vitro* MPO-driven oxidation of apo E leads to isoform-dependent susceptibility with apo E4 being the more while apo E2 is the less oxidizable isoform. This oxidation induced apo E modifications which alter its interaction with both PL and Aβ. The

increased Aβ fibrillogenesis in the presence of oxidized apo E4 could lead to enhanced Aβ deposition in senile plaques. Inhibition of Aβ fibrillogenesis by apo E2 as compared to apo E3 and apo E4 support the concept of its protective role. The lower incorporation of oxidized apo E into PL could lead to less efficient binding to receptors and thus modify the lipid metabolism, rendering inefficient the lipid recycling and neuron regeneration in the brains of patients with AD. Taken all together, our results link and strengthen both the ε4 allele linkage with , and the role of oxidation in, AD. In addition, prevention of apo E oxidation by the use of antioxidants could improve lipid recycling and reduce deleterious effects of Aβ in AD brain.

Finally, the rate of oxidative modifications should be assayed by quantification of oxidized amino acid residues by mass spectrometry. It now remains to assess the *in vivo* cerebral mechanisms underlying apo E oxidation and/or myeloperoxidase functions.

Acknowledgments

This work was supported by the Ipsen Institute (Paris), the European Community MICAD research program (EN E 105200), the Region Lorraine and Parke Davis. We thank Dr. A. Dergunov (Russia) for helping to setup the apo E-phospholipid association assay.

The authors also want to thank Dr. Y. Marcel for kind gift of monoclonal anti-apo E antibodies, Drs. L. Aggerbeck, V. Shuvaev and W. Ruff for critical reading of the manuscript as well as Drs. A. Barbier, F. Mathieu and A. Visvikis for apo E production, and C. Petitdidier for expert technical assistance.

REFERENCES

1. Halliwell, B. (1992) *J. Neurochem.* **59**, 1609-1623
2. Frölich, L., and Riederer, P. (1995) *Drug. Res.*, **45**, 443-446
3. Berlett, B.S., and Stadtman, E.R. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 20313-20316
4. Smith, C.D., Carney, J.M., Starke-Reed, P.E., Oliver, C.N., Stadtman, E.R., Floyd, R.A., and Markesbery, W.R. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA **88**, 10540-10543
5. Carney, J.M. and Carney, A.M. (1994) *Life Sci.* **55**, 2097-2103
6. Strittmatter, W.J., Saunders, A., Schmechel, D., Pericakvance, M., Englhild, J., Salvesen, O.S., and Roses, A.D. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1977-1981
7. Hensley, K., Carney, J.M., Mattson, M.P., Aksenova, M., Harris, M., Wu, J.F., Floyd, R.A., and Butterfield, D.A. (1994) *Proc. Natl. Am. Soc. USA* **91**, 3270-3274
8. Montine, T.J., Huang, D.Y., Valentine, W.M., Amarnath, V., Saunders, A., Weisgraber, K.H., Graham, D.G., and Strittmatter, W.J. (1996) *J. Neuropathol. Expal. Neurol.* **55**, 202-210
9. Hunt, J.V., Bailey, J.R., Schultz, D.L., McKay, A.G., and Michinson, M.J. (1994) *FEBS Lett.* **349**, 375-379
10. Noguchi, N., Gotoh, N., and Niki, E. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1213**, 176-182
11. Mahley, R.W. (1988) *Science* **240**, 622-630
12. Poirier, J. (1994) *Trends Neurosci.* **12**, 525-530
13. Siest, G., Pillot, T., Régis-Bailly, A., Leininger-Muller, B., Steinmetz, J., Galteau, M.-M., and Visvikis, S. (1995) *Clin. Chem.* **41**, 1068-1086
14. West, H.L., Rebeck, G.W., Hyman, B.T. (1994) *Neurosci. Lett.* **175**, 46-48
15. Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Goedert, M., Weisgraber, K.H., Dong, L., Jakes, R., Huang, D.Y., Pericak-Vance, M., Schmechel, D., and Roses, A.D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11183-11186
16. Weisgraber, K.H. (1994) *Adv. Prot.Chem.* **45**, 249-302
17. Bertrand, P., Poirier, J., Oda, T., Finch, C.E., and Pasinetti, G.M. (1995) *Mol. Brain Res.* **33**, 174-178
18. Schwarzmann, A., Gregori, L., Vitek, M.P., Lyubski, S., Strittmatter, W.J., Coyle, P.K., Zagorski, M.G., Talafous, J., Eisenberg, M., Saunders, A.M., Roses, A.D., and Golgaber, D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8368-8372
19. Castano, E., Prelli, F. Wisniewski, T., Golabek, A., Kumar, R., Soto, C., and Frangione, B. (1995) *Biochem. J.* **306**, 599-604
20. Davies, K.J.A. (1987) *J. Biol. Chem.*. **262**, 9895-9901
21. Castano, E.M., Prelli, F., Pras, M., and Frangione, B. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 17610-17615
22. Marques, M.A., Tolar, M., Harmony, J.A.K., and Crutcher, K.A. (1996) *Neuroreport* **7**, 2529-2532
23. Leininger-Muller, B., Jolivalt, C., Pillot, T., Lagrange, P., Livertoux, M.H., Grassiot, M.C., Minn, A., and Siest, G. (1995) *Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease, Research and perspectives in Alzheimer's disease*, (Roses et al. eds) Springer-Verlag.
24. Drozdz, R., and Naskalski, J.W. (1988) *Acta Biochim. Pol.* **35**, 277-286
25. Heineke, J.W. (1997) *Curr. Opinion Lip.* **8**, 268-274
26. Kisilevsky, R. (1993) *Mol. Neurobiol.* **8**, 65-66
27. Jolivalt, C., Leininger-Muller, B., Drozdz, R., Naskalski, J.W., and Siest, G. (1996) *Neurosci. Lett.* **210**, 61-64
28. Pitas, R.E., Boyles, J.K., Lee, S.H., Hui, D., and Weisgraber, K.H. (1987) *J Biol Chem* **262**, 14352-14360

29. Barbier, A., Visvikis, A., Mathieu, F., Diez, L., Havekes, L., and Siest, G. (1997) *Eur. J Clin Chem Clin Biochem.* **35**, 581-589
30. Sigalov, A., Alexandrovitch, O., and Strizevskaya. E. (1991) *J. Chromatogr.* **537**, 464-468
31. Naskalski. J.W. (1980) *Acta Med. Pol.* **21**, 129-137
32. Zcliczynski, J.M., Stelmaszynska, T., Domanski, J., and Ostrowski, W. (1971), *Biochim. Biophys. Acta* **235**, 419-424
33. Keller, R.J., Halmes, N.C., Hinson, J.A., and Pumford, N.R. (1993) *Chem. Res. Toxicol.* **6**, 430-33
34. Jonas, A. (1984) *Exp. Lung Res.* **6**,255-70
35. Naiki, H., Higuchi, K., Hosokawa, M., and Takeda, T. (1989) *Anal. Biochem.* **177**, 244-249.
36. Wisniewski, T., Castano, E.M., Golabek, A., Vogel, T., and Frangione, B. (1994) *Am. J. Pathol.* **145**, 1030-1036
37. Zorich, N., Jonas, A.,and Pownall, H.J. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 8831-8837
38. Poirier, J., Davignon, J., Bouthillier, D., Kogan, S., Bertrand, P.,and Gauthier, S. (1993) **342**, 697-699
39. Miyata, M., and Smith, J.D. (1996) *Nature Genet.* **14**, 55-61
40. Davies, K.J.A., and Delsignore, M.E.(1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 9908-9913
41. Anantharamaiah, G.M., Hughes, T.A., Iqbal, M., Gawish, A., Neame, P.J., Medley, M.F., and Segrest, J.P. (1988) *J. Lip. Res.* **29**, 309-318
42. Heinecke, J.W., Li, W., Francis, G.A., and Golstein, J.A. (1993) *J. Clin. Invest.* **91**, 2866-2872
43. Dong, L.-M., Parkin, S., Trakhanov, S.D., Rupp, B., Simmons, T., Arnold, K.S., Newhouse, Y.M., Innerarity, T.L., and Weisgraber, K.H. (1996) *Nature Struct. Biol.* **3**, 718-722
44. Droge, W., Schulze-Osthoff, K., Mihm, S., Galter, D., Schenk, H., Eck, H.P., Roth, S. and Gmunder, H. (1994) *Faseb J.* **8**, 1131-1138
45. Levine, R.L., Mosoni, L., Berlett, B.S., and Stadtman, E.R. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 15036-15040
46. Webster, S., and Rogers, J. (1996) *J. Neurosci. Res.* **46**, 58-66
47. Goldgaber, D., Schwarzman, A.I., Bhasin, R., Gregori, L., Schmechel, D., Saunders, A.M., Roses, A.D., and Strittmatter, W.J. (1993) *Ann. NY Acad. Sci. USA* **695**,139-143
48. Jordan, J., Galindo, M.F., Miller, R., Reardon, C.A., Getz, G.S., and LaDu, M.J. (1998) *J. Neurosci.* **1**, 1-10
49. Golabek, A.A., Soto, C., Vogel, T., and Wisniewski, T. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 10602-10606
50. Avdulov, N.A., Chochina, S.V., Igbavboa, U., Warden, C.S., Vassiliev, A.V., and Wood, W.G. (1997) *J. Neurochem.* **69**, 1746-1752
51. May, P.C., Gitter, B.D., Waters, D.C., Simmons, L.K., Becker, G.W., Small, J.S., and Robison, P.M. (1992) *Neurobiol. Aging* **13**, 605-607
52. Ma, S., Yee, A., Brewer, H.B.Jr, Dao, S., and Potte, H. (1994) *Nature* **372**, 92-94
53. Pillot, T., Goethals, M., Vanloo, B., Lins, L., Brasseur, R., Vandekerckhove, J., and Rosseneu, M. (1997) *Eur. J. Biochem.* **243**, 650-659
54. Roses, A.D., Saunders, A.M., Corder, E.H., Pericak-Vance, M.A., Han, S.H., Einstein, G., Hulette, C., Scmechel, D.E., Hlsti, M., Huang, D., Risch, N.J., Haines, J.L., Goedert, M., Jakes, R., Dong, L.M., Weisgraber, K.H., and Strittmatter, W.J. (1995) *Drug. Res.* **45**, 413-417

55. Schmechel, D.E., Saunders, A.M., and Strittmatter, W.J. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9649-9653
56. Bales, K.R., Verina, T., Dodel, R.C., Du, Y., Altstiel, L., Bender, M., Hyslop, P., Johnstone, E.M., Little, S.P., Cummins, D.J., Piccardo, P., Ghetti, B., and Paul, S.M. (1997) *Nat. Genet*. **17**, 263-264
57. Wurtman, R.J. (1992) *Trends Neurosc*. **15**, 117-122
58. Terry, RD (1993) *Adv. Neurol.* **59**, 1-4
59. Masliah, E., Mahley, M., Ge, N., Alford, M., Veinberg, I., and Roses, A.D. (1995) *Exp. Neurol.* **136**, 107-122
60. Haas, C., Cazorla, P., De Miguel, C., Valdivieso, F., and Vazquez, J. (1997) *Biochem. J.* **325**, 169-175
61. Berg, M.J., Durrie, R., Sapirstein, V.S., and Marks, N. (1997) *Brain Res*. **752**, 72-80
62. Beffert, U., Aumont, N., Dea, D., Davignon, J., and Poirier, J. (1998) *J. Neurochem. in press*
63. Pillot, T., Goethals, M., Vanloo, B., Talusso, C., Brasseur, R., Vandekerckhove, J., Rosseneu, M., and Lins, L.,(1996) *J. Biol. Chem*. **271**, 28757-28765

FIG 1: Oxidation of the 3 apo E isoforms

Western blot analysis of apo E2, apo E3 and apo E4 exposed to increasing concentrations of oxidant (0; 0.025; 0.12 and 0.5 mM) for 30 min at room temperature. 12 % SDS-PAGE was performed using 0.3 μg of protein per lane. Immunoblots were revealed by chemiluminescence using anti-apo E antibodies (A and B) and using anti-DNP antibodies, after stripping (C) as described in the Experimental procedures.

(A) Oxidation with the MPO system at pH 4.5, (B) and (C) oxidation with the MPO system at pH 7.4.

FIG 2 : Oxidation of the 3 apo E isoforms

Variation in the apparent molecular weight of the 3 apo E isoforms after oxidation at pH 7.4. Data are the mean ± sem from 4 separate experiments.

*$p< 0.05$ and **$p< 0.01$. Statistical analysis was carried out using a Student's t-test against the corresponding values for apo E4. Results represent the mean ± sem of 4 determinations.

FIG 3: HPLC profiles of apo E4 before and after oxidation.

Apo E4 was analyzed by RP-HPLC as described in Materials and Methods. Peaks were detected at 220 nm. Analytical RP-HPLC was performed on a RPC-4 column (5μ, 4.6x150 mm, Vydac) under a gradient of acetonitrile in 0.1% TFA, with a flow rate of 1 ml/min from 20 to 40 % during 10 min followed by a gradient from 40 to 60 % during 30 minutes. Absorbance was measured at 220 nm.

20 μg of protein was injected. (A) apo E4 before oxidation, (B) apo E4 after oxidation with 0.05 mM of oxidant at pH 4.5, (C) apo E4 after oxidation with 0.05 mM of oxidant at pH 7.4, (D) apo E4 after oxidation with 0.15 mM of oxidant at pH 7.4. Oxidation was carried out using the MPO system for 30 minutes at room temperature. RT : retention time.

FIG 4: Thioflavine T assays of $A\beta_{1-40}$ fibrillation

$A\beta_{1-40}$ fibrillation in the absence or in the presence of non oxidized apo E or oxidized apo E. Apo E was oxidized by the MPO system at pH 7.4 at an intermediate concentration of 0.3 mM of oxidant for 30 minutes at room temperature and incubated 24 h with Aβ, using an Aβ/apo E molar ratio of 100/1.

E2: Apo E2; E2 ox: oxidized apo E2; E3: Apo E3; E3 ox: oxidized apo E3; E4: Apo E4; E4 ox: oxidized apo E4. The relative fluorescence of Aβ at the time 0 was 35.

Fluorescence intensities were measured an a Cytofluor 2300 spectrofluorimeter with λex = 440/20 and λem = 480/20 nm. *$p< 0.05$ and **$p< 0.01$. Statistical analysis was carried out using a Student's t-test against the corresponding values for Aβ alone. Results represent the mean ± sem of 12 determinations.

FIG 5: Apo E incorporation in DPPC complexes

(A) Elution profiles obtained on Sephacryl HR300 of apo AI (AI), apo E2 (E2), apo E3 (E3) and apo E4 (E4). Complexes were formed by a detergent method with DPPC/protein ratio (w/w) of 3/1 as described in the Experimental procedures.

(B) Incorporation ratios of apo E in DPPC discs before (black bars) and after (grey bars) oxidation by MPO system with 0.3 mM of oxidant. Incorporation ratios were expressed as percentage of the yield of protein incorporation in lipoprotein complexes, estimated by absorbance at 280 nm, as compared to the initial amount of protein used in the assay.

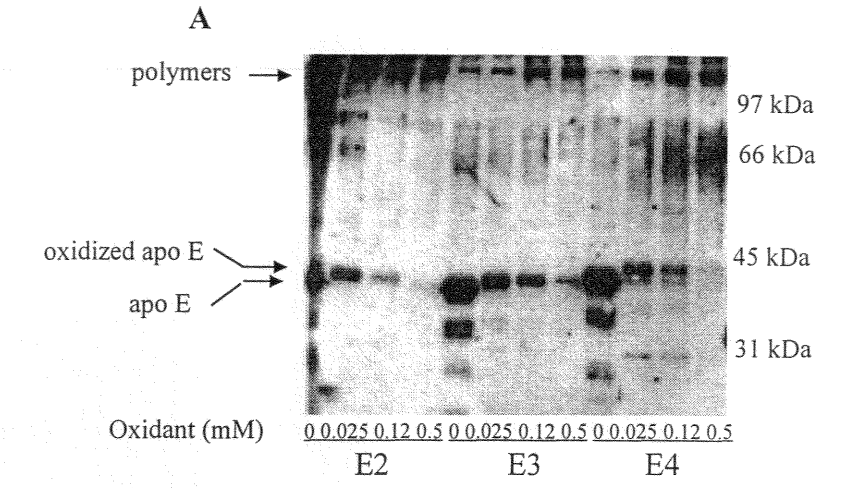
(C) DPPC/apo E weight ratios of apo E-DPPC complexes, before (black bars) and after (grey bars) oxidation of apo E. Apo E isoforms were exposed to the MPO system with 0.3 mM oxidant at pH 7.4 for 30 minutes at room temperature before incorporation in DPPC discs. Lipid content was measured by an enzymatic colorimetric assay, while apo E content was estimated from absorbance at 280 nm.
Results represent the mean ± sem of 3 determinations. *p< 0.05 and **p< 0.01. Statistical analysis was carried out using a Student's t-test against corresponding values for each isoform before oxidation. #p< 0.05. Statistical analysis was carried out using a Student's t-test against corresponding values for oxidized apo E2.

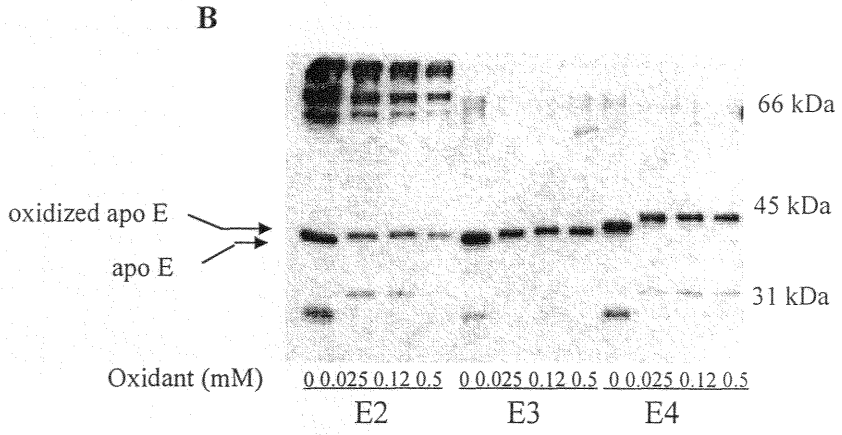
FIG 6: Oxidation of apo E-DPPC complexes.

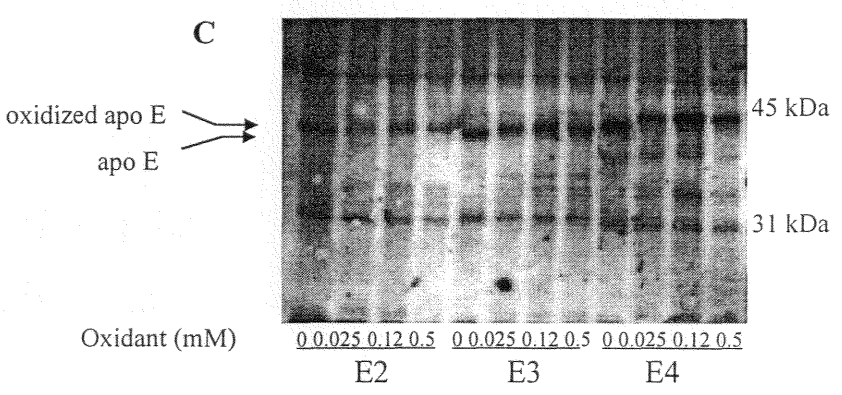
Western analysis showing oxidation of free apo E and apo E in discoidal complexes. E2: apo E2; E2/DPPC: apo E2 in DPPC dics; E3: apo E3; E3/DPPC: apo E3 in DPPC dics; E4: apo E4; E4/DPPC: apo E4 in DPPC dics. The different samples were exposed to increased concentrations of oxidant (0; 0.025 and 0.5 mM) at pH 7.4 for 30 min at room temperature. 12 % SDS-PAGE was performed using 0.3 μg of protein per lane. The immunoblot was revealed by chemiluminescence using anti-apo E antibodies as described in the Experimental procedures.

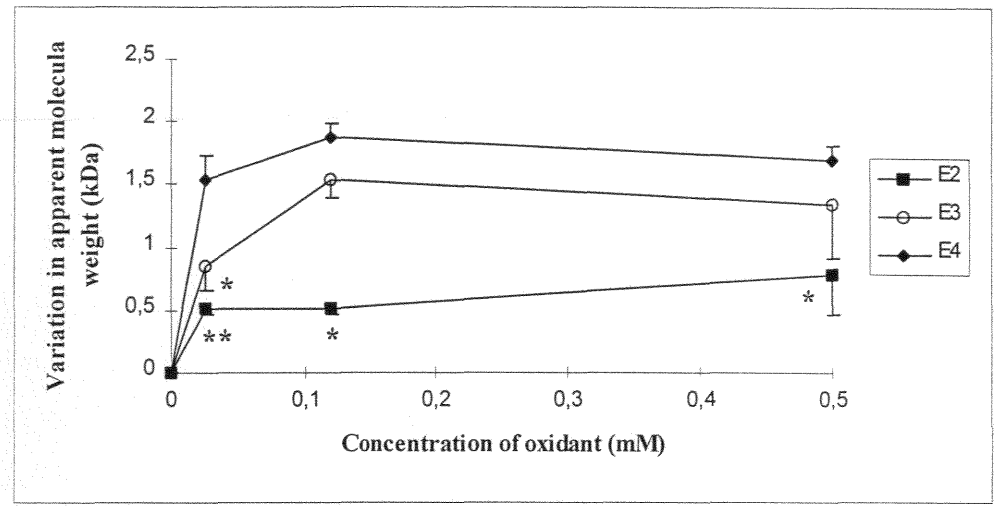
FIG 7: Thioflavine T assays of $A\beta_{1-40}$ fibrillation in presence of apo E-DPPC complexes

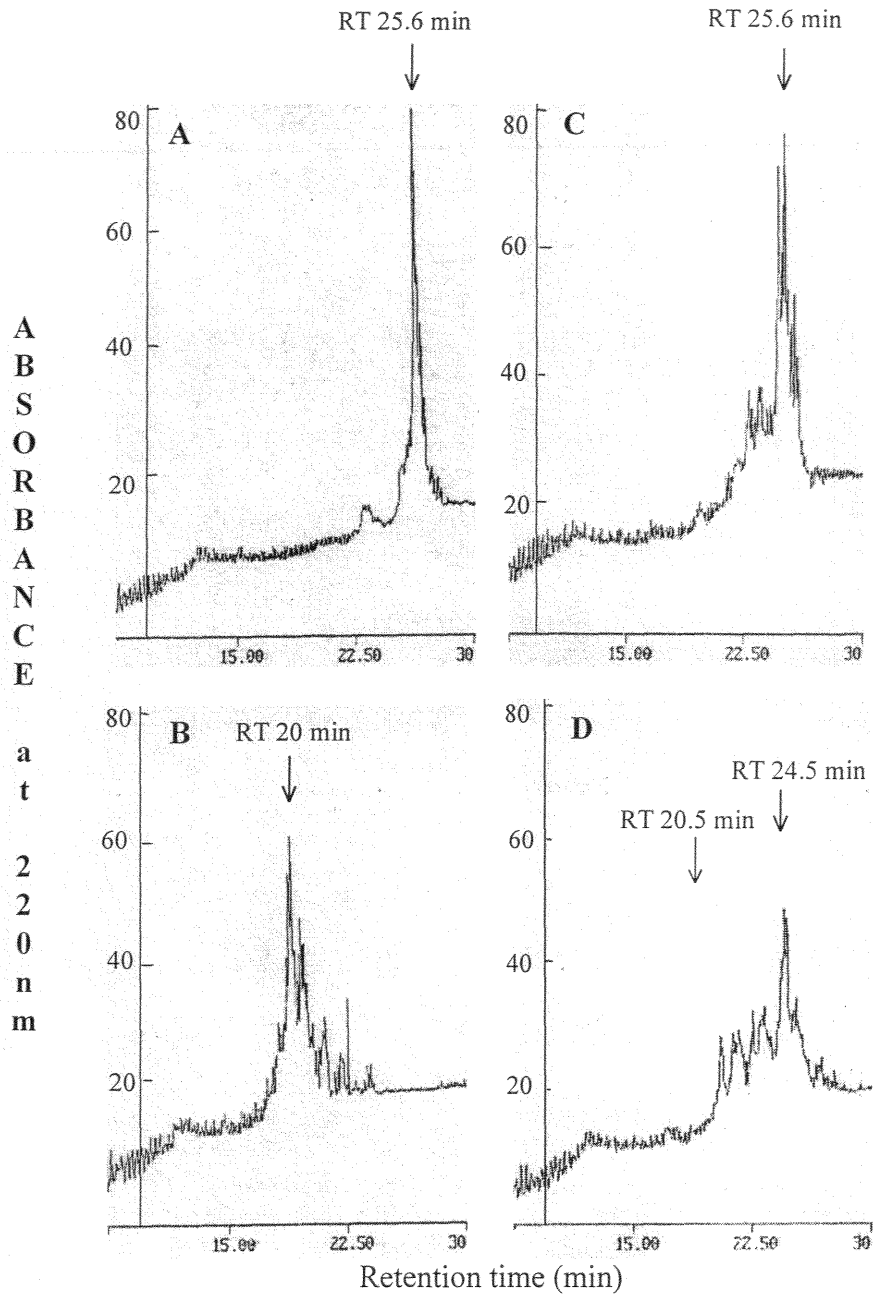
$A\beta_{1-40}$ fibrillation in the absence or in the presence of apo E in discoidal complexes, before or after oxidation. Apo E in DPPC complexes were oxidized by the MPO system at pH 7.4 at an intermediate concentration of 0.3 mM of oxidant for 30 minutes at room temperature and then incubated 24 h with Aβ, according to an Aβ/apo E molar ratio of 100/1.
DPPC: DPPC discs without apo E; E2/DPPC: apo E2 in DPPC dics; E2/DPPC ox: oxidized apo E2-DPPC complexes; E3/DPPC: apo E3 in DPPC dics; E3/DPPC ox: oxidized apo E3-DPPC complexes; E4/DPPC: apo E4 in DPPC dics; E4/DPPC ox: oxidized apo E4-DPPC complexes. The relative fluorescence of Aβ at the time 0 was 90.
Fluorescence intensities were obtained using a Cytofluor 2300 spectrofluorimeter with λex = 440/20 and λem = 480/20 nm. *p< 0.05 and **p< 0.01. Statistical analysis was carried out using a Student's t-test against the corresponding values for Aβ alone (n=11, for apo E/DPPC; n=6 for E/DPPC ox).

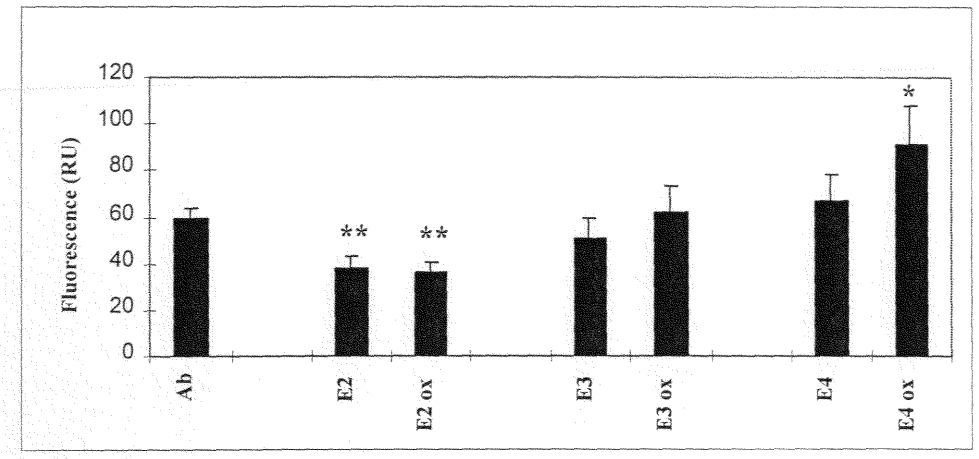

A
polymers
97 kDa
66 kDa
oxidized apo E
apo E
45 kDa
31 kDa
Oxidant (mM)
0 0.025 0.12 0.5 0 0.025 0.12 0.5 0 0.025 0.12 0.5
E2
E3
E4


B
66 kDa
oxidized apo E
apo E
45 kDa
31 kDa
Oxidant (mM)
0 0.025 0.12 0.5 0 0.025 0.12 0.5 0 0.025 0.12 0.5
E2
E3
E4

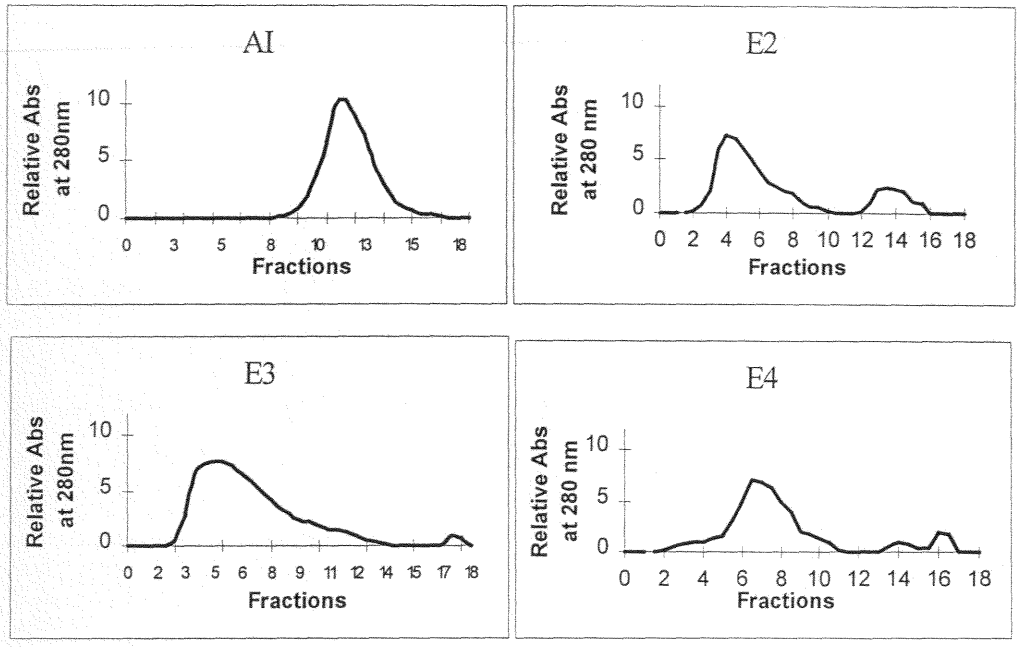

C
oxidized apo E
apo E
45 kDa
31 kDa
Oxidant (mM)
0 0.025 0.12 0.5 0 0.025 0.12 0.5 0 0.025 0.12 0.5
E2
E3
E4


Variation in apparent molecula weight (kDa)
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
Concentration of oxidant (mM)
E2
E3
E4
*
**
*
*

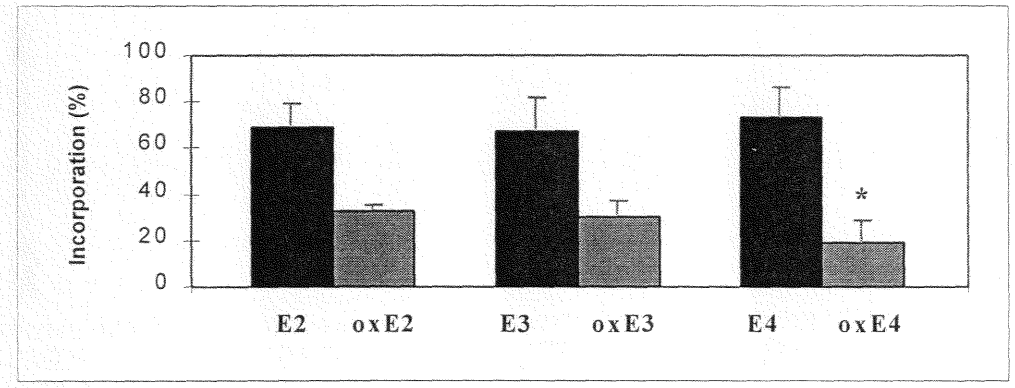

RT 25.6 min
RT 25.6 min
A
C
B
RT 20 min
D
RT 24.5 min
RT 20.5 min
80
60
40
20
15.00
22.50
30
ABSORBANCE at 220nm
Retention time (min)


Fluorescence (RU)
120
100
80
60
40
20
0
**
**
*
Ab
E2
E2 ox
E3
E3 ox
E4
E4 ox

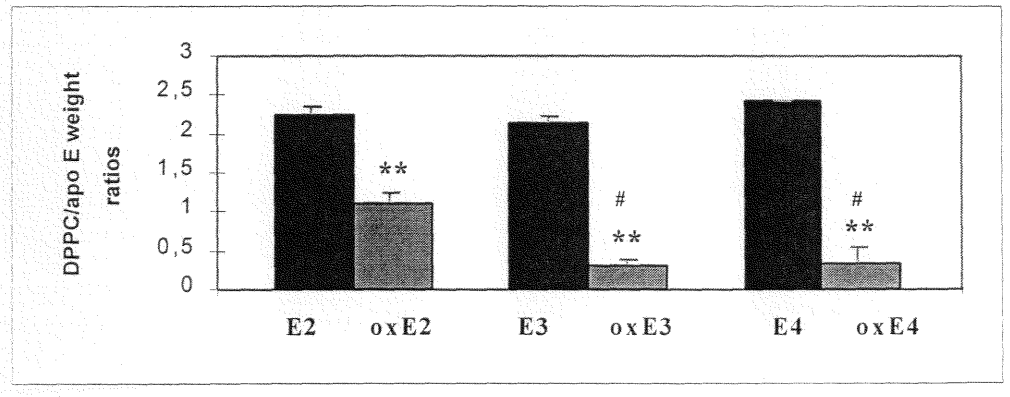
A

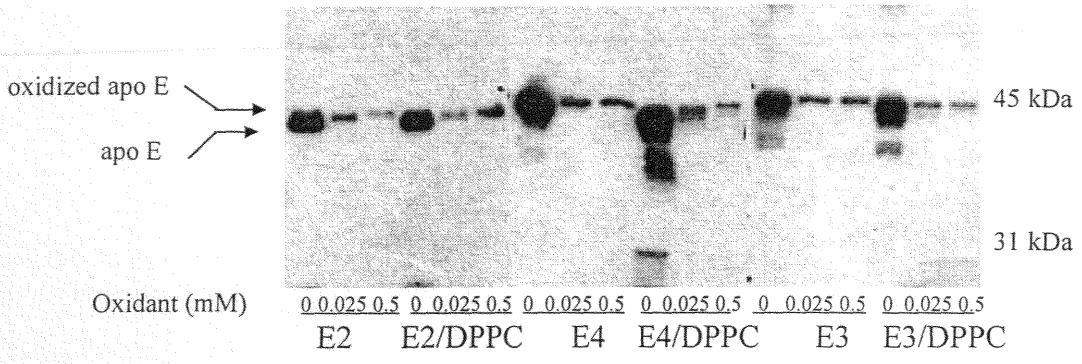

AI
Relative Abs at 280nm
10
5
0
0 3 5 8 10 13 15 18
Fractions
E2
Relative Abs at 280 nm
10
5
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18
Fractions
E3
Relative Abs at 280nm
10
5
0
0 2 3 5 6 8 9 11 12 14 15 17 18
Fractions
E4
Relative Abs at 280 nm
10
5
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18
Fractions

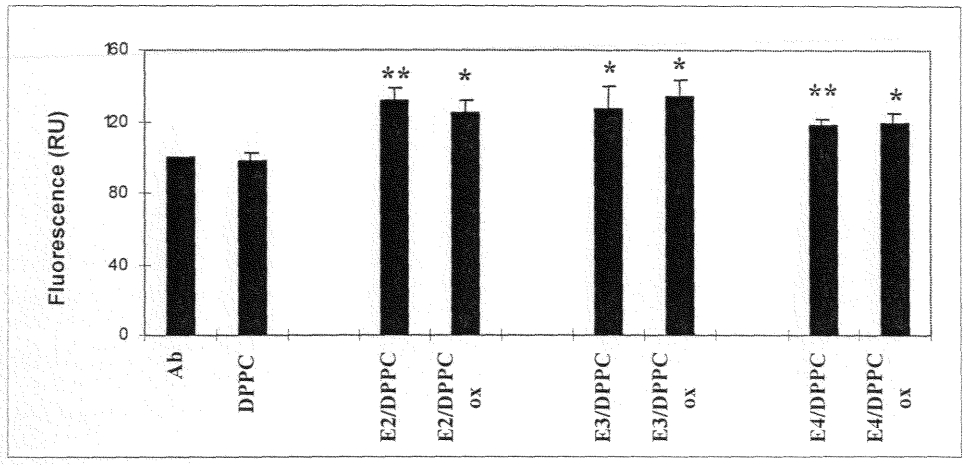
B


Incorporation (%)
100
80
60
40
20
0
*
E2
oxE2
E3
oxE3
E4
oxE4

C


DPPC/apo E weight ratios
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
**
#
**
#
**
E2
oxE2
E3
oxE3
E4
oxE4


oxidized apo E
apo E
45 kDa
31 kDa
Oxidant (mM)
0 0.025 0.5 0 0.025 0.5 0 0.025 0.5 0 0.025 0.5 0 0.025 0.5 0 0.025 0.5
E2 E2/DPPC E4 E4/DPPC E3 E3/DPPC


Fluorescence (RU)
160
120
80
40
0
**
*
*
*
**
*
Ab
DPPC
E2/DPPC
E2/DPPC ox
E3/DPPC
E3/DPPC ox
E4/DPPC
E4/DPPC ox

III. Publication n°3:

Oxidation of human apolipoprotein E: isoforms susceptibility and protection with *Ginkgo biloba* EGB 761 extract. (1998)
In *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) study: Lesson from cell biology. Advances in EGb 761 research, L. Packer, Y. Christen (Eds), 7, Paris Elsevier, sous presse

Au terme des différentes étapes précédentes, nous avons montré que l'oxydation des 3 isoformes d'apo E par le système enzymatique MPO/H_2O_2/Cl^- conduit à des modifications isoforme-dépendantes de la protéine qui s'accompagnent d'une augmentation du poids moléculaire apparent. Dans le but d'envisager une approche thérapeutique visant à contrer les conséquences de l'oxydation, nous avons évalué le rôle protecteur de substances antioxydantes, notamment l'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba.*

L'incubation de l'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba* avec l'apo E recombinante avant l'ajout du système MPO/H_2O_2/Cl^- conduit à une réduction de la variation de poids moléculaire apparent de l'apo E sur les profils d'électrophorèse de la figure 4 (Publication n°3). Cette réduction est observée dès les concentrations de 100 µg/ml et elle est d'autant plus importante que la concentration en EGb 761 augmente. Pour une concentration de 600 µg/ml de EGb 761, le déplacement électrophorétique observé après oxydation est réduit d'environ 40 % pour les 3 isoformes d'apo E. Au-delà d'une concentration de 600 µg/ml d'EGb 761, la réduction du déplacement électrophorétique ne varie plus.
Cette réduction suggére une diminution du degré d'oxydation de la protéine.

Dans notre modèle d'étude, l'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba* prévient donc l'oxydation de l'apo E par le système enzymatique de la MPO. Ces résultats confirment donc un vaste

ensemble de travaux montrant un rôle antioxydant de l'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba* ou de l'un de ses constituants. Monboisse et al. (1992) ont montré que l'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba* inhibe la production de RL produits par les polynucléaires neutrophiles, ce qui constitue la démonstration de son effet inhibiteur sur la production de RL par le système de la MPO.

L'action de l'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba* a été comparée à un antioxydant classique, l'α-tocophérol et une réduction de la variation du poids moléculaire apparent a également été observée. Ces résultats suggèrent un effet protecteur de 40 % de l'apo E recombinante vis à vis de l'oxydation *in vitro* par le système de la MPO.

Cet effet protecteur constitue une première approche au niveau moléculaire permettant de valider 2 études cliniques récentes qui montrent un ralentissement de la progression de la MA après traitement des patients par l'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba* d'une part (Le Bars et al., 1997), et par la vitamine E ou la sélégiline d'autre part (Sano et al., 1997).

Dans cet article, nous avons montré, que

a) l'oxydation *in vitro* de l'apo E par le système MPO peut être contrecarrée par des substances antioxydantes,

b) et que l'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba* permet une protection de l'apo E recombinante contre l'oxydation de l'ordre de 40 %.

OXIDATION OF HUMAN APOLIPOPROTEIN E: ISOFORMS SUSCEPTIBILITY AND PROTECTION WITH *GINKGO BILOBA* EGb 761 EXTRACT

B. LEININGER-MULLER, C. JOLIVALT, P. BERTRAND and G. SIEST

Centre du Médicament, Université Henri Poincaré Nancy I,

30 rue Lionnois, 54000 NANCY, F

Author to whom correspondence should be adressed :

G. SIEST. Centre du Médicament, Université Henri Poincaré Nancy I, 30 rue Lionnois, 54000 NANCY, F. Tel 33 (0) 3 83 17 88 34 ; Fax 33 (0) 3 83 32 13 22

Running Title :

Apolipoprotein E oxidation and Ginkgo *biloba* extract.

Summary

Apolipoprotein E (apo E) is a polymorphic protein whose a specific isoform, apo E4, has been widely associated with Alzheimer's disease (AD). Apo E may be linked with this disease by its isoform-specific interaction with lipids or proteins of amyloid plaques. On the other hand, oxidative stress has been proposed to be linked to the development of AD. In the human brain, we recently detected myeloperoxidase (MPO), a heme protein known to be implicated in inflammation. In presence of H_2O_2 and Cl^-, MPO produces hypochlorite that oxidizes proteins.

Using the MPO enzymatic system, we now report that the oxidation of the three recombinant apo E isoforms is differential, with apo E4 being more susceptible than apo E3, itself more than apo E2. In order to study whether the association of oxidized apo E with lipids can be modified, we prepared well-defined apo E-phospholipids complexes. The more the isoform is susceptible to oxidation, the more its ability to interact with phospholipids is reduced. The effects of the *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) on oxidation of each apo E isoform was investigated in the concentration range from 100 to 600 µg/ml. We observed a 40% relative protection with EGb 761. Moreover, the more the isoform is susceptible to oxidation, the more the concentration of EGb 761 necessary to protect the protein against oxidation is low. Taken all together, these results could explain the high linkage of ε4 allele with AD. The structural alteration of the more oxidizable apo E4 could lead to inefficient lipid recycling in the brain, a phenomenon implicating in the development of AD, that EGb 761 could prevent.

Apolipoprotein E / oxidation / phospholipids / Ginkgo biloba extract (EGb 761)

Introduction

Human apolipoprotein E (apo E) is a polymorphic protein whose one specific isoform has been widely associated with Alzheimer's disease (AD). The three main apo E isoforms, E2, E3 and E4 are the products of three alleles ε2, ε3 and ε4, differing from each other by a single mutation (Mahley, 1988). Apo E is implicated in lipid homeostasis. It is the major apolipoprotein synthetized in the brain where its main function is to locally recycle cholesterol and phospholipids in response to injury (Poirier, 1994). Apo E has been localized in senile plaques and neurofibrillary tangles (Namba *et al.*, 1991), the hallmarks of AD. In addition, apo E binds directly to amyloid-β peptide (Aβ), the principal constituent of senile plaques (Strittmatter *et al.*, 1993), as well as tau protein (Strittmatter *et al.*, 1994). Apo E came into the field of AD research more particularly after the demonstration of the high linkage of ε4 allele with AD (for review, see Poirier, 1994; Siest *et al.*, 1995).

Apo E is a key-component of successful synaptic plasticity (Poirier, 1994). It may be functionally linked to AD either by its decreased levels in AD brains (Bertrand *et al.*, 1995), or by its isoform-specific interaction with lipids (Weisgraber, 1994), Aβ (Strittmatter *et al.*, 1993), tau (Strittmatter *et al.*, 1994), as well as various other proteins. Furthermore, these hypothesis may be reinforced or correlated with a differential degradation of apo E isoforms due in particular to alterations in oxidative metabolism. Elevated oxidation and/or decreased protection against oxidation have been proposed to be linked to the development of the disease (Volicer and Crino, 1990), and oxidized proteins accumulate in AD brain (Smith *et al.*, 1991). As compared with other tissues, the cerebral tissue is highly susceptible to free radicals damage as a consequence

of high oxygen consumption rate and its relative paucity of enzymatic (superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase) and non enzymatic (vitamin E, C) antioxidants. Among the oxido-reduction enzymes producing free radicals, the metabolic processes involved in the biotransformation of xenobiotics can generate toxic reactive metabolites and/or free radicals in the brain. The cerebral tissue contains numerous enzymes involved in xenobiotic metabolism found primarily in the liver, albeit at relatively low specific activities (Minn *et al.*, 1991). In the rat brain, these enzymes preferentially localize at the blood-brain barrier (Ghersi-Egea *et al.*, 1988), and other interfaces like leptomeninges and choroid plexus (Leininger-Muller *et al.*, 1994). We previously reported that superoxide radical formation is largely mediated by NADPH cytochrome P450 (*c*) reductase reductive pathway in the rat brain (Ghersi-Egea *et al.*, 1991) and that the free radicals produced lead to a diminution of the cytochrome P450 dependent activity itself. Human brain exhibits glutathione *S*-transferase activities about 10 times higher than the rat brain (Ghersi-Egea *et al.*, 1993). While comparing drug-metabolizing enzymes activities in AD and control brains, we measured increased glutathione *S*-transferase activities in AD samples (Leininger-Muller *et al.*, submitted). Among other enzymes catalysing oxidation reactions, we detected myeloperoxidase (MPO) in the human brain (Jolivalt *et al.*, 1996). This heme protein is commonly localized to the neutrophils. In the presence of H_2O_2 and Cl^-, it catalyses peroxidation of chloride to hypochlorite which then rapidly interacts with oxidizable moieties of proteins (Drozdz and Naskalski, 1988). This so-called MPO enzymatic system is known to be important in inflammatory processes (Ramos *et al.*, 1995). In the AD brain, it

could be implicated in the formation of amyloid plaques which also depends from inflammatory processes (Kisilevsky, 1993).

We investigated *in vitro* the susceptibility of apo E3 and E4 to free radicals produced by a strong vanadyl/hydrogen peroxide oxidizing system. Under these conditions, both apo E isoforms were fragmented and/or polymerized (Leininger-Muller *et al.*, 1995). However, such a strong oxidation of apo E is unlikely to mimic progressive oxidative attack on protein as could occur *in vivo*. We thus studied apo E oxidation by the milder MPO oxidizing system in a more "physiological" manner. In agreement with the reported in vitro high susceptibility of apo E to oxidation as compared with albumin (Jolivalt *et al.*, 1996), apo E has been proposed to be a target of oxidative process taking place in AD (Montine *et al.*, 1996). In addition, most of the physiologically apo E is complexed to lipids as to form high density lipoproteins (HDL)-like particles in cerebrospinal fluid (Pitas *et al.*, 1987). We thus used well-defined associated apo E-phospholipids (PL) complexes which allowed us to study whether the association of oxidized apo E with lipids can be modified.

Finally, Monboisse *et al.* (1992) showed that the Ginkgo *biloba* EGb 761 extract inhibits the production of free radicals produced by human neutrophils. We studied whether this extract, as well as vitamin E, could prevent apo E oxidation. We now report evidence that oxidation of apo E is isoform-specific, has functional consequences, and can be prevented by EGb 761.

Materials and methods

The 3 isoforms of recombinant human apo E (E2, E3, E4) cDNAs were cloned in modified pARHS-2 and produced in *E. Coli* BL21 (DE3) as a fusion protein of about 44 kDa. This 44 kDa apo E results from the fusion of apo E and a peptide containing a polyhistidine sequence, which allows the recombinant proteins to be purified by single-step affinity chromatography on nickel gel (Barbier *et al.*, 1997).

In vitro oxidation assays of the recombinant proteins with MPO, isolated from polymorphonuclear neutrophils, were performed as previously described (Jolivalt *et al.*, 1996), with slight modifications of pH adapted to the formation of apo E-PL discoidal complexes. Chloramines were formed by the reaction of MPO in 55 mM phosphate buffer (pH 4.5), 100mM NaCl and 10 mM leucine with different concentrations of H_2O_2 (0, 1.25, 4, 5.75, 7.6 mM) (fig. 1). Then, native apo E was oxidized by the chloramines at physiological pH (Zcliczynski et al., 1971). Proteins were submitted to SDS-PAGE in non-reducing conditions and tranferred to PVDF (Millipore) membranes.

The effects of EGb 761 on oxidation of each apo E isoform was investigated in the concentration range of 100 to 600 µg/ml. EGb 761 was added to the incubation medium with apo E, prior to the MPO enzymatic system. Each assay with EGb 761 was made for both 0.05 mM and 0.5 mM of oxidant. In the same manner, assays were performed with vitamin E at concentration between 20 and 100 µM.

Discoidal complexes were prepared by a detergent reconstitution method adapted from Jonas (1984). The phospholipids used in the present study, dipalmitoyl phosphatidyl-choline (DPPC, Sigma), was dispersed in sodium cholate and incubated with apo E in 3/1 (w/w) ratio of DPPC/protein. The spontaneously formed discs were isolated by

adsorption of cholate on Bio Beads (Biorad). The solution containing the complexes was eluted by gel filtration on Sephacryl HR300 (Pharmacia) in order to separate apo E-DPPC discs from free apo E and free phospholipids. When required the apo E-DPPC complexes were concentrated by centrifugation on Centriplus 100 (Amicon). Apo E-DPPC complexes formed were detected at 280 nm for their protein content.

The protein carbonyl content was measured by forming labelled protein hydrazone derivatives using 2,4-dinitrophenyl hydrazine (DNPH) (Keller *et al.*, 1993). The dinitrophenyl moities formed on apo E were revealed by enhanced chemiluminescence (ECL, Pierce) after blot incubation with rabbit anti-DNP antibodies (Sigma) followed by incubation with HRP-labelled anti-rabbit antibodies (Sigma). Alternatively, blots were incubated with monoclonal anti-apo E antibodies (kind gift from Dr. Y. Marcel, Canada) followed by incubation with secondary anti-mouse antibodies labelled with HRP (Sigma), and then revealed by ECL.

Results

Upon oxidation, the apo E-specific band migrated with a higher apparent molecular weight (MW) (fig. 2A). These shifts were visualized for the 3 apo E isoforms, and are differential between the apo E isoforms. The difference observed between the main apo E band before and after oxidation is more important for apo E4 than apo E3 than apo E2 (fig. 2B).

The elution profiles of apo E-DPPC complexes are shown on figure 3A. Materiel eluted up to the fraction 10 corresponds to the apo E-DPPC complexes, while fractions eluting after the number 10 are constitued of free apo E. As we previously reported (Bertrand *et*

al., 1996), 55 to 62% of all three isoforms was incorporated into the discs. When apo E is oxidized, yields of protein complexed to DPPC are 17 and 33% for apo E3 and apo E2, respectively, and reaches as little as 0.17% for apo E4 (fig. 3B).

Addition of EGb 761 in the incubation medium leads to a diminution of the shift of the apo E band, thus suggesting a diminution of the rate of oxidation of the protein (fig. 4A). This diminution of the shift near to the level of the band of the non oxidized apo E, used as a control, varies with the concentration of EGb 761. The minimal concentration of EGb 761 required to reduce the shift is different from one isoform to another. The concentration of 100 µg/ml is sufficient to reduce the shift of the apo E4 band, while rates of 300 µg/ml are needed for both apo E2 and apo E3. As compared with the oxidized apo E, EGb 761 at 600 µg/ml induces a mean decrease of 40% of the molecular weight shift for the 3 isoforms (fig. 4B). The effects of EGb 761 were compared with those of vitamin E (fig. 5). When vitamin E is added to the oxidation reaction, the electrophoretic profile is approximatively the same than with EGb 761. EGb 761 or vitamin E alone had no effect on the electrophoretic profile of apo E (data not shown).

Discussion

The apo E allele specificity linked to pathological aging points to the differential susceptibility of apo E isoforms to oxidation. Indeed, we showed that apo E4 is more susceptible to MPO oxidation than apo E3, itself more than apo E2. This differential oxidation is characterized by a differential mobility in SDS-PAGE. The difference between the 3 apo E isoforms could be due to a difference in their structure, leading to a

differential exposition of oxidizable amino acid residues. It is known that discrete amino acid residues may mediate isoform-specific conformational changes which alter apo E interaction with lipids and receptors (Weisgraber, 1994, Dong *et al.*, 1996). Preliminary results obtained by reverse phase-HPLC indicate that the apo E structural modifications after oxidation are characterized by the decrease of the retention time of apo E3. Furthermore, the differential susceptibility of apo E isoforms to oxidation may be related to their primary structure as they differ in their cysteine content: cystein residues may act as internal antioxidants, and the cysteine content of apo E4, E3 and E2 is respectively of 0, 1 and 2 (Mahley, 1988). In addition, methionine residues were recently proposed to also act as internal antioxidants in proteins (Levine *et al.*, 1996). Depending on the exposure of the methionine residues, we might expect a differential capacity of apo E isoforms to resist to reactive species attack. Cyanogen bromide cleavage experiments are in progress to precise the impact of methionine residues in apo E oxidation. Such properties could correlate with the differential antioxidant properties of apo E isoforms (Miyata and Smith, 1996).

As the oxidative modifications of apo E suggested modification of its structure, we looked at its ability to interact with phospholipids. The more the apo E isoform is susceptible to oxidation, the more its ability to form DPPC complexes is diminished. It must be kept in mind that apo E plays its role in lipid recycling by binding to several cell membrane receptors (Mahley, 1988). This binding can only be achieved if apo E is embedded in an adequate lipidic environment. In addition, the impairment of the association of apo E with phospholipid due to oxidation seems to be specific, since the oxidation of apo E does not modify the effect of apo E on Aβ fibrillogenesis (Jolivalt *et*

al., *in preparation*). Thus, oxidation of apo E leads to functional consequences which could dramatically impair phospholipid recycling in the brain. This hypothesis is in agreement with the known important loss of cerebral choline, cholesterol and phospholipids in AD (Wurtman, 1992). This reinforces the importance antioxidants should have, by preventing the oxidation of this protein.

The resulting diminution of the shift of the apo E band when EGb 761 or vitamin E are added to the assays first means that the oxidative modifications of the protein can be prevented by antioxidants. Secondly, it suggests a protective role of the two antioxidants. In the case of EGb 761, this protection takes place at a concentration and isoform-dependent manner. The more the isoform is susceptible to oxidation, the more the concentration of EGb 761 necessary to prevent oxidation is low. Moreover, at the concentrations used in this study, vitamin E seems to have effects similar to EGb 761. Thus, we show here that among the three isoforms of apo E, apo E4 is the most susceptible to oxidation, for which lower EGb 761 concentrations are required for protection against free radicals attack, and is the isoform whose oxidation has the strongest functional consequence in terms of phospholipids association. In addition, apo E4 has a weaker antioxidant capacity than apo E3 and E2 (Miyata and Smith, 1996). Recently, it has been shown that the hypoxia-induced increase of choline release can be suppressed by bilobalide, a component of *Ginkgo biloba* (Klein *et al.*, 1997). Yet, it has been suggested that the loss of acetylcholine resulting from loss of choline could be an important factor leading to development of AD (Wurtman, 1992), and the loss of the cholinergic markers characteristic of AD are amplified by the ε4 allele (Poirier *et al.*, 1995). Taken all together, these observations could explain the high linkage of the ε4

allele with AD, and strengthen the impact of oxidative stress in the development of the disease. EGb 761, by inhibiting the formation of free radicals, could protect against neurodegeneration (fig. 6). It now remains to determine whether the oxidation of apo E effectively leads to an abnormal phospholid metabolism in neuronal cells cultures, that can be protected by EGb 761.

Finally, the ultimate goal of this project may be a clinical study. A recent study with a daily administration of selegiline and vitamin E suggests that antioxidants would slow the decline in AD (Sano *et al.*, 1997). EGb 761 is a well known antioxidant. Clinical studies indicated that chronically-administrered EGb 761 is useful in certain forms of « disturbances of cerebral function », especially in the elderly patient (DeFeudis, 1991). However, to our knowledge, no specific study with AD has been reported.

Acknowledgements: This study was supported by a grant from Ipsen Foundation (Paris), the Pôle Interuniversitaire Regional, the Region Lorraine and Parke Davis. We thank Dr. A. Dergunov (Russia) for helping to setup the apo E-phospholipid association assay.

References

Barbier A, Visvikis A, Mathieu F, Diez L, Havekes L, Siest G (1997) Characterization of three human apolipoprotein E isoforms (E2, E3 and E4) expressed in *Escherichia coli*. Eur. J *Clin Chem Clin Biochem*. **35**, 581-589

Bertrand P, Poirier J, Oda T, Finch CE, Pasinetti GM (1995) Association of apolipoprotein E genotype with brain levels of apolipoprotein E and apolipoprotein J (clusterin) in alzheimer disease. *Mol Brain Res* **33**, 174-178

Bertrand P, Shuvaev V, Leininger-Muller B, Jolivalt C, Brahimi F, Dergunov A, Visvikis A, Mathieu F, Barbier A, Siest G (1997) Apolipoprotein E interaction with

amyloid-β : Influence of apolipoprotein E association with phospholipids and heparin. *Facts Res Geront* **4**, 470-472

DeFeudis FV (1991) Clinical studies and clinical pharmacology with EGb 761. *In: Ginkgo biloba extract (EGb 761): pharmacological activities and clinical applications* (DeFeudis ed), Elsevier, Paris, 97-138

Dong LM, Parkin S, Trakhanov SD, Rupp B, Simmons T, Arnold KS, Newhouse YM, Innerarity TL, Weisgraber,KH (1996) Novel mechanism for defective receptor binding of apolipoprotein E2 in type III hyperlipoproteinemia. *Nature Struct Biol* **3**,718-722

Drozdz R, Naskalski JW (1988) Action of myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system on the egg white lysozyme. *Acta Biochim Pol* **35**, 277-286

Ghersi-Egea J F, Livertoux MH, Minn A, Perrin R, Siest G. (1991) Enzyme-mediated superoxide radical formation initiated by exogenous molecules in rat brain preparations, *Toxicol Appl Pharmacol* **110**, 107-117

Ghersi-Egea JF, Perrin R, Leininger-Muller B, Grassiot MC, Jeandel C, Floquet J, Cuny G, Siest G, Minn A (1993) Subcellular localization of cytochrome P450, and activities of several enzymes responsible for drug metabolism in the human brain. *Biochem Pharmacol* **45**, 647-658

Ghersi-Egea JF, Tayarani Y, Lefauconnier JM, Minn,A (1988) Enzymatic protection of the brain: role of 1-naphthol-UDP-glucuronosyltransferase from cerebral tissue and cerebral microvessels. *In : Cellular and Molecular aspects of Glucuronidation*, (Siest G, Magdalou J, Burchell B, eds), Colloque INSERM/John Libbey, 169-175.

Jolivalt C, Leininger-Muller B, Drozdz R, Naskalski JW, Siest G (1996) Apolipoprotein E is highly susceptible to oxidation by myeloperoxidase, an enzyme present in the brain. *Neurosci Lett* **210,** 61-64

Jonas A (1984) A review of plasma apolipoprotein A-I interaction with phosphatidylcholines. *Exp Lung Res* **6**, 255-270.

Keller RJ, Halmes NC, Hinson JA, Pumford NR (1993) Immunochemical detection of oxidized proteins. *Chem Res Toxicol* **6**, 430-33

Kisilevsky R (1993) Inflammation-associated amyloidogenesis. Lessons for Alzheimer's amyloidogenesis. *Mol Neurobiol* **8,** 65-66

Klein J, Chatterjee SS, Löffelholz K (1997) Phospholipid breakdown and choline release under hypoxic conditions : inhibition by bilobalide, a constituent of *Ginkgo biloba. Brain Res* **755**, 347-350

Leininger-Muller B, Jolivalt C, Pillot T, Lagrange P, Livertoux MH, Grassiot MC, Minn A, Siest G (1995) Apolipoprotein E oxidation and functional consequences. *In : Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease, Research and perspectives in Alzheimer's disease* (Roses et al. eds) Springer-Verlag

Leininger-Muller B, Ghersi-Egea JF, Siest G, Minn A (1994) Induction and immunological characterization of the uridine diphosphate-glucuronosyltransferase conjugating 1-naphthol in the rat choroid plexus. *Neurosci Lett* **175**, 37-40

Levine RL, Mosoni L, Berlett BS, Stadtman ER (1996) Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci (USA)* **93**, 15036-15040

Mahley RW (1988) Apolipoprotein E : cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* **240**, 622-630

Minn A, Ghersi-Egea JF, Perrin R, Leininger B, Siest G (1991) Drug metabolizing enzymes in the brain and cerebral microvessels. *Brain Res Rev* **16**, 65-82

Miyata M and Smith JD (1996) Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and β-amyloid peptides. *Nature Genet* **14**, 55-61

Monboisse JC, Cgarnotel R, Droy-Lefaix MT and Borel JP (1993) A *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) inhibits superoxide-anion production by human neutrophils. *In: Advances in Ginkgo biloba research, vol 2, Ginkgo biloba extract (EGb 761) as a free radical scavenger* (Ferradini C, Droy-Lefaix MT, Christen Y, eds), Elsevier, Paris, 124-128

Montine TJ, Huang DY, Valentine WM, Amarnath V, Saunders A, Weisgraber KH, Graham DG, Strittmatter WJ (1996) Crosslinking of apolipoprotein E by products of lipid peroxidation. *J Neuropathol Exp Neurol* **55**, 202-210

Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, Otomo E, Ikeda K (1991) Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jacob disease. *Brain Res* **541**, 163-166

Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Hui D, Weisgraber KH (1987) Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of aoplipoprotein B, E (LDL) receptors in the brain. *J Biol Chem* **262**, 14352-14360

Poirier J (1994) Apolipoprotein E in animal models of brain injury and in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* **12**, 525-530

Poirier J, Delisle MC, Quirion I, Aubert I, Farlow M, Lahiri D, Hui S, Bertrand P, Nalbantoglou J, Gilfix BMG, Gauthier S (1995) Apolipoprotein E4 allele as a predictor of cholinergic deficits and treatment outcome in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci* (USA) **24**, 12260-12264

Ramos CL, Pou S, Rosen G (1995) Effect of anti-inflammatory drugs on myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical generation by human neutrophils. *Biochem Pharmacol* **49**, 1079-1084

Sano M, Ernesto C, Thomas RG et al. (1997) A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **336**, 1216-1222

Siest G, Pillot T, Regis-Bailly A, Leininger-Muller B, Steinmetz J, Galteau MM, Visvikis S (1995) Apolipoprotein E: An important gene and protein to follow in laboratory medicine. *Clin Chem* **41**, 1068-1086

Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Stadtman ER, Floyd RA, Markesbery WR (1991) Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci* USA **88**, 10540-10543

Strittmatter WJ, Saunders AM, Goedert M., Weisgraber KH, Dong L, Jakes R, Huang DY, Pericak-Vance M, Schmechel D, Roses AD (1994) Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau : implications for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci* **91**, 11183-11186

Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong L, Salvesen GS, Pericak-Vance M, Schmechel D., Saunders AM, Goldgaber D, Roses AD (1993) Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid β peptide : isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci* (USA) **90**, 8098-81102

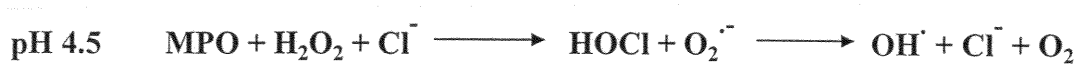
Volicer L, Crino PB (1990) Involvment of free radicals in dementia of the Alzheimer type: A hypothesis. *Neurobiol Aging* **11**, 567-571

Weisgraber KH (1994) Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Adv Prot Chem* **45**, 249-302

Wurtman RJ (1992) Choline metabolism as a basis for the selective vulnerability of cholinergic neurons. *Trends Neurosci* **15**, 117-122

Zcliczynski JM, Stelmaszynska T, Domanski J, Ostrowski W (1971) Chloramines as intermediates of oxidation reaction of amino acids by myeloperoxidase. *Bioch Biophys Acta* **235**, 419-424

Free radicals and HOCl



Amino acid mediated chloramines formation

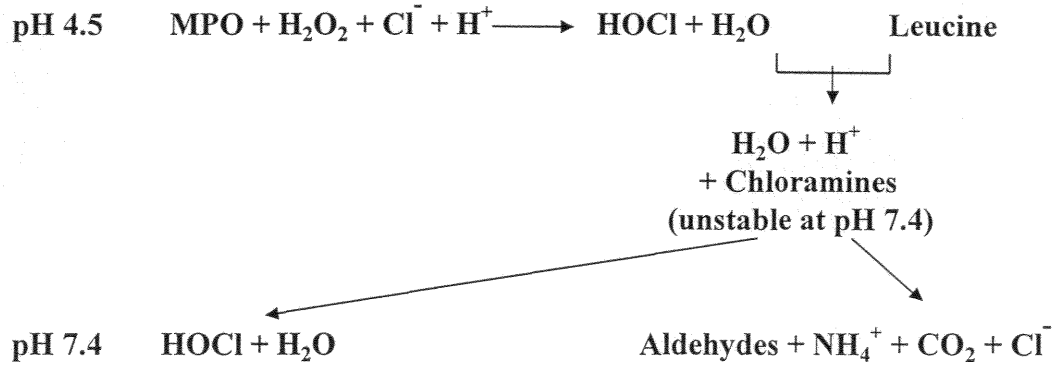


Figure 1: Myeloperoxidase (MPO) oxidation system

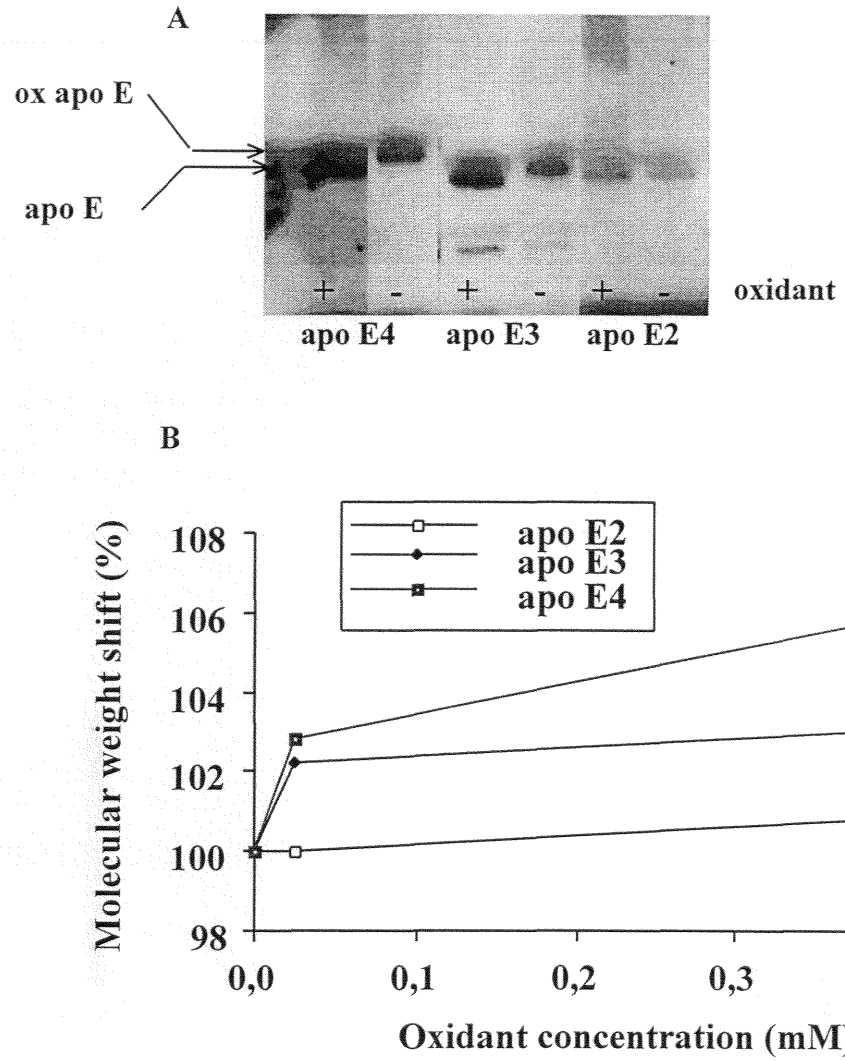
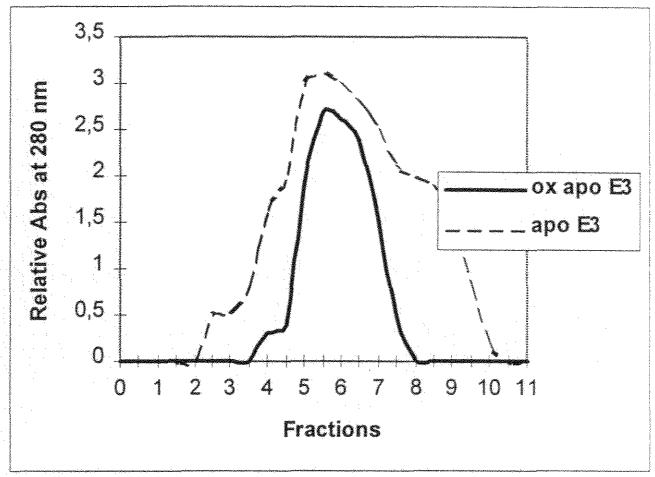


Figure 2: Differential oxidation of the 3 apo E isoforms.

A. Immunoblot showing the molecular shift of the apo E band after oxidation by MPO system with 0.5 mM oxidant.

B. Variation of the apparent molecular weight of the apo E band after oxidation.

A



B

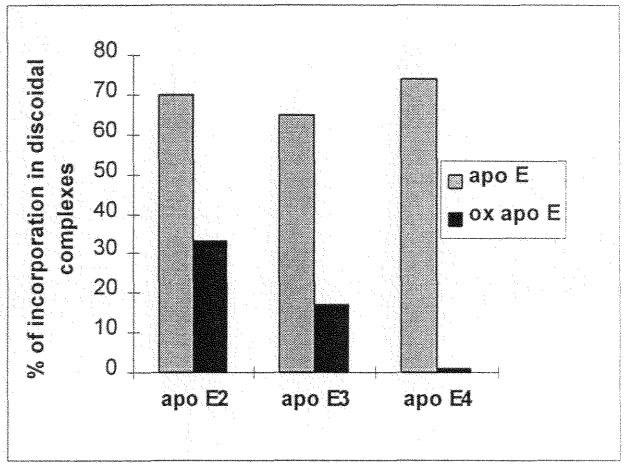


Figure 3 : Effect of oxidation upon incorporation of apo E isoforms in discoidal complexes.

(A) Elution profiles of non oxidized (apo E3) and oxidized apo E3 (ox apo E3) complexes on gel filtration.

(B) Incorporation ratios of the 3 apo E isoforms in discoidal complexes before and after oxidation at 0.16 mM oxidant.

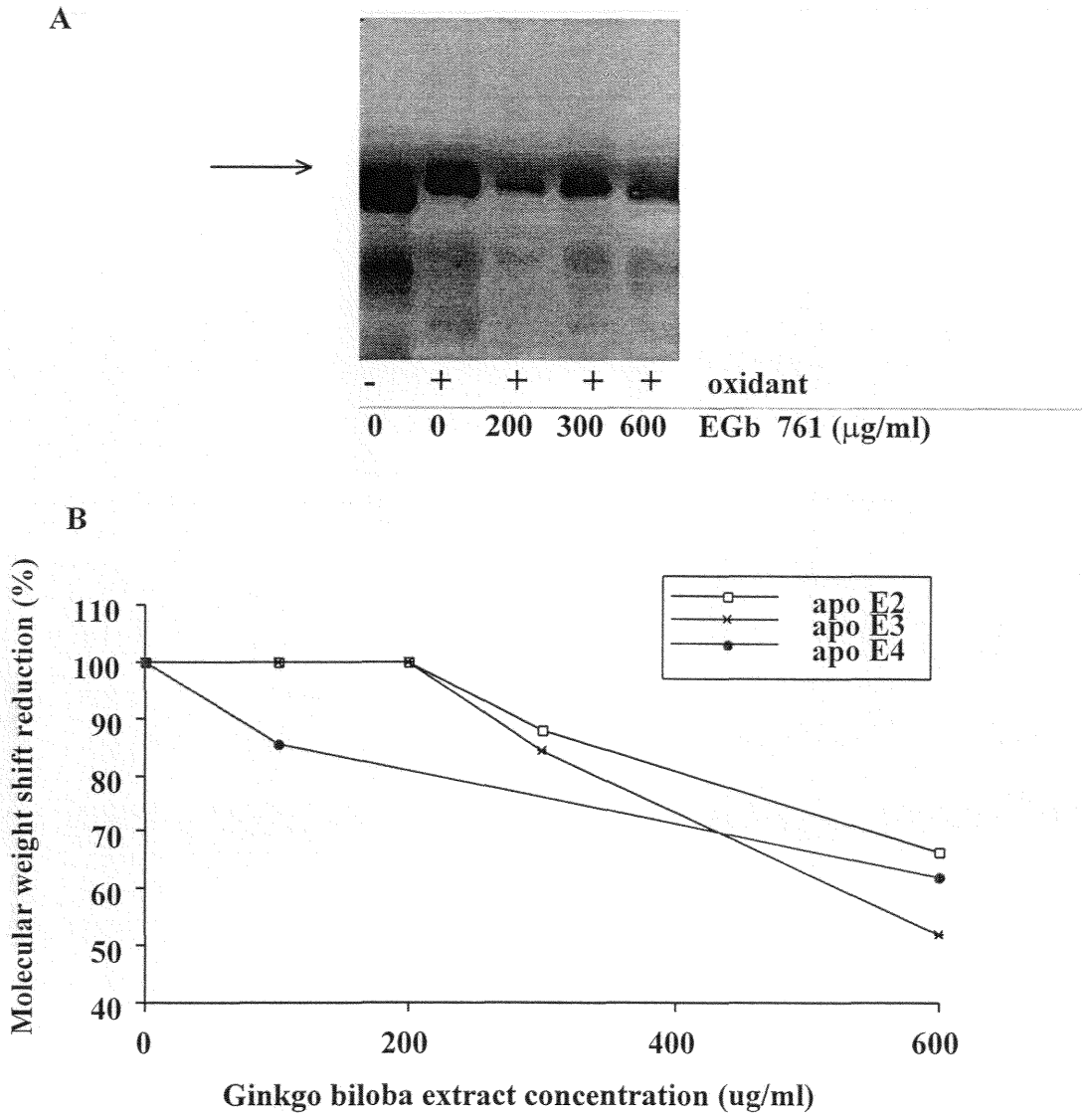


Figure 4 : Oxidation of the 3 apo E isoforms after co-incubation with EGb 761.

A. Immunoblot showing the reduction of molecular shift after oxidation in presence of EGb 761. Lane 1 : non oxidized apo E3, lane 2 to 6 : oxidation of apo E at 0.5 mM oxidant in presence of various EGb 761 concentration.

B. Variation of the percentage of decrease of the shift of apo E apparent molecular weight band relative to the oxidized control.

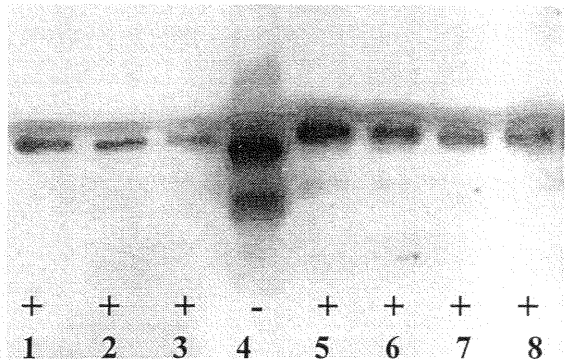


Figure 5 : Immunoblot showing the molecular shift of the apo E4 band after oxidation by MPO system with 0.5 mM oxidant, in presence of vitamin E or *Ginkgo biloba* extract (EGb 761).

Lane 1 to 3 : vitamin E at 20, 50 and 100 μM, respectively, lane 6 to 8 : Ginkgo biloba extract at 100, 300 and 600 μg/ml, respectively.

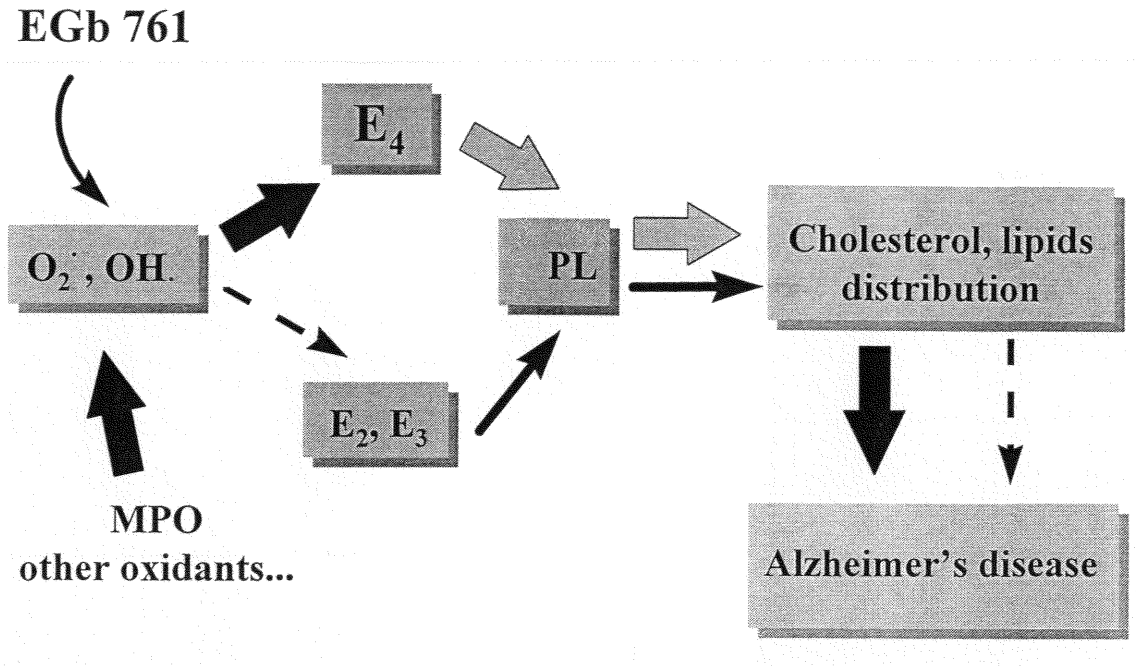


Figure 6 : Hypothesis of the role of apolipoprotein E oxidation and protection by *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) in Alzheimer's disease.

IV. Publication n°4 :

Oxidation of human apolipoprotein E and cerebral enzymatic systems. (1998) Alzheimer's Report, 1, 95-99

Tous les résultats présentés précédemment montrent *in vitro* l'importance du stress oxydant dans la MA. Le cerveau contient plusieurs systèmes enzymatiques impliqués dans la génération de RL ou dans la protection contre les RL. A l'exception d'une famille de P450, peu de travaux concernant la mesure des enzymes du métabolisme du médicament dans le cerveau humain et plus particulièrement dans les maladies neurodégénératives ont été rapportés à ce jour. En effet, l'allèle B mutant de la cyt P450 2D6-débrisoquine 4-hydroxylase est un gène de susceptibilité de la maladie de Parkinson, qui a également été identifié comme un facteur de risque de la MA à corps de Lewy (Saitoh et al., 1995). Nous avons donc mesuré l'activité de plusieurs enzymes des médicaments dans les échantillons autopsiques issus de 13 patients atteints de MA et de 12 patients ne présentant pas de pathologie neurodégénérative.

Parmi les activités enzymatiques mesurées, seule l'activité de la GST varie de façon significative. Les 3 régions du cerveau étudiées (cortex, hippocampe, cervelet) présentent une activité plus élevée de 42 % chez les patients atteints de MA comparée à celle mesurée dans les cerveaux de sujets neurologiquement sains (Tableau 1, publication n°4).

La GST est une enzyme importante dans les processus de détoxification des RL. L'augmentation de son activité dans les cerveaux de MA peut être liée à une activation en réponse aux dommages neuronaux par l'attaque radicalaire. En effet, il a été montré que le gène de la GST contient un "élément de réponse antioxydant" pouvant être activé par les

espèces réactives dérivées de l'oxygène (Nguyen et Pickett, 1992). D'autres auteurs ont montré une augmentation de l'activité GST dans les microsomes de rat après traitement par le phénobarbital, ce qui pourrait résulter d'une modification de l'enzyme par les RL (Aniya et Naito, 1993).

Dans cette étude, l'activité GST envers le CDNB semble également varier en fonction du génotype de l'apo E puisque, dans les 3 régions étudiées, elle est significativement plus élevée chez les patients porteurs de l'allèle ε4 que chez les pateints qui portent l'allèle ε3 (Tableau 2, publication n°4). L'association de l'augmentation de ces activités enzymatiques avec l'allèle ε4, facteur de risque de la MA, confirme les activités élevées mesurées chez les malades d'Alzheimer.

L'apo E pourrait réguler l'expression de cette enzyme. En effet, l'expression de l'apo E peut conduire à la régulation d'enzyme comme le P450-cholestérol-scc (Reyland et al., 1992).

Cependant il reste à vérifier si cette augmentation d'activité est liée au génotype de l'apo E ou si cette corrélation GST/ε4 est simplement due à la fréquence accrue de l'allèle ε4 dans la MA.

Ces derniers résultats suggèrent un lien entre les GST et la régulation de l'apo E, en relation avec sa sensibilité accrue à l'oxydation pouvant être impliquée dans l'étiologie de la MA.

Par ces résultats, nous avons montré

a) une augmentaion de l'activité GST dans les cerveaux de patients atteints de MA suggérant une activation en réponse à l'augmentation des RL,

b) et cette augmentation est plus marquée dans les cerveaux de patients atteints de MA exprimant l'allèle ε4 que ceux exprimant l'allèle ε3.

Volume 1, Number 2
p95-99 (1998)

Oxidation of human apolipoprotein E and cerebral enzymatic systems

Brigitte Leininger-Muller,[CA] Corinne Jolivalt, Philippe Bertrand and Gérard Siest

Centre du Medicament, Université Henri Poincaré, 30 rue Lionnois, 54000 Nancy, France

[CA]Corresponding author Fax: +33 3 83 32 13 22
E-mail: bleining@ctrmed.u-nancy.fr

Alzheimer's disease
Apolipoprotein E
Glutathione *S*-transferase
Myeloperoxidase
Oxidation

Apolipoprotein E (apoE) is a polymorphic protein whose specific isoform apoE4, has been widely associated with Alzheimer's disease (AD). ApoE may be linked with this disease by its isoform-specific interaction with lipids or proteins of amyloid plaques such as amyloid-β peptide (Aβ). In addition, oxidative stress has been linked to the development of AD. Moreover, free radical production enhances the expression of genes encoding antioxidant enzyme activities. Using the myeloperoxidase system, we previously reported that the oxidation of the three recombinant apoE isoforms is differential, apoE4 being more susceptible than apoE3, and apoE3 itself more than apoE2. ApoE-phospholipid complexes were prepared and we show that oxidation of apoE4 decreased its capacity to bind phospholipids. We also compared Aβ fibrillation in the presence of non-oxidized or oxidized apoE. Only oxidation of apoE4 enhanced Aβ fibrillation which could thus lead to inefficient lipid recycling in the brain and enhance amyloid deposition in plaques. Glutathione *S*-transferase (GST) is an important enzyme in antioxidant defense as it removes compounds capable of generating reactive oxygen species. We compared the activity of this enzyme in autopsy brains of AD patients as well as controls with no neuropathological disease in relation to the apoE genotype. GST activity is significantly increased in patients carrying an ε4 allele. Cellular experiments are now required to determine apoE-GST functional relationships. These results strengthen the role of oxidation and the high linkage of the apoE ε4 allele in AD.

INTRODUCTION

Apolipoprotein E (apoE) is a polymorphic protein corresponding to the product of three alleles ε2, ε3 and ε4, differing by only a single mutation. Its main function in the brain is to locally recycle cholesterol and phospholipids in response to injury (Poirier, 1994). ApoE has been localized in senile plaques and neurofibrillary tangles, the hallmarks of Alzheimer's disease (AD). In addition, it binds directly to amyloid-β peptide (Aβ), the principal constituent of senile plaques, as well as other proteins (Strittmatter *et al.*, 1993). Our interest in apoE within AD originated with reports of linkage of the ε4 allele with AD (Strittmatter and Roses, 1995; Montine *et al.*, 1996) and the possible role of its oxidation in the apoE-Aβ interactions, as well as its ability to interfere with Aβ fibrillation. Oxidation of lipids could give rise to reactive by-products such as malondialdehyde or 4-hydroxynonenal which covalently crosslink apoE (Montine *et al.*, 1996). These observations may be reinforced by an isoform-dependent degradation of apoE which may be due to oxidative alterations. Accumulation of oxidized proteins in AD brains has been documented (Smith *et al.*, 1991) but little data concerning the oxidation of a specific protein have been reported. Moreover, apoE is the major apolipoprotein synthesized in the brain, thus providing a potential target for free radicals.

The brain contains numerous enzymes, albeit at relatively low specific activities, involved in xenobiotic metabolism primarily found in the liver. Activities of several drug-metabolizing enzymes have been measured in rat brain tissue and isolated microvessels which constitute an *in vitro* model of the blood brain barrier, as well as in other interfaces like leptomeninges and choroid plexus (Leininger-Muller *et al.*, 1994) which display higher enzymatic activities than cerebral tissue (Ghersi-Egea *et al.*, 1994). We also studied the

subcellular distribution of cytochrome P450 and measured activities of conjugation enzymes in human brain. The most important finding was that the activity of two detoxifying enzymes, glutathione *S*-transferase (GST) and membrane-bound epoxide hydrolase were much higher in human brain than in rat brain, thus showing their importance in protection of the human brain from toxic compounds (Ghersi-Egea *et al.*, 1991).

The metabolic processes involved in the biotransformation of xenobiotics can be classified into phase I (functionalization) and phase II (conjugation) reactions. The substrates of phase I reactions are generally lipophilic molecules which undergo oxidative reactions leading to more polar metabolites. These molecules can then serve as substrates for phase II enzymes. Phase I metabolism can also generate toxic reactive metabolites and/or free radicals. We previously reported that superoxide radical formation is largely mediated by NADPH cytochrome P450(c) reductase reductive pathway in the rat brain (Ghersi-Egea *et al.*, 1991) and that recombinant apoE is oxidized by superoxide radicals produced through this metabolic pathway (Leininger-Muller *et al.*, 1996).

Among other enzymes catalyzing oxidation reactions, we detected myeloperoxidase (MPO) in the human brain (Jolivalt *et al.*, 1996). This heme protein is commonly localized in neutrophils. In the presence of H_2O_2 and Cl^-, it catalyses peroxidation of chloride to hypochlorite which then rapidly interacts with oxidizable moieties of proteins. This so-called MPO enzymatic system is known to be important in inflammatory processes (Ramos, Pou & Rosen, 1995) which may also be involved in the formation of AD brain amyloid plaques. We recently showed that recombinant apoE displays a higher susceptibility to oxidation by the MPO system than albumin (Jolivalt *et al.*, 1996) and observed an isoform-dependent susceptibility to oxidation, with apoE4 being more susceptible to oxidation than apoE3, which is itself more susceptible than apoE2 (Leininger-Muller *et al.*, 1998).

At the present time the consequences of this differential oxidation remain to be defined. Firstly we compared the effects of both oxidized apoE3 and apoE4 on Aβ fibrillation, as well as on its affinity for phospholipids, as it is known that circulating apoE is essentially included in lipoproteins in biological fluids. To our knowledge, nothing is known about drug-metabolizing enzyme variations in AD brains, except in the case of the cytochrome P450 CYP2D6-debrisoquine 4-hydroxylase mutant B allele, a susceptibility gene for Parkinson's disease which was also identified as a genetic risk factor for the Lewy body variant of AD (Saitoh *et al.*, 1995). GST is an important enzyme in antioxidant defense as it removes compounds capable of generating reactive oxygen species. We also compared the GST enzymatic activity with respect to the apoE genotype in autopsy brains of AD patients with controls with no neuropathological complications.

MATERIALS AND METHODS

The three isoforms of recombinant human apoE (E2, E3, E4) cDNAs were cloned in modified pARHS-2 and produced in *E. Coli* BL21 (DE3) as a fusion protein of about 44 kDa (Barbier *et al.*, 1997).

In vitro oxidation assays of the recombinant proteins with MPO, isolated from polymorphonuclear neutrophils, were performed as previously described (Jolivalt *et al.*, 1996), with slight modifications of pH adapted to the formation of apoE-PL discoidal complexes. Chloramines were formed by the reaction of MPO in 55 mM phosphate buffer (pH 4.5), 100 mM NaCl and 10 mM leucine with different concentrations of H_2O_2 (0, 1.25, 4, 5.75, 7.6 mM). Native apoE was then oxidized by the chloramines at physiological pH. Proteins were submitted to SDS-PAGE in non-reducing conditions and transferred to PVDF (Millipore) membranes.

Discoidal complexes were prepared by a detergent reconstitution method adapted from Jonas (1984). The phospholipid used in the present study, dipalmitoyl phosphatidyl-choline (DPPC, Sigma), was dispersed in sodium cholate and incubated with apoE in a 3:1 (w/w) ratio of DPPC:protein. The spontaneously formed discs were isolated by adsorption of cholate on Bio Beads (Biorad). The solution containing the complexes was eluted by gel filtration on Sephacryl HR300 (Pharmacia) in order to separate apoE-DPPC discs from free apoE and free phospholipids. When required the apoE-DPPC complexes were concentrated by centrifugation on Centriplus 100 columns (Amicon). ApoE-DPPC complexes formed were detected at 280 nm. Protein carbonyl content was measured by forming labelled protein hydrazone derivatives using 2,4-

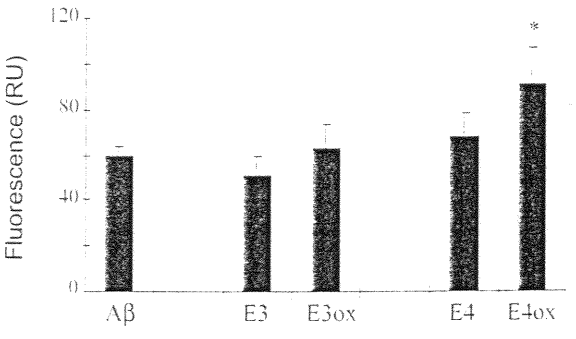


Figure 1. Thioflavine T assays of $A\beta_{1-40}$ fibrillation in the presence of non oxidized (E3, E4) and oxidized (E3ox, E4ox) apoE. ApoE was oxidized by MPO system at pH 7.4 at an intermediate concentration of 0.3 mM of oxidant for 30 min at room temperature and incubated for 24 h, in the same conditions as non oxidized free apoE with an Aβ:apoE molar ratio of 100:1. The relative fluorescence of native Aβ was 35 (n=12). Fluorescence intensities were obtained using a Cytofluor 2300 spectrofluorimeter with λ_{ex}= 440/20 and λ_{em}= 480/20 nm. E4ox was statistically different from Aβ alone, *p<0.05 Student's t-test.

©MSJ

dinitrophenyl hydrazine (DNPH). The dinitrophenyl moieties formed on apoE were revealed by enhanced chemiluminescence (ECL, Pierce) after blot incubation with rabbit anti-DNP antibodies (Sigma) followed by incubation with HRP-labelled anti-rabbit antibodies (Sigma). Alternatively, blots were incubated with monoclonal anti-apoE antibodies (kind gift from Dr Y. Marcel, Canada) followed by incubation with secondary anti-mouse antibodies labelled with HRP (Sigma), and then revealed by ECL.

Aβ (Bachem) aggregation was followed using the thioflavine T (thT) fluorescent assay as previously described (Naiki *et al.*, 1989). Experimental solutions were incubated for 6–24 h according to a molar ratio apoE:Aβ of 1:100. The incubated samples were added to 50 mM glycine (pH 9), 2 μM thT (Sigma). Emission spectra were obtained using a Cytofluor 2300 (Pharmacia) spectrofluorimeter with λ_{ex}=435 and λ_{em}=485 nm.

In the case-control study, frozen autopsy brain samples from 13 patients with autopsy-confirmed AD and 12 non-demented patients with no known neurological disease were obtained from the Kathleen Price Bryan Brain Bank at Duke University (Durham, NC, USA). All cases of AD satisfied National Institutes of Health and Consortium to Establish a Registry for AD criteria. Both AD and control groups had a similar mean (± S.D.) age (76±10 and 78±11 years respectively), post-mortem delay (3.2±1.3 and 9.3±6.9 h), storage time at -80°C (2.2±1.4 and 4.2±1.9 years) and male/female ratio (5/7 and 8/5). ApoE genotyping for each patient was carried out as described by Saunders *et al.* (1993).

Three regions were investigated from each brain, frontal cortex, cerebellum and hippocampus, except for five cases where no hippocampal sample was available for study. The pial membranes, superficial blood vessels and most of the white matter were removed by dissection from tissues sampled from each region. These samples were separately homogenized in ice-cold isolation medium (sucrose 0.32 M, Tris 10 mM, pH 7.4) by the use of a manual Dounce glass homogenizer. Cytosolic fractions were prepared as previously described (Ghersi-Egea *et al.*, 1993). GST activity was measured at 37°C on soluble fractions according to the method of Habig *et al.* (1974) using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) which is a common substrate recognized by the different isoforms of GST. Protein concentration was measured by the method of Lowry *et al.* (1951) using bovine serum albumin as a standard.

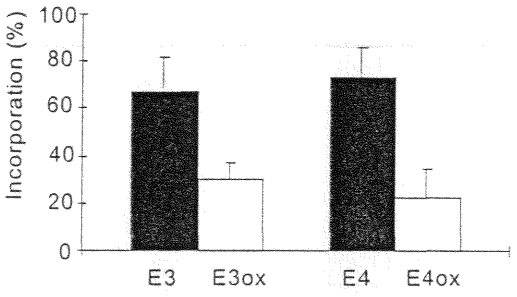


Figure 2. Percentage of incorporation of non oxidized and oxidized apoE in discoidal complexes. Incorporation percentages of apoE in DPPC discs were obtained by measuring absorbance at 280 nm of protein content in complexes, before (black bars) and after (grey bars) oxidation by MPO system with 0.3 mM of oxidant (n=3).

RESULTS

Levels of Aβ fibrillation measured by thT assays in the presence of oxidized apoE are shown in Figure 1. After addition of 0.9 μM apoE in the molar ratio apoE:Aβ 1:100, Aβ fibrillation was not affected by the presence of apoE3 while the fibrillation was enhanced (12%) with apoE4 after 24 h incubation. Oxidation of apoE3 at pH 7.4 did not affect its effect on Aβ fibrillation, while oxidized apoE4 significantly increased the fibrillation of Aβ (Fig.1).

We previously reported that 65–75% of all three isoforms were incorporated into the apoE-DPPC discs (Bertrand *et al.*, 1997). ApoE-DPPC discs had a PL:Protein ratio (w/w) of approximately 2.15 for apoE3 to 2.44 for apoE4. Oxidized apoE exhibited a decreased ability to interact with DPPC: 30% and 22% of apoE3 and apoE4 being incorporated, respectively (Fig. 2). The PL:protein ratio showed a dramatic decrease from 2.4 down to 0.5 for apoE4, suggesting a very low binding of oxidized apoE to lipids.

In the case-control study, GST specific activity measured in the soluble fractions was significantly higher in the three regions of AD brains, particularly in the frontal cortex where there was a 42% increase compared with controls (Table 1).

Table 1 Glutathione *S*-transferase activities (nmol/min mg protein) in three regions of AD and control brains

	Frontal Cortex	Hippocampus	Cerebellum
AD	376 ±147** (n=13)	326 ±80* (n=10)	421 ±139* (n=13)
Control	219 ±75 (n=12)	222 ±88 (n=10)	326 ±203 (n=12)

Data represent means of 2 or 3 determinations (±S.D.). Statistically different from the control *p<0.05, **p<0.01; Mann-Whitney t-test

Table 2 Glutathione *S*-transferase activity (nmol/min mg protein) in three brain regions of AD patients carrying apoE ε3 and ε4 alleles

	Frontal Cortex	Hippocampus	Cerebellum
ApoE ε3	238 ±94 (*n*=12)	240 ±85 (*n*=11)	309 ±129 (*n*=12)
ApoE ε4	384±174* (*n*=8)	333 ±106* (*n*=7)	514 ±207* (*n*=8)

Individual data were the mean (±S.D.) of 2 or 3 determinations. Significantly different from ε3 allele *$p<0.05$; Mann-Whitney *t*-test.

In order to determine whether GST variations are linked to the apoE genotype, we analyzed statistically the enzymatic activities in the all three regions in relation with to presence of either an apoE ε3 or ε4 allele. GST activity was significantly higher in all three regions in patients expressing ε4 compared to those bearing the ε3 allele (Table 2).

DISCUSSION

The apoE allele specificity linked to pathological aging points to the differential susceptibility of apoE isoforms to oxidation and its functional consequences, such as Aβ fibrillation and binding to phospholipids. ApoE has been proposed to both inhibit and increase fibrillation. These discrepancies are probably linked to the use of different sources of purified apoE and Aβ. Moreover, the molar ratio apoE:Aβ differs from one work to another. It has been suggested that inhibition of Aβ fibrillation results from apoE sequestering soluble Aβ, thereby preventing its transition to the insoluble form (Goldgaber *et al.*, 1993). The increased induction of Aβ fibrillation by oxidized apoE4 which we found here, is in agreement with the apoE4 risk factor in AD and could explain why patients with an ε4 allele have more amyloid deposits than those carrying ε3 alleles (Schmechel, Saunders and Strittmatter, 1993). Oxidation of apoE4 also modifies its ability to interact with phospholipids, supported by our observation of an impairment of the ability to form DPPC complexes. It must be remembered that apoE plays its role in lipid recycling by binding to several cell membrane receptors (Mahley, 1988). This binding can only be achieved if apoE is embedded in an adequate lipidic environment. Thus, oxidation of apoE leads to functional consequences which could dramatically impair phospholipid recycling in the brain. This hypothesis is in agreement with the loss of cerebral choline, cholesterol and phospholipids in AD (Poirier 1994).

Little is known about the role of drug-metabolizing enzymes in neurodegenerative diseases. Studies reported in the past decade essentially concern the implication of drug-metabolizing enzymes in aging rats, with few studies concerning the brain itself. We chose here frontal cortex, hippocampus and cerebellum as three key regions involved in AD, the latter being considered as a control cerebral localization where amyloid deposits and NFT are rarely observed.

GST activity toward CDNB was increased in AD brains. GST is an enzyme which is important in free radical detoxification processes. The increased GST activities that we observed in AD brains could be linked to an activation in response to free radical damage of AD brains. Recent findings indicate that oxidative stress enhances the expression of genes encoding other antioxidant enzymatic activities such as γ-glutamyl cysteine synthetase and heme oxygenase (Pinkus, Weiner and Violet, 1996). Moreover, this could be linked to previously observed increased GST activity in rat liver microsomes after phenobarbital treatment, which could be the result of an oxidative modification of the enzyme by reactive oxygen species (Aniya, Shigenaga and Hagen, 1993). In addition, substrates for GST include xenobiotics such as environmental toxins and chemicals, but GST was also shown to bind nonsubstrate ligands, and more especially steroid hormones like 17β-estradiol thus permitting their intracellular transport (Listowsky *et al.*, 1988). Nevertheless, the incidence of AD is greater in women than in men and several findings suggest that the estrogen loss associated with menopause may contribute to the development of this neurodegenerative disease (Rocca, Amaducci and Schoenberg, 1986). Thus, we suggest that human brain GST could be implicated in this metabolic pathway, through its function of intracellular transport of hormones. As regards the increased GST activities in patients carrying an ε4 allele that we report here, it remains now to define whether these variations in enzymatic activity are really linked to the apoE genotype of the patients, or if they are linked only to the increased frequency of the apoE ε4 allele in the AD group.

CONCLUSION

Our results support a role of oxidation in AD in addition to linkage of the apoE ε4 allele. Cellular experiments are now required to determine precise apoE-GST functional relationships.

©MSJ

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Institut IPSEN, Parke-Davis and Region Lorraine. The authors wish to thank Drs A Roses and K Hulette at Duke University (Durham, NC, USA) for providing the autopsy brain samples from the Kathleen Price Bryan Brain Bank and for helpful comments.

REFERENCES

Aniya Y, Shigenaga MK and Hagen TM (1993). Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 7915–7922.

Barbier A, Visvikis A, Mathieu F *et al.* (1997). Characterization of three human apolipoprotein E isoforms (E2, E3 and E4) expressed in *Escherichia coli. Eur J Clin Chem Clin Biochem* **35**, 581–589.

Bertrand P, Shuvaev V, Leininger-Muller B *et al.* (1997). Apolipoprotein E interaction with amyloid-β: influence of apolipoprotein E association with phospholipids and heparin. *Facts Res Geront* **4**, 470–472.

Ghersi-Egea JF, Livertoux MH, Minn A *et al.* (1991). Enzyme-mediated superoxide radical formation initiated by exogenous molecules in rat brain preparations. *Toxicol Appl Pharmacol* **110**, 107–117.

Ghersi-Egea JF, Perrin R, Leininger-Muller B *et al.* (1993). Subcellular localization of cytochrome P450, and activities of several enzymes responsible for drug metabolism in the human brain. *Biochem Pharmacol* **45**, 647-658.

Ghersi-Egea JF, Leininger-Muller B, Suleman G *et al.* (1994). Localization of drug-metabolizing enzyme activities to blood-brain interfaces and circumventricular organs. *J Neurochem* **62**, 1089–1096.

Goldgaber D, Schwarzman AI, Bhasin R *et al.* (1993). Sequestration of amyloid β-peptide. *Ann NY Acad Sci* **695**, 139–143.

Habig WH, Pabst MJ and Jakoby WB (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* **249**, 7130–7139.

Jolivalt C, Leininger-Muller B, Drozdz R *et al.* (1996). Apolipoprotein E is highly susceptible to oxidation by myeloperoxidase, an enzyme present in the brain. *Neurosci Lett* **210**, 61–64.

Jonas A (1984). A review of plasma apolipoprotein A-I interaction with phosphatidylcholines *Exp Lung Res* **6**, 255–270.

Leininger-Muller B, Ghersi-Egea JF, Siest G *et al.* (1994). Induction and immunological characterization of the uridine diphosphate-glucuronosyltransferase conjugating 1-naphthol in the rat choroid plexus. *Neurosci Lett* **175**, 37–40.

Leininger-Muller B, Jolivalt C, Pillot T *et al.* (1996). Apolipoprotein E oxidation and functional consequences. In:Roses AD ed *Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg:161–169.

Leininger-Muller B, Jolivalt C, Bertrand P and Siest G (1998). Oxidation of human apolipoprotein E. In : Packer L, Christen Y eds. *Ginkgo biloba extract (EGb 761) study: Lessons from cell biology. Advances in EGb 761 Research, Vol 7.* Elsevier, Paris.

Listowsky I, Abramovitz M, Homma H and Niitsu Y (1988). Intracellular binding of hormones and xenobiotics by glutathione S-transferases. *Drug Metab Rev* **19**, 305–318.

Lowry O.H, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265–275.

Mahley RW (1988). Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* **240**, 622–630.

Montine TJ, Huang DY, Valentine WM *et al.* (1996). Crosslinking of apolipoprotein E by products of lipid peroxidation. *J Neuropathol Exp Neurol* **55**, 202–210.

Naiki H, Higuchi K, Hosokawa M and Takeda T (1989). Fluorometric determination of amyloid fibrils *in vitro* using the fluorescent dye, thioflavine T. *Anal Biochem* **177**, 244–249.

Pinkus R, Weiner LM and Violet D (1996). Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF-κB, and glutathione *S*-transferase gene expression. *J Biol Chem* **271**, 13422–13429.

Poirier J (1994). Apolipoprotein E in animal models of brain injury and in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* **12**, 525–530.

Ramos CL, Pou S and Rosen G (1995). Effect of anti-inflammatory drugs on myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical generation by human neutrophils. *Biochem Pharmacol* **49**, 1079–1084.

Rocca WA, Amaducci LA and Schoenberg BS (1986). Epidemiology of clinically diagnosed Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **19**, 415–424.

Roses AD, Saunders AM, Corder EH *et al.* (1995). Influence of the susceptibility genes apolipoprotein E-ε4 and apolipoprotein E-ε2 on the rate of disease expressivity of late-onset Alzheimer's disease. *Drug Res* **45**, 413–417.

Saitoh T, Xia Y, Chen MD *et al.* (1995). The CYP2D6B mutant allele is overrepresented in the Lewy Body variant of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **37**, 110–112.

Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D *et al.* (1993). Association of apolipoprotein E allele ε4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* **43**, 1467–1472.

Schmechel DE, Saunders AM and Strittmatter WJ (1993). Increased amyloid β-peptide deposition in cerbral cortex as consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 9649–9653.

Siest G, Pillot T, Regis-Bailly A, Leininger-Muller B *et al.* (1995). Apolipoprotein E: An important gene and protein to follow in laboratory medicine. *Clin Chem* **41**, 1068–1086.

Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE *et al.* (1991). Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 10540–10543.

Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY *et al.* (1993). Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid β peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer's disease *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 8098–8102.

RECEIVED 7 JANUARY 1998
ACCEPTED 20 JANUARY 1998

V. Résultats récents

Pour compléter les résultats faisant l'objet des articles précédents, des expériences complémentaires ont été réalisées pour

- préciser en partie les acides aminés modifiés au cours de l'oxydation,
- apporter des éléments de réponse à la neurotoxicité des fragments d'apo E après hydrolyse par la thrombine
- compléter l'approche thérapeutique de protection contre l'oxydation.

- L'apo E est sensible à l'oxydation par le système de la MPO et présente des modifications d'acides aminés aboutissant à des modifications de structure.

Afin de préciser les acides aminés pouvant être altérés par l'oxydation, nous avons étudié l'oxydation de l'apo E en présence d'un excès d'acides aminés spécifiques, selon la méthode décrite par Drozdz et al. (1993). L'apo E est incubée avec des résidus méthionine, tryptophane et tyrosine avant l'ajout du système $MPO/H_2O_2/Cl^-$. Ces acides aminés supplémentaires sont alors plus accessibles que les acides aminés inclus dans la protéine et l'attaque radicalaire se fait préférentiellement sur ces acides aminés supplémentaires en fonction de leur sensibilité. Le déplacement de la bande majeure de l'apo E après oxydation par le système $MPO/H_2O_2/Cl^-$ est réduit en présence de méthionine dans le milieu d'incubation mais pas après l'addition de tryptophane ou de tyrosine (Figure 29). Ceci suggère une oxydation, en premier lieu, sur un des acides aminés le plus sensible à l'oxydation, la méthionine. Ces résultats sont également en accord avec les résultats obtenus par CLHP et ceux obtenus par Anantaramaiah et al. (1988) montrant que

l'oxydation des méthionines de l'apo AI altère sa structure et aboutit à une diminution du temps de rétention du pic principal de la protéine.

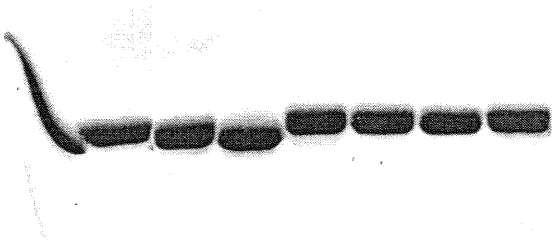


Figure 29 : Oxydation de l'apo E4 par le système MPO/H_2O_2/Cl^- en présence de méthionine (Met), tryptophane (Tryp) et de tyrosine (Tyr). 1/1 et 1/5 correspondent au rapport molaire du nombre de chacun des résidus aminés dans la séquence d'apo E et de l'acide aminé supplémentaire.

- Dans l'hypothèse d'un rôle de l'oxydation de l'apo E dans la MA, et sachant que des fragments thrombolytiques de l'apo E sont neurotoxiques et retrouvés dans les plaques séniles (Castano et al., 1995b ; Marques et al., 1997 ; Aizawa at al., 1997), nous avons étudié l'oxydation de l'apo E après hydrolyse par la thrombine.

L'apo E est une protéine constituée de 2 domaines séparés par une zone sensible aux protéases. En particulier, l'hydrolyse par la thrombine coupe la protéine en 2 fragments migrant à des poids moléculaires apparents de 30 kDa et 10 kDa, pour l'apo E recombinante avec le peptide de fusion. L'analyse du fragment de 30 kDa présente un profil d'oxydation semblable à celui de l'apo E recombinante totale, c'est-à-dire qu'après oxydation la bande majeure d'apo E hydrolysée est également déplacée vers les hauts poids

moléculaires (Figure 30). Après immunorévélation par des anticorps anti-apo E, la variation de poids moléculaire est également observée pour le fragment 10 kDa oxydé.

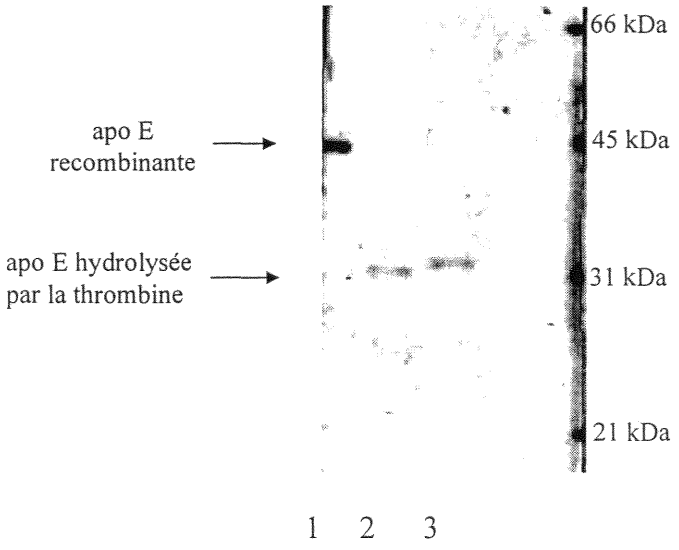


Figure 30 : Profil électrophorétique, après coloration au bleu de Coomassie, de l'apo E4 hydrolysée par la thrombine, avant (ligne 2) et après oxydation par le système $MPO/H_2O_2/Cl^-$ à pH 7,4 (ligne 3). Ligne 1 : apo E4 recombinante non oxydée.

L'oxydation des fragments protéolytiques de l'apo E pourrait donc accentuer leur toxicité en favorisant la liaison avec Aβ, par exemple. En outre, les protéines oxydées sont plus sensibles à la protéolyse (Davies, 1987). L'oxydation de l'apo E pourrait donc favoriser sa dégradation protéolytique, conduisant à la formation de fragments plus toxiques que l'apo E elle-même. Toutefois, des expériences préliminaires n'ont pas permis de confirmer cette sensibilité à la protéolyse. En effet, dans nos conditions, l'apo E oxydée ne présente pas une plus grande sensibilité à l'hydrolyse par la thrombine, que la forme non oxydée. Ces résultats sont à rapprocher des résultats obtenus par Grant et al. (1993). En effet, leurs travaux démontrent une plus grande résistance à la protéolyse de l'albumine oxydée par rapport à l'albumine native. Les auteurs suggèrent que la présence de groupements oxydés

confère à la protéine une résistance locale à la protéolyse enzymatique. Cette résistance à la protéolyse permet d'expliquer l'accumulation intracellulaire de protéines oxydées endocytosées (Grant et al., 1992). L'apo E oxydée, et plus particulièrement l'apo E4 oxydée, pourrait donc s'accumuler dans les cellules et se lier au peptide Aβ d'autant plus facilement qu'elle est oxydée et que sa concentration est localement accrue.

- L'analyse CLHP a également été menée sur les 3 isoformes d'apo E hydrolysées par la thrombine ou l'entérokinase. Pour les 3 isoformes, après hydrolyse par la thrombine, le fragment de 30 kDa est élué avec un temps de rétention très proche de celui de l'apo E recombinante. L'intensité du pic correspondant au fragment de 30 kDa est 2 à 3 fois plus importante que celle du pic correspondant au fragment de 10 kDa, dont le temps de rétention est plus faible (TR=22 à 23 min). Pour les 2 fragments, l'analyse CLHP montre que l'oxydation de l'apo E hydrolysée a des conséquences similaires à celles observées pour l'apo E recombinante.

Les 3 isoformes d'apo E hydrolysée par l'entérokinase sont éluées avec un temps de rétention supérieur d'environ 1 minute au temps de rétention des apo E recombinantes correspondantes. La réduction du temps de rétention de ces pics accompagnée de pics à des temps de rétention plus court, après oxydation confirme que la sensibilité à l'oxydation de l'apo E sans peptide de fusion reste semblable à celle de l'apo E recombinante.

- L'oxydation de l'apo E altère ses propriétés de liaison aux PL et ses propriétés d'association avec Aβ. Une approche thérapeutique par l'utilisation de substances antioxydantes afin de réduire l'oxydation de l'apo E permettrait ainsi de limiter ces

conséquences fonctionnelles délétères. Nous avons complété les résultats préliminaires obtenus avec l'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba* et comparé son action à d'autres antioxydants classiques comme la vitamine E, le GSH et le probucol.

En présence de l'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba*, le déplacement électrophorétique observé après oxydation est significativement réduit d'environ 40 % pour une concentration de 100 µg/ml et d'environ 60 % pour une concentration de 600 µg/ml (Figure 31). Dans une étude similaire, Marcocci et al. (1994) mesurent une réduction de 90 % de l'oxydation d'une autre protéine, l'oxyhémoglobine pour une concentration en EGb 761 de 90 µg/ml. Néanmoins, aucune différence significative n'a été observée pour les isoformes d'apo E.

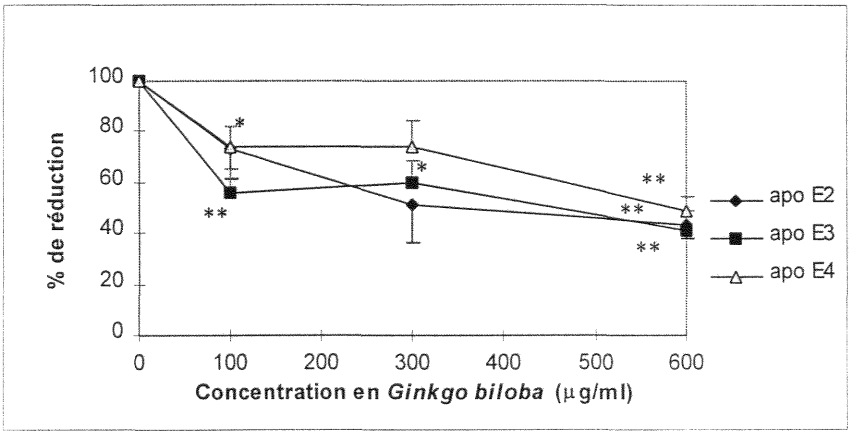
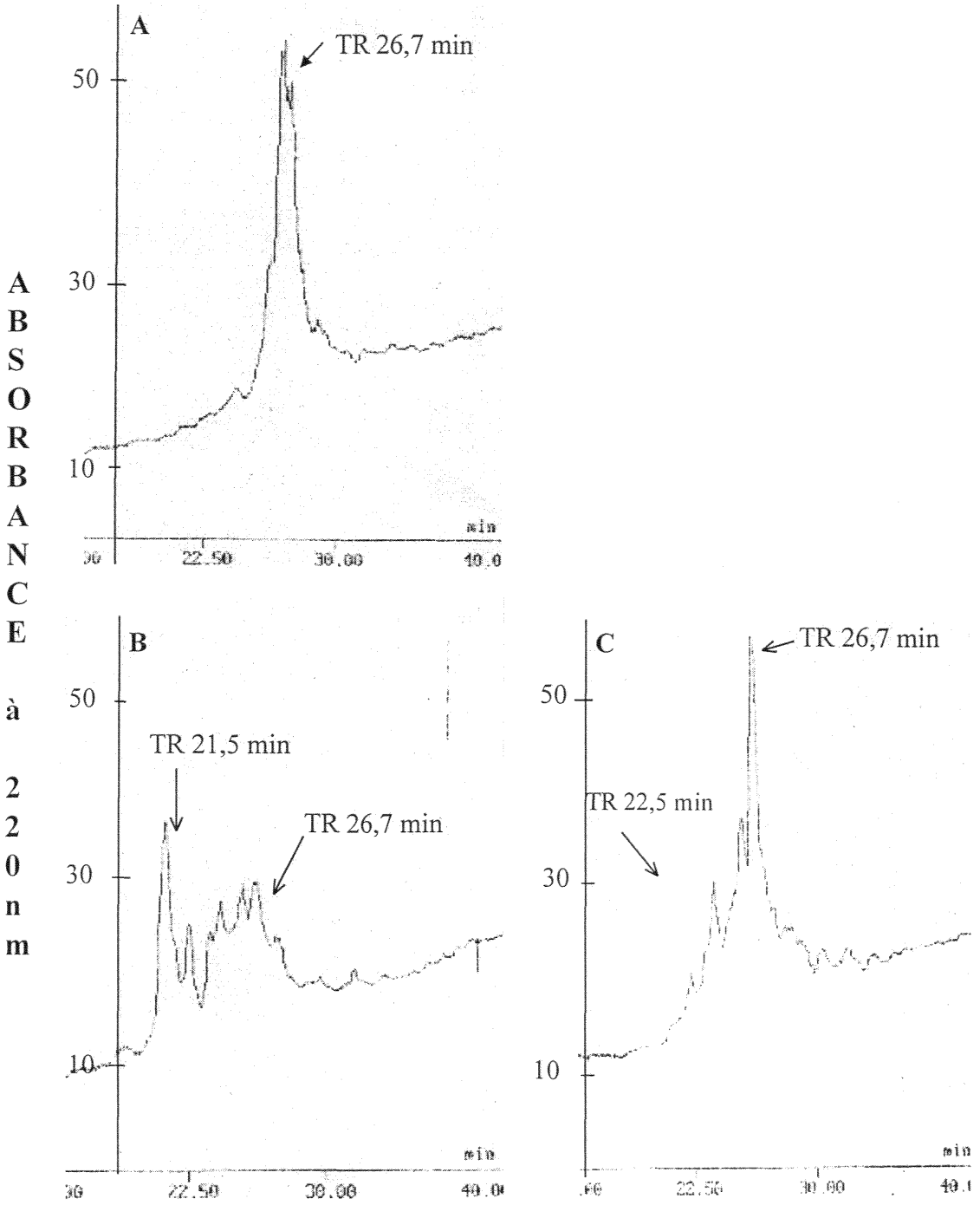


Figure 31 : Pourcentage de réduction du déplacement électrophorétique de la bande majeure d'apo E après oxydation par le système MPO/H_2O_2/Cl^-, en présence de l'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba* (100, 300, 600 µg/ml).
*p<0,05 ; **p<0,01 valeur significativement différente des valeurs correspondant à l'apo E oxydée en absence de l'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba* selon analyse statistique utilisant le test t de Student (n=4).

Les résulats obtenus pour les 3 isoformes d'apo E oxydée en présence de l'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba* après électrophorèse ont été confirmés par CLHP. En effet, les échantillons oxydés en présence de l'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba* à 600 µg/ml présentent des profils CLHP différents des apo E oxydées en absence de l'extrait EGb 761

de *Ginkgo biloba.* Après oxydation, le pic principal d'apo E est réduit et des pics intermédiaires de temps de rétention inférieurs apparaissent. Après oxydation en présence de l'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba*, le pic principal d'apo E est plus important et moins de pics intermédiaires sont visualisés. En effet, le pic principal correspondant à l'apo E3 représente 30 % de l'aire sous la courbe totale après oxydation alors qu'après oxydation en présence de l'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba,* il représente 76 %. De même, après oxydation, le pic principal correspondant à l'apo E4 représente 22 % de l'aire sous la courbe totale contre 50 % après oxydation en présence de l'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba* (Figure 32). L'analyse en CLHP permet d'estimer que la protection contre l'oxydation de l'apo E par l'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba* est de l'ordre de 30 à 40 %, valeurs similaires à celles obtenues après électrophorèse.



Temps de rétention (TR) en minutes

Figure 32 : Profil CLHP de l'apo E4 avant et après oxydation en absence ou en présence de l'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba*.

A. Apo E4 avant oxydation, B. Apo E4 après oxydation avec une concentration en oxydant de 0,15 mM à pH 7,4 C. Apo E4 après oxydation avec une concentration en oxydant de 0,15 mM à pH 7,4, en présence de 600 µg/ml d'extrait EGb 761.

Le *Ginkgo biloba* est un agent thérapeutique potentiel, pouvant protéger l'apo E ou d'autres protéines de l'oxydation, pour contrecarrer l'évolution de la MA. Cette hypothèse est appuyée par l'étude clinique de Le Bars et al. (1997) montrant que l'administration d'EGb 761 à des patients atteints de MA permet d'améliorer leurs fonctions cognitives. Ces résultats ainsi que ceux obtenus avec la vitamine E et la sélégiline dans le traitement de malades d'Alzheimer (Sano et al., 1997) supportent la théorie selon laquelle les dommages causés par les RL contribuent à la neurodégénérescence observée.

De même, la quantité en vitamine E diminue dans le plasma (Jackson et al., 1988) mais également dans le LCR (Toghi et al., 1994) de patients atteints de MA. Ceci suggère une plus forte production de RL dans le cerveau comparé aux sujets témoins ou une diminution du transport des vitamines *via* les plexus choroïdes altérés (Serot et al., 1997) ce qui réduit la neutralisation des RL. La vitamine E endogène semble, cependant, être insuffisante pour contrecarrer les effets néfastes des RL. Une supplémentation "*thérapeutique*" en vitamine E pourrait donc apporter une protection supplémentaire. En effet, nous avons montré que l'α-tocophérol réduit l'oxydation de l'apo E (Figure 33) et le traitement préventif potentiel est corroboré par l'étude clinique de Sano et al. (1997) qui montre un ralentissement de la progression de la maladie après administration de vitamine E.

Cependant, les concentrations nécessaires à la protection contre l'oxydation sont différentes selon l'isoforme. En effet, la réduction du déplacement de la bande d'apo E est significative à partir de 10 μM en α-tocophérol pour l'apo E3, de 20 μM pour l'apo E4 et à partir de 50 μM pour l'apo E2 et cette réduction est de l'ordre de 40 %.

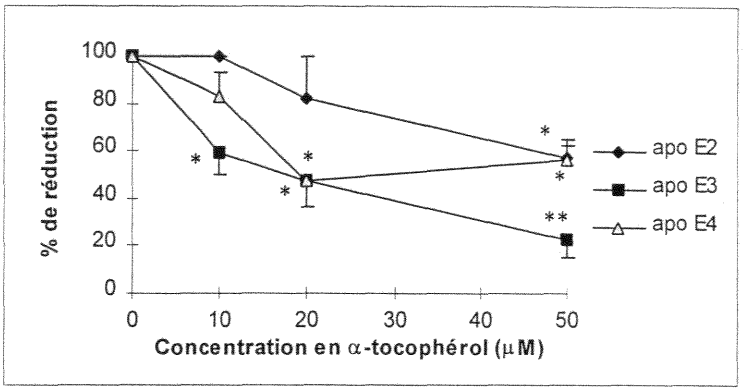


Figure 33 : Pourcentage de réduction du déplacement électrophorétique de la bande majeure d'apo E après oxydation par le système MPO/H_2O_2/Cl^-, en présence de concentrations différentes en α-tocophérol (10, 20, 50 μM). *p<0,05, **p<0,01 valeur significativement différente des valeurs correspondant à l'apo E oxydée en absence d'α-tocophérol, selon analyse statistique utilisant le test t de Student (n=3).

Le probucol, quant à lui, semble ne pas avoir de rôle protecteur contre l'oxydation de l'apo E par le système MPO. L'absence de protection de l'oxydation de l'apo E par le probucol est à rapprocher des résultats de plusieurs équipes (Stein et al., 1989 ; Zhang et al., 1997 ; Ozer et al., 1998) démontrant l'absence de pouvoir antiathérogène du probucol, après son administration à des lapins suivant un régime riche en cholestérol. La différence d'effet protecteur entre l'α-tocophérol et le probucol peut s'expliquer par la protection contre l'ion superoxyde et le radical hydroxyle de la vitamine E contrairement au probucol qui protège uniquement contre l'ion superoxyde.

L'incubation des 3 isoformes d'apo E avec le GSH permet de réduire le déplacement électrophorétique de la bande d'apo E observé après oxydation par le système enzymatique MPO/H_2O_2/Cl^- à pH 7,4. Ce déplacement électrophorétique est significativement réduit d'environ 40 % pour une concentration de 200 μM et 1 mM de GSH (Figure 34). La

protection conférée par le GSH est semblable pour les 3 isoformes d'apo E en terme de pourcentage de réduction du déplacement électrophorétique.

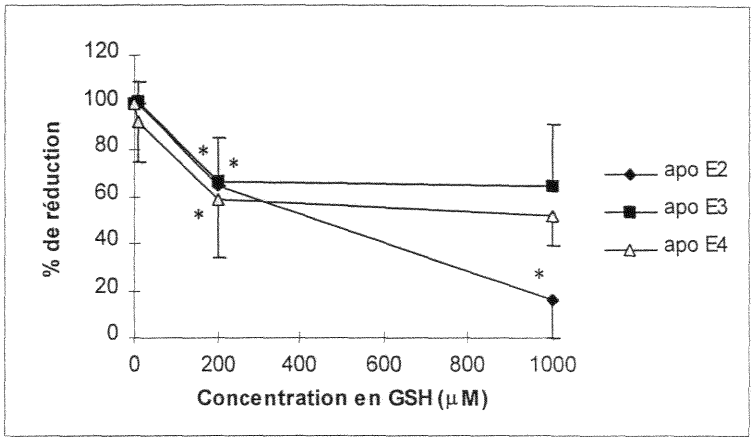


Figure 34 : Pourcentage de réduction du déplacement électrophorétique de la bande majeure d'apo E après oxydation par le système MPO/H_2O_2/Cl^-, en présence de différentes concentrations en glutathion (10, 200, 1000 µM). *p<0,05 valeur significativement différente des valeurs correspondant à l'apo E oxydée en absence de GSH selon analyse statistique utilisant le test t de Student (n=3).

Le *Ginkgo biloba*, la vitamine E et le GSH ont un effet protecteur contre l'oxydation de l'apo E qui pourrait donc limiter les conséquences fonctionnelles observées après oxydation de l'apo E, conséquences qui sont la diminution de la capacité à lier les PL et l'augmentation de la fibrillation d'Aβ. De plus, l'agrégation d'Aβ est inhibée par la rifampicine qui possède des propriétés de piégeur de RL, mais également par l'α-tocophérol (Tomiyama et al., 1996). La protection de l'oxydation de l'apo E par des antioxydants pourrait donc avoir un second aspect bénéfique sur la fibrillation d'Aβ.

DISCUSSION

L'importance de l'inflammation dans la formation des plaques séniles au cours de la MA est à présent bien établie (Kisilevsky, 1994), mais son rôle dans les processus pathologiques reste encore incompris. La question de l'implication de l'inflammation comme phénomène primaire ou secondaire dans la MA reste ouverte.

La présence de protéines de l'inflammation, comme les interleukines et les protéines du complément, autour des plaques séniles dans les cerveaux de patients atteints de MA confirme l'existence d'un processus inflammatoire. Ce processus pourrait être induit par Aβ lui-même (Rogers et al., 1992 ; Jiang et al., 1994) qui attirerait la microglie après activation du complément.

De plus, des études cliniques et épidémiologiques montrent un risque plus faible de développer la MA pour les personnes traitées par des AINS (McGeer et al., 1990 ; Rogers et al., 1993).

La présence de la MPO, enzyme de l'inflammation, dans le cerveau humain amène l'hypothèse de l'implication du stress oxydant dans la MA. En effet, la MPO catalyse la production d'oxydant comme l'acide hypochlorique ou l'ion superoxyde qui peuvent attaquer les protéines alentour (Nauseef et al., 1988). Les réactions d'oxydation peuvent

avoir lieu dans les neutrophiles ou dans le microenvironnement des phagosomes lorsque la MPO est libérée par l'activation des phagocytes. Les oxydants produits peuvent alors endommager non seulement l'élément pathogène mais également les lipides et les protéines.

La MPO (Daugherty et al., 1994) ainsi que les LDL modifiées par HOCl (Hazell et al., 1996) sont détectées dans les plaques d'athérome. La production d'HOCl par les polynucléaires neutrophiles peut contribuer à l'oxydation de LDL conduisant ainsi à la formation des plaques d'athérome (Cathcart et al., 1985). Les monocytes/macrophages contenant la MPO semblent infiltrer le parenchyme dans le cas d'une maladie inflammatoire du SNC, l'encéphalite (Ulvestad et al., 1994). La MPO cérébrale pourrait être activée lors de l'inflammation dans le cerveau alzheimérien conduisant à une forte production d'oxydant. Ceci est corroboré par l'augmentation de l'activité de la MPO plasmatique qui s'accompagne d'une augmentation de MDA et de HNE chez les patients ayant eu un traumatisme cranien avec une ischémie cérébrale (Re et al., 1997).

Dans la MA, l'hypothèse de l'implication de la MPO dans l'athérosclérose pourrait être appliquée à l'accumulation de l'apo E dans les plaques séniles, autour desquelles l'inflammation prend place. Plusieurs résultats, quoique souvent contradictoires, montrent également son importance dans la fibrillogenèse d'Aβ.

L'oxydation de l'apo E par le système enzymatique de la MPO conduit à des modifications isoforme-dépendantes de la protéine. L'apo E4 est l'isoforme la plus sensible à l'oxydation et l'apo E2 la moins sensible. L'apo E3 présente une sensibilité à l'oxydation intermédiaire proche de celle de l'apo E4. Cette différence de sensibilité des 3 isoformes d'apo E à

l'oxydation pourrait être reliée à leur propriété antioxydante. En effet, les résidus cystéine et méthionine peuvent jouer un rôle antioxydant, en protégeant les autres acides aminés de l'attaque radicalaire (Levine et al., 1996). L'apo E4 ne possédant pas de cystéine, l'oxydation des autres acides aminés affecte la structure et les fonctions de la protéine. Le rôle protecteur de l'apo E contre les RL démontré sur des neurones en culture par Miyata et Smith (1996) est en accord avec ces observations. En effet, ces auteurs ont montré que l'apo E2 protège plus efficacement les neurones de rat des dommages oxydants causés par les RL, produits notamment par le peptide Aβ. Ceci pourrait s'expliquer par la différence de sensibilité à l'oxydation des 3 isoformes d'apo E. Contrairement à l'apo E4, l'oxydation de l'apo E2 affecte peu la protéine et ses propriétés. Cet effet protecteur isoforme-dépendant, ainsi que la sensibilité à l'oxydation isoforme-dépendante que nous avons démontrée, concordent à la fois avec le rôle protecteur de l'apo E2, et avec la définition de l'apo E4 comme facteur de risque dans la MA.

Lors de la MA, la thrombine s'accumule dans le cerveau et est présente dans les plaques séniles (Akiyama et al., 1992) alors que la quantité en protéase nexine-1, inhibiteur de la thrombine, est réduite (Wagner et al., 1989 ; Vaughan et al., 1994). L'apo E cérébrale pourrait alors être hydrolysée par la thrombine présente en concentration accrue. Ces coupures thrombolytiques sont confirmées par la présence de fragments correspondant au fragment C-terminal co-purifiés avec Aβ dans les plaques séniles (Castano et al., 1995b ; Aizawa et al., 1997). Des fragments thrombolytiques correspondant à la partie N-terminale de l'apo E ont également été identifiés dans le tissu cérébral ainsi que dans le LCR humain. Ces fragments N-terminaux d'apo E4 montrent une neurotoxicité plus importante que ceux issus de l'apo E3 (Marques et al., 1996).

Après oxydation, les fragments thrombolytiques présentent des modifications similaires à l'apo E recombinante ainsi qu'une même sensibilité isoforme-dépendante. L'oxydation de ces fragments protéolytiques au cours du vieillissement pourrait accroître leur affinité pour Aβ, ceci de façon plus importante pour l'apo E4.

Goldgaber et al. (1993) suggèrent que l'inhibition de la fibrillation d'Aβ résulte de la séquestration de l'Aβ soluble, prévenant ainsi sa transition sous sa forme toxique insoluble. Plus récemment, Yang et al., (1997) et Aleshkov et al. (1997) ont montré, par immunorévélation, que l'apo E2 forme plus efficacement des complexes avec Aβ que l'apo E3 alors que la liaison apo E4-Aβ est très faible voire inexistante. Une telle association entre l'apo E2 et l'apo E3 avec Aβ prévient la polymérisation d'Aβ et le dépôt dans les plaques séniles. En fait, une faible liaison apo E-Aβ pourrait conduire à une augmentation de la fibrillation d'Aβ. Nos résultats montrant l'induction de la fibrillation d'Aβ par l'apo E4 oxydée corroborent cette hypothèse décrite par plusieurs auteurs (Yang et al., 1997 ; Zhou et al., 1996 ; Aleshkov et al., 1997). La formation de complexes apo E-Aβ, particulièrement avec l'apo E2 et l'apo E3, permettrait de réduire la quantité de peptide Aβ libre, condition nécessaire à la nucléation puis à la formation de fibrilles. Elle permettrait également l'élimination d'Aβ extracellulaire par la prise en charge de ces complexes par les récepteurs reconnaissant l'apo E, comme le suggèrent les résultats obtenus après traitement de neurones en culture par l'apo E3, où cette isoforme prévient la toxicité d'Aβ par formation de complexes apo E-Aβ (Jordan et al., 1998 ; Beffert et al., 1998).

A la lumière de nos résultats, l'apo E4 altérée par l'oxydation ne serait pas ou peu reconnue par les récepteurs LRP impliqués dans l'internalisation des complexes apo E-Aβ (Urmoneit

et al, 1997). En présence d'apo E4 oxydée, Aβ ne serait donc pas éliminé du milieu extracellulaire, ce qui favoriserait sa fibrillation.

L'apo E4 semble donc jouer un rôle de chaperon pathologique en augmentant le changement spontané de conformation de la forme faiblement amyloïdogène vers la conformation hautement amyloïdogène de Aβ (Soto et al., 1996). L'oxydation de l'apo E accélèrerait donc la transition de la forme soluble d'Aβ en sa forme insoluble. De plus, une étude récente avec des souris transgéniques pour le précurseur de l'amyloïde β et déficientes en apo E montre que l'apo E favoriserait les dépôts amyloïdes *in vivo* (Bales et al., 1997).

Outre les dépôts amyloïdes constituant les plaques séniles, la MA se caractérise également par la perte de lipides au niveau cérébral.

L'apo E joue un rôle essentiel dans le recyclage des lipides en liant spécifiquement différents récepteurs membranaires (Mahley, 1988). Cette liaison ne peut avoir lieu que lorsque l'apo E est inclue dans un environnement lipidique adéquat. La diminution proprotionnelle au nombre d'allèles ε4 de l'expression de l'apo E dans l'hippocampe et le cortex suggère que le transport du cholestérol et des lipides serait fortement affecté dans le cerveau de MA (Bertrand et al., 1995). Le transport du cholestérol et des lipides peut être d'autant plus altéré que l'apo E, en particulier l'apo E4, est oxydée. Ceci est conforté par la corrélation inverse entre la diminution du cholestérol et des lipides d'une part, et le nombre de plaques séniles chez les patients atteints de MA d'autre part (Pettegrew, 1989), le nombre de plaques étant plus élevé chez les porteurs de l'allèle ε4 (Schmechel et al., 1993). De plus, Ramassamy et al. (1997) montrent une augmentation de la peroxydation lipidique

dans les cerveaux de patients atteints de MA porteurs de l'allèle ε4 et suggèrent que, chez ces patients, l'altération de l'homéostasie lipidique est plus importante que chez les porteurs de l'allèle ε3. La réduction de la capacité de l'apo E à lier les PL après oxydation pourrait donc expliquer la perte connue du cholestérol et des lipides cérébraux dans la MA (Wurtman, 1992 ; Montine et al., 1997), la diminution de la régénération neuronale dans les cerveaux de patients atteints de MA (Terry, 1993) ainsi que la diminution de la réponse compensatoire chez des souris déficientes en apo E au cours de lésions du cortex enthorhinal (Masliah et al., 1995).

Cet enchaînement de processus aboutissant aux caractéristiques principales de la MA souligne l'implication de l'allèle ε4, mais également l'importance de l'oxydation dans la MA. L'augmentation de l'activité de la GST dans le cerveau de patients atteints de MA va dans le sens de ces observations. La protection apportée par la GST ne semble toutefois pas suffisamment efficace *in vivo*. Cette enzyme catalyse la conjugaison de substances électrophiles au GSH pour leur élimination. Cependant, les chloramines dérivées des neutrophiles, c'est-à-dire produites par le système $MPO/H_2O_2/Cl$, peuvent conduire à la perte de GSH intracellulaire chez le rat (Ogino et al., 1997). La réduction du GSH disponible pour la réaction de conjugaison réduit alors l'efficacité de la GST.

Pour renforcer les défenses cellulaires, comme notamment la perte de GSH et la diminution de la concentration cérébrale en vitamine E lors de la MA (Toghi et al., 1994), l'administration d'antioxydants peut avoir un double rôle : compléter le pool d'antioxydant endogène existant et/ou agir directement sur les processus oxydants selon plusieurs mécanismes. Une supplémentation en GSH favoriserait l'activité détoxifiante de la GST

tout en procurant une protection directe. De même, l'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba*, administré à des rats avant ischémie, normalise l'activité SOD qui diminue au cours de l'ischémie dans le cerveau. Cet extrait est également capable de réduire la concentration des produits de la peroxydation lipidique dans les mitochondries de cerveau de rat au cours du cycle ischémie-reperfusion (Seif-el-Nasr et El-Fattah, 1995).

Plusieurs niveaux de protection *in vitro* ont été attribués à l'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba* : il agirait comme piégeur d'ion superoxyde (Pincemail et al., 1989), de radical hydroxyle (Bors et al., 1990), de radical peroxyle (Maitra et al., 1995) et assurerait la restauration de l'activité SOD (Seif-el-Nasr et El-Fattah, 1995) tout en ayant une activité SOD propre (Duke et Salin, 1985). De plus, l'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba* favorise la sécrétion de l'apo E par les astrocytes hippocampaux de rat et rétablit la sécrétion d'apo E qui est réduite après oxydation par le système acide ascorbique/Fe^{2+} dans des suspensions cellulaires d'hippocampe de rat (Ramassamy et al., 1996).

In vivo, le traitement de maladies impliquant les RL et les dommages oxydants peut être envisagé par l'utilisation de l'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba*, et plus particulièrement dans la MA, où l'oxydation et l'apo E sont impliqués. En effet, une étude clinique montre que l'administration de l'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba* à des patients atteints de la MA retarde la progression de la MA (Le Bars et al., 1997). Des résultats similaires sont obtenus après traitement par la vitamine E, autre antioxydant classiquement utilisé (Sano et al., 1997) et renforce l'implication de l'oxydation dans cette maladie neurodégénérative multifactorielle qu'est la MA.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'ensemble des mécanismes biochimiques impliqués dans le développement de la MA fait encore l'objet de nombreuses hypothèses qu'il reste à vérifier.

Nos travaux tentent d'apporter des éléments de réponse pour certaines de ces hypothèses. L'ensemble de nos résultats souligne l'impact potentiel de l'oxydation et renforce l'implication de l'allèle ε4 comme facteur de risque de la MA. L'oxydation de l'apo E par le système enzymatique de la MPO, dont nous avons montré la présence dans le cerveau humain entraîne des modifications isoforme-dépendantes. **L'apo E4 est l'isoforme la plus sensible à l'oxydation alors que l'apo E2 est l'isoforme la moins sensible. L'apo E3 présente une sensibilité à l'oxydation intermédiaire mais proche de celle de l'apo E4.**

Ces modifications conduisent à des altérations fonctionnelles, notamment une action isoforme-dépendante sur la fibrillation d'Aβ et une réduction de la capacité à lier les PL. Celles-ci pourraient avoir un effet délétère sur le transport du cholestérol et des lipides dans le cerveau et le mécanisme que nous proposons est résumé figure 35. L'apo E4 étant l'isoforme la plus sensible à l'oxydation, sa **capacité à lier les PL est d'autant plus affectée**. Cette diminution de l'interaction avec les PL pourrait donc affecter l'homéostasie lipidique cérébrale. La perturbation du transport des lipides pourrait, en partie expliquer, la perte de lipides et la perte de plasticité synaptique dans le cerveau de patients atteints de

MA, conduisant finalement à la dégénérescence neuronale. Ce schéma peut être appliqué à l'apo E3, dont la capacité à lier les PL après oxydation est proche de celle de l'apo E4. Par contre, pour l'apo E2, moins sensible à l'oxydation, la capacité à lier les PL n'est que faiblement altérée.

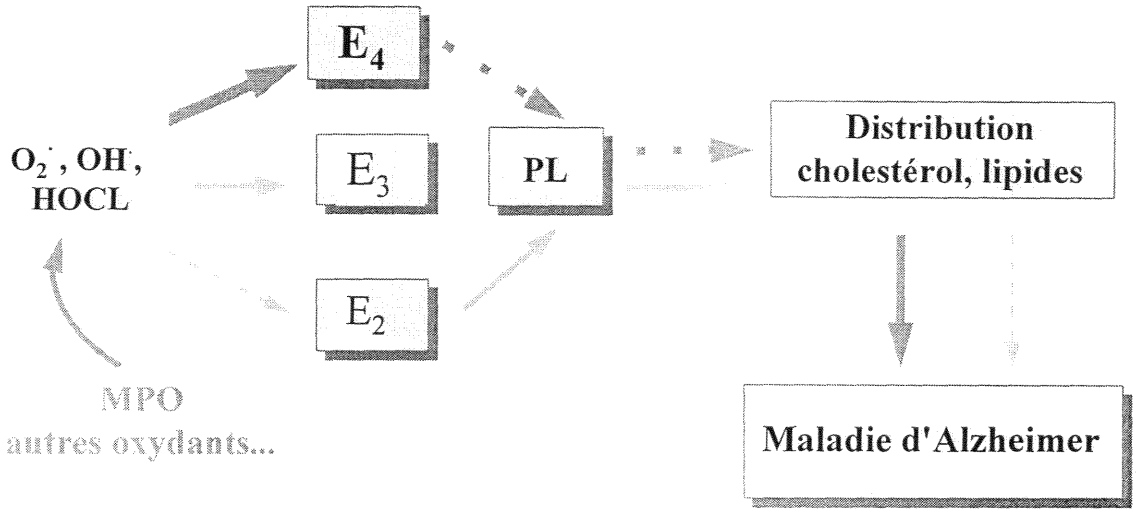


Figure 35 : Hypothèse de l'implication de l'oxydation de l'apo E dans l'homéostasie lipidique participant à l'étiologie de la MA.

Les plaques séniles et leur nombre constituent le critère de diagnostic histologique spécifique de la MA. La fibrillation d'Aβ dépendrait de la présence d'apo E et de son état d'oxydation. Elle est significativement réduite en présence d'apo E2, et l'oxydation de celle-ci l'altérant peu, n'affecte pas l'inhibition de la fibrillation d'Aβ. En revanche, l'apo E4 tend à augmenter la fibrillation d'Aβ, induction qui devient significative après oxydation. **L'induction de la fibrillogenèse d'Aβ par l'apo E4 oxydée** peut s'expliquer par les modifications importantes de la protéine après oxydation. L'apo E4 oxydée semble donc

jouer un rôle de chaperon pathologique pour la protéine Aβ (Figure 36). A l'inverse, le rôle protecteur de l'apo E2 est confirmé, ici, par l'inhibition de la fibrillation d'Aβ.

De plus, l'apo E4 oxydée se liant moins aux PL, la concentration en apo E4 libre oxydée serait alors augmentée, favorisant d'autant plus la fibrillogenèse.

En revanche, lorsque l'apo E est incorporée dans les disques de DPPC, quelle que soit l'isoforme d'apo E considérée, la fibrillation d'Aβ est significativement induite. Le changement de conformation de l'apo E et des PL lors de leur association modifierait leur réactivité face à Aβ. En effet, les différences observées pour les 3 isoformes d'apo E non incorporées dans les lipides sont nivelées au profit d'une induction équivalente pour les 3 isoformes incluses dans les complexes lipoprotéiques.

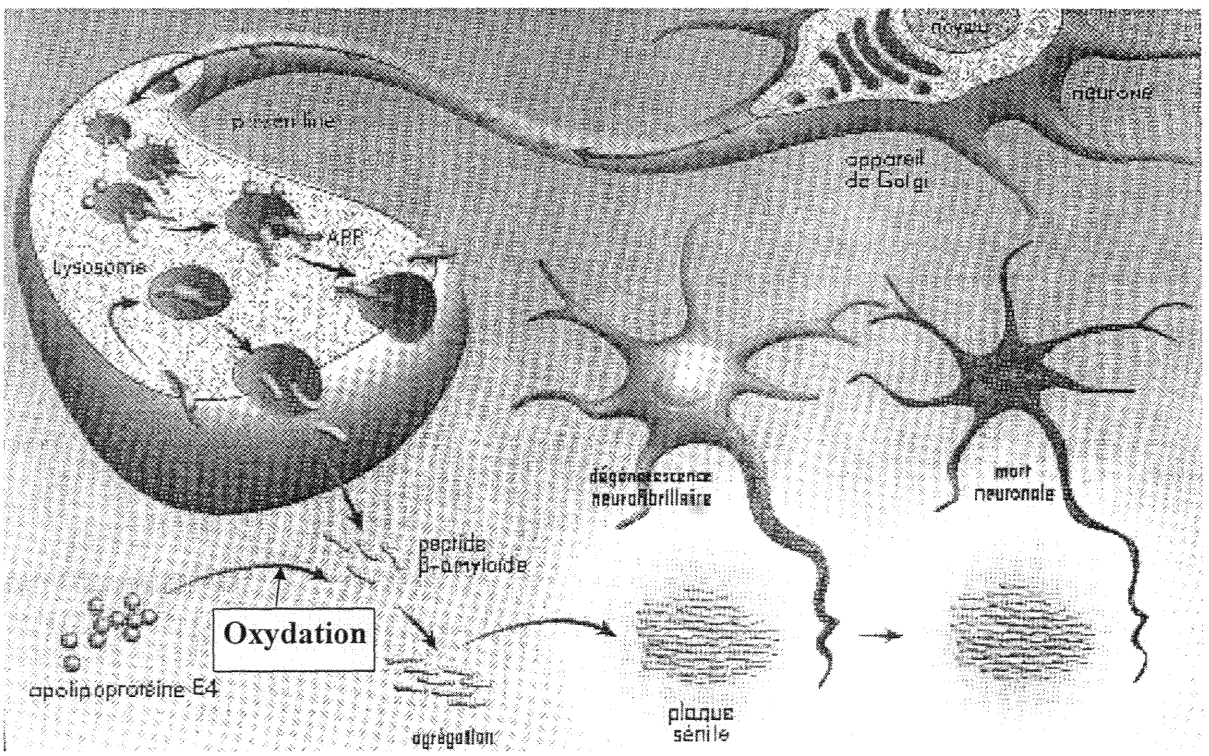


Figure 36 : Hypothèse de l'implication de l'oxydation de l'apo E4 dans la formation des plaques séniles (d'après Campion et Brice, 1997).

Contrecarrer l'oxydation de l'apo E par l'utilisation d'antioxydant tel que l'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba* constitue l'approche thérapeutique consécutive à l'ensemble de ce travail. Cette approche préventive thérapeutique est appuyée par les études cliniques montrant le ralentissement de la progression de la MA après traitement par l'extrait de *Ginkgo biloba* ou la vitamine E.

L'ensemble de ces résultats ouvre un large champ d'investigation tant au niveau de la recherche fondamentale que dans le domaine de recherches plus appliquées.

Etudes sur la protéine elle-même

Nous tenterons d'évaluer de manière plus précise les modifications dues à l'oxydation de l'apo E par spectrométrie de masse. En effet, la spectrométrie de masse en électrospray pourrait permettre de localiser les acides aminés oxydés à partir de fragments protéolytiques de chacune des isoformes d'apo E.

Bien qu'ayant une structure proche de celle des HDL, les complexes apo E-DPPC constituent un modèle simple de particules lipidiques. Nous envisageons donc de préparer des complexes à partir d'autres préparations lipidiques, notamment à partir de lipides insaturés et de cholestérol. Nous avons montré qu'après oxydation, l'apo E incorporée dans les complexes formés à partir de PL saturés présente des modifications semblables à celles observées pour l'apo E recombinante libre. L'utilisation de complexes formés à partir de PL insaturés permettra d'étudier les conséquences de la peroxydation lipidique sur l'apo E, notamment par la mesure d'adduits de HNE et de MDA.

Une analyse plus fine de la conformation de l'apo E (par dichroïsme circulaire) dans les complexes, avant et après oxydation, pourra être envisagée pour définir les acides aminés oxydés qui altèrent l'interaction de la protéine avec les lipides.

Le rôle physiologique essentiel de l'apo E est le maintien de l'homéostasie lipidique par l'intermédiaire des récepteurs membranaires cellulaires. Les propriétés de liaison de l'apo E aux récepteurs pourront être étudiées afin de vérifier si l'oxydation de l'apo E altère également cette fonction comme elle altère sa capacité de liaison aux PL.

Etudes sur modèle cellulaire

Il convient à présent d'appliquer ce modèle *in vitro* d'étude de l'oxydation des protéines sur modèles cellulaires. Des expériences sont actuellement en cours sur une lignée de neuroblastome humain IMR32 afin d'étudier dans quelle mesure l'apo E seule ou complexée avec des phospholipides, mais également l'oxydation de l'apo E, affectent la survie neuronale et/ou modèrent les effets de composés neurotrophiques ou neurotoxiques comme Aβ.

Cette approche peut être complétée par l'utilisation de cellules transfectées ou surexprimant la MPO afin de suivre l'oxydation au cours des cultures.

De plus, l'effet protecteur de substances antioxydantes telles que l'extrait EGb 761 de *Ginkgo biloba* pourra être étudié dans un tel modèle.

Application à l'Homme

En relation avec son rôle dans l'inflammation, la localisation de la MPO dans le cerveau humain nécessite des études complémentaires pouvant montrer un rôle important dans la MA. L'étude de sa répartition régionale dans des échantillons de cerveaux humains de patients non atteints de pathologies neurodégénératives et de patients atteints de MA est actuellement en cours. Cette étude permettra d'apporter des informations supplémentaires quant au rôle joué par l'inflammation, et plus particulièrement par la MPO, dans la MA. La MPO pourrait être un marqueur candidat des pathologies neurodégénératives. La mesure de son activité ou sa détection par immunorévélation dans les liquides biologiques permettront de le vérifier.

Il convient également d'évaluer *in vivo* le degré d'oxydation de l'apo E dans le LCR et dans des cerveaux de patients atteints de MA, comparé à des sujets exempts de pathologie neurodégénérative. Le degré d'oxydation dans les échantillons humains pourra être étudié par immunorévélation par des anticorps anti-DNP. L'oxydation plus particulière de l'apo E pourrait être envisagée par immunoprécipitation de l'apo E puis analyse CLHP.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aarts L., van der Hee R., Dekker I., de Jong J., Langemeijer H., Bast A. (1995)
The widely used anesthetic agent propofol can replace a-tocopherol as an antioxidant.
Febs Lett., 357, 83-85

Adolfsson R., Gotteries C.G., Oreland L., Wiberg A., Winblad B. (1980)
Increased activity of brain and platelet monoamine oxidase activity in dementia of Alzheimer type.
Life Sci., 27, 1029-1034

Aggerbeck L. P., Wetterau J. R., Weisgraber K. H., Wu C.-S. C., Lindgren F. T. (1988)
Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. II Properties of the amino- and carboxyl-terminal domains.
J. Biol. Chem. 263, 6249-6258.

Agner K. (1958)
Peroxidase oxidation of chloride ions.
Proc. 4th Intl. Cong. Biochem. Vienna, 15, 64

Aizawa Y. Fukatsu R., Takamaru Y., Tsuzuki K., Chiba H., Kobayashi K., Fujii N., Takahata N. (1997)
Amino-terminus truncated apolipoprotein E is the major species in amyloid deposits in Alzheimer's disease-affected brain: a possible role for apoliporotein E in Alzheimer's disease.
Brain Res., 768, 208-214

Aksenov M.Y., Aksenova M.V., Carney J.M., Butterfield D.A. (1997)
Oxidative modification of glutamine synthetase by amyloid beta peptide.
Free Radic. Res. 27, 267-281

Akiyama H., Ikeda K., Kondo H., McGeer P.L. (1992)
Thrombin accumulation in brains of patients with Alzheimer's disease.
Neurosci. Lett., 146, 152-154

Albrich J.M., Gilbaugh J.H., Callahan K.B., Hurst J.K. (1986)
Effects of the putative neutrophil generated toxin, hypochlorous acid, on membrane permeability and transport system of Escherichia coli.
J. Clin. Invest., 78, 177-184

Aleshkov S., Abraham C.R., Zannis V.I. (1997)
Interaction of nascent apo E2, apo E3 and apo E4 isoforms expressed in mannalian cells with amyloid peptide β(1-40). Relevance to Alzheimer's disease.
Biochem., 36, 10571-10580

Anantharamaiah G.M., Hughes T.A., Iqbal M., Gawish A., Neame P.J., Medley M.F. Segrest J.P. (1988)
Effect of oxidation on the properties of apolipoproteins AI and AII.
J. Lip. Res. 29, 309-318.

Andorn A.C., Britton R.S., Bacon B.B. (1996)
Ascorbate-stimulated lipid peroxidation in human brain is dependent on iron but not on hydroxyl radical.
J. Neurochem., 67,717-722

Andrews P.C., Krinsky N.I. (1981)
The reductive cleavage of myeloperoxidase in half, producing enzymically active hemi-myeloperoxidase.
J. Biol. Chem., 256, 4211-4218

Aniya Y., Anders M.W. (1989)
Activation of rat liver microsomal glutathione S-transferase by reduced oxygen species.
J. Biol. Chem. 264, 1998-2002

Aniya Y., Naito A. (1993)
Oxidative stress-induced activation of microsomal glutathione S-transferase in isolated rat liver.
Biochem. Pharmacol. 45, 37-42

Avdulov N.A., Chochina S.V., Igbavboa U., Warden C.S., Vassiliev A.V., Wood W.G. (1997)
Lipid binding to amyloid b-peptide aggregates: preferential binding of cholesterol as compared with phosphatidylcholine and fatty acids.
J. Neurochem., 69, 1746-1752

Babior B.M. (1978)
Oxygen dependent microbicidal killing by phagocytes.
N. Engl. J. Med., 298, 659-668

Bales K.R., Verina T., Dodel R.C., Du Y., Altstiel L., Bender M., Hyslop P., Johnstone E.M., Little S.P., Cummins D.J., Piccardo P., Ghetti B., Paul S.M. (1997)
Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition.
Nat. Genet. 17, 263-264

Bainton D.F., Ullyot J.L., Farquhar M.G. (1971)
The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in
human bone marrow.
J. Exp. Med. 134, 907-934

Barbier A., Visvikis A., Mathieu F., Diez L., Havekes L., Siest G. (1997)
Characterization of three human apolipoprotein E isoforms (E2, E3 and E4) expressed in *Escherichia coli*.
Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 35, 581-589

Basu, S. K., Ho, Y. K., Brown, M. S., Bilheimer, D. W., Anderson, R. G., and Goldstein, J. L. (1982).
Biochemical and genetic studies of the apoprotein E secreted by mouse macrophages and human monocytes.
J. Biol. Chem. 257, 9788-9795.

Baudy R.B. (1997)
Agents for the treatment of neurodegenerative diseases.
Exp. Opin. Ther. Patents, 7, 1129-1174

Bedwell S., Dean R.T., Jessup W. (1989)
The action of defined oxygen-centred free radicals on human low-density lipoprotein.
Biochem. J. 262, 707-712

Beffert U., Aumont N., Dea D. Lussier-Cacan S., Davignon J., Poirier J. (1998)
β-amyloid peptides increase the binding and internalization of apolipoprotein E to hippocampal neurons.
J. Neurochem., 70, 1458-1466

Behl C., Davis J.B., Lesley R., Schubert D. (1994)
Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity.
Cell 77, 817-827

Behl C., Widmann M., Trapp T., Holsboer F. (1995)
17-beta estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 216, 473-482

Beisiegel U., Weber W., Ihrke G., Herz J., Stanley K. K. (1989).
The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein.
Nature 341, 162-164.

Bellosta S., Nathan B. P., Orth M., Dong L.-M., Mahley R. W., Pitas R. E. (1995).
Stable expression and secretion of apolipoproteins E3 and E4 in mouse neuroblastoma cells produces differential effects on neurite outgrowth.
J. Biol. Chem. 270, 27063-27071.

Berg M.J., Durrie R., Sapirstein V.S., Marks N. (1997)
Composition of white matter bovine brain coated vesicles: evidence that several components influence β-amyloid peptide to form oligomers and aggregates in vitro.
Brain Res., 752, 72-80

Berlett B.S., Stadtman E.R. (1997)
Protein Oxidation in aging, disease and oxidative stress.
J. Biol. Chem., 272, 20313-20316

Berr C., Hauw J.J., Delaere P., Duyckaerts C., Amouyel P. (1994)
Apolipoprotein E allele epsilon 4 is linked to increased deposition of the amyloid beta-peptide (A-beta) in cases with or without Alzheimer's disease.
Neurosci. Lett. 178, 221-224

Bertrand P., Poirier J., Oda T., Finch C.E., Pasinetti G.M. (1995)
Association of apolipoprotein E genotype with brain levels of apolipoprotein E and apolipoprotein J (clusterin) in alzheimer disease.
Mol. Brain Res. 33, 174-178

Biasi F., Chiarpotto E., Lanfranco G., Capra A., Zummo U., Chiappino I., Scavazza A., Albano E., Poli G. (1994)
Oxidative stress in the development of human ischemic hepatitis during circulatory shock.
Free Radic. Biol. Med. 17, 225-233

Bisby H.R., Johnson S.A., Parker A.W. (1996)
Quenching of reactive oxidative species by probucol and comparison with other antioxidants.
Free Radic. Biol. Med., 20, 411-420

Blennow K., Hesse C., Fredman P. (1994)
Cerebrospinal fluid apolipoprotein E is reduced in Alzheimer's disease.
NeuroReport 5, 2534-2536

Borghini I., Barja F., Pometta D., James R. W. (1995).
Characterization of subpopulations of lipoprotein particles isolated from human cerebrospinal fluid.
Biochim. Biophys. Acta 1255, 192-200.

Bors W., Heller W., Michel C., Saran M. (1990)
Flavanoids as antioxidants: determination of radical scavenging efficiencies.
Methods Enzymol., 189, 343-355

Boyles J. K., Pitas R. E., Wilson E., Mahley R. W., Taylor J. M. (1985).
Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system.
J. Clin. Invest. 76, 1501-1513.

Boyse E.A., Flaherty L., Stockert E., Old L.J. (1972)
Histoincompatibility attributable to genes near H-2 that are not revealed by hemagglutination or cytotoxicity tests.
Transplantation 13, 431-432

Braak H., Braak E. (1994)
Morphological criteria for the recognition of Alzheimer's disease and the distribution pattern of cortical changes related to this disorder.
Neurobiol. Aging, 15, 355-356

Brot N., Weissbach H. (1983)
Biochemistry and physiological role of methionine sulfoxide residues in proteins.
Arch. Biochem. Biophys., 223, 271-281

Bukley G.B. (1987)
Free radical-mediated reperfusion injury : A selective review.
Br. J. Cancer, 55, 66-73

Buss H., Chan T.P., Sluis K.B., Domigan N.M., Winterbourn C.C. (1997)
Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method.
Free Radic. Biol. Med. 23, 361-366

Cammer W., Tansey F., Abramovitz M., Ishigaki S., Listowski I. (1989)
Differential localization of glutathione-S-transferase Yp and Yb subunits in oligodendrocytes ans astrocytes of rat brain.
J. Neurochem., 52, 876-883

Campion D., Flaman J.M., Brice A., Hannequin D., Dubois B., Martin C., Moreau V., Charbonnier F., Didierjean O., Tardieu S. (1995)
Mutations of the presenilin I gene in families with early-onset Alzheimer's disease.
Science 269, 970-973

Campion D., Brice A. (1997)
Des familles et des gènes.
La Recherche, 303, 72-74

Cannon J.C., Chasteen N.D. (1975)
Nonequivalence of the metal binding sites in vanadyl-labeled human serum transferrin.
Biochem. , 14, 4573-4577

Carder P.J., Hume R., Fryer A.A., Strange R.L., Lauder J., Bell J.E. (1990)
Glutathione-S-transferase in human brain.
Neuropathol. Appl. Neurobiol., 16, 293-303

Carney J.M., Starke-Reed P.E., Oliver C.N., Landum R.W., Cheng M.S., Wu J.F., Floyd R.A. (1991)
Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tert-butyl-alpha-phenylnitrone.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 88, 3633-3636

Carney J.M., CarneyA.M. 1994
Role of protein oxidation in aging and in age-associated neurodegenerative diseases.
Life Sci., 55; 2097-2103

Castano E., Prelli F. Wisniewski T., Golabek A., Kumar R., Soto C, Frangione B. (1995a)
Fibrillogenesis in Alzheimer's disease of amyloid β peptides and apolipoprotein E.
Biochem. J., 306, 599-604

Castano E.M., Prelli F., Pras M., Frangione B. (1995b)
Apolipoprotein E carboxyl-terminal fragments are complexed to amyloids A and L. Implications for amyloidogenesis and Alzheimer's disease.
J. Biol. Chem. 270, 17610-17615

Cathcart M.K., Morel D.W., Chisolm G.M. (1985)
Monocytes and neutrophils oxidize low-density lipoprotein making it cytotoxic.
J. Leukocyte Biol. 38, 341-350

de Cavanagh E.M.V., Inserra F., Ferder L., Romano L., Ercole L. Fraga C.G. (1995)
Superoxide dismutase and glutathion peroxidase activities are increased by enalapril and captopril in mouse liver.
Febs Lett., 361, 22-24

Ceballos I., Javoy-Agid F., Delacourte A., Defossez A., Lafon M., Hirsch E., Nicole A., Sinet P.M., Agid Y. (1991)
Neuronal localization of copper-zinc superoxide dismutase protein and mRNA within the human hippocampus from control and Alzheimer's disease brains.
Free Radic. Res. Commun., 12-13, 571-580

Ceballos-Picot I., Nicole A., Sinet P.M. (1992)
Cellular clones and transgenic mice overexprssing copper-zinc superoxide dismutase: models for the study of free radical metabolism and aging.
EXS, 62, 89-98

Chang D., Kwan J., Timiras P.S. (1997)
Estrogens influence growth, maturation and amyloid beta-peptide production in neuroblastoma cells and in a beta-APP transfected kidney 293 cell line.
Adv. Exp. Med. Biol., 429, 261-271

Chatterjee S.S., Gabard B.L., Jaggy H.E.W. (1986)
Pharmaceutical compositions containig bilobalide for the treatment of neuropathies.
US patent n°4, 571

Citron M., Oltersdorf T., Haass C., McConlogue L., Hung A.Y., Seubert P., Vigo-Pelfrey C., Lieberburg I., Selkoe D.J. (1992)
Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production.
Nature 360, 672-674

Clearfield M.B., Lee N., Armstrong L., deFazio P., Kudchodkar B.J., Lacko A.G. (1994)
The effect of captopril on the oxidation of plasma lipoproteins.
Pharmacol. Toxicol., 75, 218-221

Connor J.R., Menzies S.L., St Martin S.M., Mufson E.S. (1992)
A histochemical study of iron , transferrin and ferritin in Alzheimer's disease brains.
J.Neurosci. Res., 31, 75-83

Corder E. H., Saunders A. M., Risch N. J., Strittmatter W. J., Schmechel D. E., Gaskell P. C., Jr. Rimmler J. B., Locke P. A., Conneally P. M., Schmader K. E., Small G. W., Roses A. D., Haines J. L., Pericak-Vance M. A. (1994)
Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease.
Nature Genet. 7, 180-184

Corder E. H., Saunders A. M., Strittmatter W. J., Schmechel D. E., Gaskell P. C., Small G. W., Roses A.D., Haines J. L., Pericak-Vance M. A. (1993)
Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families.
Science 261, 921-923

Mc Cormick A., Campisi J. (1991)
Cellular aging and senescence.
Current Opin. Cell. Biol., 3, 230-234

Crichton R.R., Charloteaux-Wauters M. (1987)
Iron transport and storage.
Eur. J. Biochem. 164, 485-506

Crowther R.A. (1993)
Tau protein and paired helical filaments of Alzheimer's disease.
Curr. Opin. Struct. Biol., 3, 202-206

Danilevicius Z. (1973)
Apoptosis: a factor in neoplasic growth.
JAMA, 223, 434-435

Daugherty A., Rateri D.L., Dunn J.L., Heinecke J.W. (1994)
Myelopeoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation is expressed in human atherosclerotic lesions.
J. Clin. Invest., 94, 437-444

Davies P. (1983)
An update on the neurochemistry of Alzheimer's disease.
Adv. Neurol., 38, 75-86

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

Davies K.J.A. (1987)
Protein damage and degradation by oxygen radicals.
II. Modification of amino acids
J. Biol Chem., 262, 9895-9901

Davies K.J.A., Delsignore M.E.(1987)
Protein damage and degradation by oxygen radicals.
J. Biol Chem., 262, 9908-9913

Davies K.J., Lin S.W., Pacifici R.E. (1987)
Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein.
J. Biol. Chem. 262, 9914-9920.

Davies K.J.A. (1997)
Protein oxidation and proteolyisi in response to oxidative stress.
Abstr. Antalya, 17-20

Dean R.T., Thomas S.M., Vince G., Wolff S.P. (1986)
Oxidation induced proteolysis and its possible restriction by some secondary protein modifications.
Biomed. Biochim. Acta 45, 1563-1573

Dean R.T., Shanlin F.U., Stocker R., Davies M.J. (1997)
Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation.
Biochem. J., 324, 1-18

Dergunov A.D., Rosseneu M. (1994)
The significance of apolipoprotein E structure to the metabolism of plasma triglyceride-rich lipoproteins.
Biol. Chem. Hoppe Seyler 375, 485-495

Dickson D.W. (1997)
Discovery of new lesions in neurodegenerative diseases with monoclonal antibody techniques: is there a non-amyloid precursor to senile plaques?
Am. J. Pathol. 151, 7-11

Dong L.-M., Parkin S., Trakhanov S.D., Rupp B., Simmons T., Arnold K.S., Newhouse Y.M., Innerarity T.L., Weisgraber K.H., (1996)
Novel mechanism for defective receptor binding of apolipoprotein E2 in type III hyperlipoproteinemia.
Nature Struct. Biol. 3, 718-722.

Drozdz R., Naskalski J.W. (1988)
Action of myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system on the egg white lysozyme
Acta Biochim. Pol. 35: 277-286.

Drozdz R. and Naskalski J.W. (1993)
Inactivation and denaturation of some proteins by enzyme system: myeloperoxidase, chloride and hydrogen peroxide.
Folia Histochem. Cytobiol., 31, 71-75

Duke M.V. et Salin M.L. (1985)
Purification and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from a eucaryote, Ginkgo biloba.
Arch. Biochem. Biophys., 243, 305-314

Dyrks T., Dyrks E., Hartmann T., Masters C., Beyreuther K. (1992)
Amyloidogenecity of βA4 βA4-bearing amyloid protein precursor fragments by metal-catlyzed oxidation.
J.Biol. Chem., 267, 18210-18217

Eikelenboom P., Zhan S.S., van Gool W.A., Allsop D. (1994)
Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease.
Trends Pharmacol. Sci. 15, 447-450

Ekblom J., Jossan S.S., Gillberg P.G., Oreland L., Aquilonius S.M. (1992)
Monoamine oxidase-B in motor cortex: changes in amyotrophic lateral sclerosis.
Neuroscience, 49, 763-769

Elshourbagy N.A., Liao W.S., Mahley R.W., Taylor J.M. (1985)
Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 203-207

Elstner E.F. (1990)
Der sauerstoff.
Biochemie, Biology Medizin, pp 272-273

Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. (1991)
Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes.
Free Radic. Biol. Med., 11, 81-128

Evans K.C., Berger E.P., Cho C.G., Weisgraber K.H., Lansbury P.T. (1995)
Apolipoprotein E is a kinetic but not a thermodynamic inhibitor of amyloid formation: implication for the pathogenesis and treatment of Alzheimer disease.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 92, 763-767

Farhangrazi Z.S., Ying H., Bu G., Dugan L.L., Fagan A.M., Choi D.W., Holtzman D.M. (1997)
High density lipoprotein decreases b-amyloid toxicity in cortical cell culture.
NeuroReport, 8, 1127-1130

Favier A. (1997)
Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur.
Ann. Biol. Clin., 55, 9-16

Fleming J., Joshi J.G. (1987)
Ferritin isolation of aluminium-ferritin complex from brain.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7866-7870

Floyd R.A. (1990)
Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia.
FASEB J 4, 2587-2597

Focht S.J., Snyder B.S., Beard J.L., Van Gelder W., Williams L.R., Connor J.R. (1997)
Regional distribution of iron, transferrin, ferritin, and oxidatively-modified proteins in young and aged Fischer 344 rat brains.
Neuroscience 79, 255-261

Fowler C.J., Wiberg A., Oreland L., Marcusson J., Winblad B. (1980)
The effect of age on the activity and molecular properties of human brain monoamine oxidase.
J. Neural. Trans., 49, 1-20

Fridocitch I. (1983)
Superoxides radical, an endogenous toxicant.
Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 23, 239-257

Frölich L. Riederer P. (1995)
Free radical mechanisms in dementia of Alzheimer type and the potential for antioxidative treatment.
Drug. Res., 45, 443-446

Fucci L., Oliver C.N., Coon M.J., Statman E.R. (1983)
Inactivation of key metabolic enzymes by mixed-function oxidation reactions: possible implication in proteins turnover and ageing.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 1521-1525

Furuta A., Price D.L., Pardo C.A., Trncoso J.C., Xu Z.S., Taniguchi N., Martin L.J. (1995)
Localization of superoxide dismutases in Alzheimer's disease and Down's syndrome neocortex and hippocampus.
Am. J. Pathol., 146, 357-367

Garrison W.M., Jayko M.E., Bennett W. (1962)
Radiation-induced oxidation of protein in aqueous solution.
Radiati. Res., 16, 483-502

McGeer P.L., McGeer E., Rogers J., Sibley J. (1990)
Anti-inflammatory drugs and Alzheimer disease.
Lancet 335, 1037

McGeer P.L., McGeer E.G. (1995)
The inflammatory response system of the brain : implication for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative disease.
Brain Res. Reviews., 21, 195-218

McGeer P.L., Schulzer M., McGeer E.G. (1996)
Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a reveiw of 17 epidemiologic studies.
Neurology, 47, 425-432

Ghersi-Egea J.F., Livertoux M.H., Minn A., Perrin R., Siest G. (1991)
Enzyme mediated superoxide radical formation initiated by exogenous molecules i rat brain preparation.
Toxicol. Appl. Pharmacol., 110, 107-117

Ghersi-Egea J.F., Perrin R., Leiniger-Muller B., Grassiot M.C., Jeandel C., Floquet J., Cuny G., Siest G., Minn A. (1993)
Subcellular localization of cytochrome P450 and activities of several enzymes responsible for drug metabolism in the human brain.
Biochem. Pharmacol., 45, 647-658

Ghersi-Egea J.F., Leininger-Muller B., Suleman G., Siest G., Minn A. (1994)
Localization of drug-metabolizing enzyme avtivities to blood-brain interfaces and circumventricular organs.
J. Neurochem., 62, 1089-1096

Gibson G.E., Peterson C. (1981)
Aging decreases oxidative metabolism and the release and synthesis of acétylcholine.
J. Neurochem., 37, 978-984

Gitter B.D., Cox L.M., Rydel R.E., May P.C. (1995)
Amyloid beta peptide potentiates cytokine secretion by interleukin-1 beta-activated human astrocytoma cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 92, 10738-10741

van Glist W.H., de Graeff P.A., Wesseling H., de Langen C.D.J. (1986)
Reduction of reperfusion arrythmias in the ischemic isolated rat heart by angiotensin converting enzyme inhibitors: a comparison of captopril, enalapril and HOE 498.
J. Cardiovasc. Pharmacol., 8, 722-728

Golabek A.A., Soto C., Vogel T., Wisniewski (1996)
The interaction between apolipoprotein E and Alzheimer's amyloid b-peptide is dependent on b-peptide conformation.
J. Biol. Chem., 271, 10602-10606

Goldgaber, D., Schwarzman, A.I., Bhasin, R., Gregori, L., Schmechel, D., Saunders, A.M., Roses, A.D. and Strittmatter, W.J., (1993)
Sequestration of amyloid β-peptide.
Ann. NY Acad. Sci. 695, 139-143.

Goldstein J.L., Kita T., Brown M.S. (1983)
Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis. Lessons from an animal counterpart of familial hypercholesterolemia.
N. Engl. J. Med. 309, 288-296

Goodrum J.F. (1991)
Cholesterol from degenerating nerve myelin becomes associated with lipoproteins containing apolipoprotein E.
J. Neurochem. 56, 2082-2086

Gorsky L.D., Koop D.R., Coon M.J. (1984)
On the stoichiometry of the oxidase and monooxygenase reactions catalyzed by liver microsomal cytochrome P-450. Products of oxygen reduction.
J. Biol. Chem. 259, 6812-6817

Grant A.J., Jessup W., Dean R.T. (1992)
Accelerated endocytosis and incomplete catabolism of radical-damaged protein.
Biochim. Biophys. Acta, 1134, 203-209

Grant A.J., Jessup W., Dean R.T. (1993)
Inefficient degradation of oxidized regions of protein molecules.
Free Rad. Res. Comms., 18, 259-267

Grundke-Iqbal I., Fleming J., Tung Y.C., Lassmann H., Iqbal K., Joshi J.G. (1990)
Ferritin is a component of the neuritic (senile) plaques in Alzheimer dementia.
Acta Neuropathol. 81, 105-110

Guengerich F.P., Wang P., Mason P.S. (1981)
Immunological comparison of rat, rabbit and human liver NADPH-cytochrome P450 reductases.
Biochem. 20, 2379-2385

Guptasarma P., Balasubramanian D., Matsugo S., Saito I. (1992)
Hydroxyl radical mediated damage to proteins, with special reference to the crystallins.
Biochem. 31, 4296-4303

Gutteridge J.M., Stocks J. (1981)
Caeruloplasmin: physiological and pathological perspectives.
Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 14, 257-329

Gutteridge J.M. (1984)
Tissue damage by oxy-radicals: the possible involvement of iron and copper complexes.
Med. Biol. 62, 101-104

Haas C., Cazorla P., De Miguel C., Valdivieso F., Vazquez J. (1997)
Apolipoprotein E forms stable complexes with recombinant Alzheimer's disease β-amyloid precursor protein.
Biochem. J., 325, 169-175

Habig W.H., Pabst M.J., Jacoby W.B. (1974)
Glutathione *S*-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation.
J. Biol. Chem., 249, 7130-7139

Halliwell B., (1992)
Reactive oxygen species and the central nervous system.
J. Neurochem., 59, 1609-1623

Handelmann G. E., Boyles J. K., Weisgraber K. H., Mahley R. W., Pitas R. E. (1992). Effects of apolipoprotein E, beta-very low density lipoproteins, and cholesterol on the extension of neurites by rabbit dorsal root ganglion neurons *in vitro*.
J. Lipid. Res. 33, 1677-1688.

Hanlon C. S., Rubinsztein D. C. (1995).
Arginine residues at codons 112 and 158 in the apolipoprotein E gene correspond to the ancestral state in humans.
Atherosclerosis 112, 85-90.

Hansen T.W.R. (1994)
Bilirubin in the brain.
Clin. Pediatr., 33, 452-459

Hansen T.W.R., Tommarello S., Allen J.W. (1997)
Oxidation of bilirubin by rat brain mitochondrial membranes-genetic variability.
Biochem. Mol. Med., 62, 128-131

Harman D. (1992)
Free radical theory of aging.
Mutation Res. 275, 257-266

Hayer S. (1995)
Age related changes in cerebral oxidative metabolism.
Drugs and Aging, 6, 210-218

Hayflick L.(1973)
Current theories of biological aging.
Federation Proc., 34, 9-13

Hazell L.I., Arnold L., Flowers D., Waeg G., Malle E., Stocker R. (1996)
Presence of hypochlorite-modified proteins in human atherosclerotic lesions.
J. Clin. Invest., 97, 1535-1544

Hazen S.L., Heinecke J.W. (1997)
3-chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima.
J.Clin. Invest., 99, 2075-2081

Heinecke J.W., Li W., Francis G.A., Golstein J.A. (1993)
Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase catalyzes the oxidative cross-linking of proteins.
J. Clin. Invest. 91, 2866-2872

Heinecke J.W. (1997)
Mechanisms of oxidative damage of low density lipoprotein in human atherosclerosis.
Curr. Opinion Lip., 8, 268-274

Hensley K., Carney J.M., Mattson M.P., Aksenova M., Harris M., Wu J.F., Floyd R.A., Butterfield D.A. (1994)
A model for β-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radiacl generation by the peptide : relevance to Alzheimer's Disease.
Proc. Natl. Am. Soc. USA, 91, 3270-3274

Hensley K., Hall N., Subramaniam R., Cole P., Harris M., Aksenov M., Aksenova M., Gabbita S.P., Wu J.F., Carney J.M. (1995)
Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation.
J. Neurochem. 65, 2146-2156

Hochstein P., Hatch L., Sevanian A. (1984)
Uric acid: functions and determination.
Methods Enzymol. 105:162-166

Huang D.Y., Goedert M., Jakes R., Weisgraber K.H., Garner C.C., Saunders A.M., Pericak-Vance M.A., Schmechel D.E., Roses A.D., Strittmatter W.J. (1994)
Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with the microtubule-associated protein MAP2c: implications for Alzheimer's disease.
Neurosci. Lett. 182, 55-58

Hunt J.V., Bailey J.R., Schultz D.L., McKay A.G., Michinson M.J. (1994)
Apolipoprotein oxidation in the absence of lipid peroxidation enhances LDL uptake by macrophage.
FEBS Lett., 349, 375-379

Hyman B. T., West H. L., Rebeck G. W., Buldyrev S. V., Mantegna R. N., Ukleja M., Havlin S., Stanley H. E. (1995)
Quantitative analysis of senile plaques in Alzheimer disease: observation of log-normal size distribution and molecular epidemiology of differences associated with apolipoprotein E genotype and trisomy 21 (Down syndrome).
Proc. Nat. Acad. Sci. 92, 3586-3590

Ignatius M.J., Gebicke-herter P.J., Skene J.H.P., Schilling J.W. Weisgraber K.H., Mahley R.W., Shooter E.M. (1986)
Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 1125-1129

Innerarity T. L., Friedlander E. J., Rall S. C. Jr., Weisgraber K. H., Mahley R. W. (1983)
The receptor-binding domain of human apolipoprotein E. Binding of apolipoprotein E fragments.
J. Biol. Chem. 258, 12341-12347.

Ishiguro M., Imai Y., Kohsaka S. (1995).
Expression and distribution of low density lipoprotein receptor-related protein mRNA in the rat central nervous system.
Brain Res. Mol. 33, 37-46.

Jackson C.V., Holland A.J., Williams C.A., Dickerson J.W. (1988)
Vitamin E and Alzheimer's disease in subjects with Down's syndrome.
J. Ment. Defic. Res. 32, 479-484

Jacobs D.M., Tang M.X., Stern Y., Sano M., Marder K., Bell K.L., Schofield P., Dooneief G., Gurland B., Mayeux R. (1998)
Cognitive functions in non demented older women who took estrogen after menopause.
Neurology, 50, 368-373

Jacobsen L., Madsen P., Moestrup S.K., Lund A.H., Tommerup N., Nykjaer A., Sottrup-Jensen L., Gliemann J., Petersen C.M. (1996)
Molecular characterization of a novel human hybrid-type receptor that binds the α2-macroglobuline receptor-associated protein.
J. Biol. Chem. 271, 31379-31383

Jenner P. (1994)
Oxidative damage in neurodegenerative disease.
Lancet 344, 796-798

Jerlich A., Fabjan J.S., Tschabushing S., Smirnova A.V., Horakova L., Hayn M., Auer H., Guttenberger H., Leis H.J., Tatzber F., Waeg G., Schaur R.J. (1998)
Human low density lipoprotein as a target of hypochloride generated by myeloperoxidase.
Free Radic. Biol. Med., 24, 1139-1148

Jiang H., Burdick D., Glabe C.G., Cotman C.W., Tenner A.J. (1994)
beta-Amyloid activates complement by binding to a specific region of the collagen-like domain of the C1q A chain.
J. Immunol. 152, 5050-5059

Johnston J.P. (1968)
Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue.
Biochem. Pharmacol., 17, 1285-1297

Jolivalt C., Minn A., Vincent-Viry M.,. Galteau M.M, Siest G.(1995)
Dextromethorphan *O*-demethylase activity in rat brain microsomes.
Neurosci. Lett., 187, 65-68

Jolivalt C., Leininger-Muller B., Drozdz R., Naskalski J.W., Siest G. (1996)
Apolipoprotein E is highly susceptible to oxidation by myeloperoxidase, an enzyme present in the brain.
Neurosci. Lett., 210, 61-64

Jonas A. (1984)
A review of plasma apolipoprotein A-I interaction with phosphatidylcholines.
Exp. Lung Res. 6,255-70.

Jordan J., Galindo M.F., Miller R.J., Reardon C.A., Getz G.S., LaDu M.J. (1998)
Isoform-specific effect of apolipoprotein E on cell survival and β-amyloid toxicity in rat hippocampal pyramidal neuronal cultures.
J. Neurosci., 18, 1-10

Jossan S.S., D'Argy R., Aquilonius S.M., Langström B., Halletin C., Bjurling P., Stalnacke C.G., MacGregor R., Oreland L. (1989)
Localization of monoamine oxidase B in human brain by autoradiographical use of "C-labelled" t-deprenyl.
J. Neural. Trans., 77, 55-64

Jossan S.S., Gillberg P.G., Gotteries C.G., Karlsson I., Oreland L. (1991)
Monoamine oxidase B in brains from patients with Alzheimer's disease: a biochemical and autoradiographical study.
Neuroscience, 45, 1-12

Kannan R., Kuhlenkamp J.F., Jeandidier E., Trinh H., Ookhtens M., Koplowitz N. (1990)
Evidence for carrier-mediated transport of glutathione accross the blood-brain barrier in the rat.
J. Clin. Invest., 85, 2009-2013

Kanowski S., Herrmann W.M., Stephan K., Wierich W., Horr R. (1996)
Proof of efficacy of the *Ginkgo biloba* special extract EGb 761 in outpatients suffering from mild to moderate primary degenerative dementia of the Alzheimer type or multi-infarct dementia.
Pharmacopsychiatry; 29, 47-56

Kawas M.D., Resnick S., Morrison A., Brookmeyer R., Corrada M., Zonderman A., Bacal C., Donnell Lingle D., Metter E.A. (1997)
A prospective study of estrogen replacement therapy and the risk of developping Alzheimer's disease. The Baltimorer Longitudinal Study.
Neurology, 48, 1517-1521

Keller R.J., Coulombe R.A. Jr, Sharma R.P., Grover T.A., Piette L.H. (1989)
Importance of hydroxyl radical in the vanadium-stimulated oxidation of NADH.
Free Radic. Biol. Med., 6, 15-22

Keller R.J., Halmes N.C., Hinson J.A., Pumford N.R. (1993)
Immunochemical detection of oxidized proteins.
Chem. Res. Toxicol. 6, 430-33

Kim D.-H., Iijimn H., Goto K., Sakai J., Ishii H., Kim H.-J., Suzuki H., Kondo H., Saeki S., Yamamoto T. (1996)
Human apolipoprotein E receptor 2. A novel lipoprotein receptor of the low density lipoprotein receptor family predominantly expressed in brain.
J. Biol. Chem. 271, 8373-8380.

Kimura K. (1997)
Mecanisms of active oxygen species reduction by non-steroidal anti-inflammatory drugs.
Int. J. Biochem. Cell. Biol., 29, 437-446

Kisilevsky R., Fraser P.E. (1997)
Aβ amyloidogenesis : unique or variation on a systemic theme ?
Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 32, 361-404

Kisilevsky R. (1994)
Inflammation-associated amyloidogenesis. Lessons for Alzheimer's amyloidogenesis.
Mol. Neurobiol. 8, 65-66.

Kitahara M., Eyre H.S., Simonian Y., Atkin C.L., Hasstedt S.J. (1981)
Hereditary myeloperoxidase deficiency.
Blood, 57, 888-893

Klebanoff S.J.(1982)
Oxygen-dependent cytotoxic mechanisms of phagocytes.
In Gallin J.L., Fauci A.S. (Eds) Advance host defense mechanisms. N.Y. Raven Press, 1, 111-162

Klein J., Chatterjee S.S., Löffelholz K. (1997)
Phospholipid breakdown and choline release under hypoxic conditions : inhibition by bilobalide, a constituent of Gingko biloba.
Brain Res., 755, 347-550

Koudinov A., Matsubara E., Frangione B., Ghiso J. (1994)
The solution form of Alzheimer's amyloid beta protein is complexed to high density lipoprotein 3 and very high density lipoprotein in normal human plasma.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 205, 1164-1171

Koudinov A.R., Koudinova N.V., Kumar A., Beavis R.C., Ghiso J. (1996)
Biochemical characterization of Alzheimer's soluble amyloid beta protein in human cerebrospinal fluid: association with high density lipoproteins.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 223, 592-597

Kriegelstein J., Ausmeier F., El-Abhar H., Lipert K., Welsch H., Rupalla K., Henrich-Noack P. (1995)
Neuroprotective effects of Gingko biloba constituents.
Eur. J. Pharmac. Sci., 3, 39-48

Lacour M., Ez-Zaher L., Raymond J. (1991)
Plasticity mechanisms in vestibular compensation in the cat are improved by an extract of Gingko biloba (EGb 761).
Pharmacol. Biochem. Behav. 40, 367-379

Laemmli U. (1970).
Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227, 680-685.

Lapenna D. et Cuccurullo F. (1995)
Captopril: does it act as a direct antioxidant by free radical scavenging in humans?
Free Radic. Biol. Med., 18, 377-379

Larsen F., Solheim J., Prydz H. (1993).
A methylated CpG island 3' in the apolipoprotein-E gene does not repress its transcription.
Hum. Molec. Genetics 2, 775-780.

Le Bars P.L., Katz M.M., Berman N., Itil T.M., Freedman A.M., Schatzberg A.F. (1997)
A placebo-controlled, double-bind, randomized trial of an extract of ginkgo biloba for dementia.
JAMA, 278, 1327-1332

Leininger-Muller, B., Jolivalt, C., Pillot, T., Lagrange, P., Livertoux, M.H., Grassiot, M.C., Minn, A. and Siest, G. (1995)
Apolipoprotein E oxidation and functional consequences.
In Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease. Research and perspectives in Alzheimer's disease, (Roses et al. eds) Springer-Verlag.

Leeuwenburgh C., Rasmussen J.E., Hsu F.F., Mueller D.M., Pennathur S., Heinecke J.W. (1997)
Mass spectrometric quantification of markers for protein oxidation by tyrosyl radical, copper, and hydroxyl radical in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic plaques.
J. Biol. Chem. 272, 3520-3526

Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Aminci A., Climent I., Lenz A.G. (1990)
Determination of carbonyl content in oxydatively modified proteins.
Methods Enzymol., 186, 464-478

Levine R.L., Williams J.A., Stadtman E.R., Shacter E. (1994)
Carbonyl assays for determination of oxidatively modifiedproteins.
Methods Enzymol. 233, 346-357

Levine R.L., Mosoni L., Berlett B.S., Stadtman E.R., (1996)
Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 15036-15040.

Levy-Lahad E., Wijsman E.M., Nemens E., Anderson L., Goddard K.A., Weber J.L., Bird T.D., Schellenberg G.D. (1995)
A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1.
Science 269, 970-973

Listowski I., Abramovitz M., Homma H., Niitsu Y. (1988)
Intracellular binding of hormones and xenobiotics by glutathione-S-transferase.
Drug Metab. Rev., 19, 305-318.

Loeffler D.A., LeWitt P.A., Juneau P.L., Sima A.A., Nguyen H.U., DeMaggio A.J., Brickman C.M., Brewer G.J., Dick R.D., Troyer M.D., Kanaley L. (1996)
Increased regional brain concentrations of ceruloplasmin in neurodegenerative disorders.
Brain Res. 738, 265-274

Long C.A., Bielski B.H.J. (1980)
Rate of reaction of superoxide radical with chloride-containing species.
J. Phys. Chem. 84, 555-557

Lorenzo A., Yankner B.A. (1994)
Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 12243-12247

Lovell M.A., Ehmann W.D., Butler S.M., Markesbery W.R. (1995)
Elevated thiobarbituric acid-reactve substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease.
Neurology, 45, 1594-1601

Lowry O.H., Roserbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951)
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 193, 295-275

Lyras L., Evans P.J., Shaw P.J., Ince P.G., Halliwell B. (1996)
Oxidative damage and motor neurone disease difficulties in the measurement of protein carbonyls in human brain tissue.
Free Radic. Res. 24, 397-406

Ma S., Yee A., Brewer H.B.Jr, Dao S., Potte H. (1994)
Amyloid-associated proteins α1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly to Alzheimer β protein into filaments.
Nature, 372, 92-94

Maeda M., Takagi H., Hattori H., Matsuzali T. (1997)
Localization of manganese superoxide dismutase in the cerebral cortex and hippocampus of Alzheimer-type senile dementia.
Osaka City Med. J., 43, 1-5

Mahley R.W. (1988)
Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology.
Science 240, 622-630.

Maitra I., Marcocci L., Droy-Lefaix M.T., Packer L. (1995)
Peroxyl radical scavenging activity of *Ginkgo biloba* extract EGb 761.
Biochem. Pharmacol., 49, 1649-1655

Mak I.T., Freedman A.M., Dickens B.F., Weglicki W.B. (1990)
Protective effects of sulfhydryl-containing angiotensin converting enzyme inhibitors against free radical injury in endothelial cells.
Biochem. Pharmacol., 40, 2169-2175

Manelli A.M., Puttfarcken P.S. (1995)
beta-Amyloid-induced toxicity in rat hippocampal cells: in vitro evidence for the involvement of free radicals.
Brain Res. Bull., 38, 569-576

Mannervick (1985)
The isoenzymes of glutathione-S-transferase.
Adv. Enzymol. Mol. Biol., 57, 357-417

McManus M.E., Hall P.M., Stupaus I., Brennen J., Burgess W., Robinson R., Birket D.J. (1988)
Immunohistochemical localization and quantitation of NADPH-cytochrome P-450 reductase in human liver.
Mol. Pharmacol., 32, 189-194

Marcocci L., Packer L., Droy-Lefaix M.-T., Sekaki A., Gardès-Albert M. (1994)
Antioxidant action of *Ginkgo biloba* extract EGb 761.
Methods Enzymol., 234, 462-475

Markesbery W.R. (1997)
Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease.
Free Rad., Biol., Med., 23, 134-147

Marklund S.L., Oreland L., Perdahl E., Winbald B. (1983)
Superoxide dismutase activity in brains from chronic alcoholics.
Drug Alcohol Depend., 12, 209-215

Marques M.A., Tolar M., Harmony J.A.K., Crutcher K.A. (1996)
A thrombin cleavage fragment of apolipoprotein E exhibits isoform-specific neurotoxicity.
Neuroreport, 7, 2529-2532

Martinez-Cayuela M. (1995)
Oxygen free radicals and human disease.
Biochimie, 77, 147-161

Mattson M.P., Barger S.W., Begley J., Mark R.J. (1995)
Calcium, free radicals and excitotoxic neuronal death in primary cell culture.
Methods Cell Biol., 46, 187-216

May PC, Gitter BD, Waters DC, Simmons LK, Becker GW, Small JS, Robison PM (1992)
beta-Amyloid peptide in vitro toxicity: lot-to-lot variability.
Neurobiol Aging;13, 605-607

Meister A., Anderson M.E. (1983)
Glutathione.
Annu. Rev. Biochem. 52, 711-760

Méresse S., Delbart C., Fruchart J.C., Cecchelli R. (1989)
Low density lipoprotein receptor on endithelium of brain capillaries.
J. Neurochem. 53, 340-345

Mesnil H., Testa B., Jenner P. (1984)
Xenobiotic metabolism by brain monooxygenase and other cerebral enzyme.
Adv. Drug Res., 13, 95-207

Miyata M., Smith J.D. (1996)
Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and β-amyloid peptides.
Nature Genet. 14:55-61.

Monboisse J.C., Cgarnotel R., Droy-Lefaix M.T., Borel J.P. (1993)
A *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) inhibits superoxide-anion production by human neutrophils.
In: Advances in *Ginkgo biloba* research, vol 2, *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) as a free radical scavenger (Ferradini C, Droy-Lefaix MT, Christen Y, eds), Elsevier, Paris, 124-128

Montine T., Amarnath V., Martin M.,E., Strittmatter W.J., Graham D.G.(1996a)
E-4-hydroxy-2-nonenal is cytotoxic and cross-links cytoskeletal proteins in P19 neuroglial cultures.
Am. J. Pathol., 55, 202-210

Montine T.J., Huang D.Y., Valentine W.M., Amarnath V., Saunders A., Weisgraber K.H., Graham D.G., Strittmatter W.J. (1996b)
Crosslinking of apolipoprotein E by products of lipid peroxidation.
J. Neuropathol. Exp. Neurol. 55:202-210.

Montine TJ, Montine KS, Swift LL (1997)
Central nervous system lipoproteins in Alzheimer's disease.
Am. J. Pathol., 151, 1571-1575

Montoliu C., Sancho-Tello M., Azorin I., Burgal M., Valles S., Renau-Piqueras J., Guerri C. (1995)
Ethanol increases cytochrome P450 2E1 and induces oxidative stress in astrocytes.
J. Neurochem., 65, 2561-2570

Mrak R.E., Sheng J.G., Griffin W.S. (1995)
Glial cytokines in Alzheimer's disease: review and pathogenic implications.
Hum. Pathol. 26, 816-823

Naiki H., Higuchi K., Hosokawa M., Takeda T. (1989)
Fluorometric determination of amyloid fivrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavine T.
Anal. Biochem. 177, 244-249.

Namba, Y., Tomonaga, M., Kawasaki, H., Otomo, E., and Ikeda, K. (1991).
Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease.
Brain Res. 541, 163-166.

Näslund J. Thyberg J., Tjernberg L.O., Wernstedt C., Karlström A.R., Bogdanovic N., Gandy S.E., Lannfelt L., Terenius L., Norstedt C. (1995)
Characterization of stable complexes involving apolipoprotein E and the amyloid b peptide in Alzheimer's disease brain.
Neuron., 15, 219-228

Nathan B. P., Bellosta S., Sanan D. A., Weisgraber K. H., Mahley R. W., Pitas R. E. (1994)
Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro.
Science 264, 850-852.

Nakamura S., Kawamata T., Akiguchi I., Kameyama M., Nakamura N., Kimura H. (1990)
Expression of monoamine oxidase B activity in astrocytes of seniles plaques.
Acta Neuropathol., 80, 419-425

Naskalski J.W. (1980)
Simple procedure of isolation of myeloperoxidase from leukocytes, pus and bone marrow cells.
Acta Med. Pol., 21, 129-137

Nauseef W.M., Olsson I., Arnljots K. (1988)
Biosynthesis and processing of myeloperoxidase a marker for myeloid cell differentiation.
Eur. J. Haematol., 110, 97-110

Nauseef W.M. (1990)
Myeloperoxidase deficiency.
Hematol. Pathol., 4, 165-178

Nguyen T, Pickett C.B. (1992)
Regulation of rat glutathione S-transferase subunit gene expression.
J. Biol. Chem.,267, 13535-13539

Noguchi N., Gotoh N. Niki E. (1994)
Effects of ebselen and probucol on oxidative modifications of lipid and protein of low density lipoprotein induced by free radicals.
Biochem. Biophys. Acta, 1213, 176-182

Oberpichler H., Beck T., Abdel-Rahman M., Bielenberg G.W., Krieglstein J. (1988)
Effects of Gingko biloba constituents related to protection against brain damage caused by hypoxia.
Pharmacol. Res. Commun., 20, 349-368

Ogino T., Packer L., Maguire J.J. (1997)
Neutrophil antioxidant capacity during the respiratory burst: loss of glutathione induced by chloramines.
Free Radic. Biol. Med. 23, 445-452

Oliver C.N., Ahn B., Moerman E.J., Golstein S., Stadtman E.R. (1987)
Age-related changes in oxidized proteins.
J. Biol. Chem., 282, 5488-5491

Oörni K., Pentikäinen M.O., Annila A., Kovanen P.T. (1997)
Oxidation of low density lipoprotein particles decrease their ability to bind to human aortic proteoglycans. Dependence on oxidative modification of lysine residues.
J.Biol.Chem., 272, 21303-21311

Ozawa T., Hanaki A. (1989)
ESR evidence for the formation of hydroxyl radicals during the reaction of vanadyl ions with hydrogen peroxide.
Chem. Pharm. Bull., 37, 1407-1409

Ozer N.K., Sirikçi O., Taha S., San T., Moser U., Azzi A. (1998)
Effect of vitamin E and probucol on dietary cholesterol-induced atherosclerosis in rabbits.
Free Rad. Biol. Med., 24, 226-233

M.I., Agapito M.T., Gutierrez R., Recio J.M., Reiter R.J., Barlow-Walden L., Acuna-Castroviejo D., Menendez-Pelaez A. (1995)
Melatonin stimulates the activity of the detoxifying enzyme glutathione peroxidase in several tissues of chicks.
J. Pineal. Res. 19, 111-115

Pacifici R.E., Salo D.C., Davies K.J. (1989)
Macroxyproteinase (M.O.P.): a 670 kDa proteinase complex that degrades oxidatively denatured proteins in red blood cells.
Free Radic. Biol. Med. 7, 521-536

Pacifi E., Davies K.J.A. (1990)
Protein degradation as an index of oxidative stress.
Methods Enzymol., 186, 485-502

Pacifici R.E., Davies K.J.A. (1991)
Protein, lipids and DNA repair systems in oxidative stress: in the free radical theory of aging revisited.
Gerontology, 37, 166-180

Parker Jr. W.D., Filley C.M., Parks J.K. (1990)
Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disesase.
Neurology, 40, 1302-1303

Pember S.O., Shapira R., Kinkade J.M. (1983)
Multiple forms of myeloperoxidase from human neutrophilic granulocytes: evidences for differences in compartmentalization, enzymatic activity, and subunit structure.
Arch. Biochem. Biophys. 221, 391-403

Permanne B., Perez C., Soto C., Frangione B., Wisniewski T. (1997)
Detection of apolipoprotein E/dimeric soluble amyloid β complexes in Alzheimer's disease brain supernatants.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 240, 715-720

Pettegrew J.W., Panchalingam K., Klunk W.E., McClure R.J., Muenz L.R. (1994)
Alteration of cerebral metabolism in probable Alzheimer's disease: A preliminary Study.
Neurobiol. Aging, 15, 117-132

Pieri C., Marra M., Moroni F., Decchioni R., Marcheselli F. (1994)
Melatonin : a potent endogenous hydroxyl radical scavenger.
Life Sci., 1,57-60

Pike C.J., Burdick D., Walencewicz A.J., Glabe C.G., Cotman C.W. (1993)
Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state.
J. Neurosci. 13, 1676-1687

Pileblad E., Enkssen P.S., Hansson E. (1991)
The presence of glutathione in primary neuronal and astroglial cultures from rat cerebral cortex and brain stem.
J. Neural. Transm., 86, 43-49

Pillot T., Goethals M., Vanloo B., Lins L., Brasseur R., Vanderckhove J., Rosseneu M. (1997a)
Specific modulation of the fusogenic properties of the Alzheimer beta-amyloid peptide by apolipoprotein E isoforms.
Eur. J. Biochem., 243, 650-659

Pillot T., Goethals M., Vanloo B., Talussot C., Brasseur R., Vanderckhove J., Rosseneu M., Lins L. (1997b)
Fusogenic properties of the C-terminal domain of the Alzheimer beta-amyloid peptide.
J. Biol. Chem., 271, 28757-28765

Pincemail J., Dupuis M., Nasr C., Hans P., Haag-Berririer M., Anton R., Deby C. (1989)
Superoxide anion scavenging effect and superoxide dismutase activity of Ginkgo Biloba extract.
Experimentia, 45, 708-712

Pitas R.E., Boyles J.K., Lee S.H., Hui D., Weisgraber K.H. (1987a)
Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of aoplipoprotein B, E (LDL) receptors in the brain.
J. Biol. Chem. 262, 14352-14360

Pitas R.E., Boyles J.K., Lee S.H., Foss D., Mahley R.W. (1987b)
Astrocytes synthetise apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins.
Biochim. Biophys. Acta, 917, 148-161

Poirier J., Hess M., May P.C., Finch C.E. (1991)
Astrocytic apolipoprotein E mRNA and GFAP mRNA in hippocampus after entorhinal cortex lesioning.
Mol. Brain Res. 11, 97-106

Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrand P, Gauthier S (1993)
Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease.
Lancet 342, 697-699

Poirier J. (1994)
Apolipoprotein E in animal models of brain injury and in Alzheimer's disease.
Trends Neurosci. 17, 525-530.

Poirier J., Delisle M.-C., Quirion R., Aubert I., Farlow M., Lahiri D., Hui S., Bertrand P., Nalbantoglu J., Gilfix B. M., Gauthier S. (1995)
Apolipoprotein E4 allele as a predictor of cholinergic deficits treatment outcome in Alzheimer disease.
Proc. Nat. Acad. Sci. 92, 12260-12264

Pré J. (1992)
Radicaux libres et peroxydation lipidique I.
In Fre radicals and lipid peroxidation., Sem. Hôp. Paris, 68, 1430-1437

Puchala M., Schuessler H. (1993)
Oxygen effect in the radiolysis of proteins. III. Haemoglobin.
Int. J. Radiat. Biol. 64, 149-156

Puchala M., Schuessler H. (1995)
Oxygen effect in the radiolysis of proteins. IV. Myoglobin.
Int. J. Pept. Protein Res. 46, 326-332

Ramasarma T, Crane FL (1981)
Does vanadium play a role in cellular regulation?
Curr Top Cell Regul; 20, 247-301

Ramassamy C., Delisle M.C., Schoofs A., Christen Y., Poirier J. (1996)
Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) on apo E and apo J release by astrocytes after lipoperoxidation and on the level of hippocampal apo E after enthorhinal cortex lesioning.
In Advances in Ginkgo biloba extract Res., vol 5, Y. Christen M.T. Droy-Lefaix, J.F. Macias-Munez (Eds), pp 53-60

Ramassamy C., Beffert U., Averill D., Christen Y., Schoofs A., Poirier J. (1997)
Influence of apolipoprotein E genotype on lipoperoxidation in Alzheimer's disease brain.
Soc. Neurosci. Abstr., 536.18

Rao G., Xia E., Richardson A. (1990)
Effect of age on the expression of antioxidant enzymes in male Fisher F344 rats.
Mech. Ageing Dev., 53, 49-60

Raps S.A., Lai J.C.K., Hertz L., Cooper A.J.I. (1989)
Glutathione is present in high concentrations in cultured astrocytes but not in cultured neurons.
Brain Res., 493, 398-404

Ravindranath V., Anandatheerthavarada H.K., Shankar S. (1990)
NADPH cytochrome P-450 reductase in rat, mouse and human brain.
Biochem. Pharmacol., 39, 1013-1018

Re G., Azzimondi G., Lanzarini C., Bassein L., Vaona I., Guarnieri C. (1997)
Plasma lipoperoxidative markers in ischemia stroke sggest brain embolism.
Eur. J. Emerg. Med., 4, 5-9

Reiter R.J. (1991)
Pineal melatonin cell biology of its synthesisi and of its physiological interaction.
Endocrine Res., 12, 151-180

Reiter R.J. (1995)
Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain.
Faseb J., 9, 526-533

Requenna J.R., Fu M.X., Ahmed M.U., Jenkins A.J., Lyons T.J., Thorpe S.R. (1996)
Lipoxidation products as biomarkers of oxidative damage to proteins during lipid peroxidation reactions.
Nephrol. Dial. Transplant., 11, 48-53

Resnick S.M., Metter E.J., Zonderman A.B. (1997)
Estrogen replacement therapy and longitudinal decline in visual memory. A possible protective effect?
Neurology 49, 1491-1497

Reyland M.E., Prack M.M., Williams D.L. (1992)
Elevated levels of protein kinase C in Y1 cells which express apolipoprotein E decrease basal steroidogenesis by inhibiting expression of P450-cholesterol side chain cleavage mRNA.
J. Biol. Chem. 267, 17933-17938

Robak J., Gryglewski R.J. (1988)
Flavonoids are scavengers of superoxide anions.
Biochem. Pharmacol. 37, 837-841

Roberts L.M., Ray M.J., Shih T.W., Hayden E., Reader M.M., Brouillette C.G. (1997)
Structural analysis of apolipoprotein AI: limited proteolysis of methionine-reduced and -oxidized lipid-free and lipid-bound human apo AI.
Biochem., 36, 7615-7624

Robinson J., Badwey J. (1995)
The NADPH oxidasecomplex of phagocytic leukocytes: a biochemical and cytochemical view.
Histochem., 103, 163-180

Robinson J.R., Noone D.F., Kril J., Halliday G.M. (1995)
Most amyloid plaques contain ferritin-rich cells.
Alz. Res., 1, 191-196

Rogers J., Cooper N.R., Webster S., Schultz J., McGeer P.L., Styren S.D., Civin W.H., Brachova L., Bradt B., Ward P. (1992)
Complement activation by beta-amyloid in Alzheimer disease.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10016-10020

Rogers J., Kirby L.C., Hempelman S.R., Berry D.L., McGeer P.L., Kaszniak A.W., Zalinski J., Cofield M., Mansukhani L., Willson P. (1993)
Clinical trial of indomethacin in Alzheimer's disease.
Neurology 43, 1609-1611

Rogers J (1995)
Inflammation as a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease.
Arzneimittelforschung 45, 439-442

Rosen H., Orman J., Ratika R.M., Michel B.R., Van Devanter D.R. (1990)
Loss of DNA-membrane interaction and cessation of DNA synthesis in myeloperoxidase-treated Escherichia coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 10048-10052

Rosen G.M., Pou S., Ramos C.L., Cohen M.S., Britigan B.E. (1995)
Free radicals and phagocytic cells.
Faseb J., 9, 200-209

Roses A.D. (1993)
Molecular genetics of neurodegenerative diseases.
Curr. Opin. Neurol. Neurosurg. 6, 34-39

Roses A.D., Saunders A.M., Corder E.H., Pericak-Vance M.A., Han S.H., Einstein G., Hulette C., Scmechel D.E., Hlsti M., Huang D., Risch N.J., Haines J.L., Goedert M., Jakes R., Dong L.M., Weisgraber K.H., Strittmatter W.J. (1995)
Influence of the susceptibility genes apolipoprotein E-ε4 and apolipoprotein E-ε2 on the rate of disease axpressivity of late-onset Alzheimer's disease.
Drug Res., 45, 413-417

Rumley A.G., Paterson J.R., (1998)
Analytical aspects of antioxidants and free radical activity in clinical biochemistry.
Ann. Clin. Biochem., 35, 181-200

Ryan T.P, Aust S.D. (1992)
The role of iron in oxygen-mediated toxicities.
Crit. Rev. Toxicol., 22, 119-141

Saitoh T., Xia Y., Chen X., Masliah E., Galasko D., Shults C., Thal L.J., Hansen L.A., Katzman R. (1995)
The CYP2D6B mutant allele is overrepresented in the Lewy body variant of Alzheimer's disease.
Ann. Neurol. 37, 110-112

Sanan D. A., Weisgraber K. H., Russell S. J., Mahley R. W., Huang D., Saunders A., Schmechel D., Wisniewski T., Frangione B., Roses A. D. (1994)
Apolipoprotein E associates with beta amyloid peptide of Alzheimer's disease to form novel monofibrils. Isoform apoE4 associates more efficiently than apoE3.
J. Clin. Invest. 94, 860-869.

Sano M., Ernesto C., Thomas R.G., Klauber M.R., Schafer K., Grundman M., Woodbuy P., Grewdon J., Cotman C.W., Pfeiffer E., Scnheider L.S., Thal L.J. (1997)
A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disesase. The Alzheimer's disesase cooperative study.
N. Engl. J. Med., 336, 1216-1222

Sawada M., Sester U., Carlson J.S. (1992)
Superoxide radical formation and associated biochemical alterations in the plasma membrane of brain, heart and liver during the lfetime of the rat.
J. Cell. Biochem., 48, 296-304.

Scheuner D., Eckman C., Jensen M., Song X., Citron M., Suzuki N., Bird T.D., Hardy J., Hutton M., Kukull W., Larson E., Levy-Lahad E., Viitanen M., Peskind E., Poorkaj P., Schellenberg G., Tanzi R., Wasco W., Lannfelt L., Selkoe D., Younkin S. (1996)
Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vitro by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease.
Nature Med., 2 864-870

Schlutz J. (1980)
Myeloperoxidase
In Sbarra A.J., Strauss R.R.(Eds) The reticuloendothelial system, vol. 2, Biochemistry and metabolism, N.Y., Plenum Press, pp 231

Schmechel D.E., Saunders A.M., Strittmatter W.J. (1993)
Increased amyloid b-peptide deposition in cerbral cortex as consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer's disease.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 9649-9653

Schmidt M.L., Lee V.M., Forman M., Chiu T.S., Trojanowski J.Q. (1997)
Monoclonal antibodies to a 100 kDa protein reveal abundant A-beta negative plaques throughout gray matter of Alzheimer's disease brains.
Am. J. Pathol., 151, 69-80

Schneider L.S., Farlow M.R., Henderson V.W., Pogoda J.M. (1996)
Effects of estrogen replacement therapy on response to tacrine in patients with Alzheimer's disease.
Neurology, 46, 1580-1584

Schneider W.J., Nimpf J., Bujo H. (1997)
Novel members of the low density lipoprotein receptor superfamily and their potential roles in lipid metabolism.
Current opinion in lipidology, 8, 315-319

Schwarzmann A., Gregori L. Vitek M.P., Lyubski S.L., Strittmatter W.J., Enghilde J.J., Bhasin R., Silvermaan J., Weisgraber K.H., Coyle P.K., Zagorski M.G., Talafous J., Eisenberg M., Saunders A.M., Roses A.D., Goldgaber D. (1994)
Thransthyretin sequesters amyloid b protein and prevents amyloid formation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 8368-8372

Scigliano G., Girotti F., Soliveri P., Musicco M., Radice D., Caraceni T. (1997)
Increased plasma bilirubin in Parkinson patients on L-dopa: evidence against the free radical hypothesis?
Ital. J. Neurol. Sci., 18, 69-72

Seelig J., Lehrmann R., Terzi E. (1995)
Domain formation induced by lipid-ion and lipid-peptide interactions.
Mol. Membr. Biol., 12, 51-57

Seif-el-Nasr M., El-Fattah A.A.A. (1995)
Lipid peroxide, phospholipids, glutathione levels and superoxide dismutase activity in rat brain after ischemia: effect of *Ginkgo biloba* extract.
Pharmacol. Res., 32, 273-278

Selkoe D.J. (1996)
Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease.
J. Biol. Chem. 271, 18295-18298

Serot J.M., Bene M.C., Foliguet B., Faure G.C. (1997)
Altered choroid plexus basement membrane and epithelium in late-onset Alzheimer's disease: an ultrastructural study.
Ann. N Y Acad. Sci. 826, 507-509

Sherrington R., Rogaev E.I., Liang Y., Rogaeva E.A., Levesque G., Ikeda M., Chi H., Lin C., Li G., Holman K. (1995)
Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease.
Nature 375, 754-760

Shore, B., Shore, V., Salel, A., Mason, D., and Zelis, R. (1974).
An apolipoprotein preferentially enriched in cholesteryl ester-rich very low density lipoproteins.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 58, 1-7.

Siest G., Pillot T., Régis-Bailly A., Leininger-Muller B., Steinmetz J., Galteau M.-M., Visvikis S. (1995)
Apolipoprotein E: An important gene and protein to follow in laboratory medicine.
Clin. Chem. 41,1068-1086

Shi X., Dalal N.S. (1993)
Vanadate-mediated hydroxyl radical generation from superoxide radical in the presence of NADH : Haber-Weiss vs Fenton mechanim.
Arch. Biochem. Biophys., 307, 336-341

Simonian N.A., Hyman B.T. (1993)
Functional alteration in Alzheimer's disease: Diminution of cytochrome oxidase in the hippocampal formation.
J. Neuropathol Exp. Neurol., 52, 580-585

Sinet P.M., Heikkila R.E., Cohen G. (1980)
Hydrogen peroxide production in rat brain *in vivo*.
J.Neurochem., 34, 1421-1428

Slivka A., Mytilineou C., Cohen G. (1987)
Histochemical evaluation of glutathione in brain.
Brain Res., 409, 275-284

Smith C.D., Carney J.M., Starke-Reed P.E., Oliver C.N., Stadtman E.R., Floyd R.A., Markesbery W.R. (1991)
Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer's disesase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 10540-10543

Smith M.A., Taneda S., Richey P.L., Myiata S., Yan S.D., Sayre L.M., Monnier V.M., Perry G. (1994)
Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 5710-5714

Smith M.A., Sayre L.M., Monnier V.M., Perry G. (1995)
Radical AGEing in Alzheimer's disease.
Trends Neurosci., 18, 172-176

Smith M.A., Sayre L., Perry G. (1996)
Is Alzheimer's a disease of oxidative stress?
Alzheimer's Disease Review 1, 63-67

Snipes G.J., McGuire C.B., Norden J.J., Freeman J.A. (1986)
Nerve injury stimulates the secretion of apolipoprotein E by nonneuronal cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 1130-1134

Sohal R.S., Arnold L.A., Sohal B.H. (1990)
Age related changes in antioxydant enzymes and prooxidant generation in tissues of the rat with special reference to parameters in two insects species.
Free Radical Biol. Med., 10, 495-500

Soto C., Kindy M.S., Baumann M., Frangione B. (1996)
Inhibition of Alzheimer's amyloidosis by peptides that prevent beta-sheet conformation.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 226, 672-680

Spector R., Eells J. (1984)
Deoxynucleoside and vitamin transport into the central nervous system.
Federtion Proc., 43, 196-200

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

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

Stein Y., Stein O., Delplanque B., Fesmire J.D., Lee D.M., Alaupovic P.(1989)
Lack of effect of probucol on atheroma formation in cholesterol-fed rabbits kept at comparable plasma cholesterol levels.
Atherosclerosis, 75, 145-155

Steinmetz A., Saile R., Sefraoui M., Parra H.J., Fruchart J.C. (1989)
Confusion of apolipoprotein E phenotyping by serum amyloid A.
Clin. Chem. 35, 671-672

Stone W.L. et Dratz E.A. (1980)
Increased glutathione-S-transferase activity in antioxidant-deficient rats.
Biochim. Biophys. Acta, 63, 503-506

Stewart W.F., Kawas C., Corrada M., Metter E.J. (1997)
Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use.
Neurology 48, 626-632

Strittmatter W.J., Saunders A., Schmechel D., Pericakvance M., Englhild J., Salvesen O.S., Roses A.D. (1993)
Apolipoprotein E: High affinity binding β-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late onset Alzheimer's disease.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1977-1981.

Strittmatter WJ, Saunders AM, Goedert M., Weisgraber KH, Dong L, Jakes R, Huang DY, Pericak-Vance M, Schmechel D, Roses AD (1994)
Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau: implications for Alzheimer's disease.
Proc Natl Acad Sci USA 91, 11183-11186

Svoboda P., Teisinger J., Pilar J., Vyskocyl F.(1984)
Vanadyl (VO2+) and vanadate (VO3-) ions inhibit the brain microsomal Na,K-ATPase with similar affinities. protection by transferrin and noradrenaline.
Biochem. Pharmacol., 33, 2485-2491

Teale F.W.J. (1960)
Ultraviolet fluoerscence of proteins in neutral solution.
Biochem. J., 76, 381-388

Terry R.D. (1993)
Regeneration in Alzheimer disease and aging.
Adv. Neurol. 59, 1-4

Tohgi H., Abe T., Takahashi S., Kibuchi T. (1993)
The urate and xanthine concentrations in the cerebrospinal fluid in patients with type dementia and Parkinson's disease.
J. Neural. Transm. Park. Dis. Dement. Sect., 6, 119-126

Tohgi H., Abe T., Nakanishi M., Hamato F., Sasaki K., Takahashi S. (1994)
Concentrations of a-tocopherol and its quinone derivative in cerebrospinal fluid from patients with vascular dementia of the Binswanger type and Alzheimer type dementia.
Neurosci. Lett., 174, 73-76

Tomiyama T., Shoji A., Kataoka K., Suwa Y., Asano S., Kaneko H., Endo N. (1996)
Inhibition of amyloid β protein aggregation and neurotoxicity by rifampicin
Its possible function as a hydroxyl radical scavenger
J. Biol. Chem. 271, 6839-6844

Tooyama I., Kawamata T., Akiyama H., Kimura H., Moestrup S.K., Gliemann J., Matsuo A., McGeer P.L. (1995)
Subcellular localization of the low density lipoprotein receptor-related protein (alpha 2-macroglobulin receptor) in human brain.
Brain Res. 691, 235-238

Uchida K., Stadtman E.R; (1993)
Covalent attachment of 4-hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. A possible involvement of intra- and intermolecular cross-linking reaction.
J. Biol. Chem. 268, 6388-6393

Ulvestad E., Williams K., Mork S., Antel J., Nyland H. (1994)
Phenotypic differences between human monocytes/macrophages and microglial cells studied in situ and in vitro.
J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53, 492-501

Urmoneit B., Prikulis I., Wihl G., D'Urso D., Frank R., Heeren J., Beisiegel U., Prior R. (1997)
Cerebrovascular smooth muscle cells internalize Alzheimer amyloid beta protein via a lipoprotein pathway: implications for cerebral amyloid angiopathy.
Lab. Invest. 77, 157-166

Utermann G. (1975).
Isolation and partial characterization of an arginine-rich apolipoprotein from human plasma very-low-density lipoproteins: apolipoprotein E.
Hoppe Seylers Z Physiol. Chem. 356, 1113-1121.

Utermann, G., Langenbeck, U., Beisigel, U., and Weber, W. (1980)
Genetics of the apolipoprotein E system in man.
Am. J. Hum. Genet. 32, 339-347.

Utermann G., Kindermann I., Kaffarnik H., Steinmetz A. (1984)
Apolipoprotein E phenotypes and hyperlipidemia.
Hum. Genet. 65, 232-236

Vaughan P.J., Su J., Cotman C.W., Cunningham D.D. (1994)
Protease nexine-1, a potent thrombin inhibitor, is reduced around cerebral blood vessels in Alzheimer's disease.
Brain Res., 668, 160-170

Vogt W. (1995)
Oxydation of methionyl residues in proteins : tools, targets, and reversal.
Free Radic. Biol. Med. 18, 93-105

Volicer L., Crino P.B. (1990)
Involvment of free radicals in dementia of the Alzheimer's type: A hypothesis.
Neurobiol. Aging, 11, 567-571

de Vries H.E., Kurper J., de Boer A.G., van Berkel T.J.C., Breimer D.D. (1993)
Characterization of the scavenger receptor on bovine cerebral endothelial cells in vitro.
J. Neurochem., 61, 1813-1821

Wagner S.L., Geddes J.W. Ctamn C.W., Lau A.L., Gurwitz D., Isackson P.J., Cunningham D.D. (1989)
Protease nexin-1, an antithrombin with neurite outgrowth activity, is reduced in Alzheimer disease.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8224-8288

Webster, S. and Rogers, J., (1996)
Relative efficacies of amyloid β (Aβ) binding proteins in Aβ aggregation.
J. Neurosci. Res. 46, 58-66.

Weisgraber K. H. (1990)
Apolipoprotein E distribution among human plasma lipoproteins: role of the cysteine-arginine interchange at residue 112.
J. Lipid Res. 31, 1503-1511.

Weisgraber K.H. (1994)
Apolipoprotein E: structure-function relationships.
Adv. Prot. Chem. 45, 249-302.

West HL, Rebeck GW, Hyman BT (1994)
Frequency of the apolipoprotein E epsilon 2 allele is diminished in sporadic Alzheimer disease.
Neurosci. Lett.175, 46-48

Westlund K.L., Denny R.M., Kochersperger L.M., Rose R.M., Abell C.W. (1985)
Distinct monoamine oxidase A and B populations in primate brain.
Science, 230, 181-183

Wetterau J. R., Aggerbeck L. P., Rall S. C., Jr., Weisgraber K. H. (1988)
Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. I. Evidence for two structural domains.
J. Biol. Chem. 263, 6240-6248.

Wiesniewski T., Frangione B. (1992)
Apolipoprotein E: a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid.
Neurosci. Lett., 135, 235-238

Wiesniewski T., Golabek A., Matsubara E., Ghiso J., Frangione B. (1993)
Apolipoprotein E: binding to soluble Alzheimer's β-amyloid.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 192, 359-365

Wiesniewski T., Castano E.M., Golabek A., Vogel T. Frangione B. (1994)
Acceleration of Alzheimer's fibril formation by apolipoprotein E in vitro.
Am. J. Pathol. 145: 1030-1036.

Wilson, C., Agard, D. A., Mahley, R. W., and Weisgraber, K. H. (1993).
Crystal structures of the common apolipoprotein E variants: insights into functional mechanisms.
NATO ASI Series 1173, 81-95.

Wilson C., Mau T., Weisgraber K.H., Wardell M.R., Mahley R.W., Agard D.A. (1994)
Salt bridge relay triggers defective LDL receptor binding by a mutant apolipoprotein.
Structure, 2; 713-718

Wilson D.M., Binder L.I. (1997)
Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid beta peptides. In vitro evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer's disease.
Am J Pathol 150, 2181-2195

Winterbourn C.C., Van den Berg J.J.M., Roltman E., Kuypers F.A. (1992)
Chlorohydrin formation from insatured fatty acids reacted with hypochlorous acid.
Arch. Biochem Biophys., 296, 547-555

Wurtman R.J. (1992)
Choline metabolism as a basis for selective vulnerability of cholinergique neurons.
Trends Neurosc., 15, 117-122

Yan S.D. Chen X., Schmidt A.M., Brett J. Godman G., Zou Y.S., Scott C.W., Caputo C., Frappier T., Smith M.A., Perry G., Yen S.H., Stern D. (1994)
Glycated tau protein in Alzheimer disease: a mechanism for induction of oxidant stress.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 7787-7791

Yan L.J., Lodge J.K., Traber M.G., Matsugo S., Packer L. (1997)
Comparison between copper-mediated and hypochlorite-mediated modifications of human low density liporpoteins evaluated by protein carbonyl formation.
J. Lipid Res., 38, 992-1001

Yang C.-Y., Gu Z.-W., Yang H.-X., Yang M., Gotto A.M.Jr., Smith C.V. (1996)
Oxidative modifications of apoB-100 by exposure of low density lipoproteins to HOCL in vitro.
Free Rad. Biol. Med., 23, 82-89

Yang D.S., Smith J.D., Zhou Z., Gandy S.E., Martins R.N. (1997)
Characterization of the binding of amyloid-β peptide to cell culture-derived native apolipoprotein E2, E3 and E4 isoforms and to isoforms from human plasma.
J. Neurochem.,68, 721-725

Yokoyama S., Kawai Y., Tajima S., Yamamoto A. (1985).
Behavior of human apolipoprotein E in aqueous solutions and at interfaces.
J. Biol. Chem. 260, 16375-16382.

Yoshida S., Abe K., Busto R., Watson B.D., Kogure K., Ginsberg M.D. (1982)
Influence of transient ischemia on lipid-soluble antioxidants, free fatty acids and energy metabolites in rat brain.
Brain Res. 245, 307-316

Yoshizawa T., Yamakawa-Kobayashi K., Komatsuzaki Y., Arinami T., Oguni E., Mizusawa H., Shoji S., Hamaguchi H. (1994)
Dose-dependent association of apolipoprotein E allele epsilon-4 with late-onset, sporadic Alzheimer's disease.
Ann. Neurol. 36, 656-659

Yue T.L., Lysko P.G., Barone F.C., Gu J.L., Ruffolo R., Feuerstein G.Z. (1995)
Carvedilol, a new antihypertensive drug with unique antioxidant activity: potentiel role in cerebroprotection.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 230-242

Zaman Z., Roche P., Fielden P., Frost P.G., Niriella D.C., Cayley A.C.D. (1992)
Plasma concentrations of vitamins A and E and caratenoids in Alzheimer's disease.
Age and Ageing, 21, 91-94

Zannis V. I., Breslow J. L. (1981).
Human very low density lipoprotein apolipoprotein E isoprotein polymorphism is explained by genetic variation and posttranslational modification.
Biochemistry 20, 1033-1041.

Zcliczynski J.M., Stelmaszynska T., Domanski J., Ostrowski W. (1971)
Chloramines as intermediates of oxidation reaction of amino acids by myeloperoxidase.
Bioch. Biophys. Acta 235, 419-424.

Zemlan F.P., Thienhaus O.J., Bosmann H.B. (1989)
Superoxide dismutase activity in Alzheimer's disease: Possible mechanism for paired helical filament formation.
Brain Res., 476, 160-162

Zhang S.H., Reddick R.L., Avdievch E., Kesrter Surles L., Jones R.G., Reynolds J.B., Quarfordt S.H., Maeda N. (1997)
Paradoxical enhancement of atherosclerosis by probucol treatment in apolipoprotein E-deficient mice.
J. Clin. Invest., 12, 2858-2866

Zhou Z., Smith J.D., Greengard P., Gandy S. (1996)
Alzheimer amyloid-β peptide forms denaturant-resistant complex with type ε3 but not type ε4 isoform of native apolipoprotein E.
Mol. Med., 2, 175-180

Zorich N., Jonas A., Pownall H.J. (1985)
Activation of lecithin cholesterol acyltransferase by human apolipoprotein E in discoidal complexes with lipids.
J. Biol. Chem., 260, 8831-8837

BIBLIOTHÈQUE
PHARMACIE
ODONTOLOGIE
NANCY

université HENRI POINCARÉ
NANCY 1

Nom, Prénom : J O L I V A L T Corinne

Nature de la thèse :

Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1

en Biologie et Santé

VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 16 juin 1998 n° 476

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ NANCY 1 ★ LE PRESIDENT

Jean-Pierre FINANCE

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ · NANCY 1

24-30, rue Lionnois B.P. 3069 54013 Nancy cedex · Tél. 03 83 85 48 00 · Fax 03 83 85 48 48

Adresse électronique : _____ @uhp.u-nancy.fr

RESUME

Lors du vieillissement, les processus oxydants résultant de l'accumulation des radicaux libres (RL) conduisent à une altération de l'ADN, à une peroxydation des lipides et à une oxydation des protéines. Le cerveau étant essentiellement composé d'acides gras et de protéines, constituants sensibles à l'oxydation, il est particulièrement vulnérable à l'action des RL, d'autant plus que son contenu en antioxydants est faible. Au cours du vieillissement pathologique, et notamment dans le cas de la **maladie d'Alzheimer** (MA), des auteurs ont montré la présence en excès de protéines oxydées dans le tissu cérébral. Parmi les protéines s'accumulant dans les dépôts amyloïdes au cours de la MA, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'**apolipoprotéine E** (apo E), dont l'affinité pour le peptide amyloïde (Aβ) dépendrait de processus oxydants. L'implication du polymorphisme de l'apo E (3 allèles : ε2, ε3 et ε4), et plus particulièrement l'augmentation de la fréquence de l'allèle ε4 dans la MA, soulève la question d'une sensibilité différente à l'**oxydation** des 3 isoformes d'apo E.

Nous avons donc étudié l'oxydation *in vitro* de l'apo E recombinante produite chez *E.* coli, par le système enzymatique de la **myéloperoxydase** (MPO) dont nous avons montré la présence dans le cerveau humain. Dans ce modèle d'étude, nous avons montré que l'apo E4 est plus sensible à l'oxydation que l'apo E3, elle-même plus sensible que l'apo E2. En altérant sa conformation, l'oxydation de l'apo E conduit à une diminution de la capacité de liaison de l'apo E aux **phospholipides**, cette diminution étant d'autant plus importante que l'isoforme est sensible à l'oxydation. En ce qui concerne la fibrillation d'**A**β, seule l'apo E4 oxydée induit sa fibrillation. Dans ce modèle d'étude, nous avons montré le rôle protecteur de l'extrait EGb 761 de ***Ginkgo biloba***. Enfin, nous avons mesuré une augmentation significative de l'activité de la glutathion *S*-transférase dans le cerveau de patients atteints de MA. Ceci suggère une activation de l'enzyme en réponse à la production de RL dans le cerveau.

L'ensemble de ces résultats confirme le rôle du stress oxydant, d'une part et l'implication de l'allèle ε4 comme facteur de risque dans la MA, d'autre part. L'utilisation d'antioxydants comme le *Ginkgo biloba* peut être envisagée comme traitement préventif de cette maladie.

Mots-clés : **A**polipoprotéine E, **O**xydation, **M**yéloperoxydase, **P**hospholipides, **A**myloïde béta, **M**aladie d'Alzheimer, **P**rotection, ***Ginkgo biloba***.