

Université de Montréal

Étude de la structure et de l'expression de l'apolipoprotéine D

par

Laurence Terrisse

Département des sciences biomédicales

Faculté de médecine

Thèse présentée à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en sciences biomédicales

Août 1998

© Laurence Terrisse, 1998



Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Étude de la structure et de l'expression de l'apolipoprotéine D

présentée par

Laurence Terrisse

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Présidente-rapporteuse	Louise Simard
Directeur de recherche	Éric Rassart
Codirecteur	Ross Milne
Membre du jury	Lise Bernier
Examinatrice externe	Joséphine Nalbantoglu
Représentante du doyen	Louise Simard

Thèse acceptée le 99.05.21

Sommaire

L'apolipoprotéine D est une glycoprotéine faisant partie de la famille des lipocalines dont le rôle principal est de transporter de petites molécules hydrophobes. Son association avec de nombreux composés ainsi que sa distribution tissulaire suggère qu'elle soit une protéine multifonctionnelle. Des études de modélisation moléculaire révèlent que la structure tridimensionnelle de cette lipocaline serait celle d'un tonneau dans lequel pourrait s'introduire un ligand hydrophobe mais les domaines fonctionnels de l'apolipoprotéine D permettant la fixation et le transport d'un ligand n'ont pas encore été démontrés. Un premier but de ce travail est donc de mettre en évidence les domaines fonctionnels impliqués dans cette liaison. L'approche utilisée consiste à produire des anticorps monoclonaux et d'utiliser ces anticorps pour établir une carte antigénique de l'apolipoprotéine D. Pour cela des fragments de différentes longueurs d'apolipoprotéine D ont été exprimés dans un système bactérien et ces fragments ont été testés pour leur immunoréactivité avec les différents anticorps produits. Ces expériences nous ont permis d'établir une carte de la structure primaire de la protéine. Suite à cette cartographie, les anticorps ont été utilisés dans un test de liaison pour bloquer la liaison de l'apolipoprotéine D à son ligand et pouvoir localiser l'anticorps inhibant la liaison sur la cartographie de la structure primaire afin d'identifier la région fonctionnelle. Malheureusement, aucun anticorps n'a bloqué la liaison de façon significative. Cela est probablement dû à la structure globulaire de l'apolipoprotéine D avec les régions extérieures qui sont plus immunogéniques et les régions à l'intérieur peu accessibles par les anticorps. Les anticorps produits reconnaissent donc des épitopes conformationnels qui semblent confirmer la structure tridimensionnelle prédite pour cette protéine.

Après ces études de structure de la protéine, nous avons voulu caractériser cette protéine sur le plan physiologique. L'apolipoprotéine D lie plusieurs ligands dont différentes hormones stéroïdiennes et de plus son expression semble modulée dans différentes pathologies. Nous nous sommes intéressés à des processus neurodégénératifs et nous avons étudié l'expression de l'apolipoprotéine D tant chez l'homme que chez l'animal. La maladie d'Alzheimer (MA) est un désordre démentiel neurodégénératif progressif caractérisée par une atrophie neuronale au niveau de l'hippocampe avec deux aspects majeurs : une déposition extracellulaire d'amyloïde et une accumulation intracellulaire de la protéine *tau* anormalement phosphorylée. L'apolipoprotéine E est le facteur de risque le plus important de la MA avec la présence de l'allèle $\epsilon 4$ qui augmente le risque et avance l'âge de développer une MA. Cependant très peu d'informations sont disponibles concernant la régulation et la fonction de l'apoE dans le cerveau. L'apoD ayant plusieurs caractéristiques communes avec l'apoE (distribution diversifiée, augmentation de l'expression dans les nerfs en régénération), nous nous sommes intéressés à l'étude de l'expression de ces deux apolipoprotéines.

Dans la MA, nous avons démontré que l'apoD augmentait dans les hippocampes chez plus de 70% des patients atteints et que dans le liquide céphalo-rachidien, l'apoD augmentait de 4 fois par rapport aux patients non atteints de MA alors qu'aucune augmentation d'apoE significative n'a été observée. De plus, cette augmentation d'apoD est fonction de la présence de l'allèle $\epsilon 4$. Nous avons également étudié l'expression de l'apoD et de l'apoE dans un processus neurodégénératif animal. Suite à des lésions induites dans le cortex entorhinal, l'apoE augmente à 6-8 jours après la lésion alors que l'apoD augmente dès 1 jour post-lésion pour revenir à des niveaux contrôles à 30 jours post-lésion.

L'apolipoprotéine D semble donc être un marqueur de processus neurodégénératifs et de plus est un marqueur plus important et plus précoce que l'apoE. Le signal amenant cette induction d'apoD reste à déterminer.

Table des matières

SOMMAIRE	III
TABLE DES MATIÈRES	VI
LISTE DES TABLEAUX	X
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	XIII
REMERCIEMENTS	XVII
CHAPITRE I : ÉTAT DES CONNAISSANCES	1
1.1 Les lipoprotéines	1
1.1.1 Composition et structure des lipoprotéines	1
1.1.2 Apolipoprotéines	1
1.1.3 Classes des lipoprotéines	2
1.2 Introduction	3
1.3 Structure du gène de l'apolipoprotéine D	4
1.4 Structure de la protéine	6
1.4.1 Structure primaire	6
1.4.2 Hétérogénéité antigénique	7
1.4.3 Structure secondaire et tertiaire	8
1.4.4 Les lipocalines	11
1.4.5 L'apolipoprotéine D: protéine multimérique	12

1.5 Distribution tissulaire et cellulaire	13
1.5.1 Distribution chez différentes espèces animales	13
1.5.2 Expression cellulaire	17
1.5.3 Régulation de l'expression	19
1.6 Allèles de l'apolipoprotéine D et études cliniques	23
1.6.1 Allèles de l'apolipoprotéine D	23
1.6.2 Études cliniques	23
1.7 Ligands de l'apolipoprotéine D	24
1.7.1 La bilirubine et le cholestérol	24
1.7.2 Les hormones stéroïdiennes	25
1.7.3 L'acide arachidonique	26
1.7.4 L'acide E-3-méthyle-2hexenoïque	26
1.8 Fonctions potentielles de l'apolipoprotéine D	27
1.8.1 Métabolisme du cholestérol et de ses esters	28
1.8.2 LCAT et acide arachidonique	29
1.8.3 Protéine de phase aiguë	29
1.8.4 Marqueurs d'altérations hormonales et de la croissance cellulaire	30
1.8.5 Transporteur de molécules biologiques actives	31
1.9 L'apolipoprotéine D et le système nerveux	32
1.9.1 Le système nerveux périphérique	32
1.9.2 Le système nerveux central	34
1.9.2.1 Situation non pathologique	34
1.9.2.2 Neurodégénérescence	35

2.0 La maladie d'Alzheimer	36
2.1 Données cliniques et prévalence	36
2.2 Facteurs de risque génétique	37
2.3 Diagnostique	38
2.4 Le liquide céphalo-rachidien	39
2.5 L'apolipoprotéine E	41
2.5.1 Métabolisme	41
2.5.2 Récepteurs dans le système nerveux	42
2.1 Objectifs et hypothèses de travail	45

CHAPITRE II - ARTICLE:

Structural determinants for the interaction of ligand binding with purified Apolipoprotein D.

Abstract	49
Introduction	50
Materials and Methods	53
Results	58
Discussion	62
References	67

CHAPITRE III - ARTICLE:

INCREASED LEVELS OF APOLIPOPROTEIN D IN CEREBROSPINAL FLUID AND HIPPOCAMPUS OF ALZHEIMER'S PATIENTS

Abstract	81
Introduction	84
Materials and Methods	88
Results	92
Discussion	95
References	101

CHAPITRE IV - ARTICLE:

Modulation of Apolipoprotein D and Apolipoprotein E mRNA expression
in rat hippocampus after enthorinal cortex lesion.

Abstract	119
Introduction	121
Materials and Methods	124
Results	127
Discussion	130
References	139

CHAPITRE V: DISCUSSION	159
------------------------	-----

RÉFÉRENCES	172
------------	-----

ANNEXE I : ARTICLE IV

ANNEXE II : ARTICLE V

Liste des tableaux

Tableau I : Résumé de la modulation de l'expression de l'apolipoprotéine D	p.22
--	------

Liste des figures

Figure 1.1: Le gène de l'apolipoprotéine D	p.5
Figure 1.2: Structure primaire de l'apolipoprotéine	p.7
Figure 1.3: Structure secondaire de l'apolipoprotéine D	p.8
Figure 1.4: Structure tertiaire de l'apolipoprotéine D	p.9
Figure 1.5: Comparaison de séquences de l'apoD chez différentes espèces	p.16
Figure 2.1: Immunoréactivité des différents anticorps monoclonaux.	p.76
Figure 2.2: Immunoréactivité des fragments d'apoD générés sous forme de protéines de fusion avec la β -galactosidase avec les anticorps monoclonaux et cartographie des anticorps monoclonaux avec la structure primaire de l'apoD.	p.77
Figure 2.3: Test de compétition des anticorps monoclonaux	p.78
Figure 2.4: Effets des anticorps monoclonaux sur la liaison de l'apoD à son ligand.	p.79
Figure 2.5: Modélisation de la structure tertiaire de l'apoD	p.80
Figure 3.1: Immunodetection of apoD and apoE in hippocampal extracts and CSF of patients with Alzheimer's disease patients with other neuropathologies and normal subjects.	p.113
Figure 3.2: Quantification of ApoD and apoE concentrations by radioimmunometric assay or densitometric analyses	p.114

Figure 3.3: Correlation between the concentrations of apoD and apoE in hippocampal extracts as a function of the apoE genotype of AD patients and normal subjects	p.115
Figure 3.4: Correlation between the concentrations of apoD and apoE in CSF as a function of the apoE genotype of AD patients and normal subjects	p.116
Figure 3.5: ApoD concentrations in the CSF of AD patients and normal subjects as a function of age	p.117
Figure 4.1: Apolipoprotein D levels of expression in different areas of the normal rat brain.	p.154
Figure 4.2: Apolipoprotein E levels of expression in different areas of the normal rat brain.	p.155
Figure 4.3: Modulation of apoD and apoE mRNA expression following enthorinal cortex lesioning of normal rat brain.	p.156
Figure 4.4: Modulation of apoD protein expression following enthorinal cortex lesioning of normal rat brain.	p.157
Figure 4.5: Modulation of apoD protein expression in apoE deficient mice compare to normal mice.	p.158

Liste des abréviations

- A β : beta-amyloïde
AChE: acétylcholinestérase
ADNc: acide désoxyribonucléique complémentaire
apoAI: apolipoprotéine AI
apoAII: apolipoprotéine AII
apoB: apolipoprotéine B
apoD: apolipoprotéine D
APRE: éléments de réponse à la phase aiguë
ARNm: acide ribonucléique messenger
BBP: bilin binding protein
BChE: butyrylcholinestérase
Bic: bacterial lipocalin
CETP: cholesteryl ester transfer protein
ChAT: choline-acétyl-transférase
DEX: dexaméthasone
DHT: dihydroxytestostérone
DNF: dégénérescence neurofibrillaire
E₂: 17- β -oestradiol
E3M2H: acide E-3-méthyle-2hexénoïque
ECL: enthorrhinal cortex lesioning
ERE: éléments de réponse aux oestrogènes
GCDFP: gross-cystic-disease-fluid protein
GRE: éléments de réponse aux glucocorticoïdes
HDL: lipoprotéines de haute densité
IEF: isoélectrofocalisation
IL- α : interleukine alpha
IL-6: interleukine six
IRM: imagerie par résonance magnétique

LCAT: lécithine cholestérol acyl transférase

LDL: lipoprotéines à faible densité

MA: maladie d'Alzheimer

PET: tomographie d'émission à positions

PRE: éléments de réponse à la progestérone

RBP: retinol binding protein

RFLP: restriction fragment length polymorphism

SDR: répresseur dépendant des stéroïdes

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

SNC: système nerveux central

SNP: système nerveux périphérique

SPET: tomographie d'émission monophotonique

SRE: éléments de réponse aux stéroïdes

TTR: transthyréline

VHDL: lipoprotéines à très haute densité

VLDL: lipoprotéines de très basse densité

*Il faut faire de la vie un rêve
et faire d'un rêve la réalité.*

Pierre Curie

à mes enfants,

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu mes deux directeurs de recherche, Dr. Éric Rassart et Dr. Ross Milne pour leur encadrement tout au long de mes études. Sous leur supervision, j'ai appris la rigueur scientifique et ils ont su développer chez moi une grande curiosité ainsi qu'un esprit critique important. Je tiens à les remercier également pour leur amitié et leur compréhension pendant ces années. Je tiens également à remercier Than Dung Nguyen et Florence Lacasse qui m'ont aidé au laboratoire pendant mon doctorat et un merci particulier à Corinne Barat dont les connaissances scientifiques m'ont beaucoup apporté. Je tiens également à la remercier ainsi qu'Elsy Édouard, Josée Houde, Florence Lacasse et Kathleen Parker pour leur encouragement et leur amitié tout au long de mon doctorat.

Enfin je veux remercier de tout mon cœur mes parents et mon mari qui ont su me donner la motivation nécessaire pour réussir mes études. Sans leur soutien de tous les jours, je n'aurai pu arriver au bout de ce long cheminement.

Chapitre I : État des connaissances

1.1 Les lipoprotéines

1.1.1 Composition et structure des lipoprotéines

Les lipoprotéines sont des particules circulantes formées de lipides et de protéines contenant la totalité des lipides sanguins, à l'exception des acides gras non estérifiés. Les lipoprotéines auraient généralement une forme sphérique (Shen et al., 1977) avec les lipides qui n'ont aucun groupement polaire (comme les triglycérides et les esters de cholestérol) formant le centre des particules alors que les molécules lipidiques amphiphiliques (comme le cholestérol et les phospholipides) recouvriraient ce noyau. Les lipoprotéines forment des complexes parfaitement solubles en milieu aqueux tel le sérum et permettent aux lipides de circuler dans le sang malgré leur caractère hydrophobe.

1.1.2 Les apolipoprotéines

Les apolipoprotéines (apo) ont toutes comme propriété une affinité particulière pour les lipides. Certaines régions en configuration en hélice α orientent leurs résidus d'acides aminés hydrophiles d'un côté de l'hélice α (face non polaire) et leurs résidus hydrophobes de l'autre côté (face polaire). C'est ce phénomène qui donne aux apo leur caractère amphipatique et grâce à cette propriété amphipatique, le côté polaire des apolipoprotéines s'associe avec le pôle chargé des glycérophospholipides (par exemple la phosphatidylcholine) et le milieu aqueux tandis que le côté non-polaire s'associe avec les chaînes aliphatiques des glycérophospholipides. Il en

résulte la formation d'une membrane monolipidique avec le côté extérieur polaire face aux solvants aqueux et le côté intérieur non polaire qui délimite une région hydrophobe pouvant abriter des lipides qui eux n'ont aucune polarité.

Ce sont les apolipoprotéines qui vont déterminer l'évolution métabolique des lipoprotéines et cette évolution dépendra donc du type de protéines retrouvées dans la structure macromoléculaire. Cette composition des lipoprotéines varie au cours de leur métabolisme. L'interaction des particules avec la surface des cellules, avec des enzymes lipolytiques et avec d'autres lipoprotéines permet à ces structures macromoléculaires d'échanger, de perdre et d'acquérir des lipides ainsi que des apolipoprotéines. Les apo qui ont des propriétés physico-chimiques assurant le maintien des lipoprotéines, jouent également un rôle dans la sécrétion, le transport et le métabolisme de ces particules via des récepteurs cellulaires.

1.1.3 Classification des lipoprotéines

Les différentes classes de lipoprotéines sont isolées par ultracentrifugation grâce à leur différence de densité, cette densité différant par leur rapport lipide:protéine. Les lipides étant moins denses que les protéines, plus une lipoprotéine sera riche en lipides, plus elle sera légère. Les lipoprotéines ont ainsi été caractérisées en plusieurs classes: les chylomicrons, les VLDL, les IDL, les LDL et les HDL. Chacune de ces classes, même si elles ne sont pas complètement homogènes, permet d'obtenir des groupes à même destin métabolique. La répartition des

différents lipides n'est pas la même d'une classe à l'autre et finalement le profil des apos diffère pour chaque classe.

Les VLDL sont principalement d'origine hépatique et sont riches en triglycérides. Plusieurs étapes de lipolyse conduisent à leur transformation en IDL puis en LDL. Ces dernières sont relativement riches en cholestérol et sont internalisées par les cellules des organes périphériques (Dolphin, P., 1985). Elles constituent donc la source exogène de cholestérol la plus importante pour les organes périphériques. Les HDL pour leur part sont produites par le foie et l'intestin et permettent l'élimination du cholestérol en excès dans les tissus périphériques en incorporant les particules de cholestérol avant de retourner vers le foie où elles seront éliminées.

1.2 Introduction et historique

L'apolipoprotéine D (apoD) humaine a été détectée dans le plasma dès 1963 (Ayrault-Jarrier et al., 1963) mais sa caractérisation est survenue plus tard avec plusieurs études sur sa structure, son expression génique et son rôle comme protéine de transport. Cependant, ni son rôle, ni son ligand physiologique n'ont été clairement identifiés, toutefois les données accumulées semblent suggérer qu'il s'agit d'une protéine multifonctionnelle à plusieurs ligands (Milne et al., 1993). L'apoD humaine a été isolée pour la première fois à partir de fractions plasmatiques de lipoprotéines de haute densité (HDL) par McConathy et Alaupovic en 1973. Connue préalablement sous le nom de « thin line protein », elle avait été détectée dans les lipoprotéines à haute et très haute densité (HDL et VHDL) de même qu'à faible densité (LDL) par immunodiffusion double en utilisant des antisérums de lapin contre les HDL (Ayrault-Jarrier et al, 1963). En 1973, Pearlman et

collègues ont décrit la GCDFP-24 comme une protéine liant la progestérone et présente en forte concentration dans le fluide kystique mammaire. Or il a été par la suite établi (Balbin et al., 1990) que la GCDFP-24 est identique à l'apoD. Enfin en 1986, l'ADNc complet de l'apoD humaine a été cloné et séquencé (Drayna et al., 1986) permettant d'identifier l'apoD comme faisant partie de la grande famille des lipocalines. Sa vaste distribution tissulaire suggère qu'elle pourrait avoir un rôle général au niveau du métabolisme et est donc en accord avec son appartenance à la famille des lipocalines et son rôle de transporteur qui en découle.

1.3 Structure du gène de l'apolipoprotéine D

Le gène de l'apoD humaine a été localisé sur le chromosome 3 dans la région p14.2 alors que le gène de l'apoD de souris a été localisé sur le chromosome 16. L'ADNc a une longueur d'environ 815 pb et serait divisé en 5 exons distribués sur une surface d'environ 12 kpb dans le génôme humain (Drayna et al., 1987). Au moins un intron interrompt la région 5' non traduite et l'exon 1 tel que déduit d'après la séquence de l'ADNc possède 27 nucléotides (Drayna et al., 1986). Lambert et al. (1993) par une analyse par extension d'amorces ont permis de localiser un site d'initiation de transcription situé 27 pb en aval d'une séquence consensus TATA et ont permis d'établir la longueur de l'exon 1 à 66 pb. De plus, l'exon 1 est situé à 3.7 kb de l'exon 2 et serait non-codant. La structure du gène de l'apoD est illustrée à la figure 1.1.

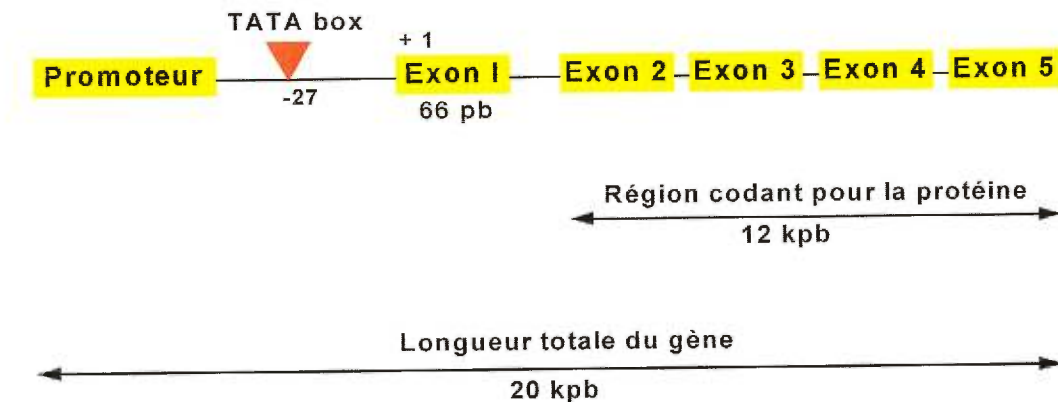


Figure 1.1 Le gène de l'apolipoprotéine D.

L'analyse du promoteur de l'apoD humaine révèle la présence de plusieurs éléments de régulation. Parmi ceux-ci, on retrouve des éléments de réponse aux oestrogènes, à la progestérone, aux glucocorticoïdes et aux stéroïdes (ERE,PRE,GRE et SRE). On retrouve également des éléments de réponse à la phase aigüe (APRE) ainsi qu'un répresseur dépendant des stéroïdes (SDR). De plus, une région d'ADN capable de former une hélice de forme Z est également observée, cette conformation étant habituellement associée avec l'activation et la répression des gènes de mammifères (Lambert et al., 1993). La diversité de ces éléments de régulation reflète la complexité de la régulation de l'expression de l'apoD humaine.

1.4 Structure de la protéine

1.4.1 Structure primaire

La caractérisation de l'apoD humaine a débuté au début des années 70 avec les études de McConathy et Alaupovic (1976). Les auteurs ont démontré que l'apoD est une glycoprotéine constituée d'une seule chaîne polypeptidique et que la glycosylation contribue à environ 18% de la masse totale de la protéine. La séquence primaire déduite du clonage (Drayna et al., 1986) montre 189 acides aminés dont 5 cystéines et un peptide signal de 20 acides aminés hydrophobes laissant une glutamine en position N-terminale (qui sera cyclisée après clivage du peptide signal). Le poids moléculaire calculé à partir de l'ADNc est donc de 18.1 kDa mais sur gel d'électrophorèse de polyacrylamide (SDS-PAGE), le poids moléculaire apparent varie de 19 kDa à 32 kDa (Drayna, 1986; Balbin, 1990 et Albers, 1981). Les différences de poids moléculaire dues au niveau de glycosylation ont permis de mettre en évidence la présence d'isomères de l'apoD humaine dont le pH isoélectrique varie de 4.8 à 5.6 (Weech et al., 1986). Ce sont les acides aminés asparagine en position 45 et 78 qui contribuent à la N-glycosylation de l'apoD humaine (Peitsch et Boguski, 1989; Yang et al., 1994). Ces mêmes auteurs ont également démontré la présence de ponts disulfures qui permettent de renforcer la structure de la protéine (Yang et al., 1994). Le premier pont disulfure est formé par l'association des cystéines 41 et 165 alors que le second est formé par l'association des cystéines 8 et 114. Il a aussi été démontré que la cystéine en position 116 est libre et peut donc former un pont disulfure avec d'autres macromolécules biologiques tel que l'apoAII (Yang et al., 1994). La structure primaire de l'apoD humaine est illustrée à la figure 1.2.

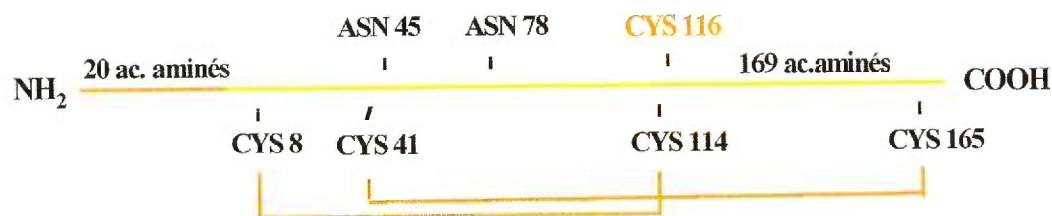


Figure 1.2 Structure primaire de l'apoD humaine. La région en orange représente le peptide signal alors que la région en jaune représente la partie codant pour la protéine mature. Les deux ponts disulfures sont identifiés ainsi que la cystéine libre est en position 116. Les asparagines en position 45 et 78 montrent les sites de N-glycosylation.

La séquence en acides aminés a permis d'établir l'apoD comme faisant partie de la famille des lipocalines. En effet, l'apoD a 25% d'homologie de séquence avec la « retinol binding protein » (RBP) et de 30 à 40% d'homologie avec la « bilin binding protein (BBP) et l'insecticyanine (Peitsch et Boguski, 1989). La protéine aurait aussi une bonne homologie avec d'autres membres de la famille des α_2 -microglobulines (lipocalines) soit la lactoglobuline, α_2 -microglobuline de rat et l'insecticyanine de papillon (Drayna et al., 1987).

1.4.2 Hétérogénéité antigénique

L'apoD a été trouvée en association avec les lipoprotéines dans les plasmas humain et de babouin (Weech et al., 1986; Bojanovski et al., 1980). Dans le plasma humain, mise à part l'apoD, 7 complexes protéiques sont détectables par des anticorps anti-apoD (Weech et al., 1986). Les auteurs ont montré que ces polypeptides, appelés antigènes D, ont des poids moléculaires variant de 39kDa à 98kDa, migrent plus lentement que l'apoD sur gel d'électrophorèse et qu'ils se séparent en 10 bandes de point isoélectrique différent par IEF. Deux anticorps monoclonaux réagissant avec deux épitopes différents de l'apoD et non-spécifiques aux hydrates de carbone, réagissaient

avec chacun de ces polypeptides. La différence de poids moléculaire entre ces antigènes D persistait après un traitement à l'endoglycosidase F prouvant que cette différence n'est pas due à des taux de glycosylation différents. Il est probable que ces antigènes D représentent des hétérodimères ou homodimères d'apoD avec d'autres apo (voir section 1.4.5).

1.4.3 Structure secondaire et tertiaire de la protéine

La structure secondaire de l'apoD diffère de celle des autres apolipoprotéines car contrairement à ces dernières, elle contient très peu d'hélices alpha. En effet, l'apoD contient 7% de prolines qui sont des acides aminés interrompant les hélices alpha. D'autre part, les deux ponts disulfures apportent des restrictions à la formation d'hélices alpha et finalement la structure primaire permet de conclure que l'apoD serait formée principalement de feuillets bêta (Drayna et al., 1986; Yang et al., 1994; Camato et al., 1989). La structure secondaire de l'apoD tel qu'illustrée à la figure 1.3 est caractérisée par la présence de 8 feuillets bêta et d'une hélice alpha dans la région c-terminale.

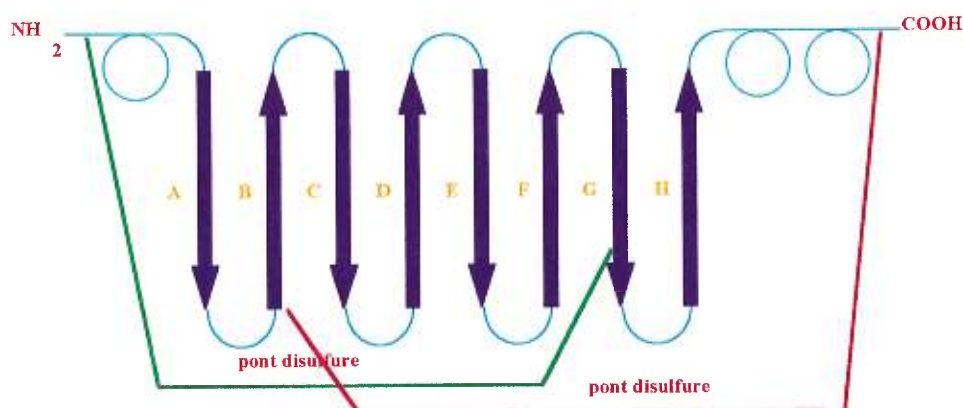


Figure 1.3: Prédiction de la structure secondaire de l'apolipoprotéine D humaine selon Peitsch et Boguski (1990). Les lettres A à H démontrent la présence de 8 feuillets β -antiparallèles alors qu'une hélice α -hélicoïdale est observée dans la région C-terminale.

Le repliement de ces 8 feuillets bêta antiparallèles permet la formation d'une protéine dont la forme est celle d'un baril. Le ligand de l'apoD viendrait se nicher dans la cavité tel que postulé par une analyse logarithmique (Weinberg, 1994) qui situent les acides aminés identifiés comme liant le ligand dans une séquence de faible variabilité (région 114-125 et 145-152), cette séquence de faible variabilité correspondant à la poche de liaison.

La structure tridimensionnelle de quatre lipocalines a été déterminée et dans chaque cas la chaîne polypeptidique est pliée de façon à former un feuillet bêta antiparallèle de 8 brins qui est ouvert à son sommet et fermé à sa base par une hélice alpha C-terminale. Tous les membres de cette famille adoptent cette structure et servent de transporteur de petites molécules hydrophobes dans la poche formant le haut du feuillet.

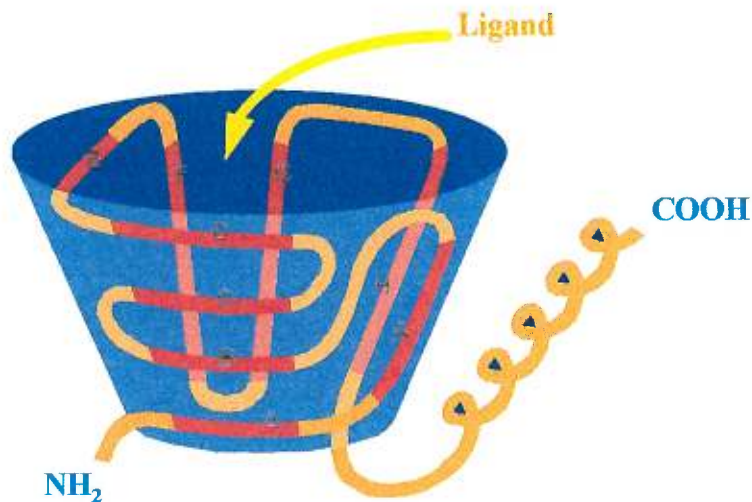


Figure 1.4: Schématisation de la structure tertiaire des lipocalines (Gachon, A.-M., 1994). Le repliement des feuillets β (A à H) permet la formation d'une protéine dont la structure tertiaire possède la forme d'un baril. Un ligand hydrophobe peut donc être introduit à l'intérieur de ce baril et être transporté.

Il n'y a cependant que 25 à 30% d'homologie de similarité de séquence en acides aminés dans cette famille (Gachon, 1994). En se basant sur les positions relatives des cystéines et d'autres séquences déterminant la structure tertiaire de la protéine, Peitsch et Boguski (1989) ont supposé que l'apoD serait plus proche de la BBP. Cette protéine possède l'avantage d'avoir été cristallographiée avec son ligand (Huber et al., 1987a; Huber et al., 1987b) et les acides aminés impliqués dans la liaison de cette protéine avec son ligand ont donc été élucidés. Les auteurs (Peitsch et Boguski, 1989) par des études d'alignement de structure tertiaire ont démontré que l'apoD et la BBP ont de 30 à 40% d'homologie de séquence, la discontinuité de séquence est due à des insertions ou des délétions au niveau des boucles reliant les feuillets bêta l'un à l'autre. Ces boucles sont plutôt situées à la surface de la BBP et diffèrent de l'apoD par des substitutions de résidus hydrophobes dans la chaîne latérale. Dans leur modèle, les auteurs proposent que cette région en association avec les résidus hydrophobes d'une boucle adjacente pourrait médier l'association de l'apoD avec les HDL, l'entrée de la poche de liaison se trouvant près de la surface de la lipoprotéine. Les acides aminés impliqués dans la formation de ponts salins, la position des cystéines ainsi que la présence des deux ponts disulfures sont conservés entre ces deux lipocalines. De plus un grand nombre d'acides aminés impliqués dans la liaison au ligand sont conservés chez l'apoD humaine. Une analyse d'alignement de séquence démontre que ces acides aminés sont aussi pour la plupart conservés chez divers membres des lipocalines.

1.4.4 Les lipocalines

L'apolipoprotéine D humaine est associée à la famille des lipocalines. Les membres de cette famille possèdent un faible niveau d'homologie au niveau de leur séquence primaire, cependant une caractéristique commune permet de les associer à une même famille de protéines. Tous les membres sont capables d'adopter une structure tridimensionnelle en forme de baril. Cette structure découle du repliement des feuillets bêta antiparallèles qui sont conservés dans l'ensemble des membres de cette famille. Les lipocalines sont aussi caractérisées par plusieurs propriétés communes associées à la reconnaissance moléculaire. Parmi ces dernières, on remarque la capacité de liaison à des petites molécules hydrophobes, liaison à des récepteurs de surface cellulaire et formation de complexe avec diverses macromolécules solubles. Jusqu'à tout récemment, on attribuait surtout aux lipocalines la propriété de transporter des ligands hydrophobes mais de plus en plus, une certaine diversité est associée à leurs fonctions; elles sont impliquées dans des mécanismes de coloration chez les invertébrés, des mécanismes de transport de phéromones, de régulation cellulaire et de réponses immunitaires (Flower, 1996; Gachon, 1994). Bien qu'elles aient des fonctions très diversifiées, la découverte de la « bacterial lipocalin » (blc) chez *Escherichia coli* permet d'affirmer que les lipocalines auraient un ancêtre commun (Bishop et al., 1995; Bishop et Weiner, 1996). L'apoD, par l'organisation de ses ponts disulfures ressemble également à Lazarillo, une lipocaline récemment identifiée chez les embryons de sauterelles et impliquée dans le développement neural (Bishop et Weiner, 1996).

1.4.5 L'apoD, une protéine multimérique

L'apoD humaine purifiée à partir du plasma sanguin ou du fluide kystique mammaire et observée sans dénaturation semble se retrouver sous forme de monomères ou de dimères en s'associant avec elle-même ou avec d'autres apolipoprotéines. L'apoD semble en effet s'associer avec la plupart des lipoprotéines, comprenant les lipoprotéines de très basse densité (VLDL) aux lipoprotéines de très haute densité (VHDL) (Ayrault-Jarrier et al., 1963; McConathy et Alaupovic, 1976.). Chez l'humain, 89% de l'antigène plasmatique est associé avec des lipoprotéines : 83% avec des HDL et VHDL, 5% avec les LDL et VLDL. En utilisant l'anticorps 4E11, l'apoD semble se trouver sous deux formes dans les LDL; une forme libre et une forme complexée avec l'apoB (Camato et al., 1989). L'apoD représente 5% de la masse protéique des HDL associée dans un complexe avec la lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT), une enzyme qui avec l'apolipoprotéine AI (apoAI), agit au niveau de l'estérification du cholestérol. La concentration de l'apoD est de 6,1 et de 6,8 μ moles par litre de plasma respectivement chez l'homme et la femme (Camato et al., 1989). L'apoD a également été retrouvée en association avec l'apoAI et l'apoAII par un pont disulfure. Ce complexe pouvant expliquer l'association apoD-HDL mais ne serait pas le seul déterminant puisque l'apoD a déjà été retrouvée libre dans les HDL (Yang et al., 1994). L'apoD a également été observée complexée avec l'apolipoprotéine B (apoB) dans les LDL humaines et sous forme de monomères et d'homodimères dans l'urine ainsi que dans le liquide lacrymal (Blanco-Vaca et al., 1993; Holmquist, 1990 et Holzfeind et al., 1995). La majorité des complexes d'apoD se retrouve en fait sous forme de dimères apoD-apo-AII et il est possible que ces hétérodimères augmentent indirectement l'affinité de l'apoD pour les lipoprotéines (Bradley et al., 1996).

1.5 Expression de l'apolipoprotéine D

1.5.1 Distribution tissulaire

La vaste distribution de l'apoD chez les mammifères est probablement le reflet de son importance et de son rôle en tant que protéine multifonctionnelle.

Chez l'humain, l'apoD est exprimée dans le foie et les intestins qui sont les sites majeurs de synthèse des autres apolipoprotéines mais aussi dans les glandes surrénales, le pancréas, les reins, le placenta, le cerveau, la rate, les poumons, les nerfs périphériques, les ovaires et les testicules (Drayna et al., 1986). Les glandes surrénales et les reins sont les organes qui démontrent la plus forte expression d'ARNm. L'apoD a également été identifiée comme la composante majeure du fluide kystique mammaire (Balbin et al., 1990) et des études immunohistochimiques (Aspinall et al., 1995) ont par la suite démontrées qu'elle était présente dans les cellules épithéliales de la prostate. Divers groupes ont montré qu'elle était libérée dans les sécrétions lacrymales et exprimée par le corps ciliaire de l'oeil où elle serait déversée dans l'humeur aqueuse (Holzfeind et al., 1995; Escribano et al., 1995). Dans l'oeil de mammifère, le corps ciliaire permet de réguler la sécrétion de l'humeur aqueuse et la pression intraoculaire (Escribano et al., 1995). L'apoD a également été retrouvée dans les sécrétions apocrines au niveau axillaire toutefois le patron de glycosylation diffère de celui de l'apoD plasmatique (Zeng et al., 1996).

Des études d'hybridation *in situ* (Provost et al., 1991a) ont permis de mettre en évidence certains organes exprimant l'apoD chez le lapin. L'expression d'apoD a été observée dans le système nerveux central (SNC), les testicules, les poumons, les glandes surrénales, la rate, les reins, les

ovaires, le tissu adipeux et en quantité mineure dans le foie, les intestins, la moelle osseuse, le thymus, les muscles squelettiques et les nodules lymphatiques. La structure primaire de l'apoD humaine a 80% d'homologie avec celle du lapin alors que les structures secondaires et tertiaires sont presque identiques. En effet les substitutions d'acides aminés sont conservatrices, deux des sites de glycosylation et quatre des cinq cystéines sont localisés au même endroit (Provost et al., 1990).

Chez le singe rhésus, l'apoD est une glycoprotéine de 33 kDa présente dans le plasma à une concentration d'environ 70 µg/ml (Smith et al., 1990). Par des techniques d'hybridation in situ, l'expression de l'apoD a été mise en évidence dans plusieurs organes dont la rate, les testicules, le foie, les muscles cardiaques, l'intestin, les reins, la glande pituitaire, les artères, le cortex, l'hypothalamus et le cervelet. Cette étude a aussi démontré que ce sont principalement les fibroblastes et les cellules à proximité des capillaires et des vaisseaux sanguins qui expriment l'apoD. L'apoD a également été localisée dans les cellules associées aux nerfs périphériques, les cellules neurogliales, dans l'espace sous-arachnoïdien, sur la surface du cerveau incluant les cellules de la pie, les cellules périvasculaires et les neurones (Smith et al., 1990; Bojanovski et al., 1980).

L'apoD de rat semble sur SDS-PAGE être formée d'une série d'isoformes entre 27 et 31 kDa sur gels non réduits et de 29 à 33 kDa sur gels réduits (Boyles et al., 1990b). L'apoD de rat a de multiples points isoélectriques entre pH 4.05 et 4.37 résultant de la N-glycosylation. Chez le rat contrairement à l'humain, il y a peu d'apoD trouvée dans le plasma (Boyles et al., 1990a), cependant la localisation immunocytochimique d'apoD dans douze tissus du rat (foie, rein, vessie, glandes surrénales, duodénum, testicules, poumon, rate, pancréas, coeur, peau, système nerveux central et périphérique) a montré qu'une certaine variété de cellules contenait des

niveaux substantiels d'apoD (Boyles et al., 1990a). Des études de Northern blot chez la souris (Séguin et al., 1995) ont démontré que divers organes exprimaient l'apoD, parmi ceux-ci, on observe une expression dans la moëlle épinière, le cervelet, le cerveau, les ovaires, les glandes surrénales, les testicules, les muscles, le thymus, les poumons, le foie et les reins. Cette étude a aussi permis de mettre en évidence que l'expression la plus élevée était localisée principalement au niveau du système nerveux central soit dans la moelle épinière, le cervelet et le cerveau. Il a aussi été démontré (Patel et al., 1995) chez la souris que des cultures d'astrocytes primaires isolées à partir de cerveau néonatal exprimaient l'apoD de façon constitutive ce qui suggère un rôle pour l'apoD dans le transport de ligands tels la progestérone et le cholestérol vers les tissus nerveux. L'expression de l'apoD a également été mise en évidence chez le cochon d'inde ou le shéma d'expression suit celui retrouvé chez le rat et la souris (Provost et al., 1995).

La séquence complète de l'ADNc de l'apoD murine a été déterminé (Séguin et al., 1995; Cofer et Ross, 1996) et consiste en 920 nucléotides suivis d'une queue de polyA. Un seul cadre de lecture ouvert peut être observé codant pour une protéine mature de 169 acides aminés et un peptide leader de 20 acides aminés. L'ARNm de l'apoD de souris et humain montrent 66.3% d'homologie et ce chiffre monte à 77.9% si l'on ne considère que les régions codantes (Cofer et Ross, 1996). Deux sites de N-glycosylation potentiels sont conservés dans les quatre espèces (homme, lapin, rat et souris). Les deux régions consensus (responsables de la liaison de petites molécules hydrophobes) trouvées chez les membres de la famille des lipocalines sont également bien conservées chez les quatre apoD. La figure 1.5 montre les séquences conservées dans l'apoD de quatre espèces:

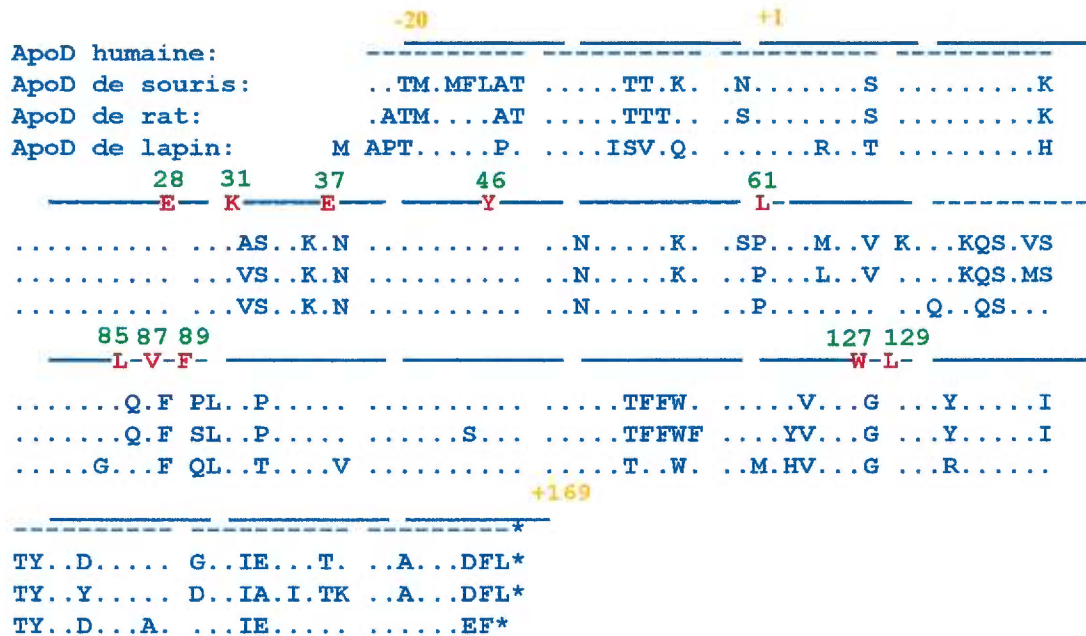


Figure 1.5: Séquences conservées de l'apolipoprotéine D chez différentes espèces animales. La séquence de l'apoD humaine a été comparée avec la séquence de souris, de rat et de lapin. Les caractères en rouge représentent les acides aminés susceptibles d'être impliqués dans la liaison de l'apoD à son ligand.

Vieira et al., 1995 ont démontré que l'apoD n'est pas une apolipoprotéine exprimée exclusivement chez les mammifères. L'apoD aviaire a aussi été observée, par utilisation d'un anticorps monoclonal spécifique à l'apoD, au niveau du jaune d'oeuf des oocytes en pleine croissance. Les auteurs ont décelé une apoD aviaire de même masse moléculaire que l'apoD humaine (soit 29 kDa) et qui s'associe de façon préférentielle aux lipoprotéines plasmatiques. Une autre protéine immunoréactive de 24 kDa est également trouvée au niveau du sérum. La fonction de l'apoD pourrait être le transport de lipides à partir du plasma vers l'ovocyte pendant la période de l'embryogénèse chez les espèces ovipares.

1.5.2 Expression cellulaire

L'ARNm de l'apoD est exprimé par des fibroblastes et plus particulièrement par les fibroblastes situés autour des vaisseaux sanguins (Provost et al., 1991a; Smith et al., 1990). L'expression de l'apoD est également observée au niveau du système nerveux central par les cellules gliales de la matière blanche principalement dans les astrocytes et les oligodendrocytes alors qu'au niveau du système nerveux périphérique, l'apoD est synthétisée par les fibroblastes endoneuraux (Boyles et al., 1990a; Boyles et al., 1990b; Boyles et al., 1989).

L'apoD est présente exclusivement dans les tumeurs issues de glandes de type apocrine :

Le fluide kystique mammaire contient quatre protéines principales soit les GCDFP pour « gross-cystic-disease-fluid protein ». La séquence partielle en acides aminés de la GCDFP-24 a démontré que cette protéine correspondait à l'apoD et elle devient donc la composante majeure du fluide kystique mammaire où elle y est par ailleurs 1000 fois plus concentrée que dans le plasma sanguin des femmes atteintes (Balbin et al., 1990). Statistiquement, 7% des femmes préménopausées sont atteintes de kystes mammaires or ces femmes développent des cancers du sein avec une fréquence de deux à quatre fois plus élevée que la normale. Il est donc probable que certains composants des fluides kystiques soient reliés au développement de carcinomes mammaires (Balbin et al., 1990). La composition du fluide kystique varie selon la progression tumorale et l'apoD est retrouvée en concentration plus élevée dans les fluides issus de tumeurs bénignes très différenciées par rapport aux tumeurs malignes peu différenciées (Sanchez et al., 1992a et b). Ainsi, 88% des femmes atteintes de façon bénigne ont des sécrétions mammaires contenant de l'apoD alors

que 57% des femmes atteintes de carcinomes mammaires ont des sécrétions sans apoD (Sanchez et al., 1992b). De plus, une forte expression d'apoD dans les carcinomes mammaires représente un facteur favorable pour la femme en diminuant ses risques de rechute et en augmentant ses chances de survie (Diez-Ita et al., 1994). Cependant, le rôle de l'apoD demeure pour l'instant inconnu, certains auteurs (Kesner et Bradlow, 1990) suggérant même que l'apoD contribuerait à la formation de kystes mammaires. En effet, une activité protéase a été associée à l'apoD (Kesner et Bradlow, 1990) ce qui amènerait une accumulation de peptides et par la suite un débalancement osmotique.

Le même phénomène est également observé dans le cancer de la prostate où l'on retrouve une augmentation de l'expression de l'apoD dans les stades avancés de la maladie (Aspinall et al., 1995). Par des études immunocytochimiques, il a été démontré que l'expression de l'apoD par des cellules épithéliales de la prostate pouvait varier en fonction des circonstances physiologiques. En effet, l'expression d'apoD détectée chez les tumeurs bénignes de la prostate est légèrement supérieure à la normale alors que l'expression par les carcinomes de prostate est très élevée (Aspinall et al., 1995) et il est probable que l'apoD serve de marqueur biologique pour évaluer la progression du cancer de la prostate.

Un autre rôle potentiel dans l'homéostasie cellulaire a été attribué à l'apoD. Des études réalisées dans des cultures primaires de fibroblastes humains ont démontré qu'un arrêt de croissance forcé pouvait induire l'expression d'apoD (Provost et al., 1991b). Cette induction a aussi été observée lorsque ces cellules atteignent un état de confluence ou de sénescence provoquant l'arrêt de croissance. L'induction de l'expression de l'apoD serait dans un but de conserver l'homéostasie cellulaire dans certaines conditions métaboliques suivant l'arrêt de croissance. Il est

possible également que l'expression de l'apoD soit reliée à un stade de différenciation qui est atteint suite à l'arrêt de croissance (Provost et al., 1991b).

1.5.3 Régulation de l'expression cellulaire

La régulation de l'expression de l'apoD est très complexe et plusieurs auteurs ont démontré l'importance de facteurs biologiques dans la modulation de la protéine. Chez plusieurs types cellulaires, il a été démontré que l'expression de l'apoD pouvait être modulée par la présence de certains stéroïdes. Chez les cellules ZR-75-1, qui sont des cellules épithéliales de cancer mammaire, ainsi que chez les cellules LNCaP, des cellules cancéreuses de la prostate, l'expression de l'apoD est inhibée par la présence d'oestrogènes et stimulée par la présence d'androgènes et ce de façon inversement proportionnelle à la prolifération cellulaire (Simard et al., 1990; Simard et al., 1991; Simard et al., 1992). En effet, lorsque deux androgènes, la dihydroxytestostérone (DHT) et la dexaméthasone (DEX) sont ajoutés à des cellules mammaires cancéreuses humaines, il y a une stimulation de 3 à 4 fois de la sécrétion d'apoD et une diminution de 50% de la prolifération cellulaire (Simard et al., 1992). Les oestrogènes (E₂) ont l'effet contraire, c'est à dire qu'ils suppriment l'expression d'apoD et stimulent la prolifération cellulaire. Les effets de DHT et DEX sont additifs et peuvent augmenter l'expression de l'apoD en présence ou absence d'oestrogènes. La dihydroxytestostérone et la testostérone inhibent aussi la prolifération des cellules LNCaP et stimulent la production d'apoD par ces mêmes cellules (Simard et al., 1991). Ces expériences ont permis de constater que la prolifération cellulaire et l'expression d'apoD sont biphasés chez ce type de cellules et sous un contrôle stéroïdien.

L'exposition des cellules de cancer du sein (ZR-75-1 et T-47D) à l'interleukine alpha (IL- α) diminue de moitié la prolifération cellulaire basale et réduit de façon marquée l'action mitogène du 17- β -oestradiol stimulant ainsi l'expression d'apoD (Blais et al., 1994). Il est aussi démontré qu'il y a addition de l'effet de l'IL- α et du DHT ou DEX dans la régulation de ces marqueurs biochimiques dans les cellules cancéreuses mammaires humaines. La présence de l'IL- α ne change pas la sensibilité de l'apoD aux deux stéroïdes. Au contraire, l'interleukine-6 (IL-6) abaisse la sécrétion d'apoD par les ZR-75-1 de 50% après 6-14 jours d'incubation et inhibe également la sécrétion induite par le DHT et le DEX sans que la sensibilité de l'apoD aux deux stéroïdes soit touchée ce qui suggère que le modèle de transduction des deux substances est différent (Blais et al., 1995). L'IL-6 inhibe aussi la prolifération cellulaire de 40% et son effet d'inhibition s'additionne à celui du 17- β -oestradiol et annule l'effet stimulateur de l'IL- α . Les mêmes phénomènes sont constatés dans les cellules du cancer de la prostate LNCaP. Dans le cas de l'IL-6, la sécrétion d'apoD n'est pas opposée à la prolifération cellulaire comme pour l'IL-1 α .

Des études de modulation d'expression en présence d'acide rétinoïque ont aussi été réalisées (Lopez-Boado et al., 1994). L'ajout d'acide rétinoïque sur des cellules ZR-75-1 et T47D induit fortement l'expression d'apoD et ce en fonction de la dose et du temps. L'augmentation d'expression est aussi accompagnée par une inhibition de la prolifération cellulaire et d'une progression vers un stade plus différencié. Des études récentes (Lopez-Boado et al., 1996) ont confirmé que l'induction par l'acide rétinoïque était reliée spécifiquement au récepteur nucléaire RAR α (récepteur de l'acide rétinoïque) chez les cellules de cancer mammaire T-47D. Il a aussi été démontré que certains analogues de l'acide rétinoïque

étaient capables d'induire un arrêt de prolifération cellulaire sans toutefois induire l'expression d'apoD (Lopez-Boado et al., 1996).

Ces différentes études laissent supposer que l'expression de l'apoD peut être modulée directement ou indirectement par une diminution de la prolifération cellulaire. De plus la présence en forte concentration de l'apoD dans les fluides kystiques pourrait refléter un mécanisme d'action utilisant un récepteur hormonal. Le tableau I montre un résumé de ce qui est connu sur la modulation de l'expression de l'apoD.

Tableau I : Résumé de la modulation de l'expression de l'apoD

Condition	Expression du gène de l'apo D	Prolifération cellulaire
androgènes et glucocorticoïdes	↗	↘
oestrogènes	↘	↗
interleukine 1 α	↗	↘
interleukine 6	↘	↘
1,25-dihydroxy-vitamine D ₃	↗	↘
confluence		
culture à passage précoce	↗	↘
culture à passage tardif	↗	↘
déprivation de sérum	↗	↘
acides rétinoïques	↗	↘
oestrogènes +		
oestrogènes -	-	-
nerfs sciatiques en régénération	↗	↘

1.6 Allèles de l'apolipoprotéine D et études cliniques

1.6.1 Allèles de l'apolipoprotéine D

Malgré des études qui ont commencé il y a plus de 25 ans, très peu d'informations sont disponibles sur les allèles de l'apoD dans les populations humaines et sur les relations pouvant exister entre cette protéine et certaines maladies. Drayna et al. (1987b) ont fait des études de RFLP (restriction fragment length polymorphism) sur l'apoD humaine. Ils ont montré que les enzymes *MspI* et *TaqI* permettaient chacun d'identifier deux allèles et que ces deux polymorphismes coségrègent dans les trois familles étudiées et n'ont donc permis que l'identification de deux allèles. L'allèle le moins représenté se retrouve à une fréquence de 18% dans un échantillonnage de 103 personnes dont la race n'est pas précisée.

1.6.2 Études cliniques

Le niveau moyen normal d'apoD plasmatique a été estimé à environ 12 mg/100ml (Camato et al., 1989), toutefois les mêmes auteurs ont trouvé des niveaux de 5 à 23 mg/100ml de plasma chez des individus ne présentant aucun signe pathologique. L'apoD est détectée également dans l'urine humaine à des niveaux variant entre 0.2 et 3.0 mg/L (Holmquist, 1990). Parmi les antigènes D (section 1.4.2), seule l'apoD a été détectée.

Aucun lien évident n'a encore été établi entre l'apoD et le métabolisme des lipoprotéines. Chez les patients atteints de la maladie de Tangier, d'abétalipoprotéïnémie, d'une déficience de la LCAT, de la LPL où même chez des sujets atteints d'hypertriglycérémie à la naissance, les études montrent des niveaux relativement faibles d'apoD plasmatique soit environ la moitié du niveau normal (Alaupovic et al., 1971; Breckenridge et al., 1982;

Illingworth et al., 1981; Lane et McConathy, 1983 et Alaupovic et Fernandes, 1985). Cependant toutes ces maladies se caractérisent aussi par des niveaux faibles de HDL-cholestérol et les faibles niveaux d'apoD observés pourraient être une conséquence de cette caractéristique (Albers et al., 1984). Chez l'humain, aucune déficience complète en apoD plasmatique n'a encore été observée.

1.7 Ligands potentiels de l'apoD

Il est connu que l'apoD peut lier un ou plusieurs types de lipides en plus de petites molécules hydrophobes. En effet, l'apoD a une surface hydrophobe entourant la poche de liaison de la protéine ce qui permet sa liaison aux lipides. Parce que l'apoD est exprimée dans une grande variété de tissus et sous diverses conditions, il est probable que les ligands associés à cette protéine peuvent varier selon les conditions.

1.7.1 La bilirubine et le cholestérol

À cause de son association avec la LCAT, le cholestérol a longtemps été considéré comme le principal ligand de l'apoD (Drayna et al., 1986). Or, par un modèle moléculaire et un test de liaison préliminaire, les composés de l'hème se sont avérés de meilleurs ligands pour cette protéine que le cholestérol et ses esters (Peitsch et Boguski, 1989). Dans cette étude, le ratio de liaison apoD:cholestérol a été fixé à 1:0.16 et le rendement serait encore plus faible avec l'ester de cholestérol. Un autre ligand a été testé basé sur sa ressemblance avec l'insecticyanine, soit la bilirubine, un composé de l'hème. La bilirubine lie l'apoD dans un ratio molaire de 1:1 et démontre une interaction de nature hydrophobique.

Certaines études (Fielding et Fielding, 1980; Kostner et Steyer, 1988) semblent démontrer que l'apoD pourrait former un complexe avec la LCAT, en effet, l'augmentation de l'activité d'estérification du cholestérol en présence de la LCAT et de l'apoD suggère que cette dernière ait un effet stabilisateur sur la LCAT. Cependant, une étude cherchant à établir une association entre le niveau d'apoD et de cholestérol dans les fluides kystiques mammaire, a démontré qu'il n'y avait aucune corrélation entre leurs concentrations respectives (Sanchez et al., 1992a). En comparant les concentrations de ces deux éléments dans le sang et dans le fluide kystique mammaire, on constate que le cholestérol est deux fois plus élevé dans le fluide kystique alors que l'apoD y est de 500 à 1000 fois plus élevée. Ce qui laisse supposer d'autres ligands pour l'apoD dans le fluide kystique mammaire bien que le cholestérol pourrait être utilisé comme précurseur dans la synthèse de certains stéroïdes et que ces derniers pourraient ensuite lier l'apoD.

1.7.2 Les stéroïdes

L'apoD a d'abord été caractérisée par sa capacité à lier la progestérone et la prégnénone avec une très forte affinité lorsqu'elle a été identifiée pour la première fois dans les fluides kystiques mammaires (Pearlman et al., 1973). Sa constante d'association (K_a) est de 1×10^6 mole/litre pour donner un ratio de liaison molaire entre l'apoD et la progestérone de 1:1 alors que la prégnénone possède un K_a encore plus élevé de 1.32×10^6 mole/litre (Dilley et al., 1990). De plus, l'apoD aurait une affinité décroissante pour les progestines, les androgènes et les estrogènes (Lea, 1988). Ainsi, à l'intérieur du groupe des progestines, une affinité décroissante est observée entre la prégnénone, la progestérone, la prégnanolone et la prégnandione (Dilley et al., 1990). Les groupes situés

sur les carbones aux positions 17 et 21 de la progestérone semblent être essentiels à la liaison puisque des molécules comme l'estradiol et l'estrone ne démontrent pas de liaison (Lea, 1988; Dilley et al., 1990). L'apoD pourrait donc être impliquée dans la liaison de la progestérone et dans son transport dans les tissus mammaires humains.

1.7.3 L'acide arachidonique

L'acide arachidonique a été identifié tout récemment comme ligand potentiel de l'apoD avec une K_a de 1.6×10^8 mole/litre (Morais-Cabral et al., 1995) ce qui représente une affinité 20 fois supérieure à celle de la progestérone. L'acide arachidonique devient donc à ce jour, le ligand ayant la plus forte affinité pour l'apoD. Cette découverte est particulièrement intéressante puisque l'acide arachidonique est un précurseur dans la synthèse des eicosanoïdes et des prostaglandines (Von Euler, 1988) et son métabolisme est directement relié à la formation d'AMP cyclique (Lagarde, 1988). L'apoD pourrait être impliquée dans le transport de l'acide arachidonique afin de permettre la synthèse des eicosanoïdes et des prostaglandines. À cause de son association avec la LCAT, il est aussi envisageable que l'apoD contrôle la conversion de l'acide arachidonique (forme active) en cholestérol ester (forme inactive). Ce nouveau ligand de l'apoD laisse supposer un rôle important de l'apoD dans la régulation cellulaire.

1.7.4 L'acide E-3-methyle-2-hexenoïque

L'acide E-3-methyle-2-hexenoïque (E3M2H) est transporté à la surface de la peau dans la région axillaire par deux protéines nommées ASOB 1 et 2. ASOB2 a été identifiée comme étant l'apoD à partir de sa

séquence en acides aminés (Zeng et al., 1996) et leur rapport molaire ligand/protéine est d'environ deux. Ce composé odorant est principalement sécrété par les glandes apocrines, le rôle de l'apoD serait de permettre son transport à la surface de la peau. Par ailleurs, deux autres lipocalines, l'aphrodisine et la pheromaxéine, transportent aussi des molécules odorantes pour la communication par les phéromones.

1.8 Fonctions de l'apoD

La diversité des tissus produisant l'apoD chez les mammifères semble indiquer des fonctions variant d'un organe à l'autre. Par exemple, elle pourrait être une protéine de phase aigüe dans les nerfs en régénération apportant des molécules spécifiques aux sites de régénération et évacuant d'autres molécules. Dans la rate, elle pourrait évacuer des molécules toxiques dérivées de l'hème. Dans les autres tissus comme les glandes surrénales et les testicules, elle pourrait être un transporteur d'hormones stéroïdes. Provost et al, 1990 ont émis l'hypothèse que l'apoD exerce ses principales fonctions dans les organes plutôt qu'en circulation. Ainsi, elle pourrait jouer un rôle paracrine local dans la distribution de son ligand ou entre les cellules et le HDL en circulation dans les tissus où les cellules ne sont pas directement exposées aux HDL en circulation. Un tel rôle de l'apoD peut être impliqué dans la biologie des tissus normaux ou cancéreux mammaires ou prostatiques. Chez les murins, l'expression de l'apoD est dominante dans le SNC et il y aurait donc eu une divergence de fonction au cours de l'évolution.

1.8.1 Métabolisme du cholestérol et de ses esters

Lorsque l'apoD a été caractérisée par McConathy and Alaupovic (1973), elle était alors considérée comme une protéine de transfert des esters de cholestérol mais par la suite cette activité a plutôt été attribuée à une autre protéine (Morton et Zilversmith, 1981). L'apoD a été originellement identifiée comme une composante des HDL et en association avec la LCAT, l'apoA-I ou la CETP (cholesteryl ester transfer protein), elle pourrait faire partie d'un complexe responsable de l'efflux du cholestérol des tissus périphériques vers le foie pour son catabolisme (Spreyer et al., 1990). En effet, une augmentation de l'activité d'estérfication du cholestérol a été observée en présence du cholestérol et la formation d'un complexe avec la LCAT aurait un effet stabilisateur d'où l'implication de l'apoD dans l'afflux du cholestérol à partir des tissus périphériques vers le foie (Kostner et Speyer, 1988). Le haut taux d'apoD dans le cerveau suggère que celle-ci peut également jouer un rôle dans le transport des lipides dans le cerveau. Le cerveau va chercher son cholestérol à partir de la circulation à travers la barrière hémato-céphalique mais aussi par une synthèse *de novo*. L'apoD est, chez l'humain, surtout exprimée dans les astrocytes délimitant l'espace arachnoïdien et les cellules de la pie-mère pour transporter les lipides dans les régions internes du cerveau (Smith et al., 1990). La présence de l'apoD dans les tissus connectifs et interstitiels de tous les organes et son accumulation dans les nerfs périphériques en régénération suggère que l'apoD transporte aussi le cholestérol dans les compartiments extravasculaires. Cependant, l'identification de la GCDFP-24 comme étant l'apoD a remis en question le rôle de l'apoD dans le transport réverse du cholestérol car la GCDFP-24 ne lie pas le cholestérol et il n'y a pas de relation entre sa concentration et la concentration de cholestérol dans le fluide kystique.

1.8.2 LCAT et acide arachidonique

La relation entre l'apoD et la RBP solidifie le concept que l'apoD joue un rôle dans le transfert de lipides relié à la fonction de la LCAT. La LCAT est l'enzyme synthétisée par le foie qui catalyse l'estérification du cholestérol libre dans le plasma formant ainsi des esters de cholestérol et de phosphatidylcholine. Elle pourrait lier les substrats (lécithine, cholestérol) ou les produits (lysolécitnine, esters de cholestérol) de la réaction LCAT (Drayna et al., 1987a). Via son association avec la LCAT, l'apoD pourrait jouer un rôle dans la régulation du métabolisme de l'acide arachidonique dans les lipoprotéines. L'apoD pourrait stabiliser l'acide arachidonique en prévenant sa conversion en esters de cholestérol. L'affinité entre l'apoD et l'acide arachidonique et leur implication dans les processus de croissance et de régénération laisse supposer un rôle pour l'apoD dans les mêmes processus. Le métabolisme de l'acide arachidonique est directement relié à la formation d'AMPc dans la sensibilité à la douleur, l'activité des cellules nerveuses et la prolifération cellulaire (Lagarde, 1988). La surexpression de l'apoD lors de la régénération alors qu'il y a une myélinisation active suggère que l'apoD peut agir comme un transporteur d'acide arachidonique en enlevant ce précurseur de la cellule si la croissance ralentit (Von Euler, 1988).

1.8.3 Protéine de phase aigüe

Peitsch et Boguski (1989), quant à eux, suggèrent que l'apoD est une protéine produite localement en phase aigüe. Ainsi des tissus ne faisant pas habituellement le catabolisme de l'hème, peuvent faire de la bilirubine afin d'établir une défense antioxydante. C'est le cas de la hème oxygénase qui convertit l'hème en biliverdine puis en bilirubine grâce à la biliverdine

réductase. La hème oxygénase devient une protéine dominante lors de stress dans les fibroblastes de la peau. La bilirubine peut cependant devenir toxique et doit alors être évacuée. Pour les mêmes raisons, lors de traumatismes accompagnés d'hémorragie locale, il est nécessaire d'enlever les métabolites dérivant de la mort des érythrocytes. Ainsi dans les situations de phase aigüe, la concentration locale d'apoD pourrait augmenter afin de permettre aux métabolites de l'hème d'accéder au fluide extracellulaire et à la circulation où après dilution, ils seront transférés à l'albumine. En se basant sur la séquence en acides aminés et à l'aide de modèles moléculaires, les auteurs ont trouvé que l'hème est le ligand préférentiel de l'apoD. Rappelons aussi que des éléments de réponse à la phase aigüe (APRE) ont été trouvés dans la région entourant la portion 5' du gène de l'apoD (Lambert et al., 1993).

De la même façon, l'apoD pourrait jouer un rôle dans l'évacuation des métabolites de l'hème dans la rate qui est l'organe responsable de la destruction des vieux érythrocytes. En effet, de hauts taux d'ARNm ont été détectés dans la rate humaine et de lapin et des quantités moindres ont été détectés chez le singe rhésus alors que chez la souris et le rat de faibles taux d'apoD ont été détectés. Pourtant chez ces deux derniers animaux, l'érythropoïèse a surtout lieu dans la rate contrairement à l'humain, le lapin et le singe. Ainsi, la bilirubine et les composés reliés à l'hème pourraient être réutilisés rapidement *in situ* pour l'élaboration de nouveaux érythrocytes. Un besoin minimal pour éliminer l'hème en excès pourrait expliquer les faibles taux d'apoD constatés chez le rat et la souris (Séguin et al., 1995).

1.8.4 Marqueur d'altérations hormonales et de la croissance cellulaire

L'apoD a aussi été identifiée comme liant la progestérone et la prégnénolone dans le fluide kystique mammaire suggérant un rôle dans le

transport des stéroïdes dans le tissu mammaire. De plus, l'induction d'apoD par les androgènes, l'acide rétinoïque et l'IL-1 α dans les cellules mammaires cancéreuses suggère que l'apoD peut être un marqueur d'altérations hormonales. Une corrélation entre le cancer de la prostate et l'expression de l'apoD a aussi été identifiée et de plus des cellules de cancer de prostate induisent l'expression d'apoD lors d'une stimulation par les androgènes. L'induction de l'expression de l'apoD dans ces différents cas de figure est inversement proportionnelle à la prolifération cellulaire, un rôle pour l'apoD dans l'homéostasie cellulaire n'est pas à exclure. De plus, les études de Provost et al. (1991b) réalisées sur des cultures primaires de fibroblastes humains ont démontré qu'un arrêt de croissance induit l'expression d'apoD. Ces observations laissent supposer un rôle pour l'apoD relié au stade de différenciation atteint suite à l'arrêt de croissance.

1.8.5 Le transport de molécules biologiques actives

Il a été démontré que l'apoD était sécrétée au niveau axillaire par les glandes apocrines et que son rôle serait alors de transporter le 3M2H. Ce rôle est considéré comme d'une grande importance puisque les sécrétions axillaires chez la femme ont la capacité d'affecter le cycle menstruel.

L'apoD est aussi exprimée par les glandes lacrymales où sa fonction serait d'assurer la dispersion des différentes composantes lipidiques à la surface de la cornée et de favoriser l'élimination de certains composés pouvant endommager la cornée.

1.9 L'apoD dans le système nerveux

1.9.1 L'apo D dans le système nerveux périphérique

Les cellules fibroblastiques du système nerveux périphérique (SNP) sécrètent de l'apoD et cette sécrétion est d'autant plus importante dans les nerfs périphériques en régénération après une lésion (Boyles et al., 1990b; Spreyer et al., 1990). En effet, les concentrations de l'apoD et de son messenger augmentent respectivement de 500 et de 40 fois au niveau des nerfs périphériques durant ce phénomène par rapport à leur concentration en situation normale. On note également l'augmentation d'autres apolipoprotéines durant la régénération des nerfs, soit les apo A-I, A-IV et E, qui augmentent respectivement de 26, 14 et 250 fois par rapport à leur concentration en situation normale. Les apo A-I et A-IV sembleraient provenir de la circulation sanguine, alors que les apoD et E seraient produites localement; ainsi, ces deux dernières apolipoprotéines semblent tenir un rôle important dans la régénérescence (Boyles et al., 1990b). La dégénérescence des nerfs entraîne une accumulation du cholestérol provenant de la dégradation des membranes de myéline par les macrophages et les cellules de Schwann et ce cholestérol est par la suite restitué durant la régénérescence par des lipoprotéines contenant les apoA-I et E; on associe donc aux apoA-I, D et E un rôle probable de liaison et de transport du cholestérol et de ses esters dans le SNP pour le maintien de l'homéostasie et la réutilisation du cholestérol lors de la régénérescence (Boyles et al., 1989; Goodrum, 1993 et Goodrum, 1995). Or, on sait aujourd'hui que la principale source de cholestérol durant ce phénomène provient de la réutilisation du cholestérol membranaire et non pas de la circulation sanguine; les cellules de Schwann réagissent en effet en

augmentant l'expression de leurs récepteurs de LDL durant la remyélinisation, servant probablement à capter les lipoprotéines. Il s'agirait donc d'un mécanisme de transfert et de recyclage du cholestérol plutôt que d'un mécanisme de remplacement du cholestérol (Boyles et al., 1989; Goodrum, 1993). On note des résultats similaires obtenus chez le lapin et le singe (Boyles et al., 1990b) et ces observations ont également été confirmées chez le rat par une étude similaire démontrant une augmentation d'ARNm équivalente à 40 fois le niveau basal dans les fibroblastes situés à proximité des nerfs sciatiques (Spreyer et al., 1990).

Longtemps, les apoA-I et E ont été considérées comme étant indispensables à l'association du cholestérol dans les lipoprotéines prises ensuite par les récepteurs de LDL. Or, il a été constaté récemment qu'il y a une réutilisation du cholestérol et une régénérescence chez des souris dont l'expression du gène de l'apoE (Popko et al., 1993) ou des gènes des apoE et A-I ensemble (Goodgrum., 1995) est réprimée ("knockout"). Ainsi, une ou d'autres apolipoprotéines seraient importantes à la régénérescence ou du moins à la réutilisation du cholestérol en passant ou non par les LDL-récepteurs. Dans cette ligne de pensée, il est possible que l'apoD soit cette apolipoprotéine (Popko et al., 1993; Goodgrum., 1993; Goodgrum., 1995). En considérant la bilirubine comme un ligand potentiel de l'apoD et en sachant que la bilirubine est produite dans les nerfs endommagés, on pourrait aussi penser que l'apoD servirait à éviter l'accumulation de cette molécule ayant un effet toxique sur les cellules fibroblastiques (Peitsch et Boguski, 1989).

1.9.2 L'apo D dans le système nerveux central

1.9.2.1 Fonctions de l'apo D en situation normale

L'apoD est également sécrétée dans le système nerveux central (SNC) via les oligodendrocytes et les astrocytes et serait peut-être impliquée dans le processus de réinnervation (Provost et al., 1990; Boyles et al., 1990b; Patel et al., 1995). L'apoD pourrait être impliquée dans l'estérification du cholestérol ou de certains stéroïdes, puisque la LCAT se retrouve aussi dans le cerveau et que l'oxystérol, connu pour stimuler l'estérification du cholestérol, stimule aussi la sécrétion d'apoD par les astrocytes (Lesczynski et al., 1989; Lesczynski et Schafer, 1990; Patel et al., 1995). Elle pourrait également lier la progestérone puisque celle-ci est synthétisée dans le cerveau et induit la sécrétion d'apoD par les astrocytes. L'apoD pourrait ainsi servir dans le transport de la progestérone dans les tissus nerveux (Patel et al., 1995). Toutes ces fonctions ne sont que des hypothèses car le ou les rôles de l'apoD au niveau du cerveau ne sont pas clairement définis.

On sait cependant que la formation et l'arrêt de communication de synapses dans le cerveau sont modulés par des récepteurs de stéroïdes, comme par exemple ceux des androgènes et des estrogènes. Dans la région de l'hippocampe particulièrement, on retrouve des récepteurs d'estrogène et de progestérone, ces derniers étant induits par l'estrogène. L'estrogène étant peut-être un modulateur de l'expression de l'apoD qui, de son côté, lie probablement la progestérone, il pourrait y avoir une interrelation entre ces éléments (McEwen et Wooley, 1994). De plus, on sait que les oligodendrocytes sécrètent de l'apoD au niveau du SNC (Boyles et al., 1990b; Patel et al., 1995). Or, ces mêmes cellules sont également reconnues

pour convertir le cholestérol en prégnénolone (Hu et al., 1987). L'apoD pourrait donc servir à transporter la prégnénolone produite.

1.9.2.2 L'apo D et les pathologies neurodégénératives

L'apoD semble donc être impliquée dans le processus de réinnervation au niveau du SNC (Boyles et al., 1990b). De plus, le fluide cérébro-spinal contient aussi les apo A-I, A-IV, E, D et J (Borghini et al., 1995). Chez les patients atteints de maladies provoquant un désordre neuronal, on a observé que les apo C-II, C-III, E et B sont augmentées dans le sérum (Ikeda et al., 1993). Ces éléments, particulièrement l'apoE, pourraient également permettre le transport du cholestérol au site de réinnervation. L'apoE est reconnue pour transporter le cholestérol à des sites de dommages neuronaux. Contrairement à la situation observée dans le SNP, l'apoE semble être essentielle dans le processus de réinnervation du SNC. Chez une souris dont l'expression du gène d'apoE est réprimée, on observe en effet une perte de connections synaptiques durant la réinnervation (Masliah et al., 1995). Ainsi, l'apoD pourrait servir à transporter des stéroïdes d'une région du cerveau à une autre ou avoir une fonction différente dans la distribution des lipides que celle dans le SNP.

De plus, une importante augmentation d'apoD a été observée dans le cerveau de souris atteintes de la maladie de Niemann-Pick de type C. Cette pathologie est caractérisée par un défaut dans le transport du cholestérol intracellulaire entraînant une neurodégénérescence progressive (Yoshida et al., 1996 et Suresh et al., 1998). Ong et al., (1997) ont aussi montré que suite à une lésion causée par l'acide kaïnique, il y avait une induction spécifique de l'apoD dans les hippocampes de rat au niveau des neurones pyramidaux destinés à mourir. Morfin et al., (1992) ont montré que la prégnénolone s'accumule dans le cerveau, tant chez l'humain que chez le rat,

sous forme de sulfate de prégnénone. Ce stéroïde qui est aussi présent en forte concentration dans les nerfs sciatiques est dérivé du cholestérol (Hu et al., 1987; Morfin et al., 1992). L'augmentation d'expression d'apoD dans les neurodégénérescences pourrait s'expliquer par le besoin accru de présenter un stéroïde tel la prégnénone pour l'estérification par la LCAT.

2.0 La maladie d'Alzheimer

2.1 Données cliniques

La maladie d'Alzheimer (MA) est un désordre neurodégénératif d'étiologie inconnue, caractérisé par un déclin progressif des fonctions intellectuelles, de la mémoire, du jugement, de la capacité à raisonner. Les symptômes précoces peuvent inclure des pertes de mémoire, des difficultés à appréhender les idées abstraites et des désorientations dans le temps et l'espace. Les complications associées à la MA aboutissent généralement à la mort de l'individu dans les 2 à 10 ans, suivant l'évolution de la maladie. La MA a été décrite pour la 1^{ère} fois en 1907 par un clinicien chercheur allemand Alois Alzheimer, qui a procédé à l'autopsie d'une femme âgée de 51 ans traitée pour démence. Les anomalies observées sont maintenant connues sous le nom de plaques et de lésions et sont les caractéristiques histopathologiques de la MA.

Le diagnostic d'une MA probable est établi après exclusion de plusieurs autres causes connues comparables à cette maladie. Le diagnostic définitif est posé à la mort des patients par la présence dans leur cerveau:

- 1- De lésions neurofibrillaires intraneurales qui sont des enchevêtrements constitués de filaments en double hélice ("paired

helical filaments" ou PHF), dont le principal constituant est la protéine tau sous forme hyperphosphorylée.

- 2- De plaques séniles extracellulaires abondantes constituées majoritairement d'un peptide appelé amyloïde β ($A\beta$) défini par sa conformation repliée en feuillets β , et constitué de 39 à 43 acides aminés, produits du catabolisme d'un précurseur protéique nommé APP (Amyloid Protein Precursor).

2.2 Facteurs de risque génétiques

Sur la base des liens génétiques, la MA peut être classée en deux formes: familiale et sporadique qui représentent respectivement 10 et 90% des cas. Les formes familiales sont associées à des mutations rares localisées sur les chromosomes 21, 14 et 1 et affectant respectivement les gènes de l'APP (précurseur de la protéine amyloïde), de la préséniline 1 (PS-1 ou S182) et de la préséniline 2 (PS-2 ou SMT-2). Les mutations sur le chromosome 21 comptent seulement pour 2 à 3% des cas de la MA familiale à début précoce (Schellenberg et al, 1992). L'étude de mutations, en parallèle avec d'autres travaux expérimentaux ont renforcé l'hypothèse de la cascade de l'amyloïde, caractérisée par une série d'événements aboutissant à la démence de type Alzheimer. Les gènes des présénilines codent pour des protéines transmembranaires homologues. Leurs fonctions, comme celles de l'APP, ne sont pas connues. Les mutations dans le gène PS-1 seraient responsables de 70 à 80% des cas familiaux précoces, celles du gène PS-2 de 20%. La forme sporadique (à début tardif sans association familiale) est liée majoritairement au locus de l'apoE sur le chromosome 19, qui est associé à 64% des cas de MA sporadique.

2.3 Diagnostic et traitements de la maladie d'Alzheimer

Le diagnostic de la MA n'est pas une procédure simple et il est plutôt basé sur l'exclusion d'autres causes probables de démence. À l'apparition des symptômes, des évaluations neurologiques, psychiatriques et physiques complètes devraient être menées par un clinicien spécialiste. Ces examens doivent inclure une histoire médicale détaillée, des examens de laboratoire, des tests neuropsychologiques. Des techniques récentes telles le scanner cérébral, l'imagerie par résonance magnétique (IRM), l'électroencéphalographie, la spectroscopie RMN et de l'imagerie fonctionnelle - tomographie d'émission monophotonique (SPECT) et tomographie d'émission à positions (PET), permettent des mesures directes de l'atrophie cérébrale corticale, des modifications morphologiques de la substance blanche et des mesures du métabolisme cérébral. Après des examens complets, le diagnostic d'une maladie Alzheimer probable est certain dans 80 à 90% des cas. Seule, l'autopsie et l'examen histopathologique du tissu cérébral peuvent confirmer le diagnostic par la présence de nombreuses plaques séniles et de lésions neurofibrillaires.

Cependant cela laisse un pourcentage d'erreur de 10 à 20% pour les patients ce qui perturbe énormément les essais cliniques qui ont pour but de tester de nouveaux médicaments. Le diagnostic se doit d'être précoce afin d'appliquer une thérapie avant une destruction trop importante du cerveau. De multiples approches de traitement ont été proposées par la recherche sans aboutir à une amélioration significative chez la majorité des patients souffrant de la MA. La Tacrine, une molécule agissant sur les neurones cholinergiques, a un effet bénéfique chez certains patients en ralentissant la progression de la maladie mais à l'heure actuelle c'est la seule molécule à effet positif. Il est donc important de développer des marqueurs fiables des

atteintes cérébrales afin de pouvoir élaborer d'autres stratégies thérapeutiques.

2.4 Le liquide céphalorachidien

2.4.1 Composition

Le liquide céphalorachidien (LCR) contient 99% d'eau contre 93% pour le plasma et son volume total est estimé de 100 à 160 ml chez l'adulte, il représente 6,3% du contenu du compartiment intracranial. La concentration en protéines du fluide lombaire est comprise physiologiquement entre 0,15 et 0,45 g/l. On estime que environ 80% des protéines du LCR proviennent du plasma par diffusion à travers la barrière hémato-encéphalique. Le reste est synthétisé localement. Les composants protéiques principaux du LCR sont l'albumine (la plus abondante des protéines d'origine exclusivement plasmatique), la transthyrétine, la transferrine, la cystatine, l' α_1 -antitrypsine, l' α_1 -macroglobuline, les immunoglobulines et les apolipoprotéines (apo) principalement, l'apoE. Le LCR contient effectivement des lipoprotéines que l'on peut séparer par ultracentrifugation. Ces particules ressemblent aux HDL plasmatiques et sont composées de protéines (35%), phospholipides (34%), cholestérol libre (13%), esters de cholestérol (17%) et triglycérides (2%) (Rebeck, 1997). Parmi les apolipoprotéines, on trouve majoritairement les apoE, A-I, D, A-IV et J.

Le LCR est sécrété dans les plexus choroïdes et dans les ventricules cérébraux latéraux. Les plexus choroïdes produisent plus de 70% du volume total de LCR. Le reste est formé à partir des activités métaboliques du cerveau et du parenchyme de la moelle épinière. (May et al, 1990; Reiber, 1994).

Les changements dans la composition biochimique du LCR sont souvent le résultat d'activités métaboliques altérées, de réactions inflammatoires ou de la mort cellulaire. En raison de ses liens étroits avec le cerveau et de sa facilité de recueil, le LCR est le liquide biologique qui a fait l'objet du plus grand nombre de travaux, partant du postulat que la mesure de la concentration dans le LCR des substances qui ne traversent pas la barrière hémato-encéphalique permet d'estimer leur production dans le système nerveux central.

2.4.2 Biochimie et physiologie du LCR

Le LCR assure les fonctions physiologiques suivantes:

- 1- Rôle mécanique comme support physiologique du cerveau, considéré comme un «lit d'eau», le LCR constitue une protection continue et souple contre les chocs et les changements de pression au sein de la cavité cérébrale, au niveau de l'espace sous-arachnoïdien et des ventricules.
- 2- Transport intracérébral des biomolécules, élimination des métabolites et des déchets du SNC (CO_2 , choline) et maintien de la stabilité de l'environnement chimique du cerveau. Un exemple de ce rôle est l'élimination en quelques jours des cellules pathologiques après une hémorragie méningée.
- 3- Défense contre l'invasion pathogène, ce qui explique la rareté de l'infection du cerveau au cours des infections généralisées.

2.5 L'apolipoprotéine E

L'apoE est synthétisée par de nombreux tissus, principalement le foie (90%), le cerveau (par les astrocytes et les oligodendrocytes), le système nerveux périphérique (par les cellules de Schwann). D'autres cellules peuvent produire l'apoE notamment les macrophages. L'apoE est une protéine de 299 acides aminés, d'un poids moléculaire de 34 200 Da (Rall et al, 1992). Elle est polymorphe, son locus localisé sur le chromosome 19 (en position 19q12) possède trois allèles majeurs $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$.

L'isoforme E3, la plus fréquente, présente une cystéine en position 112 et une arginine en position 158; l'isoforme E4 se différencie de E3 par la substitution de la cystéine en position 112 par une arginine; l'isoforme E2 se distingue de E3 par la substitution de l'arginine en position 158 par une cystéine. Les trois isoformes diffèrent par leurs points isoélectriques (PI) en isoélectrofocalisation: apoE2 (PI=5,3), apoE3 (PI=5,4) et apoE4 (PI=5,55). Les isoformes humaines intracellulaires hépatiques et du LCR diffèrent des isoformes sériques par leur syalylation, ajoutant une complexité supplémentaire au polymorphisme de l'apoE.

2.5.1 ApoE et métabolisme lipidique

L'apoE est l'un des composants des lipoprotéines riches en triglycérides dans la circulation sanguine (chylomicrons, VLDL et HDL). La forme E2 qui est principalement associée à la fraction HDL des lipoprotéines plasmatiques, et dont l'affinité est réduite pour les récepteurs apoB/E entraîne une cholestérolémie plus basse que la forme E3. La forme E4, quant à elle, a une plus grande affinité pour les VLDL que pour les HDL et pour les récepteurs apo B/E et la transmission d'un allèle $\epsilon E4$ est associée

avec une cholestérolémie plus élevée par rapport au génotype $\epsilon 3/\epsilon 3$ (Gueguen et al, 1989).

2.5.2 ApoE et récepteurs des lipoprotéines dans le système nerveux central

Dans de nombreuses espèces, dont l'homme, le cerveau est le second site de synthèse de l'apoE après le foie (Elshourabgy et al, 1985). Les astrocytes sont les principales cellules de production de l'apoE dans le cerveau (Boyles et al, 1985; Pitas et al, 1987). Dans le LCR, les lipoprotéines contenant l'apoE sont des particules de type HDL contenant d'autres apolipoprotéines (A-I, A-IV, D, J) (Pitas et al, 1987; Borghini et al, 1994). Dans le cerveau, le cholestérol semble être synthétisé localement (Edmond et al, 1991; Juvernics et Morell, 1995), ce qui suggère une implication importante de l'apoE dans l'homéostasie du cholestérol au niveau du SNC (Pitas et al, 1987; Borghini et al, 1994). Contrairement au compartiment plasmatique où les lipoprotéines contenant de l'apoB (VLDL and LDL) sont également impliquées dans le transport du cholestérol, dans le LCR seules les lipoprotéines contenant l'apoE possèdent les propriétés de se lier aux récepteurs des LDL et de participer au transport du cholestérol par la voie des récepteurs.

D'autre part, la synthèse de l'apoE augmente après les lésions et les dommages cellulaires des neurones périphériques (Snipes et al, 1986) et centraux (Poirier et al, 1991). Le cholestérol non estérifié libéré après les lésions est estérifié et transporté par l'apoE vers les neurones en cours de réinnervation et sera capté par la voie des LDLR afin de servir de précurseur aux nouvelles terminaisons synaptiques (Poirier et al, 1993).

2.5.3 Place des apolipoprotéines E dans la maladie d'Alzheimer

De nombreuses études biologiques, épidémiologiques et génétiques ont établi le lien étroit unissant le polymorphisme de l'apoE à la MA et le rôle central probable que pourrait jouer cette apolipoprotéine dans la physiopathologie de la maladie.

L'équipe de Namba (1991) est la première à montrer par une méthode immunohistochimique la présence de l'apoE aux côtés de la protéine amyloïde A β dans les plaques séniles extracellulaires et les vaisseaux sanguins cérébraux ainsi que dans les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) des patients atteints de MA. Une interaction forte entre apoE et A β été démontrée et des complexes apoE-A β sont trouvés dans le LCR (Strittmatter et al, 1993). L'équipe de Rebeck (1993) confirme la présence de l'apoE et du récepteur LRP dans les plaques séniles des malades. Enfin, le niveau de transcription de l'ARNm de l'apoE dans le cerveau et en particulier dans les astrocytes est augmenté chez les malades (Yamada et al, 1995; Diedrich et al, 1991).

D'autres études indiquent que le rôle de l'apoE dans la MA semble lié à son polymorphisme. Les malades porteurs de l'allèle ϵ 4 ont davantage de plaques séniles et la densité des dépôts d'A β dans leurs plaques séniles et leurs vaisseaux cérébraux est plus grande (Rebeck et al, 1993; Schmechel et al, 1993; Berr et al, 1994).

L'équipe de Strittmatter et Roses a montré le lien entre le polymorphisme de l'apoE et la protéine tau, composant principal des DNF, qui est sous forme hyperphosphorylée dans la MA: la protéine tau non

phosphorylée se lie davantage à l'apoE3 qu'à l'apoE4 alors que ni l'apoE4 ni l'apoE3 ne se lie à tau phosphorylée (Strittmatter et al, 1994).

Le rôle probablement important joué par le polymorphisme de l'apoE dans la physiopathologie de la MA est confirmé par les études épidémiologiques. Roses et ses collaborateurs (Strittmatter et al, 1993) ont été les premiers à montrer une association statistiquement significative entre la MA familiale et la présence de l'allèle $\epsilon 4$. De nombreuses autres équipes, dont celle d'Amouyel ont également trouvé cette association (Amouyel et al, 1993). La fréquence des différents allèles varie suivant les études (variations géographiques et techniques) et l'expression de la maladie (familiale ou sporadique). La fréquence moyenne de l'allèle $\epsilon 4$ est de 0,37 (0,24-0,52) en cas de MA sporadique à début tardif contre 0,16 (0,12-0,2) pour les témoins. Le risque de développer la MA pour les porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ est 3 à 15 fois plus grand que celui des non-porteurs selon les études. Le risque de voir apparaître une MA augmente de 20 à 90% suivant que l'on a 1 ou 2 allèles $\epsilon 4$. Actuellement, on estime que 65% des MA seraient attribuables à la présence de $\epsilon 4$ (Roses et al, 1995).

2.1 Objectifs et hypothèses de travail

En tant que membre de la famille des lipocalines, l'apoD transporte une ou plusieurs petites molécules hydrophobes variant selon les situations physiologiques. Le gène de l'apoD s'exprime dans de nombreux organes tant périphériques que centraux et cette protéine semble donc être une protéine multifonctionnelle ayant divers rôles locaux selon l'organe. La fonction précise de l'apoD demeure obscure et le but principal de ce projet est de mieux comprendre ce rôle dans un premier temps par une étude moléculaire de la protéine et dans un deuxième temps par une étude de la modulation de son expression dans des situations pathologiques. La démarche expérimentale se résume donc en deux grands volets:

- 1) Étude de la structure-fonction de la protéine et pour cela nous nous proposons:
 - a) établir des anticorps monoclonaux contre l'apoD humaine
 - b) reconnaissance de fragments d'apoD sous forme de protéine de fusion avec la β -galactosidase par les anticorps monoclonaux afin de faire une cartographie des sites antigéniques
 - c) identification de la région de l'apoD responsable de la liaison aux ligands par utilisation des anticorps monoclonaux précédemment cartographiés pour blocage dans un test de liaison apoD-ligand.
 - d) études fonctionnelles pour vérifier l'affinité de plusieurs ligands avec l'apoD

2) Étude de la modulation de l'expression de l'apoD dans des situations pathologiques et pour cela nous proposons:

a) L'expression du gène semble être régulée à plusieurs niveaux et est inductible notamment dans la régénération des nerfs périphériques ou encore lorsqu'il y a une diminution de la prolifération cellulaire. D'autre part, l'expression de l'apoD est importante dans le cerveau et ce chez de nombreuses espèces. Pour ces raisons, nous avons décidé d'étudier l'expression de l'apoD dans une maladie neurodégénérative telle la maladie d'Alzheimer. Pour cela, l'expression de la protéine sera suivie, grâce aux anticorps monoclonaux établis, au niveau de l'hippocampe de patients Alzheimers mais aussi dans le LCR et le niveau d'expression sera comparé par rapport à l'expression retrouvée chez les patients contrôles. Cette étude a pour but de comprendre le rôle de l'apoD dans le cerveau et d'établir des corrélations entre l'expression de l'apoD et l'expression d'autres protéines impliquées dans les maladies neurodégénératives.

b) L'étude de l'expression de l'apoD sera menée en parallèle dans un modèle animal de neurodégénérescence afin de pouvoir faire une étude plus exhaustive de la modulation de l'apoD. Nous avons choisi pour cette partie des travaux, le modèle animal chez le rat ECL où les caractéristiques de neurodégénérescence suite à une lésion dans le cortex enthorinal, sont bien connues et publiées. Cette étude se fera à plusieurs niveaux, soit:

-étude de l'expression de l'apoD à plusieurs temps après la lésion et ce tant au niveau du messager que de la protéine

-localisation immunohistochimique de l'apoD chez le rat ECL à différents temps post-lésion

c) Enfin, étant donné le rôle de l'apoE dans les neurodégénérescences, nous nous proposons d'étudier l'expression de l'apoD chez des souris déficientes pour le gène de l'apoE afin d'établir une corrélation entre l'absence de l'apoE et une modulation de l'expression de l'apoD ce qui suggèrerait un mécanisme compensatoire.

Ces travaux devraient permettre une meilleure compréhension des fonctions de l'apoD dans une situation pathologique précise et les études de structure-fonction par les anticorps devraient permettre d'identifier d'une part, un ligand physiologique de l'apoD ainsi que son affinité et d'autres parts les résidus importants dans la liaison de l'apoD avec son ou ses ligands physiologiques. Ces informations nous permettront de cibler de façon plus précise les implications biologiques de cette protéine.

CHAPITRE II

Structure-function relationships of human apolipoprotein D: an immunochemical analysis

Laurence Terrisse¹, Karine Marcoux¹, Louise Brissette¹, Ross Milne² and Eric Rassart¹ *

¹ Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal,
Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8

² Lipoprotein and Atherosclerosis Research Group, University of Ottawa Heart Institute,
40 Ruskin St. , Ottawa, Ontario, Canada, K1Y 4W79

* Corresponding author. Dép. des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8. Fax: (1)(514) 987-4647.

ABSTRACT

Apolipoprotein (apo) D is a 169 amino acids glycoprotein found in association with HDL in plasma. We have produced and characterized seven monoclonal antibodies (mAbs) that reacted with human purified apoD as shown by polyacrylamide gel electrophoresis analyses. This new panel of mAbs plus five previous mAbs produced by our group were used to probe the structure-function of apoD. We have identified two major antigenic sites recognized by these mAbs. Antibodies D2, D11 and D12 recognized the same epitope while antibodies D3 to D9 recognized another epitope as determined by competitive studies. The corresponding epitopes were mapped within the apoD primary structure by analyses of the mAbs reactivity with apoD fragments expressed as fusion proteins in bacteria. Monoclonal antibodies D2 and D4 reacted with amino acids 7 to 99 while D3, D5, D7 and D8 reacted with amino acids 99 to 169. Furthermore, mAbs D6 and D9 only reacted with amino acids 129 to 169, whereas mAb D1 recognized all fragments. Finally, we have tested all of the anti-apoD mAbs for their ability to block the binding of apoD to one of its ligands, pregnenolone. None of the anti-apoD mAbs could block the pregnenolone-apoD interaction. We conclude that the mAbs recognizes a conformational epitope that includes residues from both the amino terminal and carboxy terminal regions of apoD, but these mAbs could not be used to identify functional domains of apoD.

INTRODUCTION

Apolipoprotein D (apoD) is a 29 kDa glycoprotein that was originally identified as a component of high density plasma lipoproteins (HDL) (McConathy et Alaupovic, 1973) and was subsequently shown to be identical to GCDFP-24, a progesterone-binding protein present in high concentration in mammary gross cystic fluid (Balbin et al., 1990). The cloning and sequencing of the human apoD cDNA revealed that the mature protein is composed of 169 amino acids (Drayna et al., 1986). ApoD is considered an atypical apolipoprotein based on its primary structure and tissue distribution (for a review see Milne et al., 1993). ApoD does not show sequence similarities with other exchangeable plasma apolipoproteins and does not possess the characteristic amphipatic α -helical structural motif. Instead, apoD is a lipocalin, a superfamily of proteins that share a conserved tertiary structure whose principal role appears to be the transport of small hydrophobic ligands (Drayna et al., 1986). All members of this protein superfamily are characterized by an eight-stranded β -barrel that forms the ligand binding pocket (Peitsch and Boguski, 1990). ApoD has been shown to bind several small hydrophobic molecules including cholesterol, progesterone, heme-related compounds, arachidonic acid and the major pheromone found in human axillary secretions, 3-methyl-2-hexanoic acid (Boyles et al., 1990b; Lea, 1988; Morais-Cabral et al., 1995; Peistch and Boguski, 1990; Zeng et al., 1996). Whether any or all of these compounds

represent physiological ligands is still unclear. Nevertheless, this potential diversity of ligands suggests that apoD may be a multifunctional protein.

The apoD gene is expressed in many tissues. Amongst the tissues with the highest expression, in both the rhesus monkey (Smith et al., 1990) and rabbit (Provost et al., 1990 et 1991b), are spleen, adrenals, brain and testis. In mice, the highest levels of apoD mRNA were found in the central nervous system (CNS) and particularly in the spinal cord, the cerebellum and the brain (Séguin et al., 1995). The CNS also appears to be the major site of apoD expression in the rat (Boyles et al., 1990b). In most tissues, the apoD transcript was found primarily in interstitial and connective tissue fibroblasts and, in the central nervous system, in glial cells of the white matter, predominantly astrocytes and oligodendrocytes. Patel et al. (1995) have also shown that apoD is constitutively secreted by rat astrocytes. In cultured cell lines, apoD expression appears to be modulated by steroid hormones and/or by cell growth. In both breast carcinoma (Simard et al., 1990) and prostate cancer (Simard et al., 1991) cell lines, apoD expression is up-regulated by androgens and down-regulated by estrogens and is inversely correlated with cell proliferation. In normal human diploid fibroblast cell lines, apoD gene expression is only detected in late passage cells or in cells that undergo growth arrest (Provost et al., 1991a).

Consistent with its diverse functions and tissue distribution, ApoD expression seems to be modulated by various physiological conditions. In rat, apoD accumulates in the regenerating peripheral nerve after crush injury (Boyles et al., 1990a; Spreyer et al., 1990). Moreover, high apoD levels are found in hippocampus of Alzheimer's patients and in cerebrospinal fluid (CSF), apoD level is increased 3 to 4 fold in neurologic diseases such as Alzheimer's disease, vascular dementia or cerebrovascular disease (Terrisse et al., 1998). A recent study (Ong et al., 1997) suggested a role for apoD in neuronal degeneration with kainic acid-induced excitotoxic injury of rat brain wherein the authors have found the specific induction of apoD in hippocampal pyramidal neurons destined for cell death. ApoD mRNA and protein are also up-regulated in the cerebellum of the lysosomal cholesterol deficient storage mouse, an animal model of Niemann-Pick disease (Yoshida et al.) which is phenotypically characterized by chronic progressive neurodegeneration. Thus apoD could have a role in both cellular proliferation and in neural regeneration.

In the present study, we describe the production and characterization of a panel of monoclonal antibodies (mAbs) specific for human apoD. These mAbs were used as probes to investigate apoD conformation and to identify the functional domains of apoD.

METHODOLOGY

1- Production and purification of monoclonal antibodies

All monoclonal antibodies were obtained from the same fusion of spleen from immunized Balb/c mice. All animals received a minimum of 3 intraperitoneal injections of 30 μg of purified human apoD mixed with 100 μg of muramyl peptide adjuvant (Calbiochem) (Milne et al. 1992) at 3 week intervals. Three days before fusion, mice were given a single intravenous injection of 30 μg of antigen without adjuvant. The protocol for the polyethylene glycol-mediated fusion of spleen cells with SP2-O myeloma cells has been described in detail (Milne et al. 1992). The cells were distributed in 1000 microculture wells and hybrid cells were selected in medium containing hypoxanthine, aminopterin and thymidine. At approximately ten days after fusion, culture supernatants were tested for the presence of anti-apoD IgG antibodies by a solid phase immunometric assay (Camato and al, 1989). Briefly, Immulon II Removawells (Dynatech) were coated overnight at room temperature with 50 μl of a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ solution of purified human apoD in 5 mM glycine, pH 9.2. The wells were washed five times with 0.25% Tween 20 in PBS and then saturated with 300 μl of 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 60 minutes at room temperature. This solution was then discarded and the wells were refilled with 50 μl of hybridoma medium which was incubated for two hours. After two hours of incubation, the supernatant was discarded and the wells were washed with Tween-PBS buffer as described

above. Bound apoD antibody was detected by a 2 hour incubation with appropriately diluted ^{125}I -anti-mouse IgG. The wells were washed as before and radioactivity was counted. Positive hybridomas were then cloned by limiting cell dilution and ascites fluid containing antibodies were generated in Balb/c mice by intraperitoneal injection of hybridoma cells. Monoclonality was confirmed using an isotyping kit (Boehringer Mannheim). Antibodies were purified from ascitic fluid by Sepharose Protein G (Pharmacia Biotech) affinity chromatography according to the manufacturer's recommendations.

2-Western blot analysis

500 μl of human mammary cystic fluid was subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under reducing conditions using 12% polyacrylamide gels (Neville,1971). The migrated proteins were electrophoretically transferred to nylon membranes and, after saturation with 3% BSA, the replicas were exposed to appropriately diluted anti-apoD ascites or hybridoma culture supernatant. Bound mAb was detected using ^{125}I -anti-mouse IgG as previously described (Weech et al. 1986).

3- Antibody competition assays

Purified monoclonal antibodies (1 mg) were biotinylated using a protein biotinylation kit (Amersham Life Science) following the manufacturer's recommendations. One hundred microlitres of biotinylated mAb (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and 100 μl of non biotinylated antibody were mixed and added to Immulon II

Removawells (Dynatech) that had been previously coated with 50 μ l of a 1 μ g/ml solution of purified human apoD in 5 mM glycine, pH 9.2 at 4°C for 12 hours as described above. The wells were washed five times with a 0.25% solution of Tween 20 in PBS and 200 μ l of diluted streptavidin-peroxidase (Amersham) in PBS with 3% BSA was added and incubated for 60 minutes at room temperature. This solution was then discarded and the wells were washed with Tween-PBS buffer as before. Finally, 200 μ l of peroxidase substrate was added for 20 minutes at room temperature and results were read at 405 nm.

4-Construction of β -Galactosidase Fusion Proteins

The apoD cDNA was a gift of Dr. Dennis Drayna (formerly at Genentech Inc., South San Francisco CA). The apoD coding sequence was excised from the vector with the enzyme *EcoRI*, purified by electroelution, amplified by PCR and subcloned into the *SmaI* site in the polylinker of the pBluescript vector (Stratagene). This construction was further cleaved with *EcoRI*, *Sau3A*, *HaeIII*, *AluI*, *HincII* or *PstI*. The DNA fragments were separated on an 8% acrylamide gel, eluted, end-filled using deoxyribonucleotides and the Klenow fragment of DNA polymerase I (Pharmacia) and cloned into the appropriate pEX-1, pEX-2 or pEX-3 vector (Boehringer Mannheim) so that the apoD insert was in the correct reading frame with respect to the β -galactosidase coding sequence. The plasmids were used to transform competent POP 2136 *E. coli* cells. Plasmids from ampicillin-resistant clones were purified and the orientation of the insert was determined by cleavage with appropriate restriction endonucleases and the

length of the insert was estimated by electrophoresis on 8% polyacrylamide gels. All positive clones were also confirmed by DNA sequencing using the Sanger technique.

5-Induction of chimeric β -galactosidases proteins

For expression of apoD- β -galactosidase fusion proteins, the selected clones were grown at 33°C for 2-3 h. When the absorbance at 600 nm reached 0.3 - 0.6, transient expression of the fusion proteins was induced by shifting the culture to a temperature of 42°C for 3h. Ten ml of the cell suspension was centrifuged, resuspended in 0.5 ml of 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 75 mM NaCl and 1 mM EDTA and, after addition of 12 μ l of lysozyme (10 mg/ml), the bacteria were incubated at room temperature for 15 minutes. Cells were then subjected to two cycles of freeze, thawing and vortexing followed by the addition of 6 μ l of 1 M MgCl₂ and 50 μ g of DNase I for 20 min at 37°C. The lysate was centrifuged for 30 min at 4°C at 12,000 g. The supernatant was conserved at 4°C and the precipitate resuspended in 500 μ l of 10% SDS. The proteins were subjected to SDS polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes. The nitrocellulose replicas were then probed with anti-apoD mAbs and horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG as described above. In all cases, immunoreactive fusion proteins were found in the precipitate.

6- Ligand binding studies

The ligand-binding assay used was a modified version of that described by Dilley *et al.* (1990). ApoD (25 μg or 1.32×10^{-3} μmole) was first incubated for 4 hours at 4°C under rotation with different antibodies (562.5 μg or 4.0×10^{-3} μmole). Then, ^3H -pregnenolone (Dupont, 2.4×10^{-8} Ci) and non-radioactive (Sigma) pregnenolone were added at a concentration of 1.5×10^{-9} M in a total volume of 800 μl of 10 mM phosphate buffer at pH 7.5. After an overnight incubation at 4°C under rotation, 0.2 ml of a 40% slurry of DEAE-Biogel was added and the binding of apoD was allowed for 2 hours at 4°C under rotation. ApoD was isolated by centrifugation for 10 minutes at 500 g. The supernatant was taken and the pellet was washed two times with 500 μl of ligand binding assay buffer (10 mM phosphate at pH 7.5). The supernatant and the pellet were counted in 10 ml of BCS scintillation fluid (Amersham Life Sciences) with an automatic Wallac 1409 beta counter (Fisher Scientific). A negative control containing pregnenolone without apoD and a positive control containing ^{125}I -apoD and antibodies were run with every ligand-binding assay. The positive control was counted with a Cobra II auto-Gamma counter (Packard-Canberra).

RESULTS

1- Monoclonal antibodies and epitope mapping

Seven hybridomas generated with spleen cells of mice that had been immunized with human apoD were identified that secrete IgG mAbs that bind purified human apoD in a solid phase radioimmunoassay and crossreact on Western blots with a protein having the molecular weight characteristic of apoD (Figure 1). The seven mAbs were called D4, D5, D6, D7, D8, D9 and D10, respectively. In addition to this new panel of anti-apoD mAbs, we have also included 5 previously described anti-apoD mAbs in this study (Weech et al. 1986). For consistency, we have renamed previously described mAbs: 2B9 (D1), 5G10 (D2), 4E11 (D3), 2G12 (D11) and 5H6 (D12). Most of the new mAbs detect two immunoreactive bands in purified preparations of apoD, as do the mAbs in the previously described panel (Weech et al. 1986) (example : D11). Antibody D10 appears to be unique in reacting only with the larger of the two proteins. This heterogeneity could result from different levels of glycosylation, proteolysis or the presence of apoD heterodimers that are resistant to the reducing conditions used for electrophoresis (Weech et al. 1986). The hybridomas were recloned by limiting dilution and the subclones were used to raise ascites in Balb/c mice. The immunoglobulin isotypes were determined serologically and it was shown that mAbs D7 and D9 were of the IgG1 subclass and mAbs D4, D5, D6, D8 and D10 belonged to the IgG2a subclass. It had previously been determined that

D2, D11 and D12 were IgG1 antibodies whereas D1 and D3 were of the IgG2a subclass (Weech et al. 1986).

To define more precisely the epitopes recognized by the 12 anti-apoD mAbs, we measured the reactivity of each mAb with apoD- β -galactosidase fusion proteins expressed in *E. Coli* vectors. In all cases, cDNA fragments encoding truncated apoD peptides were cloned into pEX vectors in frame with the coding sequence of β -galactosidase. All constructs were verified by restriction enzyme analysis and DNA sequencing. The mAbs were tested for reactivity with apoD fusion proteins that had been subjected to SDS polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes. Autoradiograms obtained with two of the mAbs are shown in Figure 2 and a summary of the reactivities of all the mAbs is presented in the lower panel. Antibodies D2 and D4 reacted with fusion proteins that include apoD residues 7-78 and 7-99 as well as full-length apoD but not with fusion proteins that included sequences from the carboxy terminus of apoD. Antibodies D3, D5, D7 and D8 recognized an epitope that was present on fusion proteins that contained apoD residues 99-169 and 128-169, respectively. Two other mAbs, D6 and D9, also recognized the apoD residue 128-169 fusion protein but not the longer protein that included apoD residues 99-169. The reason for the lack of reactivity with the longer protein is not apparent but we have observed a similar phenomenon during the mapping of anti-apoB mAbs using apoB- β -galactosidase fusion proteins (Pease et al. 1990). Antibody D1 was unique in showing reactivity with the four apoD fusion proteins.

To establish the topology of epitopes on native apoD, all of the anti-apoD mAbs were tested for their respective abilities to compete with their biotinylated homologues for binding to immobilized apoD. The competition curves that were obtained for two antibodies are shown in Figure 3. Our results show that mAb D2 does not compete with biotinylated mAb D9, but D2 does compete with mAb D11, mAb D6 does not compete with biotinylated mAb D2, but does compete with mAb D3, D4 and D9.

Finally, we tested all of the anti-apoD mAbs for their ability to block the binding of apoD to one of its ligands, pregnenolone. It has previously been reported that pregnenolone binds to apoD with a K_a of 1.32×10^6 L/mol. Purified apoD was incubated with a molar excess of anti-apoD IgG before addition of ^3H -pregnenolone. After an overnight incubation, free pregnenolone was separated from protein-bound pregnenolone by ion exchange batch chromatography (Dilley et al, 1990). Each mAb was tested at two different ligand concentrations, in at least three separate experiments. The ligand concentrations were based on Scatchard analysis of the binding of ^3H -pregnenolone to pure apoD (not shown). As can be seen in Figure 4, none of the anti-apoD mAbs nor polyclonal anti-apoD IgGs (caro) could block the pregnenolone-apoD interaction. As bound endogenous ligand (e.g. progesterone) could be co-purified with apoD from mammary cystic fluid, we have compared the binding properties of purified apoD and purified apoD that had been subjected to delipidation. Delipidation of the

apoD changed neither its ligand-binding properties nor the ability of the antibodies to modulate binding of pregnenolone to apoD (not shown).

DISCUSSION

The physiological function of apoD has not yet been established. However, by analogy to other members of the lipocalin family, it is probable that one role of apoD could be to bind and transport one or more small hydrophobic ligands. Models of apoD tertiary structure have been proposed in which apoD adopts an anti-parallel β -barrel conformation with an internal hydrophobic pocket that would serve as the ligand-binding site. In addition to this putative ligand-binding site, apoD likely possesses other functional domains that are directly implicated in its physiological function. Again by analogy to other lipocalins, apoD may be a ligand for an apoD- or lipocalin-specific cell surface receptor. Flower (1995) recently showed that members of the lipocalin family demonstrate a particular structural fold that suggests that both ends and sides of the barrel are topologically distinct and proposed that there is a functional dichotomy between the two ends of the lipocalin fold. The structurally invariant end of the molecule may be implicated in general binding to common cell surface receptors or other proteins while the more variable end that includes the hydrophobic pocket would be adapted to the specialized task of binding small ligands. In human plasma, apoD is found primarily associated with HDL and would presumably possess a site that is responsible for binding to the lipoprotein surface either through interaction with lipids or apolipoproteins. Finally, proteolytic activity has been associated with purified apoD. It is unclear if this

activity is intrinsic to apoD or results from a physically associated or contaminating protease.

In order to test the proposed model of apoD tertiary structure and to define functionally important sites in apoD, we have generated and characterized a panel of anti-apoD mAbs. Their respective pattern of reactivity with a series of apoD fragments expressed as β -galactosidase fusion proteins allowed us to map the epitopes recognized by the mAbs within the apoD primary structure as shown in figure 2. Two of the mAbs, D2 and D4 react with epitopes situated between residues 7 and 78, while five of the mAbs, D3, D5, D7, D8, and D9 react with epitopes localized between residues 128 and 169. Antibody D1 is unique in that it reacts with all four apoD fusion proteins. As fusion proteins β gal-apoD₇₋₇₈ and β gal-apoD₇₋₉₉ do not contain apoD sequences that overlap with those included in fusion proteins β gal-apoD₉₉₋₁₆₉ and β gal-apoD₁₂₈₋₁₆₉, it is probable that the mAb recognizes a conformational epitope that includes residues from both the amino terminal and carboxy terminal regions of apoD. Anti-human apoA-I- (Marcel et al. 1991) and anti-apoB- (Pease et al., 1989; Young et al. 1992) specific monoclonal antibodies that recognize epitopes that are assembled from non-contiguous segments of primary structure have also been reported to react with two or more non-overlapping fragments of their respective antigens. Given the compact β -barrel structure of apoD, it is probable that some mAbs in this panel are in fact specific for discontinuous conformational epitopes.

The extensive cross-competition amongst the mAbs for binding to immobilized apoD can also be attributed to the compact structure of the antigen. Antibody D4, specific for an epitope between residues 7-78, competes with antibodies that are specific for epitopes between residues 128-169. From the crystal structure of antigen-antibody complexes, it has been shown that up to 17 residues of the antigen can be in contact with residues of the antibody combining site and that the antibody footprint can represent up to 800 \AA^2 of the antigen surface. There are several sites in the proposed model of apoD tertiary structure where residues from these two regions are in close enough proximity to account for both the antibody competition results and the reactivity of mAb D1 with non-overlapping apoD- β -galactosidase fusion proteins (Figure 5). Residues 126-130, 27-31 and 157-159, respectively, represent adjacent strands within the β -barrel structure and are, therefore, in spatial proximity. The side chains of residues 64-66 that form a β -turn are predicted to be within 7 \AA of the side chains of residues 164-169 that compose the carboxy terminus. Furthermore, it was predicted in the model of apoD tertiary structure, and subsequently demonstrated experimentally (Yang et al. 1994), that cysteine residues 44 and 165 form a disulfide bond.

Based on the proposed model of apoD tertiary structure, an antibody would not have access to the putative ligand-binding pocket of apoD that is predicted to have dimensions of $x = 14 \text{ \AA}$, $y = 5 \text{ \AA}$, $z = 14 \text{ \AA}$ (Peitsch and

Boguski,1990). Nevertheless, antibodies specific for an epitope that includes residues that constitute the entrance to the binding pocket could potentially limit access of apoD ligands. Neither the anti-apoD mAbs nor a polyclonal anti-apoD antiserum could block the binding of pregnenolone to apoD. It has been observed that residues that form the open end of the β -barrel of lipocalins are often responsible for protein-protein interactions (Flower, 1995). In the case of apoD, there are numerous solvent-exposed hydrophobic residues within the two major loops at the entrance to the β -barrel. It has been proposed that these residues could participate in the association of apoD with the HDL surface and that the entrance to the ligand-binding pocket would be close to the lipoprotein particle (Peitsch and Boguski,1990). When not bound to the lipoprotein surface, the exposed hydrophobic residues could cause homo- or hetero-dimer formation. Self-association of lipid-free purified apoD may in fact occur as we have observed that a single immobilized mAb could immunoprecipitate only 25% of 125 I-apoD and that this could be increased to 50% when certain combinations of anti-apoD mAbs were used (data not shown). Therefore, the regions of apoD that form the entrance to the binding pocket may be poorly immunogenic due to their relative inaccessibility in the native protein or due to a high homology between human apoD and its murine homologue. Based on the location of the epitopes within the apoD primary sequence and on the cross-competition between the antibodies for binding to apoD, it is probable that the mAbs recognize conformational epitopes composed of residues whose side chains are exposed on the external surface of the base and sides of the β -barrel.

Here, we have characterized a panel of 12 anti-human apoD mAbs and their respective epitopes have been mapped to restricted regions within the apoD primary structure. We are presently attempting to obtain a more precise epitope map using both apoD synthetic peptides and shorter fragments of apoD expressed in *E. coli*. The mAbs are presently being used to identify functional domains of apoD including the sites that are responsible for the association with lipoproteins and, potentially, with cell surface receptors and to determine the mechanism responsible for the proteolytic activity that has been attributed to apoD.

REFERENCES

- Balbin, M, Freije, J.M.P., Fueyo, A., Sanchez, L.M. and Lopez-Otin, C., Apolipoprotein D is the major protein component in cyst fluid from women with human breast gross cystic disease, *Biochem. J.*, 271 (1990) 803-807.
- Boyles, J.K., Notterpek, L.M. and Anderson L.J., Accumulation apolipoproteins in the regenerating and remyelinating mammalian peripheral nerve. Identification of apolipoprotein D, apolipoprotein A-IV, apolipoprotein E and apolipoprotein A-I, *J. Biol. Chem.*, 265 (1990a) 17805-17815.
- Boyles, J.K., Notterpek, L.M., Wardell, M.R. and Rall Jr., S.C., Identification, characterization, and tissue distribution of apolipoprotein D in the rat, *J. Lipid Res.*, 31 (1990b) 2243-2256.
- Cabral, J.H.M., Atkins, G.L., Sanchez, L.M., Lopez-Boado, Y.S., Lopez-Otin, C. and Sawyer, L., Arachidonic acid binds to apolipoprotein D: implications for the protein's function, *FEBS Lett.*, 366 (1995) 53-56.
- Camato, R., Marcel, Y.L., Milne, R.W., Lussier-Cacan, S. and Weech, P.K., Protein polymorphism of a human plasma apolipoprotein D antigenic epitope. *J. Lipid Res.*, 30 (1989) 865-875.

Curtiss, L. and Banka, C., Selection of monoclonal antibodies for linear epitopes of an apolipoprotein yield antibodies with comparable affinity for lipid-free and lipid associated apolipoprotein, *J. Lipid Res.*, 37 (1996).

Dilley, W.G., Haagensen, D.E., Cox, C.E. and Wells S.A.Jr., Immunologic and steroid binding properties of the GCDFP-24 protein isolated from human gross cystic disease fluid, *Breast Cancer Res. Treat.*, 16 (1990) 253-260.

Drayna, D., Fielding, C., McClean, J., Baer, B., Castro, G., Chen, E., Comstock, L., Henzel, W., Kohr, W., Rhee, L., Wion, K. and Lawn, R., Cloning and expression of human apolipoprotein D cDNA, *J. Biol. Chem.*, 261 (1986) 16535-16539.

Drayna, D., McLean, J.W., Wion, K.L., Trent, J.M., Drabkin, H.A. and Lawn, R.M., Human apolipoprotein D gene: gene sequence, chromosome localization, and homology to the α_{2m} -globulin superfamily, *DNA*, 6 (1987) 199-204.

Flower, D., The lipocalin protein family: structure and function, *Biochem.J.*, 318 (1996) 1-14.

Flower, D., Multiple Molecular Recognition Properties of the Lipocalin Protein Family, *J. Molec. Recogn.*, 8 (1995) 185-195.

Guex, N. and Peitsch, M.C., SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18 (1997) 2714-2723.

Lea, O.A., 1988. Binding properties of progesterone-binding cyst protein, PBCP, *Steroids*, 52: 337-338.

Marcel, Y., Provost, P., Koa, H., Raffai, E., Vu Dac, N., Fruchart, J-C. et Rassart, É., The epitopes of apolipoprotein A-I define distinct structural domains including a mobile middle region, *The J. Biol. Chem.*, 266:6 (1991) 3644-3653.

Massamiri, T., Tobias, P. and Curtiss, L., Structural determinants for the interaction of lipopolysaccharide binding protein with purified high density lipoproteins: role of apolipoprotein A-I, *J.Lipid Res.*, 38 (1997) 516-525.

McConathy, W. and Alaupovic, P., Isolation and partial characterization of apolipoprotein D: a new protein moiety of the human plasma lipoprotein system, *FEBS Lett.*, 37 (1973) 178-182.

McConathy, W. and Alaupovic, P., Studies on the isolation partial characterization of apolipoprotein D and lipoprotein D of human plasma, *Biochemistry*, 15 (1976) 515-520.

Milne, R.W., Rassart, E. and Marcel, Y., 1993. Molecular biology of apolipoprotein D, *Current Opinion in Lipidology*, 4: 100-106.

Neville, D.M., (1971) Molecular weight determination of protein dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. *J. Biol. Chem.* 246, 6328-6334

Ong, W.Y., He, Y., Suresh, S. and Patel, S.C., Differential expression of apolipoprotein D and apolipoprotein E in the kainic acid-lesioned rat hippocampus, *Neuroscience*, 79:2, (1997) 359-367.

Patel, S.C., Asotra, K., Patel, Y., McConathy, W.J., Patel, R.C. and Suresh, S., Astrocytes synthesize and secrete the lipophilic ligand carrier apolipoprotein D, *NeuroReport*, 6 (1995) 653-657.

Peitsch, M.C. and Boguski, M.S., Is apolipoprotein D a mammalian Bilin-Binding Protein?, *The New Biologist*, 2:2 (1989) 197-206.

Provost, P.R., Marcel, Y.L., Milne, R.W., Weech, P.K. and Rassart, É., Apolipoprotein D transcription occurs specifically in nonproliferating quiescent and senescent fibroblast cultures, *FEBS Lett.*, 290 (1991a) 139-141.

Provost, P.R., Villeneuve, L., Weech, P.K., Milne, R.W., Marcel, Y.L. and Rassart, É., Localization of the major sites of rabbit apolipoprotein D gene transcription by *in situ* hybridization, *J. Lipid Res.*, 32 (1991b) 1959-1970.

Provost, P.R., Weech, P.K., Tremblay, N.M., Marcel, Y.L. and Rassart, É., Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of rabbit apolipoprotein D, *J. Lipid Res.*, 31 (1990) 2057-2065.

Raffaï, R., Maurice, R., Weisgraber, K., Innerarity, T., Wang, X., MacKenzie, R., Himara, T., Watson, D., Rassart, É. and Milne, R., Molecular characterization of two monoclonal antibodies specific for the LDL receptor-binding site of human apolipoprotein E, *J. Lipid Res.*, 36 (1995) 1905-1918.

Roy, P., MacKenzie, R., Hiramata, T., Jiang, X., Kussie, P., Tall, A., Rassart, É. and Milne, R., Structure-function relationships of human cholesteryl ester transfer protein: analysis using monoclonal antibodies, *J. Lipid Res.*, 37 (1996) 22-34.

Sayle, R.A., and Milner-White, E.J., RASMOL: biomolecular graphics for all. *Trends Biochem. Sci.* 20, 374-376 (1995).

Séguin, D., Desforges, M. and Rassart, É., Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of mouse apolipoprotein D, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 30 (1995) 242-250.

Simard, J., Veilleux, R., de Launoit, Y., Haagensen, D.E. and Labrie, F., Stimulation of apolipoprotein D secretion by steroids coincides with inhibition of cell proliferation in human LNCaP prostate cancer cells, *Cancer Res.*, 51 (1991) 4336-4341.

Simard, J., Dauvois, S., Haagensen, D.E., Levesque, C., Merand, Y. and Labrie, F., Regulation of progesterone-binding breast cyst protein GCDFP-24 secretion by estrogens and androgens in human breast cancer cells: a new marker of steroid action in breast cancer, *Endocrinology*, 126 (1990) 3223-31.

Simard, J.; de Launoit, Y.; Haagensen, D.E.; Labrie, F., Additive stimulatory action of glucocorticoids and androgens on basal and estrogen-repressed apolipoprotein-D messenger ribonucleic acid levels and secretion in human breast cancer cells, *Endocrinology*, 130 (1992) 1115-21.

Smith, K.M., Lawn, R.M. and Wilcox, J.N., Cellular localization of apolipoprotein D and lecithin:cholesterol acyltransferase mRNA in rhesus monkey tissues by *in situ* hybridization, *J. Lipid Res.*, 31 (1990) 995-1004.

Spreyer, P., Schaal, H., Kuhn, G., Rothe, T., Unterbeck, A., Oleck, K. and Muller, H.W., Regeneration-associated high levels expression of apolipoprotein D mRNA in endoneurial fibroblasts of peripheral nerve, *EMBO J.*, 9 (1990) 2479-2484.

Terrisse, L., Poirier, J., Bertrand, P., Merched, A., Siest, G., Milne, R.W. and Rassart, E., Increased levels of apolipoprotein D in cerebrospinal fluid and hippocampus of Alzheimer's patients, *J. Neurochem.*, 71:4 (1998).

Weech, P.K., Camato, R., Milne, R.W. and Marcel, Y.L. (1986) Apolipoprotein D and Cross-reacting Human Plasma Apolipoproteins Identified using Monoclonal Antibodies. *J. Biol. Chem.* 261: 7941-7951.

Yang, C.Y., Gu, Z.W., Blanco-Vaca, F., Gaskell, S.J., Yang, M., Massey, J., Gotto, A.M. and Pownall, H.J., 1994. Structure of human apolipoprotein D : locations of the intermolecular and intramolecular disulfide links. *Biochemistry* 33: 12451-12455.

Yoshida, K., Cleaveland, E., Nagle, J., French, S., Yasmen, L., Oshima, T., Brady, R., Pentchev, P. and Kulkarni, A., Molecular cloning of the mouse Apolipoprotein D gene and its upregulation expression in Niemann-Pick Disease type C mouse model, *DNA and Cell Biology*, 15:10 (1996) 873-882.

Zeng, C., Spielman, A., Vowels, B., Leyden, J., Biemann, K. et Preti, G., 1996. A human axillary odorant is carried by apolipoprotein D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6626-6630.

Figure legends

Figure 1: Immunodetection of apoD with anti-apoD mAbs. Purified apoD was subjected to SDS-PAGE, electrophoretically transferred to nylon membranes and detected by sequential incubations with anti-apoD hybridoma supernatants and ^{125}I -anti-mouse IgG. Lanes N1 and N2 were exposed to supernatants from hybridomas that secrete non-apoD-specific IgG.

Figure 2: Reactivity of mAbs with fragments of apoD expressed as β -galactosidase fusion proteins. Bacterial cell extracts containing the fusion proteins were subjected to SDS polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes and were then tested for immunoreactivity with the different mAbs. This figure shows autoradiograms for mAbs D2 and D1. The lower panel summarizes of the reactivities of all of the anti-apoD mAbs with apoD- β -galactosidase fusion proteins.

Figure 3: Antibodies were biotinylated and tested for binding to a solid phase apoD in the presence or absence of competing unlabeled antibodies. Serial dilutions of apoD mAbs were incubated with unlabeled antibody in microwells to which apoD had been absorbed. The wells were washed and then exposed to streptavidin-peroxidase. After incubation, the wells were washed and peroxidase substrate was added. The results are expressed as observed OD in

the presence of competing unlabeled antibody as a percent of OD observed in the absence of competing unlabeled antibody.

Figure 4: Inhibition of apoD ligand binding activity by mAbs. Purified apoD was preincubated for 3 hours with an excess of mAb. ^3H -Pregnenolone was then added for 18 hours at 4°C and, bound and free ligand were separated as described in Materials and Methods. Non-specific binding of pregnenolone to ApoD was determined using an excess of unlabeled pregnenolone.

Figure 5: Model of apoD tertiary structure. Atomic coordinates for apoD were based on the model described in Peitsch et al. (1990) which were obtained from the Brookhaven Protein Data Bank (identification code 1APD). In panel A, the molecule is presented in a cartoon form (RASMOL) (Sayle, R.A., and Milner-White, E.J.,1995) and in panel B, residues 7-78 and 128-169 are presented as a stick model (Swiss Pdb Viewer) (Guex, N. and Peitsch, M.C.,1997). The orientation of the molecule is the same in both panels, residues 7-78 are shown in yellow and residues 128-169 are shown in green. Inter-residue distances were estimated using the Swiss Pdb Viewer.

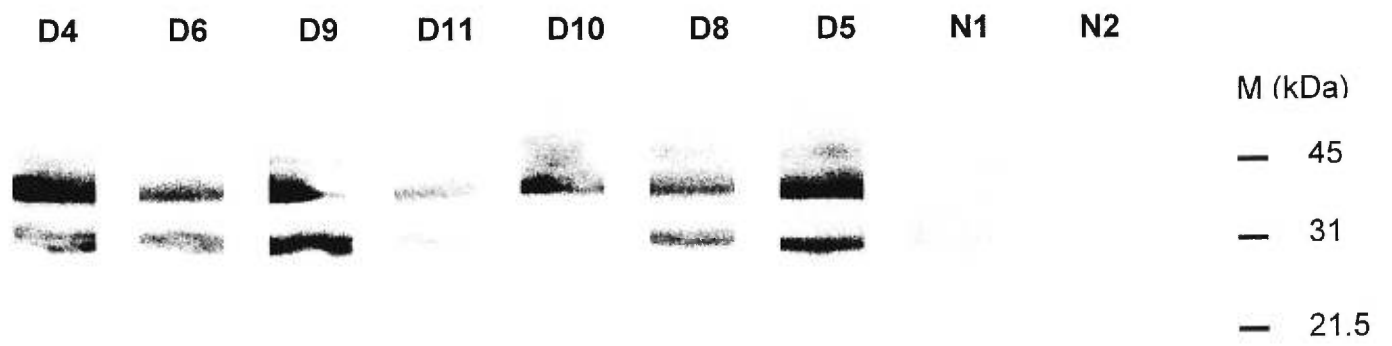


Figure 2.1: Immunodetection of apoD with anti-apoD mAbs

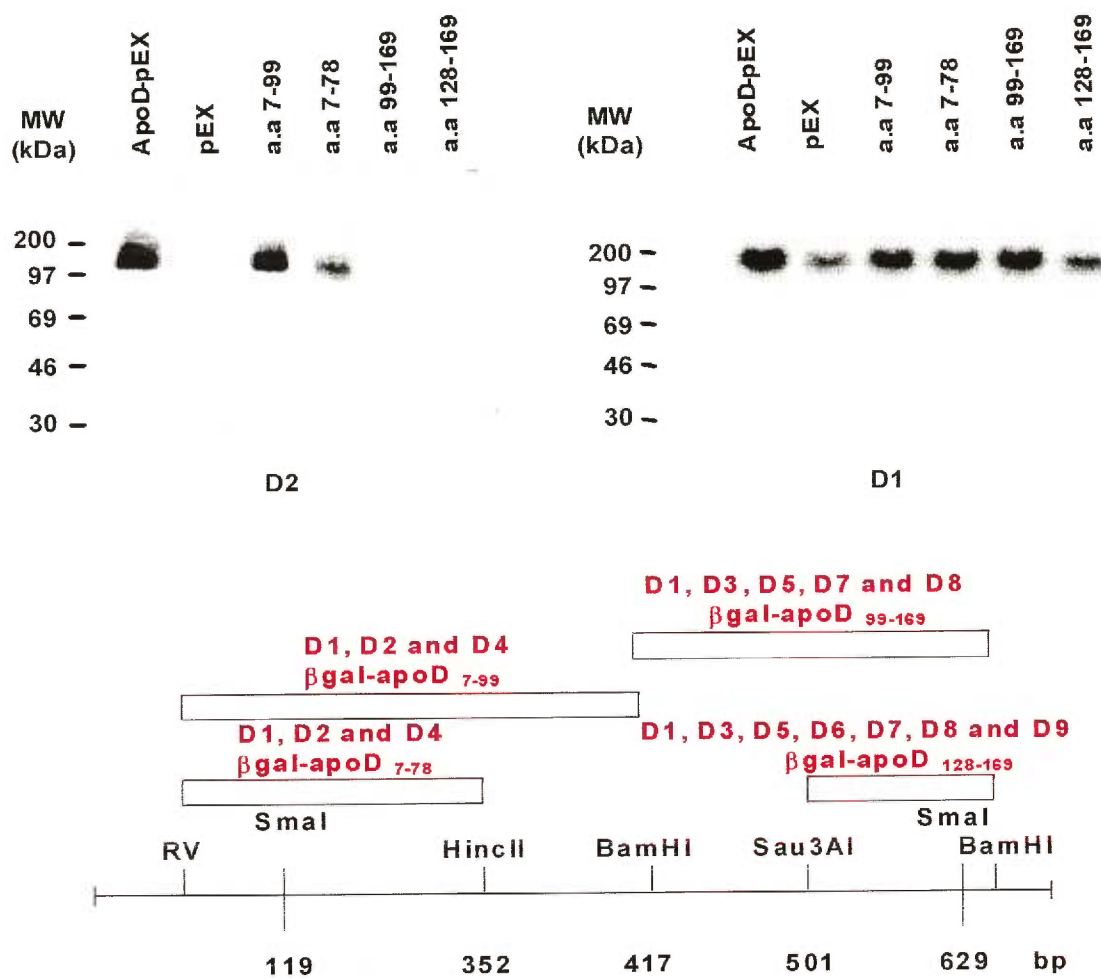


Figure 2.2: Reactivity of mAbs with fragments of apoD expressed as β -galactosidase fusion proteins

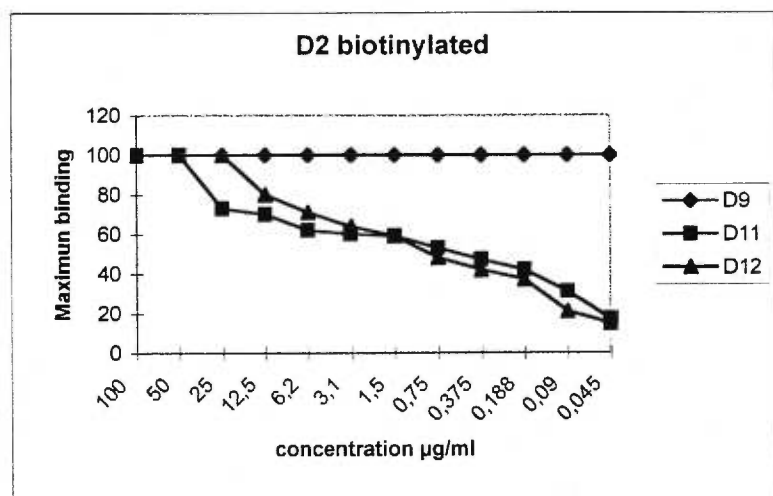
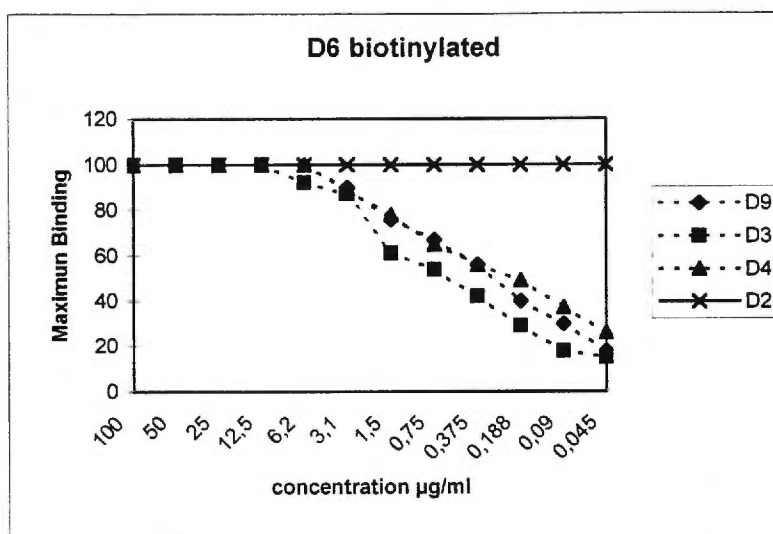


Figure 2.3: Competition studies of biotinylated antibodies with solid phase apoD in the presence of competing non-biotinylated antibodies.

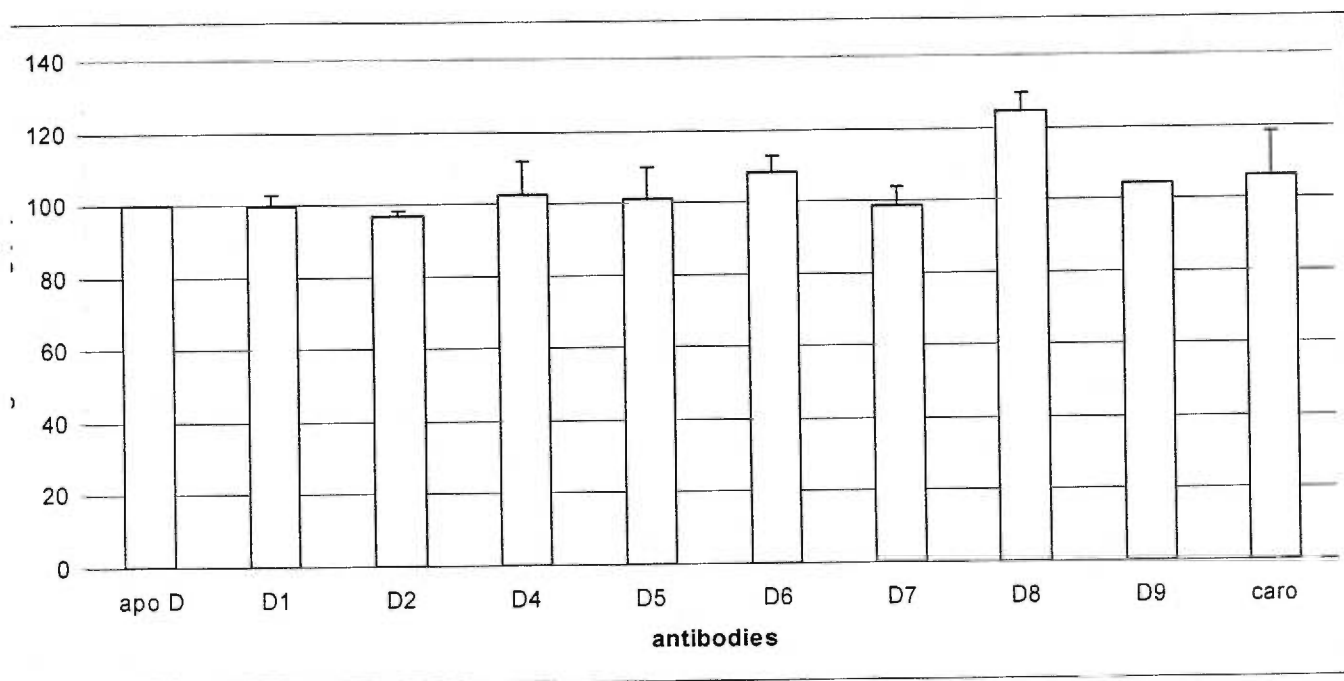


Figure 2.4 : Inhibition of apoD ligand binding activity by mAbs

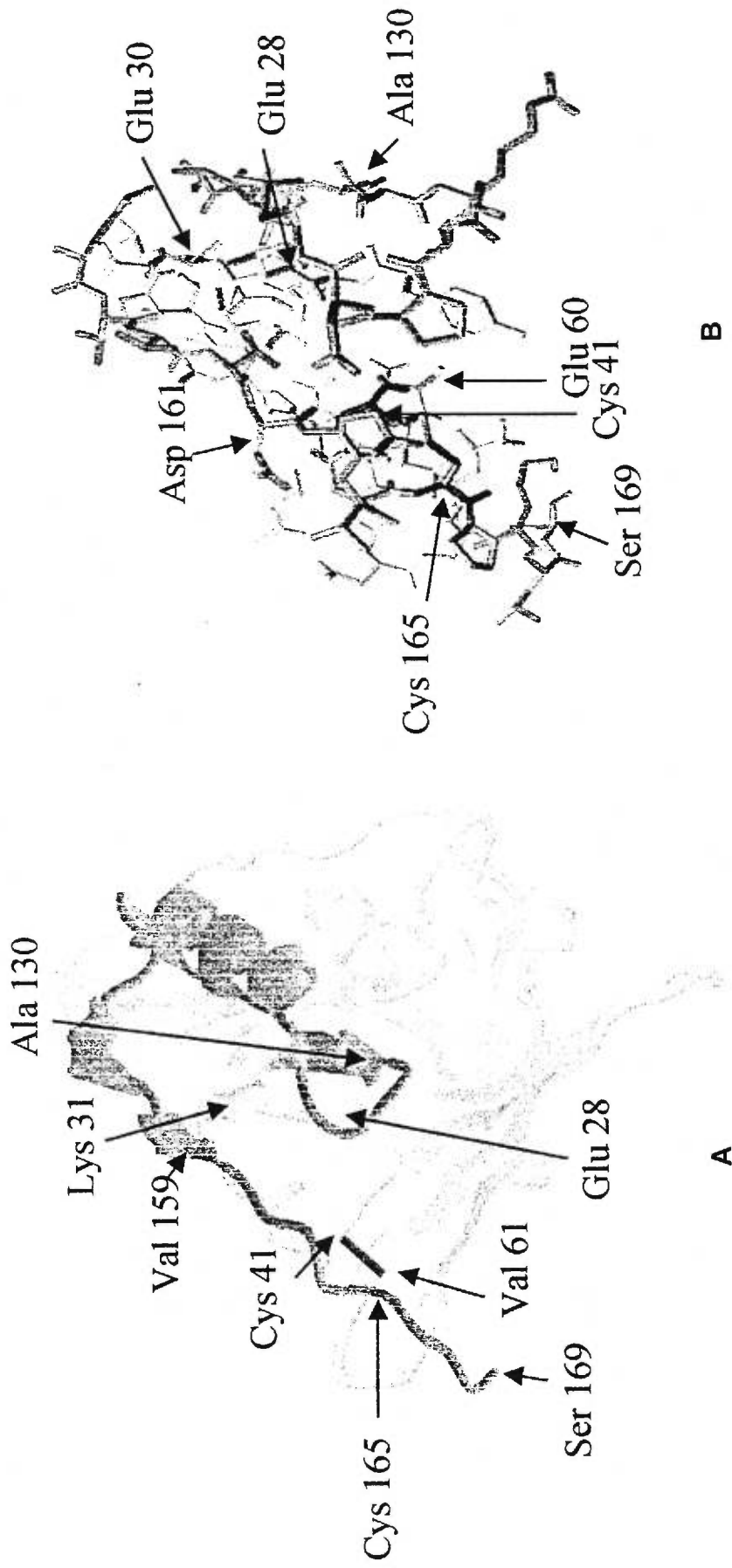


Figure 2.5 : Modélisation de la structure tertiaire de l'apoD

CHAPITRE III

INCREASED LEVELS OF APOLIPOPROTEIN D IN CEREBROSPINAL
FLUID AND HIPPOCAMPUS OF ALZHEIMER'S PATIENTS.

Terrisse L.^a, Poirier J.^b, Bertrand P.^b, Merched A.^c, Visvikis S.^c, Siest G.^c, Milne R.^d, and Rassart, E.^a

^a Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal, Qué., Canada, H3C-3P8

^b Douglas Hospital Research Centre, Centre for Studies in Aging, McGill University, Montréal, Qué., Canada, H4H 1R3

^c Centre de Medecine Préventive, URA-CNRS 597, 2 rue du Doyen Jacques Parisot, F-54501 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

^d Lipoproteins and Atherosclerosis Group, University of Ottawa Heart Institute, 1053 Carling Av., Ottawa, Ontario, Canada, K1Y 4E9

Corresponding author : Dr. Éric Rassart

Département des sciences biologiques,
Université du Québec à Montréal, Montréal,
Qué., Canada, H3C 3P8
Tél.: (514) 987-3000 ext.3953
Fax: (514) 987-4647
Email : rassart.eric@uqam.ca

L.Terrisse et al., J. of Neurochem., vol.71, no4, 1998

ABSTRACT

Apolipoprotein (apo) D is a member of the lipocalin family of proteins. Most members of this family are transporters of small hydrophobic ligands, although in the case of apoD, neither its physiological function(s) nor its putative ligand(s) have been unequivocally identified. In humans, apoD is expressed in a number of tissues, including the central nervous system, and its synthesis is greatly increased during regeneration of rat peripheral nerves. As apoD may have an important function in the nervous system and, particularly, in nerve regeneration, we measured immunoreactive apoD levels in the hippocampus and in cerebrospinal fluid (CSF) of patients with either Alzheimer's disease (AD) or other neuropathologies. In parallel, we determined the concentrations of apoE, another apolipoprotein also implicated in nerve regeneration and in the etiology of AD. ApoD but not apoE, was increased in the hippocampus of AD patients compared to controls. ApoD concentrations, as determined by radioimmunoassay, were significantly increased in the CSF of AD patients ($4.23 \mu\text{g} / \text{ml} \pm 1.58$) and patients with other pathologies ($3.29 \mu\text{g} / \text{ml} \pm 1.35$) compared to those in the CSF of normal subjects ($1.15 \mu\text{g} / \text{ml} \pm 0.71$). Although the differences were smaller than for apoD, the mean apoE concentrations in the CSF of both groups of patients were also significantly higher than those of controls. In AD patients, apoD, but not apoE, levels in CSF and hippocampus increased as a function of inheritance of the $\epsilon 4$ apoE allele. This study therefore demonstrates that increased apoD levels in the hippocampus and in CSF are a

marker of neuropathology, including that associated with AD, and are independent of apoE concentrations.

Keywords: Alzheimer's disease, ApolipoproteinD, ApolipoproteinE, Neurodisorders, Neurodegeneration, Nerve Regeneration

Running title : Increased levels of apolipoprotein D in Alzheimers

INTRODUCTION

Apolipoprotein D (apoD) is a 169 amino acid glycoprotein of apparent Mr 29,000 that was originally identified (McConathy and Alaupovic, 1973) as a component of high density plasma lipoproteins (HDL). ApoD is a member of the lipocalins, a superfamily of proteins (Drayna et al, 1986) that are involved in the transport of small hydrophobic ligands (Peitsch and Boguski, 1989). As a member of the lipocalin family, ApoD, adopts an 8-stranded β -barrel tertiary structure that distinguishes it from the other exchangeable plasma apolipoproteins whose tertiary structure is dominated by amphipathic α -helices. The first candidate ligand proposed for apoD was cholesterol since the protein is associated with HDL and forms an active complex with lecithin:cholesterol acyl transferase (LCAT), the enzyme responsible for the esterification of cholesterol in plasma (Steyer and Kostner, 1988). ApoD was subsequently shown to be identical to GCDFP-24, a progesterone-binding protein present in high concentration in mammary gross cystic fluid (Balbin et al, 1990). In addition to progesterone, apoD can bind pregnenolone (Dilley et al, 1990, Pearlman et al, 1973) and bilirubin (Peitsch and Boguski, 1989). ApoD has also been shown to bind with high affinity arachidonic acid (Cabral et al, 1995), a precursor to prostaglandins which are specific modulators in the brain (Matsuo et al., 1995). Whether any or all of these molecules represent physiological ligands of apoD remains to be proven.

Unlike most other apolipoproteins, which are predominantly synthesized in the liver and the intestinal epithelium, apoD is widely expressed in many different tissues. In humans, apoD mRNA is detected at different levels in almost all the tissues examined (Provost et al, 1990). In the rabbit, the major sites of expression were the spleen, adrenals, lung, brain and male genital tissues (Provost et al, 1990; 1991b). Using *in situ* hybridization techniques, apoD gene expression was found mainly in interstitial and connective tissue fibroblasts in the monkey (Smith et al, 1990) and rabbit (Provost et al, 1991b). In the rabbit central nervous system (CNS), the major cell type was glial cells of the white matter, mostly astrocytes and oligodendrocytes. Our group (Séguin et al, 1995) also analyzed the distribution of apoD mRNA in mouse and rat organs and expression was essentially restricted to the CNS with very high levels in the spinal cord, the cerebellum and the brain. From studies on cell lines, it was shown that cultured human fibroblasts express apoD only when in a growth arrested state (Provost et al, 1991a). In human breast carcinoma and prostatic cancer cell lines, apoD expression is up-regulated by androgens (Simard et al, 1990) and retinoic acid (Lopez-Boado et al, 1994) and down-regulated by estrogens (Simard et al, 1992). Also, Patel et al (1995) showed that apoD is constitutively secreted by rat astrocytes, associated with other lipids and its secretion is stimulated by 25-hydroxycholesterol.

ApoD mRNA and immunoreactive apoD protein levels increase 40 and 500 times, respectively, in rat peripheral nervous tissue after experimental injury (Boyles et al, 1989; Spreyer et al, 1990). Other apolipoproteins, apoE, apoA-I and apoA-IV also accumulate at the site of regeneration (Boyles et al, 1990) but only in the case of apoD and apoE is the increase attributable to local synthesis. Although apoE is thought to play a role in lipid redistribution after neuronal injury (Mahley,1988), peripheral nerve regeneration is not impaired in apoE (Popko et al, 1993) or in apoE/apoA-I knockout mice (Goodrum et al, 1995). Thus, neither apolipoprotein appears to be essential for peripheral nerve regeneration and other apolipoproteins may be involved in the recycling of myelin cholesterol. However, in the mouse CNS, apoE was shown to be important and its absence resulted in defective reinnervation (Masliah et al,1995).

ApoE is a 299 amino acid protein that exists as 3 common isoforms, apoE2, apoE3 and apoE4 encoded by 3 co-dominantly expressed alleles (Mahley,1988). ApoE genetic polymorphism is associated with susceptibility to Alzheimer's disease (AD). ApoE4 is considered to be a susceptibility allele that both increases the risk of AD and lowers the age of its onset (Saunders et al,1993; Strittmatter et al, 1993). In contrast, apoE2 appears to be protective and is associated with a lower risk of AD and an increase in the age of onset (Roses et al,1995). In addition to the genetic association between apoE polymorphism and susceptibility to AD, immunoreactive apoE can be observed within the neurofibrillary tangles and β -amyloid proteins in

the senile plaques in the brains of AD patients. Until recently, apoE seemed unique among the apolipoproteins in that it had special relevance to nervous tissue. It is synthesized in astrocytes and oligodendrocytes and plays an important role in redistribution of lipids and in growth and maintenance of neuronal membranes after injury (Mahley,1988). In spite of a lack of similarity in structure, apoD and apoE share a number of common properties including their tissue distribution and the increase in their local synthesis following nerve injury. Like apoE, apoD could therefore have an important role in the nervous system and the two apolipoproteins may have coordinated functions in both normal and pathological situations, including that of AD.

We have measured apoD and apoE levels in cerebrospinal fluid (CSF) and hippocampal tissue of AD patients and patients with other neuropathologies. Our results show a large increase of apoD concentration in the CSF of patients with AD or with other neuropathologies.

MATERIALS AND METHODS

Patient populations, CSF and hippocampus collection and determination of apoE genotype

ApoD and apoE concentrations were determined in the CSF of 41 patients with AD (75.4 ± 9.9 years), 11 subjects without the presence of any confirmed neuropsychiatric disease (control group, 67.4 ± 11 years) and 29 patients with other neurological diseases including cerebrovascular disease, motorneuron disease and meningoencephalitis (64.3 ± 13 years). The CSF samples were obtained (at the Centre de Médecine Préventive, Vandoeuvre-lès-Nancy, France) by routine lumbar puncture once informed consent was obtained from each patient. The samples were analyzed for protein and stored in 0.2 ml aliquots at -196°C . The clinical diagnosis of probable AD was established using criteria of the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (Merched et al., 1996). Patients without AD and control subjects had a Mini Mental State Score of Folstein higher than 28. Patients with AD had a Mini-Mental State score of Folstein lower than 25. The control group was composed of subjects on whom lumbar puncture had been performed for diagnosis of fever or staging of lymphoma. These subjects had normal CSF cytology and chemistry. DNA was isolated from nucleated blood cells by the technique of Miller (Miller et al., 1988). ApoE genotypes were determined at the Centre de Médecine Préventive by Hha1 digestion of PCR amplified fragments

spanning the apoE polymorphic sites (Hixson and Vernier,1990) as described (Merched et al.,1996).

Human hippocampal tissue from 72 AD patients and from 35 control subjects were obtained from Dr. Carol Miller (University of Southern California, School of Medicine) of the Alzheimer Disease Research Consortium of LA and Orange Counties. Frozen tissues from autopsy confirmed caucasian cases of sporadic AD: females (n =9, age=79 \pm 2 years), post-mortem delays (PMD) = 5.2 \pm 1 h.; males (n=13, age = 80 \pm 1 year, PMD = 4.5 \pm 0.7 h.). Controls were: females (n = 5, age = 67 \pm 4 years, PMD = 11 \pm 2.7 h.) and males (n = 10, age = 54 \pm 5 years. PMD = 8.5 \pm 1h.) as described (Strittmatter et al., 1993). Genomic DNA was isolated from frozen frontal cortex and apoE genotype was determined by PCR using allele-specific primers according to Nalbantoglu et al., (1994).

Electrophoresis and immunoblotting

Hippocampal tissue was dissected and frozen at -80 °c until used and was then homogenized in KPO₄ 10mM - KCl buffer (pH 7.4). Samples (15 μ g protein) were subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under reducing and non-reducing conditions using 12% acrylamide gels (Neville,1971). The migrated proteins were electrophoretically transferred to nylon membranes and, after saturation with 3% bovine serum albumin (BSA), the replicas were exposed to the anti-human apoD

monoclonal antibody, 2B9 on one replica (Camato et al, 1989; Weech et al, 1986) or the anti-human apoE monoclonal antibody, 3H1 on another replica (Weisgraber et al, 1986). The concentration used for 2B9 was 2.3 mg/ml and for 3H1 was 0.538 ng/ml. The appropriate dilutions of antibodies had been determined in previous titration experiments and were 1/20000 for 2B9 and 1/1000 for 4H1. Bound monoclonal antibody was detected by an anti-mouse IgG-horseradish peroxidase conjugate using the ECL detection system (Amersham).

Radioimmunometric assay

ApoD was quantified in CSF by a solid phase competitive immunometric assay using the anti-apoD monoclonal antibody 2B9 as was previously described (Camato et al, 1989). Immulon II Removawells (Dynatech) were coated overnight at room temperature with 50 μ l of a 1 μ g / ml solution of purified human apoD in 5mM glycine, pH 9.2. The wells were washed five times with 0.25% Tween 20 in PBS and then saturated with 300 μ l of 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 60 minutes at room temperature. This solution was then discarded and the wells were refilled with 100 μ l of a mixture of antibody and test CSF. The appropriate dilution of 2B9 antibody had been determined in previous titration experiments. To make the mixture of test CSF and antibody, equal volumes of diluted antibody and diluted CSF were mixed. All dilutions were made in 1% BSA. The mixtures were incubated overnight at 4°C before addition to the saturated apoD-coated wells. After a two-hour incubation at room

temperature, the contents were discarded and the wells were washed again with Tween-PBS buffer. Bound 2B9 antibody was detected by a 2-hour incubation with appropriately diluted ^{125}I -anti-mouse IgG. The wells were washed as before and radioactivity was counted. The assay was calibrated using pure apoD as the standard.

Statistical analysis

Statistical differences between the CSF and hippocampal levels of the apolipoproteins between the clinical group and the control group were evaluated using an analysis of variance and a multiple comparison test on the least-squares means.

RESULTS

Tissue extracts of hippocampus (Figure 1A) or CSF (Figure 1B) from AD patients, from patients with other neuropathologies or from control subjects were analyzed by Western blotting for the presence of immunoreactive apoD and apoE. These were age-matched subjects and the apoE2, E3, E4 genotypes are indicated above each sample. Both apolipoproteins were detected in all hippocampal extracts and in most CSF samples. ApoD seemed generally more abundant in both hippocampus and CSF of AD patients when compared to the age-matched control, although the concentration of apoE showed considerable variation. The bands representing apoD and apoE in hippocampal extracts of 72 AD patients and 35 controls were quantified by densitometry and the results are shown in figure 2A. ApoD levels in the hippocampal extracts from AD patients were significantly higher ($p < 0.005$) than those in extracts prepared from control subjects. As some studies have reported apolipoprotein variations in the CSF of patients with neuropathologies, we have measured apoD and apoE levels in the CSF of AD patients. This was done by an accurate radioimmunoassay and the results are shown in figure 2B. The apoD levels in the CSF of AD patients ($4.23 \mu\text{g} / \text{ml} \pm 1.58$) were 3 to 4 fold higher ($p < 0.0001$) than those of normal subjects ($1.15 \mu\text{g} / \text{ml} \pm 0.71$). Also, the apoD levels in the CSF of patients with other neuropathologies ($3.29 \mu\text{g} / \text{ml} \pm 1.35$) were also significantly higher ($p < 0.0001$) than those of normal subjects. This suggests that the increased concentration of apoD in the CSF is not restricted to AD since it is also increased in several different neuropathologies including cerebrovascular

disease, motorneuron disease and meningoencephalitis. Although the differences were less significant than those observed for apoD, apoE concentrations were also higher in the CSF of AD patients and of patients with other neuropathologies than in the CSF of normal subjects ($p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively). Since the inheritance of an E4 allele is a risk factor in AD, we determined if apoD concentration varied as a function of the apoE genotype within our patients and control groups. Both apoD and apoE levels in hippocampal extracts and in CSF of AD patients and normal controls were further analyzed in terms of the apoE genotype of the subjects. Interestingly, the apoD concentrations in hippocampal extracts from AD patients with the E3/E3, E3/E4 and E4/E4 genotypes were significantly ($p = 0.001$) higher than those of control subjects of the corresponding genotype (Figure 3A). More impressive, however, was the correlation between the concentration of apoD in the CSF of AD patients and the apoE genotype shown in Figure 4A. Indeed, the apoD concentration in the CSF of E4/E4 AD patients ($5.8 \mu\text{g} / \text{ml} \pm 0.73$) was significantly higher than that of E3/E4 AD patients ($4.78 \mu\text{g} / \text{ml} \pm 0.6$) which, in turn, was significantly higher than that of E3/E3 AD patients ($3.05 \mu\text{g} / \text{ml} \pm 0.19$). No differences were seen in the apoD levels in the CSF of control subjects as a function of apoE genotype (Figure 4A). In contrast, apoE levels in hippocampal extracts (Figure 3B) and in CSF (Figure 4B) of AD patients and controls appeared to be independent of the apoE genotype.

Since the group of AD patients was significantly older than the control group, it is possible that the higher apoD and apoE levels could reflect age differences between the groups. However, as shown in Figure 5, neither apoD nor apoE concentrations in the CSF of AD patients or control subjects were correlated with age. Moreover, no differences were observed in the apoD or apoE levels in CSF between males and females for any of the subject groups (not shown).

DISCUSSION

We demonstrate here that apoD concentrations are increased by 60% and 350% in the hippocampus and in the CSF, respectively, of patients with AD when compared to those of normal subjects. Moreover, elevated apoD levels in the CSF are not restricted to AD patients as we have also observed a 3-fold increase in apoD concentration in the CSF of subjects with a variety of other neuropathologies. Although the differences were less significant than those observed for apoD, apoE levels were also significantly higher in the CSF of AD patients ($p < 0.001$) and in patients with other neuropathologies ($p < 0.05$) than in the CSF of control subjects. In other studies, apoE concentrations in the CSF of AD subjects have been reported to be higher (Carlsson et al, 1991; Ikeda et al, 1993), comparable (Pirtilla et al, 1994) or lower (Blennow et al, 1994; Lehtimäki et al, 1995) than those of control subjects. Increased CSF apoE levels have been reported in a number of other neuropathologies including Creutzfeldt-Jacob disease (Amouyel et al, 1994; Namba et al, 1991), Scrapie disease (Diedrich et al, 1991) and Lewy body disease (St-Clair et al, 1994).

While no correlation between apoD and apoE levels was observed in our study, the apoD concentration in CSF of AD patients appeared to be influenced by the apoE genotype. Inheritance of an apoE4 allele was correlated, in a dose dependent manner, with increased apoD concentrations in CSF of AD patients (Figure 4). As the age of onset of the disease and the density of senile plaques in the cortex of AD patients (Zubenko et al, 1994) are negatively and positively

correlated, respectively, with the number of inherited apoE4 alleles, the increased apoD levels in the CSF of AD patients with one or more apoE4 alleles may be a reflection of the severity of the disease. However, when the AD group was characterized by their Mini Mental State Score and separated into two groups according to the evolution of the pathology, no correlation ($p < 0.3$) was found between the severity of the AD and apoD concentration in the CSF. Furthermore, one could expect that, as the disease progresses, apoD levels should increase with age. Our results in figure 5 show, however, that apoD concentration in the CSF is not correlated with age in either the AD patients or the controls subject. In contrast to apoD, the apoE levels in the CSF of AD subjects appear to be independent of the apoE genotype, with a trend towards lower apoE levels in patients who have inherited an apoE4 allele.

Senile plaques, amyloid deposition, formation of paired helical filaments and neurofibrillary tangles are all manifestations of AD. Seniles plaques contained deposits of the β -amyloid peptide (Wisniewski et al,1993) and it has been shown that apoE4 binds with high affinity to this peptide (Strittmatter et al,1993). Also, the density of β -amyloid deposits increased in the E3/E4 patients when compared to the E3/E3 patients (Wisniewski et al,1993). The apoD increase that we observed with the presence of E4 allele could be interpreted as a compensatory mechanism in presence of less efficient apoE. It would be interesting to perform an immunocytochemical study of cortical regions of AD

brain to verify whether apoD levels are higher in neurofibrillary tangles than in senile plaques, in contrast to apoE.

It is possible that the observed elevations in apoD levels in both the CSF and the hippocampus of patients with AD and other neuropathologies, and the increased apoD observed following experimental peripheral nerve injury (Spreyer et al,1990) may be a response to a common stimulus and apoD could be playing a similar role in the two situations. ApoE is thought to be involved in lipid redistribution during axon degeneration and regeneration. ApoE can form complexes with lipids and, as a ligand for cell surface receptors, it can mediate the cellular uptake of lipid particles (Weisgraber,1994). This is unlikely to be the role of apoD. In contrast to apoE, apoD does not have a typical exchangeable apolipoprotein tertiary structure and, although it is predominantly associated with high density lipoproteins in the plasma, it is not expected to be efficient in mobilizing lipids. Moreover, no cell surface receptor for apoD has been identified. Nevertheless, apoD could be playing an accessory role in lipid redistribution such as stabilizing the enzyme lecithin cholesterol acyl transferase (Steyer and Kostner, 1988). However, since apoD is a member of the lipocalin superfamily, it seems more likely that apoD would transport a small hydrophobic ligand essential in high concentration in pathological situations. Indeed, we found acute phase regulatory elements in the human apoD promoter region (Lambert et al,1993). Both pregnenolone and progesterone, which bind apoD with high affinity, are present in the brain (Mathur et al,1993). Exogenous progesterone, as well as 25-hydroxycholesterol, both stimulate secretion of apoD

by rat astrocytes (Patel et al,1995), suggesting that steroids hormones released during cell injury or death in the brains of patients with AD or other neuropathologies could be a stimulus for apoD expression. Such an increase in apoD production has also been reported recently in kainic acid-lesioned rat hippocampus (Ong et al, 1997). The increase appeared as early as the first day after kainic acid treatment supporting a possible role for apoD as an acute phase protein.

Based on the distribution of cells that express apoD within the CNS, Smith et al. (1990) have proposed that apoD may facilitate the transport of cholesterol across the blood-brain barrier. In AD or in other pathologies of the CNS, an increased requirement for such transport could certainly be envisaged. However, apoD has a relatively low affinity for cholesterol (Dilley et al,1990). Moreover, no differences were observed in plasma apoD levels between AD patients and normal subjects (unpublished results). In the CSF, apoD represented as much as 1% of the total protein content of AD subjects. In subjects with other neuropathologies, it accounted for 0.9% of CSF protein and 0.35% in normal subjects. In the plasma, while apoD concentrations were much higher than those found in CSF, they contributed only to 0.15% of total plasma protein (Camato et al,1989). While we cannot exclude a pathology-associated increase in selective transfer of apoD across the blood-brain barrier in the patients, given the known tissue distribution of apoD gene expression in primates, it is probable that the increased levels of apoD present in the CSF and

in the tissue samples from patients are the result of an increase in local synthesis.

As apoD gene expression has been shown to be associated with growth arrest (Provost et al, 1991a) in cultured human fibroblasts and in several other cell lines, it is possible that the increase in apoD in CSF and hippocampus of patients having pathologies of the CNS could represent a relatively non-specific response to cell injury or death. However, in the case of peripheral nerve injury, apoD expression does not seem to be associated with cell death. After a crush injury of rat sciatic nerve, there is a moderate increase in apoD expression that appears to be the result of the experimental lesion. This, however, is followed by an up-regulation of apoD gene expression that is restricted to sites undergoing regeneration. One would therefore presume that apoD is playing some specific role in peripheral nerve regeneration and possibly CNS maintenance and repair. Within the CNS of patients with neuropathology, the increase in immunoreactive apoD could be indicative of ongoing reinnervation rather than cell injury and death. If so, increased apoD expression in AD could be linked to the ability of apoD to function as a transporter of sterols, steroids, arachidonic acid or a still unidentified ligand in the brain that is implicated in tissue repair following injury.

Whatever the role of apoD may be in the CNS, the present study clearly demonstrates that an increased concentration of apoD in the CSF is a good marker of neuropathology including that associated with AD.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Jeandel for the gift of CSF samples, the hospital Douglas brain Bank for hippocampal samples, Doris Dea and Louise Falstreault for their excellent technical assistance. We gratefully acknowledge support from the Medical Research Council of Canada (Grant MT-9880).

REFERENCES

Amouyel, P., Vidal, O., Launay, J.M. and Laplanche, J.L. (1994) The apolipoprotein E alleles as major susceptibility factors for Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* **344**, 1315-1318.

Balbin, M., Freije, J.M., Fueyo, A., Sanchez, L. and Lopez-Otin, C. (1990) Apolipoprotein D is the major protein component in cyst fluid from women with human breast cystic disease. *Biochem.J.* **271**, 803-807.

Blennow, K., Hesse, C., and Freeman, P. (1994) Cerebrospinal fluid apolipoprotein E is Reduced in Alzheimer's disease. *Neuroreport* **5**, 2534-2536.

Boyles, J. K., Zoellner, C.D., Anderson, L.J., Kosik, L.M., Pitas, R.E., Weisgraber, K.H., Hui, D.Y., Mahley, R.W., Gebicke-Haerter, P.J., Ignatus, M.J. and Shooter, E.M. (1989) A Role for Apolipoprotein E, Apolipoprotein A-I, and Low Density Lipoprotein Receptors in Cholesterol Transport during Regeneration and Remyelination of the Rat Sciatic Nerve. *J. Clin. Invest.* **83**, 1015-1031.

Boyles, J. K., Notterpek, L. M. and Anderson L. J. (1990) Accumulation of apolipoproteins in the regenerating and remyelinating mammalian peripheral nerve. Identification of apolipoprotein D, apolipoprotein A-IV, apolipoprotein E and apolipoprotein A-I. *J. Biol. Chem.*, **265**, 17805-17815.

Cabral, J.H.M., Atkins, G.L., Sanchez, L.M., Lopez-Boado, Y.S., Lopez-Otin, C. and Sawyer, L. (1995) Arachidonic acid binds to apolipoprotein D: implications for the protein's function. *FEBS Lett.*, **366**, 53-56.

Camato, R., Marcel, Y.L., Milne, R.W., Lussier-Cacan, S. and Weech, P.K. (1989) Protein Polymorphism of a Human Plasma Apolipoprotein D Antigenic Epitope. *J. Lipid Res.* **30**, 865-875.

Carlsson, J., Armstrong, V., Reiber, H., Felgenhauer, K., and Seidel, D. , (1991) Clinical relevance of the quantification of apolipoprotein E in cerebrospinal fluid. *Clin. Chim. Acta* **196**, 167-176.

Diedrich, J.F., Minnigan, H. and Carp, R.I. (1991) Neuropathological changes in Scrapie and Alzheimer's disease are associated with increased expression of apolipoprotein E and Cathepsin D in astrocytes. *J. Virol.* **65**, 4759-4768.

Dilley, W.G., Haagensen, D.E., Cox, C.E. and Wells S.A.Jr., (1990) Immunologic and steroid binding properties of the GCDFP-24 protein isolated from human gross cystic disease fluid. *Breast Cancer Res. and Treatment.* **16**, 253-260.

Drayna, D., Fielding, C., McLean, J., Baer, B., Castro, G., Chen, E., Comstock, L., Henzel, W., Kohr, W., Wion, K. and Lawn, R. (1986) Cloning and expression of human apolipoprotein D cDNA. *J. Biol. Chem.* **261**, 16535-16539.

Goodrum, J.F., Bouldin T.W., Zhang, S.H., Maeda, N. and Popko, B. (1995) Nerve Regeneration and Cholesterol Reutilization Occur in the Absence of Apolipoprotein E and A-I in Mice. *J. Neurochem.*, **64**, 408-416

Ikeda, T., Sugiuchi, H., Senba, U., Shibuya, Y., Uji, Y., Okabe, H. and Araki, S. (1993). Preliminary findings on the variation of serum apolipoprotein levels in neural degenerative Disorders. *J. Clin. Lab. Anal.* **7**, 1-4.

Lambert, J., Provost, P., Marcel, Y.L. and Rassart, E. (1993) Structure of the human apolipoprotein D gene promoter region. *Biochim. Biophys. Acta* **1172**, 190-192.

Lehtimaki, T., Pirttila, T., Mehta, P., Wisniewski, H., Frey, H. and Nikkari, T. (1995) Apolipoprotein E polymorphism and its influence on apoE concentrations

in the cerebrospinal fluid in Finnish patients with Alzheimer's disease. *Hum. Genet.* **95**, 39-42.

Lopez-Boado, Y.S., Tolivia, J. and Lopez-Otin, C., (1994) Apolipoprotein D gene induction by retinoic acid is concomitant with growth arrest and cell differentiation in human Breast Cancer cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 26871-26878.

Mahley, R.W. (1988) Apolipoprotein E: Cholesterol Transport Protein with Expanding Role in Cell Biology. *Science* **240**, 622-630.

Masliah, E., Mallory, M., Alford, M., Ge, N and Mucke, L. (1995) Abnormal Synaptic Regeneration in hAPP₆₉₅ Transgenic and APOE Knockout Mice. In *Research Advances in Alzheimer's disease and Related Disorders*, John Wiley and Son, 405-414.

Mathur, C., Prasad, V., Raju, V., Welch, M., and Lieberman, S. (1993) Steroids and their conjugates in the mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 85-88.

Matsuo, M., Hamasaki, Y., Fujiyama, F. and Miyazaki, S. (1995) Eicosanoids are produced by microglia, not by astrocytes, in rat glial cell cultures. *Brain Research* **685**, 201-204.

Merched, A., Blain, H., Visvikis, S., Herbeth, B., Jeandel, C. et Siest, G. (1996) cerebrospinal fluid apolipoprotein E level is increased in late-onset Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sc.*, **5146**, 33-39.

McConathy, W.J., and Alaupovic, P. (1973) Isolation and partial characterization of apolipoprotein D; a new protein moiety of the human plasma lipoprotein system. *FEBS Lett.* **37**, 178-182.

Nalbantoglu, J., Gilfix, B.M., Bertrand, P., Robitaille, Y., Gauthier, S., Rosenblatt, D.S. and Poirier, J. (1994) Predictive value of apolipoprotein E genotyping in Alzheimer's disease: results of an autopsy sery and an analysis of several combined studies. *Ann. Neurol.* **36**, 889-895.

Namba, Y., Tomonaga, M. and Kawasaki, H. (1991) Apolipoprotein E reactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Res.* **541**, 163-166.

Neville, D.M., (1971) Molecular weight determination of protein dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. *J. Biol. Chem.* **246**, 6328-6334

Ong, W.Y., He, Y., Suresh, S. and Patel, S.C. (1997) Differential expression of apolipoprotein D and apolipoprotein E in the kainic acid-lesioned rat hippocampus. *Neuroscience* **79**, 359-367.

Patel, S.C., Asotra, K., Patel, Y., McConathy, W.J., Patel, R.C. and Suresh, S. (1995) Astrocytes synthesize and secrete the lipophilic ligand carrier apolipoprotein D. *NeuroReport* **6** 653-657.

Pearlman, W.H., Gueriguian, J.L. and Sawyer, M.E. (1973) A specific progesterone-binding component of human breast cyst fluid. *J.Biol.Chem.* **248**, 5736-5741.

Peitsch, M.C. and Boguski, M.S., (1989) Is apolipoprotein D a mammalian Bilin-Binding Protein? *The New Biologist* **2**, 197-206.

Pirtilla, T., Mehta, P., Lehtimaki, T., Kim, K., Sersen, E. Frey, H., Nikkari, T. and Wisniewski, H. (1994) Relationship between apolipoprotein E4 allele and CSF amyloid b-protein in Alzheimer's disease and controls. *Neuro. Res. Commun.* **15**, 201-207.

Poirier, J., Davignon, J., Bouthillier, D., Kogan, S., Bertrand, P. and Gauthier, S. (1993) Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer' Disease. *Lancet* **342**, 697-699.

Popko, B., Goodrum, J. F., Bouldin, T. W., Zhang, S. H. and Maeda, N. (1993) Nerve Regeneration Occurs in the Absence of Apolipoprotein E in Mice. *J. Neurochem.* **60**, 1155-1158

Provost, P.R., Weech, P.K., Tremblay, N.M., Marcel, Y.L. and Rassart, E. (1990) Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of rabbit apolipoprotein D. *J. Lipid Res.* **31** 2057-2065.

Provost, P.R., Marcel, Y.L., Milne, R.W., Weech, P.K. and Rassart, E. (1991a) Apolipoprotein D transcription occurs specifically in nonproliferating quiescent and senescent fibroblast cultures. *FEBS Lett.* **290**, 139-141.

Provost, P.R., Villeneuve, L., Weech, P.K., Milne, R.W., Marcel, Y.L. and Rassart, E. (1991b) Localization of the major sites of rabbit apolipoprotein D gene transcription by in situ hybridization. *J. Lipid Res.* **32**, 1959-1970.

Roses, A., Saunders, A., Corder, E., Pericak-Vance, S. , Han, S., Einstein, G., Hulette, C., Schmechel, D., Holsti, M., Huang, D., Risch, N., Haines, J., Goedert, M., Jakes, R., Dong, L., Weisgraber, K. and Strittmatter, W. (1995) Influence of

the susceptibility genes apolipoprotein E4 and apolipoprotein E2 on the rate of disease expressivity of late-onset Alzheimer disease. *Drug Res.* **45**, 413-417.

Saunders, A., Strittmatter, W., Schmechel, D., St. George-Hyslop, P. H., Pericak-Vance, M.A., Joo, S.H., Rosi, B.L., Gusella, J.F., Crapper-MacLachlan, D.R., Alberts, M.J., Hulette, C., Crain, B., Goldgaber, D., and Roses, A.D. (1993) Association of apolipoprotein E allele E4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* **43**, 1467-1472.

Séguin, D., Desforges, M. and Rassart, E. (1995) Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of mouse apolipoprotein D. *Mol. Brain Res.*, **30**, 242-250.

Simard, J., Dauvois, S., Haagen, D.E., Levesque, C., Merand, Y. and Labrie, F. (1990) Regulation of progesterone-binding breast cyst protein GCDPF-24 secretion by estrogens and androgens in human breast cancer cells: a new marker of steroid action in breast cancer. *Endocrinology* **126**, 3223-3231.

Simard, J., de Launoy, Y., Haagen, D.E. and Labrie, F. (1992) Additive stimulatory action of glucocorticoids and androgens on basal and estrogen-repressed apolipoprotein-D messenger ribonucleic acid levels and secretion in human breast cancer cells. *Endocrinology* **130**, 1115-21.

Smith, K., Lawn, R. and Wilcox, J. (1990). Cellular localization of apolipoprotein D and lecithin:cholesterol acyltransferase mRNA in rhesus monkey tissues by in situ hybridization. *J. Lipid Res.* **31**, 995-1004.

Spreyer, P., Schaal, H., Kuhn, G., Rothe, T., Unterbeck, A., Oleck, K. and Muller, H.W. (1990) Regeneration-associated high levels expression of apolipoprotein D mRNA in endoneurial fibroblasts of peripheral nerve. *EMBO J.* **9**, 2479-2484.

St-Clair, D., Norrman, R., Perry, R., Yates, C., Wilcock, G. and Brookes, A. (1994) Apolipoprotein E4 allele frequency in patients with Lewy-body dementia, Alzheimer's disease and age-matched controls. *Neurosc. Lett.* **176**, 45-46.

Steyer, E. and Kostner, K.M. (1988) Activation of lecithin-cholesterol acyltransferase by apolipoprotein D: comparison of proteoliposomes containing apolipoprotein D, A-I or C-I. *Biochim. et Biophys. Acta* **958**, 484-491.

Strittmatter, W., Saunders, A., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S. and Roses, A.D. (1993) Apolipoprotein E: High-avidity binding to β -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer's Disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1977-1988.

Weech, P.K., Camato, R., Milne, R.W. and Marcel, Y.L. (1986) Apolipoprotein D and Cross-reacting Human Plasma Apolipoproteins Identified using Monoclonal Antibodies. *J. Biol. Chem.* **261**, 7941-7951.

Weisgraber, K.H., Rall, S.C., Jr., Mahley, R.W., Milne, R. W., Marcel, Y.L., and Sparrow, J.T., (1986) Human apolipoprotein E: Determination of the heparin binding sites of apolipoprotein E3. *J. Biol. Chem.* **261**, 2068-2076.

Weisgraber, K.H., Pitas, R.E., and Mahley, R.W., (1994) Lipoproteins, neurobiology, and Alzheimer's disease: Structure and function of apolipoprotein E. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 507-515.

Wisniewski, T., Golabeck, A., Matsubara, E., Ghiso, J. and Frangione, B. (1993) Apolipoprotein E: binding to soluble Alzheimer's β -amyloid. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **192**, 359-365.

Zubenko, G., Stiffler, S., Stabler, S., Kopp, U. , Hughues, H., Cohen, B. and Moosy, J. (1994) Association of the apolipoprotein E4 allele with clinical subtypes of autopsy-confirmed Alzheimer's Disease. *Amer. J. Med. Gen.* **54**, 199-205.

Figure legends

Figure 1: Immunodetection of apoD and apoE in hippocampal extracts and CSF of patients with Alzheimer's disease (A or AD), patients with other neuropathologies (OP) and normal subjects (C or CT). Samples were subjected to SDS-PAGE, electrophoretically transferred to nylon membranes and apoD and apoE were sequentially detected with anti-apoD and anti-apoE monoclonal antibodies. The apoE genotype of the subjects is indicated. **A:** Immunoreactive apoD and apoE in hippocampal extracts. For detection of apoD, the membrane was exposed for 30 seconds to peroxidase substrate, and 10 minutes for apoE detection. Each control patient is age-matched with the preceding AD patient. **B:** Immunoreactive apoD and apoE in CSF of patients and controls.

Figure 2: ApoD and apoE levels in CSF and hippocampal extracts from patients with Alzheimer's disease (AD), with other neuropathologies (OP) and from normal subjects (CT). **A:** ApoD and apoE were detected in hippocampal extracts after SDS PAGE as described in the legend to figure 1. The concentrations of the apolipoproteins were estimated by densitometric scanning of the autoradiograms. The values are expressed in relative optical density (R.O.D.) units \pm SEM and were normalized to immunoreactive tubulin whose concentration is not changed in AD. **B:** ApoD and apoE concentrations were measured in the CSF by radioimmunoassays using purified apoD and apo

E, respectively, for calibration. The bars represent mean concentration \pm SEM. (*:p=0.05, **:p=0.01, ***:p=0.005 and ****:p=0.001)

Figure 3: The concentrations of apoD (A) and apoE (B) in hippocampal extracts as a function of the apoE genotype of AD patients (dark bars) and normal subjects (light bars). Data are taken from Figure 2 (*:p=0.05, **:p=0.01, ***:p=0.005 and ****:p=0.001).

Figure 4: The concentrations of apoD (A) and apoE (B) in CSF as a function of the apoE genotype of AD patients (dark bars) and normal subjects (light bars). Data are taken from Figure 2 (*:p=0.05, **:p=0.01, ***:p=0.005 and ****:p=0.001). Since we did not have the genotypes of all 41 patients, we characterized only 30 patients with Alzheimer's disease.

Figure 5: ApoD concentrations in the CSF of AD patients and normal subjects as a function of age. Each point represents the apoD concentration as a function of age for an individual subject.

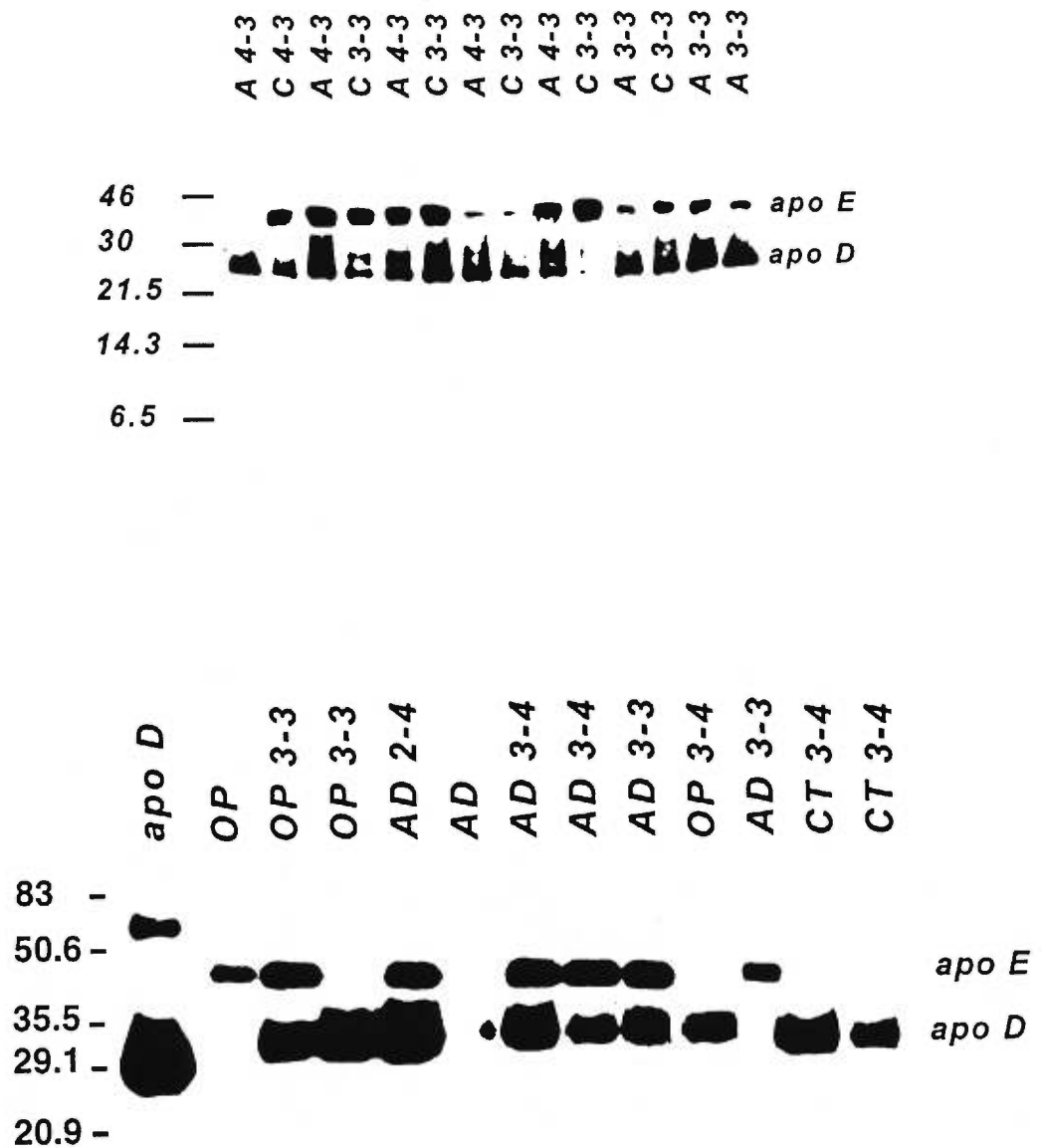


Figure 3.1: Immunodetection of apoD and apoE in hippocampal extracts and CSF of patients with Alzheimer's disease patients with other neuropathologies and normal subjects.

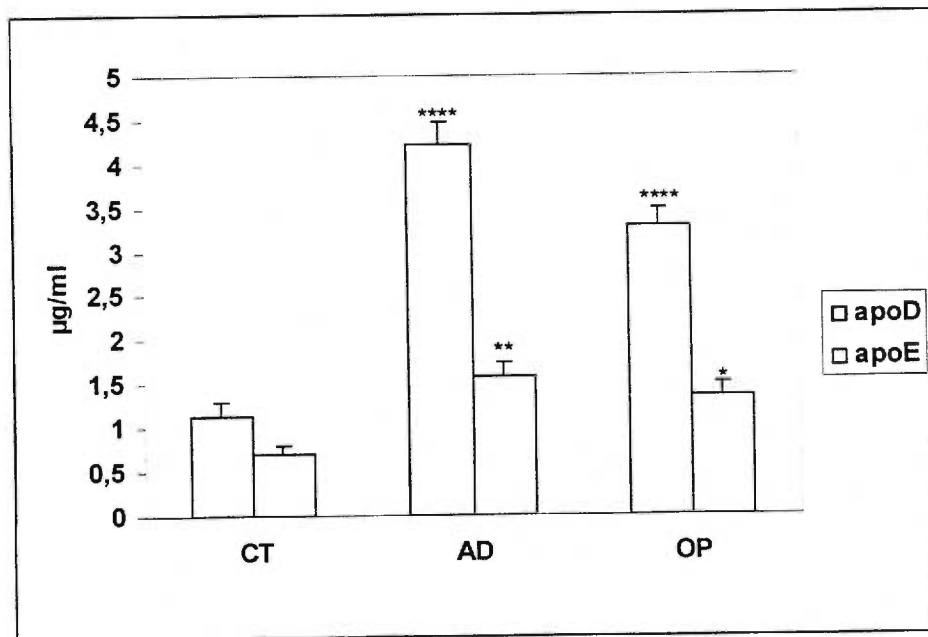
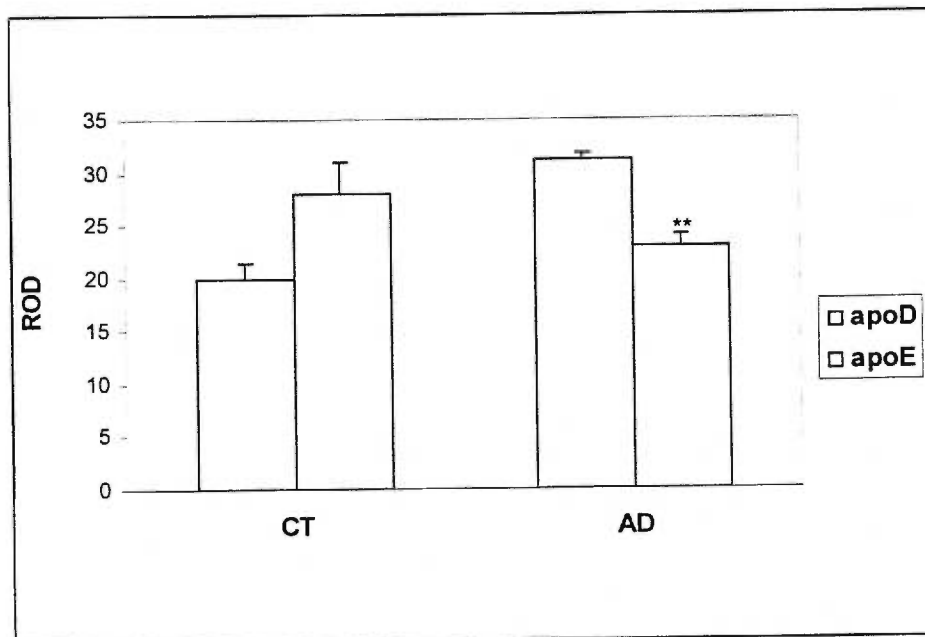


Figure 3.2: Quantification of ApoD and apoE concentrations by radioimmunometric assay (lower panel) or densitometric analyses (upper panel)

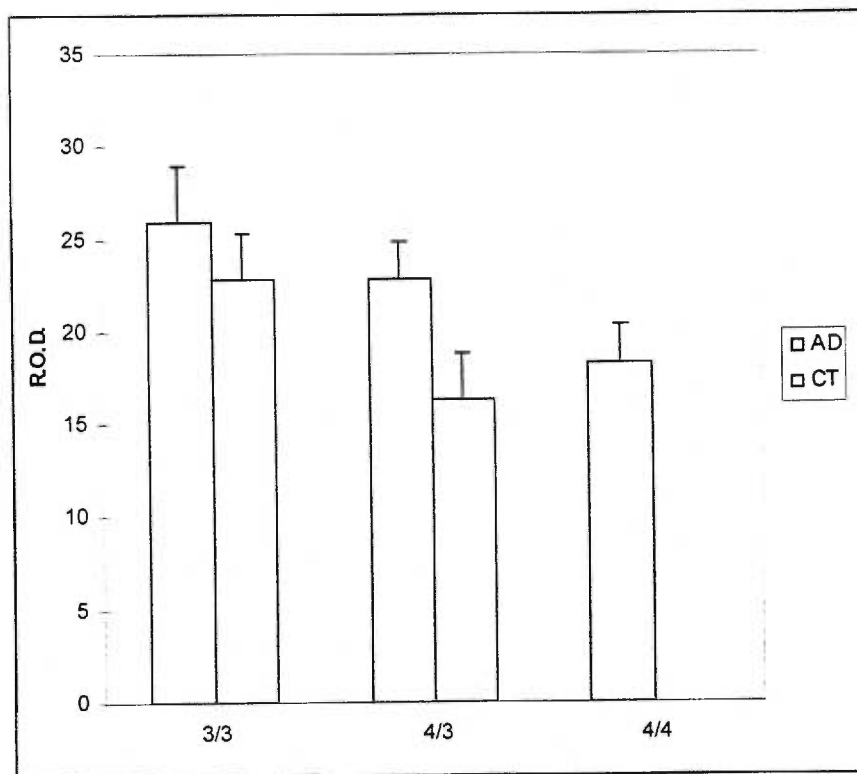
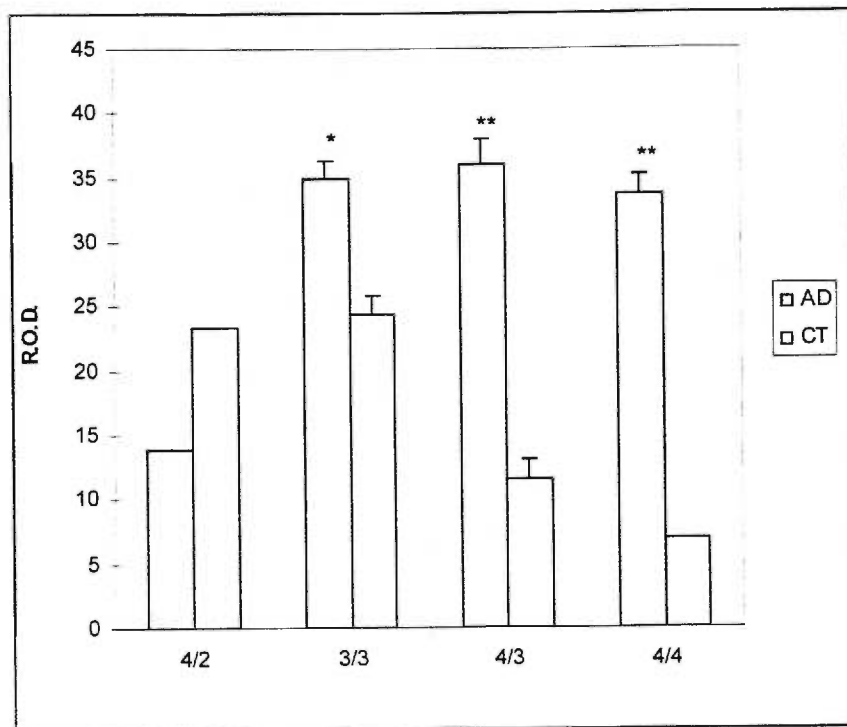


Figure 3.3: Correlation between the concentrations of apoD (upper panel) and apoE (lower panel) in hippocampal extracts as a function of the apoE genotype of AD patients and normal subjects

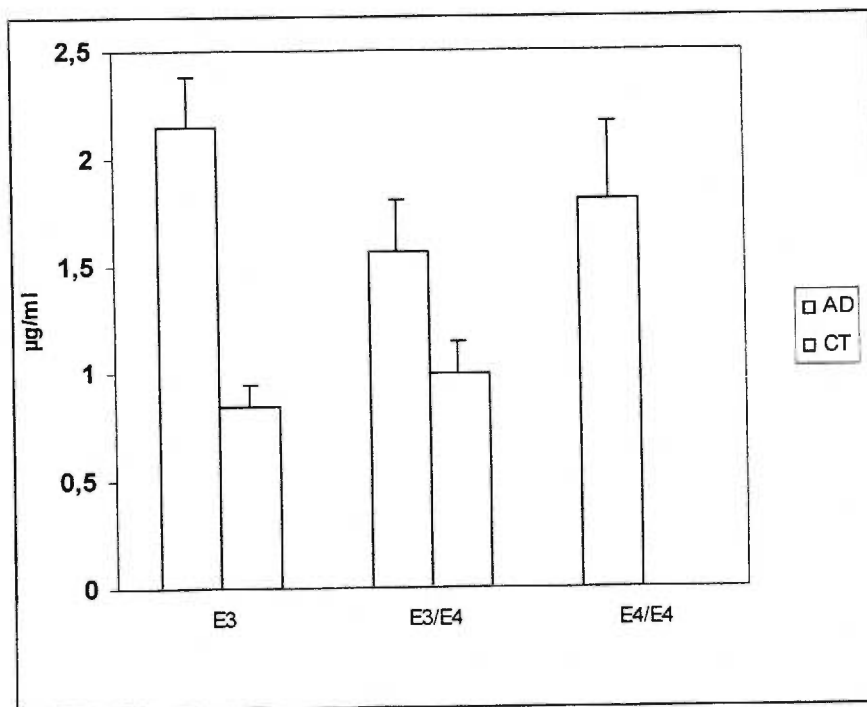
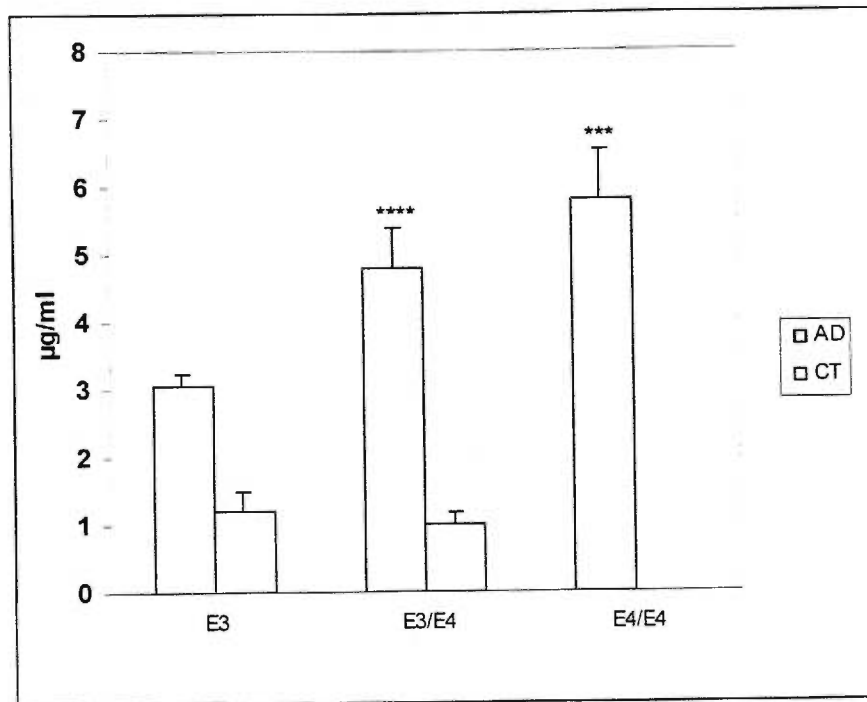


Figure 3.4: Correlation between the concentrations of apoD (upper panel) and apoE (lower panel) in CSF as a function of the apoE genotype of AD patients and normal subjects

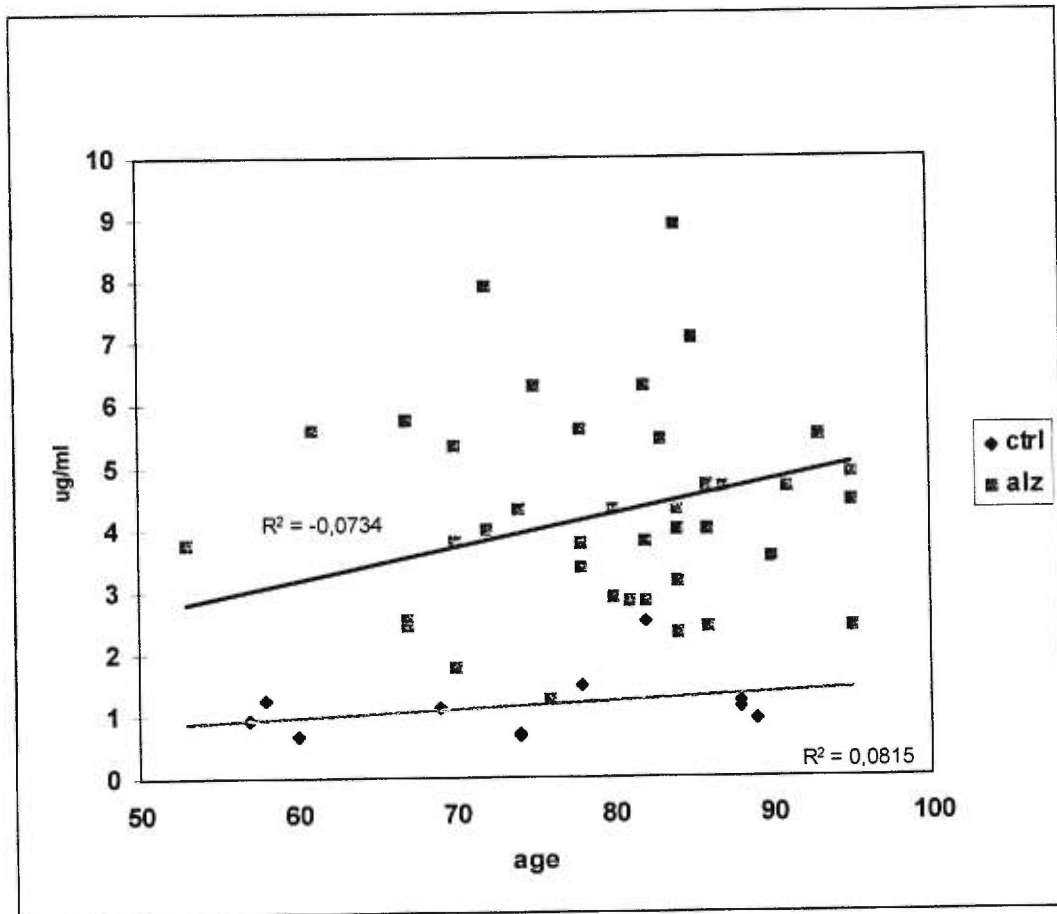


Figure 3.5: ApoD concentrations in the CSF of AD patients and normal subjects as a function of age

CHAPITRE IV

Modulation of Apolipoprotein D and Apolipoprotein E mRNA expression in rat hippocampus after enthorinal cortex lesion.

Laurence Terrisse¹, Diane Séguin¹, Philippe Bertrand², Jude Poirier², Ross Milne³ and Eric Rassart^{1*}

¹ Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8

² Douglas Hospital Research Center, Center for Studies in Aging, McGill University, Montréal, Québec, Canada, H4H 1R3

³ Lipoprotein and Atherosclerosis Group, University of Ottawa Heart Institute, 1053 Carling Av., Ottawa, Ontario, Canada, K1Y 4E9

* Corresponding author. Dép. des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8. Fax: (1)(514) 987-4647.

ABSTRACT

Apolipoprotein (apo) D is member of the lipocalin family of proteins. Although its physiological function is unknown, apoD is thought to transport one or more small hydrophobic ligands. A second apolipoprotein, apoE is known to play an important role in lipid transport, and apoE genetic polymorphism has been shown to be associated with susceptibility to Alzheimer's disease. Both apoD and apoE are expressed in the central nervous system (CNS) and both proteins accumulate at sites of peripheral nerve injury due to increased local synthesis. The two proteins may have overlapping or complementary functions within nervous tissue. In order to define the role of apoD within the CNS, we have studied the regional distribution of apoD and apoE mRNA and protein within the normal rat brain and the changes in apoD and apoE expression in the hippocampus of rats after enthorhinal cortex lesion (ECL). Within the brains of normal rats, apoD expression in the hippocampus was as high as 180-fold that of the liver. ApoD mRNA levels in other areas of the rat brain ranged from 40 to 120 times the levels found in the liver. The distribution of apoE gene expression within the brain was similar to that of apoD, but was much lower than hepatic apoE expression. When rats were subjected to ECL, the apoD message increased by 54% at 4 days post lesion (DPL) in the ipsilateral region of hippocampus while apoE mRNA levels (ipsilateral and contralateral) decreased by 43%. At 6 to 8 DPL apoD mRNA in the ipsilateral hippocampus remained elevated (42% above controls) whereas the apoE mRNA levels increased to

about 15% above those of controls. At 14 and 31 DPL, both apoD and apoE expression was similar to controls. The increase in immunoreactive apoD in hippocampal extracts was more dramatic. At 1 DPL, immunoreactive apoD levels were already 16-fold higher than those in extracts of non-lesioned animals and, at 31 DPL, levels were still 8-fold higher than those of control animals. Finally we have demonstrated that the levels of apoD in the brains of apoE-deficient mice are 50-fold those of wildtype control mice. ApoD clearly has an important function within the CNS in both normal and pathological situations.

Keywords: Alzheimer's disease, Apolipoprotein D, Apolipoprotein E, Astrocytes, Central nervous system (CNS), Hippocampus, Lipocalin.

Abbreviations: apoD: apolipoprotein D, apoE: apolipoprotein E, CNS: Central nervous system, DHT: dihydrotestosterone, ECL: Entorhinal cortex lesion, GCDFP: gross cystic disease fluid protein, HDL: high density lipoprotein, LCAT, lecithin:cholesterol acyl transferase, MOPS: 3-[N-morpholino] propane-sulphonic acid, SDS: sodium dodecyl sulfate, SSC: sodium saline citrate.

1. INTRODUCTION

Apolipoprotein D (apoD) is an atypical apolipoprotein. It is secreted as a glycoprotein of 29 kDa and, in plasma, is found associated with plasma high density lipoproteins (HDL) (Ayrault-Jarrier et al., 1963; Bojanovsky et al., 1980; Albers et al., 1981; Weech et al., 1986; Camato et al., 1989; Provost et al., 1990). The tissue distribution of apoD mRNA is somewhat species-specific (Drayna et al., 1986; Provost et al., 1990; Smith et al., 1990; Provost et al., 1991b; Séguin et al., 1995; Provost et al., 1995) but in all species studied to date, amongst the principal sites of expression are the central and peripheral nervous systems (Boyles et al., 1990a; Smith et al., 1990; Provost et al., 1991b; Séguin et al., 1995). Within the central nervous system (CNS), fibroblast-like cells and glial cells have been shown to be responsible for apoD expression (Provost et al., 1991b).

Based on the analysis of its primary structure, apoD was shown to belong to the lipocalin family, whose members are transporters of small hydrophobic ligands (Drayna et al., 1987; Peitsch and Boguski, 1989). The physiological ligand(s) for apoD have not been identified although apoD has been shown to be capable of binding a number of small hydrophobic molecules (Lea, 1988; Peitsch and Boguski, 1989; Dilley et al., 1990; Cabral et al., 1995), including steroid hormones. In fact, apoD was independently identified as GCDFP-24, a progesterone-binding protein found in high concentration in human breast cystic

fluids. ApoD also binds other steroids and steroid sulfates, such as pregnenolone, DHT, testosterone, DHEA, DHEA-sulfate, estradiol, etc. with varying affinities (Perlman et al., 1973; Lea et al., 1987; Lea, 1988; Dilley et al., 1990; Balbin et al., 1990). In addition to being potential apoD ligands, steroid hormones have been demonstrated to modulate apoD gene secretion in cultured cells (Simard et al., 1990; Simard et al., 1991; Simard et al., 1992; Patel et al., 1995). Several steroid hormone regulatory elements have been identified in the human apoD promotor (Lambert et al., 1993), such as estrogen responsive elements (ERE), progesterone responsive elements (PRE) and glucocorticoids responsive elements (GRE).

ApoE is a component of plasma very low density lipoproteins (VLDL), high density lipoproteins (HDL) and chylomicrons (Mahley,1988). ApoE is a 299 amino acid protein that exists as 3 common isoforms, apoE2, apoE3 and apoE4 encoded by 3 co-dominantly expressed alleles (Mahley,1988). ApoE genetic polymorphism is associated with susceptibility to Alzheimer's disease (AD) and immunoreactive apoE can be observed within the neurofibrillary tangles and β -amyloid proteins in the senile plaques in the brains of AD patients. Until recently, apoE seemed unique among the apolipoproteins in that it had special relevance to nervous tissue. It is synthesized in astrocytes and oligodendrocytes and plays an important role in redistribution of lipids and in the growth and maintenance of neuronal membranes after injury (Mahley,1988). In addition, both apoD and apoE show increased local

synthesis at sites of peripheral nerve injury. In the case of apoD, the mRNA and immunoreactive protein levels increase 40 and 500 times, respectively, in rat peripheral nervous tissue after experimental injury (Boyles et al, 1990a; Spreyer and al, 1990). Other apolipoproteins, apoA-I and apoA-IV also accumulate at the site of nerve injury and regeneration (Boyles et al, 1990b) but this does not appear to result from local synthesis as is the case for apoD and apoE.

Although apoD was first characterized in the early 1970's (McConathy and Alaupovic, 1973; McConathy and Alaupovic, 1976), its physiological role has not been defined. In view of the tissue distribution of its gene expression and its accumulation at sites of nerve injury, it would appear to have an important function within the nervous system in both normal and pathological situations. In the present study, we report the regional distribution of apoD and apoE mRNA and protein within the normal rat brain and after entorhinal cortex lesion. Furthermore, we demonstrate that apoD is expressed at very high levels in the brains of apoE-deficient mice.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. *Animals*

Rats used in this experiment were male Fisher adult rats of 250 to 300 g (Charles River, St-Constant, Québec, Canada). Cages contained two or three rats, under a 12 hours light/dark cycle, with free access to food and water. All rats were handled in strict accordance of the Canadian Council on Animal Care and the National Institutes of Health Guide for the care and Use of the Laboratory Animals. The apoE-deficient mice used were described previously by Popko et al. (1993) and generated by Piedrahita et al. (1992).

2.2. *Entorhinal Cortex Lesions*

ECL were performed according to Scheff et al, 1980, Poirier et al, 1990 and Poirier et al., 1991a. Basically, multiple electrolytic lesions of the entorhinal area (30 s) were used to create ECL at 3 different depths (2, 4 and 6 mm below the dura) and in 3 locations (L: 3.3, B: 0, L: 4.3, B: 0, L: 5.1, B: -1 mm). At different days post lesion (1, 4, 6, 8, 14 and 31 DPL), rats were anesthetized, decapitated, the hippocampus dissected and immediately frozen at -80°C until they were used for analyses of RNA or immunoreactive protein.

2.3. Northern blot analysis

Total RNA from various areas of normal rat brain was extracted by a method used for ribonuclease-rich tissues (Chirgwin et al., 1979). RNA was then denatured by formaldehyde/formamide and electrophoresed in 1% agarose gel containing MOPS (20 mM) and formaldehyde (17%) (adapted from Lehrach et al., 1977). Nucleic acids were transferred to Hybond-N nylon membrane and were fixed by a 3-minute exposure to UV light. Filters were prehybridized for 1 hour at 42°C in a solution containing 50% formamide, 3 x SSC (1 X SSC contains 150 mM NaCl and 15 mM Na citrate), 0.5% SDS and 5 X Denhardt's reagent, and then were incubated overnight in the presence of the appropriate probe (³²P-labeled apoD, apoE or β-actin cDNA) at 42°C in hybridizing solution, containing 50% formamide, 1 M NaCl, 0.5% SDS, 10% dextran sulfate and 3 X Denhardt's reagent. Blots were rinsed for 20 minutes in 2 X SSC at room temperature (2 rinses), washed at 60°C in 1 X SSC, 0.1% SDS for 45 minutes, then rinsed once in 1 X SSC at room temperature before exposure. Membranes were exposed overnight to Kodak XAR-5 X-OMAT films at -80°C with an intensifying screen (Coronex Lighting Plus, E.I. du Pont de Nemours and Co., Wilimington, DE). Autoradiographs were scanned on a Molecular Dynamics scanner and optical densities were measured for comparative results. Apolipoprotein D levels of expression was normalized to a ratio of apoD expression over β-actin expression.

2.4. Western blot analysis

Hippocampal tissue was homogenized in KPO_4 10mM - KCl buffer (pH 7.4). Samples (15 μg protein) were subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under reducing and non-reducing conditions using 12% acrylamide gels (Neville,1971). The migrated proteins were electrophoretically transferred to nylon membranes and, after saturation with 3% bovine serum albumin (BSA), the replicas were exposed to the anti-rat apoD polyclonal antibody, (kindly provided by S. Patel) or the anti-human and anti-rat apoE polyclonal antibody. Bound polyclonal antibody was detected by an anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase conjugate using the ECL detection system (Amersham).

3. RESULTS

In order to compare levels of apoD and apoE gene expression in different regions of the rat brain, Northern blots were first hybridized with a rat β -actin cDNA ^{32}P -labeled probe. The same membrane was then washed and sequentially rehybridized with rat apoD and apoE cDNA probes. Figure 1A illustrates that apoD mRNA is detected, at different levels, in all the areas of the rat brain that were tested. As can be seen in figure 1B, the highest expression levels were found in hippocampus and hypothalamus. By comparison, apoE gene expression (Fig.2) is much more uniform throughout the brain. As was previously observed (Elshourbagy et al., 1985), apoE mRNA levels in the brain were much lower than those in the liver. This is in direct contrast to the relative expression of apoD in brain and liver.

As expression of both apoD and apoE has been shown to be increased at sites of peripheral nerve regeneration, we wished to determine if apoD and apoE gene expression and protein levels are modulated during neurodegeneration within the brain. To this end we have used the rat entorhinal cortex lesion model as described previously by Poirier and al., 1990. As detailed in Methods and Materials, rats were subjected to unilateral entorhinal lesion and, at 1, 4, 6, 8, 14 and 31 days post lesion (DPL), animals were sacrificed and ipsilateral and contralateral hippocampal tissue samples were taken for analysis. ApoD, apoE and actin mRNA in the tissues was detected by hybridization of Northern blots with the appropriate ^{32}P -cDNA probes (Figure 3A) and the relative levels of the transcripts, as a function of time after lesion, were estimated by densitometric

analyses of the autoradiograms (Figure 3B). ApoD mRNA levels in the ipsilateral hippocampus of mice sacrificed at 4 DPL and at 6-8 DPL were increased 58% and 43%, respectively, compared to those of control mice whereas the levels in the contralateral hippocampus of mice sacrificed at 14 and 31 DPL were similar to those of the control animals. ApoD mRNA levels in the contralateral hippocampus did not appear to be affected by the lesion. In contrast to what was seen for the apoD transcript, apoE mRNA levels in both the ipsilateral and contralateral samples taken from rats sacrificed at 4 DPL four days were only 43% of those of control animals. For animals sacrificed at later time points, apoE gene expression was similar to that of controls. Thus it would appear that expression of the apoD and apoE genes is differentially modulated within the hippocampus following enthorinal cortex lesion.

Hippocampal tissue extracts of rats that had undergone enthorinal cortex lesion were subjected to SDS polyacrylamide gel electrophoresis and the migrated proteins were transferred to nitrocellulose membranes where immunoreactive apoD and apoE bands were detected with appropriate antibodies and quantified on the autoradiograms by densitometry (Figure 4A). Following the experimental lesion there was a rapid and very large increase in immunoreactive apoD in the tissue. As early as 1 DPL, apoD levels were 16-fold higher than those in hippocampal extracts of non-lesioned animals. The highest levels were seen in animals sacrificed at 2 DPL (20-fold the levels of control animals). At 4 DPL the levels were 14-fold those of control animals and there was a gradual decrease in immunoreactive apoD in animals sacrificed at

longer intervals after surgical intervention but, even at 31 DPL, levels were 8-fold higher than those of non-operated rats.

In order to gain more insight into the potential physiological roles of apoD within the CNS, we have compared the levels of immunoreactive apoD within the brains of normal and apoE-deficient mice. As can be seen in Figures 5A and 5B, the level of immunoreactive apoD is 50-fold higher in the frontal cortex of apoE-deficient mice than in the corresponding region of control mice. Compared to wild-type mice, a 20-fold higher apoD level is also apparent in the cerebellum of the apoE deficient mice. Therefore, in apoE deficiency, there is large increase in the concentration of immunoreactive apoD within the brain. This could be compensatory or could be secondary to neuropathology that results from the lack of apoE expression within the CNS.

4. DISCUSSION

ApoD and apoE are thought to have overlapping or complementary roles in nerve degeneration and/or the remyelination processes that occur in the central and peripheral nervous systems in both normal and pathological situations. This hypothesis was originally based on the observations that the apoD and apoE genes are expressed at high levels in glial cells within the central nervous system of several species (Elshourbagy et al., 1985; Boyles et al., 1990a; Provost et al., 1990; Provost et al., 1991b; Séguin et al., 1995) and that there is a local increase in apoD and apoE gene expression and an accumulation of the corresponding immunoreactive proteins during the remyelination that follows experimental peripheral nerve injury (Boyles et al., 1990a; Boyles et al., 1990b; Spreyer et al., 1990). The respective functions of the two proteins in nervous tissue have not been fully defined although there is considerable evidence to suggest that apoE is directly implicated in the redistribution of lipids within the nervous system. In addition, a number of other potential roles have been attributed to apoE within the brain based on observed association between apoE genetic polymorphism and the susceptibility to Alzheimer's disease. The role of apoD within nervous tissue and the reasons for its accumulation at sites of nerve injury remain highly speculative. However, as apoD is a member of the lipocalin family, it could be predicted that it would serve to transport or sequester one or more small hydrophobic ligands.

Our results (Figures 1A and 1B) show that apoD is expressed throughout the rat brain at levels that are much higher than that in liver. Expression of apoD in the hippocampus was estimated to be as high as 180 times that in the liver with other regions of brain having apoD mRNA levels from 40- to 120-fold those of the liver. The high expression of apoD in the CNS of the rat is similar to what we have previously reported for the mouse where apoD transcripts are mainly found in the spinal cord, cerebellum and brain (Séguin et al., 1995). Other groups have also confirmed high apoD expression in mouse brain (Cofer and Ross, 1996 and Yoshida et al., 1996). Abundant apoD message has been reported in the brains of rhesus monkey (Smith et al. 1990) and rabbit (Provost et al. 1990, 1991b) although, unlike rodents, the CNS was not the predominant site of apoD expression in these species. ApoE mRNA was found in regions of the rat brain in which the apoD gene was also expressed. In contrast to apoD, however, the levels of apoE message were much lower in brain than in liver.

There have been several reports that neurodegenerative disease can cause alterations in apoD mRNA and protein levels within the brain. Increases in apoD mRNA and protein have been observed in the cerebellum of a strain of mice that is considered to be a model for human Niemann-Pick Type C disease (Yoshida et al., 1996). This condition is characterized by abnormal lysosomal cholesterol storage, defective intracellular cholesterol transport and chronic progressive neurodegeneration. An increase in immunoreactive apoD has also been demonstrated in cerebrospinal fluid (Terrisse et al., *J.Neuroch.* in press)

and oligodendria within the brain (Patel, unpublished results) of patients with Alzheimer's Disease. A recent study (Ong et al., 1997) has demonstrated increased apoD within the hippocampus of rats that have been subjected to kainic acid-induced excitotoxic injury. In the present study, we have used entorhinal cortex lesion (ECL) as a model to study apoD and apoE gene expression and the accumulation of immunoreactive apoD and apoE at sites of neural degeneration and regeneration within the rat brain. ECL is a classic example of reactive synaptogenesis with a compensatory response of hippocampal formation. This induces sprouting and a rapid hypertrophy of hippocampal astrocytes and an increase in the number of microglia (Poirier et al., 1991). ECL was shown to cause the loss of nearly 60% of the synaptic input of the hippocampus although this loss of synapses is transient and new synapses are formed within a few days after denervation (Matthews et al., 1976). Our results show that apoD mRNA in the ipsilateral hippocampus rapidly increases following ECL with a peak between 1 and 4 DPL (Fig.#3). The increase in apoD protein in hippocampal extracts following ECL is even more dramatic with levels in rats sacrificed at 1 and 2 DPL that are 16- and 20-fold, respectively, those of non-operated animals (Fig.#4). Immunohistochemical analysis of brain sections after ECL revealed an increased expression of apoD in the choroid plexus, the meninges, the dentate gyrus and the glia both at 1 and 4 DPL (not shown). In contrast to apoD, apoE gene expression in both ipsilateral and contralateral hippocampus shows a transient decrease immediately following ECL and a slight increase at later time points.

We have furthermore demonstrated that immunoreactive apoD levels within the frontal cortex and cerebellum of apoE-deficient mice are 50- and 20-fold higher, respectively, than those of wild type control mice. It has been reported that nerve regeneration in the peripheral nervous system in apoE-deficient and apoE/apoA-I-deficient mice is normal (Popko et al., 1993; Goodrum et al., 1995) whereas, abnormal synaptic regeneration within the dentate gyrus of the hippocampus of apoE knock-out mice has been demonstrated (Masliah et al., 1995). In the absence of apoE, the high levels of apoD could potentially reflect a compensatory response. For example, apoD may facilitate lipid transport within nervous tissue, a function that would normally be carried out primarily by apoE. Alternatively, the high levels of apoD in the apoE-deficient mice could be indicative of neuropathology that is secondary to the lack of apoE.

While we have shown that apoD expression in the brain is increased in rats following ECL and in apoE-deficient mice, neither the signal that is responsible for the increased apoD expression nor the function of apoD in the CNS have been identified. A number of factors are known to modulate apoD gene expression in cells. Steroids have been shown to be both ligands for apoD and to be capable of altering apoD gene expression. In breast and prostate cancer cell lines, apoD mRNA and protein secretion are downregulated by estrogens, and increased by androgens and glucocorticoids (Simard et al., 1990; Simard et al., 1991; Simard et al., 1992). Increased secretion of apoD, but not

apoE, is also observed following addition of progesterone or 25-hydroxycholesterol to mouse primary astrocyte cultures (Patel et al., 1995). ApoD gene expression also depends upon the state of differentiation and the proliferative activity of the cell. In cultured human fibroblasts, apoD message is only detected in late passage cells or in cells that undergo growth arrest (Provost et al., 1991). Addition of retinoic acid, which has anti-proliferative and differentiating effects in a wide variety of cell types and tissues, stimulates apoD mRNA expression a human breast cancer cell line (Lopez-Boado et al., 1994).

Astrocytes that constitutively express apoD and apoE mRNA (Provost et al., 1991b; Patel et al., 1995) actively respond to brain damage by participating in the repair of the disrupted blood-brain barrier and in the reorganization of neuronal circuits (Latov et al., 1979; Mathewson and Berry, 1985). This proliferation can also impair the reinervation process by creating a physical barrier that can arrest axonal growth (Bovolenta et al., 1992). In one model, the proliferation of astrocytes that normally follows penetrating brain injury could be rapidly down-regulated by gonadal steroids (Garcia-Estrada et al., 1993). Administration of testosterone, 17- β estradiol and, to a lesser extent, progesterone to rats immediately following lesion of the parietal cerebral cortex resulted in a reduction in the number of proliferating astrocytes within the dentate gyrus when examined 3 days after surgery (Garcia-Estrada et al., 1993). Following ECL there is a rapid proliferation of astrocytes in the hippocampus which reaches a peak between 2 and 4 DPL (Matthews et al., 1976; Gall et al.,

1979). Gonadal steroids could potentially be responsible for the local increase in apoD mRNA and protein by either directly activating the expression of the apoD gene or, indirectly, by causing a growth arrest of astrocytes (Provost et al., 1991a; Simard et al., 1990; Simard et al., 1991; Simard et al., 1992; Patel et al., 1995). In the case of ECL, we would propose the following sequence of events. There would be an initial proliferation of astrocytes (duration of 1 to 2 days), followed by a steroid-induced growth arrest and stimulation of apoD (at 3-4 DPL) and apoE (6 to 14 DPL) production. Both proteins would accumulate locally and be implicated in the process of reinnervation and synaptic regeneration. It should be noted, however, that in some models, astrocytes may not be the major cell type responsible for apoD expression following brain injury. Ong et al. (1997) have observed that, in kainic acid-lesioned rat hippocampus, specific induction of apoD occurred in pyramidal neurons destined for cell death whereas apoE was induced only in astrocytes. However this does not explain the early expression of apoD protein at 1DPL (fig.# 4). Amat et al. (1996) recently showed that microglia proliferate as soon as 1DPL after cortical stab wound in the rat and precedes proliferation of invading blood-borne macrophages. They later showed (Amat et al, 1998) that oligodendrocyte precursor cells, but not differentiated oligodendrocytes, proliferate very early in response to brain injury. They proposed that these immature oligodendrocytes are induced to proliferate at the wound site and serve as a source of new oligodendrocytes. Therefore, increased apoD expression could be due to the proliferation of microglia or oligodendrocyte precursors cells which would induce

secondarily the astrocyte response as shown in other neurodegenerative systems studying astrocyte and microglia cell expression (Svensson et al., 1993 and McCann et al., 1996).

ApoD is promiscuous in terms of ligand-binding and is expressed in a variety of normal tissues as well as in pathological situations. It may, therefore, fulfill different roles in different tissues. In nervous tissue, one potential role for apoD could be to facilitate the esterification of steroid hormones. ApoD is often found associated with lecithin:cholesterol acyl transferase (LCAT) activity and has been reported to stabilize its activity. Pregnenolone, a putative physiological ligand of apoD, accumulates in human and rat brains and in human sciatic nerves in the form of pregnenolone sulfate and fatty acid esters (Hu et al., 1987; Morfin et al., 1992). Within peripheral or central nervous tissue, apoD may present steroids such as pregnenolone or LCAT for esterification. Further investigation, involving overexpression of the apoD gene in the brain is necessary to define its role within the central nervous system.

Much recent attention has been paid to the role of apoD and apoE as vehicles for lipid movement in the nervous system. Many apolipoproteins are implicated in nerve regeneration. ApoD, apoE and less importantly apoA-I, apoA-IV increase during the regeneration process (Boyles et al., 1990a; Spreyer et al., 1990). ApoD and apoE are often found together. Co-expression may reflect team work between these two proteins and when necessary functional

complementation. To test this hypothesis, we studied apoD expression in apoE-deficient mice. We determined that apoD expression in frontal cortex and cerebellum was increased 50 fold and 20 fold respectively when compared to control mice. This drastic increase could reflect the role of apoD in neuropathologies

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Doris Dea for her excellent technical assistance and Marc Danik for helpful discussions and critical review of the manuscript. We gratefully acknowledge support from the Medical Research Council of Canada (Grant MT-9880).

REFERENCES

Albers, J.J., Cheung, M.C., Ewens, S.L. and Tollefson, J.H., Characterization and Immunoassay of apolipoprotein D, *Atherosclerosis*, 39 (1981) 395-409.

Amat, L.A., Ishiguro, H., Nakamura, K. and Norton, W.T., Phenotypic diversity and kinetics of proliferating microglia and astrocytes following cortical stab wounds, *Glia*, 16:4 (1996) 368-382.

Amat, L.A., Farooq, M., Ishiguro, H. and Norton, W.T., Cells of the oligodendrocyte lineage proliferate following cortical stab wounds: an in vitro analysis, *Glia*, 22:1 (1998) 64-71.

Ayrault-Jarrier, M., Levy, G and Polonovski, J., Etude des Alpha-apolipoprotéines sériques humaines par immunoélectrophorèse, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 45 (1963) 703-713.

Balbin, M, Freije, J.M.P., Fueyo, A., Sanchez, L.M. and Lopez-Otin, C., Apolipoprotein D is the major protein component in cyst fluid from women with human breast gross cystic disease, *Biochem. J.*, 271 (1990) 803-807.

Bojanovsky, D., Alaupovic, P., McConathy, W.J. and Kelley, J.L., Isolation and partial characterization of apolipoprotein D and lipoprotein D from baboon plasma. *FEBS Lett.*, 112 (1980) 251-254.

Bovalenta, P., Wandosell, F. and Nieto-Sampedro, M., CNS glial scar tissue: A source of molecules which inhibit central neurite outgrowth, *Prog. Brain Res.*, 94 (1992) 367-379.

Boyles, J.K., Notterpek, L.M. and Anderson L.J., Accumulation apolipoproteins in the regenerating and remyelinating mammalian peripheral nerve. Identification of apolipoprotein D, apolipoprotein A-IV, apolipoprotein E and apolipoprotein A-I, *J. Biol. Chem.*, 265 (1990a) 17805-17815.

Boyles, J.K., Notterpek, L.M., Wardell, M.R. and Rall Jr., S.C., Identification, characterization, and tissue distribution of apolipoprotein D in the rat, *J. Lipid Res.*, 31 (1990b) 2243-2256.

Cabral, J.H.M., Atkins, G.L., Sanchez, L.M., Lopez-Boado, Y.S., Lopez-Otin, C. and Sawyer, L., Arachidonic acid binds to apolipoprotein D: implications for the protein's function, *FEBS Lett.*, 366 (1995) 53-56.

Camato, R., Marcel, Y.L., Milne, R.W., Lussier-Cacan, S. and Weech, P.K., Protein polymorphism of a human plasma apolipoprotein D antigenic epitope. *J. lipid Res.*, 30 (1989) 865-875.

Chajek, T. and Fielding, C.J., Isolation and characterization of a human cholesteryl ester transfer protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75 (1978) 3445-3449.

Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. and Rutter, W.J., Isolation of biological active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease, *Biochemistry*, 18 (1979) 5294-5299.

Cofer, S and Ross, S., The murine gene encoding apolipoprotein D exhibits a unique expression pattern as compared to other species. *Gene*, 171 (1996) 261-263.

Dilley, W.G., Haagensen, D.E., Cox, C.E. and Wells S.A.Jr., immunologic and steroid binding properties of the GCDFP-24 protein isolated from human gross cystic disease fluid, *Breast Cancer Res. and Treatment.*, 16 (1990) 253-260.

Drayna, D., Fielding, C., McClean, J., Baer, B., Castro, G., Chen, E., Comstock, L., Henzel, W., Kohr, W., Rhee, L., Wion, K. and Lawn, R., Cloning and expression of human apolipoprotein D cDNA, *J. Biol. Chem.*, 261 (1986) 16535-16539.

Drayna, D., McLean, J.W., Wion, K.L., Trent, J.M., Drabkin, H.A. and Lawn, R.M., Human apolipoprotein D gene: gene sequence, chromosome localization, and homology to the $\alpha_2\text{m}$ -globulin superfamily, *DNA*, 6 (1987) 199-204.

Elshourbagy, N.A., Liao, W.S., Mahley, R.W. and Taylor, J.M., Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rat and marmosets, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 (1985) 203-207.

Gall, C., Rose, G. and Lynch G., Proliferative and migratory activity of glial cells in the partially deafferented hippocampus, *J. Comp. Neurol.*, 183 (1979) 539-550.

Garcia-Estrada, J.; Del Rio, J.A.; Luquin, S.; Soriano, E. and Garcia-Segura, L.M., Gonadal hormones down-regulate reactive gliosis and astrocyte proliferation after a penetrating brain injury, *Brain Res.*, 628 (1993) 271-278.

Goodrum, J.F., Bouldin, T.W., Zhang, S.H., Maeda, N. and Popko, B., Nerve regeneration and cholesterol reutilization occur in the absence of apolipoproteins E and A-I in mice, *J. Neurochem.*, 64 (1995) 408-416.

Hu, Z.Y., Bourreau, E., Jung-Testa, I., Robel, P and Baulieu, E.-E., Neurosteroids: oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 (1987) 8215-8219.

Lambert, J., Provost, P.R., Marcel, Y.L. and Rassart, E., Structure of the human apolipoprotein D gene promotor region, *Biochim. Biophys. Acta*, 1172 (1993) 190-192

Latov, N., Nilaver, G., Zimmerman, E.A., Johnson, W.G., Silverman, A.-J., Defendi, R and Cote, L., Fibrillary astrocytes proliferate in response to brain injury, *Dev. Biol.*, 72 (1979) 381-384.

Lea, O.A., Binding properties of progesterone-binding cyst protein, PBCP, *Steroids*, 52 (1988) 337-338.

Lea, O.A., Kvinnsland, S. and Thorsen, T., Progesterone-binding Cyst protein in human breast tumor cytosol, *Cancer Res.*, 47 (1987) 6189-6192.

Lehrach, H., Diamond, D., Mosney, J.M. and Boedtke, H., RNA molecular weight determination by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination, *Biochemistry*, 16 (1977) 4743.

Lopez-Boado, Y.S., Tolivia, J. and Lopez-Otin, C., Apolipoprotein D gene induction by retinoic acid is concomitant with growth arrest and cell differentiation in human Breast Cancer cells, *J. Biol. Chem.*, 269 (1994) 26871-26878.

Luquin, S., Naftalin, F. and Garcia-Segura, L.M., Natural fluctuation and gonadal hormone regulation of astrocyte immunoreactivity in dentate gyrus, *J. Neurobiol.*, 24 (1993) 913-924.

Mahley, R.W., Apolipoprotein E: Cholesterol Transport Protein with Expanding Role in Cell Biology, *Science* 40 (1988) 622-630.

Masliah E., Mallory M., Ge N., Alford M., Veinberg I., Roses A.D.: Neurodegeneration in the central nervous system of apo E-deficient mice. *Expal. Neurol.*, 1995, 136, 107-122.

Mathewson, A.J. and Berry, M., Observations on the astrocyte response to a cerebral stab wound in adult rats, *Brain Res.*, 327 (1985) 61-69.

Matthews, D.A., Cotman, C.W. and Lynch, G., An electron microscopic study of lesion-induced synaptogenesis in the dentate gyrus of the adult rat, *Brain Res.*, 115 (1976) 1-41.

McCann, M.J., O'Callaghan, J.P., Martin, P.M., Bertram, T. and Streit, W.J., Differential activation of microglia and astrocytes following trimethyl tin-induced neurodegeneration, *Neuroscience*, 72:1 (1996) 273-281.

McConathy, W. and Alaupovic, P., Isolation and partial characterization of apolipoprotein D: a new protein moiety of the human plasma lipoprotein system, *FEBS Lett.*, 37 (1973) 178-182.

McConathy, W. and Alaupovic, P., Studies on the isolation partial characterization of apolipoprotein D and lipoprotein D of human plasma, *Biochemistry*, 15 (1976) 515-520.

Morfin, R., Young, J., Corpéchet, C., Egestad, B., Sjøvall, J. and Baulieu, E.-E., Neurosteroids: pregnenolone in human sciatic nerves, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 (1992) 6790-6793.

Ong, W.Y., He, Y., Suresh, S. and Patel, S.C., Differential expression of apolipoprotein D and apolipoprotein E in the kainic acid-lesioned rat hippocampus, *Neuroscience*, 79:2, (1997) 359-367.

Patel, S.C., Asotra, K., Patel, Y., McConathy, W.J., Patel, R.C. and Suresh, S., Astrocytes synthesize and secrete the lipophilic ligand carrier apolipoprotein D, *NeuroReport*, 6 (1995) 653-657.

Peitsch, M.C. and Boguski, M.S., Is apolipoprotein D a mammalian Bilin-Binding Protein?, *The New Biologist*, 2:2 (1989) 197-206.

Perlman, W.H., Gueriguian, J.L. and Sawyer, M.E., A specific progesterone-binding component of human cyst fluid, *J. Biol. Chem.*, 248 (1973) 5736-5741.

Piedrahita, J.A., Zhang, S.H., Hagan, J.R., Oliver, P.M. and Maeda, N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, (1992) 4471-4475.

Poirier, J., Hess, M., May, P.C. and Finch, C.E., Cloning of hippocampal poly(A) RNA sequence that increase after entorhinal cortex lesion in adult rat, *Mol. Brain Res.*, 9 (1991) 191-195.

Poirier, J., Hess, M., May, P.C. and Finch, C.E., Apolipoprotein E- and GFAP-RNA in hippocampus during reactive synaptogenesis and terminal proliferation, *Mol. Brain Res.*, 11 (1991) 97-106.

Poirier, J., May, P.C., Osterburg, H.H., Geddes, J., Cotman, C.W. and Finch, C.E., Alteration of gene expression in rat hippocampus following entorhinal cortex lesion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 (1990) 303-306.

Poirier, J., Davignon, J., Bouthillier, D., Kogan, S., Bertrand, P., and Gauthier, S., Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease, *Lancet*, 342 (1993) 697-699.

Popko, B., Goodrum, J.F., Bouldin, W., Zhang, S.H., and Maeda, N., Nerve regeneration occurs in the absence of apolipoprotein E in mice, *J. Neurochem.*, 60 (1993), 1155-1158.

Provost, P.R., Tremblay, Y., El-Amine, M. and Bélanger, A., Guinea pig apolipoprotein D RNA diversity, and developmental and gestional modulation of mRNA levels, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 109 (1995) 225-236.

Provost, P.R., Marcel, Y.L., Milne, R.W., Weech, P.K. and Rassart, E., Apolipoprotein D transcription occurs specifically in nonproliferating quiescent and senescent fibroblast cultures, *FEBS Lett.*, 290 (1991a) 139-141.

Provost, P.R., Villeneuve, L., Weech, P.K., Milne, R.W., Marcel, Y.L. and Rassart, E., Localization of the major sites of rabbit apolipoprotein D gene transcription by in situ hybridization, *J. Lipids Res.*, 32 (1991b) 1959-1970.

Provost, P.R., Weech, P.K., Tremblay, N.M., Marcel, Y.L. and Rassart, E., Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of rabbit apolipoprotein D, *J. Lipids Res.*, 31 (1990) 2057-2065.

Scheff, S.W., Bernardo, L.S. and Cotman, C.W., Decline in reactive fiber growth in the dentate gyrus of aged rats compared to young adult rats following enthorinal cortex removal, *Brain Res.*, 199 (1980) 21-38.

Séguin, D., Desforges, M. and Rassart, E., Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of mouse apolipoprotein D, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 30 (1995) 242-250.

Simard, J., Veilleux, R., de Launoit, Y., Haagensen, D.E. and Labrie, F., Stimulation of apolipoprotein D secretion by steroids coincides with inhibition of cell proliferation in human LNCaP prostate cancer cells, *Cancer Res.*, 51 (1991)4336-4341.

Simard, J.; Dauvois, S.; Haagensen, D.E.; Levesque, C., Merand, Y. and Labrie, F., Regulation of progesterone-binding breast cyst protein GCDFP-24 secretion by estrogens and androgens in human breast cancer cells: a new marker of steroid action in breast cancer, *Endocrinology*, 126 (1990) 3223-31.

Simard, J.; de Launoit, Y.; Haagensen, D.E.; Labrie, F., Additive stimulatory action of glucocorticoids and androgens on basal and estrogen-repressed apolipoprotein-D messenger ribonucleic acid levels and secretion in human breast cancer cells, *Endocrinology*, 130 (1992) 1115-21.

Smith, K.M., Lawn, R.M. and Wilcox, J.N., Cellular localization of apolipoprotein D and lecithin:cholesterol acyltransferase mRNA in rhesus monkey tissues by in situ hybridization, *J. Lipids Res.*, 31 (1990) 995-1004.

Spreyer, P., Schaal, H., Kuhn, G., Rothe, T., Unterbeck, A., Oleck, K. and Muller, H.W., Regeneration-associated high levels expression of apolipoprotein D mRNA in endoneurial fibroblasts of peripheral nerve, *EMBO J.*, 9 (1990) 2479-2484.

Svensson, M., Eriksson, N.P. and Aldskogius, H., Evidence for activation of astrocytes via reactive microglial cells following hypoglossal nerve transection, *J. Neurosci. Res.*, 35:4 (1993) 373-381.

Terrisse, L., Poirier, J., Bertrand, P., Merched, A., Siest, G., Milne, R.W. and Rassart, E., Increased levels of apolipoprotein D in cerebrospinal fluid and hippocampus of Alzheimer's patients, *J. Neurochem.*, 71:4 (1998).

Yoshida K., Cleaveland E., Nagle J., French S., Yasmen L., Oshima T., Brady R., Pentchev P. and Kulkarni A., Molecular cloning of the mouse Apolipoprotein D gene and its upregulation expression in Niemann-Pick Disease type C mouse model, *DNA and Cell biology*, vol.15, no.10 (1996) 873-882.

Weech, P.K., Camato, R., Milne, R.W. and Marcel, Y.L., Apolipoprotein D and cross-reacting human plasma apolipoproteins identified using monoclonal antibodies, *J. Biol. Chem.*, 261 (1986) 7941-7951.

Witkins, J.W., Ferin, M., Popilskis, S.J. and Silverman, A.-J., Effects of gonadal steroids on the ultrastructure of GnRH neurons in the Rhesus monkey: Synaptic input and glial apposition, *Endocrinology*, 129 (1991) 1083-1092.

Figure legends

Figure 1. A: In each lane, 5 μ g of total RNA from different areas of normal brain was loaded. 1)pooled hippocampus, 2)pituitary gland, 3)cerebellum, 4)liver, 5)embryonal cortex, 6)frontal cortex, 7)hypothalamus, 8)striatum, 9)amygdale, 10)olfactory bulb, 11)parietal cortex and 12)temporal cortex. The membrane was probed with 32 P-labeled apoD (A) or β -actin (B) rat cDNAs. B: Apolipoprotein D levels of expression in different areas of the normal rat brain. Each column corresponds to a ratio of apoD expression over β -actin expression in relative optical density values, an arbitrary level of 1 is given to the liver level for comparison.

(p=pooled hippocampus, ap=pituitary gland, c=cerebellum, li=liver, cw= whole cortex, fc=frontal cortex, mh=hypothalamus, s=striatum. a=amygdale, of-olfactory bulb, pc=parietal cortex and tc=temporal cortex).

Figure 2. A: In each lane, 5 μ g of total RNA from different areas of normal brain was loaded. 1)pooled hippocampus, 2)pituitary gland, 3)cerebellum, 4)liver, 5)embryonal cortex, 6)frontal cortex, 7)hypothalamus, 8)striatum, 9)amygdale, 10)olfactory bulb, 11)parietal cortex and 12)temporal cortex. The membrane was probed with 32 P-labeled apoE (A) or β -actin (B) rat cDNAs. B: Apolipoprotein E expression levels in different areas of the normal rat brain. Each column corresponds to a ratio of apoE expression over β -actin expression in relative optical density values, an arbitrary level of 1 is given to the liver level for comparison. (p=pooled hippocampus, ap=pituitary gland, c=cerebellum,

li=liver, cw= whole cortex, fc=frontal cortex, mh=hypothalamus, s=striatum. a=amygdale, of-olfactory bulb, pc=parietal cortex and tc=temporal cortex).

Figure 3. A: Modulation of apoD and apoE mRNA expression following enthorinal cortex lesioning (ECL) of normal rat brain. In each lane, 5 μ g of total hippocampal RNA (pool of 3 to 6 rats) was loaded. The first lane represents the control without lesioning and the others are different times after the lesion indicated above each lane as Day Post Lesion (DPL). The membrane was probed with 32 P-labeled apoD (upper panel), apoE (middle panel) or β -actin (lower panel) rat cDNAs. Results in A were quantified by densitometry and a time course analysis is shown in B. The results are expressed as the variation of base line expression at different days post-lesion relative to the control level. Note that the increased of apoD expression at 4 DPL coincides with a reduction in apoE expression.

Figure 4. A: Modulation of apoD protein expression following enthorinal cortex lesioning (ECL) of normal rat brain. In each lane, 20 μ g of hippocampal protein extracts (pool of 3 to 6 rats) was loaded. The first lane represents the control without lesioning and the other lanes are different times after lesioning indicated above each lane as Day Post Lesion (DPL). The membrane was probed with anti-rat apoD polyclonal antibody and detected by an anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase conjugate. Results in A were quantified by densitometry and a time

course analysis is shown in B. The results are expressed as the variation in base line of expression at different days post-lesion relative to the control level. ApoD expression increased as soon as 1 DPL at 15 times the level of control, reached a peak at 2 DPL and seemed to gradually decrease after 4 DPL.

Figure 5. A: Expression of apoD protein in apoE deficient mice. The numbers at the top represent each different mouse tested and control is purified human apoD from breast cyst fluid. K indicates apoE -deficient mice and C indicates control animals. In each lane, 20 μ g of total protein extracts was loaded and the membrane was probe with anti-rat apoD polyclonal antibody and detected by an anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase conjugate. Results in A were quantified by densitometry and a time course analysis is shown in B. The results are expressed as the variation in base line expression relative to the control level.

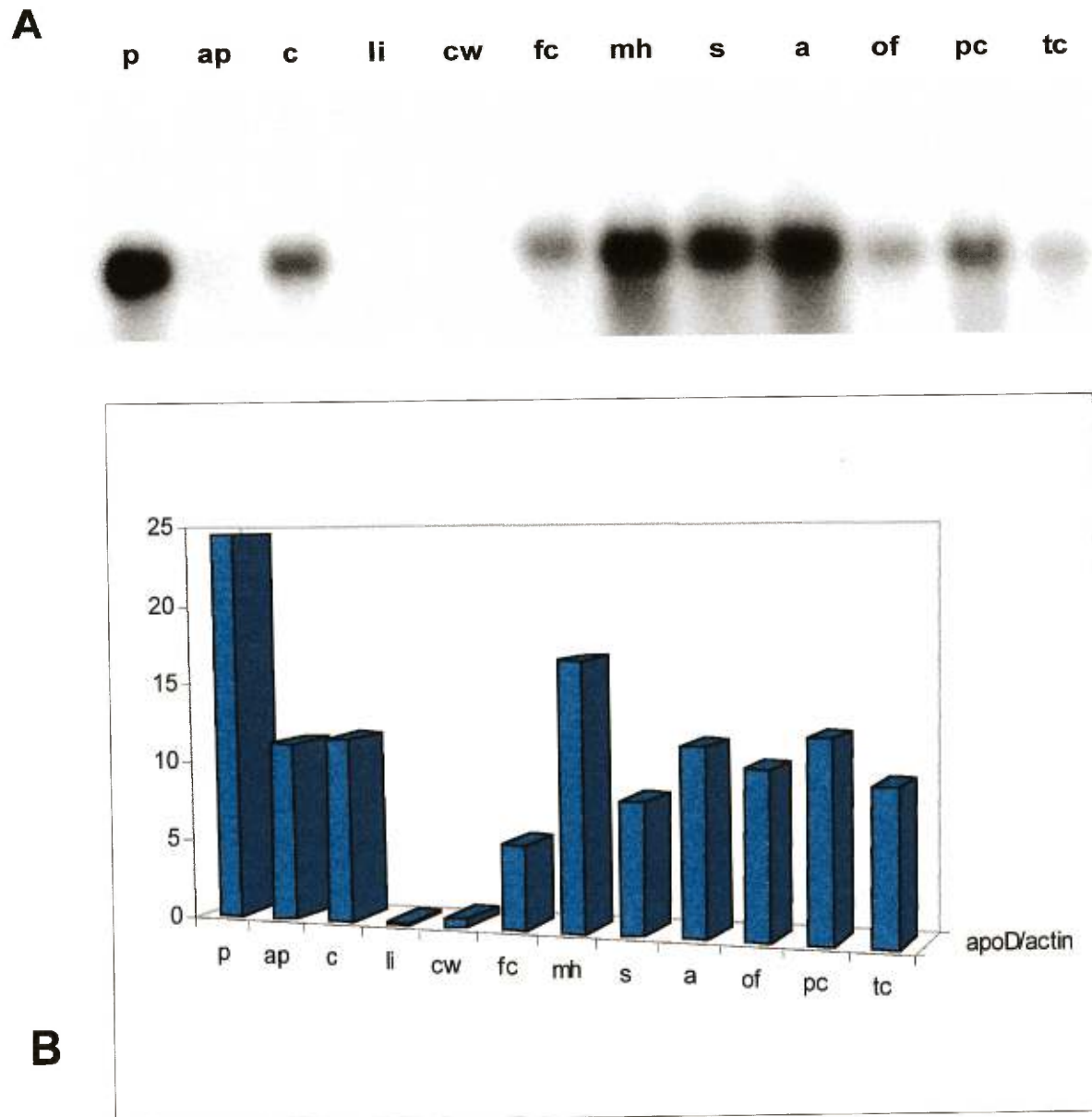


Figure 4.1: Apolipoprotein D expression levels in different areas of the normal rat brain.

A

p ap c li cw fc mh s a of pc tc

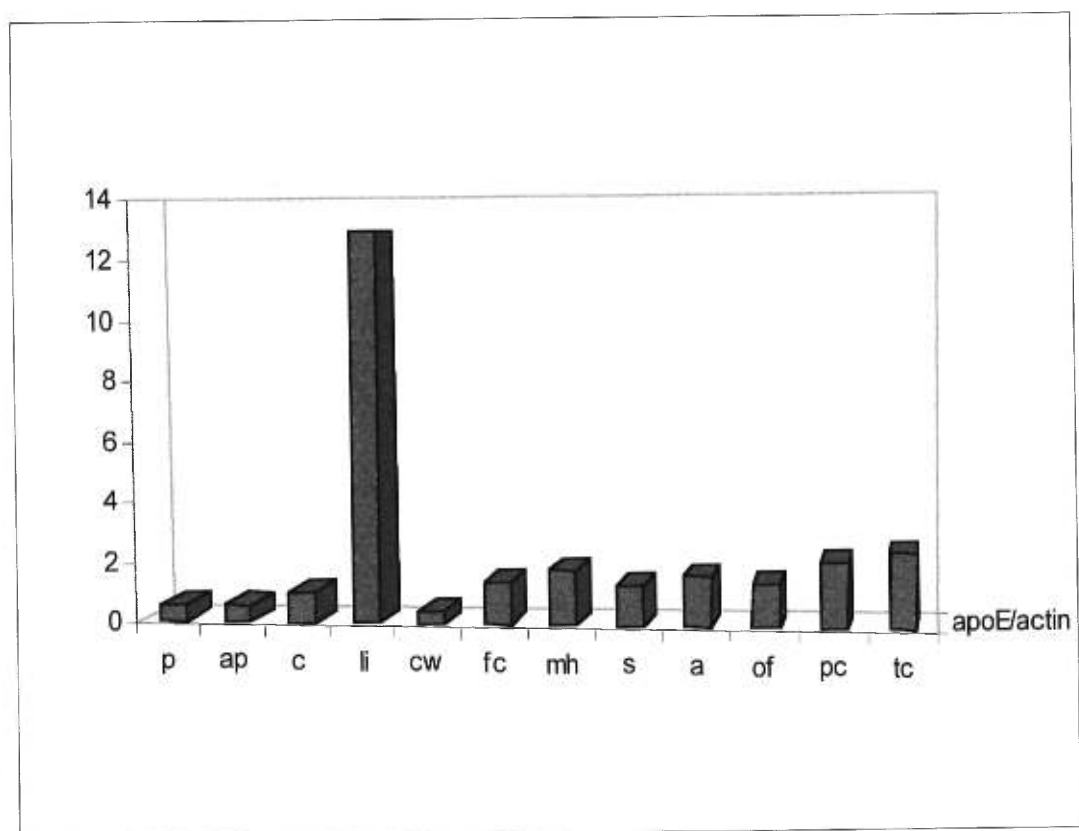
**B**

Figure 4.2: Apolipoprotein E expression levels in different areas of the normal rat brain.

A

C 1i 1c 4i 4c 6i 6c 14i 14c 31i 31c 60i 60c 96i 96c



apoD

B

C 1i 1c 4i 4c 6i 6c 14i 14c 31i 31c 60i 60c 96i 96c



apoE

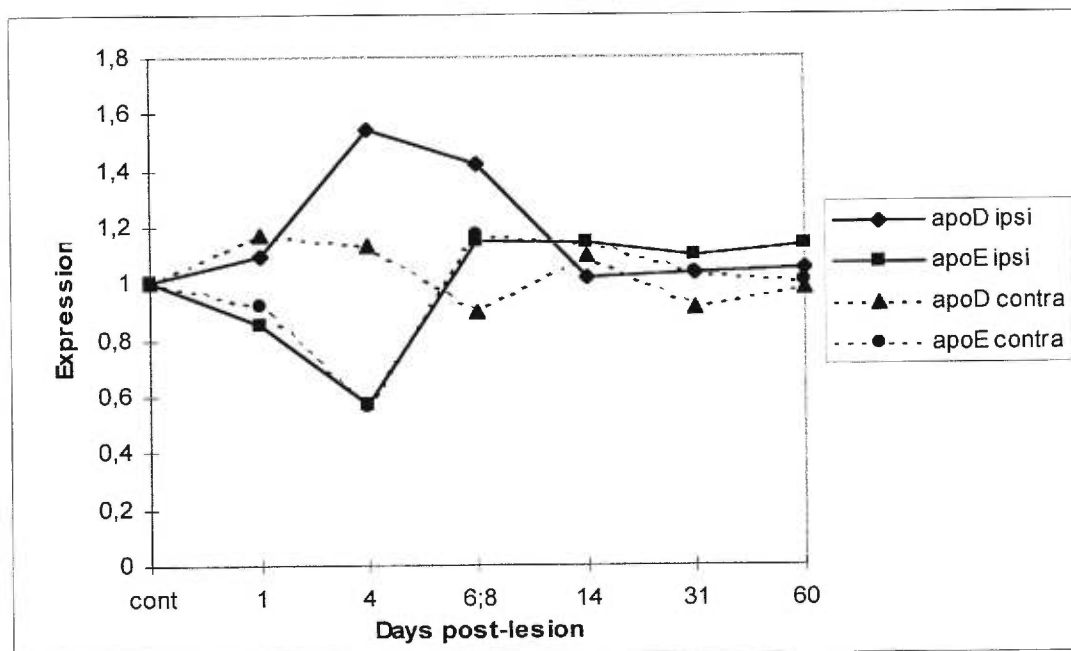
**C**

Figure 4.3: Modulation of apoD and apoE mRNA expression following enthorinal cortex lesioning of normal rat brain.

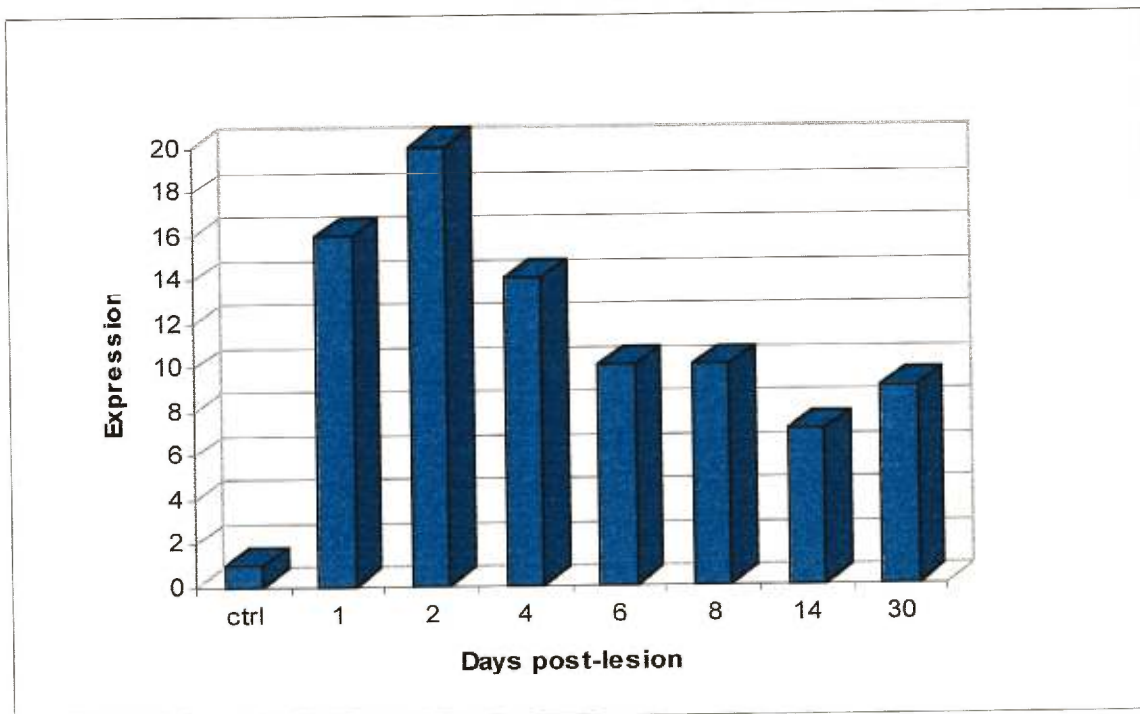
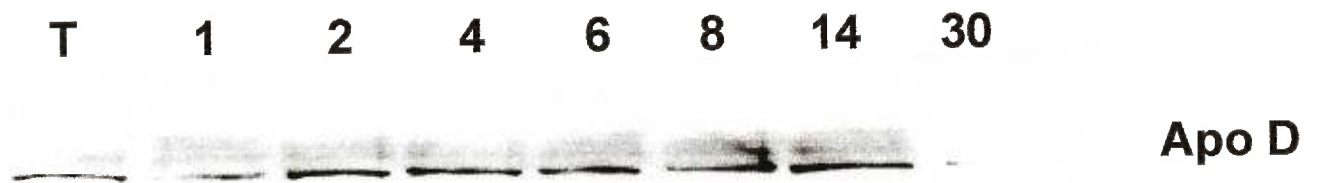


Figure 4.4: Modulation of apoD protein expression following enthorinal cortex lesioning of normal rat brain.

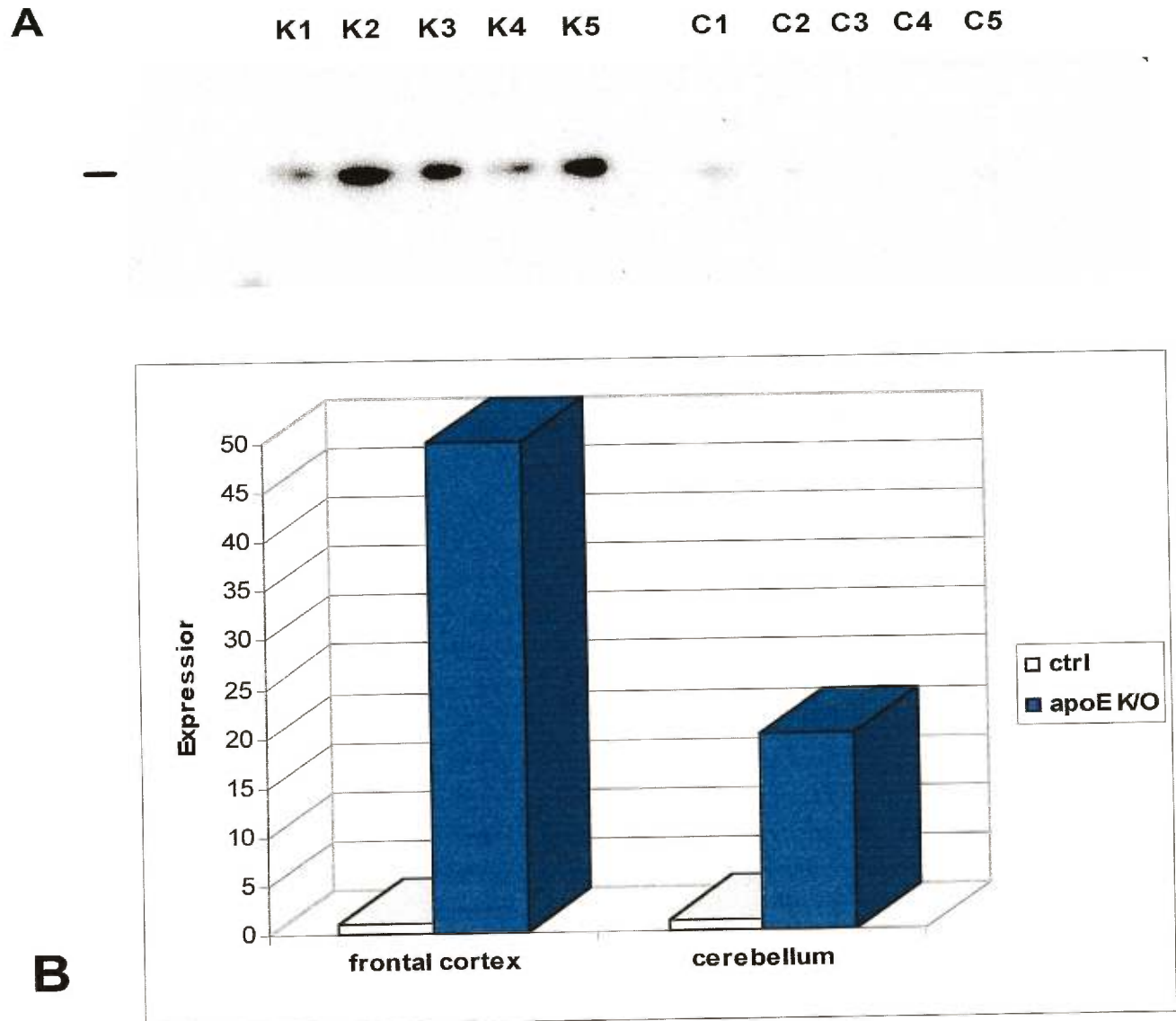


Figure 4.5: Modulation of apoD protein expression in apoE deficient mice compare to normal mice.

CHAPITRE V: DISCUSSION

La première phase de ce projet de recherche portait sur les études de structure-fonction de l'apolipoprotéine D par l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Les modèles établis de la structure tertiaire de l'apoD proposent qu'elle aurait une conformation en tonneau avec une poche à l'intérieur de ce tonneau et qui contiendrait le site de liaison au ligand. En plus de ce site de liaison au ligand, l'apoD posséderait des domaines fonctionnels qui seraient impliqués dans sa fonction physiologique.

Pour confirmer cette structure tridimensionnelle de l'apoD ainsi que pour définir les sites fonctionnels importants, nous avons généré et caractérisé une série d'anticorps monoclonaux. Leur immunoréactivité avec une série de fragments d'apoD exprimés sous forme de protéines de fusion avec la β -galactosidase nous a permis de cartographier les épitopes reconnus par les anticorps en fonction de la structure primaire de l'apoD (voir figure 4.2). Deux de ces anticorps réagissent avec les épitopes situés entre les résidus 7 et 78 alors que 5 autres anticorps reconnaissent plutôt les épitopes situés entre les résidus 128 et 169. L'anticorps D1 pour sa part reconnaît la protéine dans son entier. Étant donné la structure tertiaire prédite pour l'apoD, les anticorps doivent vraisemblablement réagir avec des épitopes non continus en terme de structure primaire mais reconnaissant un épitope conformationnel.

Nos études de compétition pour l'apoD entre les différents anticorps monoclonaux peuvent aussi confirmer la structure compacte de cet antigène. L'anticorps D4 qui est spécifique pour un épitope dont les résidus se situent entre 7 et 78 compétitionne avec les anticorps spécifiques pour les épitopes situés entre les résidus 128 et 169. Plusieurs sites (126-130, 27-31 and 157-159, respectivement) dans le modèle de structure tertiaire d'apoD proposé montrent des portions de résidus qui sont adjacents et donc à proximité spatiale

(Figure 4.5). En se basant sur la structure tertiaire proposée, l'anticorps pourrait ne pas avoir accès au site de liaison du ligand. D'ailleurs, l'absence de blocage du ligand à l'apoD par les anticorps laisse suggérer aussi que les régions formant l'entrée de la poche de liaison soient peu immunogéniques. De plus, nous avons montré qu'un seul anticorps précipitait un maximum de 25% d'apoD marquée à l'iode alors que l'utilisation d'un mélange d'anticorps doublait ce taux de précipitation ce qui montre qu'il existe une hétérogénéité de l'apoD en terme d'expression des epitopes. Il est possible que l'apoD forme des dimères en solution qui rendent certains epitopes partialement inaccessibles aux anticorps. Ces expériences semblent donc confirmer une structure tridimensionnelle globulaire pour l'apoD telle que prédite par la modélisation moléculaire (Peitsch et Boguski, 1990). Il serait important de vérifier néanmoins certains paramètres:

- 1) vérifier le non blocage du site de liaison par les anticorps avec un autre ligand de l'apoD comme par exemple l'acide arachidonique qui présente une forte affinité pour l'apoD.
- 2) l'utilisation d'un mélange d'anticorps dans le test de liaison pourrait peut-être éliminer le problème d'hétérogénéité dans l'expression des epitopes. Dans la même optique, il serait intéressant d'effectuer des tests d'affinité des différents anticorps pour l'apoD.

D'autres expériences sont nécessaires pour mieux comprendre la structure de cette protéine. Premièrement, une cartographie plus fine des sites antigéniques est nécessaire pour mieux délimiter les sites reconnus par les anticorps. Cette cartographie plus fine peut s'effectuer soit à l'aide de peptides synthétiques d'apoD soit à l'aide de fragments plus courts exprimés en protéines de fusion par la bactérie. Deuxièmement, des mutants de l'apoD humaine ont été générés dans le laboratoire par une technique de

mutagénèse dirigée. Ces mutants ont été séquencés et produits. Les mutations ont été choisies par comparaison de séquence de l'apoD dans différentes espèces et par comparaison de séquence des membres des lipocalines. Sept mutants différents ont été obtenus avec des mutations dans les régions susceptibles d'être impliquées dans la capacité de liaison de l'apoD humaine. Ces mutants ont été testés pour leur immunoréactivité avec les différents anticorps (résultats non montrés) et toutes les protéines mutantes sont reconnues par les anticorps. Ce résultat n'est guère surprenant puisque la majorité des mutations introduites dans le gène de l'apoD sont des mutations conservatrices et ne devraient pas affecter la structure globale de cette protéine. De plus, l'ensemble de ces mutations ont pour cible des acides aminés situés à l'intérieur du site de liaison de l'apoD et il est donc peu probable que ces mutations affectent la capacité de reconnaissance des anticorps monoclonaux dont la cible comme expliqué ci-dessus serait plutôt les parois externes de l'apoD. Par contre, il serait très intéressant d'utiliser ces protéines mutantes dans les tests de liaison, cette approche pouvant conduire à l'identification des acides aminés impliqués dans la liaison de l'apoD avec ses divers ligands et permettrait une meilleure compréhension du mécanisme de fixation et de transport effectué par l'apoD.

Les anticorps générés peuvent également servir à identifier le site responsable sur l'apoD de l'association aux lipoprotéines et évidemment peuvent être utilisés pour identifier un récepteur cellulaire de surface pour l'apoD. Les anticorps peuvent être utilisés aussi pour déterminer si l'activité protéolytique qui est présente dans les préparations de l'apoD est vraiment une propriété de l'apoD. Il serait également intéressant de faire les tests d'inhibition de liaison entre le ligand et l'apoD avec un variant de l'apoD. En effet, il existe deux formes distinctes d'apoD humaine suite à un polymorphisme naturel. On retrouve une première forme d'apoD contenant une leucine en position 110 et une deuxième forme où cette leucine est

remplacée par une phénylalanine. La première forme est beaucoup plus abondante naturellement que la forme contenant la phénylalanine (Drayna et al., 1986). Certaines protéines acquièrent de nouvelles caractéristiques suite à la substitution d'un seul acide aminé, il serait donc intéressant de vérifier si ce polymorphisme occasionne des modifications dans la capacité de liaison de l'apoD.

La deuxième partie de ce projet s'intéresse plus au rôle physiologique de l'apoD. Ce rôle comme nous l'avons expliqué dans le chapitre I semble multiple et dépendant tant du tissu, que d'une situation physiologique précise. Étant donné l'importance grandissante des fonctions des apolipoprotéines dans le cerveau (apoE, apoJ etc..) et étant donné l'expression importante de l'apoD dans le cerveau chez plusieurs espèces animales, nous nous sommes intéressés à la fonction de l'apoD dans des situations de neurodégénérescence. Dans le système nerveux central, l'apoE est synthétisée principalement par les astrocytes (Pitas et al., 1987). Certains travaux originaux ont montré l'importance de l'apoE dans la croissance, la régénération neuronale et la synaptogénèse (Mahley, 1988; Boyles et al., 1990). Ces données sont en faveur d'une implication de l'apoE dans le métabolisme lipidique et l'homéostasie du cholestérol dans le cerveau. De plus et bien qu'on attribue le rôle de distribution des lipoprotéines principalement à l'apoE, il semble que l'apoD serait impliquée dans le recyclage du cholestérol durant la régénération des nerfs périphériques. On note en effet que l'apoD est synthétisée localement, ce qui permet d'émettre l'hypothèse que l'apoD jouerait un rôle local important dans la régénération des nerfs. Par contre, dans le SNC, l'apoE est essentielle durant la réinnervation et son absence résulte en une perte synaptique importante (Masliah *et al.*, 1995).

Nous avons donc étudié l'expression de l'apoD dans la maladie d'Alzheimer ainsi que dans plusieurs neuropathologies telles l'accident cérébrovasculaire, le « motoneurone disease » et la méningoencephalite. Ces mesures d'expression d'apoD et simultanément d'apoE ont été effectuées dans l'hippocampe de patients atteints de MA mais surtout dans le LCR de patients atteints ou non de MA. Le LCR contient la majorité des facteurs impliqués dans la formation des plaques amyloïdes et des lésions neurofibrillaires. Parmi ces facteurs se trouvent principalement l'apoE, la protéine tau, le peptide amyloïde β ($A\beta$), mais également l'apoD, J, la transthyréline (TTR), l' α 1-antichymotrypsine.

Nos résultats montrent que parallèlement à la concentration de l'apoE dans le LCR, celle de l'apoD augmente de façon considérable chez les patients atteints de la MA mais aussi chez les patients atteints d'autres pathologies par rapport au groupe contrôle (4.23 ± 1.58 et 3.29 ± 1.35 vs 1.15 ± 0.70 mg/l, avec dans les deux cas $p < 0.0001$) (Fig.2.2). La concentration de l'apoD est positivement corrélée avec la dose de l'allèle ApoE- ϵ 4 ($p < 0.001$) (Fig.2.3).

L'augmentation des apoD et E semble être liée aux caractères communs de la MA et des autres pathologies neurologiques et inflammatoires, probablement en réaction aux dommages cellulaires. Ces résultats suggèrent un rôle de coordination des deux protéines dans la réparation et la régénération neuronale. Etant donné l'appartenance de l'apoD à la famille des lipocalines, elle pourrait assurer le transport de ligand(s) hydrophobe(s) essentiel(s) dans les situations pathologiques ou alternativement l'élimination de substance(s) neurotoxique(s). L'apoD pourrait donc servir de transporteur d'une région du système nerveux vers une autre région en réinnervation. La corrélation positive entre la

concentration de l'apoD dans le LCR et la dose de l'allèle ε4 souligne une interaction probablement de nature métabolique entre les deux marqueurs.

Les mécanismes précis pouvant impliquer les dysfonctions de l'apoE dans la MA ne sont pas encore définis. Tandis que certaines études postulent pour un rôle de l'apoE dans l'élimination de l'amyloïde (Schmechel et al., 1993, Strittmatter et al., 1993), d'autres suggèrent un rôle dans la protection contre la phosphorylation excessive de la protéine tau (Strittmatter et al., 1994), et dans la plasticité neuronale (Poirier et al., 1994). Toutefois, l'association de l'allèle ε4 à 64% des cas de MA (Saunders et al., 1993) suggère un rôle particulier de cet allèle.

L'allèle ε4 de l'apoE est donc le facteur de risque génétique le plus important de la maladie d'Alzheimer. Des implications spécifiques ont été proposées de l'apoE4 dans la genèse des plaques séniles et des lésions neurofibrillaires en dehors de la remobilisation du cholestérol et la réparation des neurones. Afin de mieux comprendre la corrélation positive entre la concentration de l'apoD dans le LCR et la dose de l'allèle ε4, nous avons étudié (voir article en annexe) dans le liquide céphalorachidien (LCR), trois facteurs pouvant être impliqués dans l'amyloïdogénèse, la réparation neuronale et l'intégrité du cytosquelette qui sont respectivement, la transthyrétine, l'apoD et l'actine. La TTR séquestre vraisemblablement le peptide Aβ dans le milieu extracellulaire (Schwarzman et al, 1994) et l'actine, un composant majeur du cytosquelette, impliquée dans la croissance cellulaire, pourrait interagir avec l'apoE (Fleming et al., 1996). Nous avons suivi les variations pathologiques de ces trois protéines simultanément à celles de l'apoE dans le LCR des patients atteints de la MA et des contrôles. Nos résultats montrent une augmentation de la concentration d'apoD et E mais une diminution de celle de la TTR en liaison avec la MA. Quant aux effets de l'allèle ε4, nous avons constaté des relations dose-dépendantes

avec l'augmentation de la concentration de l'apoD, de celle de l'actine et du nombre des plaques séniles. Par ailleurs, la concentration de TTR diminue en relation avec l'abondance des plaques séniles. L'ensemble de nos résultats montrent que l'apoE4 pourrait être impliquée dans une ou plusieurs voies de métabolisme mettant en jeu l'apoD, la TTR et l'actine dans un processus physiopathologique spécifique de la MA.

Trois hypothèses principales concernant l'intervention de l'apolipoprotéine E dans la physiopathologie de la MA ont été avancées:

1) L'apoE a un rôle certain dans la réparation nerveuse périphérique. En cas d'altération nerveuse périphérique, des macrophages sont mobilisés et produisent en grande quantité l'apoE qui participe à la maintenance des membranes de myéline en redistribuant les lipides de dégradation vers les axones en régénération et vers les cellules de Schwann responsables de la remyélinisation par l'intermédiaire des LDL-récepteurs (Goodrum et al, 1991).

2) La deuxième hypothèse, appelée "cascade de l'amyloïde" est proposée dès 1992 par Hardy et Wisniewski. La MA serait due à:

a- Une hyperproduction de peptide $A\beta$ responsable de la formation de substance amyloïde toxique pour le neurone.

b- Une potentialisation de l'effet neurotoxique de l' $A\beta$ sécrétée en quantité physiologique où l'apoE interviendrait probablement. En effet, en réponse aux lésions neuronales physiologiques produites lors du vieillissement, la microglie activée et les astrocytes réactifs produiraient davantage d'apoE par activation de protéines kinases C.

L'hypothèse de Hardy et Wiesniewski (Hardy et al, 1992) est controversée car plusieurs auteurs pensent que l'apoE pourrait être impliquée dans l'élimination de la substance amyloïde physiologiquement produite. Il semble que l'apoE puisse aussi moduler la neurotoxicité de A β en modifiant les taux de cholestérol cellulaire et membranaire en particulier, qui comme les facteurs de croissance, semblent agir sur la fonction neuronale en modulant l'homéostasie calcique. Le cholestérol pourrait contrer les effets neurotoxiques de l'A β , expliquant ainsi l'augmentation de la neurotoxicité de A β dans les zones pauvres en cholestérol telle que la substance grise corticale (Hartmann et al, 1994). Cependant cette hypothèse est démentie par Sparks et al (1994) qui observe, chez des animaux nourris avec une grande quantité de cholestérol (2%) une accumulation d'A β dans les cellules cérébrales, sans induire pour autant l'altération du cytosquelette, indiquant que le cholestérol pourrait avoir une action directe sur le métabolisme de l'APP.

3) La troisième hypothèse met en jeu l'interaction entre l'apoE et la protéine tau. Dans la MA, le cytosquelette neuronal est progressivement détruit et remplacé par des agglomérats de filaments en double hélice (PHF pour Paired Helical Filaments en anglais) qui sont composés en grande partie de protéines tau sous forme hyperphosphorylée. L'assemblage et l'intégrité des microtubules sont inhibés par la phosphorylation de tau, probablement par défaut de liaison de la protéine tau normale à la tubuline dans les microtubules. Les neurones présentant ces dégénérescences neurofibrillaires de filaments en double hélice perdent l'assemblage microtubulaire de leur cytosol et dégèrent. L'apoE est l'un des constituants des DNF des patients présentant une MA (Namba et al, 1991). Quand l'apoE3 est incubée avec la protéine tau, l'apoE3 forme des complexes stables avec la protéine tau non-phosphorylée contrairement à l'apoE4, alors qu'aucune des deux isoformes ne se lie à tau phosphorylée.

Les isoformes E3 et E2 pourraient être des cofacteurs bénéfiques ou des agents séquestrants de la protéine tau en la protégeant de la phosphorylation, ce qui lui permettrait de conserver son action sur les microtubules (Strittmatter et al, 1994). Ce rôle protecteur de l'apoE nécessite sa présence dans le neurone et des études de détection immunohistochimiques démontrent sa présence dans les neurones (Strittmatter et al, 1994).

L'apoD pourrait tout comme l'apoE être impliquée à chacun de ces niveaux: nous avons déjà discuté du rôle de l'apoD en tant que transporteur de lipides et ce rôle au cerveau pourrait se traduire en une fonction de maintenance des membranes de myéline. L'apoD pourrait aussi avoir un rôle dans l'élimination de l'A β qui est un petit composé hydrophobe. Il serait intéressant de faire des études de comarquage avec l'apoD et l'A β afin de vérifier une colocalisation éventuelle. Les études portant sur les dosages d'A β dans le LCR se sont avérées contradictoires mais des études conjointes de plusieurs marqueurs pourraient augmenter la sensibilité des tests. D'autre part, il a été mentionné qu'il existe une corrélation entre l'A β et le cholestérol quoique cette interaction soit encore mal définie. La dynamique est peut-être encore plus complexe que prévue associant également l'apoD en tant que transporteur de cholestérol. Enfin, il serait tout aussi intéressant de vérifier la présence de l'apoD dans les DNF ce qui suggérerait un rôle dans l'assemblage du cytosquelette d'où son augmentation lorsqu'il y a dégénérescence.

La présence d'autres facteurs génétiques est suspectée dans la MA, les études biochimiques et neuropathologiques (Hardy et al., 1985) rapportent dans le cerveau un déficit cholinergique (Ach), une baisse de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) et de la choline-acétyl-transférase (ChAT). La

ChAT est présente en très faible quantité dans le LCR ce qui rend son dosage difficile. Par contre, le LCR contient deux types de cholinestérases: les acétylcholinestérases et les butyrylcholinestérases (BChE) dont les proportions respectives sont de 80% et 20%. Très récemment, Lehman et al, (1997) ont découvert qu'un variant génétique de la butyrylcholinestérase (BCHE-K) est associé avec l'allèle $\epsilon 4$ de l'apoE dans la MA. Leurs résultats montrent que les sujets porteurs des deux allèles BCHE-K et $\epsilon 4$ ont 30 fois plus de risque d'avoir la MA, tandis que le variant BCHE-K à lui seul augmente de 7,5 fois ce risque.

La MA est une pathologie complexe et très hétérogène, pour comprendre la fonction de l'apoD dans cette pathologie et dans le système nerveux en général, d'autres expériences sont nécessaires. Des études de corrélation entre l'expression de l'apoD et d'autres protéines impliquées dans la MA seraient une première étape pour mieux cerner la dynamique. Nous proposons notamment d'étudier la corrélation entre l'apoD et l'A β , entre l'apoD et les protéines tau ainsi qu'entre l'apoD et les sujets porteurs des deux allèles BCHE-K et $\epsilon 4$.

Plusieurs études ont montré des augmentations d'expression d'apoD dans des modèles animaux:

- 1) chez des souris montrant une neurodégénération progressive (modèle du Niemann Pick Disease de type C), les niveaux tant de la protéine que du messenger sont augmentés dans le cervelet (Yoshida et al.).
- 2) l'apoD augmente également dans l'hippocampe de rats ayant reçus de l'acide kaïnique qui induit des lésions (Ong et al., 1997).

Nous avons aussi étudié l'expression de l'apoD dans un modèle animal de neurodégénérescence soit le rat ECL (enthorhinal cortex lesioning). Les lésions du cortex entorhinal entraînent une dégénérescence de la voie perforante allant du cortex entorhinal à l'hippocampe par destruction des cellules pyramidales CA1. La conséquence est une activation des astrocytes et une hyperproduction d'apoE favorisant la repousse des cellules pyramidales hippocampiques glutaminergiques et des cellules cholinergiques du septum (Poirier et al, 1991). Dans ce modèle, on observe une augmentation de l'ARNm de l'apoE dans l'hippocampe avec un délai superposable à l'augmentation de la tubuline1 impliquée dans les mécanismes de repousse neuronale (Poirier et al, 1991). L'apoE aurait donc un effet neuroprotecteur due à une augmentation de la disponibilité des lipides recyclés à partir des membranes des neurones endommagés.

Nos résultats montrent que le messager d'apoD dans l'hippocampe ipsilatéral (i.e. du côté de la lésion) augmente rapidement suite à la lésion et atteint un pic d'expression entre 1 et 4 jours après la lésion (fig.3.3). L'augmentation de la protéine est encore plus précoce avec un pic d'expression entre 1 et 2 jours après la lésion et une augmentation allant de 16 à 20 fois le niveau d'expression retrouvé chez les rats non lésionnés (fig.3.4). L'expression d'apoE pour sa part, est plus tardive que celle observée pour l'apoD et beaucoup moins forte. Nous avons également décidé d'étudier l'expression d'apoD chez des souris déficientes pour le gène de l'apoE (apoE knock/out ou k/o). Les résultats (fig.3.5) montrent une augmentation d'apoD de 50 fois dans le cortex frontal et de 20 fois dans le cervelet par rapport à l'expression d'apoD retrouvée chez les souris sauvages. L'apoD pourrait jouer un rôle compensatoire en absence d'apoE et serait alors le principal transporteur de lipides dans le système nerveux.

D'autres études chez les modèles animaux sont nécessaires pour comprendre l'implication de l'apoD dans le cerveau tant dans des situations physiologiques normales que pathologiques. L'étude de l'expression de l'apoD chez des souris surexprimant le gène de l'apoE4 (souris transgéniques E4) ainsi que l'étude chez des souris déficientes pour le gène de l'apoE devraient amener des éclaircissements sur la fonction de l'apoD dans le cerveau et dans les neuropathologies. En particulier, il faudrait localiser de façon immunohistochimique l'expression de l'apoD chez ces deux modèles puisque seules deux régions du cerveau ont été étudiées dans nos travaux chez les souris apoE k/o. De plus, il serait intéressant de suivre l'expression de l'apoD chez des souris apoE k/o chez lesquelles on induit une neurodégénérescence. La construction de souris apoD (k/o) est présentement en cours dans le laboratoire et amènera vraisemblablement beaucoup d'informations sur le rôle de cette protéine. Il serait très intéressant d'effectuer du phénotypage chez ces animaux et surtout d'induire une neurodégénérescence et d'observer les processus de réparation qui s'établissent par rapport à des souris non déficientes pour le gène de l'apoD.

L'apoD pourrait avoir un rôle important de transport des hormones stéroïdiennes dans le cerveau où on la retrouve en quantités importantes lors de situations pathologiques (Patel *et al.*, 1995; Terrisse *et al.*, 1998). On sait que la formation de synapses au niveau du cerveau est modulée par la liaison de certains stéroïdes à leurs récepteurs, comme par exemple certains estrogènes et certains androgènes (McEwen et Woolley, 1994). On sait également qu'au niveau de l'hippocampe, on retrouve des récepteurs de progestérone qui sont induits par l'estrogène. Or, l'estrogène et la progestérone sont des modulateurs de l'expression de l'apoD (Lambert *et al.*, 1993; McEwen et Woolley, 1994; Patel *et al.*, 1995). Il est donc possible que l'apoD, dont la synthèse est augmentée par l'estrogène, apporte la progestérone vers son récepteur afin de lui permettre de favoriser la

formation de nouvelles synapses à la suite d'un dommage. On ne sait cependant pas si l'apoD elle-même a un récepteur au niveau du cerveau, il serait important d'identifier la présence d'un tel récepteur ainsi que le signal d'induction pour l'expression d'apoD. Le rôle de l'apoD au niveau du SNC pourrait également être de stabiliser la LCAT durant l'estérification du cholestérol ou d'autres stéroïdes. On sait en effet que la LCAT est exprimée dans le cerveau (Lesczynski et al., 1989; Lesczynski et Schafer, 1990). Enfin sachant que l'acide arachidonique est un ligand potentiel de l'apoD et que les métabolites de l'acide arachidonique modulent la sécrétion du précurseur de la protéine composant les plaques amyloïdes, il est possible que l'apoD apporte l'acide arachidonique et contribue à la formation de ces plaques indirectement (Kinouchi et al., 1995).

Malgré des études qui ont commencé il y a plus de 25 ans, très peu d'informations sont disponibles sur les allèles de l'apoD dans les populations humaines et sur les relations pouvant exister entre cette protéine et certaines maladies. Des études des polymorphismes seraient à entreprendre pour éventuellement associer un polymorphisme avec une implication précise de l'apoD dans un état physiologique particulier. Ces travaux ont démontré que l'apoD est un marqueur de dégénérescence et pourrait être utilisé comme suivi dans les thérapies. En effet, il existe plusieurs stratégies de thérapies contre les maladies neurodégénératives et la tendance actuelle focalise vers la production de molécules neuroprotectrices bloquant la neurotoxicité de substances telles l'A β . L'apoD pourrait servir de marqueur pour suivre l'efficacité de ses différentes thérapies où même il pourrait avoir association d'un polymorphisme de l'apoD avec une thérapie plus efficace qu'une autre.

Bibliographie

Alaupovic, P. et Fernandes, J., 1985. The serum apolipoprotein profile of patients with glucose-6-phosphatase deficiency. *Pediatr.Res.*, 19, 380-384.

Alaupovic, P., McConathy, W.J., Curry, M.D., Magnani, H.N., Torsvik, H., Berg, K. et Gjone, E., 1974. Apolipoproteins and lipoprotein families in familial lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.* 33, supplé137, 83-87.

Albers, J.J., M.C. Cheung, S.L. Ewens, et J.H. Tollefson. 1981. Characterization and immunoassay of apolipoprotein D. *Atherosclerosis* 39: 395-409.

Albers, J.J., Cheung, M.C., Ewens, S.L. et Tollefson, J.H., 1981. Artherosclerosis, Characterization and immunoassay of apolipoprotein D. 39 (1981) pp395-409.

Albers, J.J., Taggart, H., Applebaum-Bowden, D., Haffner, S., Chesnut, C. et Hazzard, W. 1984. Reduction of lecithin-cholesterol acyltransferase, apolipoprotein D and the Lp(a) lipoprotein with the anabolic steroid stanozolol. *Biochim.Biophys.Acta* 795,293-296.

Amouyel, P., Brousseau, T., Fruchart, J.C. et Dallongeville, J. 1993. Apolipoprotein E- ϵ 4 allele and Alzheimer's disease. *Lancet*, 342: 1309.

Aspinall, J.O., Bentel, J.M., Horsfall, D.J., Haagensen, D.E., Marshall, V.R. et Tilley, W.D., 1995. Differential expression of apolipoprotein D and prostate specific antigen in benign and malignant prostate tissues. *J.Urology* 154: 622-628.

Ayrault-Jarrier, M., Levy, G et Polonovski, J., 1963. Etude des Alpha-apolipoprotéines sériques humaines par immunoélectrophorèse, Bull. Soc. Chim. Biol., 45: 703-713.

Balbin, M, Freije, J.M.P., Fueyo, A., Sanchez, L.M. et Lopez-Otin, C., 1990. Apolipoprotein D is the major protein component in cyst fluid from women with human breast gross cystic disease, Biochem. J., 271: 803-807.

Balbin, M., Freije, J.M., Fueyo, A., Sanchez, L. et Lopez-Otin, C., 1990. Apolipoprotein D is the major protein component in cyst fluid from women with human breast cystic disease. Biochem.J. 271: 803-807.

Berr, C., Hauw, J.J., Delaere, P., Duyckaerts, C. et Amouyel, P. 1994. Apolipoprotein E allele ϵ 4 is linked to increased deposition of the amyloid β -peptide (A β) in cases with or without Alzheimer's disease. Neurosci Lett, 178: 221-224.

Bertrand, P., Poirier, J., Oda, T., Finch, C. et Pasinetti, G. 1995 Association of apolipoprotein E genotype with brain levels of apolipoprotein E and apolipoprotein J (clusterin) in Alzheimer disease. Molec Brain Res 33: 174-178.

Bishop,R.E. et Weiner,J.H., 1996. Outlier lipocalins more than peripheral. Trends Biochem.Sci. 21: 127.

Bishop,R.E., Penfold, S.S., Frost,L.S., Hóltje,J.V. et Weiner,J.H., 1995. Stationary phase expression of a novel *Escherichia coli* outer membrane lipoprotein and its relationship with mammalian apolipoprotein D. J.Biol.Chem. 270 (40) : 127.

Blais, Y., Sugimoto, K., Carrière, M.-C., Haagensen, D.E., Labrie, F. et Simard, J., 1994. Potent stimulatory effect of interleukin-1 α on apolipoprotein D and gross cystic disease fluid protein-15 expression in human breast-cancer cells, *Int. J. Cancer*, 59: 400-407.

Blais, Y., Sugimoto, K., Carrière, M.-C., Haagensen, D.E., Labrie, F. et Simard, J., 1995. Interleukin-6 inhibits the potent stimulatory action of androgens, glucocorticoids and interleukin -1 α on apolipoprotein D and GCDFP-15 expression in human breast cancer cells. *Int.J.Cancer* 62: 732-737.

Blanco-Vaca,F. et Pownall,H.J., 1993. Disulfide linked dimers of apolipoprotein D in urine. *Electrophoresis* 14: 1086-1087.

Bojanovsky, D., Alaupovic, P., McConathy, W.J. et Kelley, J.L., 1980. Isolation and partial characterization of apolipoprotein D and lipoprotein D from baboon plasma. *FEBS Lett.*, 112: 251-254.

Borghini, I., Barja, F., Pometta, D. et James, R.W. 1995. Characterization of subpopulations of lipoprotein particles isolated from human cerebrospinal fluid. *Biochim. Biophys. Acta* 1255: 192-200.

Boyles, J.K., L.M. Kosik et M.R. Wardell. 1989. Apolipoprotein D is synthesized by neural tissue and accumulates in the regenerating nerve. *Supplement to Circulation: Abstracts from the 62nd Scientific Sessions* 80(4), II-385.

Boyles, J.K., Notterpek, L.M. et Anderson L.J., 1990b. Accumulation apolipoproteins in the regenerating and remyelinating mammalian peripheral nerve. Identification of apolipoprotein D, apolipoprotein A-IV, apolipoprotein E and apolipoprotein A-I, *J. Biol. Chem.*, 265: 17805-17815.

- Boyles, J.K., Notterpek, L.M., Wardell, M.R. et Rall Jr., S.C., 1990a. Identification, characterization, and tissue distribution of apolipoprotein D in the rat, *J. Lipid Res.*, 31: 2243-2256.
- Bradley, W.A., Gianturo, S.H. et Segrest, J.P., 1996. Plasma lipoproteins. Part C: quantitation. *Methods in enzymology* 263:3-49
- Breckenridge, W.C., Little, J.A., Alaupovic, P., Wang, C.S., Kuksis, A., Kakis, G., Lindgren, F. et Gardiner, G., 1982. Lipoprotein abnormalities associated with a familial deficiency of hepatic lipase. *Arteriosclerosis*, 45, 161-179.
- Camato, R., Marcel, Y.L., Milne, R.W., Lussier-Cacan, S. et Weech, P.K. 1989. Protein Polymorphism of a Human Plasma Apolipoprotein D Antigenic Epitope. *J. Lipid Res.* 30: 865-875.
- Cofer, S et Ross, S., 1996. The murine gene encoding apolipoprotein D exhibits a unique expression pattern as compared to other species. *Gene*, 171: 261-263
- Diedrich, J.F., Minnigan, H. et Carp, R.I., 1991. Neuropathological changes in Scrapie and Alzheimer's disease are associated with increased expression of apolipoprotein E and Cathepsin D in astrocytes. *J. Virol.* 65: 4759-4768.
- Diez-Itza, I., Vizoso, F., Merino, A.M., Sanchez, L.M., Tolviva, J., Fernandez, J., Rubial, A et Lopez-Otin, C., 1994. Expression and prognostic significance of apolipoprotein D in breast cancer, *Am. J. Pathol.*, 144: 310-320.
- Dilley, W.G., Haagensen, D.E., Cox, C.E. et Wells S.A.Jr., 1990. Immunologic and steroid binding properties of the GCDFP-24 protein

isolated from human gross cystic disease fluid, *Breast Cancer Res. and Treatment.*, 16: 253-260.

Dolphin, P., 1985. Lipoprotein metabolism and the role of apolipoproteins as metabolic programmers. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 63: 850-869.

Drayna, D., Fielding, C., McLean, J., Baer, B., Castro, G., Chen, E., Comstock, L., Henzel, W., Kohr, W., Wion, K. et Lawn, R., 1986. Cloning and expression of human apolipoprotein D cDNA. *J. Biol. Chem.* 261: 16535-16539.

Drayna, D.T., J.W. McLean, K.L. Wion, J.M. Trent, H.A. Drabkin, et R.M. Lawn. 1987a. Human Apolipoprotein D Gene: Gene Sequence, Chromosome Localization, and Homology to the $\alpha_2\text{I}$ -Globulin Superfamily. *DNA* 6: 199-204.

Drayna, D., Scott, J.D. et Lawn, R. 1987b. Multiple RFLPs at the human apolipoprotein D (ApoD) locus. *Nucleic Acids Res.* 15, p9617.

Emond, J., Korsak, R.A., Moroow, J.W., Torok-Both, G. et Catlin, H.D. 1991. Dietary cholesterol and the origin of cholesterol in the brain of developing rats. *J. Nutr.* 121: 1323-1330.

Elshourbagy, N.A., Liao, W.S., Mahley, R.W. et 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 rat and marmosets, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 203-207.

Escribano, J., Ortego, J. et Coca-Prados, M. 1995. Isolation and characterization of cell-specific cDNA clones from a subtractive library of the ocular ciliary body of a single normal human donor: transcription and synthesis of plasma proteins. *J. Biochem.* 118: 921-931.

Fielding, P.E., et C.J. Fielding. 1980. A cholesteryl ester transfer complex in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 3327-3330.

Fleming, L.H., Weisgraber, K.H., Strittmatter, W.J., Troncosco, J.C. et Johnson, G.N.W. 1996. Differential binding of apolipoprotein E isoforms to tau and other cytoskeletal proteins. *Exp Neuro*, 138: 252-260.

Flower, D., 1996. The lipocalin protein family: structure and function, *Biochem.J.*, 318: 1-14.

Gachon, A.-M., 1994. Lipocalines et transport de ligands hydrophobes. *Medecine/Sciences* 10: 22-29.

Goodrum, J. F. 1993. Cholesterol synthesis in regenerating peripheral nerve is not influenced by serum cholesterol levels. *J Neurochem* 60: 1564-1566.

Goodrum, J.F., Bouldin, T.W., Zhang, S.H., Maeda, N., et Popko, B. 1995. Nerve regeneration and cholesterol reutilisation occur in the absence of apolipoproteins E and A-I in mice. *J Neurochem* 64: 408-416.

Gueguen, R., Visvikis, S., Steinmetz, J., Siest, G. et Boerwinkle, E. 1989. An analysis of genotype effects and their interactions using the apolipoprotein E polymorphism and longitudinal data. *Am J Hum Genet*, 45: 793-802.

Hardy, J.A. et Higgins, G.A. 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256: 184-185.

- Hartmann, H., Eckert, A. et Muller, W.E. 1994. Apolipoprotein E and cholesterol affect neuronal calcium signalling: The possible relationship to β -amyloid neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Comm*, 200: 1185-1192.
- Holmquist L. 1990. Identification and quantification of apolipoproteinD in normal human urine. *Electrophoresis* 11: 93-94.
- Holzfeind P, Merschak P, Dieplinger H et Redl B., 1995. The human lacrimal gland synthesizes apolipoprotein D mRNA in addition to tear prealbumin mRNA, both species encoding members of the lipocalin superfamily. *Exp. Eye Res.* 61 (4): 495-500.
- Hu, Z.Y., Bourreau, E, Jung-Testas, I., Robel, P. et Baulieu, E.-E. 1987. Neurosteroids: Oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 84: 8215-8219.
- Huber, R., M. Schneider, O. Epp, I. Mayr, A. Messerschmidt et J. Pflugrath. 1987b. Crystallization, Crystal Structure Analysis and Preliminary Molecular Model of the Bilin Binding Protein from the Insect Pieris brassicae. *J. Mol. Biol.* 195: 423-434.
- Huber,R., Schneider,M., Mayr,I., Muller, R., Deutzmann,R., Zuber, H., Falk,H. et Kayser,H., 1987a. Molecular structure of the Bilin-binding Protein (BBP) from *Pieris brassicae* after refinement at 2.0 Å resolution. *J.Mol. Biol.* 198: 499-513.
- Ikeda, T., Sugiuchi, H., Senba, U., Shibuya,Y., Uji, Y., Okabe, H. et Araki, S. 1993, Preliminary findings on the variation of serum apolipoprotein levels in neural degenerative disorders. *J Clin Lab Anal* 7: 1-4.
- Illingworth,D.R., Connor,W.E. et Alaupovic,P.,1981. High density lipoprotein metabolism in a patient with abetalipoproteinemia. *Ann.Nutr.Metab.* 25, 1-10

Juvernics, H. et Morell, P. 1995. Cholesterol for synthesis of myelin is made locally, not imported into the brain. *J. Neurochem*, 64: 895-901.

Kesner, L., Yu, W. et Bradlow, H.L. 1990. Cyst fluid proteases. *Ann, NY Acad. Sci.* 586: 198-203.

Kinouchi, T., Ono, Y., Sorimachi, H., Ishiura, S., et Suzuki, K. 1995. Arachidonate metabolites affect the secretion of an N-terminal fragment of Alzheimer's disease amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Comm* 209: 841-849.

Kostner, G.M. et Steyer, E. 1988. Activation of lecithin-cholesterol acyltransferase by apolipoprotein D: comparison of proteoliposomes containing apolipoprotein D, A-I or C-I. *Biochim. Biophys. Acta* 958: 484-491.

Lagarde, M. 1988. Prostaglandins, biology and chemistry of prostaglandins and related eicosanoids. Curtis-Prior, P.B. Ed., Churchill-Livingstone: 147-151.

Lambert, J., Provost, P., Marcel, Y.L. et Rassart, E., 1993. Structure of the human apolipoprotein D gene promoter region. *Biochim. Biophys. Acta* 1172: 190-192.

Lane et McConathy, 1983. Factors affecting the lipid and apolipoprotein levels of cord sera. *Pediatr Res* 1983 Feb;17(2):83-91

Lea, O.A., 1988. Binding properties of progesterone-binding cyst protein, PBCP, *Steroids*, 52: 337-338.

Lehman, D.J., Johnston, C. et Smith, A.D. 1997. Synergy between the genes for butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein ϵ 4 in late-onset confirmed Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, 6(11): 1933-1936.

Lesczynski, D.E. et Schafer, R.M. 1990. Nonspecific and metabolic interaction between steroid hormones and human plasma lipoproteins. *Lipids* 25: 711-718.

Lesczynski, D.E., Schafer, R.M., Perkins, E.G., Jerrell, J.P. et Kummerow, F.A. 1989. Esterification of dehydroepiandrosterone by plasma HDL. *Biochim Biophys Acta* 1014: 90-97.

Lopez-Boado, Y.S., Klaus, M., Dawson, M. et Lopez-Otin, C., 1996. Retinoic acid-induced expression of apolipoprotein D and concomitant growth arrest in human breast cancer cells are mediated through a retinoic acid receptor RAR-dependent signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 271 (50): 32105-32111.

Lopez-Boado, Y.S., Tolivia, J. et Lopez-Otin, C., 1994. Apolipoprotein D gene induction by retinoic acid is concomitant with growth arrest and cell differentiation in human Breast Cancer cells, *J. Biol. Chem.*, 269: 26871-26878.

Masliah, E., Mallory, M., Ge, N., Alford, M., Veinbergs, I. et Roses, A.D. 1995. Neurodegeneration in the central nervous system of apo E-deficient mice. *Exp Neurol* 136: 107-122.

May, C., Kaye, J.A., Atack, J.R., Schapiro, M.B., Friedland, R.P. et Rapoport, S.I. 1990. Cerebrospinal fluid production is reduced in healthy aging. *Neurol*, 40: 500-503.

McConathy, W.J., et P. Alaupovic. 1973. Isolation and partial characterization of apolipoprotein D; a new protein moiety of the human plasma lipoprotein system. *FEBS Lett.* 37: 178-182.

McConathy, W.J., et P. Alaupovic. 1976. Studies on the isolation and partial characterization of apolipoprotein D and lipoprotein D of human plasma. *Biochemistry* 15: 515-520.

McEwen, B.S., et Woolley C.S. 1994. Estradiol and progesterone regulate neuronal structure and synaptic connectivity in adult as well as developing brain. *Exp Gerontol* 29: 431-436.

Milne, R.W., Rassart, E. et Marcel, Y., 1993. Molecular biology of apolipoprotein D, *Current Opinion in Lipidology*, 4: 100-106.

Morais-Cabral, J.H.M., Atkins, G.L., Sanchez, L.M., Lopez-Boado, Y.S., Lopez-Otin, C. et Sawyer, L., 1995. Arachidonic acid binds to apolipoprotein D: implications for the protein's function, *FEBS Lett.*, 366: 53-56.

Morfin, R., Young, J., Corpéchet, C., Egestad, B., Sjøvall, J. et Baulieu, E.-E., 1992. Neurosteroids: pregnenolone in human sciatic nerves, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 6790-6793.

Morton, R.E. et Zilversmith, D.B. 1981. A plasma inhibitor of triglyceride and cholesteryl ester transfer activities. *J. Biol. Chem.* 256: 11992-11995.

Namba, Y., Tomonaga, M. et Kawasaki, H., 1991. Apolipoprotein E reactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 541:163-166.

Ong, W.Y., He, Y., Suresh, S. et Patel, S.C., 1997. Differential expression of apolipoprotein D and apolipoprotein E in the kainic acid-lesioned rat hippocampus, *Neuroscience*, 79(2): 359-367.

Patel, S.C., Asotra, K., Patel, Y., McConathy, W.J., Patel, R.C. et Suresh, S., 1995. Astrocytes synthesize and secrete the lipophilic ligand carrier apolipoprotein D, *NeuroReport*, 6: 653-657.

Pearlman, W.H., Gueriguian, J.L. et Sawyer, M.E., 1973. A specific progesterone-binding component of human breast cyst fluid. *J.Biol.Chem.* 248: 5736-5741.

Peitsch, M.C. et Boguski, M.S., 1989. Is apolipoprotein D a mammalian Bilin-Binding Protein?, *The New Biologist*, 2(2): 197-206.

Pitas R.E., Boyles J.K., Lee S.H., Hui D. et Weisgraber K.H. 1987. Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E(LDL) receptors in the brain. *J. Biol. Chem.*, 262: 14352-14360

Poirier, J. 1994. Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease. *TINS* 17: 525-530.

Poirier, J., Davignon, J., Bouthillier, D., Kogan, S., Bertrand, P., et Gauthier, S. 1993. Apolipoprotein E polymorphisme and Alzheimer's disease. *Lancet* 342: 697-699.

Popko, B., Goodrum, J.F., Bouldin, T.W., Zhang, S.H. et Maeda, N. 1993. Nerve regeneration occurs in the absence of apolipoprotein E in mice. *J Neurochem* 60: 1155-1158.

Provost, P.R., Marcel, Y.L., Milne, R.W., Weech, P.K. et Rassart, E., 1991b. Apolipoprotein D transcription occurs specifically in non proliferating quiescent and senescent fibroblast cultures, *FEBS Lett.*, 290: 139-141.

Provost, P.R., Tremblay, Y., El-Amine, M. et Bélanger, A., 1995. Guinea pig apolipoprotein D RNA diversity, and developmental and gestional modulation of mRNA levels, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 109: 225-236.

Provost, P.R., Villeneuve, L., Weech, P.K., Milne, R.W., Marcel, Y.L. et Rassart, E., 1991a. Localization of the major sites of rabbit apolipoprotein D gene transcription by in situ hybridization, *J. Lipids Res.*, 32: 1959-1970.

Provost, P.R., Weech, P.K., Tremblay, N.M., Marcel, Y.L. et Rassart, E., 1990. Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of rabbit apolipoprotein D, *J. Lipids Res.*, 31: 2057-2065.

Rall, S.C., Weisgraber, K.H. et Mahley, R.W. 1992. Apolipoprotein E: the complet amino acid sequence, *J Lipid Res*, 33: 447-454.

Rebeck, G., Reiter, J., Strickland, D. et Hyman, B.T., 1993. Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron*, 11 pp575-580.

Rebeck, G.W. 1997. Potential biological mechanisms of ApoE in Alzheimer's disease. In *Molecular mechanism of dementia*, Wasco, W. and Tanzi, R.E. (Ed), Humana Press Inc, Totowa, NJ, USA, pp. 21-37.

Reiber, H. 1994. Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF)- a concept common to normal blood barrier function and to dysfunction in neurological diseases, *J Neuro Sci*, 122: 189-203.

Roses, A., Saunders, A., Corder, E., Pericak-Vance, S., Han, S., Einstein, G., Hulette, C., Schmechel, D., Holsti, M., Huang, D., Risch, N., Haines, J., Goedert, M., Jakes, R., Dong, L., Weisgraber, K. et Strittmatter, W., 1995. Influence of the susceptibility genes apolipoprotein E4 and apolipoprotein E2 on the rate of disease expressivity of late-onset Alzheimer disease. *Drug Res.* 45: 413-417.

Salen, G., Berginer, V., Shore, V., Horak, I., Horak, E., Tint, S. et Shefer, S. 1987. Increased concentrations of cholestanol and apolipoprotein B in the cerebrospinal fluid of patients with cerebrotendinous xanthomatosis. *N Engl J Med* 316: 1233-1238.

Sanchez, L.M., Diez-Itza, I., Vizoso, F. et Lopez-Otin, C. 1992a. Cholesterol and apolipoprotein D in gross cystic disease of the breast. *Clin. Chem.* 38(5): 695-698.

Sanchez, L.M., Vizoso, F., Diez-Itza, I. et Lopez-Otin, C. 1992b. Identification of the major protein components in breast secretions from women with benign and malignant breast cancer diseases. *Cancer Res.* 52: 95-100.

Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D., George-Hyslop, P.H., Pericak-Vance, M.A., Joo, S.H., Rosi, B.L., Gusella, J.F., Crapper-MacLachlan, D.R., Alberts, M.J. et al. 1993. Association of apolipoprotein E allele ϵ 4 with the late onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*, 43: 1467-1472.

Schellenberg, G.D., Bird, T.D., Wijsman, E.M., Orr, H.T., Anderson, L., Nemens, E., White, J.A., Bonnycastle, L., Weber, J.L., Alonso, M.E. et al., 1992. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* 258 (5082): 668-671.

Schmelchel D.E., Saunders A.M., Strittmatter W.J. et al., 1993. AD increased amyloid β amyloid-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late onset Alzheimer's Disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 9649-9653.

Schwarzman, A.L., L. Gregori, M.P., Vitek, S., Lyubski, W.J., Strittmatter, J.J., Enghilde, R., Bhasin, J., Silverman, K.H., Weisgraber, P.K., Coyle, M.G., Zagorski, J., Talafous, M., Eisenberg, A.M., Saunders, A.D., Roses, A. et Goladgaber, D. 1994. Tranthyretin sequesters amyloid β protein and prevents amyloid formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 8368-8372.

Séguin, D., Desforges, M. et Rassart, E., 1995. Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of mouse apolipoprotein D, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 30: 242-250.

Shen, B.W., Scanu, A.M. et Kézdy, F.J. 1977. Structure of human serum lipoproteins inferred from compositional analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 837-841.

Simard, J., Veilleux, R., de Launoit, Y., Haagensen, D.E. et Labrie, F., 1991. Stimulation of apolipoprotein D secretion by steroids coincides with inhibition of cell proliferation in human LNCaP prostate cancer cells, *Cancer Res.*, 51: 4336-4341.

Simard, J.; Dauvois, S.; Haagensen, D.E.; Levesque, C., Merand, Y. et Labrie, F., 1990. Regulation of progesterone-binding breast cyst protein GCDP-24 secretion by estrogens and androgens in human breast cancer cells: a new marker of steroid action in breast cancer, *Endocrinology*, 12 : 3223-31.

Simard, J.; de Launoit, Y.; Haagensen, D.E. et Labrie, F., 1992. Additive stimulatory action of glucocorticoids and androgens on basal and estrogen-repressed apolipoprotein-D messenger ribonucleic acid levels and secretion in human breast cancer cells, *Endocrinology*, 130: 1115-21.

Smith, K.M., Lawn, R.M. et Wilcox, J.N., 1990. Cellular localization of apolipoprotein D and lecithin:cholesterol acyltransferase mRNA in rhesus monkey tissues by in situ hybridization, *J. Lipids Res.*, 31: 995-1004.

Snipes, G.J., McGuire, C.B., Norden, J.J. et Freeman, J.A. 1986. Nerve injury stimulates the secretion of apolipoprotein E by nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83: 1130-1134.

Sparks, D.L., Scheff, W., Hunsaker, J.C., Hiuachen, L.I.U., Landers, T. et Gross, D.R. 1994. Introduction of Alzheimer-like β -amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. *Exp neurol*, 126: 88-94.

Spreyer, P., Schaal, H., Kuhn, G., Rothe, T., Unterbeck, A., Oleck, K. et Muller, H.W., 1990. Regeneration-associated high levels expression of apolipoprotein D mRNA in endoneurial fibroblasts of periferal nerve, *EMBO J.*, 9: 2479-2484.

Strittmatter, W., Saunders, A., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S. et Roses, A.D., 1993. Apolipoprotein E: High-avidity binding to β -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer's Disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1977-1988.

Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Goedert, M., Weisgraber, K.H., Dong, L.M., Jakes, R., Huang, D.Y., Perikak-Vance, M., Schmechel, D et Roses, A.D. 1994. Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with

microtubule-associated protein tau: implications for Alzheimer disease, *Proc Natl Acad Sci USA*, 91(23): 11183-11186.

Strittmatter, W.J., Weisgraber, K.H., Goebert, M., Saunders, A.M., Huang, D., Corder, E.H., Dong, L.M., Jakes, R., Alberts, M.J., Gilbert, J.R., Schmechel, D.E., Perikak-Vance, M.A. et Roses, A.D. 1994. Microtubule instability and paired helical filament formation in the Alzheimer disease are related to apolipoprotein E genotype, *Exp Neurol*, 125: 163-171.

Suresh, S., Yan, Z., Patel, R.C., Patel, Y.C. et Patel, S.C., 1998. Cellular cholesterol storage in the Niemann-Pick disease type C mouse is associated with increased expression and defective processing of apolipoprotein D. *J. Neurochem.* 70: 242-251.

Terrisse, L., Poirier, J., Bertrand, P., Merched, A., Siest, G., Milne, R.W. et Rassart, E., Increased levels of apolipoprotein D in cerebrospinal fluid and hippocampus of Alzheimer's patients, *J. Neurochem.*, 71:4 (1998).

Vieira, V., Lindstedt, K., Schneider, W. et Vieira, P.M. 1995 Identification of a circulatory and oocytic avian apolipoprotein D. *Mol. Rep. Dev.* 42:443-446.

Von Euler, U.S. 1988. Prostaglandins, biology and chemistry of prostaglandins and related eicosanoids. Curtis-Prior, P.B. Ed., Churchill-Livingstone: 1-7.

Weech, P.K., Camato, R., Milne, R.W. et Marcel, Y.L. (1986) Apolipoprotein D and Cross-reacting Human Plasma Apolipoproteins Identified using Monoclonal Antibodies. *J. Biol. Chem.* 261: 7941-7951.

Weinberg,R.B. 1994. Identification of functional domains in the plasma apolipoproteins by analysis of inter-species sequence variability. *J.lipid.Res.*, 35: 2212-2222.

Yamada, T., Kondo, A., Takamatsu, J.I., Tateishi, J. et Goto, I. 1995. Apolipoprotein E mRNA in the brains of patients with Alzheimer's disease, *J Neurol Sci*, 129: 56-61.

Yang,C.Y., Gu,Z.W., Blanco-Vaca,F., Gaskell,S.J.,Yang,M., Massey,J., Gotto,A.M. et Pownall,H.J., 1994. Structure of human apolipoprotein D:locations of the intermolecular and intramolecular disulfide links. *Biochemistry* 33: 12451-12455.

Yoshida, K., Cleaveland, E.S., Nagle, J.W., French, S., Yaswen, L., Ohshima, T., Brady, R.O., Pentchev, P.G. et Kulkarni, A.B. 1996. Molecular cloning of the mouse apolipoprotein D gene and its upregulated expression in Niemann-Pick disease type C mouse model. *DNA Cell Biol* 15: 873-882.

Zeng,C., Spielman,A., Vowels,B., Leyden,J., Biemann,K. et Preti,G., 1996. A human axillary odorant is carried by apolipoprotein D. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 93: 6626-6630.

soumise à *Progrès Récents sur la Maladie d'Alzheimer et les Syndromes
Apparentées*. Edition SOLAL.

**Les apolipoprotéines D et E dans le système nerveux
central des patients Alzheimeriens.**

A. Merched, L. Terrisse, P. Bertrand, J. Poirier,
S. Visvikis, G. Siest, R. Milne, E. Rassart

LES APOLIPOPROTEINES D ET E DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL DES PATIENTS ALZHEIMERIENS

A. MERCHED, L. TERRISSE, P. BERTRAND, J. POIRIER, S. VISVIKIS,
G. SIEST, R. MILNE, E. RASSART

I- RESUME

Afin d'étudier la fonction des apolipoprotéines (apo) D et E dans la maladie d'Alzheimer (MA), nous avons déterminé leur quantité dans l'hippocampe ainsi que dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) des patients atteints de la MA et d'autres patients ayant ou non des atteintes neurologiques différentes. Nos résultats montrent que dans l'hippocampe, la quantité de l'apoD, contrairement à celle de l'apoE, est significativement plus élevée chez les patients ayant la MA par rapport aux patients contrôles. Dans le LCR, la concentration des deux protéines augmente mais de façon plus substantielle pour l'apoD aussi bien chez les patients ayant la MA que chez ceux souffrant d'autres pathologies neurologiques par rapport aux individus exempt de toute maladie neurologique. De plus, dans le LCR des patients alzheimeriens, la concentration de l'apoD contrairement à celle de l'apoE, augmente de manière proportionnelle au nombre d'allèle $\epsilon 4$ de l'apoE, le facteur de risque majeur de la MA. Ces résultats montrent l'importance des apoD et E dans les maladies neurodégénératives telle que la MA. La relation entre la concentration d'apoD et l'allèle $\epsilon 4$ souligne une nouvelle interaction ou régulation métabolique potentielle par laquelle l'allèle $\epsilon 4$ pourrait moduler ou expliquer la susceptibilité accrue des porteurs de cet allèle à la MA.

II- INTRODUCTION

L'apolipoprotéine (apoE) est une protéine polymorphe qui possède trois allèles majeurs $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$. Le rôle de l'apoE dans le métabolisme lipidique est bien établi. Elle est l'un des composants des lipoprotéines riches en triglycérides dans la circulation, assurant la liaison de ces lipoprotéines aux récepteurs cellulaires (Mahley, 1988). Dans la maladie d'Alzheimer il est clairement démontré que la présence de l'allèle $\epsilon 4$ augmente le risque de développer la MA et diminue l'âge de survenue de la maladie (voir revue Siest et al, 1995). Toutefois, les mécanismes précis expliquant l'implication de l'apoE dans la MA ne sont pas encore démontrés. Tandis que certaines études postulent un rôle de

l'apoE dans la clairance du peptide amyloïde (Strittmatter et coll, 1993), d'autres suggèrent un rôle dans la protection contre la phosphorylation excessive de la protéine tau (Strittmatter et al, 1994), et dans la plasticité neuronale (Poirier et coll, 1993). Les deux apolipoprotéines D et E sont exprimées dans de nombreux tissus notamment le système nerveux central (SNC). Leur synthèse est largement induite au cours de la régénération des nerfs périphériques et suggère des fonctions importantes dans la régénération neuronale du SNC au cours des maladies neurodégénératives tel que la MA. En effet, par comparaison à l'apoE, les fonctions physiologiques de l'apoD sont encore peu élucidées. Cette dernière appartient à la famille des lipocalines ayant la caractéristique de transporter des petites molécules hydrophobes dont la nature reste peu connue pour l'apoD.

Afin d'évaluer la possible synergie des deux apolipoprotéines D et E dans le SNC au cours du vieillissement neuropathologique, nous avons étudié leur niveau dans l'hippocampe ainsi que dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) de patients atteints de la MA et d'autres patients (ayant ou non des pathologies neurologiques diverses). Nous avons rapporté les variations des ces deux protéines en relation avec le polymorphisme de l'apoE, l'âge, le sexe et le statut mental des patients (le MMS).

III- SUJETS ET METHODES

Les concentrations d'apoD et E ont été mesurées dans le LCR de 41 patients ayant une MA probable établie selon les critères NINCDS-ADRA, 11 sujets exempts de toute maladie neuropsychiatrique et 29 patients présentant d'autres pathologies neurologiques ou inflammatoires. Les échantillons de LCR ont été obtenus par ponction lombaire, recueillis dans les unités hospitalières de neurologie ou de gériatrie de la région de Nancy et stockés dans l'azote liquide jusqu'à l'analyse. Les tissus des hippocampes proviennent de 72 cas confirmés de MA et 35 sujets contrôles obtenus de l'hôpital Douglas (Verdun, QC, Canada). Dans le LCR, l'apoD a été mesurée à l'aide d'une technique radioimmunométrique (Camato et al, 1989) et l'apoE à l'aide d'une technique ELISA (Merched et al, 1997). L'immunoréactivité des deux protéines dans les homogénats hippocampaux a été évaluée après migration électrophorétique, électrotransfert et immunodétection classiques à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-apoD (2B9) et anti-apoE (3H1) dont les caractéristiques ont été décrites antérieurement (Camato et al, 1989; Weisgraber et al, 1986).

IV- RESULTATS ET DISCUSSION

Les apo D et E ont été détectées dans tous les homogénats d'hippocampe et la plupart des échantillons de LCR. La quantité de l'apoD est significativement supérieure ($p < 0.005$) dans les hippocampes des patients atteints de la MA par rapport aux sujets contrôles (Fig 1 et 2A). Dans le LCR, elle est de 3 à 4 fois supérieure ($p < 0.0001$) chez les patients avec la MA (4.23 ± 1.58 mg/l) par rapport à celle chez les sujets contrôles (1.15 ± 0.71 mg/l)), mais elle était également élevée chez les patients ayant d'autres pathologies neurologiques (3.29 ± 1.35 mg/l, $p < 0.0001$) (Fig 2B). De même, une augmentation de la concentration de l'apoE, bien que moins marquée que celle de l'apoD, a été observée chez les patients MA, et les patients « neurologiques » ($p < 0.001$ et $p < 0.05$, respectivement). Par contre, les niveaux hippocampaux d'apoE diminuent dans la MA (Bertrand et al, 1995).

L'augmentation *in vivo* des deux apolipoprotéines avec la MA et les autres maladies inflammatoires et neurodégénératives corrobore les précédentes études cellulaires rapportant une augmentation importante de leur synthèse suite à des lésions expérimentales (Boyles et al 1990). Une implication dans la remobilisation et la réutilisation du cholestérol a été proposée pour l'apoE (Poirier et al, 1993). Des fonctions similaires peuvent être proposées ici. L'apoD pourrait jouer un rôle accessoire dans la redistribution des lipides, par exemple via la stabilisation de la lécithine cholestérol acyl transférase LCAT (Steyer and Kostner, 1987). Etant donné son appartenance à la famille des lipocalines, elle pourrait assurer le transport de ligand(s) hydrophobe(s) essentiel(s) dans les situations pathologiques ou alternativement l'élimination de substance(s) neurotoxique(s).

Quant aux effets de l'allèle $\epsilon 4$, nous avons montré des variations significatives de la concentration de l'apoD dans le LCR des patients en relation avec cet allèle (Fig 3). L'allèle $\epsilon 4$ est corrélé de manière dose-dépendante à une augmentation de la concentration en apoD (Fig 3C). La concentration était significativement supérieure chez les patients homozygotes $\epsilon 4 / \epsilon 4$ (5.8 ± 0.73 mg/l) par rapport à celle des patients hétérozygotes $\epsilon 3 / \epsilon 4$ (4.78 ± 0.6), elle-même supérieure à celle des patients de génotypes $\epsilon 3 / \epsilon 3$ (3.05 ± 0.19).

Nous n'avons trouvé aucune corrélation entre la concentration de l'apoE et la dose de l'allèle $\epsilon 4$ (Fig 3D), ni entre les concentrations des deux apolipoprotéines dans l'hippocampe et le nombre d'allèle $\epsilon 4$ (Fig 3A et 3B). L'âge et le sexe n'affectent pas la concentration des apoD et E ni dans le LCR des patients atteints de la MA ni chez les contrôles. Les concentrations des apoD et E ne sont pas liées au score MMS et ne semblent pas varier avec la sévérité de la MA.

L'augmentation dose-dépendante de l'apoD dans le LCR avec l'allèle $\epsilon 4$ pourrait refléter une certaine interaction ou régulation spécifique. Les niveaux d'apoD dans l'hippocampe n'étant pas affectée par le polymorphisme de l'apoE, l'interaction entre les deux marqueurs serait probablement de nature métabolique. En effet, les apo D et E font partie d'au moins une population de lipoprotéines dans le LCR (Borghini et al, 1995) qui pourrait être régulée par un turn-over différent suivant la nature de l'isoforme de l'apoE. L'absence de corrélation entre l'apoE et la dose de l'allèle $\epsilon 4$ pourrait être due à l'appartenance de l'apoE à plus qu'une population de lipoprotéines de régulation différente (Borghini et al, 1995).

V- CONCLUSION

L'augmentation des apoD et E semble être liée aux caractères communs de la MA et des autres pathologies neurologiques et inflammatoires, probablement en réaction aux dommages subis par les neurones. Ces résultats sont en faveur d'un rôle de coordination des deux protéines dans la réparation et la régénération neuronale. La corrélation positive entre la concentration de l'apoD dans le LCR et la dose d'allèle $\epsilon 4$ souligne une interaction entre les deux protéines, qui pourrait être pertinente dans la physiopathologie de la MA.

VI- REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier Drs C. Jeandel, H. Blain, J.M. Serot, et M. Weber pour la collecte des échantillons de LCR. Nous remercions également D. Aguillon et D. Derex pour leur assistance technique.

VII- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BERTRAND P., POIRIER J., ODA T., FINCH C. and PASINETTI G. Association of apolipoprotein E genotype with brain levels of apolipoprotein E and apolipoprotein J (clusterin) in Alzheimer disease. *Molec. Brain Res.*, 1995, 33 174-178.

BORGHINI I., BARGA F., POMETTA D., JAMES R.W. Characterization of subpopulations of lipoprotein particles isolated from human cerebrospinal fluid. *Biochem Biophys Acta*, 1995, 1255: 192-200.

BOYLES J.K., NOTTERPEK L.M., ANDERSON L.J. Accumulation of apolipoproteins in the regenerating and remyelinating mammalian peripheral nerve. *J Biol Chem*, 1990, 254, 17805-17815.

CAMATO R., MARCEL Y., MILNE R., LUSSIER-CACAN S., WEECH P. Protein polymorphism of a human plasma apolipoprotein D antigenic epitope. *J Lipid Res*, 1989, 30: 865-875.

MAHLEY R. W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, 1988, 240 : 622-630.

MERCHED A., BLAIN H., VISVIKIS S., HERBETH B., JEANDEL C., SIEST G. Cerebrospinal fluid apolipoprotein E level is increased in late onset Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 1996, 5146.

POIRIER J., BACCICHET A., DEA D., GAUTHIER S. Cholesterol synthesis and lipoprotein reuptake during synaptic remodelling in hippocampus in adult rats. *Neuroscience*, 1993, 55(1): 81-90.

SIEST G., PILLOT T., REGIS-BAILLY A., LENINGER-MULLER B., STEINMETZ J., GALTEAU M. M., VISVIKIS S. Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine. *Clin. Chem.*, 1995, 41(8) : 1068-1086.

STEYER E., KOSTNER G.M. Activation of lecithin-cholesterol acyltransferase by apolipoprotein D: Comparaison of proteo-liposomes containing apolipoprotein D, A-I, or C-I. *Biochem Biophys Acta*, 1987, 958: 484-491.

STRITTMATTER W.J., SAUNDERS A.M., SCHMECHEL D., PERIKAK-VANCE M.A., ROSES A.D. Apolipoprotein E : high avidity binding to β amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer's disease. *Proc Natl.Acad Sci U.S.A.* 1993, 90: 1977-1981.1993.

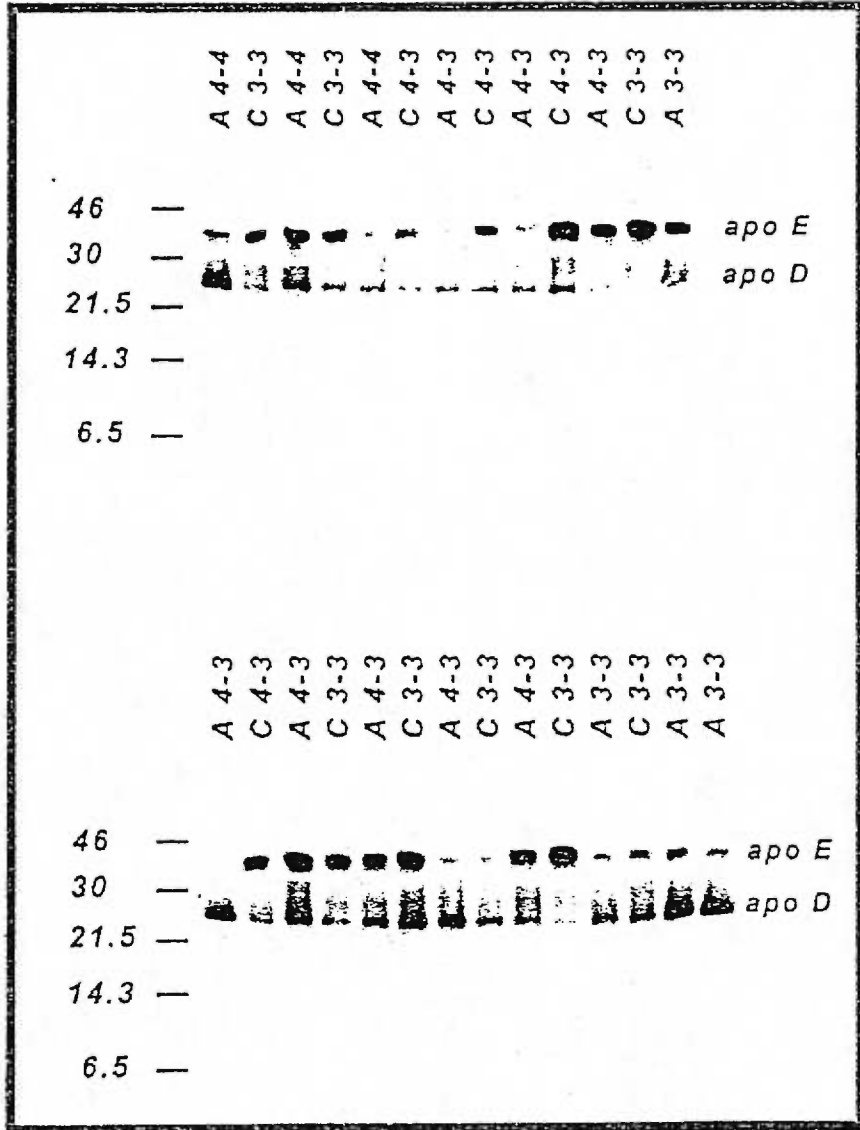
STRITTMATTER W.J., SAUNDERS A.M., GOEDERT M., WEISGRABER K.H., DONG L.M., JAKES R., HUANG D.Y., PERICAK-VANCE M., SCHMECHEL D., ROSES A.D. Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau: implications for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(23):11183-11186

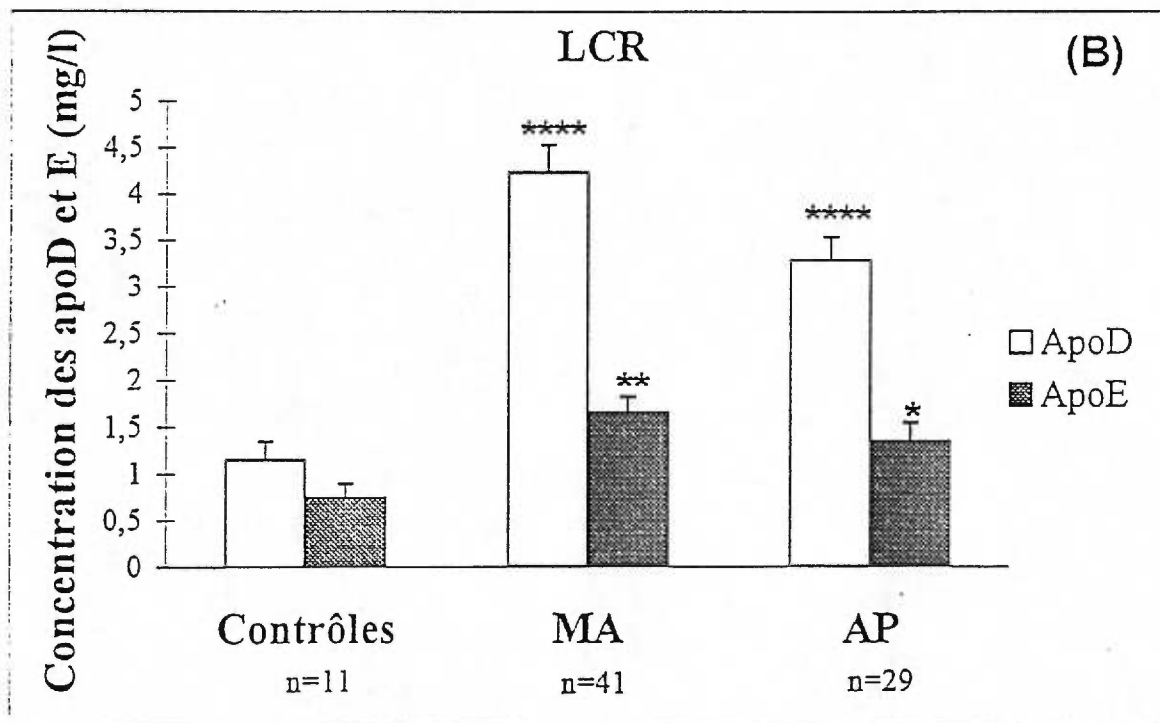
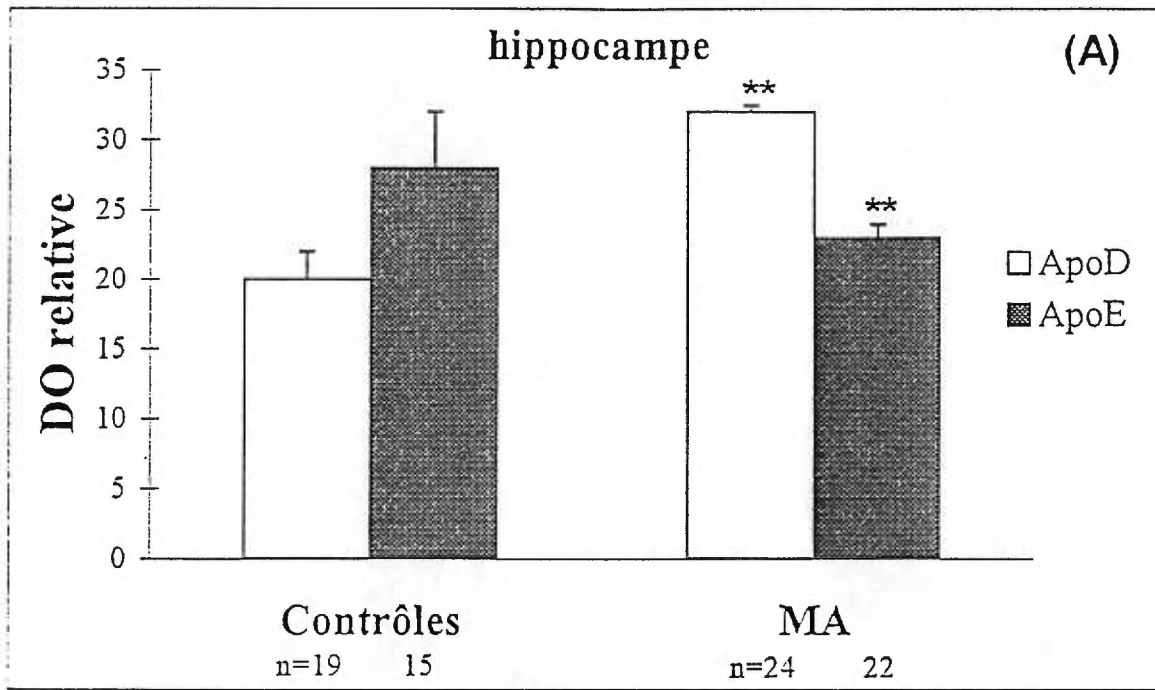
WEISGRABER K.H., RALL S.C., MAHLEY R.W., MILNE R.W., MARCEL Y.L., SPARROW J.T. Human apolipoprotein E. Determination of the heparin binding sites of apolipoprotein E3. *J Biol Chem*, 1986, 261: 2068-2076.

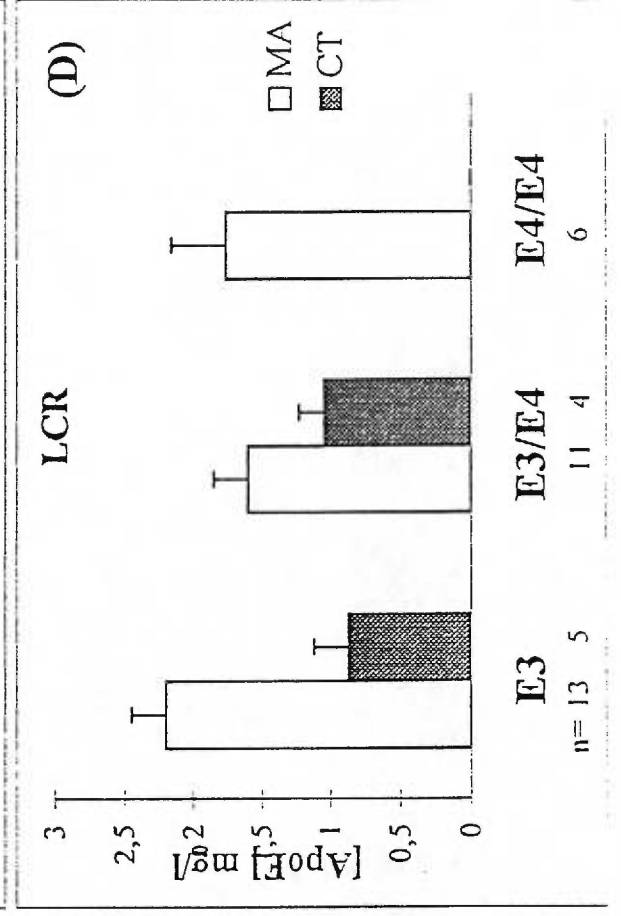
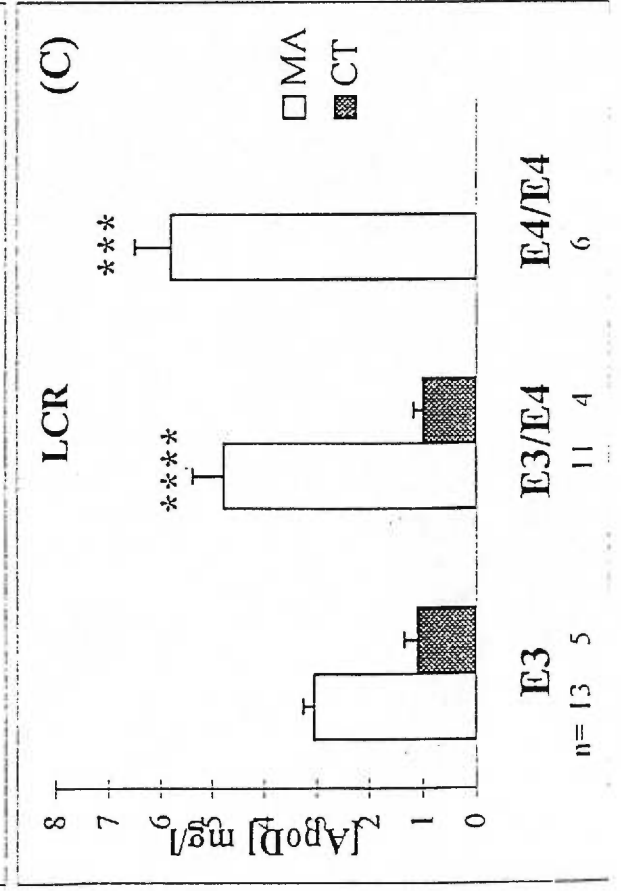
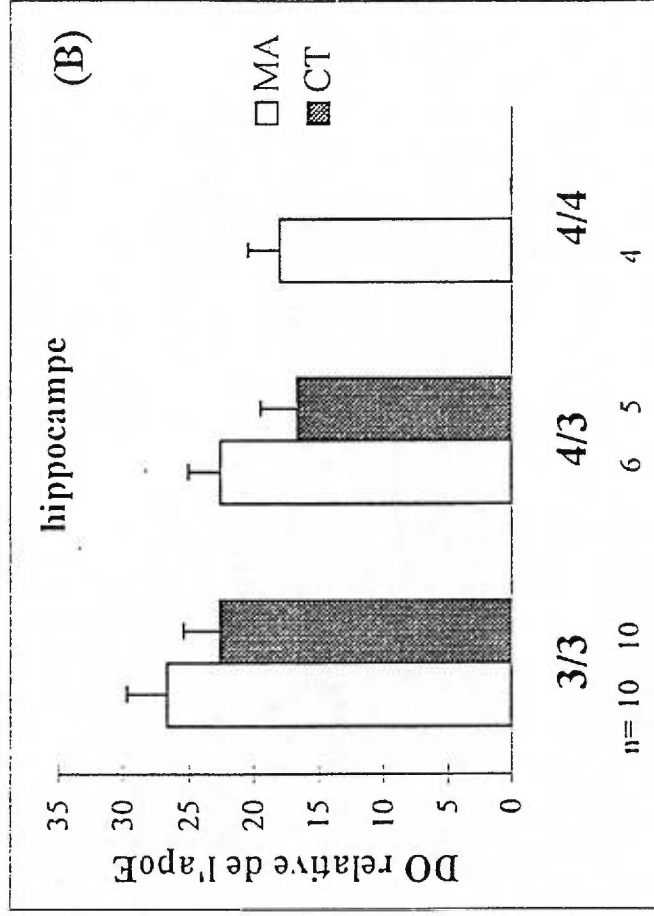
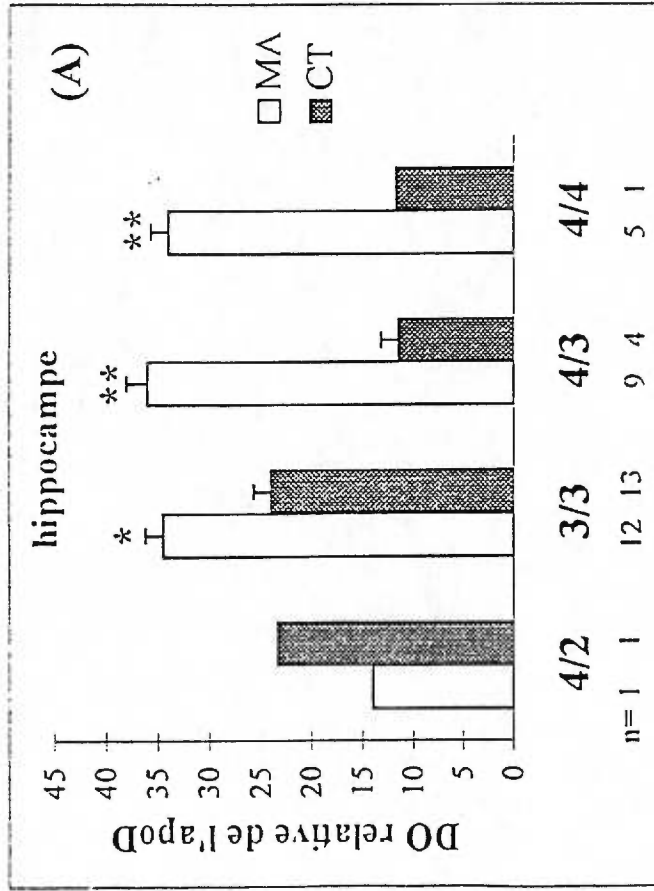
Fig. 1. Immunodetection des ApoD et E dans les extraits des hippocampes des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (A) et des sujets contrôles (C) .

Fig 2. Variation de la concentration des ApoD et E dans les hippocampes (A) et les LCR (B) des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (MA), des sujets contrôles et des patients atteints d'autres pathologies neurologiques que la MA (AP). Les bars représentent les moyennes \pm SEM. * $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$, **** $p < 0.001$.

Fig. 3. Variation de la concentration des ApoD et E dans les extraits hippocampaux (A et B) et les LCR (C et D) des patients en fonction du nombre d'allèle $\epsilon 4$. * $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$, **** $p < 0.001$.







soumise à *Progrès Récents sur la Maladie d'Alzheimer et les Syndromes*
Apparentées. Edition SOLAL.

**Génétique de l'apolipoprotéine E et Association avec
la transthyrétine, l'apolipoprotéine D et l'actine dans
la maladie d'Alzheimer.**

A. Merched, S. Visvikis, J.-M. Serot, L. Terrisse, E. Rassart, G. Siest.

GENETIQUE DE L'APOLIPOPROTEINE E ET ASSOCIATION AVEC LA TRANSTHYRETINE, L'APOLIPOPROTEINE D ET L'ACTINE DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER

A. MERCHED, S. VISVIKIS, J.-M. SEROT, L. TERRISSE, E. RASSART, G. SIEST

I- RESUME

L'allèle $\epsilon 4$ de l'apolipoprotéine E (apoE) est le facteur de risque génétique le plus important de la maladie d'Alzheimer (MA). Des implications spécifiques ont été proposées de l'apoE4 dans la genèse des plaques séniles et des lésions neurofibrillaires en dehors de la remobilisation du cholestérol et la réparation des neurones. Afin de mieux comprendre les trois fonctions différentes de l'apoE4, nous avons étudié dans le liquide céphalorachidien (LCR), trois facteurs pouvant être impliqués dans l'amyloïdogenèse, la réparation neuronale et l'intégrité du cytosquelette qui sont respectivement, la transthyréine (TTR), l'apoD et l'actine. Nous avons suivi les variations pathologiques de ces trois protéines simultanément à celles de l'apoE dans le LCR des patients atteints de la MA et des contrôles. Nos résultats montrent une augmentation de la concentration d'apoD et E mais une diminution de celle de la TTR en liaison avec la MA. Quant aux effets de l'allèle $\epsilon 4$, nous avons constaté des relations dose-dépendantes avec l'augmentation de la concentration de l'apoD, de celle de l'actine et du nombre des plaques séniles. Par ailleurs, la concentration de TTR diminue en relation avec l'abondance des plaques séniles. L'ensemble de nos résultats montrent que l'apoE4 pourrait être impliquée dans une ou plusieurs voies de métabolisme mettant en jeu l'apoD, la TTR et l'actine dans un processus physiopathologique spécifique de la MA.

II- INTRODUCTION

Le locus du gène de l'apoE code pour 3 allèles communs ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$) qui diffèrent les uns des autres par une substitution d'un ou deux acide(s) aminé(s). Dans le système nerveux central l'apoE est synthétisée principalement par les astrocytes (Pitas et al., 1987). Certains travaux originaux ont montré l'importance de l'apoE dans la croissance, la régénération neuronale et la

synaptogénèse (Mahley, 1988, Boyles et al., 1990; Poirier et al., 1994). Ces données sont en faveur d'une implication de l'apoE dans le métabolisme lipidique et l'homéostasie du cholestérol dans le cerveau. Les mécanismes précis pouvant impliquer les dysfonctions de l'apoE dans la MA ne sont pas encore définis. Tandis que certaines études postulent pour un rôle de l'apoE dans la clairance de l'amyloïde (Schmechel et al., 1993, Strittmatter et al., 1993), d'autres suggèrent un rôle dans la protection contre la phosphorylation excessive de la protéine tau (Strittmatter et al., 1994), et dans la plasticité neuronale (Poirier et al., 1994). Toutefois, L'association de l'allèle $\epsilon 4$ à 64% des cas de MA (Saunders et al., 1993) suggèrent un rôle particulier de cet allèle.

Le LCR contient la majorité des facteurs impliqués dans la formation des plaques amyloïdes et des lésions neurofibrillaires. Parmi ces facteurs se trouvent principalement l'apolipoprotéine (apo) E, la protéine *tau*, le peptide amyloïde β ($A\beta$), mais également l'apoD, J, la TTR, l' $\alpha 1$ -antichymotrypsine. La transthyréine (TTR) séquestre vraisemblablement le peptide $A\beta$ dans le milieu extracellulaire (Schwarzman et al, 1994), l'apolipoprotéine D (apoD) participe dans la régénération et la réparation neuronale (Boyles et al, 1990) et l'actine, un composant majeur du cytosquelette, impliquée dans la croissance cellulaire, pourrait interagir avec l'apoE (Fleming et al., 1996). Dans des échantillons de LCR, nous avons donc examiné les variations de la concentration des apoEs avec celle de la TTR, de l'apoD et de l'actine évaluée par électrophorèse bidimensionnelle. Nous avons étudié leur état d'équilibre et/ou d'interaction dans ce compartiment en relation avec la MA et en parallèle avec le polymorphisme de l'apoE, le statut mental, les données de l'histopathologie clinique du cerveau.

III- POPULATION ET METHODES

Les apoD et E ont été mesurées dans les LCR prélevés par ponction lombaire chez 41 patients atteints de MA probable selon les critères de NINCDS-ADRDA, 11 individus n'ayant pas d'atteintes neurologiques et 39 patients ayant diverses atteintes neurologiques périphériques et inflammatoires.

La relation de la TTR et de l'apoE avec les plaques séniles et l'actine a été réalisée chez 20 patients ayant une MA confirmée sur le plan anatomopathologique et 10 patients avec diverses atteintes neurologiques et inflammatoires. En *post mortem*, du LCR intraventriculaire a été prélevé. Une analyse semi-quantitative des plaques séniles a été réalisée à l'aide d'un anticorps monoclonal anti- $A\beta$ (Dako) (Serot et al., 1994) au niveau des lobes temporal, frontal, pariétal et de l'hippocampe (CA1). L'abondance des plaques séniles a été classée en modérée (+), abondante (++) et très abondante (+++).

Les deux apolipoprotéines ont été mesurées à l'aide des techniques ELISA classiques décrites précédemment (Camato et al., 1989, Merched et al., 1997), la TTR par immunonéphélométrie à l'aide du système Array™ (Beckman). L'étude de l'actine a été réalisée après séparation des protéines de LCR par électrophorèse bidimensionnelle (Visvikis et al., 1986) et des mesures densitométriques quantitatives des deux spots d'actine identifiés par comparaison aux cartes publiées et par révélation immunospécifique à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-actine (Sigma). Le polymorphisme génétique de l'apoE a été déterminé par électrophorèse bidimensionnelle ou par PCR à l'aide de la technique de Hixson et Vernier (1990).

IV- RESULTATS ET DISCUSSION

A- ApoE, ApoD et réparation neuronale

Nous avons d'abord étudié l'ApoD dont l'expression est stimulée comme celle de l'apoE dans les conditions de lésions expérimentales du tissu périphérique (Boyles et al, 1990). Nos résultats montrent que parallèlement à la concentration de l'apoE dans le LCR, celle de l'apoD augmente de façon considérable chez les patients atteints de la MA mais aussi chez les patients atteints d'autres pathologies par rapport au groupe contrôle (4.23 ± 1.58 et 3.29 ± 1.35 vs 1.15 ± 0.70 mg/l, avec dans les deux cas $p < 0.0001$) (Fig 1). La concentration de l'apoD est positivement corrélée avec la dose de l'allèle ApoE- $\epsilon 4$ ($p < 0.001$) (Fig 2). Une augmentation de la concentration de l'apoE, bien que moins marquée que celle l'apoD, a été observée chez les patients MA, et les patients « neurologiques » ($p < 0.001$ et $p < 0.05$, respectivement) (Fig 1).

L'augmentation des apoD et E semble être liée aux caractères communs de la MA et des autres pathologies neurologiques et inflammatoires, probablement en réaction aux dommages cellulaires. Ces résultats sont en faveur d'un rôle de coordination des deux protéines dans la réparation et la régénération neuronale. Etant donné l'appartenance de l'apoD à la famille des lipocalines, elle pourrait assurer le transport de ligand(s) hydrophobe(s) essentiel(s) dans les situations pathologiques ou alternativement l'élimination de substance(s) neurotoxique(s). La corrélation positive entre la concentration de l'apoD dans le LCR et la dose de l'allèle $\epsilon 4$ souligne une interaction probablement de nature métabolique entre les deux marqueurs.

B- ApoE, transthyrétine et formation des plaques séniles

Par ailleurs, afin de mieux comprendre le processus de dépôts de l'amyloïde β dans les plaques séniles (PS) au niveau du cerveau, nous avons étudié la contribution potentielle de deux protéines ayant une affinité assez forte vis-à-vis de l'A β , l'ApoE et la TTR. Nous avons mesuré leur concentration dans le LCR *postmortem* en tenant compte de l'abondance des dépôts amyloïdes estimée par études immunohistochimiques sur le cerveau des mêmes patients et en sachant que les résultats peuvent varier en fonction des observateurs (Duyckaerts et al., 1990). Nos résultats montrent que la concentration de la TTR, contrairement à celle de l'ApoE, est plus basse dans le LCR des patients atteints de la MA par rapport aux patients ayant ou non d'autres pathologies neurologiques (22.21 ± 1.41 vs 36.52 ± 4.12 mg/l \pm SEM, $p < 0.01$) (Fig 3). Elle est également négativement corrélée à l'abondance des PS ($p < 0.01$) (Fig 4). Tandis que le nombre des plaques séniles augmente significativement avec le nombre d'allèle $\epsilon 4$ ($p < 0.05$). La TTR et l'apoE semblent avoir des effets opposés dans la formation des plaques séniles. Leur affinité au peptide A β suggère une relation de compétition entre les deux protéines, avec un rôle protecteur de la TTR et un effet amyloïdogénique de l'apoE4.

C- ApoE, actine et cytosquelette

Un autre aspect de la physiopathologie de la MA a été abordé via l'étude par électrophorèse bidimensionnelle d'un composant majeur du cytosquelette, l'actine (Fig 5). L'actine a été étudiée dans le LCR, en relation avec la génétique de l'apoE. De plus en plus d'arguments sont en faveur d'un rôle important de l'apoE dans la biochimie du cytosquelette grâce à ses affinités différentielles vis-à-vis de plusieurs composants de celui-ci, comme la protéine *tau*, l'actine et la protéine *MAP2* (Fleming et al, 1996). Nos résultats montrent une augmentation de l'actine en relation avec la dose de l'allèle $\epsilon 4$ ($p < 0.05$) (Fig 6) Ces résultats suggèrent que l'apoE4 pourrait moduler et réguler la plasticité du cytosquelette via des interactions directes avec les composants du cytosquelette.

En résumé, l'ensemble de ce travail montre les résultats suivants :

(i) la présence de l'allèle $\epsilon 4$, la diminution de la concentration de la TTR semblent être les conditions les plus favorables à la formation des plaques séniles. Ces fonctions pourraient être dues à un mécanisme de compétition entre les deux facteurs vis à vis du peptide A β ou à une implication

dans le métabolisme anormale de ce peptide, (ii) les deux apolipoprotéines D et E sont importantes dans les maladies neurodégénératives telle que la MA probablement au niveau de la remobilisation de cholestérol et la réparation neuronale. Toutefois, la présence de l'allèle $\epsilon 4$ semble inhiber ou ralentir cette remobilisation et pourrait compromettre par conséquence la régénération cellulaire, (iii) L'apoE semble intervenir activement au niveau de la biochimie du cytosquelette. L'isoforme $\epsilon 4$ pourrait avoir une contribution négative à la stabilité du cytosquelette à travers l'actine, et finalement (iv) l'actine pourrait servir comme marqueur du cytosquelette dans la MA. Sa polymérisation semble être négativement régulée par l'apoE4. Cette régulation pourrait s'exercer de manière directe ou indirecte.

Ces résultats montrent que l'apolipoprotéine E4 pourrait être impliquée dans une ou plusieurs voies de corrélation particulière(s) mettant en jeu l'apoD, la TTR, l'actine et probablement d'autres dans un processus physiopathologique spécifique de la MA. L'élucidation des bases moléculaires de la maladie d'Alzheimer et la définition de bons marqueurs seront utiles sur le plan étiopathologique mais également pour le suivi thérapeutique de cette maladie.

VI- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BOYLES J.K., NOTTERPEK L.M., ANDERSON L.J. *J Biol Chem*, 1990, 254: 17805-17815.
- CAMATO R., MARCEL Y., MILNE R., LUSSIER-CACAN S., WEECH P. *J Lipid Res*, 1989, 30: 865-875.
- DUYCKAERTS C., DELAERE P., HAUW J.J., ABBAMONDI-PINTO A.L., SORBI S., et al. *J Neurol Sci* 1990, 97(2-3) : 295-323.
- FLEMING L.H., WEISGRABER K.H., STRITTMATTER W.J., TRONCOSO J.C., JOHSON G.N.W. *Exp Neurol*, 1996, 138: 252-260.
- HIXSON J. E., VERNIER D.T. *J Lipid Res*, 1990, 31: 545-548.
- MAHLEY R. W. *Science*, 1988, 240 : 622-630.
- MERCHED A., BLAIN H., VISVIKIS S., HERBETH B., JEANDEL C., SIEST G. *J Neurol Sci*, 1997, 145: 33-39.
- PITAS R.E., BOYLES J.K., LEE S.H., HUI D., WEISGRABER K.H. *J Biol Chem*, 1987, 262: 14352-14360.
- POIRIER J., BACCICHET A., DEA D., GAUTHIER S. *Neuroscience*, 1993, 55(1): 81-90.
- ROSES A.D., EINSTEIN G., GILBERT J., GOEDERT M., et al, *Ann NY Acad Sci USA*, 1996, 777: 147-157.
- SCHMELCHEL D.E., SAUDERS A.M., STRITTMATTER W.J. et al. *Proc Natl Acad Sci*, 1993, 90: 9649-9653.
- SCHWARZMAN A.L., GREGORI L., VITEK M.P., LYUBSKI S., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91: 8368-8372.
- SEROT J.M, BENE M. C., FAURE G.C. *Hum Pathol*, 1994, 25 : 1185-1190.
- STRITTMATTER W.J., SAUNDERS A.M., GOEDERT M. et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(23):11183-11186 .
- STRITTMATTER W.J., SAUNDERS A.M., SCHMECHEL D., PERIKAK-VANCE M.A., ROSES A.D. *Proc Natl.Acad Sci. U.S.A.* 1993, 90: 1977-1981.
- VISVIKIS S., STEINMEITZ J., CUVELIER I., GALTEAU M. M., SIEST G. In *Recent Progresses in Two -Dimentional Electrophoresis* (Galteau M. M., and Siest G., eds), 1986, pp. 159-165. Presses Universitaires/ Nancy, France.

Fig. 1. Variation de la concentration des Apo D et E dans le LCR des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (MA), des contrôles et des patients atteints d'autres pathologies neurologiques et inflammatoires que la MA (AP). Les bars représentent les moyennes \pm SEM. * $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$, **** $p < 0.001$.

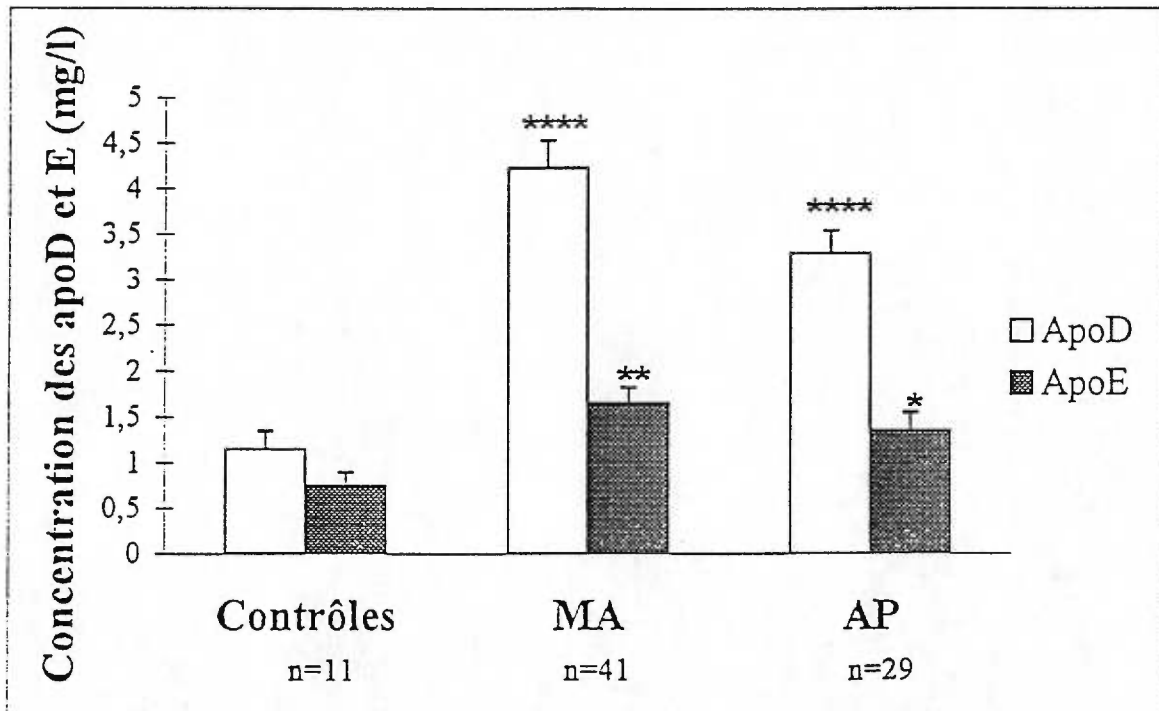
Fig. 2. Variation de la concentration de l'ApoD (A) et l'ApoE (B) dans le LCR des patients en fonction du nombre d'allèle $\epsilon 4$. *** : $p < 0.005$, **** $p < 0.001$.

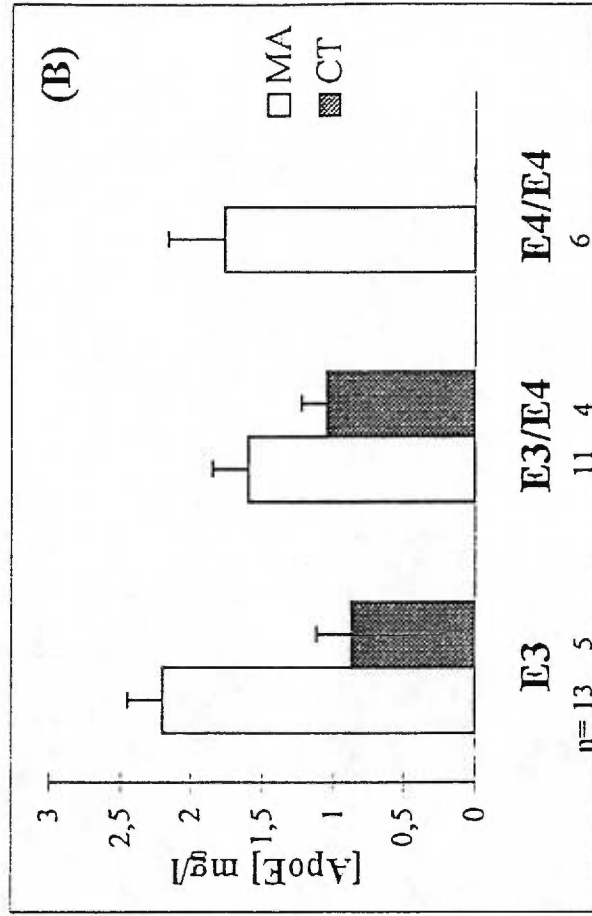
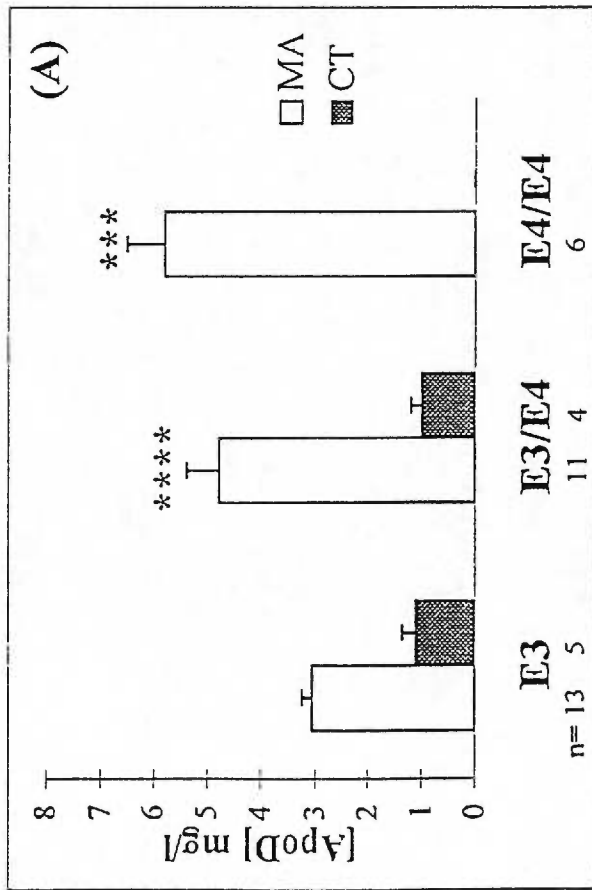
Fig 3. Concentration de la transthyréline dans le LCR intraventriculaire des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (MA) et d'autre pathologies neurologiques et inflammatoires (contrôles). ** : $p < 0.01$

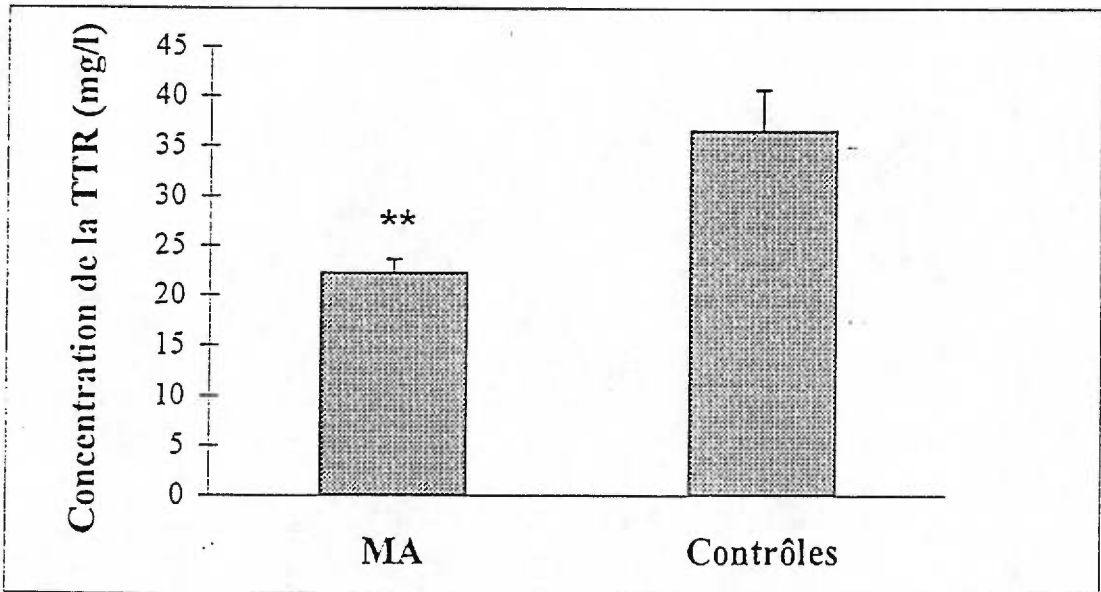
Fig. 4. Relation entre les concentrations moyennes de l'apoE et la TTR dans le LCR intraventriculaire et l'abondance des plaques séniles dans le cerveau des mêmes patients. L'évolution de la fréquence de l'allèle $\epsilon 4$ est présentée en pointillé. (+) abondance moyenne, (++) abondant, (+++) très abondant. * $p < 0.05$.

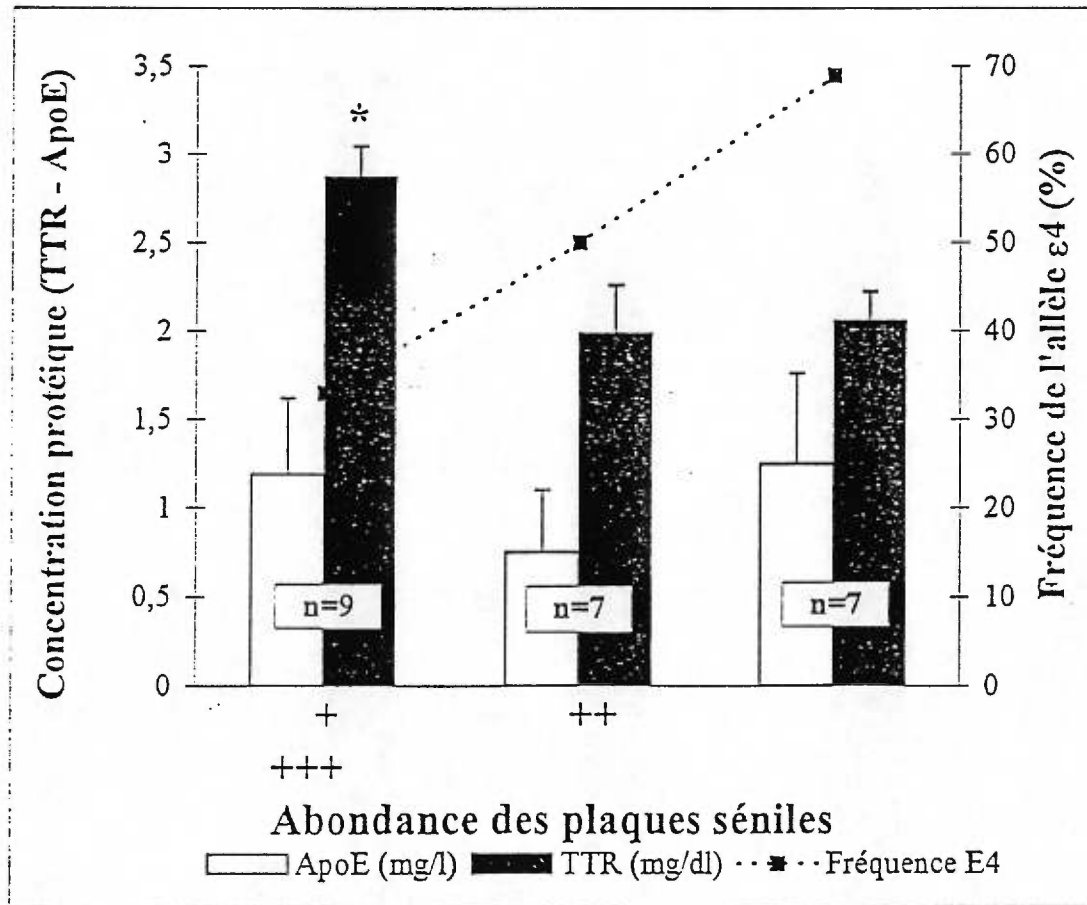
Fig. 5. Profil électrophorétique bidimensionnel des protéines de LCR colorées au nitrate d'argent (A). A droite sont présentés un agrandissement de la région d'actine (B) et une révélation immunospécifique de l'actine à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-actine (Sigma). PM ; marqueur de poids moléculaire.

Fig. 6. Variation de la quantité d'actine dans le LCR intraventriculaire des patients atteints de la MA en fonction du nombre d'allèle $\epsilon 4$. * $p < 0.05$.

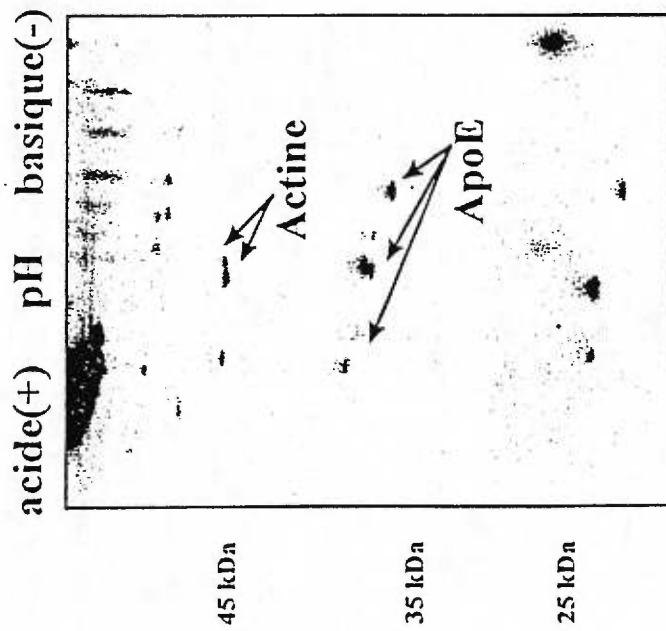








(A)



(B)



(C)

