



**HAL**  
open science

# La sous-unité lourde des neurofilaments (NFH): du gène à la pathologie

Franck Letournel

## ► To cite this version:

Franck Letournel. La sous-unité lourde des neurofilaments (NFH): du gène à la pathologie. Biologie cellulaire. Université d'Angers, 2007. Français. NNT: . tel-00345836

**HAL Id: tel-00345836**

**<https://theses.hal.science/tel-00345836>**

Submitted on 10 Dec 2008

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**LA SOUS-UNITE LOURDE  
DES NEUROFILAMENTS (NFH) : DU GENE A LA  
PATHOLOGIE**

**THESE DE DOCTORAT**

**Spécialité : Biologie Cellulaire**

**ECOLE DOCTORALE D'ANGERS**

**Présentée et soutenue publiquement**

**le : 22/06/2007**

**à : Angers**

**par**

**Franck Letournel**

**Devant le jury ci-dessous :**

**Pr. J.Y. Daniel** (Rapporteur), PU-PH, CHU Bordeaux

**Pr. D. Fellmann** (Rapporteur), PU-PH, CHU Besançon

**Pr A. Barthelaix** (Examineur), PU-PH, CHU Angers

**Pr V Catros-Quemener** (Examineur), PU-PH, CHU Rennes

**Dr. J. Eyer** (Président du Jury et Examineur), CR1, UPRES EA3143, Angers

**Directeur de thèse : Pr. A. Barthelaix**, PU-PH, CHU Angers

**Laboratoire :** UPRES EA3143, Laboratoire de Neurobiologie et Transgénèse,  
4 rue Larrey, CHU,  
49033 Angers cedex 01  
Tel-fax : 02.41.35.47.26



# TABLES DES MATIERES

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>5</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>9</b>
<b>1. Préambule .....</b>	<b>9</b>
<b>2. Les Neurofilaments (NFs) .....</b>	<b>11</b>
2.1. Introduction .....	11
2.1.1. Généralités concernant les Filaments Intermédiaires (FI).....	11
2.1.2. Les FI neuronaux (FIn) .....	12
2.2. Les NFs .....	12
2.2.1. Structures des NFs.....	12
2.2.2. Structure des autres FIn (Figure 3).....	13
2.2.2.1. La Nestine .....	13
2.2.2.2. La Périphérine .....	13
2.2.2.3. L'α-Internexine .....	14
2.3. Assemblage des FI (Tableau 1 ; Figure 6) .....	14
2.3.1. Cas des NFs (Figure 7).....	15
2.3.2. Assemblage des autres FIn.....	16
2.4. Modifications post-traductionnelles des NFs (Figure 3).....	17
2.4.1. Phosphorylation (Figure 3).....	17
2.4.2. Glycosylation .....	19
2.5. Fonctions des NFs .....	19
2.5.1. Croissance longitudinale de l'axone .....	19
2.5.2. Croissance radiale de l'axone et vitesse de conduction nerveuse .....	20
2.5.3. Arborisation dendritique .....	21
2.6. Protéines et organelles associées aux NFs (Figure 4) .....	21
2.7. Transport des NFs (Figure 8a et 8b).....	22
2.8. Régulation .....	25
2.8.1. Des FI .....	25
2.8.1.1. Structure des gènes (Figure 9).....	25
2.8.1.2. Régulation des FIn .....	26
2.8.2. Implication des introns dans le contrôle des FI.....	28
2.8.2.1. Introduction .....	28
2.8.2.2. Introns et FIn .....	28
2.8.3. Facteurs de transcription et NFs.....	29
2.9. NFs et régénérescence axonale .....	30
2.10. Neurofilaments en pathologie .....	31
2.10.1. NFs et SLA.....	32
2.10.2. NFs et MP.....	36
2.10.3. NFs et maladie d'Alzheimer .....	36
2.10.4. NFs et démence de type frontale (DNI) .....	37
2.10.5. NFs et Neuropathies .....	37
2.10.5.1. Neuropathies héréditaires .....	37
2.10.5.2. Neuropathies diabétiques .....	38
2.10.5.3. Neuropathies induites par des toxiques.....	39
2.10.6. NFs et anticorps anti-NFs comme marqueurs de pathologie .....	40
2.11. Modèles murins de transgénèse des FIn (Tableaux 4 et 5) .....	40

<b>3. Les protéines STOPS (Stable Tubule Only Polypeptides)</b>	<b>43</b>
3.1. L'isoforme neuronale ou N-STOP (Figure 15).....	43
3.2. Organisation du gène des STOPS .....	44
3.3. Les différentes isoformes des protéines STOPS.....	44
3.4. Fonctions .....	45
3.4.1. Organisation fonctionnelle de STOP (Figure 15) .....	45
3.4.2. Evolution phylogénétique des protéines STOPS (Figure 15).....	45
3.4.3. Fonctions en culture de cellules .....	46
3.4.4. Souris déficientes pour STOP .....	47
3.4.5. STOP et NFs.....	47
<b>OBJECTIFS DU TRAVAIL .....</b>	<b>49</b>
<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>51</b>
<b>MODÈLES D'ÉTUDES .....</b>	<b>52</b>
1 <sup>er</sup> Article.....	53
Neurofilament high molecular weight -green fluorescent protein fusion is normally expressed and transported in axons: a neuronal marker to investigate the biology of neurofilaments.....	53
2 <sup>nd</sup> Article .....	54
Involvement of intronic sequences in the neuron-specific expression of the <i>NFH</i> gene.	54
<b>LA PATHOLOGIE .....</b>	<b>63</b>
3 <sup>ème</sup> Article .....	64
Stable Tubule Only Polypeptide (STOP) proteins co-aggregate with Spheroids Neurofilaments in Amyotrophic Lateral Sclerosis.....	64
4 <sup>ème</sup> Article .....	65
Cytoskeleton abnormalities in axopathies of unknown etiology: correlations with morphometry .....	65
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>66</b>
<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>70</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>92</b>
<b>Annexe 1 .....</b>	<b>93</b>
Paralysie périodique révélant une thyrotoxicose.....	93
<b>Annexe 2 .....</b>	<b>94</b>
Transsphenoidal surgery in the elderly. ....	94
<b>Annexe 3 .....</b>	<b>95</b>
Two clinicopathological cases of a dominantly inherited, adult-onset orthochromatic leukodystrophy. ....	95
<b>Annexe 4 .....</b>	<b>96</b>
Syndrome de Garcin révélant un lymphome malin non hodgkinien.....	96
<b>Annexe 5 .....</b>	<b>97</b>
Hématome intracérébral au cours d'une épreuve d'effort : intérêt médico-légal. ....	97
<b>Annexe 6 .....</b>	<b>98</b>
Phenotype associated with APP duplication in five families. ....	98
<b>Annexe 7 .....</b>	<b>99</b>
Neuron growth engineering on a photoinduced surface relief grating: a tool for plastic neuroelectronics .....	99

A Catherine, Nathan, Tanguy, Eléonor et Grégoire.

## REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je tiens à remercier Mme le Pr. A. Bartheleix qui m'a accueilli dans le Laboratoire de Biologie Cellulaire. Elle m'a donné le goût de la recherche et toujours encouragé. Ses conseils, son encadrement et les nombreuses discussions que nous avons eues, scientifiques ou non, m'ont toujours été bénéfiques. Que vous trouviez dans ce manuscrit le témoignage de ma profonde et sincère reconnaissance.

Je remercie M le Dr J. Eyer pour avoir accepté d'encadrer ce travail et pour m'avoir accueilli dans son unité de recherche.

Je remercie Mme Le Pr V Catros-Quemener qui a bien voulu participer au jury en tant qu'examineur.

Je remercie M le Pr. D. Fellmann qui a accepté avec un plaisir non caché de juger ce travail. J'espère que la collaboration initiée sera fructueuse.

Je remercie M le Pr. J.Y. Daniel qui a accepté de relire ce manuscrit et de le commenter. Je le remercie également pour son soutien au sein de l'ANEBC.

Un grand merci à messieurs les Prs. J. Emile et F. Dubas pour m'avoir fait découvrir la Neurologie et plus particulièrement la Neuropathologie. Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance.

Je remercie l'ensemble du personnel des Départements de Neurologie et de Neurochirurgie ainsi que du pavillon funéraire pour leur disponibilité et leur gentillesse.

Je remercie également messieurs les Prs. D. Bonneau, F. Pouplard, P Reynier pour leur soutien et leurs encouragements.

Je voudrais remercier également mes collègues neurologues, Frédérique Etcharry-Bouyx, Catherine Fressinaud, Jacques Klein, Corinne Moreau, Guillaume Nicolas, Isabelle Penisson-Besnier et Christophe Verny, qui directement ou indirectement ont participé à l'élaboration de mes travaux de recherche et avec qui les nombreuses discussions scientifiques et personnelles ont toujours été fructueuses.

Je remercie M le Pr. D. Boujard et M le Dr. T. Madigou qui ont permis de développer un modèle de transgénèse chez le Xenope.

Je remercie les membres du MNI, en particulier Kathleen, Josh et Igor qui m'ont enseigné la « bio mol » et l'anglais. Je remercie plus particulièrement Wayel qui a accepté de m'encadrer pendant un an et d'avoir été patient. Merci à Jack pour cette année mémorable. Enfin merci à Alan qui a fait que notre arrivée et notre installation à Montréal se sont déroulées de la meilleure des façons.

Enfin sans être prisonnier d'une simple tradition qui consiste à remercier les amis, ma famille, ceux qui ont participé à ma formation humaine et professionnelle, que les quelques lignes qui viennent leur soient adressées.

A la « Bocquouille family » en souvenir des nombreuses soirées passées ensemble et en préparation des prochaines rencontres. Une des meilleures choses qui nous soient arrivées a été de vous rencontrer. Castres n'est finalement pas aussi loin que ça pour que « parrain » puisse revoir sa « filleule », peut-être avec une « flûte »...

Je voudrais remercier mes parents qui ont toujours cru en moi (peut être plus que moi d'ailleurs), m'ont toujours encouragé et n'ont jamais douté des possibilités qui m'étaient offertes. Merci à Valérie (et Antoine, bien sûr) pour leur accueil parisien, leur chaleur et les répétitions de « fausse thèse ». Enfin je remercie Thomas et Béatrice qui acceptent régulièrement d'entretenir ma « cave » et ceci pour une rétribution mineure.

Je remercie également la « partie adverse » en souvenir de son accueil dans les moments, trop nombreux pour être cités, non scientifiques que nous avons partagés ensemble et d'avoir accepté de me faire un des plus beaux cadeaux, leur fille. Je remercie mes belles-soeurs pour leur joie de vivre et leur amitié. Merci à « pervers pépère » et « tonton Ricard ».

Je voudrais remercier les « futurs ex-passés expats » notamment Valou et Phil qui nous ont fait découvrir le Québec et nous ont soutenus dans les moments difficiles du grand froid.

Je remercie les membres du labo de Bio Cell : Sophie pour sa gentillesse, sa patience et les quelques séances de « massages », Lydie qui m'a appris les rudiments des techniques de biologie cellulaire et les « neuropath's girls », Catherine et Isabelle, pour leur investissement dans la neuropathologie. Je les remercie toutes les quatre de bien vouloir me supporter.

Je remercie l' « abusateur » en attendant qu'il apprécie la fin des films, « ptite ... » enfin Matt et sa décontraction, « Devilliiiiéé » pour sa blondeur et ses invitations non forcées chez elles, « Elie » Damien « Wiseman » pour sa clairvoyance dans l'avenir, « El Corron » qui est parti trop tôt du Labo, Cécile et son goût pour les « quiches », Myrtille et ses « mails transférés », la « meuf » et sa jovialité indéfectible, Rodolphe et Isabelle, Patrice, miss « PCR ». Je remercie également les anciens de Nucléïs, Fred et David, sans qui la mise au point des « outils » n'aurait pu se faire. Je remercie enfin Pascale, toujours souriante de bonne humeur, même à la sortie des « lieux inhabituels » qui feront couler beaucoup d'encre.

Un grand merci à Tonio qui a accepté de relire ce manuscrit et surtout d'avoir accepté d'être parmi les remerciements..... Je pense que tu comprendras l'allusion.

Merci à l'ensemble des membres du Dojo de St-Sylvain qui me permettent de décompresser, notamment après des réunions difficiles....

Enfin je voudrais remercier toutes les personnes que j'aurais pu oublier et notamment les nombreux étudiants qui ont participé à l'ensemble de ces résultats.

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>1,2-DAB:</b>	1,2-diacetylbenzene
<b>3'UTR :</b>	3' Untranslated Region
<b>A :</b>	Adénosine
<b>AA :</b>	Acides Aminés
<b>AGEs :</b>	Advanced Glycation Endproducts
<b>AIF :</b>	Apoptosis Inducible Factor
<b>AMPA :</b>	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoaxole Propionic Acid
<b>AP-1 :</b>	Activating Protein 1
<b>APP :</b>	Amyloid Precursor Protein
<b>ARN :</b>	Acide RiboNucléique
<b>ARNm :</b>	Acide RiboNucléique messenger
<b>ATG :</b>	Site d'initiation de la transcription
<b>ATP :</b>	Adenosine TriPhosphate
<b>BDNF :</b>	Brain Derived Neurotrophic Factor
<b>bp:</b>	base pair
<b>BPAG1 :</b>	Bullous Pemphigoid Antigen-1 Protein
<b>C :</b>	Cytosine
<b>CamKII :</b>	Calcium/calmodulin Dependent Protein Kinase II
<b>Cdk :</b>	Cyclin Dependent Kinase
<b>cFI :</b>	FI cytoplasmiques
<b>CK1 :</b>	Caséine Kinase 1
<b>CMT :</b>	Maladie de Charcot-Marie-Tooth
<b>cNOS :</b>	cytoplasmic Nitric Oxide Synthetase
<b>DNF :</b>	Dégénérescences Neurofibrillaires
<b>DNI :</b>	Dementia with Neurofilaments Inclusions
<b>DRIP :</b>	Dopaminergic Receptor Interacting Protein
<b>DsRed :</b>	Proteine Fluorescente Rouge
<b>E :</b>	Glutamate
<b>EAAT2 :</b>	Excito-Amino-Acid Transporter 2
<b>ELISA :</b>	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
<b>Erk1 et 2 :</b>	Extracellular Regulated Kinases 1 et 2
<b>ES :</b>	cellules souches embryonnaires
<b>EST:</b>	Expressed Sequences Tagged
<b>E-STOP:</b>	Early STOP
<b>FACS :</b>	Fluorescent Activated Cell Sorter
<b>FI :</b>	Filaments Intermédiaires
<b>Fin:</b>	Filaments Intermédiaires neuronaux
<b>F-STOP:</b>	Fibroblastic STOP
<b>G :</b>	guanine
<b>GFP :</b>	Green Fluorescent Protein
<b>GSK :</b>	Glycogen Synthase Kinase
<b>GTP :</b>	Guanosine TriPhosphate
<b>HAT :</b>	Hypoxanthine, Aminoptérine, Thymidine
<b>HPRT :</b>	Hypoxanthine PhosphoRybosylTransferase
<b>Hsp68 :</b>	Promoteur minimal de Heat Shock Protein-68kDa
<b>IDPN :</b>	$\beta$ , $\beta'$ -iminodipropionitrile
<b>IFAP :</b>	Intermediate Filaments Associated Proteins
<b>IGF-1 :</b>	Insulin Growth Factor 1
<b>IL-6 :</b>	Interleukine 6
<b>JAK :</b>	Janus Activated Kinase
<b>JNK :</b>	c-Jun NH2-terminal Kinase
<b>JNK3 :</b>	Jun N-Terminal kinase 3
<b>K :</b>	Lysine
<b>kb:</b>	kilo base
<b>kDa :</b>	kilo Dalton

<b>KSP :</b>	Lysine-Sérine-Proline
<b>LacZ :</b>	Gène bactérien codant pour la $\beta$ -galactosidase
<b>LB :</b>	Lewy Bodies
<b>LCS :</b>	Liquide Cérébro-Spinal
<b>LIF :</b>	Leukemia Inhibitory Factor
<b>MAG :</b>	Myelin Associated Glycoprotein
<b>MAP :</b>	Microtubule Associated Protein
<b>MAP2 :</b>	Microtubule Associated Protéin 2
<b>MAPKK :</b>	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
<b>MBP :</b>	Myelin Basic Protein
<b>MEF :</b>	Mouse Embryonic Fibroblasts
<b>MF :</b>	MicroFilaments d'Actine
<b>MP :</b>	Maladie de Parkinson
<b>MT :</b>	Microtubules
<b>NFH :</b>	Neurofilament High subunit
<b>NFHLacZ:</b>	Protéine de fusion entre NFH et LacZ
<b>NFL :</b>	Neurofilament Light subunit
<b>NFM :</b>	Neurofilament Medium subunit
<b>NFs :</b>	Neurofilaments
<b>NGF :</b>	Nerve Growth Factor
<b>nm:</b>	nanomètre
<b>NMDA :</b>	<i>N</i> -methyl-D-aspartic acid
<b>NO :</b>	monoxyde d'azote
<b>N-STOP:</b>	Neuronal adult STOP
<b>NT-3/4/5:</b>	NeuroTrophines 3, 4 et 5
<b>NUDEL :</b>	mammalian homologue of <i>Aspergillus nidulans</i> nuclear distribution molecule NudE
<b>O-GlcNAc :</b>	liaison de type <i>O</i> d'un résidu <i>N</i> -acétylglucosamine
<b>ORF:</b>	Open Reading Frame
<b>pI :</b>	point Isoélectrique
<b>POU :</b>	domaine de fixation sur l'ADN (Pit 1, Oct 1, UNC 86)
<b>PP1 - 2A – 2B :</b>	Protein Phosphatases 1, 2A et 2B
<b>PS1 :</b>	Préséniline 1
<b>RNAi :</b>	Interférence à l'ARN
<b>ROS :</b>	Reactive Oxygen Species
<b>SAPK<math>\gamma</math> et 1b :</b>	Stress Activated Protein Kinases $\gamma$ et 1b
<b>SDS/PAGE :</b>	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
<b>SH-3 :</b>	Src Homology domain 3
<b>SLA :</b>	Sclérose Latérale Amyotrophique
<b>SMN :</b>	Survival MotoNeuron gene
<b>SNC :</b>	Système Nerveux Central
<b>SNP :</b>	Système Nerveux Périphérique
<b>SOD-1 :</b>	SuperOxyde Dismutase 1
<b>STAT:</b>	Signal Transducers and Activators of Transcription
<b>STOPs:</b>	Stable Tubule Only Polypeptides
<b>T :</b>	thymidine
<b>TAU :</b>	Tubule Associated Unit
<b>TDP-43 :</b>	TAR DNA-binding protein de 43 kDa
<b>TetO :</b>	Promoteur minimal TetO
<b>TGF<math>\beta</math>:</b>	Transforming Growth Factor $\beta$
<b>TNF<math>\alpha</math> :</b>	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
<b>TRE :</b>	Tetracyclin Responsive Element
<b>TRE :</b>	TPA-Responsive Element
<b>ULFs :</b>	Unit Length Filaments
<b>Xgal :</b>	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactoside

# INTRODUCTION

## *1. Préambule*

Le cytosquelette cellulaire est un élément majeur de l'architecture cellulaire. Il correspond à la polymérisation d'unités protéiques élémentaires, en structures macromoléculaires et filamentaires. Ces structures sont réparties en trois grandes classes, définies par leur diamètre apparent en microscopie électronique: les microfilaments d'actine (MF) de 8nm, les filaments intermédiaires (FI) de 10 nm et les microtubules (MT) de 24 nm (**Ackerlay, 2004**). Ces trois classes sont caractérisées par une dynamique d'assemblage qui leur est propre, rendant compte de leurs propriétés. Elles ont d'importantes et nombreuses relations à l'intérieur de la cellule, entre elles, mais aussi avec l'environnement extracellulaire.

Le terme de cytosquelette, même s'il est admis, est en fait peu adapté. En effet, il fait référence, inconsciemment, au squelette, cartilagineux ou osseux, et ainsi à une structure solide certes, mais statique. C'est un terme réducteur ne prenant pas en compte toutes les fonctions qu'exercent ces macromolécules au sein de la cellule et de son environnement. Certains auteurs proposent le terme de charpente dynamique en lieu et place de cytosquelette, ce qui permet de mieux traduire la dualité structurelle et fonctionnelle.

Pourquoi étudier le cytosquelette? Outre l'intérêt fondamental de mieux comprendre les mécanismes d'adaptation de la cellule à un stimulus et à son environnement, il est maintenant acquis que des perturbations de son fonctionnement sont impliquées dans l'apparition de certaines maladies. Par ses rôles multiples, notamment dans la division cellulaire, il est devenu la cible de thérapies anticancéreuses. La désorganisation du cytosquelette paraît être un élément clé dans la physiopathologie, par exemple, des maladies dites neurodégénératives, maladie d'Alzheimer (MA), maladie de Parkinson (MP), Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA), Démences à corps de Lewy (DLB)... Ces maladies se traduisent le plus souvent par la formation d'agrégats intracellulaires contenant un ou plusieurs éléments du cytosquelette. L'élément majoritaire permet de « classer » la maladie, tout du moins sur le plan neuropathologique, ces agrégats étant répartis, selon la pathologie, dans une population ou sous population de neurones. Dans certaines entités clinico-pathologiques, les agrégats sont présents dans les cellules gliales, astrocytes ou oligodendrocytes. Cependant, à l'exception de maladies liées à la mutation du gène de tel ou tel élément du cytosquelette, le rôle précis de ces agrégats et de la désorganisation du cytosquelette ne sont pas clairement déterminés. Par ailleurs il est probable qu'en fonction de la topographie et du moment de leur apparition, ils peuvent être soit toxiques, soit en rapport avec un mécanisme protecteur pour la cellule. Il n'en reste pas moins que la caractérisation des maladies neurodégénératives est très largement basée sur l'analyse

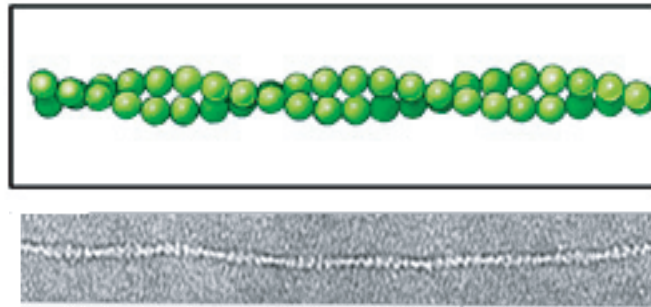


## Figure 1: Représentation schématique du cytosquelette

Le cytosquelette cellulaire est formé de trois groupes de macromolécules réparties selon leur diamètre apparent en microscopie électronique à transmission. A: Les microfilaments d'actine. Ils sont formés par la polymérisation d'une protéine globulaire, l'actine, constituant un filament de 8 nm. B: Les Filaments Intermédiaires. Ils correspondent à l'assemblage d'homo ou hétérodimères formant un réseau de filaments de 10 nm de diamètre. C: Les microtubules. Ils correspondent à la polymérisation de deux protéines globulaires associées, les tubulines  $\alpha$  et  $\beta$ , formant un cylindre creux de 24 nm. Contrairement aux deux autres classes, la classe des FI est constituée de nombreuses protéines. (d'après Alberts *et al*, dans *Molecular Biology of the Cell*, 4<sup>TH</sup> Eds).

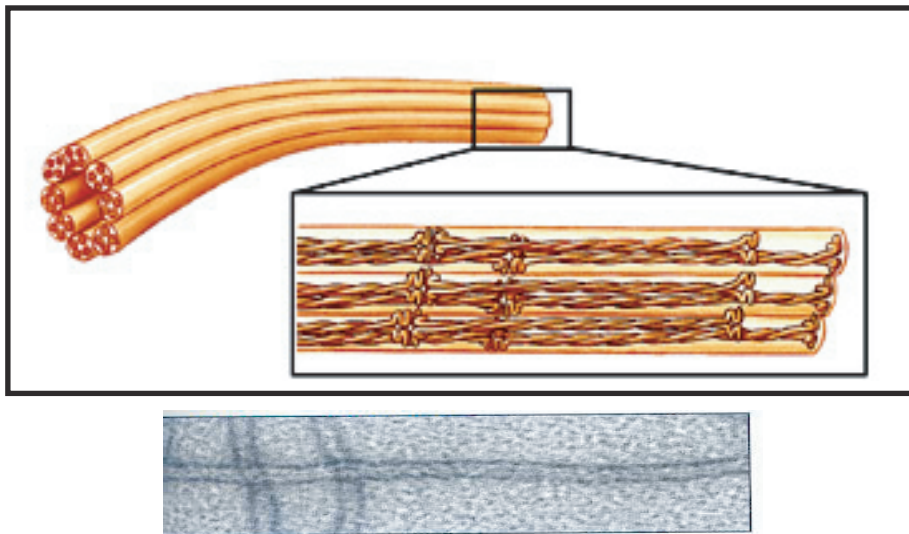
**A**

### MICROFILAMENTS (8 nm)



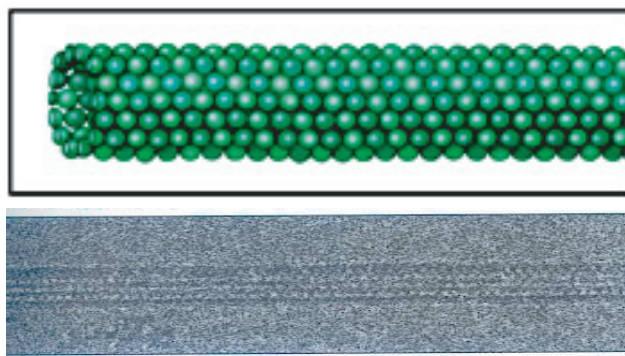
**B**

### FILAMENTS INTERMEDIAIRES (10 nm)



**C**

### MICROTUBULES (25 nm)



neuropathologique, et que les méthodes biochimiques, cellulaires et moléculaires sont déterminantes dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués.

Parmi les Filaments Intermédiaires, les Neurofilaments (NFs) sont non seulement les protéines les plus abondantes des neurones, mais en sont également les FI spécifiques. Leur métabolisme est souvent perturbé dans la plupart des maladies neurodégénératives, mais aussi dans des maladies du système nerveux périphérique d'origine génétique, métabolique ou induite par des toxiques. Étudier le métabolisme des NFs, depuis la régulation de l'expression génique jusqu'à leur catabolisme, est essentiel à la compréhension des mécanismes impliqués dans la différenciation des neurones, mais aussi dans celle de leur implication en pathologie humaine.

L'objectif du travail que nous poursuivons, est de mieux comprendre le métabolisme des NFs et leur implication en pathologie humaine, en développant des modèles, cellulaires et animaux. L'un de ces principaux modèles, utilise une construction visant à la synthèse d'une protéine de fusion entre la sous unité lourde des NFs (NFH) et un rapporteur fluorescent, eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein). Cette construction nous a permis de développer des modèles, *in vitro* et *in vivo*, pour étudier les NFs, dans des conditions proches de la physiologie (1<sup>er</sup> article).

Les NFs sont des protéines qui apparaissent lors de la différenciation terminale du neurone. Les mécanismes de régulation de leur expression, dans le temps et dans l'espace, sont donc des éléments clés lors de la maturation de ces cellules. Nous nous sommes donc intéressés aux séquences régulatrices du gène *NFH*, en particulier celles situées dans les séquences non codantes intragéniques, les introns, qui semblent jouer un rôle important dans le contrôle de l'expression du gène (2<sup>nd</sup> article).

En partant de résultats obtenus précédemment dans le laboratoire de Neurobiologie et Transgénèse, sur les souris NFHLacZ, nous avons cherché à savoir si l'association préférentielle démontrée entre une protéine associée aux microtubules (la protéine STOP, Stable Tubule Only Polypeptide) et les agrégats de NFs, était également présente dans les maladies neurodégénératives humaines, en particulier la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) (3<sup>ème</sup> article).

Enfin toujours dans un souci de rechercher une analogie entre les hypothèses émises à partir des différents modèles expérimentaux et les pathologies humaines, nous étudions le comportement du cytosquelette de l'axone, dans des neuropathies de causes indéterminées, les modifications du cytosquelette observées, pouvant orienter vers un processus physiopathologique particulier (4<sup>ème</sup> article).

## Tableau 1 : Classification des Filaments Intermédiaires (FI)

(D'après Alberts *et al*, dans Molecular Biology of the Cell, 4<sup>TH</sup> Eds)

Classe	Type	Sous type	Localisation tissulaire	Mode d'assemblage
I	Kératine acide	15	Epithéliums	1
II	Kératine basique	15	Epithéliums	1
III	"Desmin like"	Desmine	Muscle	2
		Vimentine	Mésenchyme	2
		Périphérine	Neurones (Système Nerveux Périphérique)	2
		GFAP (1)	Astrocytes	2
IV	Neurofilaments	NFL (2)	Neurones matures	2
		NFM (3)	Neurones matures	2
		NFH (4)	Neurones matures	2
		$\alpha$ -internexine	Neurones	2
V	Lamines	A	Membranes nucléaires	3
		B	Membranes nucléaires	3
		C	Membranes nucléaires	3
VI	Nestine		Neurones immatures	2
FI «orphelins»	Phakinine		Cristallin	?
	Filensine		Cristallin	?

- (1) GFAP : Glio-Fibrillary Acid Protein
- (2) NFL : Neurofilament Light Subunit
- (3) NFM : Neurofilament Medium Subunit
- (4) NFH : Neurofilament High Subunit

## 2. Les Neurofilaments (NFs)

### 2.1. Introduction

#### 2.1.1. Généralités concernant les Filaments Intermédiaires (FI)

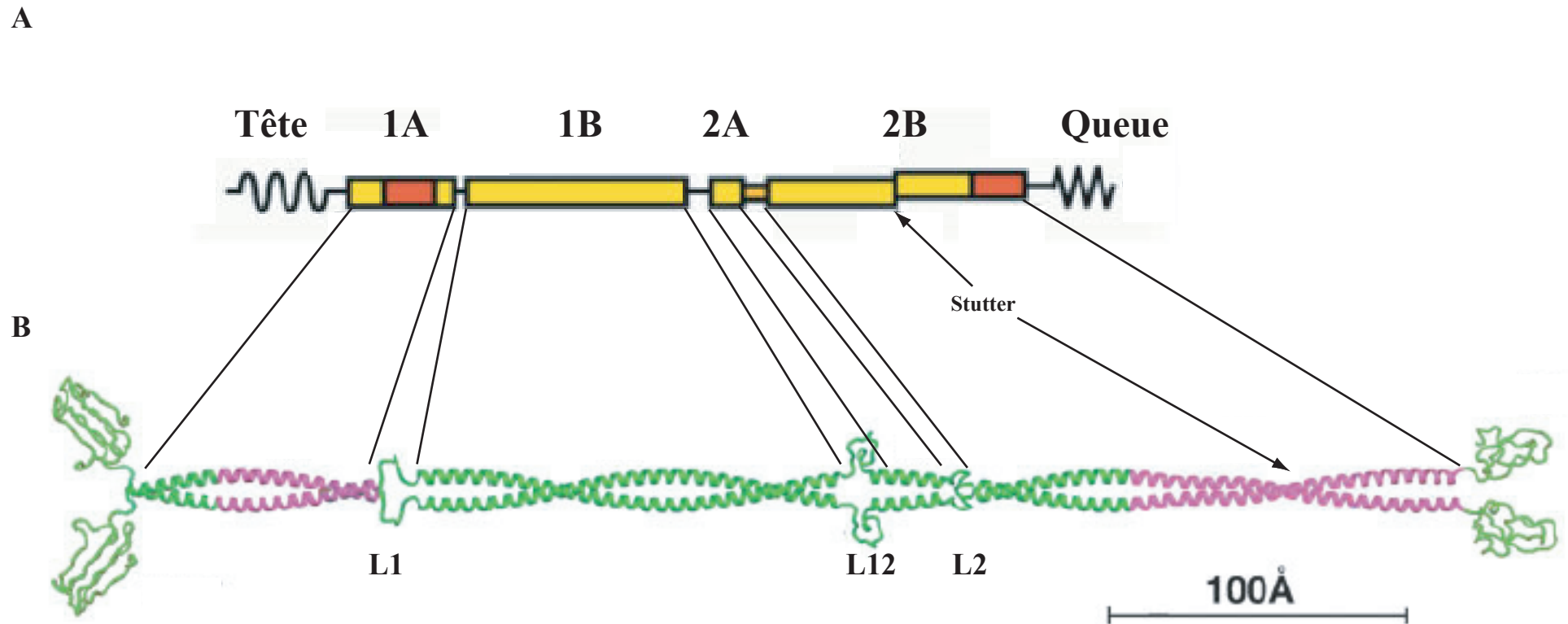
Le cytosquelette de toutes les cellules eucaryotes contient trois systèmes majeurs de filaments: les microfilaments (MF) formés par la polymérisation d'une protéine globulaire, l'actine ; les microtubules (MT) formés par la polymérisation de deux protéines globulaires, les tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  ; et les Filaments Intermédiaires (FI) (**Figure 1**).

Ils correspondent à des structures dont le diamètre apparent en microscopie électronique est de 10 à 12 nm, intermédiaire entre celui des MF et des MT. Contrairement à ces derniers, l'assemblage moléculaire des FI aboutit à la formation de structures longues, non polaires, ininterrompues de segments d'hélices  $\alpha$ . Leurs propriétés viscoélastiques les rendent à même de mieux résister aux déformations que les MT et MF. Afin d'obtenir une forme stable, ils adoptent un aspect en corde par leur association de type « coiled-coils ». Sur le plan biochimique, ils sont caractérisés par une demi-vie de l'ordre de l'heure, leur insolubilité, leur résistance aux détergeant non ioniques et ne possèdent pas d'activité enzymatique connue. Les FI sont des constituants ubiquitaires des cellules eucaryotes, et des molécules proches ont été mises en évidence chez les bactéries et les levures. Contrairement aux MT et MF qui sont des structures très conservées entre les espèces, les FI sont hautement et finement contrôlés, permettant une expression spécifique en fonction des tissus, en fonction du stade de développement embryologique voire en fonction d'un compartiment cellulaire. Ainsi, les FI représentent un groupe très hétérogène du point de vue chimique. Il existe environ 65 gènes, et six classes de FI sont actuellement individualisées en fonctions de leurs caractéristiques biochimiques et de leur distribution tissulaire (**Tableau 1**).

Malgré cette hétérogénéité, ils possèdent une organisation tripartite proche (**Figure 2**). On distingue un domaine central de structure  $\alpha$ -hélicoïdale, ou domaine en bâtonnet (« rod domain »), conservé entre les différents FI et entre les espèces. Il possède environ 310 AA pour les formes cytoplasmiques (classes I à IV) et 350 AA pour les lamines (classe V). Il est composé d'une succession d'heptapeptides riches en résidus hydrophobes et impliqués dans les interactions avec un autre domaine central (**Kreplak, 2004**). Cette périodicité au sein du domaine central est subdivisée en quatre sous domaines, 1A, 1B, 2A et 2B, par des régions sans structure  $\alpha$ -hélicoïdale ou linkers (L1, L12 et L2) (**Figure 2**). La conservation de ce domaine central est surtout prononcée au niveau de ces extrémités N et C-terminales (**Strelkov, 2003**). La première région comporte 26 résidus d'acides aminés formant les 2/3 de 1A et la seconde, de 32 résidus, est située à la toute fin de 2B. Ces deux régions ont un rôle crucial dans la formation des dimères. Enfin, il existe une insertion de 4 résidus au sein d'un

## Figure 2: Structure des Filaments Intermédiaires

A: Les domaines centraux  $\alpha$ -hélicoïdaux des FI neuronaux (boîtes jaunes) sont flanqués par les extrémités variables N-terminale ou "Tête" et C-terminale ou "Queue". Ce domaine central, en bâtonnet, est séparé par de courtes séquences non  $\alpha$ -hélicoïdales ("linker"; L1, L12 et L2) en domaines 1 et 2 et en sous domaines A et B. Quatre domaines sont ainsi individualisés: 1A, 1B, 2A et 2B. Le domaine 2B possède une structure courte de 4 acides aminés ou "Stutter". La résolution cristallographique du domaine central a été obtenue (pour la vimentine) et traduit cet aspect en hélice  $\alpha$  (B). Au niveau des extrémités N et C-terminales du domaine central se trouve deux régions hautement conservées (boîtes rouges) entre les FI et entre les espèces. Ces deux régions sont impliquées dans la formation de dimère de FI (D'après Lee *et al*, 1996 et Strelkov *et al*, 2003)



heptapeptide de 2B, appelé « stutter ». Il est toujours situé à la même place dans les différents FI, à peu près au milieu de 2B (Strelkov, 2003).

Ce domaine central est flanqué de chaque côté de domaines globulaires, l'extrémité N-terminale (tête), et l'extrémité C-terminale (queue). Ces deux domaines sont sujets à de grandes variations de taille et de séquence, et sont le siège à la fois des différences entre les FI mais aussi de certaines propriétés (Herrmann, 2004). Aucune résolution en cristallographie n'a été obtenue pour ces deux domaines. Il semble que la « tête » a une structure secondaire pauvre permettant une grande flexibilité qui serait nécessaire lors de la formation du dimère (Parry, 1999). Plus récemment, Dhe-Paganon *et al* (2002), ont montré que le domaine C-terminal des lamines contenait un domaine de type « Immunoglobuline » avec une structure en feuillets  $\beta$ -plissés, siège de mutations chez l'homme (Krimm, 2002).

### 2.1.2. Les FI neuronaux (FIn)

Les premiers neuropathologistes de la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle ont mis en évidence la présence de neurofibrilles, grâce au développement des colorations argentiques. Cependant ce n'est qu'avec l'apparition de la microscopie électronique à transmission, que Schmitt (1968) a pu montrer que le diamètre de ces neurofibrilles était de 10nm et que le terme de Neurofilaments (NFs) est apparu. Parmi les FIn, les protéines des NFs, NFL, NFM et NFH ont été les premières isolées, en raison de leur abondance. Trois autres protéines neuronales ont depuis été mises en évidence: la Nestine, l' $\alpha$ -Internexine et la Périphérine (Figure 3).

## 2.2. Les NFs

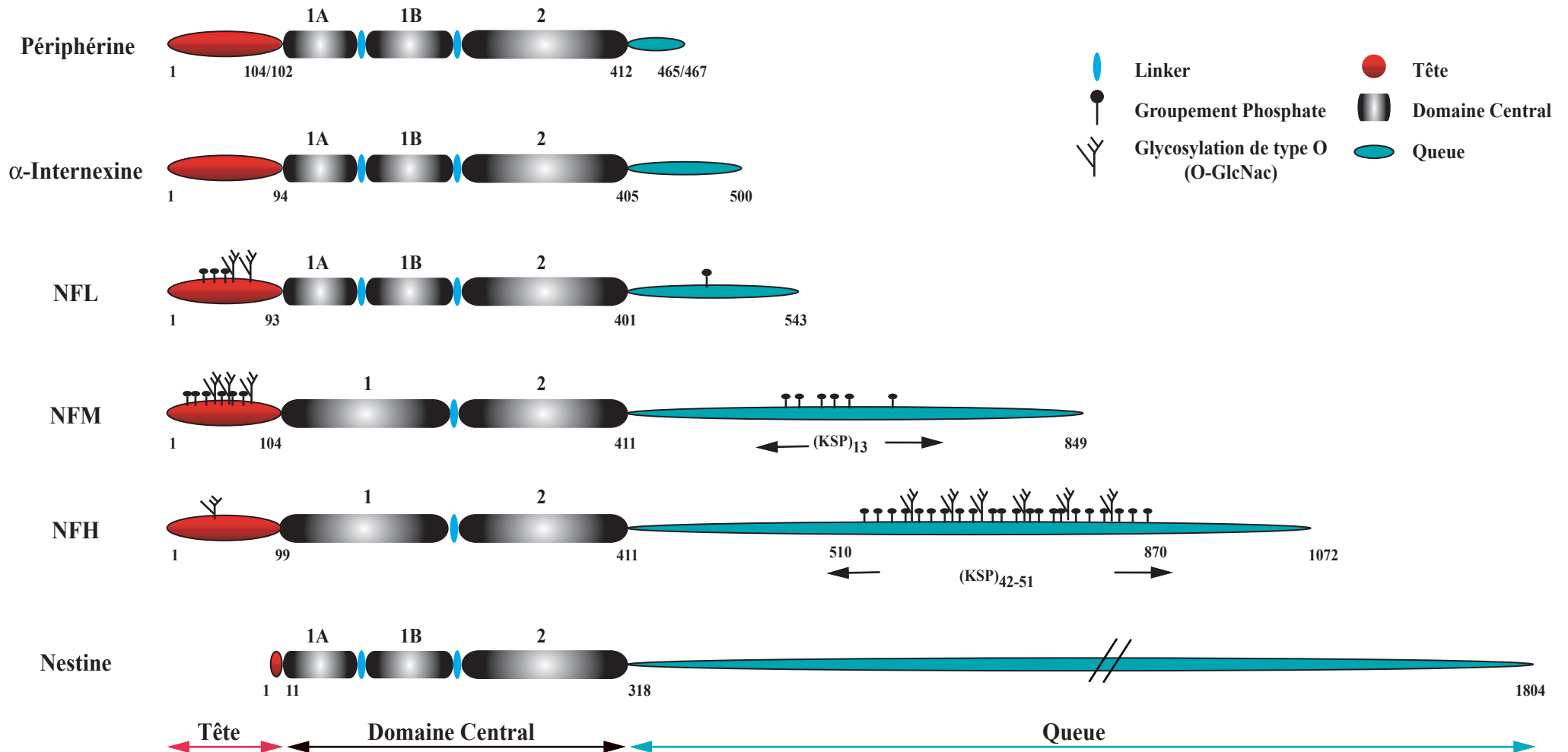
### 2.2.1. Structures des NFs

Ils appartiennent à la classe IV des FI et correspondent aux éléments les plus abondant du cytosquelette neuronal. On distingue trois sous unités en fonction de leur poids moléculaire apparent : une sous unité dite « légère ou light » de 68 kDa (NFL), une sous unité de poids moléculaire intermédiaire, « medium », de 160 kDa (NFM) et une de poids moléculaire élevé, « high », de 205 kDa (NFH) (leur poids théoriques étant respectivement de 60, 100 et 110 kDa) (Liu, 2004). La purification par sédimentation différentielle montre que le ratio NFL, NFM et NFH est de 5:2:1 (Liem, 1979). Le domaine central de 310 AA contient de nombreux résidus hydrophobes (tous les sept résidus) ce qui facilite la formation des dimères (Lee, 1996 ; Al-Chalabi, 2003).

Contrairement aux autres FI, les NFs sont caractérisés par la présence de bras radiaires qui s'étendent à partir du corps du neurofilament, jusqu'à une distance de 30 nm (Figure 4). Ceux ci

### Figure 3: Structure des nFIs

Les domaines centraux  $\alpha$ -hélicoïdaux des FI neuronaux (boîtes noires) sont flanqués par les extrémités variables N-terminale ou "Tête" (arrondis rouges) et C-terminale ou "Queue" (arrondis verts). Ils sont séparés en domaines 1 et 2, sauf pour NFM et NFH (la division du domaine 2 n'a pas été représentée. cf. Figure 2). Les sites de phosphorylation (ballons noirs) et de glycosylation de type O (arbre) sont placés sur les NFs. Le nombre d'acides aminés est indiqué pour la périphérine (rat), l' $\alpha$ -Internexine (rat), NFL (souris), NFM (souris), NFH (souris) et la nestine (rat) (D'après Lee *et al*, 1996)



sont formés par les extrémités C-terminale de NFM et surtout NFH, et forment des liens avec les autres structures du cytosquelette. Le domaine central de NFL possède une structure commune aux autres FI alors que le domaine 1 de NFM et NFH ne possède pas de région interruptrice (**Figure 3**). Les domaines N-terminaux ne partagent pas de fortes homologies entre leur séquence, mais ont la particularité d'être riches en résidus Sérine (S) et Thréonine (T).

La caractéristique des NFs est leur extrémité C-terminale. Celle de NFL est courte mais possède de nombreux résidus de Glutamate (E) parfois appelés segment E. La « queue » de NFM est plus longue, comporte aussi des segments E ainsi que des motifs de type Lysine-Sérine-Proline (KSP). Ces derniers peuvent être séparés en des séquences de type KSPXK (X, n'importe quel résidu) et KSPXY (Y n'est pas K). Le nombre et la distribution de ces sites dépendent de l'espèce. Enfin, NFH se différencie au sein des FI et des NFs par une longue extrémité C-terminale riche en motifs KSP (entre 42 et 51 selon les espèces) (**Figure 3**). Chez l'homme deux isoformes sont présentes: l'une avec 43 répétitions (forme courte ou S) et l'autre avec 44 répétitions (forme longue ou L) (**Figlewicz, 2003**). L'extrémité C-terminale de NFH contient quatre domaines repliés dont la stabilité et la longueur sont augmentées avec le degré de phosphorylation (**Aranda-Espinoza, 2002**).

## **2.2.2. Structure des autres FI (Figure 3)**

### **2.2.2.1. La Nestine**

Il s'agit d'un composant transitoire du cytosquelette des neurones, exprimé dans des cellules multipotentes du neurectoderme, avant la différenciation finale en neurone. Il s'agit de la plus grande protéine de FI connue. Son domaine N-terminal est très court (11AA), et le long domaine C-terminal (150 kDa) contient jusqu'à 35 répétitions de motifs de 11AA, acides, expliquant son poids moléculaire de 200 kDa (**Lee, 1996**). Lors de la différenciation neuronale, la Nestine est régulée négativement et voit son expression inhibée avant d'être remplacée par d'autres FI. Cependant dans certaines circonstances, son expression réapparaît (régénération musculaire, cicatrice gliale du système nerveux central après traumatisme crânien...). Elle a très probablement un rôle majeur, régulé par des phénomènes de phosphorylation, dans le contrôle de l'assemblage des autres FI, mais aussi dans son assemblage avec la Vimentine et l' $\alpha$ -Internexine (**Michalczyk, 2005**).

### **2.2.2.2. La Périphérine**

Elle a initialement été isolée dans des PC12 (cellules provenant d'une tumeur de la médullosurrénale de rat, le phéochromocytome) (**Lee, 1996**). Elle est exprimée dans une sous population de neurones dont les axones se dirigent vers la périphérie, en dehors du système nerveux

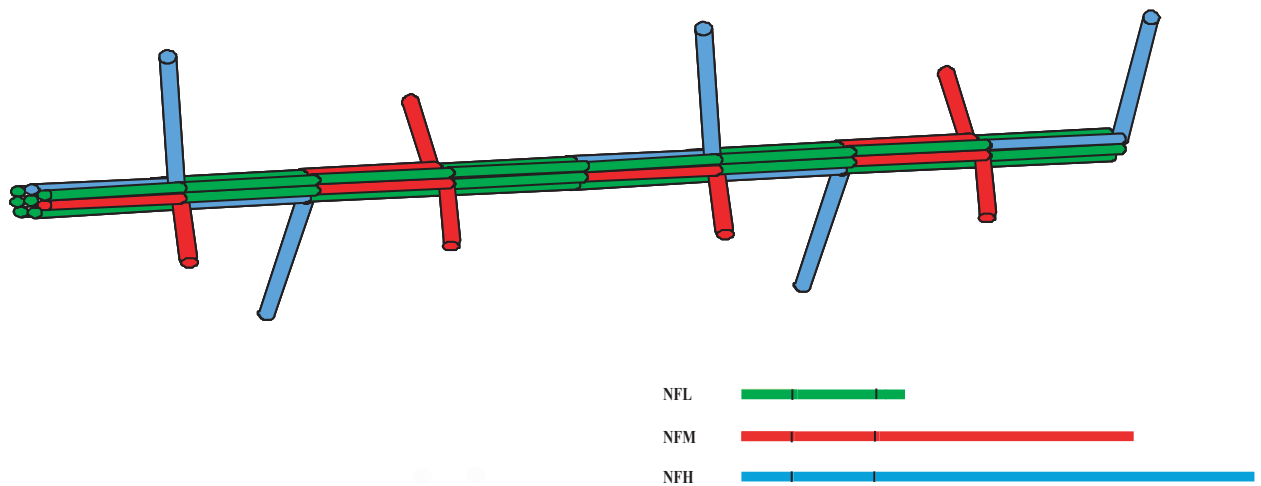


## Figure 4: Modèle schématique et théorique de la structure finale et des relations des NFs

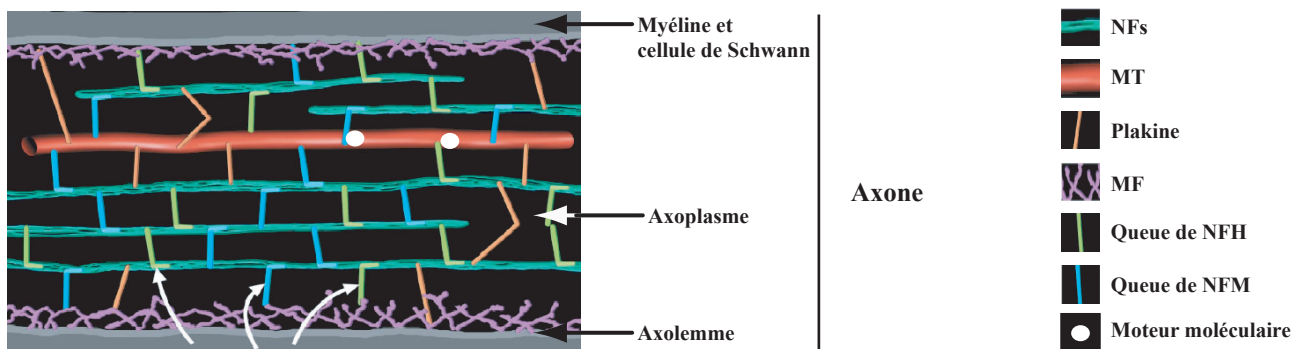
A: Schéma représentant l'agencement des trois sous-unités dans le NF final. L'axe est formé par les domaines centraux des trois sous-unités et notamment de NFL (boîtes vertes). Les extrémités C-terminales des sous-unités NFM (boîtes rouges) et NFH (boîtes bleues) se projettent perpendiculairement à l'axe du NF formant des bras radiaires capables d'interagir avec les autres éléments du cytosquelette. (D'après Nixon *et al*, 1993)

B: Les composants du cytosquelette sont organisés en un réseau tridimensionnel à l'intérieur de l'axone. Les neurofilaments (NFs, vert sombre) sont en relation entre eux, avec les microtubules (MT, rouge) et les microfilaments (MF, violet) par l'intermédiaires des bras radiaires de NFM (bleu) et NFH (vert clair). Leur transport est assuré par les moteurs moléculaires (en blanc, dynéines et kinésines). Les trois éléments, MF, NFs et MT, sont connectés aussi par des protéines de la famille des plakines (orange) comme BPAG1, qui permettent une stabilisation de l'axoplasme. Les signaux moléculaires provenant de la cellule de Schwann (flèches) peuvent contrôler le niveau de phosphorylation des bras radiaires de NFM et NFH et donc moduler l'organisation du réseau. (D'après Larivière *et al*, 2004)

A



B



central (**Tableau 1**). Elle appartient à la classe III des FI. La surexpression de la Périphérine chez l'animal aboutit à une maladie du motoneurone (cf. ci dessous). En culture de cellules, sa surexpression aboutit à la formation de corps apoptotiques par un mécanisme dépendant du TNF $\alpha$  (**Robertson, 2001**). De plus, il existe une augmentation de la production de la Périphérine lors des processus de régénération ou sous l'action de cytokines (IL6 et le LIF par une voie de signalisation JAK/STAT). Une augmentation de son ARNm a été mise en évidence au cours de modèles murins de SLA (**Troy, 1990 ; Lecomte, 1998 ; Larivière, 2003 ; Robertson, 2003**). Enfin, un transcrit alternatif aberrant de 61 kDa semble être préférentiellement agrégé dans les sphéroïdes des motoneurones de SLA (**Robertson, 2003**). Julien *et al* (**2000**) ont proposé un modèle résumant l'implication de la Périphérine dans la toxicité des motoneurones (**Figure 5**).

### 2.2.2.3.L' $\alpha$ -Internexine

Elle appartient à la classe IV des FI, a un poids moléculaire de 60 kDa et s'exprime dans les petits interneurones. Elle est capable de former *in vitro* des homodimères (**Tableau 1**). L'extrémité N-terminale est riche en résidus de type Lysine (K) et Glutamate (E), et à la fois la « tête » et la « queue » ont de courtes séquences très homologues à NFM (**Lee, 1996**).

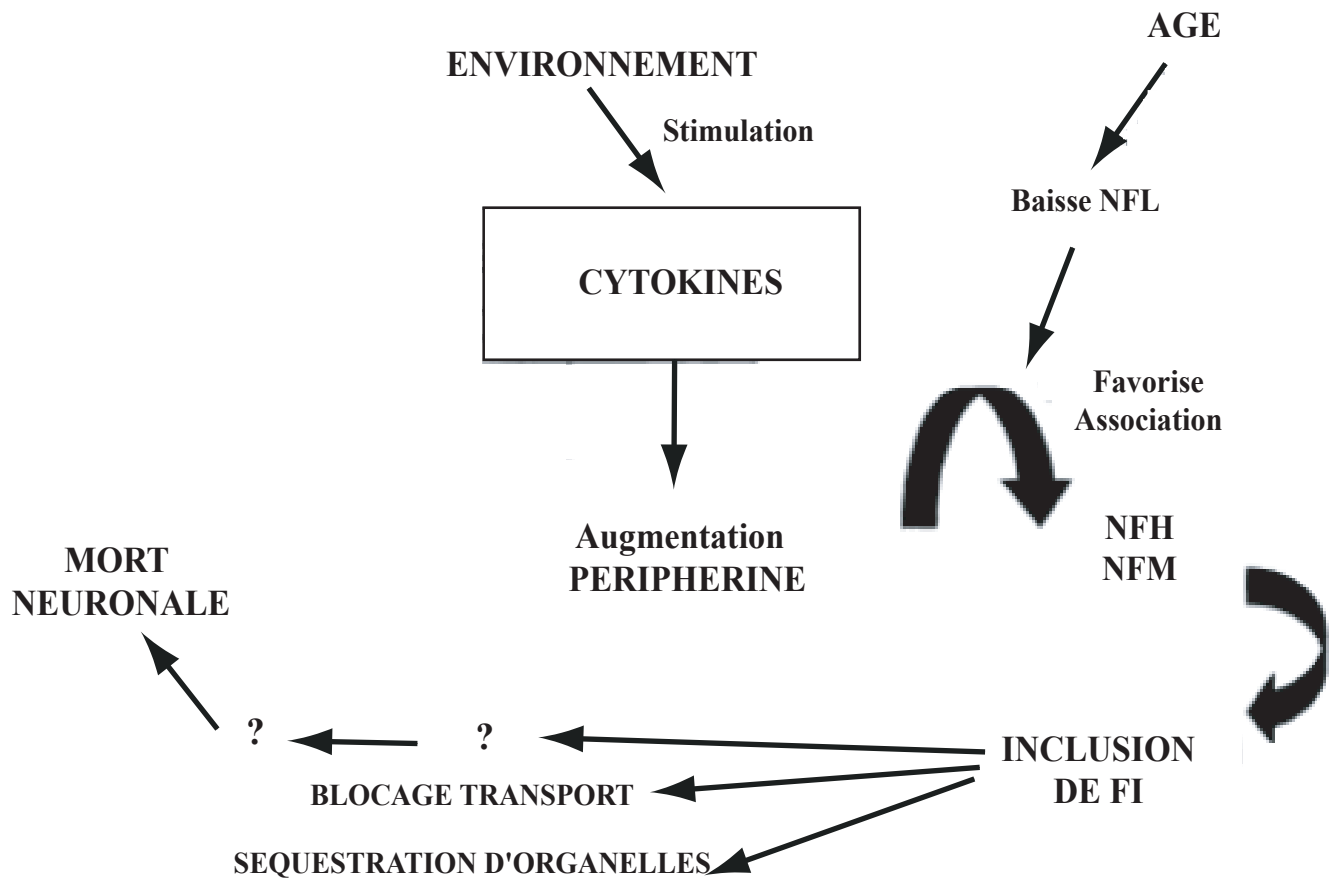
## 2.3. Assemblage des FI (**Tableau 1 ; Figure 6**)

Il s'agit d'un assemblage spontané ne requérant pas, *in vitro*, d'énergie moléculaire, contrairement à celui des autres éléments du cytosquelette, MF et MT requérant l'hydrolyse de nucléotides (ATP ou GTP). Les premières expériences *in vivo* ont permis de montrer que les FI étaient aussi des structures dynamiques dont l'assemblage apparaissait plus complexe que celui observé *in vitro* (**Chou, 2000**). Les domaines 1A et 2B sont les éléments indispensables à la formation des dimères, comme le montrent les études de cristallographie (**Strelkov, 2003**). Les résultats d'expériences *in vitro*, laissent penser qu'en plus de la classification classique, une autre plus fonctionnelle peut être actuellement proposée : groupe 1 (classe I et II), groupe 2 (classe III, IV et VI) et groupe 3 (classe V) (**Tableau 1 et Figure 6**). Ces trois types d'auto assemblage ne sont pas exclusifs et peuvent coexister au sein d'une même cellule. Le groupe 1 est constitué de FI formant des hétéropolymères obligatoires alors que les FI du groupe 2 sont capables, au moins *in vitro*, de former des homopolymères bien qu'ils apparaissent le plus souvent sous forme d'hétéropolymères *in vivo*. Les Lamines ne s'assemblent pas dans le cytoplasme et sont directement recrutées au niveau de la membrane nucléaire interne et constitue le groupe 3 (**Herrmann, 2004**).

Les sous unités des NFs apparaissent s'assembler selon un mode 2 puisqu'ils requièrent la présence de NFL et ceci malgré certaines particularités (**Kreplak, 2004**). Dans cette configuration, le dimère s'assemble rapidement, en 1 seconde, avec un autre dimère, de façon

**Figure 5: Représentation schématique de la toxicité de la périphérine**

Ce modèle prend en compte l'âge et les facteurs environnementaux. Les cytokines pro-inflammatoires peuvent de plus être un intermédiaire de la mort neuronale en augmentant la synthèse de Périphérine. Celle-ci entraîne alors une accumulation de NFs. La réduction de NFL secondaire à l'âge est un phénomène aggravant. Le mécanisme exact de la toxicité des agrégats peut se faire par la perturbation du transport axonal, une séquestration d'organelles, et notamment les mitochondries, ou par un autre phénomène. (D'après Julien *et al*, 2000)



antiparallèle, formant des structures courtes de 60nm de long et de 16nm de diamètre. Ces unités élémentaires sont appelées ULFs (Unit Length Filaments). Le modèle est tel que huit tétramères sont nécessaires pour former ces ULFs (**Hermann, 2000**). Une seconde phase d'élongation longitudinale intervient ensuite puis enfin une troisième, plus longue, caractérisée par une compaction radiale aboutissant à un FI de la taille de 10nm. Il apparaît que la première phase est étroitement contrôlée par le domaine N-terminal et que la troisième est sous le contrôle du domaine C-terminal (**Kleplak, 2004**).

Quoique intéressant, ce classement d'assemblage ne recoupe pas entièrement les mécanismes impliqués *in vivo*. En effet, les FI sont aussi des structures dynamiques qui interagissent avec les autres éléments du cytosquelette.

### 2.3.1. Cas des NFs (Figure 7)

Les premières études *in vitro* ont montré que NFL a un rôle essentiel dans l'assemblage des sous unités. Les NFs sont des hétéropolymères obligatoires impliquant NFL dans la formation du cœur du neurofilament. La formation finale du NF contient ~ 32 molécules par section. NFM et NFH, bien que possédant un domaine central, sont incapables, *in vitro*, de s'assembler en l'absence de NFL (**Balin, 1991a, Balin, 1991b**), alors que ce dernier, tout du moins pour la forme humaine, peut former de courts filaments (**Geisler, 1981 ; Heins, 1993 ; Carter, 1998**).

L'incapacité de NFH de s'auto assembler peut s'expliquer par l'absence dans le domaine central de résidus proline et par sa richesse en résidus chargés entre les positions 186 et 215 (**Lees, 1988**). En culture de cellules, l'expression de formes humaines mutées de NFL (dans le domaine N-terminal ou central), mutations présentent dans certaines neuropathies héréditaires humaines (cf. ci dessous), abolit les propriétés d'assemblage de NFL et induit au contraire la formation d'agrégats (**Perez-Olle, 2002**). Ces agrégats sont plus nombreux lorsque le domaine central est perturbé. Ces résultats sont en faveur d'un effet dominant négatif de la mutation sur la constitution du réseau. NFL forme donc le cœur du neurofilament. NFM et NFH viennent alors s'ancrer de manière périodique sur cet axe grâce au domaine central (**Figure 4**).

La tête de NFL est nécessaire lors de l'assemblage des NFs (**Heins, 1993**). De plus, NFM est responsable d'une stabilisation de cet assemblage (**Al-Chalabi, 2003**). En culture de cellules, les trois sous unités sont capables de s'associer individuellement avec la Vimentine pour former un réseau de FI cytoplasmiques. Cet assemblage requière la présence de la « tête » et du domaine central mais ne fait pas intervenir le domaine C-terminal (**Gill, 1990 ; Wong, 1990 ; Chin, 1991**). Les domaines C et N-terminaux n'interviennent pas dans les propriétés d'assemblage de NFM avec NFL ou la Vimentine dans des fibroblastes comme le montrent les protéines de fusion. En effet l'adjonction de la GFP, en N-terminal des sous unités NFL et NFH, ne modifie pas leur propriété de formation de NFs (**Roy, 2000**). Cependant, la surexpression en culture de cellules de GFP-NFH aboutit à la

## Figure 6: Modèle schématique d'association des dimères des FI

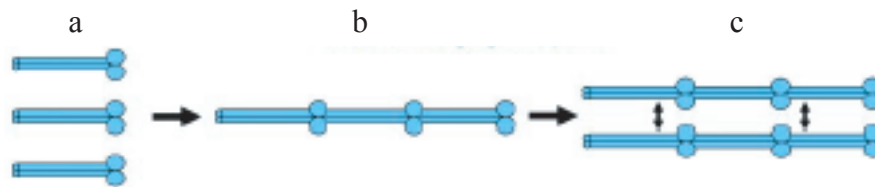
Les modes d'assemblage sont déduits d'expériences *in-vitro* (D'après Strelkov *et al*, 2003 et Herrman *et al*, 2004)

(1) Groupe 3. Les dimères de Lamine s'associent initialement (a) puis il y a une phase d'élongation longitudinale (b) suivie d'une élongation latérale (c) constituant le filament final.

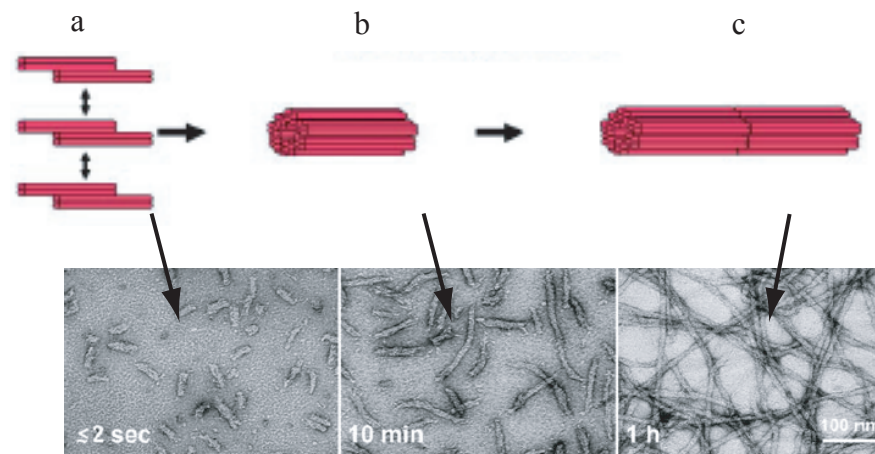
(2) Groupe 2: Le prototype est la Vimentine. Deux dimères s'associent en anti-parallèle pour former un tétramère (a). Plusieurs tétramères se rassemblent latéralement et forment une "unité filamentaire" (b, Unit Length Filaments ou ULF). L'association longitudinale de ces ULFs forment un filament proprement dit après une phase de compaction latérale (c). L'aspect correspondant en Microscopie Electronique est représenté pour chaque phase.

(3) Groupe 1: Les Kératines s'associent en hétérotétramères par association latérale (a) et longitudinale (b, pratiquement concomitante) en un FI de longueur définitive (c). Les ULF ne sont rencontrées qu'à faibles concentrations.

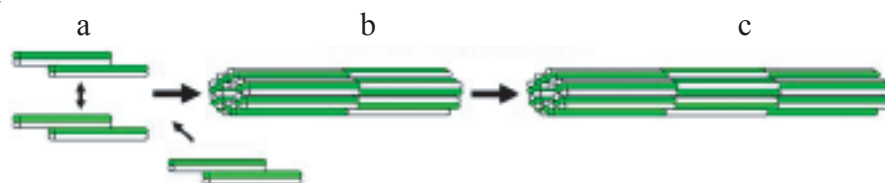
### (1) Groupe 3



### (2) Groupe 2



### (3) Groupe 1



formation d'agrégats périnucléaires de NFs qui altèrent la structure, la motilité et la viabilité des cellules (Szebenyi, 2002). Mais, une délétion de la partie C-terminale du domaine central conduit à la formation d'une forme dominante négative de NFM, responsable d'une désorganisation du réseau de FI, comprenant NFL ou la Vimentine. (Wong, 1990). L'absence des extrémités C-terminales de NFL, NFM ou NFH ne modifie pas les propriétés d'assemblage des NFs entre eux, ni l'adjonction de motifs supplémentaires comme des cibles de type c-myc (Gill, 1990 ; Wong, 1990). Par contre lorsque des cellules déficientes en FI, telles que les SW13-, sont transfectées avec des NFs, la présence de NFL est requise pour obtenir un réseau de FI (Lee, 1993). L'expression des sous unités NFL et NFM dans des oligodendrocytes de souris transgéniques, normalement dépourvus de FI, abonde dans ce sens. La formation d'un réseau de FI ne se fait que chez les animaux exprimant les deux sous unités et non l'une ou l'autre (Lee, 1993).

L'ensemble de ces résultats implique que les NFs sont des hétéropolymères obligatoires requérant NFL et NFH ou NFM. A la différence de la kératine, où l'association de l'hétérodimère nécessite un ratio de 1:1 entre les deux sous unités, les NFs tolèrent un spectre large de ratio entre les trois sous unités. Cette propriété a une implication *in vivo* puisque les ratios évoluent lors de la différenciation neuronale (Nixon, 1992).

Le plus intéressant est que des partenaires de polymérisation semblent être présents dans la cellule. Cela a été montré récemment pour une protéine appelée NUDEL (mammalian homologue of *Aspergillus nidulans* nuclear distribution molecule NudE). Le schéma proposé est que cette protéine interagit avec le « rod-domain » de NFL favorisant ainsi la polymérisation des NFs (Figure 7). Elle interviendrait aussi en permettant la relation des NFs avec la Dynéine (Nguyen, 2004). La présence de NUDEL est importante pour la stabilité et l'assemblage des NFs, d'autant que les expériences d'interférence à l'ARN (RNAi) aboutissent à une réduction, au niveau protéique, de NFL et/ou à l'accumulation de NFs près du noyau (Holzbaur, 2004 ; Nguyen, 2004).

L'extrémité N-terminale de NFL est sujette à des modifications post-traductionnelles de type phosphorylation et O-glycosylation, modifications dynamiques impliquées dans la régulation de l'assemblage. La phosphorylation de ce domaine est responsable d'une inhibition de l'assemblage (cf. ci dessous). L'importance de NFL dans l'assemblage, et donc dans un transport normal des NFs, a été illustrée *in vivo*. La présence d'une forme mutée chez la caille est responsable d'une accumulation des NFs (Toyoshima, 2000). Enfin, l'assemblage peut être perturbé par l'adjonction d'un rapporteur à l'extrémité C-terminale de NFH, la  $\beta$ -galactosidase, capable de s'auto-assembler de manière puissante et irréversible (Zabin, 1982 ; Eyer, 1994).

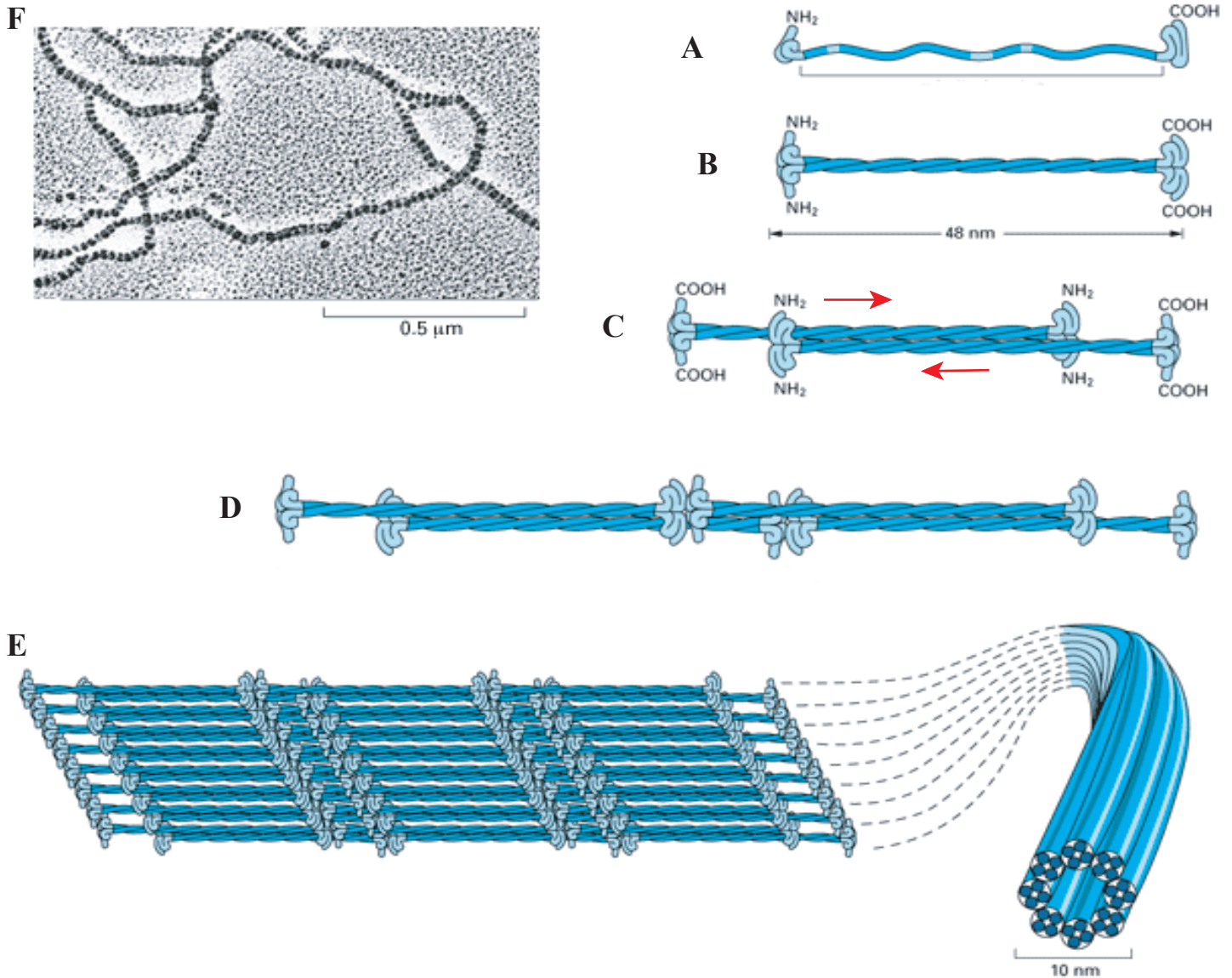
### 2.3.2. Assemblage des autres FIn

L' $\alpha$ -Internexine possède une structure hybride particulière qui explique ses capacités d'auto-assemblage ou d'hétéro-assemblage avec les FI de la classe III ou IV (Tableau 1 ; Figure 3).

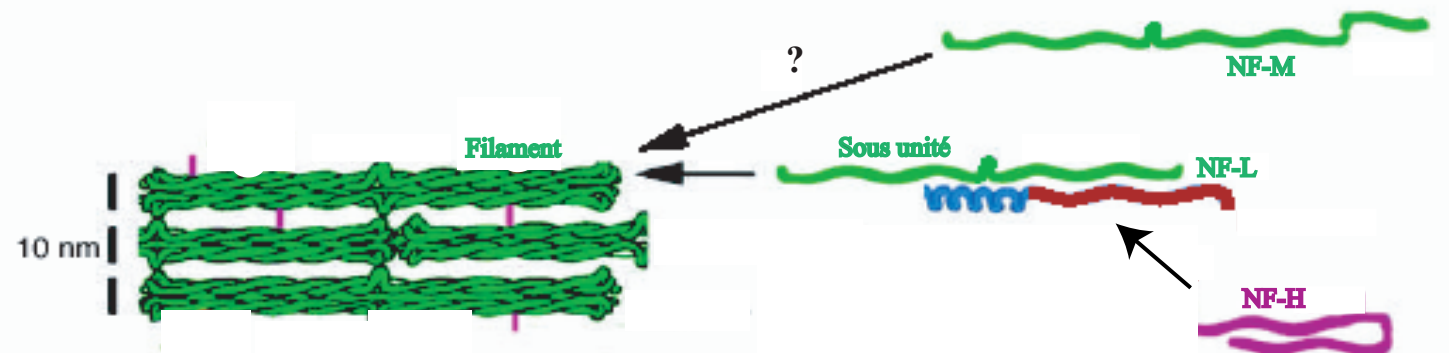
## Figure 7: Modèle schématique d'association des NFs

Le principe est celui du groupe 2 (ou du groupe 3) décrit dans la Figure 6. Un protomère de NF (A) s'associe en parallèle avec un autre protomère réalisant un dimère polarisé (B) dans lequel le domaine central conservé réalise une association de type "coiled-coil". Deux dimères vont former un tétramère antiparallèle, soluble (C). L'assemblage latéral conduit à un protofilament (D) puis un filament définitif (E) de 10nm de diamètre comme montré sur l'image de microscopie électronique (F). (D'après Alberts B *et al*, dans Molecular Biology of the Cell, 4<sup>th</sup> Eds).

G: Modèle moléculaire du rôle de NUDEL dans l'assemblage des NFs. La protéine NUDEL (rouge) interagit directement par son domaine en bâtonnet (bleu) avec un protomère de NFL (vert) favorisant ainsi son assemblage dans le NF. En parallèle NFH (violet) s'incorpore indirectement avec NUDEL par un mécanisme mal élucidé. L'incorporation de NFM se ferait selon un schéma voisin impliquant une molécule inconnue (D'après Nguyen *et al*, 2004).



## G Rôle de NUDEL



En effet, son domaine central est organisé en sous domaines 1A, 1B et 2, comme NFL et contrairement à NFH et NFM, mais ses extrémités N et C-terminales contiennent des séquences homologues à NFM (**Ching, 1993**). La Périphérine peut aussi former des homo ou hétérodimères avec les NFs. La co-expression de la Périphérine et des NFs existe surtout lors du développement ou lors des phénomènes de régénération axonale. Comme pour les autres FI de la classe III, les domaines central et N-terminal ont un rôle crucial dans l'assemblage de la Périphérine que n'a pas le domaine C-terminal (**Cui, 1995**). L'assemblage de la Périphérine se fait préférentiellement avec NFL. L'association avec NFH est par contre responsable d'une altération de l'assemblage de la Périphérine, montrant que la perturbation de la stœchiométrie des NFs peut avoir un retentissement sur les propriétés d'assemblage de la Périphérine (**Beaulieu, 1999**).

## **2.4. Modifications post-traductionnelles des NFs (Figure 3)**

### **2.4.1. Phosphorylation (Figure 3)**

Il s'agit de leur principale modification post-traductionnelle. Elle touche les trois sous unités, de manière différente, implique des kinases spécifiques et ne concerne que les extrémités N et C-terminales. C'est ce degré important de phosphorylation qui explique un poids moléculaire très nettement supérieur à celui prédit. Il s'agit d'un phénomène dynamique et très finement régulé dans le temps et dans l'espace (**Pant, 2000**). *In vivo*, il correspond à un phénomène lent probablement lié à l'accessibilité des sites de phosphorylation. Cette séquence topographique s'explique par la nécessité de phosphorylation d'un site suivant après la phosphorylation du site précédant (**Xia, 2003**).

L'extrémité C-terminale de NFM et NFH est remarquable car elle possède des motifs répétés de type KSP au nombre de 13 pour NFM (chez l'homme) et 44 ou 45 pour NFH (chez l'homme et 51 chez la souris) (**Figlewicz, 1993 ; Lee, 1996 ; Al-Chalabi, 2003**). La plupart, si ce n'est tous les résidus Sérines de NFH, sont phosphorylés ce qui en fait la protéine la plus phosphorylée de l'organisme (**Julien, 1982**). Il existe également un gradient proximo-distal de phosphorylation des NFs dans l'axone, probablement en rapport avec un gradient identique des kinases et phosphatases (**Brown, 1998**). Mais au sein d'un même axone, NFM et NFH peuvent consister en la superposition de domaines contigus phosphorylés et non phosphorylés (**Gotow, 1994 ; Brown, 1998**).

La phosphorylation par des kinases (Protéine Kinase A et C) de l'extrémité N-terminale de NFL et NFM, intervient dans le contrôle de l'assemblage. Elle inhibe ou en favorise le désassemblage de réseaux de NFs déjà formés *in vivo* et *in vitro* (**Hisanaga, 1994 ; Cleverly, 1998 ; Sihag, 1999**). Les Sérines 55 et 57 de NFL joue un rôle primordial. Cette phosphorylation se produit immédiatement après la synthèse de NFL et NFM, et préviendrait la formation précoce de NFs avant leur transport axonal (**Sihag, 1991**). La phosphorylation de l'extrémité C-terminale concerne NFM et surtout NFH. Elle fait intervenir de nombreuses kinases comme des Caséines Kinases (CK1), des



sérines kinases (GSK-3 $\alpha/\beta$ , cdk-5/p35) et des prolines kinases, [SAPK $\gamma$ , p38 $\alpha$  kinase, Erk1 et 2, SAPK1b (JNK3)] (Guidato, 1996 ; Giasson, 1997 ; Veeranna, 1998 ; Brownless, 2000 ; Ackerley, 2004). Cdk-5 et son activateur neurone spécifique, p35, interviennent plus particulièrement dans la phosphorylation des motifs KSPXK de NFH et NFM (Sun, 1996 ; Kesavapany, 2003). Les voies MAPKK et Erk1/2 sont capables de phosphoryler les deux types de motifs, avec une affinité préférentielle pour ceux de type KSPXY (Veeranna, 1998). L'inhibition, *in vitro*, de cdk-5 et Erk1/2, aboutit à une réduction de l'état de phosphorylation de NFH et NFM et réduit l'apparition de neurites (Veeranna, 1998 ; Sharma, 1999). L'activité de SAPK1b, kinase neuronale, peut, *in vitro*, être augmentée sous l'action du glutamate (Brownless, 2000). L'activation, *in vitro*, de SAPK $\gamma$  induit une phosphorylation anormale de NFH et son accumulation périnucléaire dans les PC12, indépendamment de la voie Erk (Giasson, 1996). *In vitro*, les NFH issus de la corne antérieure de la moelle épinière sont plus phosphorylés mais se déphosphorylent plus vite que ceux issus de la corne postérieure (Chertoff, 1995). L'activation de la voie Erk1/2 apparaît être suffisante pour la phosphorylation de l'extrémité C-terminale de NFM (Li, 1999). Cette voie permettrait de rendre accessible d'autres sites KSP de NFM sensibles à la phosphorylation par cdk5. Dans les conditions de toxicité cellulaire induite par le calcium, la calpaïne devient un activateur de la voie Erk1/2 pouvant expliquer l'hyperphosphorylation des NFs (Veeranna, 2004). Cependant, NFL peut être phosphorylée sur la sérine 473 par la caséine kinase II (Nakamura, 1999).

La phosphorylation des domaines C-terminaux des NFs est considérée comme la modification contrôlant l'espacement entre les NFs, par des forces répulsives ou attractives en fonction du degré de phosphorylation, permettant de contrôler le diamètre axonal. La formation de ces bras radiaires crée un espace où les autres protéines sont exclues (Brown, 1997).

Les principales phosphatases du système nerveux, PP1, PP2A, ont une expression diffuse, gliale et neuronale. La calcineurine (PP2B) a une expression plus restreinte aux neurones (Strack, 1997). Le point remarquable est que l'ensemble de ces phosphatases a une expression axonale dans les neurones. Malgré cette répartition uniforme, un pool de PP1 et PP2A est associé aux NFs lors de leur purification, mais la phosphatase PP2A est l'enzyme la plus importante, comme le montre l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques, tels que l'acide okadaïque (Strack, 1997). Elle permet notamment de contrôler le degré de phosphorylation des sites de type KSPXK de NFH induits par cdk5 (Veeranna, 1995). PP1 est plus en relation avec le domaine N-terminal de NFL (Terry-Lorenzo, 2000). La calcineurine est une autre phosphatase des NFs, notamment de NFH, dont l'inhibition provoque l'accumulation de NFs phosphorylés dans les neurones (Tanaka, 1993).

Ainsi les NFs s'assemblent en une structure dynamique complexe, hautement régulée, en particulier par phosphorylation, qui forme un réseau intervenant dans la conduction nerveuse et maintenant la charpente de l'axone.

## 2.4.2. Glycosylation

Elle concerne les « têtes » de NFL et NFM, et comme la phosphorylation est un processus dynamique et contrôlé (**Figure 3**). L'addition de résidus sucrés par une liaison de type *O*-glycosylation (*O*-GlcNAc) se fait sur les Sérines 34 et 48 de NFL et Thréonine 19 et Sérine 34 de NFM, donc proche des sites indispensables à l'assemblage (**Dong, 1993**). Récemment, l'addition de sucres a été mise en évidence sur NFH, à la fois sur la « tête » (Thréonine 53, Sérines 54 et 56) mais aussi à proximité des motifs KSP de l'extrémité C-terminale (**Dong, 1996**). La phosphorylation de l'extrémité C-terminale de NFM et la glycosylation surviennent en même temps ce qui implique une influence mutuelle mais aussi un rôle dans le contrôle de l'assemblage et de la formation des NFs (**Lüdemann, 2005**). La répulsion secondaire à l'addition de groupement phosphates serait remplacée par une attraction, secondaire à l'addition de résidus sucrés. Ainsi la dynamique phosphorylation/*O*-glycosylation (contrôlée par les couples kinases/phosphatases et transférases/*N*-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidases) régule l'assemblage des NFs (**Liu, 2004**).

## 2.5. Fonctions des NFs

Les fonctions des NFs découlent intimement de leur état de phosphorylation.

### 2.5.1. Croissance longitudinale de l'axone

De nombreux axones chez l'homme s'étendent sur de grandes distances, pouvant atteindre un mètre, afin de former une synapse avec leur cible. Il est établi que les MF et MT jouent un rôle majeur dans la formation du cône de croissance. De plus, ces deux partenaires sont en relation très étroite, via probablement des MAPs, TAU et MAP2, et des petites kinases de la famille Rho GTPases (pour revue cf. **Dehmelt, 2004**). Cependant, les FIn interviennent dans l'élongation de l'axone probablement en le stabilisant. L'injection d'anticorps anti-NFM, dans des embryons de *Xenopus laevis* au stade 2 cellules, montre que les neurites sont plus courts, que l'élongation prend plus de temps. Il en résulte une morphologie anormale des neurites, alors que l'initiation du cône de croissance est normale (**Lin, 1995 ; Walker, 2001**). Les NFs permettraient de faciliter l'élongation en la rendant plus efficace.

Les expériences d'inactivations géniques des FIn chez l'animal vont aussi dans ce sens, puisque ces animaux transgéniques ne présentent pas d'anomalies majeures du développement (**Larivière, 2004**). L'absence de Périphérine est par exemple responsable d'une perte des axones sensitifs non myélinisés (**Larivière, 2002**). L'utilisation d'oligonucléotides anti-sens anti- $\alpha$ -Internexine en culture de cellules, bloque la croissance de neurites déjà formés, mais ne modifie pas la formation de néo-neurites. Ces résultats n'ont cependant pas été retrouvés dans des souris

transgéniques (Levavasseur, 1999 ; Shea, 1999). Par contre, des cellules non neuronales qui expriment la protéine de fusion GFP-NFH, émettent de longs prolongements cytoplasmiques, inhabituels, ressemblant à des neurites (Szebenyi, 2002).

Cependant, les expériences *in vivo* donnent des résultats plus mitigés sur l'importance de NFH. En effet, en son absence, le diamètre de l'axone des neurones n'est que peu modifié, ce qui laisse penser que des mécanismes compensatoires, notamment par NFM, interviennent, d'autant que l'absence de ce dernier, chez des souris transgéniques, réduit très fortement le calibre axonal (Elder, 1999). Il est donc concevable que dans des espèces de plus grande taille l'absence de NFs puisse être plus délétère sur l'élongation de l'axone.

### 2.5.2. Croissance radiale de l'axone et vitesse de conduction nerveuse

Les NFs contrôlent et modulent le diamètre axonal. Ce rôle est fondamental puisque le diamètre est directement en rapport avec la vitesse de conduction le long de l'axone, notamment dans les axones myélinisés de gros diamètre. Ceci explique l'abondance en NFs dans ce type d'axone. En fonction de la ou des sous unités modifiées, la réduction de la vitesse de conduction nerveuse et du diamètre de l'axone est variable. Comme attendu, la perturbation de l'assemblage des NFs par la modification de NFL (suppression ou expression de la forme humaine) provoque un ralentissement des conceptions nerveuses et une réduction du calibre axonal (Kriz, 2000 ; Nguyen, 2000). Les résultats les plus intéressants portent sur le rôle de NFM et NFH. En effet, chez la souris *Trembler*, modèle de démyélinisation, une diminution de la phosphorylation de NFH est observée (de Waegh, 1992). Ces résultats supportent donc un rôle des cellules de Schwann sur l'état de phosphorylation et dans le contrôle du calibre axonal. Dans un autre modèle, souris déficientes pour la MAG, une baisse de la phosphorylation de NFM et NFH aboutit à une réduction de l'espacement des NFs et donc du calibre axonal (Yin, 1998). Lors de la co-culture de neurones issues du ganglion postérieur (DRG) ou de PC12 avec des COS-7 exprimant la MAG, le niveau de phosphorylation de NFM et NFH est augmenté par une voie dépendante de cdk5 et de Erk1/2 (Dashiell, 2002). Cependant, l'absence complète de NFH chez la souris ou de son extrémité C-terminale n'a que peu de retentissement sur le diamètre, le réduisant de 20 à 25%, associé à une perte modérée des motoneurones (Rao, 1998 ; Rao, 2002a). Ces anomalies sont notées principalement sur les axones de gros diamètre. Des mécanismes compensatoires sont donc probablement présents, liés à NFM et aux MT, dont la densité est augmentée chez ces animaux.

Il apparaît en fait que le rôle principal incombe à NFM (Wong, 1995). La disparition de cette sous unité est responsable d'une neuropathie chez la souris qui se traduit par une réduction drastique du calibre axonal et une diminution de l'espacement entre les NFs dans l'axone. Par contre il n'existe pas de perte neuronale dans la corne antérieure de la moelle épinière. De façon surprenante le

transport des NFs n'est pas perturbé (Elder, 1998a ; Jacomy, 1999 ; Rao, 2003). De même, la surexpression de NFM aboutit à une réduction du calibre axonal, à la présence d'accumulation de NFs dans les corps cellulaires des motoneurones et dans des dilatations de l'axone et à une réduction du contenu en NFH des axones (Wong, 1995). De plus, l'absence de NFM et NFH est responsable d'une accumulation de NFL dans les neurones, mais ne modifie pas le contenu des autres FIn, Péripérine et  $\alpha$ -Internexine, qui ne sont pas, a priori, des modulateurs du calibre axonal (Levavasseur, 1999 ; Larivière, 2002).

### 2.5.3. Arborisation dendritique

Les NFs sont aussi présents en quantité abondante dans les dendrites des motoneurones. Cette arborisation peut être perturbée lorsqu'il y a une surexpression de NFM ou NFH, ou chez les souris déficientes pour NFL (Kong, 1998 ; Casey, 2002).

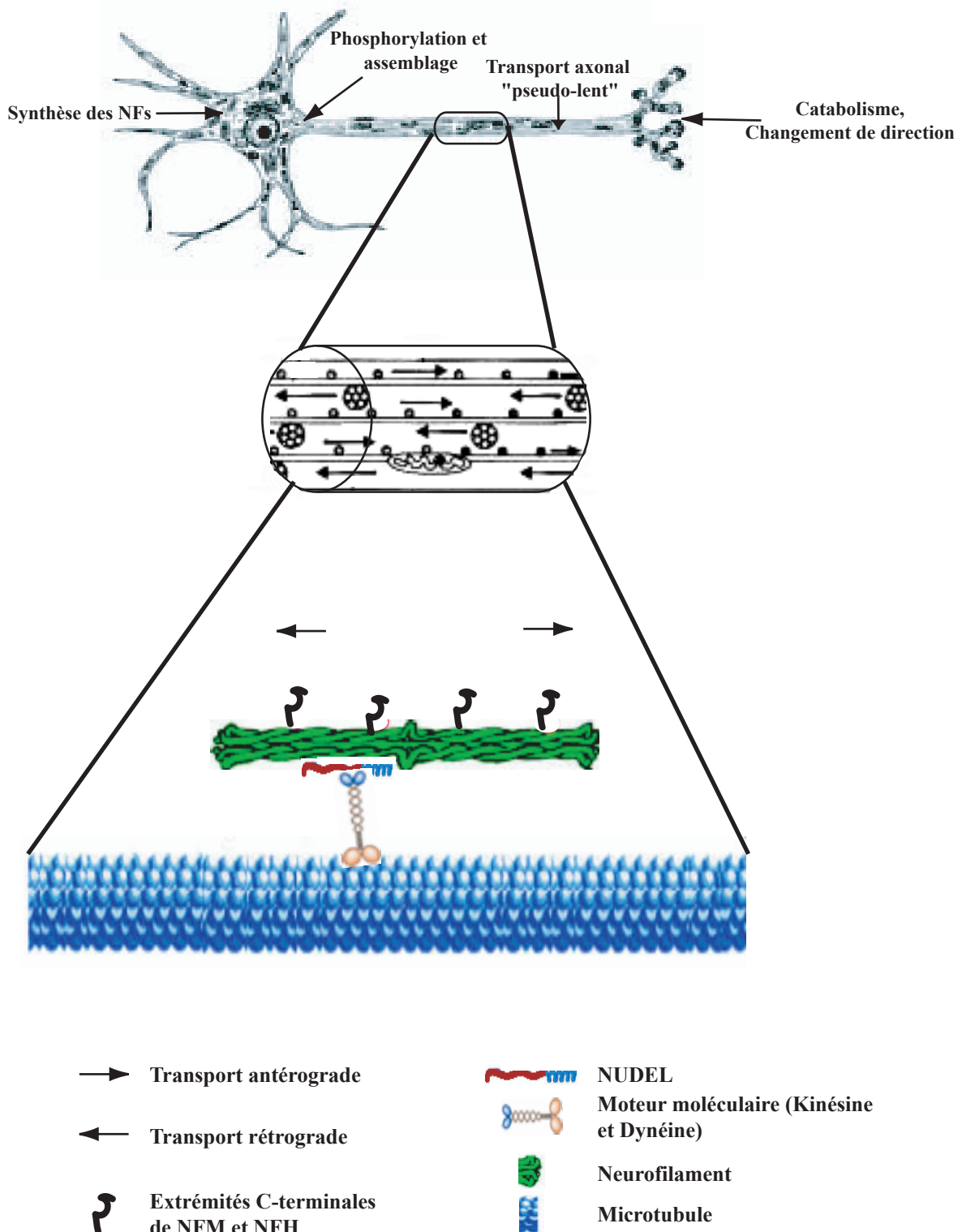
**L'ensemble des résultats obtenus en transgénèse et en culture de cellules permet de penser que la sous unité NFL est primordiale pour instaurer un réseau normal de NFs dans l'axone. La sous unité NFM est l'élément le plus important dans le contrôle du calibre axonal et dans la stabilisation du réseau de NFs en particulier en renforçant les sous unités NFL néo-assemblées. La sous unité NFH n'apparaît pas être indispensable ou essentielle à la croissance radiale des axones mais contribue à l'établissement du diamètre maximal et à l'élongation des axones à large calibre. Elle est aussi impliquée dans la régulation de la densité microtubulaire et du transport axonal.**

## 2.6. Protéines et organelles associées aux NFs (Figure 4)

Outre les moteurs moléculaires et NUDEL cités plus haut, les protéines de la famille Plakine (desmoplakine, plectine, BPAG1) sont les IFAPs les mieux caractérisées. Il s'agit de protéines de haut poids moléculaire, capables de relier les FIs aux autres éléments du cytosquelette. Des souris mutantes pour BPAG1 (souris *dystonia musculorum*, *dt/dt*) présentent une dégénérescence sévère des neurones sensitifs, des dilatations axonales et une désorganisation majeure du réseau de FI et de MT (Yang, 1996 ; Leung, 1999). Cette protéine possède à son extrémité N-terminale un domaine lui permettant de s'associer avec les MF. Elle possède également un domaine d'interaction aux FIn, Péripérine surtout et NFs, à l'extrémité C-terminale. L'absence de cette protéine et l'impossibilité des FIn d'être reliés aux autres éléments du cytosquelette expliqueraient la désorganisation des FIn.

## Figure 8a: Transport des Neurofilaments (1)

La synthèse des NFs a lieu dans le corps cellulaire du neurone. La phosphorylation de NFL prévient l'assemblage. Dans le cône d'émergence l'assemblage des trois sous unités a lieu (après déphosphorylation de l'extrémité N-terminale de NFL). Progressivement les extrémités C-terminales de NFM et NFH sont phosphorylées et le transport se fait le long des microtubules. Il fait intervenir les moteurs moléculaires (Kinésines et Dynéines) et se fait par des mouvements rapides interrompus par de longues pauses donnant un aspect "pseudo-lent" au transport des NFs. L'incorporation de sous unités est favorisée par NUDEL qui participe probablement à la liaison aux moteurs moléculaires. Arrivés à la synapse, les NFs sont soit dégradés par des enzymes dépendantes du calcium, soit se lient à la dynéine et subissent un transport rétrograde. Pendant tout le transport, les NFs peuvent changer de moteur moléculaire et avoir un transport bidirectionnel. (D'après Al-Chalabi *et al*, 2003; Nguyen *et al*, 2004).



Cependant, les NFs ne sont pas essentiels au développement des perturbations du système nerveux, puisque leur absence ne modifie pas la survenue et le développement de l'axonopathie (Eyer, 1998). Plus récemment, la préséniline 1 (PS1) a été impliquée dans la formation des NFs. Il s'agit d'une protéine permettant le catabolisme de l'APP et dont la ou les mutations engendrent une maladie d'Alzheimer. En culture de cellules, les formes mutées de PS1 sont responsables d'une désorganisation du réseau de NFs notamment en jouant sur NFH (Dowjat, 2001).

Les FI semblent avoir un rôle dans le positionnement des mitochondries en collaboration avec les MT et MF (Hirokawa, 1982 ; Milner, 2000). Le déplacement des mitochondries ressemble à celui des NFs avec de fréquents arrêts, parfois longs (Ligon, 2000). Une étude récente, *in vitro*, a montré que la relation des mitochondries avec les NFs se faisait préférentiellement par l'extrémité C-terminale de NFH. Elle impliquait des protéines de la membrane externe des mitochondries, les porines. Ces liaisons étaient régulées par la phosphorylation de NFH et par le potentiel de membrane des mitochondries (Wagner, 2003). Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus en culture de cellules, où la surexpression de NFH aboutit à la formation d'agrégats périnucléaires de NFs qui s'accompagnent de l'accumulation de mitochondries (Szebenyi, 2002). Cependant, chez les souris transgéniques dont le domaine C-terminal de NFH a été supprimé, aucune anomalie de la répartition mitochondriale ne semble être présente (Eyer, 1994 ; Rao, 2002b).

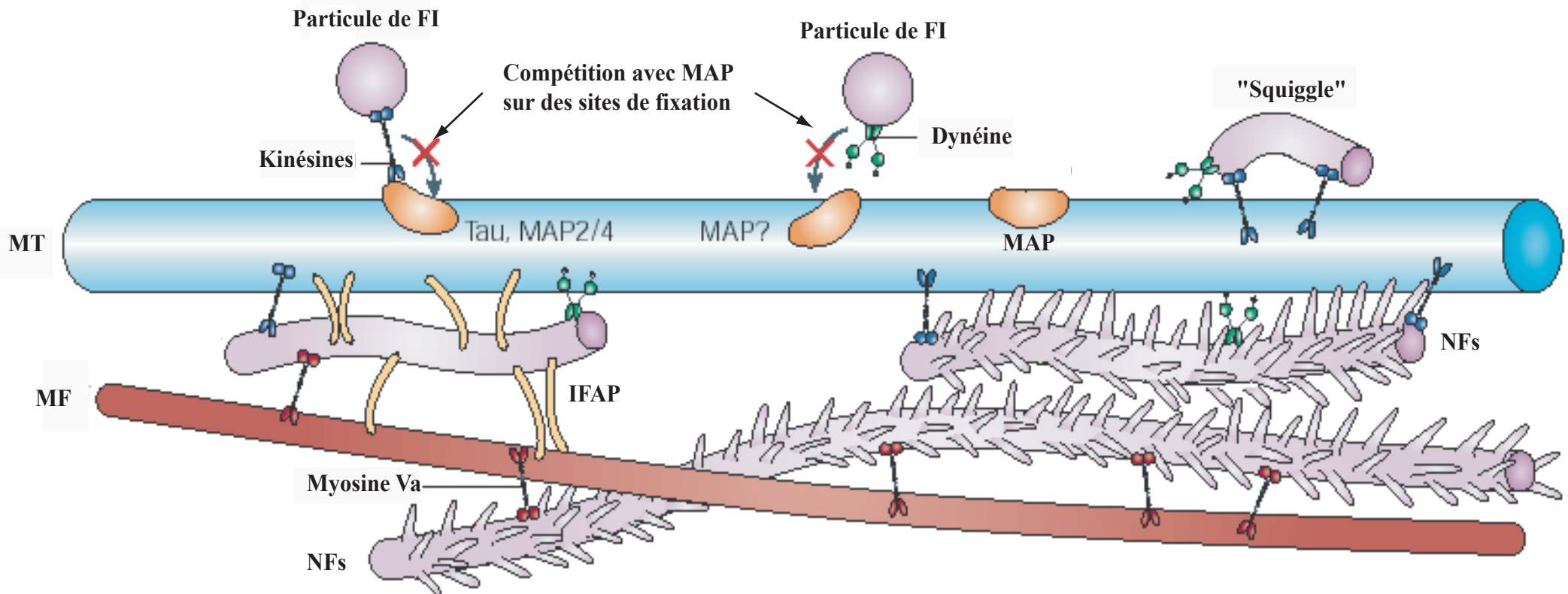
Des expériences de double hybride ont montré que l'extrémité C-terminale de NFM est capable d'interagir avec le récepteur D1 de la dopamine, par sa troisième boucle cytoplasmique, et ceci implique probablement le domaine riche en acides glutamiques (Kim, 2002). NFM pourrait avoir un rôle dans le transport du récepteur jusqu'à la terminaison présynaptique et appartenir à la classe des Protéines Interagissant avec les Récepteurs Dopaminergiques (DRIP). Quant à NFL, il interagirait avec les récepteurs NMDA (Sanelli, 2007).

## 2.7. Transport des NFs (Figure 8a et 8b)

Les NFs sont synthétisés dans le corps cellulaire du neurone. L'assemblage et la phosphorylation des bras radiaires ont lieu dans le cône d'émergence, tout au long de l'axone et augmente avec le transport (Nixon, 1987 ; Grant, 1988). Le transport axonal des NFs a fait l'objet de nombreuses controverses, jusqu'à la réalisation de protéines de fusion entre l'extrémité N-terminale de NFM ou NFH et la GFP (Yabe, 1999 ; Roy, 2000 ; Wang, 2000 ; Yabe, 2001). Ces études *in vitro*, ont montré de façon précise que les NFs étaient animés de mouvements rapides, de l'ordre de 1µm/s, donc de l'ordre du transport rapide, suivis de longues pauses. A un moment donné la plupart des NFs sont en pause (80%), mais cet aspect est surtout mis en évidence lors du mouvement antérograde des NFs. Par vidéomicroscopie, il a été montré que les NFs, ayant une direction rétrograde, se déplacent plus vite et effectuent moins de pauses (Uchida, 2004). Mais au sein d'un même axone, les NFs ont un

## Figure 8b: Transport des Neurofilaments (2)

Les MAPs (MAP2, TAU...) peuvent entrer en compétition avec Kinésine et Dynéine pour la fixation des FI sur les microtubules (MT). Le transport peut se faire soit sous forme de "particules" (protomères) soit sous forme de filaments courts entortillés ("squiggles"). Les FI s'associent avec les deux principaux types de moteurs moléculaires, le déplacement final dépendant de la résultante des deux forces. Les pauses observées seraient un moment privilégié de changement. Les FI sont aussi liés aux Myosines, moteurs moléculaires associés aux microfilaments (MF). Les neurofilaments (NFs) obéiraient au même schéma. Enfin des molécules plus spécifiques aux FI (IFAPs), telles que la Plectine ou BPAG-1 (cf. Figure 4) entrent également en jeu dans la relation des FI avec les MT et MF (D'après Chang *et al*, 2004).



comportement différent voire asynchrone (**Roy, 2000**). Cette caractéristique explique que pendant longtemps les NFs ont été considérés comme appartenant à la composante lente du transport axonal, bien qu'aucun moteur moléculaire connu ne soit associé à ce type de transport aussi lent. Ces expériences ont aussi montré que les NFs étaient capables de bouger dans les deux sens avec une composante antérograde plus abondante. Le caractère bidirectionnel et intermittent avec de longues pauses rend compte de la résultante qui a un aspect de transport lent de l'ordre de 0.25 à 3 mm/jour (**Al-Chalabi, 2003**). Ces pauses pourraient être secondaires à des interactions transitoires avec les éléments de l'axoplasme (**Lariviere, 2004**). Ces résultats concordent avec ceux obtenus pour les autres FI, comme la Vimentine (**Prahlad, 1998**). La vitesse du transport dépend du type de neurones, de l'âge de l'animal, de la position dans l'axone, mais aussi de l'état fonctionnel du neurone (**Hoffman, 1983 ; McQuarrie, 1989**).

Le degré de phosphorylation des extrémités C-terminales de NFM et de NFH intervient dans le contrôle du transport des NFs. Les études récentes, *in vitro*, ont montré une relation nette entre un ralentissement du transport des NFs et un état de phosphorylation élevé des bras radiaires de NFH et NFM. Les NFs phosphorylés passent plus de temps en pause qu'en mouvements (**Ackerley, 2003**). L'hypothèse est que la phosphorylation de NFH serait responsable de sa dissociation d'avec les moteurs moléculaires ou des MT, d'autant que le ralentissement du transport axonal des NFs est parallèle à l'apparition de NFH (**Hisanaga, 1989 ; Hisanaga, 1991; Miyasaka, 1993 ; Shea, 2003**). D'autre part, l'excès de glutamate intervient dans ce mécanisme par l'activation de kinases, notamment SAPK1b, hyperphosphorylant NFH et NFM. La démonstration *in vitro* de cette action du glutamate permet de faire un lien entre l'hypothèse excito-toxique mise en avant dans de nombreuses maladies neurodégénérative et les NFs (**Ackerley, 2000**). Chez les souris *dilute*, déficientes en Myosine Va, le contenu en NFs est multiplié par deux, soulignant l'intervention de ce moteur moléculaire dans l'établissement d'une répartition et d'un transport normaux des NFs dans l'axone (**Rao, 2002b**). Ce moteur moléculaire est présent en quantité abondante dans le système nerveux et notamment dans le cône de croissance. Il se lie de façon sélective avec les FI, GFAP, Périphérine et NFL (**Rao, 2002b**). Les NFs sont alors transportés jusqu'à la terminaison synaptique où ils sont dégradés par des protéases calcium dépendantes, lysosomales (cathépsine) ou non lysosomales (comme les calpaïnes) (**Roots, 1983**).

Le cône de croissance semble être le lieu privilégié de changement de direction des NFs, et ceux qui ne subissent pas de mouvement rétrograde participent à la formation de la charpente du cône de croissance (**Uchida, 2004**). Ces NFs ne sont pas phosphorylés et se présentent sous forme de structures courtes. Leur mouvement est dépendant des moteurs moléculaires des MT et MF (**Chan, 2003**). L'étape de dégradation implique une déphosphorylation initiale par la PP2A. Ces enzymes sont inactives dans l'axone et sont activées à la terminaison synaptique en fonction de la concentration en calcium (**Gallant, 1986 ; Nixon, 1986**). Il a d'autre part été mis en évidence une sensibilité accrue des NFs aux calpaïnes lorsqu'ils sont déphosphorylés (**Pant, 1988**). La cathepsine D, la trypsine et l' $\alpha$ -



chymotrypsine sont des enzymes protéolytiques ubiquitaires capable de dégrader les NFs, notamment lorsqu'ils s'accumulent dans le corps cellulaire des neurones (**Fasani, 2004**).

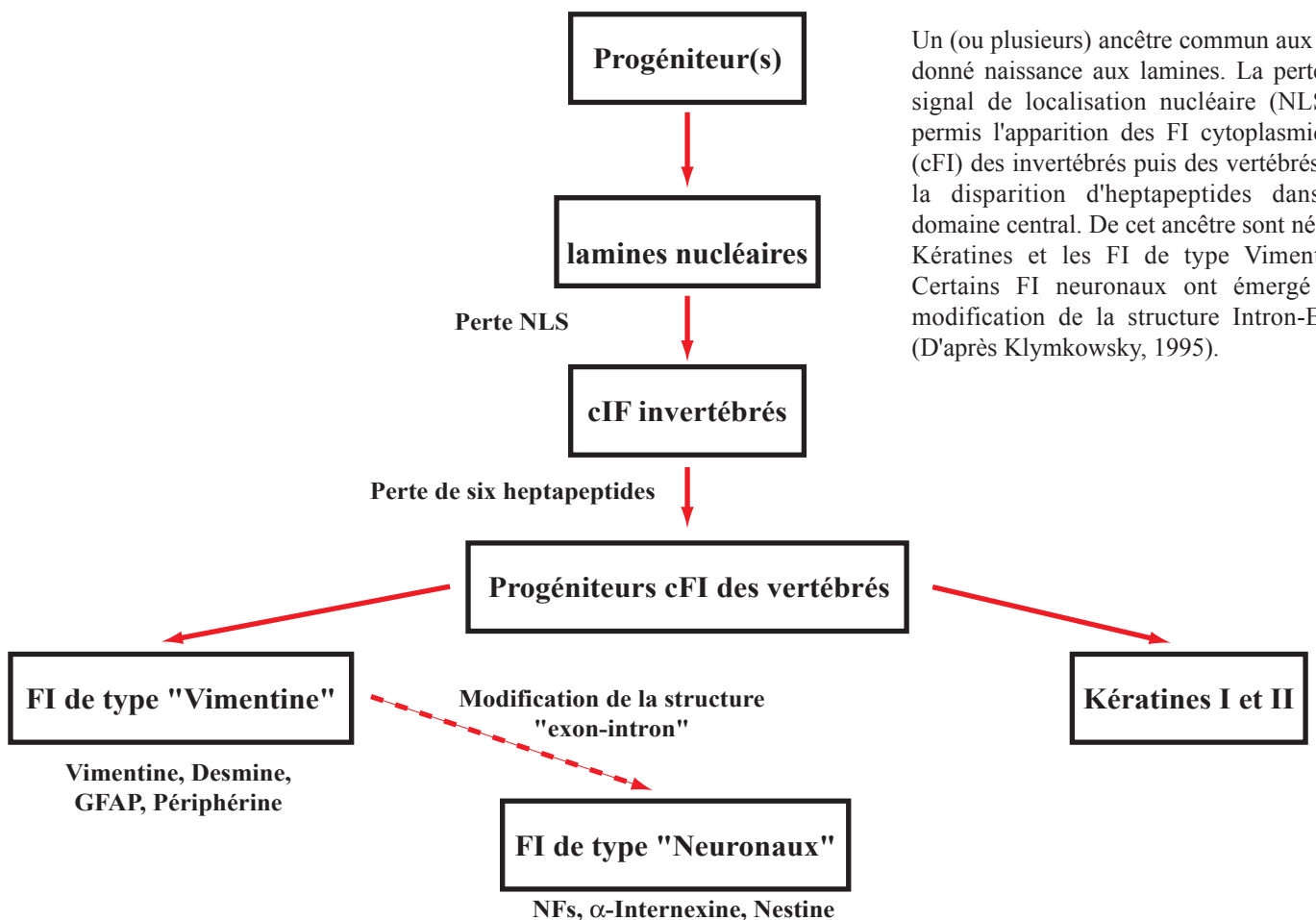
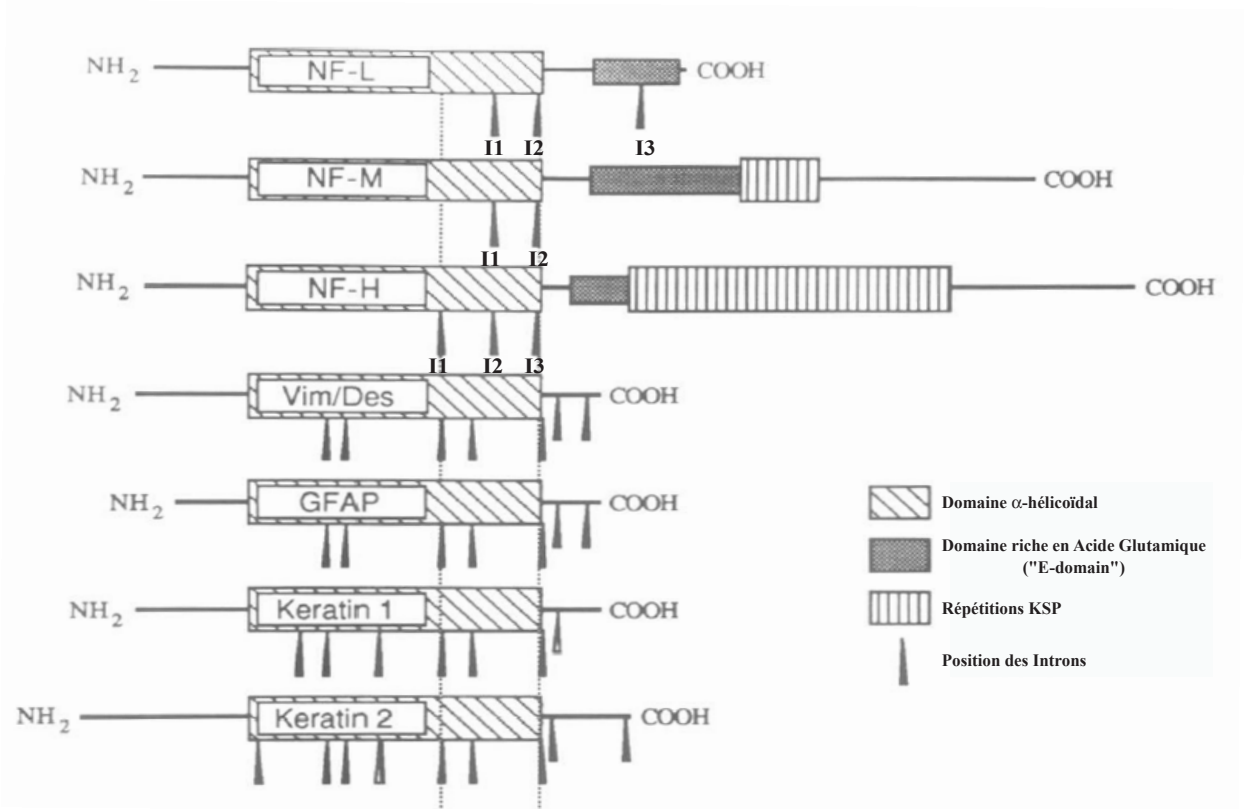
Enfin, cet aspect spécifique, permet de relier le transport axonal des NFs aux moteurs moléculaires classiques, Dynéines et Kinésines. L'aspect bidirectionnel observé peut alors être expliqué par un échange de moteurs moléculaires au sein de l'axone. Il a été montré, en culture de cellules et chez l'animal, que les NFs étaient capables de s'associer aux Dynéines et Kinésines, notamment l'isoforme neuronale KIF5A (**Shah, 2000 ; Yabe, 2000 ; Xia, 2003 ; Wagner, 2004**). Elles sont colocalisées avec les NFs mobiles dans l'axone géant de calamar. Certains auteurs proposent que les deux types de moteurs moléculaires soient en même temps associés aux NFs, la direction finale dépendant du moteur « le plus fort » (**Prahlad, 2000 ; Uchida, 2004**). Les MT sont indispensables au transport des NFs comme le montrent les expériences *in vitro* de dépolymérisation des MT. De façon intéressante, la dépolymérisation des MF ralentit, modestement, leur trafic (**Francis, 2005**). NUDEL pourrait dans cette hypothèse s'associer à la Dynéine pour permettre le transport des NFs, mais aussi participer au « turn-over » du réseau (**Nguyen, 2004**). Cette hypothèse est confortée par l'importance, *in vivo*, de l'assemblage des NFs pour leur transport sous forme d'hétéro-oligomères (**Yuan, 2003**).

S'il est maintenant admis que les NFs ont une synthèse dans le corps cellulaire et un transport rapide et intermittent, des inconnues persistent sur la forme des NFs lors du transport, à savoir sous forme de FI intacts, mais courts (« squiggles »), ou bien sous forme de protomères voire de particules. Toujours *in vivo* et avec les modèles de protéines de fusion entre NFM ou NFH et la GFP, les deux hypothèses semblent être pertinentes (**Shea, 2001**). Les NFs sont capables d'être transportés sous forme de FI intacts mais aussi sous forme de protofilaments, l'aspect assemblé ou non dépend de l'état fonctionnel de la cellule (**Yabe, 1999 ; Roy, 2000 ; Yabe, 2001 ; Ackerley, 2003 ; Uchida, 2004**). Ainsi, les NFs pourraient être désassemblés en unités plus courtes pour permettre leur dissociation du NF et faciliter leur transport dans l'axone, notamment par un transport rapide (**Yan, 2005**). Ces résultats sont à rapprocher d'autres FI, Périphérine et Vimentine notamment, où les expériences en culture de cellules ont montré de façon évidente que des « points » (« dots »), correspondant à des protomères, pouvaient être transportés préalablement à un assemblage complet (**Prahlad, 1998 ; Helfand, 2003**).

Ce mode de transport rapide, dépendant des moteurs moléculaires, permet de délivrer des protéines du cytosquelette dans toutes les régions d'une cellule, et en particulier dans les neurites, afin d'assurer leur renouvellement et le maintien des structures. A la différence des NFs, la Périphérine se déplace plus rapidement, avec moins de pause, probablement parce que son extrémité C-terminale est plus courte et moins sujette à des phénomènes de phosphorylation (**Helfand, 2003**). Des unités courtes de polymères auraient comme avantage de pouvoir être aisément transportées, sous forme de cargo, comme cela a été mis en évidence pour les MT (**Baas, 2004**). Comme le montrent les études *in vivo* et *in vitro*, la perturbation du transport axonal a des répercussions importantes sur le fonctionnement et la

## Figure 9: Structure et évolution des gènes des Filaments Intermédiaires neuronaux

Comparaison de la position des introns (I) dans les trois sous unités des NFs humains par rapport à celle d'autres gènes de FI. Chaque sous unité des NFs possèdent deux introns (I1 et I2 de NFL et NFM et I2 et I3 de NFH) de localisation identique par rapport à la séquence codante. NFL et NFH possèdent un intron supplémentaire: I1 de NFH occupe une position similaire à d'autres introns des autres FI. NFL a la particularité de posséder un intron (I3) interrompant le domaine E (D'après Lees *et al*, 1988).



Un (ou plusieurs) ancêtre commun aux FI a donné naissance aux lamines. La perte du signal de localisation nucléaire (NLS) a permis l'apparition des FI cytoplasmiques (cFI) des invertébrés puis des vertébrés par la disparition d'heptapeptides dans le domaine central. De cet ancêtre sont nés les Kératines et les FI de type Vimentine. Certains FI neuronaux ont émergé par modification de la structure Intron-Exon (D'après Klymkowsky, 1995).

structure de l'axone, donc sur le neurone. Les forces qui permettent le mouvement des FI ont donc potentiellement d'autres fonctions. En particulier, elles permettraient d'intégrer le cytosquelette dans une unité fonctionnelle dont la perturbation dans un sens ou dans l'autre, produirait des effets délétères sur les autres éléments du cytosquelette. Ces forces pourraient ainsi bloquer ou au contraire favoriser le déplacement des polymères du cytosquelette axonal, comme cela est observé dans le fuseau mitotique (**Bass, 2004**).

## **2.8. Régulation**

### **2.8.1. Des FI**

#### **2.8.1.1. Structure des gènes (Figure 9)**

L'étude des gènes des FI montre qu'il n'y a pas de recouvrement franc entre les domaines fonctionnels et les exons. Cependant, chez les vertébrés, le nombre et la position des introns semblent obéir à la même organisation.

Les études bioinformatiques de comparaison de séquences, entre les différents FI, ont permis de supposer que les lamines nucléaires représentent l'ancêtre des FI cytoplasmiques (cFI). Ceci se ferait par perte du signal de localisation nucléaire et de la boîte CAAX impliquée dans l'isoprénnylation (**Klymkowsky, 1995**). La disparition de six heptapeptides, dans le domaine central des cFI des invertébrés, aurait permis l'émergence d'un progéniteur des cFI des vertébrés donnant naissance aux Kératines et au groupe des FI de type Vimentine (Vimentine, GFAP, Desmine et Périphérine). La modification de la structure Exon-Intron aurait favorisé l'apparition de FI neuronaux (**Blumenberg, 1989 ; Dodemont, 1990**).

La Nestine serait apparue en premier, puis les NFs qui auraient été formés par duplication, aboutissant aux différentes sous unités (**Dahlstrand, 1992**). Il a été proposé que les NFs sont apparus par rétrotranscription d'un intermédiaire ARN sans intron puis avec acquisition secondaire d'introns spécifiques des NFs (**Lewis, 1986**). En effet, les gènes des NFs ne contiennent que deux ou trois introns dont les positions diffèrent partiellement de celles des autres FI (**Roosa, 2000**). Pendant tout ce processus les protéines des NFs, à l'exception de NFH, ont gardé la possibilité de s'associer avec les FI de type Vimentine. Lors de la neurogénèse, il existe une expression séquentielle des FI<sub>n</sub>, se recouvrant partiellement (**Figure 10**).

## Figure 10: Expression des Filaments Intermédiaires neuronaux

A. L'étude de l'expression des FI neuronaux montre une expression temporelle et spatiale hautement régulée avec un chevauchement partiel. La Vimentine est le premier FI à apparaître. Puis la Nestine s'exprime dans les progéniteurs qui vont s'orienter vers une différenciation neuronale. La périphérine et l' $\alpha$ -Internexine prennent ensuite le relais et ont une expression concomitante. B. L'expression de la Périphérine (en vert) devient maximale lors de la croissance axonale. Lors de la différenciation terminale des neurones les NFs deviennent les principaux FI (rouge). Leur expression est aussi séquentielle, NFL, NFM puis NFH (D'après Chang *et al*, 2004).

A

**Vimentine**

1<sup>er</sup> FI à apparaître dans les cellules souches neurales

**Nestine**

Son apparition traduit une orientation vers un phénotype neuronal

**$\alpha$ -internexine**

Aide à maintenir la plasticité neuronale pendant la croissance et la régénérescence (Persiste dans quelques neurones)

**Périphérine**

Aide à maintenir la plasticité neuronale pendant la croissance et la régénérescence (Persiste dans quelques neurones)

**Doublet de neurofilaments  
NFL et NFM**

Etablit le phénotype neuronal

**Triplet de neurofilaments  
NFL, NFM et NFH**

L'incorporation de la troisième sous-unité stabilise les filaments

**Neurofilaments phosphorylés**

Transport des neurofilaments dans les axones

B



Progéniteur



Croissance axonale en cours



neurone mature

**Développement neuronal**



### 2.8.1.2.Régulation des FIn

L'expression des FIn dans les neurones matures n'est ni exclusive ni ne montre de parfait recoupement, impliquant une apparition séquentielle, spatiale et/ou temporelle, en fonction du stade de développement. Les différentes études ont principalement été effectuées chez le rat et la souris. Les premiers FI à apparaître dans le neurectoderme sont la Vimentine et la Nestine. Avec la différenciation post mitotique des neurones, leur expression est inhibée. (Cochard, 1984, Zimmerman, 1994). En culture de cellules (cellules N2a/d1), la Vimentine est la première protéine à apparaître dans le neurite. Puis les NFs sont synthétisés, s'associent transitoirement avec la Vimentine avant de former le contingent majoritaire des neurites. Ceci se produit en inhibant l'expression de la Vimentine, en augmentant l'expression des NFs, associée à un « turn-over » des hétéropolymères Vimentine-NFs préexistants (Yabe, 2003). L'apparition de l' $\alpha$ -Internexine précède de peu celle de NFL, et leur répartition est très voisine, même si les neurones de petit calibre axonal expriment préférentiellement la première et les neurones de gros diamètre, myélinisés, expriment préférentiellement les NFs (Fliegner, 1994). La Périphérine apparaît après NFL et son expression se restreint aux neurones dont l'axone a une destination périphérique (neurones du système nerveux autonome, neurones moteurs et sensoriels de la moelle épinière) (Ecurat, 1990). L'apparition des NFs se fait précocement, dès le 9<sup>ème</sup> – 10<sup>ème</sup> jour embryonnaire (E9-E10) chez la souris et est corrélée au processus de différenciation neuronale (Cochard, 1984). L'expression de NFH est retardée, vers E15-E18 en fonction des études, et son expression augmente en période post natale (Shaw, 1982 ; Cochard, 1984 ; Carden, 1987 ; Eyer, 1994).

Les différentes études en culture de cellules, qui se sont intéressées aux mécanismes de régulation de l'expression des NFs, ont été décevantes. Chacune des sous unités des NFs provient d'un gène unique. Ainsi, *NFH* est situé sur le chromosome 11 chez la souris et 22q22.2 chez l'homme ; *NFM* et *NFL* se trouvent sur le même chromosome mais en des locus différents, respectivement 14 chez la souris et 8p21 chez l'homme). Compte tenu de leur structure, les NFs ont probablement divergé à partir d'un ancêtre commun. Ils possèdent probablement des mécanismes de régulation voisins qui expliquent leur expression dans un tissu donné et une coordination de leur expression. Celle-ci apparaît évidente par leur expression séquentielle au cours du développement et par la présence de NFs en quantité stœchiométrique assez similaire dans différentes régions du cerveau (Shneidman, 1992).

Dans des PC12, les trois unités des NFs sont présentes en l'absence de NGF. La différenciation induite par le NGF s'accompagne d'une expression forte et précoce de la sous unité NFL, et à moindre degré de NFM. Par contre, l'expression de NFH est peu modifiée, même après de longues périodes de stimulation (Lindenbaum, 1987 ; Lindenbaum, 1988). Le NGF semble donc fonctionner au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. En conséquence, la sensibilité différente de NFH rend compte de la nature différente de la protéine et du gène. En effet, NFH est une

structure majeure dans le maintien de l'axone et dans la relation avec d'autres éléments du cytosquelette. L'expression au stade précoce de différenciation serait délétère pour la croissance axonale et/ou la plasticité des neurones (**Lindenbaum, 1988**). Cependant, l'état de phosphorylation de NFH dans ce modèle cellulaire n'atteint jamais les niveaux de phosphorylation observés *in vivo* (**Lindenbaum, 1988**). Les cellules PC12 ne sont pas le meilleur modèle d'étude de l'expression séquentielle des NFs, même si elles reproduisent certains aspects observés *in vivo*.

Les régions promotrices des NFs contiennent un promoteur proximal basal, un enhancer proximal faible et un inhibiteur distal fort, comme pour la Périphérine (**Thompson, 1992**). Celui-ci est compris entre -1314 et -385 pour *NFH*, -874 et -505 pour *NFM* et -936 et -325 pour *NFL*. L'association de ces éléments a été un frein à l'étude des mécanismes de régulation (**Lee, 1996**). Le promoteur de *NFH* contient une « TATA box » dont la délétion bloque l'expression de NFH et de -115 à -65 se situe une séquence palindromique nécessaire à son expression (**Schwartz, 1994**). Un large fragment du promoteur murin de *NFH* (8,5 kb) peut mimer l'expression dans le temps et dans l'espace du gène endogène (**Hirasawa, 2001**). Un fragment plus court (2,9 kb) aboutit aussi à une expression neurone spécifique mais plus précoce, dès le jour embryonnaire E14,5 (**Eyer, 1994**). *NFH* contient trois introns. Les deux premiers ont la même position que ceux de *NFM* et *NFL* (**Figure 9**). Le troisième apparaît être particulier à *NFH*, mais à une position similaire à celle d'autres FI (**Lees, 1998**). *NFL* par contre est caractérisé par un troisième intron, unique dans sa position, puisqu'il interrompt la région riche en glutamine (**Figure 9**). Ceci suggère que *NFM* et *NFH* sont issus de *NFL*. La coordination de l'expression de *NFL* et *NFM* peut s'expliquer par leur proximité sur le génome.

L' $\alpha$ -Internexine est exprimée de façon diffuse lors du développement, est un composant majeur du cytosquelette des neurones chez l'adulte, en particulier dans les interneurons et dans les cellules granulaires du cervelet (**Chien, 1995**).

Une composante commune aux FIn semble être la nécessité d'une association entre le promoteur minimal inclus dans la région 5' et les séquences non codantes intragéniques. Cela a été démontré pour *NFL* et *NFM* (**Charron, 1995**). L'association de ces éléments permet alors d'obtenir une expression assez forte, parfois proche de celle des FIn endogènes, neurone spécifique (**Lee, 1996**). Une association similaire est nécessaire pour la Périphérine et la Nestine (**Belecky-Adams, 1993 ; Zimmermann, 1994**). Enfin, les séquences situées dans la région 3' non transcrite (3' UTR) ont un rôle fondamental, en permettant notamment de contrôler la stabilité de l'ARN, à la fois *in vitro* et *in vivo* (**Cañete-Soler, 1999**). L'insertion d'une cible *c-myc*, dans cette région, est responsable d'une perte des motoneurons et des neurones du système digestif, proportionnelle au niveau d'expression du transgène chez la souris. Ainsi, la perturbation du processus de transcription de l'ARN, notamment en perturbant une région essentielle à la fixation des ribonucléoprotéines, peut être impliquée dans la physiopathologie de maladies neurodégénératives (**Lin, 2003 ; Lin, 2005**). Le contrôle post-transcriptionnel est assuré par des protéines se liant à l'ARN. Elles sont neurones spécifiques et conservées, ont une expression spatiale et temporelle, et sont requises pour le développement et la

différentiation des neurones. Elles sont aussi probablement impliquées dans la dégénérescence sélective de sous population(s) neuronale(s), comme dans les syndromes neurologiques paranéoplasiques.

## **2.8.2. Implication des introns dans le contrôle des FI**

### **2.8.2.1.Introduction**

La découverte en 1977 de structures non codantes au sein des gènes, les introns, a été fondamentale. Ces séquences sont de grande taille par rapport aux exons (rapport de 10/1 environ). Ils sont le plus souvent situés aux limites d'exons codant pour des unités fonctionnelles, au sein de la structure tertiaire des protéines. Un gène contient en moyenne 5 à 6 introns, d'une taille moyenne de 2,1 kilobases (kb). Ils ont fréquemment une position conservée au sein d'un gène entre plusieurs espèces, ce qui est le cas des introns des FI. Ils interviennent dans de nombreux processus de contrôle de l'ADN : source d'ARN non codant, acteurs de l'épissage alternatif, amplification des processus de recombinaison... (**de Souza, 2003 ; Fedorova, 2003**).

De nombreuses séquences de régulation génique ont été mises en évidence au sein des séquences introniques de nombreux gènes (neuronaux ou non neuronaux), appartenant ou non à la classe des FI (**Sarkar, 1991 ; Casanova, 1995 ; Chan, 1999**). Ces séquences introniques ont une fonction fondamentale permettant, en s'associant ou non avec le promoteur endogène, de contrôler dans le temps et dans l'espace l'expression d'un gène donné des FI. Cette fonction primordiale est confirmée par l'existence de mutations sur les introns, responsables du développement de pathologie chez l'homme. Ainsi, des mutations sur l'intron 10 de la protéine TAU, au niveau du site d'épissage, s'accompagnent de l'apparition d'une démence fronto-temporale, associée à un syndrome parkinsonien, de transmission autosomique dominante (FTDP-17) (**Tolnay, 2000**). De même, des cas de démence de type Alzheimer à début précoce sont liés à des mutations sur l'intron 4 du gène de la préséniline 1 (**Janssen, 2000**).

Jusqu'à maintenant, aucune mutation intronique n'a été rapportée dans les gènes des FI, pouvant être responsable d'un phénotype pathologique particulier chez l'homme.

### **2.8.2.2.Introns et FI**

Les différents résultats obtenus des expériences, *in vitro* ou *in vivo*, supportent l'hypothèse d'une coopération entre les séquences non codantes intragéniques et les séquences situées en 5', afin d'établir un profil complexe d'expression dans le temps et dans l'espace, en fonction des

différents FI (**Duprey, 1995**). En culture de cellules, et chez l'animal, le premier intron de *NFL*, notamment une région proximale de 350 bp, permet une forte expression de la protéine (**Hsu, 1995**).

Dans le cas de la Nestine, une séquence de 700 bp dans la partie 5' du second intron, est suffisante pour induire l'expression chez la souris d'un rapporteur, reproduisant l'expression de la Nestine endogène (**Lothian, 1997**). La séquence humaine a en plus la capacité d'induire l'expression du rapporteur dans les cellules de la crête neurale. Ces résultats montrent que des séquences homologues peuvent avoir des fonctions supplémentaires entre les rongeurs et l'homme. L'intron 1 (I1) des FIn apparaît important puisqu'il est responsable de l'expression spatiale et temporelle d'autres FIn. Ainsi, celui de la Périphérine est essentiel pour l'expression de cette protéine dans des neurones la contenant, mais n'intervient pas, par exemple, dans la réponse aux traumatismes lors des phénomènes de régénérescence axonale (**Uveges, 2002**). L'adjonction d'un autre intron (I2 ou 3) ne modifie par son comportement. D'autre part, son activité dépend du type cellulaire puisqu'en culture de fibroblastes il a un rôle inhibiteur, de même que les autres introns (**Lecomte, 1999**).

Des sites de reconnaissance de motifs pour des facteurs de transcription de la famille Sp1 et NF-1 sont présents dans I1. Sp1 appartient à une famille de facteurs de transcription, dits « motifs zinc en doigt de gants » se liant sur des régions riches en G/C ou G/T et ayant la possibilité de s'associer à d'autres facteurs de transcription pour assurer leur activité (**Bouwman, 2002**). Mais, dans l'ensemble, la conservation de la « TATA box » est indispensable au bon fonctionnement de la séquence intronique de *NFL* (**Charron, 1995**).

Pour *NFL*, les expériences chez la souris montrent que les deux premiers introns (I1 et I2) agissent comme stimulateurs de l'expression d'un rapporteur (« enhancer »), notamment I1, qui apparaît avoir la plus forte activité dans sa portion 5', voire de se substituer à l'absence du promoteur.

Des séquences de type CAGGA, qui contiennent une partie des motifs de type AGGAA reconnus par des facteurs de transcription de la famille ETS (**Ghosh, 1988**) sont souvent présentes dans les gènes à expression neuronale comme *NFL* (**Charron, 1995**), *NFM* (**Levy, 1987**), *NFH* (**Charron, 1995**), l'*α-Internexine* (**Ching, 1991**) ou la *Périphérine* (**Desmarais, 1992**).

### 2.8.3. Facteurs de transcription et NFs

De nombreux facteurs de transcription sont capables de se fixer sur des motifs consensus présents sur le promoteur ou sur les introns des NFs. Parmi eux, Oct-2 et Brn3b, qui appartiennent à la famille des facteurs de transcription de type POU, possèdent une fonction inhibitrice sur les gènes neuronaux contenant une séquence de type « TATA box » comme les NFs (**Latchman, 1999**). Cependant, d'autres facteurs de la même famille (NF-1 ou Brn3a) ont une action opposée, activant le promoteur des NFs (**Schwartz, 1997 ; Smith, 1997**).



Le NGF permet, *in vitro*, de réguler l'expression des NFs. Son injection intrathécale s'oppose à la baisse de synthèse des NFs des neurones des ganglions postérieurs après axotomie (Verge, 1990).

Le complexe AP-1 est formé principalement de deux facteurs de transcription appartenant aux familles Jun et Fos. Ce complexe reconnaît une séquence consensus appelée TRE, dont la séquence est la suivante : 5'-TGAG/CTCA-3'. L'activation de ce complexe se fait par la phosphorylation de Jun sur son extrémité N-terminale (pour revue cf. Herdegen, 1998 ; Waetzig, 2004). Ces deux facteurs s'hétérodimérisent via des motifs de type « fermeture éclair » (« Leucine zipper ») avant de pouvoir se fixer sur l'ADN, et interviennent dans le contrôle de la régulation transcriptionnelle des NFs, notamment lors de la neuritogénèse. Dans ce complexe, le facteur de transcription Fos permet de stimuler la synthèse de la Galectine-1 impliquée dans la croissance et la régénération axonale (Kato, 2001 ; Gil, 2001 ; Miura, 2005).

## 2.9. NFs et régénérescence axonale

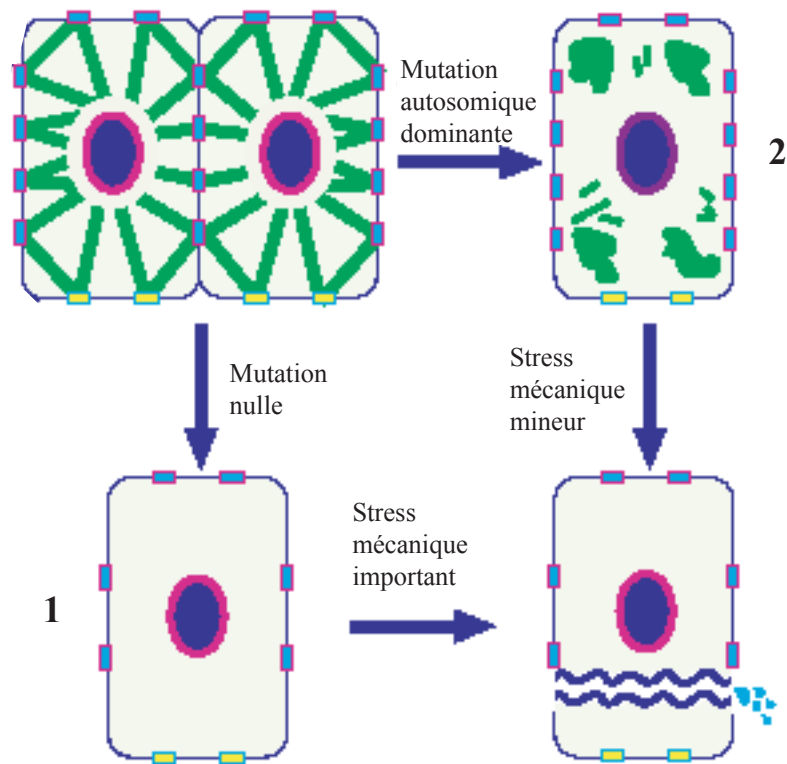
Le cône de croissance est une structure transitoire, dynamique, mobile et spécialisée de la partie terminale d'un axone en développement ou en régénérescence. Il est responsable du guidage de l'axone jusqu'à sa cible. Les MT et les MF sont les éléments clés du contrôle de son extension, et sont les cibles des signaux moléculaires de l'environnement, répulsifs ou attractifs (Fu, 1997 ; Gordon-Weeks, 2004 ; Gallo, 2004). De nombreux mécanismes moléculaires interviennent, tant du point de vue de la cellule de Schwann que de celui de l'axone, mais la séquence de leur intervention reste mal comprise. Une question importante est notamment de comprendre les différences entre SNC et SNP et le faible pouvoir de régénération du premier. Dans ce contexte, l'utilisation de marqueurs fluorescents (GFP, DsRed...), chez l'animal, est un outil puissant pour étudier *in vivo* les étapes de la régénération axonale et de la remyélinisation (Pan, 2003).

Ainsi, lors de la coupure d'un axone (axotomie), une réorganisation du cytosquelette est nécessaire. Le segment le plus distal va subir une dégénérescence progressive ou dégénérescence wallérienne. La myéline et l'axone sont détruits par des macrophages alors que la partie proximale est le siège d'une rétraction axonale. Les cellules de Schwann vont ensuite proliférer et s'assembler en bandes cytoplasmiques à l'intérieur de la membrane basale. L'intégrité de ces structures va permettre, rapidement, l'apparition d'un groupe de cônes de croissance qui bourgeonne à partir du premier nœud de Ranvier, situé en partie proximale de la lésion. Ces cônes de croissance forment un bouquet de régénération axonale (« cluster de régénération ») dont l'évolution se fait, au mieux, vers une restitution « *ad integrum* » du parenchyme nerveux.

L'étude du cytosquelette montre une modification de l'expression de ses éléments. Sur le plan de la structure, il existe une limite nette située entre 50 et 150µm du lieu de la section axonale :

## Figure 11: Représentation schématique de la toxicité des FI

Le rôle délétère des FI sur le fonctionnement cellulaire est représenté à travers celui des FI de kératine. Ils constituent un réseau (barres vertes) à travers les cellules épithéliales depuis le noyau jusqu'à la membrane cellulaire où ils entrent dans la composition de structures différenciées, les desmosomes (carrés bleus) et les hémidesmosomes (carrés jaunes). Dans le cas d'une mutation dite nulle (perte de fonction) il résulte une disparition du réseau (1) et une sensibilisation des cellules (lignes horizontales courbes) à des stress mécaniques importants. En revanche dans le cas de mutations dites autosomiques dominantes (2), il y a acquisition d'une nouvelle fonction (gain de fonction), apparition d'agrégats intracellulaires de FI rendant la cellule encore plus sensible à des traumatismes mineurs. (D'après Fuchs *et al*, 1998).



en amont de cette zone l'organisation du cytosquelette de l'axone est normale et en aval il est désorganisé (fragmentation des MT et NFs). Six étapes ont été isolées. (a) activation de caspases secondaire à l'augmentation locale de  $Ca^{2+}$  (b). (c) Protéolyse des éléments du cytosquelette, notamment des NFs, ce qui permet une restructuration de son organisation (d). Ces modifications (e) créent les conditions nécessaires à l'importation de matériaux pour la restructuration de l'axone (f) (**Spira, 2001**). Des facteurs de guidance axonale, attractifs ou répulsifs, sont également présents, comme les sémaphorines, les nétrines, Nogo et les éphrines (**Koeberle, 2004 ; Gaillard, 2005**).

Les NFs ont une régulation commune sous forme d'inhibition de la synthèse de leur ARNm et d'une baisse de l'expression protéique et du transport (**Goldstein, 1987 ; Goldstein, 1988**). Au niveau de l'extrémité, ils sont dégradés rapidement par la calpaïne (**Banik, 1997**). En parallèle l'actine et la tubuline, et plus particulièrement les isoformes neuronales ( $\alpha 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 3$ ), sont augmentées au niveau protéique et de l'ARN (**Hoffman, 1988 ; Tashiro, 1991**). La Périphérine et l' $\alpha$ -Internexine voient aussi leur synthèse augmentée et sont nécessaires à une régénération de bonne qualité (**Troy, 1990 ; McGraw, 2002 ; Belecky-Adams, 2003**). GAP-43, une protéine impliquée dans le guidage axonal, est augmentée au niveau du cône de croissance pendant l'élongation axonale et lors de la régénération (**Avwenagha, 2003**). Ainsi, est réalisé un profil d'expression, rappelant le « programme » mis en place lors du développement de l'axone, le niveau d'expression des différents FIn subit un contrôle spatio-temporel, hautement régulé, probablement différent entre le SNP et le SNC (**Gervasi, 2003**). Le rôle des NFs dans ces phénomènes de régénération reste sujet à controverse. Dans certains modèles, leur absence ne modifie pas les capacités de régénération axonale, alors que dans d'autres modèles leur absence est un frein à une régénération normale (**Zhu, 1997 ; Zhang, 2002 ; Jean, 2003**).

Ces mécanismes sont régulés par des facteurs trophiques sécrétés par les neurones et/ou par les cellules de Schwann, comme l'IGF-1, les Neurotrophines (BDNF, NGF, NT-3/4/5) et par des cytokines ( $TGF\beta$ ,  $TNF\alpha$ ) (**Avwenagha, 2003 ; Koeberle, 2004**). Ces différents facteurs sont modifiés au cours des processus de régénération, et le niveau de variation est fonction du type de neuropathies (**Fressinaud, 2003**). Dans ce contexte, l'activation de la voie JNK semble avoir un rôle important dans la régénérescence et l'inhibition de la phosphorylation de NFM et NFH, et retarde, en culture de cellule, l'extension des neurites (**Fernyhough, 2002**).

## **2.10. Neurofilaments en pathologie**

Les NFs interviennent dans la physiopathologie de maladies dites neurodégénératives. L'accumulation anormale de NFs a été mise en évidence dans plusieurs de ces maladies, comme la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA), la maladie de Parkinson (MP), certaines neuropathies héréditaires (maladie de Charcot-Marie-Tooth), les neuropathies à axones géants ou les neuropathies

**Tableau 2 : Classification génétique des sous types de maladies du motoneurones**  
(D'après Shaw, 2005)

Type	Gène	Transmission, Chromosome
ALS1	<i>SOD1</i>	Dominant-adult onset, 21q22.1
ALS2	<i>ALSIN</i>	Recessive-juvenile onset, 2q33
ALS3	–	Dominant-adult onset, 18q21
ALS4	<i>Senataxin (SETX)</i>	Dominant-juvenile onset, 9q34
ALS5	–	Recessive-juvenile onset, 15q15.1–q21.1
ALS6	–	Dominant-adult onset, 16q12
ALS7	–	Dominant-adult onset, 20ptel–p13
ALS8	<i>Vesicle associated membrane protein (VAPB)</i>	Dominant-adult onset, 20q13.33
ALS-FTD	–	Dominant-adult onset, 9q21–22
ALS-X	–	Dominant-adult onset, Xp11–q12
ALS with parkinsonism and dementia	<i>Microtubule associated protein tau (MAPT)</i>	Dominant-adult onset, 17q21
Progressive LMN disease	<i>Dynactin p150 subunit (DCTN1)</i>	Dominant-adult onset, 2p13

ALS : Sclérose Latérale Amyotrophique. LMN : maladie du 2<sup>nd</sup> motoneurone. SOD-1 : SuperOxyde Dismutase 1  
FTD: Démence Frontotemporale

diabétiques. L'altération de leur métabolisme perturbe le fonctionnement cellulaire (**Figure 11**). Les NFs sont souvent des composés quantitativement importants dans les agrégats protéiques observés dans ces maladies, et sont parfois mis en évidence dans les liquides biologiques tels que le LCS ou le sérum (**Norgren, 2003 ; Shaw, 2005**).

### 2.10.1. NFs et SLA

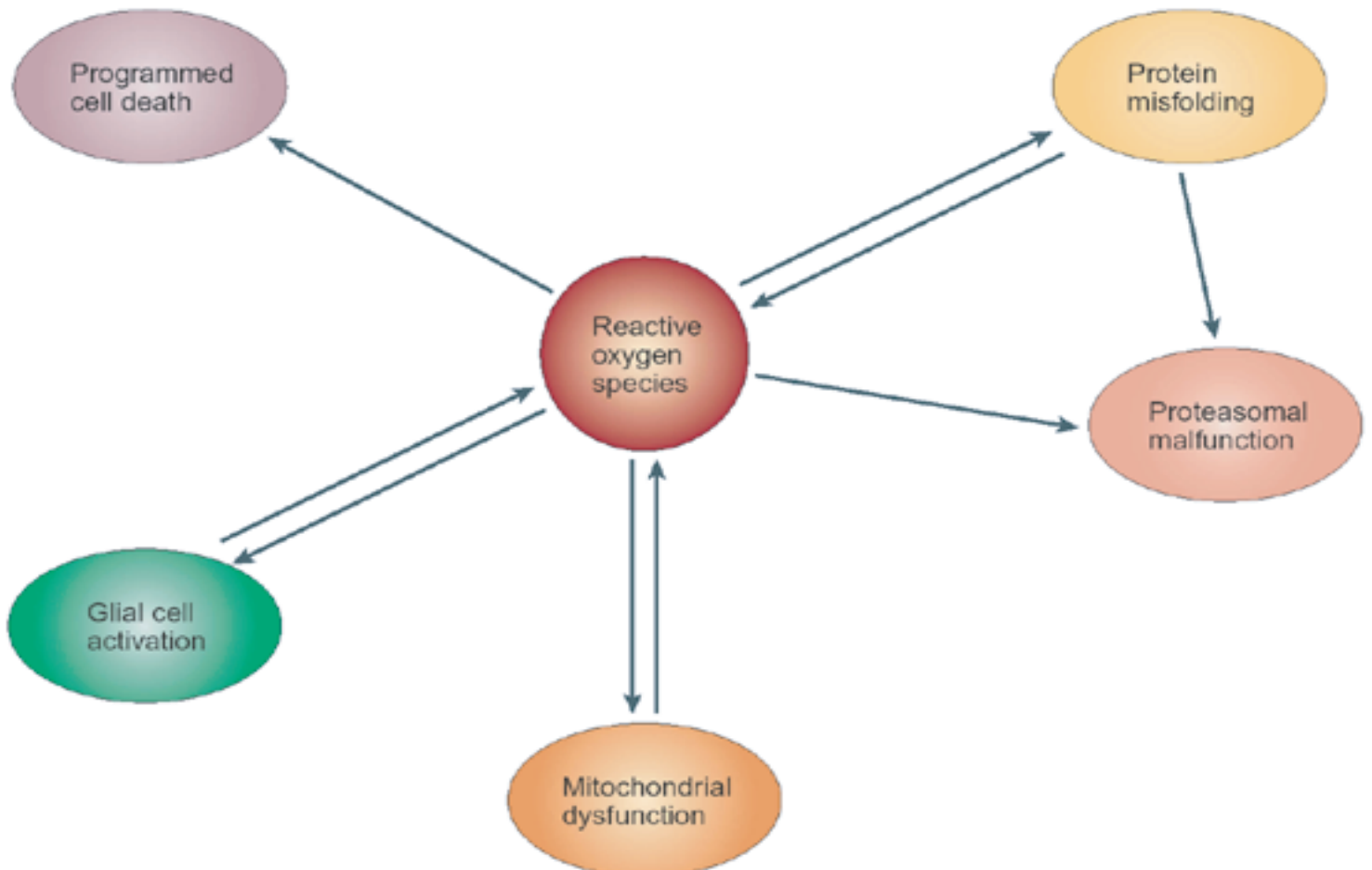
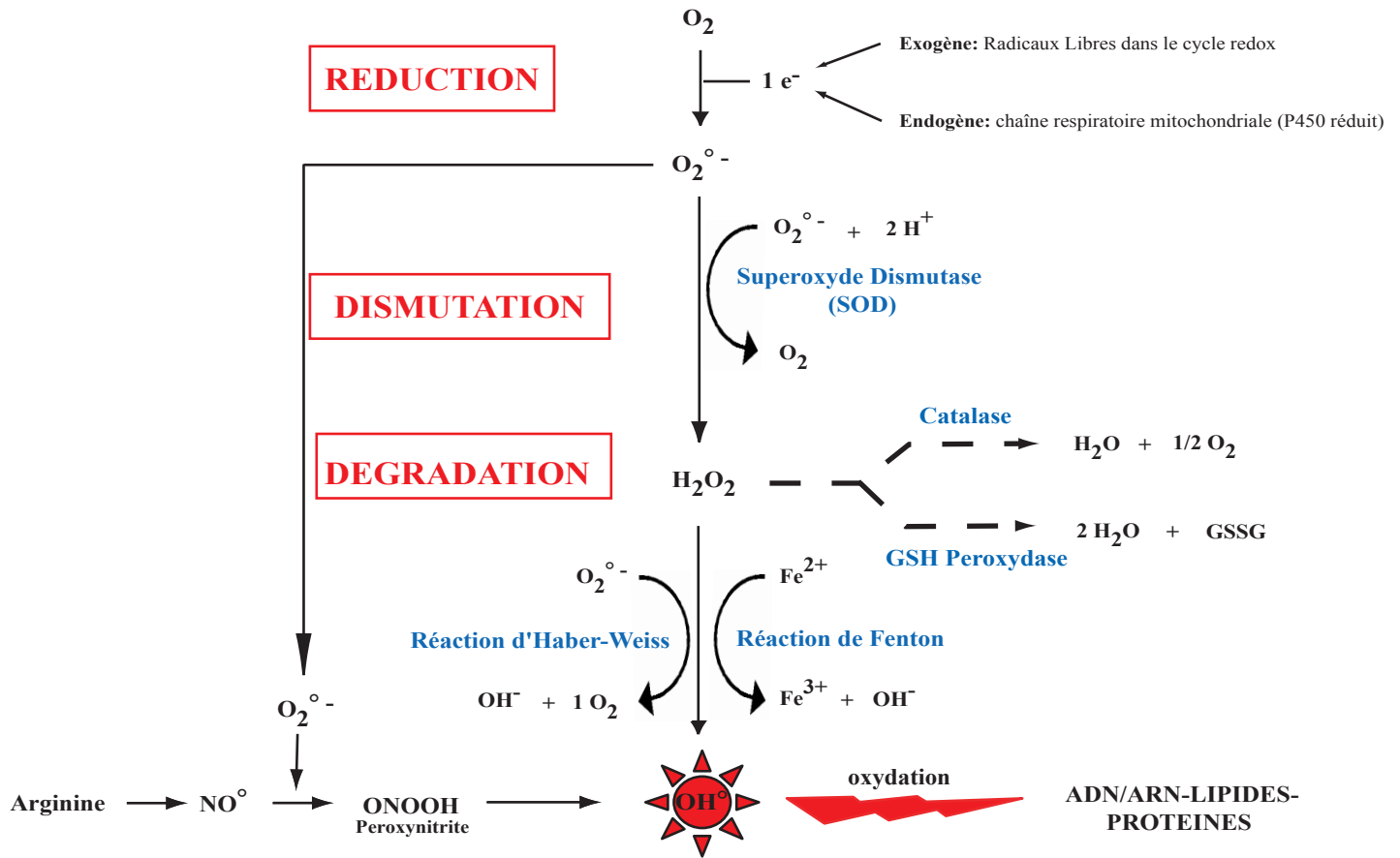
La SLA est la troisième cause de maladie neurodégénérative chez l'adulte (pour revue, **cf. Rowland, 2001 ; Shaw, 2005**). Sa prévalence est estimée à 5 pour 100 000 habitants, avec une homogénéité dans tous les pays, et son incidence est de 2,4 pour 100 000 habitants. Le sexe masculin semble être discrètement plus représenté (ratio de 1,6/1). Il s'agit d'une affection progressive et fatale, débutant vers 60 ans et dont la durée est de 2 à 4 ans. La majorité des cas surviennent de façon sporadique. Cependant, des cas familiaux ont été décrits (10%) qui ont été associés, pour 10-20% d'entre eux (soit 1-2% de l'ensemble des cas), à une mutation sur le gène de *SOD-1* (**Tableau 2; Rosen, 1993**). Malgré l'ancienneté de sa description, le ou les mécanismes physiopathologiques à l'origine de la maladie sont mal connus et le traitement reste essentiellement palliatif.

Cette affection se caractérise par une dégénérescence des motoneurons de la corne antérieure de la moelle épinière et de l'aire motrice primaire ou circonvolution frontale ascendante. La traduction clinique est une paralysie musculaire progressive, touchant un ou plusieurs métamère(s), qui s'accompagne d'une amyotrophie et de fasciculations dans le même territoire. L'atteinte du premier motoneurone (cellules de Betz de l'aire motrice primaire) se traduit par un syndrome pyramidal. Cependant, les motoneurons des nerfs oculomoteurs sont le plus souvent préservés. En 1994 des critères de diagnostic ont été définis au cours d'une conférence de consensus (critères d' « El Escorial » ) (**Brooks 1994**) puis revus en 1999 (**Wilbourn, 1998**). Les catégories de SLA (possible, probable ou confirmée) sont bien corrélées avec les critères neuropathologiques, qui restent actuellement les seuls permettant de porter le diagnostic définitif de la maladie.

L'examen macroscopique de l'encéphale peut mettre en évidence une atrophie de la circonvolution frontale ascendante, et celui de la moelle épinière montre souvent une atrophie des racines antérieures des nerfs rachidiens (pour revue **cf. Hirano, 1996**). La caractéristique histologique est une perte des motoneurons de la corne antérieure de la moelle, du tronc cérébral et du cortex moteur. Cependant la perte des cellules de Betz apparaît, pour une raison inconnue, être moins fréquente (**Murayama, 1992**). La substance blanche apparaît le plus souvent pâle, notamment au niveau du faisceau pyramidal, en rapport avec une perte myélinique. Cependant, cette affection est probablement un syndrome, puisque l'aspect neuropathologique est variable en fonction des cas et que d'autres régions du système nerveux sont fréquemment atteintes. Différentes inclusions, révélées par les colorations standard, sont décrites dans les motoneurons survivants, comme les inclusions

## Figure 12: Formation/détoxication des Espèces Réactives de l'Oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) proviennent de la réaction avec un électron ( $e^-$ ) formant l'anion superoxyde ( $O_2^{\circ-}$ ). Sa dégradation fait intervenir l'enzyme SOD puis les catalases et Glutathion peroxydases. En absence de dégradation le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) produit le radical hydroxyl ( $OH^\circ$ ) toxique pour les différents composants de la cellule. Les ERO sont ainsi au centre de la perturbation du fonctionnement de la cellule (D'après Julien, 2001).



hyalines ou les corps de Bunina. Récemment, des inclusions en « écheveaux » (« Skein-like inclusions ») ont été mises en évidence. Elles sont révélées par des anticorps dirigés contre l'ubiquitine, sont caractéristiques de cette affection et peuvent contenir une protéine, TDP-43, capable de se fixer sur l'ADN (Leigh, 1991 ; Arai, 2006).

Plusieurs mécanismes physiopathologiques, très probablement intriqués, sont impliqués dans la mort sélective des motoneurones, d'autant que les neurones en général ont une faible capacité à lutter contre les anomalies résultant d'un déficit transcriptionnel (Alves-Rodrigues, 1998). 5 à 10% des formes de SLA apparaissent être d'origine génétique et plusieurs loci sont actuellement reconnus (Tableau 2 ; Shaw, 2005). SOD-1, une enzyme fonctionnant avec un cuivre, située dans l'espace intermembranaire des mitochondries, catalyse la conversion du radical superoxyde ( $O_2^{\bullet}$ ) en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et en oxygène, réaction catalysée par la présence du cuivre (Figure 12). Une centaine de mutations a été décrite dans des formes familiales de SLA et correspond aux mutations les plus fréquemment trouvées. Il apparaît que l'action toxique de cette enzyme se fait par un gain de fonction, inconnu, et non par l'accumulation de  $H_2O_2$ . Celui-ci résulterait d'une réaction de SOD-1 avec d'autres substrats, probablement en modifiant les capacités de fixation à l'autre métal présent, le zinc. Cet état aboutirait à la production de radicaux nitrotyrosinés capables d'interagir avec les protéines et notamment les NFs (Figure 12; Abe, 1997). Ce gain de fonction ferait aussi intervenir un mauvais repliement de SOD-1 pour former des agrégats (Durham, 1997). Il existe de grandes variations phénotypiques en fonction du type de mutation, ce qui implique que des gènes modificateurs interviennent dans cette physiopathologie (Tableau 3).

Il existe tout un cortège d'évidences, neuropathologiques et expérimentales (cf. ci-dessous), mettant à contribution les mitochondries dans la survenue de la SLA, mais aussi des autres maladies neurodégénératives : altérations morphologiques dans différents tissus, augmentation du nombre de mitochondries et du niveau de calcium dans les terminaisons nerveuses des motoneurones, baisse de l'activité du complexe IV, niveau élevé de mutations de l'ADN mitochondrial (Shaw, 2005). Enfin, la cascade des cytokines pro-inflammatoires intervient à un moment ou un autre, plus particulièrement le  $TNF\alpha$  et l'IL-6. Les FIn participent à la physiopathologie de la maladie, comme le montrent les différents modèles, cellulaires et murins, et leur désorganisation à l'échelle protéique et nucléique lors de l'analyse des tissus (Chou 1997).

L'homéostasie calcique joue un rôle fondamental, comme le montre la résistance à la dégénérescence de certains motoneurones, riches en calcineurine, les motoneurones oculomoteurs notamment (Hirano, 1996). Le mécanisme de l'excitotoxicité fait intervenir un excès d'entrée de calcium par une activation anormale de récepteurs particuliers au glutamate (récepteurs non-NMDA de type AMPA), et plus particulièrement par la présence de la sous unité GluR2. La vulnérabilité particulière des motoneurones s'expliquerait par le taux d'expression basse de GluR2, de façon physiologique, ou par une édition anormale de son ARNm chez les patients SLA (Takuma, 1999). De plus, des taux élevés de glutamate ont été trouvés dans leur LCS (Shaw, 1995). Néanmoins, ils

**Tableau 3 : Facteurs génétiques, potentiels, de susceptibilité à la survenue d'une SLA**  
(D'après Shaw, 2005)

<b>Gène</b>	<b>Chromosome</b>	<b>Variant</b>	<b>Forme associée</b>
Neurofilament heavy (NEFH)	22q12.1–q13.1	KSP deletion/insertion	Sporadic
Apolipoprotein E (Apo E $\Sigma$ 4)	19q13.2	$\Sigma$ 4 genotype	Sporadic
Cytochrome c oxidase subunit 1	Mt	Microdeletion	Sporadic
Excitatory amino acid transporter 2 (EAAT <sub>2</sub> )	11p13–p12	Decreased expression	Familial/sporadic
AMPA receptor subunit (GluR2)	4q32–q33	Altered RNA editing	Sporadic
? Survival motor neurone 1 (SMN1)	5q12.2–q13.3	Copy number	Sporadic
? Survival motor neurone 2 (SMN2)	5q12.2–q13.3	Copy number	Sporadic
Ciliary neurotrophic factor (CNTF)	11q 12.2	Null allele	Familial
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	6p12	Promotor polymorphisms	Sporadic

KSP : motif Lysine-Sérine-Proline. Mt : mitochondrie.



peuvent être le résultat d'un déficit de recapture par les astrocytes, puisque le transporteur (EAAT2) est anormal chez ces patients (**Meyer, 1999**). Cette sensibilité particulière aux radicaux libres apparaît être diffuse à l'ensemble de l'organisme, puisque des fibroblastes en culture de patients SLA (avec ou sans mutation SOD-1) meurent plus lorsqu'ils sont mis en présence d'agents favorisant le stress oxydant (**Aguirre, 1998**).

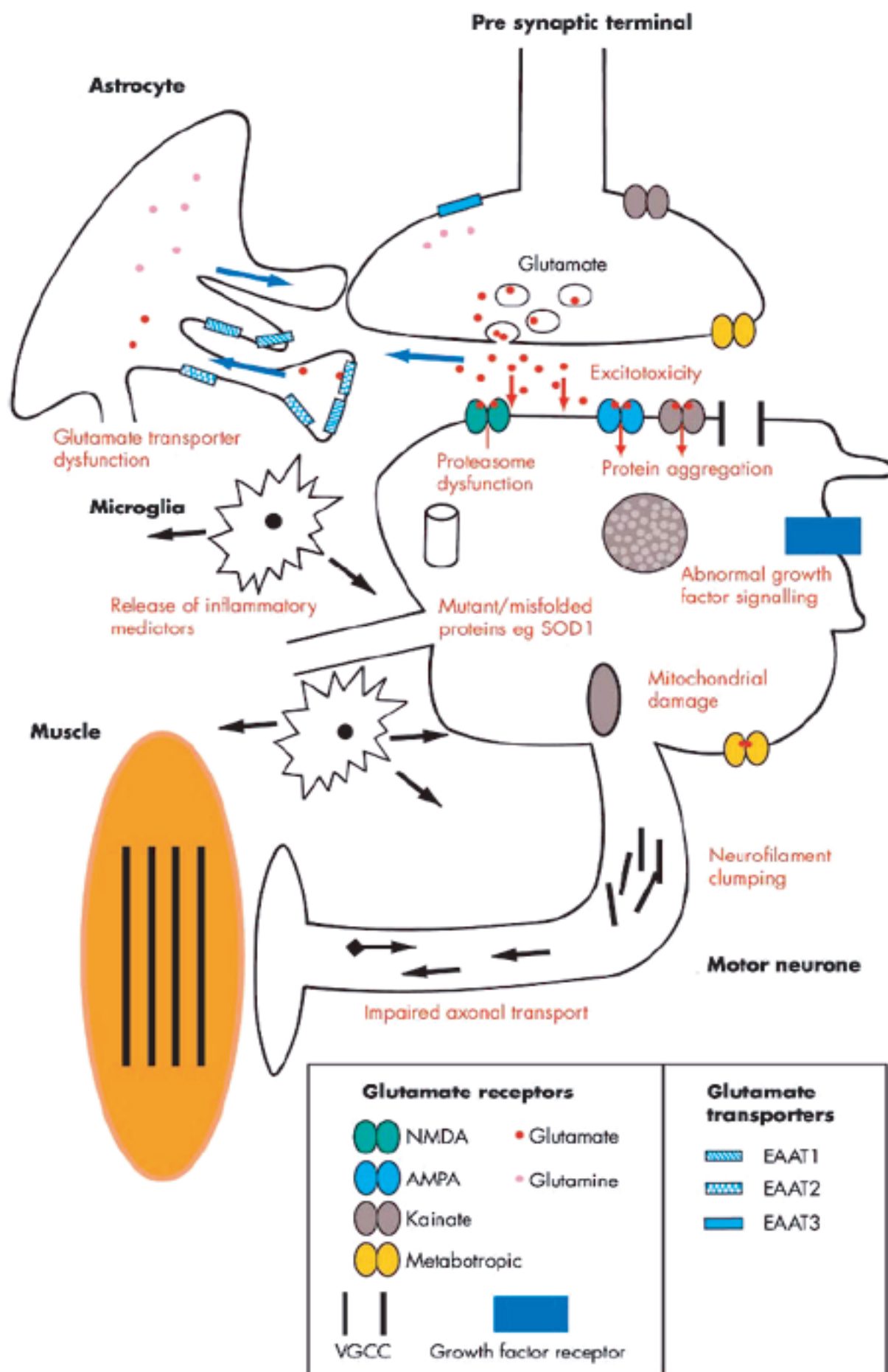
Enfin, les phénomènes apoptotiques jouent aussi un rôle comme le montre l'étude autopsique des tissus. Cependant, comme il s'agit de phénomènes de durée brève (environ 24 heures), pour une durée de la maladie de 2 à 5 ans, ils ne sont mis en évidence que dans moins de 0,01% des cellules (**Sathasivan, 2001**). Finalement, un modèle physiopathologique peut être proposé regroupant l'ensemble des acteurs impliqués à un moment ou un autre dans la SLA (**Figure 13**).

La présence d'amas de NFs phosphorylés et d'autres FI, dans le corps cellulaire des motoneurones ou dans des dilatations proximales de l'axone (sphéroïdes), est souvent mise en évidence. Cette dernière anomalie n'est pas spécifique car présente dans d'autres affections neurodégénératives ou au cours du vieillissement. Le rôle exact de cette accumulation demeure mal connu. De plus en plus d'évidences provenant de modèles expérimentaux tendent à montrer que ces agrégats peuvent avoir une fonction protectrice ou délétère sur les motoneurones en fonction des moments. Le calibre axonal est réduit, il existe des signes de dégénérescence wallérienne et d'atrophie neurogène (pour revue cf. **Price, 1994**). Les filaments intermédiaires, notamment les Neurofilaments phosphorylés, s'accumulent dans le corps cellulaire et dans les sphéroïdes, où ils sont associés à la Périphérine (**Wong, 2000**). Ces sphéroïdes sont présents aussi sur le faisceau cortico-spinal, mais à la différence de ceux rencontrés sur les motoneurones secondaires, ils possèdent plus d'organelles dégénérés (**Okamoto, 1990**). D'un point de vue physiopathologique, les sphéroïdes se constitueraient à la partie initiale de l'axone et tendraient ensuite à se déplacer distalement.

Les études d'hybridation in situ ont permis de montrer que le taux d'ARNm de NFL était réduit de 60% environ, sans modification des ARNm de NFH et NFM (**Wong, 2000 ; Strong, 2004**). Ces résultats sont à rapprocher d'une baisse similaire dans les régions occipitales des patients Alzheimers et trisomiques 21, ce qui implique encore que la dysrégulation de la stœchiométrie des NFs semble participer aux processus neurodégénératifs (**Bajo, 2001**). Récemment, l'analyse de tissus par spectrométrie de masse n'a pas permis de montrer de modification de la phosphorylation de NFH, par rapport aux témoins (**Strong, 2001**). Néanmoins, cela ne signifie pas que des modifications locales puissent survenir, expliquant l'hyperphosphorylation observée au cours de la SLA, ou que des NFs normalement phosphorylés sont séquestrés dans le corps cellulaire. Il est aussi possible que des modifications post-traductionnelles, anormales, surviennent. Récemment, une mutation sur le gène de la Périphérine a été observée dans un cas sporadique de SLA. Cette mutation siège dans le premier Linker du gène et bloque l'assemblage de la Périphérine, avec un effet dominant négatif en culture de cellules (**Leung, 2004**).

### Figure 13: Mécanismes moléculaires de la mort des motoneurones

Représentation schématique des différents mécanismes moléculaires impliqués dans la mort des motoneurones au cours de la SLA. Le diagramme fait intervenir les motoneurones, les astrocytes, les cellules microgliales et les muscles. Les principales hypothèses physiopathologiques et leur(s) connexion(s) sont représentées (D'après Shaw, 2005).



Des dérivés des radicaux libres comme cNOS, la citrulline ou l'arginine se trouvent associés aux accumulations de NFs (**Chou, 1996 ; Sasaki, 2000**). Le peroxy-nitrite, qui dérive du NO, est capable alors de réagir avec les radicaux tyrosines. Or le niveau de nitrosilation des radicaux tyrosines inhibe la phosphorylation, donc pourrait altérer le transport des NFs. Cette hypothèse permettrait de relier l'activité de la SOD-1 aux NFs. Il apparaît que NFL est très sensible aux phénomènes de nitration. Cela a été montré par un fort marquage avec des anticorps dirigés contre la nitration des radicaux tyrosines et par une augmentation de la concentration des tissus en 3-nitrotyrosine, un marqueur de la toxicité oxydative du peroxy-nitrite (**Abe, 1997 ; Beal, 1997 ; Strong, 1999**). Mais, la comparaison, globale, de l'état de nitration de NFL ne montre pas de différence par rapport aux témoins (**Strong, 1998**). Comme précédemment pour les NFs, cela n'exclut pas que des modifications locales de nitration puissent survenir.

L'altération du transport axonal est précoce dans les maladies neurodégénératives. L'étude de l'APP, témoin du transport axonal, montre une modification de sa répartition en immunohistochimie après traumatisme cérébral ou dans les processus neurodégénératifs. Une accumulation anormale est observée dans les motoneurons et dans les sphéroïdes de patients atteints de SLA, ayant une évolution courte de la maladie (**Sasaki, 1999**). La perturbation précoce du transport axonal est à rapprocher des résultats obtenus chez les souris transgéniques (cf. ci-dessous).

Les NFs sont des macromolécules dont le renouvellement est faible et sont ainsi sensibles à des modifications de type glycation (AGEs), témoins d'un stress oxydatif. Il s'agit d'une réaction non enzymatique (réaction de Maillard), initiée par l'adjonction d'un sucre en position  $\alpha$  et  $\epsilon$  d'un radical Lysine, Arginine ou Histidine. Après une cascade complexe de déshydratation, fragmentation, condensation, oxydation, les AGEs sont irréversibles. Ils perturbent alors le métabolisme des protéines en créant des liens inter-protéiques formant des agrégats. Les métaux, tels que le cuivre ou le fer, accélèrent la formation de ces complexes (**Kikuchi, 2001**). Chou et al (**1998**) ont montré que les NFs accumulés dans les sphéroïdes des patients SLA étaient sujets à ce type de modifications post-traductionnelles.

Plus récemment, Al-Chalabi et al (**1999**) ont mis en évidence dans de rares cas de SLA, des mutations des motifs KSP, voire une délétion affectant le domaine C-terminal de NFH, mais n'ont été pas retrouvés la prépondérance de l'isoforme S de NFH qui a été mise en évidence dans une population russe (**Skvortsova, 2004**). Néanmoins, ces anomalies sont probablement plus un facteur de risque que réellement causales, puisque non trouvées dans l'analyse de 200 cas (**Garcia, 2006**). La Périphérine se trouve aussi accumulée dans les sphéroïdes, en association avec les NFs. Sa présence peut traduire un phénomène de régénération comme dans les sections nerveuses qui s'accompagnent d'une élévation de ce FI (**Migheli, 1993**). Un autre élément en faveur de phénomènes de régénération associés, est la présence dans les sphéroïdes de Galectine 1, molécule impliquée dans la régénérescence axonale (**Kato, 2001**).

**Tableau 4 : Effets de la modulation de l'expression des différents filaments intermédiaires neuronaux chez la souris**  
(D'après Julien; 1999 et Larivière, 2003)

Transgènes	Inclusions péricaryales	Inclusions axonales	Effet sur le diamètre axonal	Effet sur la quantité de FI	Dysfonctions cellulaires	Pertes de motoneurones	Références
<b>Humain</b>							
hNFL	aucune	aucune	non	non	non	non	Julien, 1987
hNFH	massives	quelques-unes	réduit	non	oui	non	Cote, 1993
hNFM	massives	quelques-unes	réduit	non	oui	non	Vickers, 1994; Gama Sosa, 2003
hNFH-hNFL	peu	peu	non	non	non	non	Meier, 1999
<b>Souris (KO)</b>							
NFL -/-	massives	quelques-unes	réduit (50%)	oui	oui	oui	Xu, 1993
NFM -/-	non	non	réduit (50%)	oui	non	non	Elder, 1998
NFH -/-	massives	quelques-unes	réduit (20%)	non	non	faible	Marszalek., 1996
NFH/NFM -/-	non	non	réduit (50%)	oui	non	oui	Jacomy, 1999
$\alpha$ -Internexine -/-	aucune	aucune	aucun	non	oui (Cervelet)	non	Levavasseur, 1999
$\alpha$ -Internexine -/-; NFL-/-	aucune	aucune	réduit (50%)	oui	non	oui	Levavasseur, 1999
Périphérine	aucune	oui	non	non	oui	oui	Beaulieu, 1999a, larivière, 2002
Périphérine; NFL	petites	multiples	ND	oui	oui	oui	Beaulieu, 2000
<b>Souris (sur expression)</b>							
NFL	massives	oui	réduit	non	oui	non	Xu, 1993
NFM	massives	oui	réduit (50%)	oui	non	non	Wong, 1995
NFH	massives	quelques-unes	ND	non	non	non	Marszalek., 1996
Périphérine	non	oui	ND	non	oui	oui	Beaulieu, 1999
$\alpha$ -Internexine	non	non	non	non	oui (cervelet)	non	Ching, 1999
<b>Mutants</b>							
mNFHLacZ	massives	aucunes	réduit	oui	non	60% (Cervelet)	Eyer, 1994
mNFL	massives	quelques-unes	réduit (50%)	non	oui	oui	Lee, 1994
mNFM	massives	aucunes	réduit (50%)	non	non	non	Wong, 1995
mNFL-cmyc	oui	ND	ND	ND	oui	oui	Canete-soler, 1999

h: humain ; m: murin ; NFL: Neurofilament Light Subunit; NFM: Neurofilament Medium Subunit; NFH: Neurofilament High Subunit; ND: Non Déterminé

Le transport axonal a récemment été plus impliqué dans la physiopathologie de la maladie par la mise en évidence de mutation sur la dynactine et par l'accumulation fréquente dans les sphéroïdes de kinésine, mais pas de dynéine (**Toyoshima, 1998 ; Puls, 2003**). L'ensemble de ces anomalies bloquerait progressivement le transport axonal avec comme résultante la mort des motoneurones.

L'intervention des mitochondries dans la SLA, s'est concrétisée par la mise en évidence de modifications morphologiques (dilatations, fragmentation...) mais aussi fonctionnelles (perturbations de la chaîne respiratoire) (pour revue, **Manfredi, 2005**). Cependant, le rôle réel de la perturbation mitochondriale est sujet à caution, puisque la plupart des études portent sur des tissus obtenus en post-mortem, alors que la maladie était déjà déclarée.

### **2.10.2. NFs et MP**

La maladie de Parkinson est la seconde cause de maladie neurodégénérative, après la maladie d'Alzheimer. Elle associe un syndrome extrapyramidal, une hypertonie et un tremblement d'où son nom de paralysie agitante (« shaking palsy ») des anglo-saxons. Elle se caractérise, d'un point de vue neuropathologique, par la perte des cellules dopaminergiques de la substance noire mésencéphalique (et plus particulièrement de la pars compacta), qui présentent des inclusions caractéristiques : les corps de Lewy (LB). Ces agrégats contiennent essentiellement une protéine, l' $\alpha$ -synucléine en association avec d'autres éléments du cytosquelette comme les NFs ou l' $\alpha$ -Internexine.

Récemment, une mutation sur le gène de *NFM*, codant pour le domaine 2B, a été trouvée dans un cas d'une MP juvénile sporadique (**Lavedan, 2002**). Cette substitution (G1747A) porte sur l'exon 4, remplaçant la glycine en position 336, qui est hautement conservée entre les espèces mais aussi entre les autres FI, par une sérine. Cette substitution survient dans une séquence consensus de type Arginine-Glycine-Thréonine-Lysine-Acide glutamique (RGTKE) qui permet et facilite une interaction entre les protéines (**Letai, 1995**). Cette mutation aboutirait à une déstabilisation du dimère NFL-NFM et est à rapprocher de la survenue d'accumulation massive de NFs chez une souris transgénique portant une mutation dans le domaine 2B de NFL (**Lee, et al. 1994 ; Tableau 4**). Cependant, il n'est pas compris pourquoi la déstabilisation survient uniquement dans la substance noire mésencéphalique. Il a pu être montré que la stœchiométrie des différents éléments du cytosquelette, plus particulièrement des NFs, était perturbée, marquée par une diminution des NFs, lors de l'analyse de prélèvements post-mortem (**Pollak, 2003**).

### **2.10.3. NFs et maladie d'Alzheimer**

La maladie d'Alzheimer est la première cause de démence. Elle se caractérise par deux lésions histologiques : la présence de dégénérescences neurofibrillaires (DNF) dans les neurones

et des plaques séniles dans le neuropile. Les DNF résultent de l'accumulation d'une MAP, la protéine TAU, anormalement phosphorylée, alors que les plaques séniles sont secondaires à l'accumulation d'un peptide (A4) résultant du catabolisme anormal de la protéine APP.

Les NFs s'accumulent aussi dans les DNF. Mais il s'agit plus d'un phénomène secondaire. Comme dans la maladie de Parkinson, la stœchiométrie des NFs est altérée. Cette baisse significative des NFs peut être le témoin d'un désassemblage du cytosquelette, observé dans les maladies neurodégénératives (**Bajo, 2001 ; Pollak, 2003**).

#### **2.10.4. NFs et démence de type frontale (DNI)**

Récemment une nouvelle entité neuropathologique a été individualisée. Il s'agit d'une démence de type fronto-temporale dans laquelle des inclusions neuronales expriment principalement les NFs (les trois sous unités, phosphorylées), mais aussi l' $\alpha$ -Internexine. Ces inclusions ne sont pas révélées par des anticorps dirigés contre l' $\alpha$ -synucléine ou la protéine TAU et expriment de façon variable de l'ubiquitine (**Josephs, 2003 ; Cairns, 2004**).

#### **2.10.5. NFs et Neuropathies**

##### **2.10.5.1. Neuropathies héréditaires**

**La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT)** est la plus fréquente des neuropathies héréditaires. Il s'agit d'un groupe très hétérogène, tant au point de vue clinique que génétique. Les signes cliniques s'échelonnent depuis des formes mineures, débutant chez l'adulte et évoluant lentement avec peu de handicap, jusqu'à des formes congénitales, drastiques, mortelles en quelques années. Sur la base de critères électrophysiologiques et neuropathologiques, deux groupes sont individualisés : les formes dites primitivement démyélinisantes (CMT-1) et les formes axonales (CMT-2). Les CMT-1 associent un ralentissement des vitesses de conceptions (inférieures à 30m/s), une perte des fibres myélinisées et les aspects classiques de « bulbes d'oignons », traduisant une remyélinisation inefficace. Dans les CMT-2, les vitesses de conduction sont subnormales, les potentiels sensitifs absents et l'examen histologique du nerf montre une raréfaction des fibres myélinisées, avec de nombreux « clusters de régénération ». Récemment deux familles de CMT-2 ont été reliées à la présence de mutations de *NFL* et classées en CMT-2E (**Mersiyanova, 2000 ; De Jonghe, 2001**). Il s'agit de mutations touchant le domaine N-terminal et le domaine central qui perturberaient l'assemblage et le transport des NFs (cf plus haut). Chez la drosophile, qui ne possède pas de NFs, l'inactivation de la kinésine aboutit à la présence de dilatations axonales et à l'apparition progressive de paralysies distales chez la larve (**Hurd, 1996**). Chez un rat transgénique, modèle de

type « CMT1A », les NFs non phosphorylés sont précocement augmentés, en même temps que les premiers signes électroneuromyographiques et neuropathologiques de démyélinisation, alors que le cytosquelette de l'axone est normal sur le plan de la densité en éléments du cytosquelette (**Grandis, 2004**).

**La neuropathie à axones géants** (« Giant Axonal Neuropathy », GAN) est responsable d'une neuropathie progressive, sévère, de début précoce chez l'enfant, affectant aussi le système nerveux central. Il s'agit d'une affection rare caractérisée par la présence d'axones géants, dont le cytosquelette apparaît être désorganisé, avec une accumulation de NFs phosphorylés aboutissant à une distension de l'axone sur la biopsie nerveuse (**Bruno, 2004**). En microscopie électronique, il s'agit de filaments de 10nm empaquetés, formant des condensations denses aux électrons et repoussant les autres organelles à la périphérie. Ces anomalies sont également trouvées dans le système nerveux central. Cette neuropathie est secondaire à des mutations sur le gène de la gigaxonine (*GAN*, chromosome 16p24), protéine impliquée dans les relations entre les NFs et les autres éléments du cytosquelette (**Bomont, 2000 ; Bomont, 2003b**). La désorganisation du cytosquelette dépasse les neurones, puisque des fibroblastes en cultures présentent aussi une accumulation de Vimentine. L'accumulation de FI se retrouve aussi dans des astrocytes (GFAP), dans le muscle (Desmine) et dans les kératinocytes (Kératine). En culture de cellules, l'agrégation de Vimentine observée chez ces patients peut être prévenue par traitement à la Pénicillamine (**Tandan, 1990 ; Mahadevan, 2000**). Cette molécule est un donneur de groupements sulphydrides capable de stabiliser les groupements thiols. Ces résultats rappellent les observations faites dans les neuropathies toxiques (acrylamide, N-Hexane...). La synthèse et les modifications post-transcriptionnelles des NFs ne sont pas affectées (**Bomont, 2003a**).

### 2.10.5.2. Neuropathies diabétiques

Le diabète, première cause de neuropathie, est caractérisé par un ensemble de troubles du métabolisme culminant avec la perturbation du métabolisme glucidique. D'autres troubles, métaboliques, vasculaires, immunologiques, sont associés qui participent et rendent compte à un moment donné de l'évolution, de leur participation aux neuropathies diabétiques. La présence de plusieurs facteurs physiopathologiques intriqués explique le polymorphisme des neuropathies diabétiques.

La polyneuropathie sensitive, symétrique, neuropathie la plus fréquente au cours du diabète, s'associe à des remaniements des nerfs périphériques incluant une dégénérescence axonale et une perte des fibres myélinisées probablement par un phénomène de mort rétrograde. Les études sur les modèles de rats diabétiques ont montré que des modifications des NFs survenaient : diminution de leur expression dans les neurones sensitifs, perte des NFs au niveau de l'extrémité distal des nerfs et

phosphorylation anormale dans la moelle épinière (**Xu, 2002**). Cet état anormal de phosphorylation apparaît être secondaire à l'activation de la voie JNK par l'hyperglycémie (**Fernyhough, 1999**).

L'absence de NFs, dans les axones, aggrave la neuropathie de souris dont le diabète est induit. Celle-ci débute plus tôt, est plus sévère et la réduction du calibre axonal est plus importante (**Zochodne, 2004**). Ces anomalies sont réversibles lorsque l'hyperglycémie est corrigée par l'injection d'insuline. Ces résultats montrent que les NFs ont possiblement un rôle protecteur dans ce type de neuropathie.

La régénération axonale chez des souris diabétiques est altérée. En effet on n'observe pas de majoration de l'expression de la tubuline et les NFs, au contraire, sont moins exprimés (**Xu, 2002**). Ainsi, l'hyperglycémie et/ou l'absence d'insuline pourrait aboutir à l'inhibition de la production de NFs, à la fois au niveau transcriptionnel et traductionnel. Une hyperphosphorylation s'ajoute par l'activation chronique de la voie JNK inhibant le transport axonal des éléments du cytosquelette (**Fernyhough, 2002**). Enfin l'hyperglycémie aboutit aussi à la production d'AGEs (cf. ci dessus).

#### **2.10.5.3. Neuropathies induites par des toxiques**

**L'aluminium** est capable chez la souris d'induire l'accumulation de NFs et d'engendrer une perte des motoneurons. L'analyse de l'ARNm des NFs montre que ceux de NFM et NFH sont diminués (**Strong, 1994**). L'aluminium serait responsable de la formation d'un pool de NFs phosphorylés, à la fois en induisant une résistance aux phosphatases et en inhibant les phosphatases endogènes. Les modèles animaux toxiques, secondaires à l'injection chronique d'aluminium, sont cependant réversibles à l'arrêt du traitement (**Strong, 1991**). L>IDPN ( $\beta$ ,  $\beta'$ -iminodipropionitrile) et le 1,2-diacetylbenzene (1,2-DAB) sont aussi responsables d'une phosphorylation aberrante des NFs, responsable d'une neuropathie avec des axones géants sur la biopsie nerveuse (**Gold, 1991 ; Tshala-Katumbay, 2005**).

**L'acrylamide** est une drogue connue pour être responsable d'une agrégation des FI, notamment des NFs en culture de cellules (**Hartley, 1997**), mais aussi chez l'animal où elle est responsable d'une neuropathie progressive avec accumulation de NFs dans les axones. Le rôle exact des NFs est mal connu, puisque des souris ne possédant plus de NFs dans l'axone développent une neuropathie induite par l'acrylamide identique à des animaux contrôles (**Stone, 2001**).

De nombreux **médicaments**, notamment utilisés en chimiothérapie anticancéreuse comme la vincristine, induisent des neuropathies sensibles douloureuses. Ils touchent plus particulièrement les petites fibres, affectant très probablement le transport axonal comme le montrent la présence d'une diminution du contenu en MT de l'axone et la dilatation des neurones qui accumulent aussi des NFs dans le corps cellulaire (**Topp, 2000**).



**Tableau 5 : Effets de la modulation de l'expression des NFs chez les souris mutantes pour SOD-1**  
(D'après Julien, 1999 et Larivière, 2004)

Transgènes	Durée de vie	NFs dans les motoneurones		Références
<b>Transgène</b>		Axone	Corps cellulaire	
hNFH (SOD1 <sup>G37R</sup> )	augmentée (65%)	réduits	augmentés	Couillard-Despres, 1998
hNFL (SOD1 <sup>G37R</sup> )	non modifiée	non modifiés	non modifiés	Couillard-Despres, 2000
mNFL ou mFH (SOD1 <sup>G93A</sup> )	augmentée (16%)	réduits	augmentés	Kong, 2000
Périphérine (SOD1 <sup>G37R</sup> )	non modifiée	non modifiés	non modifiés	Larivière, 2003
<b>KO</b>				
mNFL (SOD1 <sup>G85R</sup> )	augmentée (15%)	réduits	augmentés	Williamson, 1998
Triple (SOD1 <sup>G37R</sup> )	non modifiée	réduits	non modifiés	Nguyen, 2000
mNF(M/H) <sup>tailΔ</sup>	augmentée (15%)	normaux	normaux	Lobsiger, 2005
Périphérine	non modifiée	non modifiés	non modifiés	Larivière, 2003
<b>Mutants</b>				
mNFHLacZ	non modifiée	réduits	accumulation massive	Eyer, 1998

h: humain ; m: murin ; NFL: Neurofilament Light Subunit; NFM: Neurofilament Medium Subunit; NFH: Neurofilament High Subunit; SOD1<sup>G85R</sup> , SOD1<sup>G93A</sup> , SOD1<sup>G37R</sup> : mutation SOD-1 utilisée en fond génétique

### **2.10.6. NFs et anticorps anti-NFs comme marqueurs de pathologie**

En tant que constituants majeurs du cytosquelette, les NFs sont de bons candidats à la fonction de biomarqueurs, notamment pour la quantification de la perte axonale. La rupture de la membrane axonale aboutit à leur libération dans le LCS et ainsi à leur détection par méthode ELISA ou par Western Blot (**Petzold, 2005a**). Les NFs ont ainsi été mis en évidence dans de nombreuses pathologies neurologiques aiguës (Accidents Vasculaires Cérébraux...) ou chroniques (SLA...) (**Petzold, 2005a ; Shaw, 2005 ; Brettschneider, 2006**). C'est dans la Sclérose En Plaques que les études sont les plus nombreuses. Elles montrent qu'il existe une corrélation entre le taux de NFH présents dans le LCS et le handicap. Leur présence à un taux élevé semble être un témoin prédictif de mauvais pronostic (**Petzold, 2005b ; Miyazawa, 2007**). Enfin, des anticorps anti-NFs ont également été mis en évidence dans la SEP, dans des neuropathies avec blocs de conduction ou dans la SLA (**Petzold, 2005a**).

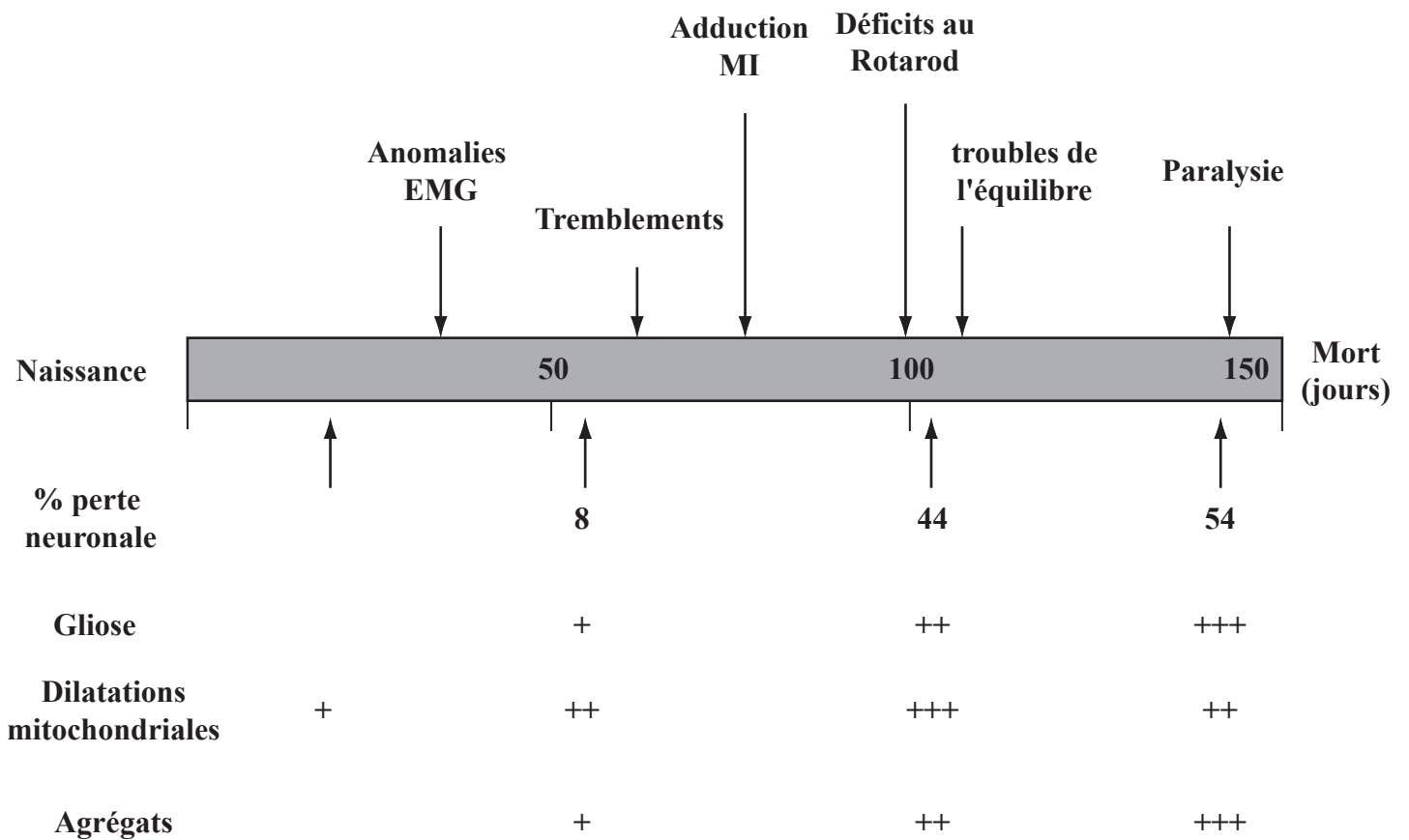
### **2.11. Modèles murins de transgénèse des FIn (Tableaux 4 et 5)**

De nombreux modèles murins ont été créés afin de mieux appréhender le ou les rôles des NFs dans la physiopathologie de la SLA. Les résultats sont ambigus, parfois contradictoires et ne reproduisent qu'une partie des signes cliniques et des lésions histologiques observés chez l'homme. Une explication est la toxicité possiblement induite par la surexpression d'un transgène, d'autant que la surexpression de la rhodopsine sauvage chez la souris induit une perte sélective des photorécepteurs (**Olsson, 1992**). L'effet dose, observé chez l'homme dans certaines situations pathologiques, joue donc probablement un rôle dans la survenue d'un phénotype chez la souris. Par exemple, les souris transgéniques surexprimant une forme humaine de NFH ou NFL de souris, développent une accumulation anormale de NFs dans les motoneurones, associée à une dégénérescence axonale et à une paralysie musculaire, éléments ressemblant à la SLA (**Cote, 1993 ; Xu, 1993**). L'absence de NFL bloque la possibilité de former des FI et en conséquence le calibre de l'axone est réduit, de façon importante et contient peu de FI, mais les souris ont un développement normal, alors que la vitesse de conduction est réduite de 50%, et qu'il existe un délai lors de la régénération axonale (**Zhu, 1997**). Des résultats similaires sont obtenus lorsque l'association des NFs est perturbée par une mutation sur le domaine central de NFL (**Lee, 1994**). De façon surprenante, la coexpression de la forme humaine de NFL avec une surexpression de NFH de souris restaure la fonction des motoneurones, soulignant l'importance de la stœchiométrie des NFs (**Meier, 1999**).

Les résultats concernant NFM sont plus homogènes. Son absence aboutit à une réduction sévère du diamètre de l'axone avec diminution du taux de NFL et diminution du contenu en NFs. NFM module donc, en partie, la croissance radiale de l'axone en affectant probablement l'assemblage des NFs (**Elder, 1998a ; Jacomy, 1999**). En fonction des équipes, l'absence de NFH

**Figure 14: Représentation graphique de la progression de la maladie chez les souris SOD-1 (G93A).**

Les premiers signes cliniques apparaissent vers 2 mois sous la forme de modifications de l'EMG, suivis rapidement de tremblements et de limitation de l'adduction des membres inférieurs (MI). A 4 mois les premières manifestations de déficits moteurs sont présentes, corrélées à une perte des motoneurones de 50% environ. Les premiers signes neuropathologiques correspondent à une vacuolisation des motoneurones et des dilatations mitochondriales. Plus tard mais toujours en l'absence de symptômes il existe une désorganisation du cytosquelette avec accumulation de NFs. (D'après Bendotti *et al*, 2004).



réduit ou n'a aucun retentissement sur le diamètre de l'axone, mais s'accompagne souvent d'une augmentation de la concentration en MT des axones (**Elder, 1998b ; Rao, 2002a**). La suppression de NFM et de NFH conduit à l'accumulation de NFL dans le cytoplasme de l'axone et donc à une réduction du calibre axonal, comme pour les souris déficientes en NFL (**Jacomy, 1999**). Ces résultats impliquent que l'hétérodimérisation de NFL avec NFM ou NFH est indispensable pour une translocation efficace dans l'axone, d'autant que l'étude en microscopie par force atomique montre que l'autoassemblage *in vitro* de NFL est instable, et que la composition en NFs de l'axone a un retentissement sur la composition des autres éléments du cytosquelette (**Brown, 1998 ; Brandt, 2001**). Un fait essentiel est que les accumulations cytoplasmiques périnucléaires observées sont le plus souvent relativement bien tolérées, en fonction des modèles, par les motoneurones.

Dans les modèles murins de SLA, « souris SOD » (**Figure 14; Tableau 5**; pour revue, cf. **Bendotti, 2004**), le ralentissement du transport des NFs apparaît être une constante et un phénomène précoce, sans perturbation du transport de la tubuline ou de l'actine, précédant l'apparition des signes cliniques. De plus, ces NFs se trouvent accumulés dans les sphéroïdes associés souvent, mais pas complètement, avec d'autres FI, la Périphérine et l' $\alpha$ -Internexine (**Tu, 1996**). Ces éléments confirment que l'intervention des NFs dans la physiopathologie n'est pas un événement tardif (**Williamson, 1999**). La surexpression dans ce contexte de sous unité NFH ou NFM, murine ou humaine, permet d'augmenter la survie des animaux, probablement par un effet protecteur de l'accumulation des NFs dans le corps cellulaire (**Couillard-Desprès, 1998 ; Kong, 2000**). De plus les formes mutées de SOD-1 peuvent agir en inhibant l'action de la calcineurine, bloquant la déphosphorylation (**Ferri, 2000**). Par contre, la suppression des NFs (M ou H) permet de réduire la formation d'accumulation de protéine TAU et d'augmenter la survie des animaux, soulignant encore l'importance de la toxicité des NFs lorsqu'ils s'agrègent dans les sphéroïdes axonaux (**Ishihara, 2001**). La survie des animaux est aussi prolongée lorsque les extrémités C-terminales de NFH et NFM sont délétées (**Lobsiger, 2005**).

Une accumulation de NFs phosphorylés, au niveau de la jonction neuromusculaire, a été observée dans des souris portant une délétion homozygote du gène *SMN1*. Celle-ci est responsable d'une désorganisation de la synapse neuro-musculaire, n'est pas corrélée avec un dysfonctionnement des systèmes de dégradation, et serait en partie responsable de la mort neuronale, par mort rétrograde (« dying-back »). Cependant de telles anomalies ne sont pas présentes dans les souris SOD-1 (**Cifuentes-Diaz, 2002**). Ces résultats suggèrent que dans certaines situations, l'accumulation des NFs a un rôle protecteur, probablement par chélation du calcium et des ROS, mais cela ne semble pas être une constante, puisque le croisement entre des souris SOD-1<sup>(G37R)</sup> avec des souris possédant des agrégats massifs (souris NFHLacZ) ne modifie pas la durée de vie des animaux (**Eyer, 1998**).

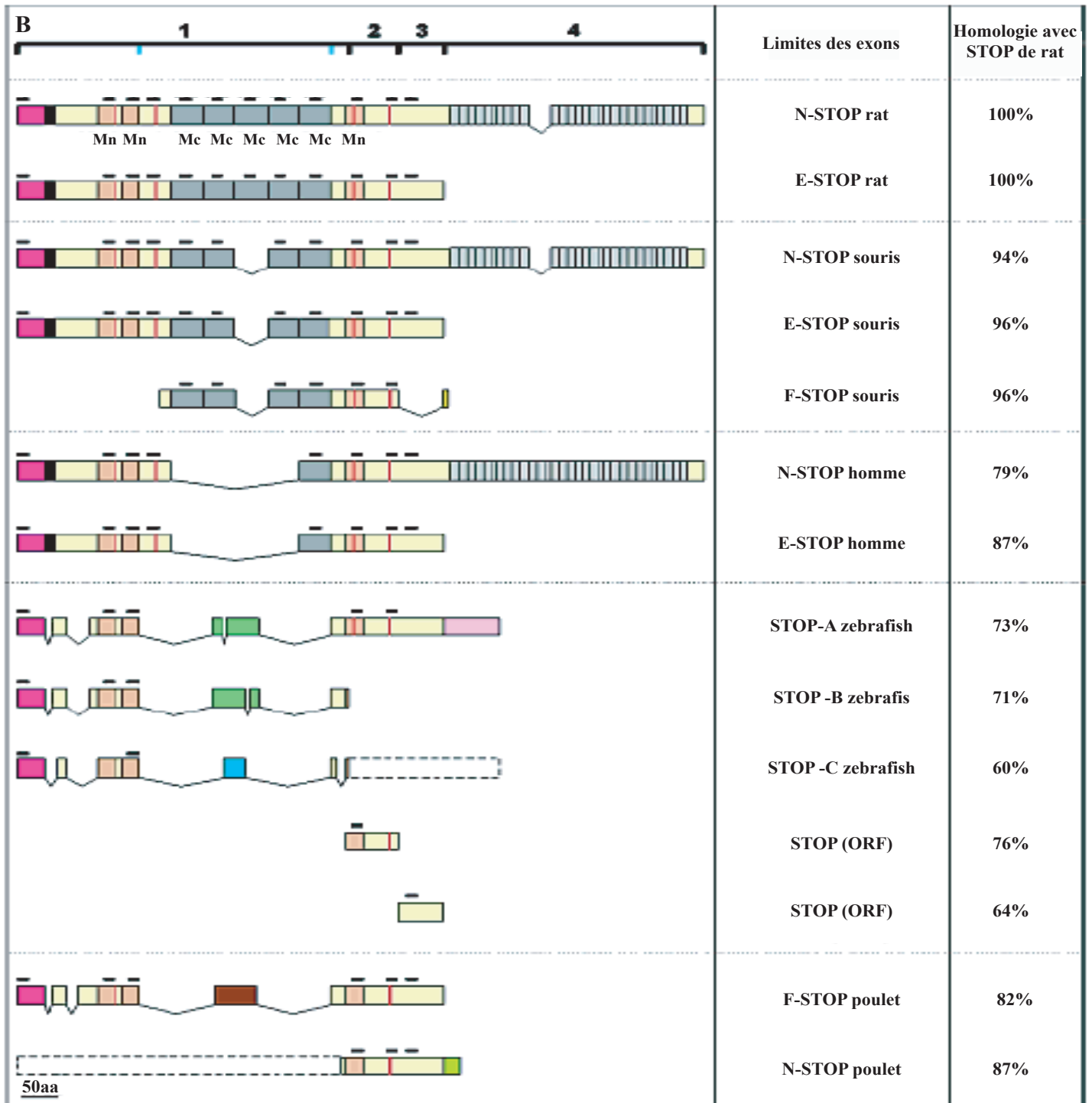
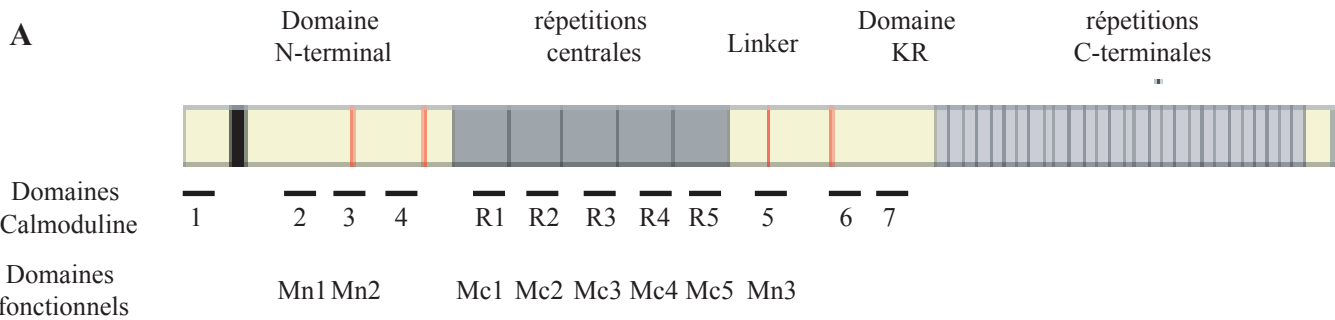
Dans ces modèles « SOD-1 », des anomalies des mitochondries, comparables à ce qui est observé chez l'homme, sont présentes et précoces (**Tableau 5; Figure 14**). Les mitochondries apparaissent vacuolisées et s'accumulent dans le corps des neurones ainsi que dans les dendrites et les

axones. La vacuolisation semble provenir de la membrane externe, qui se détache progressivement de la membrane interne, augmentant ainsi la taille de l'espace intermembranaire (**Higgins, 2003**). Ceci libérerait les molécules pro-apoptotiques de l'espace intermembranaire qui activeraient la caspase 1 et l'apoptose. Ce phénomène apparaît être amplifié en présence de radicaux libres (**Pasinelli, 1998**). Une théorie actuelle est que la libération de molécules pro-apoptotiques (AIF, Cytochrome c...) serait quantique, c'est à dire qu'elle proviendrait du dysfonctionnement d'une mitochondrie. Cette toxicité locale, intracytoplasmique, c'est à dire dans un compartiment cellulaire tel que la synapse, ne pourrait être responsable de la mort cellulaire directement, mais pourrait se répandre dans le neurone sur une longue période de temps. Ceci permettrait d'expliquer le délai entre les anomalies cellulaires et la survenue des symptômes. Ce mécanisme de mort cellulaire pourrait être spécifique aux motoneurons et aurait comme conséquence, qu'à n'importe quel moment de la progression de la maladie, seul un petit nombre de neurones dégénérerait par apoptose (**Manfredi, 2004**). En plus de ces altérations morphologiques, il existe une perturbation du fonctionnement de la chaîne respiratoire et une incapacité des mitochondries à capter le calcium intracellulaire. Ces dernières anomalies permettent de faire un lien entre mitochondries et phénomènes d'excitotoxicité induits par le glutamate d'une part, et d'autre part entre mitochondries et NFs (cf. § 2.6 ; **Tateno, 2004**).

La surexpression de la Périphérine est responsable d'une maladie du motoneurone de survenue tardive ressemblant encore à la SLA (**Beaulieu, 2000**). La progression de cette dégénérescence des motoneurons est cependant aggravée lorsque la sous unité NFL est absente, une situation rencontrée dans la SLA (**Beaulieu, 1999b**), mais il existe une restauration du phénotype lorsque la sous unité NFH est surexprimée dans ce contexte (**Beaulieu, 2003**). Il semble maintenant reconnu que lors de l'absence de NFL, NFH et NFM ont une action délétère en s'assemblant avec la Périphérine et forment ainsi des agrégats cellulaires dans le corps des neurones. Néanmoins, la surexpression ou la suppression de la Périphérine dans un contexte de souris portant une mutation sur le gène de SOD-1 ne modifie pas le parcours de la maladie, alors que dans le contexte de souris « SOD-1 », l'expression de la protéine NFH humaine améliore la survie des animaux (**Couillard-Desprès, 1998**). Ceci implique que la Périphérine n'est pas un élément clé dans la survenue de la pathologie (**Lariviere, 2003**). NFH aurait donc un rôle protecteur en transférant l'accumulation de la Périphérine du compartiment axonal où elle serait toxique, vers le compartiment cytoplasmique. L'ensemble de ces résultats souligne encore l'importance de la stœchiométrie des FIn dans la formation, la localisation et la toxicité des inclusions neuronales ou axonales observées dans la SLA (**Lariviere, 2003**).

## Figure 15: Organisation structurale de STOP

A: La protéine STOP possède de nombreux modules de liaison à la calmoduline (traits noirs horizontaux). En parallèle existent des modules fonctionnels permettant la résistance des MT à l'instabilité induite par le nocodazole et le froid (Mn) ou simplement le froid (Mc). La figure B montre la représentation schématique des STOPs de mammifères, de poissons et d'oiseaux. Les régions de même couleurs sont homologues entre les espèces. Les modules Mn sont en oranges et Mc en gris foncés. Les barres verticales rouges sont les domaines probables de phosphorylation. Le pourcentage d'identité de séquences avec N-STOP de rat est indiquée dans la colonne de droite (D'après Bosc *et al.*, 2003).



### 3. Les protéines STOPs (*Stable Tubule Only Polypeptides*)

Les MT, cylindres creux résultants de la polymérisation des tubulines  $\alpha$  et  $\beta$ , sont des structures dynamiques impliquées dans de nombreux processus vitaux à la cellule, comme le trafic intracellulaire ou la division cellulaire. Ils sont particulièrement abondant dans les neurones qui contiennent un sous groupe de MT résistants à des conditions dépolymérisantes, comme le froid ou des drogues (nocodazole, colchicine...). Cette propriété est essentielle au développement des neurones, à leur maintien et leur fonction (**Margolis, 1986b**). Des protéines associées aux MT (MAPs) ont été individualisées comme étant capables de contrôler l'état de polymérisation/dépolymérisation de ces MT, voire d'induire une résistance au froid. C'est le cas d'une famille de protéines, STOPs (*Stable Tubule Only Polypeptides*), dont il existe plusieurs isoformes provenant de l'épissage alternatif d'un même gène (**Margolis, 1986b ; Bosc, 2003**).

#### 3.1. L'isoforme neuronale ou N-STOP (Figure 15)

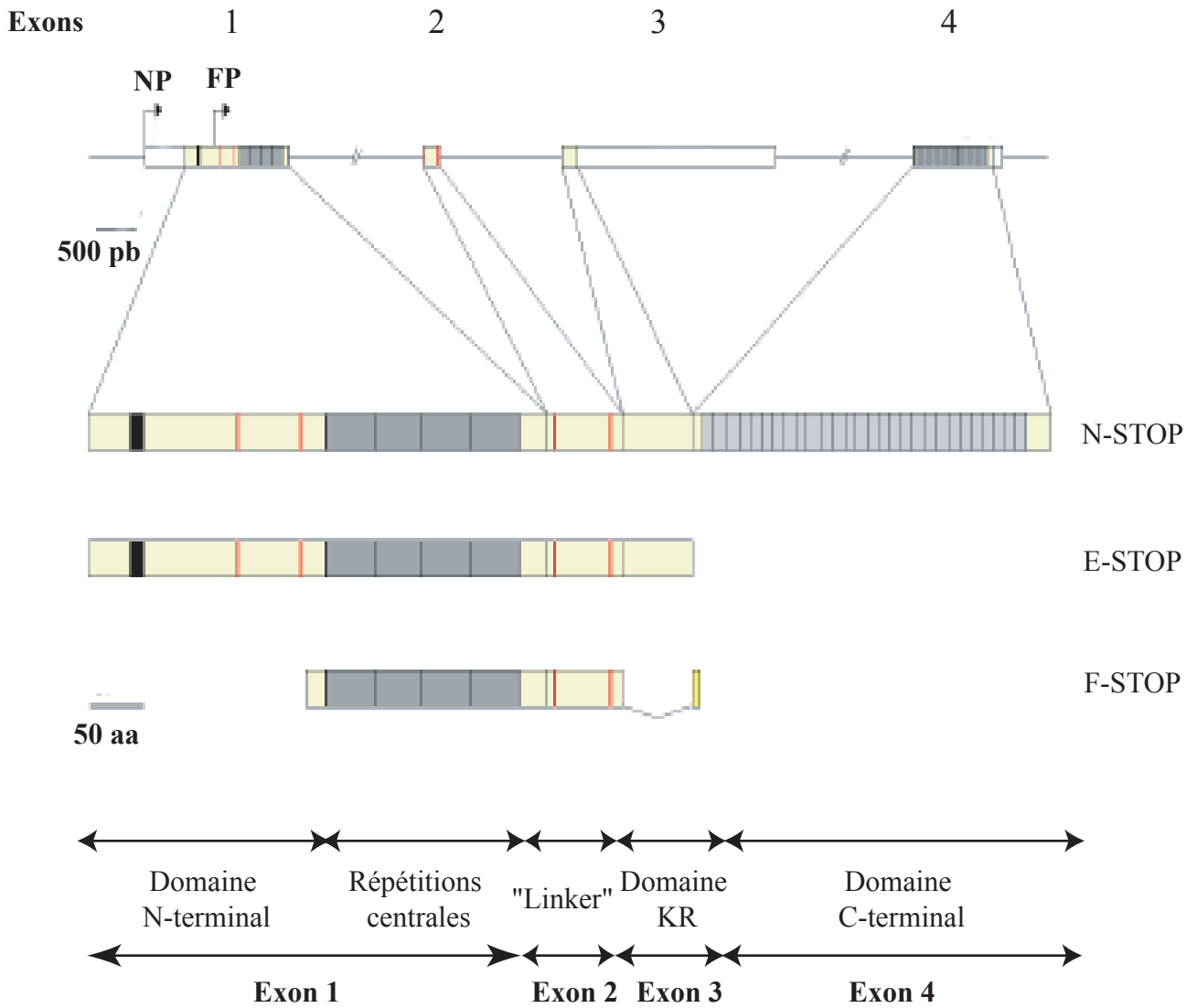
Il s'agit d'une protéine de 952AA, calmoduline dépendante, dont le poids moléculaire calculé est de 100 kDa chez le rat. Le poids moléculaire apparent est néanmoins plus important sur les gels de SDS/PAGE (145 kDa) impliquant des modifications post-traductionnelles importantes, comme pour d'autres MAPs (MAP2, MAP4 ou TAU) (**Bosc, 1996**). Sa structure est particulière, n'est liée à aucune des autres MAPs, même si elles partagent entre elles un pI basique (9,5), la présence de répétition de séquences et l'existence d'isoformes. N-STOP comporte trois parties : une région centrale constituée par la répétition de cinq domaines de 46AA, une région N-terminale et une extrémité C-terminale constituée de vingt-huit motifs répétés de 11AA. Le domaine central et l'extrémité C-terminale sont séparés par une région « liante » ou « linker domain » et par une région dite « KR » car riche en Lysine et Arginine, composée d'environ 40AA (**Bosc, 1999**). N-STOP possède quatre sites consensus de phosphorylation par des kinases régulées par la calmoduline (CamKII), et deux séquences de polyprolines (domaine SH-3). N-STOP est exprimée exclusivement dans les neurones avec une expression maximale chez l'adulte.

L'isoforme murine se distingue par la présence de 4 domaines centraux répétés, une séquence de 906AA (poids théorique de 96,4 kDa), alors que la forme humaine, déduite d'EST, n'a qu'un domaine central, mais possède une séquence supplémentaire insérée dans l'extrémité C-terminale (813AA, poids théorique de 86,5 kDa).

A la différence des autres MAP, la fixation de STOP sur les microtubules est indépendante de l'état de polyglutamination, se fait préférentiellement avec la tubuline  $\alpha$  et avec une affinité plus importante que pour les autres MAPs (**Bonnet, 2002**).

**Figure 16: Organisation génomique du gène *STOP* de rat**

Le gène des protéines STOPs est unique, situé sur le chromosome 1. Il est constitué de 4 exons et de 3 introns. Les différentes isoformes de STOP proviennent de l'épissage alternatif de ce gène. Les régions exoniques non transcrites apparaissent en grisées sur le gène. NP représente le promoteur de la F-STOP et FP celui des isoformes neuronales, N-STOP et E-STOP. N-STOP est codée par les exons 1 à 4 et E-STOP par les exons 1 à 3. L'exon 3 de l'ARNm de E-STOP est allongé par une structure intronique en 3'. L'épissage des exons 2 et 4 de l'ARNm de F-STOP introduit un glissement du cadre de lecture et la terminaison de l'ORF, 21 bp plus loin (D'après Bosc *et al.*, 2003).





### 3.2. Organisation du gène des STOPS

Les études génomiques ont montré que le gène *STOP* (*Mtap6*) était unique et localisé sur le chromosome 7 (région E2-F1) de la souris et 1q32 chez le rat. La longueur de ce gène est d'environ 40 kb (**Aguezzoul, 2003**). Il est composé de 4 exons, avec les séquences usuelles d'épissage, et de trois introns, l'intron 3 étant particulièrement volumineux. Les résultats semblent contradictoires chez l'homme puisque par hybridation *in situ* *STOP* a été localisé sur le chromosome 6p12 (**Jolly, 1999**), alors que le chromosome 7 de la souris a une synténie avec le chromosome 11q14 humain, et qu'une protéine, KIAA1878 (numéro d'accèsion GenBank™ AB058781 ; **Nagase, 2001 ; Bosc, 2003**), est équivalente à la N-STOP (numéro d'accèsion GenBank™ AP001922).

Les quatre exons du gène *STOP* correspondent chacun presque entièrement à un des quatre domaines de la protéine (**Figure 16**). L'exon 1 (1817 bp) code pour l'extrémité N-terminale et le domaine répété central, les exons 2 à 4 (respectivement 214, 197 et 1152 bp) codent pour la région « linker », le domaine « KR » et l'extrémité C-terminale respectivement. L'exon 4 ne comporte qu'une seule séquence de polyadénylation (**Denarier, 1998a**).

Deux promoteurs sont présents, l'un induisant la transcription des formes E et N-STOP et le second, inclus dans les séquences codantes de N-STOP, contrôle l'expression de F-STOP (cf. ci-dessous ; **Aguezzoul, 2003**). La région flanquante 5' ne possède pas de « TATA box » ni d'élément d'initiation, mais plusieurs motifs consensuels de fixation du facteur de transcription Sp1 (**Denarier, 1998a**).

### 3.3. Les différentes isoformes des protéines STOPS

De l'épissage alternatif de ce gène émergent deux autres isoformes : F-STOP et E-STOP. F-STOP (Fibroblastic STOP) est une variante de 42 kDa de N-STOP, de distribution tissulaire diffuse. Les séquences protéiques de l'exon 3 sont épissées, et celles de l'exon 2 et 4 sont fusionnées, ce qui change le cadre de lecture et a pour conséquence l'absence d'une grande part de l'extrémité N et C terminale (**Figure 15; Denarier, 1998a**). E-STOP (Early STOP) est une variante embryonnaire de N-STOP de 84 kDa chez le rat. Il s'agit d'une isoforme majeure persistant tout au long de la vie. E-STOP résulte d'une fusion de l'exon 3 avec l'intron suivant, absence de transcription de l'exon 4, avec pour conséquence l'absence des répétitions C-terminales.

### 3.4. Fonctions

#### 3.4.1. Organisation fonctionnelle de STOP (Figure 15)

La caractéristique des protéines STOPs est d'être organisée en modules, au nombre de douze, capables de se lier à la Calmoduline et ayant la capacité de stabiliser les MT (**Bosc, 2001**). Ils sont situés dans la région centrale (CamR1-5) et les autres de part et d'autre (Cam1-7). Sur la base d'étude en culture de cellules, ces modules ont été groupés en modules dits Mn ou Mc.

Les modules Mn (Cam2, Cam3 et Cam5) induisent une résistance des MT à l'instabilité induite par le nocodazole et au froid. Les modules Mc (CamR1-5) sont responsables d'une résistance des MT au froid. N-STOP qui possèdent les deux types de modules est donc capable d'induire une résistance des neurones aux deux conditions, alors que F-STOP, qui ne possède qu'un module Mn, ne protège pas, ou mal, les MT des fibroblastes à l'action de cette drogue. Les protéines STOPs ont donc la particularité d'avoir une organisation modulaire bifonctionnelle (fixation de la calmoduline/stabilisation des MT) expliquant leurs propriétés.

La fixation de la calmoduline sur F-STOP apparaît être particulière. En effet, elle se fixe par son extrémité C-terminal sur le motif Cam, laissant l'extrémité N-terminale libre d'interagir avec d'autres protéines et ne subit pas de repliement comme cela est observé habituellement (**Bouvier, 2003**). Ces domaines caractéristiques des STOPs ont été mis en évidence sur d'autres protéines, indiquant que ces modules fonctionnels peuvent être partagés et impliqués dans d'autres propriétés de stabilisation des MT (**Bosc, 2001 ; Bosc, 2003**). Le domaine C-terminal n'est donc pas impliqué dans la stabilisation des MT et pourrait servir de lien avec d'autres éléments du cytosquelette.

#### 3.4.2. Evolution phylogénétique des protéines STOPs (Figure 15)

L'expression des protéines STOPs est restreinte aux vertébrés. Les données les plus précises concernent les formes murines, humaines et de rat. Elles sont toutes codées par un gène unique et le degré d'identité entre les séquences varie de 79 à 94% d'homologie. Les variations portent essentiellement sur le domaine central et l'extrémité C terminale, et concernent donc surtout les exons 1 et 4. Ce type de variation est également présent sur d'autres MAPs, telles que MAP2 et MAP4 (**Chapi, 1995**).

Chez les oiseaux et les poissons, le domaine central répété est remplacé par une séquence courte, non répétée, sans relation aucune avec les répétitions présentes chez les mammifères. Celles ci sont codées par l'exon 1 et sont bordées de façon étonnante par des séquences ayant de fortes homologies de séquences avec celles présentes chez les mammifères. Les protéines STOPs de ces espèces sont aussi caractérisées par l'absence de répétitions dans le domaine C-terminal. Plus

récemment, une protéine de la caille (Nau) possédant trois domaines fortement homologues à STOP, a été isolée (**Suzuki, 1998**).

L'analyse comparative des exons 1 des différentes espèces montre qu'il existe une organisation unique, double, avec une partie hautement conservée et l'insertion d'une région variable mais en un lieu précis. Cela est probablement dû à l'utilisation de différents promoteurs entre les différentes isoformes. De façon remarquable les séquences codantes de l'exon 1 de N-STOP appartiennent au promoteur de F-STOP. Ainsi une séquence identique est utilisée soit comme promoteur soit comme séquence codante. Cette caractéristique n'est retrouvée que dans peu de gènes. Une séquence promotrice cryptique existe dans le gène de la thymidine kinase du virus herpes (**Ellison, 1995**). Un autre exemple est apporté par les gènes *Golli/MBP*, où un promoteur de *MBP* se situe dans la séquence codante de la protéine Golli, impliquée dans le développement des oligodendrocytes (**Campagnoni, 1993**).

### 3.4.3. Fonctions en culture de cellules

*In vivo*, STOP permet aux MT de résister à la dépolymérisation induite par le froid ou les drogues, et est le principal facteur de résistance des cellules. Cela a en particulier été démontré dans des cellules HeLa dépourvues de MT stables au froid, parce que dépourvues de STOP. Dans ces cellules, la transfection de STOP induit la stabilité des MT au froid (**Bosc, 1996**).

Les MT des neurones sont étonnement résistants et sont le siège de modifications traduisant une durée de vie longue, associant une perte des radicaux tyrosines et une délétion d'un acide aminé de l'extrémité C-terminale de l' $\alpha$  tubuline (forme  $\Delta 2$ -tubuline) (**Bosc, 1999**). Les propriétés de STOP sont inhibées par le complexe Calcium-Calmoduline ou par l'injection d'anticorps anti-STOP (**Bosc, 2001**). Des PC12 non différenciées sont incapables de former des neurites sous l'action du NGF lorsque la fonction de STOP est inhibée (**Guillaud, 1998**). Par contre, les neurites de PC12 déjà différenciées ne sont pas affectés par la disparition de STOP, impliquant que des MT stables ne sont pas absolument nécessaires au maintien des neurites, tout du moins en culture de cellules. A l'inverse, si la stabilisation des MT au froid n'est pas modifiée lorsque la protéine TAU (une autre MAPs) est inhibée, les neurites subissent une rétraction (**Shea, 1992**).

L'ensemble de ces résultats témoigne donc d'une coopération entre les différentes MAPs. Cependant, STOP apparaît être unique dans ses fonctions sans apparente substitution possible par d'autres MAPs, au moins en culture de cellules. Cela ne semble pas être le cas chez l'animal (cf. ci-dessous). E-STOP et F-STOP ont les mêmes propriétés de stabilisation des MT au froid, *in vivo* et *in vitro*. Les différentes isoformes agissent cependant de manière différente. Lorsque le « turn-over » des MT est lent, comme dans les cellules neuronales, STOP est associée de manière forte et permanente avec les MT et se retrouve dans la fraction insoluble lors de son isolement. Dans les

cellules à fort pouvoir mitotique, comme les fibroblastes, F- STOP a une localisation principalement cytoplasmique et se retrouve dans la fraction soluble lors de son extraction. Son association avec les MT ne se fait que lorsqu'il y a exposition au froid ou lors de la division cellulaire, par un mécanisme rapide mais mal compris (**Denarier, 1998b**). Ainsi STOP se fixe de manière a priori irréversible sur les MT, au niveau des régions pauvres en radicaux tyrosines, de façon substœchiométrique, soit pendant l'assemblage ou sur un MT formé (**Slaughter, 2003**).

Enfin les protéines STOPS possèdent un comportement unique, se déplaçant latéralement sur le MT, grâce à un collet d'où part une extrémité capable de réagir avec d'autres éléments du cytosquelette. Ceci permet de verrouiller les extrémités du polymère de MT et de le rendre stable. Ce phénomène suggère que la protéine STOP pourrait être impliquée dans certains mécanismes de transport cellulaire (**Margolis, 1986a**).

#### **3.4.4. Souris déficientes pour STOP**

L'étude des souris KO pour STOP confirme que la stabilité des MT est très largement affectée, mais que cela n'a pas de conséquence majeure sur le développement ou la viabilité des animaux. A l'inverse, il existe de nombreux déficits de la fonction synaptique, qui se traduisent par des altérations de la plasticité synaptique à court et long terme (**Andrieux, 2002**). Cette plasticité met en jeu des remaniements morphologiques de la synapse et le trafic des vésicules synaptiques. Les MT sont donc des éléments importants de ces remaniements (**van Rossum, 1999**). L'absence de STOP dans ces conditions peut perturber le « turn-over » des vésicules en affectant la dynamique microtubulaire ou l'interaction avec les moteurs moléculaires.

Cela se traduit par des altérations du comportement, marquées par des périodes d'activités désordonnées, des épisodes d'agitation motrice, d'anxiété ou de prostration, un « retrait social » et un désinvestissement de la prise en charge des petits. La libération de DOPAMINE est anormalement élevée dans le noyau accumbens, après une stimulation électrique, alors que les mécanismes de recapture et d'auto-inhibition ne sont pas modifiés (**Brun, 2005**). Ces anomalies sont réversibles lorsqu'un traitement neuroleptique au long cours est introduit. De façon intéressante STOP est située sur une région chromosomique qui a été reliée aux psychoses (**St Clair, 1990 ; Gurling, 2001**), mais aussi à une forme particulière de CMT (4B), caractérisée par une neuropathie sensitivo-motrice, démyélinisante, de transmission autosomique récessive (**Bolino, 2000**).

#### **3.4.5. STOP et NFs**

La rétention des FI neuronaux observée dans le corps cellulaire des souris NFHLacZ s'accompagne d'une augmentation considérable de la densité microtubulaire axonale (d'un facteur 10)

sans altération de distribution de plusieurs des MAPs (**Riederer, 2002**). Au sein de l'équipe, nous avons déterminé que la protéine STOP est majoritairement co-purifiée avec les NFs, et ceci de façon indépendante de l'état de polymérisation/dépolymérisation des MT. Par une méthode de « peptide-array », nous avons mis en évidence des sites de liaison aux NFs le long de la séquence de STOP. *In vivo*, nous avons montré, par des études d'immunofluorescence, que chez les souris NFHLacZ, la protéine STOP est présente en forte proportion dans les corps cellulaires, avec les NFs, mais que les axones en sont appauvris, à la différence des souris contrôles (**Bocquet, soumis**). L'ensemble de ces travaux montre que la protéine STOP, connue jusqu'à maintenant comme une protéine associée aux MT est aussi associée de manière forte aux NFs.

La protéine STOP est ainsi organisée en domaines multifonctionnels qui peuvent être impliqués à la fois dans la liaison de la tubuline, des NF, et de la calmoduline ou au contraire dans l'interaction avec un seul de ces partenaires.

## OBJECTIFS DU TRAVAIL

Le cytosquelette des neurones apparaît désorganisé dans de nombreuses maladies neurodégénératives et dans des neuropathies périphériques, héréditaires, métaboliques ou induites par des toxiques. Les perturbations impliquent souvent les Filaments Intermédiaires et plus particulièrement les Neurofilaments.

Les travaux conduits et présentés ici, avaient pour objectifs de mieux comprendre la physiologie, la biologie, la régulation de la synthèse et le métabolisme des Neurofilaments, pour une approche de leur rôle dans les pathologies humaines.

Le métabolisme des NFs est encore mal connu, bien que de nombreux travaux soient issus des nouvelles approches techniques. L'avènement des rapporteurs fluorescents a permis par exemple de disséquer le transport des NFs ; les études de cristallographies ont mis en évidence les domaines et sous domaines impliqués dans l'association des monomères entre eux ; les expériences de transgénèse ont montré que la perturbation de la stœchiométrie et/ou des mutations des NFs aboutissaient au déclenchement chez l'animal, de maladies, proches dans certains cas, de maladies neurodégénératives ou de neuropathies humaines. Il reste cependant de nombreuses zones d'ombre concernant entre autre les mécanismes impliqués dans le contrôle spatial et temporel de l'expression des NFs, le rôle précis des modifications post-transcriptionnelles ou leur implication réelle dans l'apparition de maladies chez l'homme, en raison notamment de leur forte propension à l'agrégation.

Afin de tenter d'appréhender plus profondément ces possibilités, nous avons entrepris une double approche :

### 1. **Pour l'utilisation d'une protéine de fusion NFHGFP :**

Au sein de l'équipe une lignée de souris transgéniques, souris NFHLacZ a été développée (Eyer, 1994). L'objectif, grâce au rapporteur LacZ codant pour l'enzyme  $\beta$ -galactosidase, était de suivre le métabolisme des NFs, depuis la synthèse jusqu'au transport à la jonction neuromusculaire. Or cette enzyme forme des homotétramères dont les liaisons sont stables et ne peuvent être dégradées, tout du moins *in vivo*. En conséquence les NFs se trouvent agrégés dans le corps cellulaire et exclus, presque entièrement, du compartiment axonal dont le calibre est réduit. Malgré ces anomalies importantes, les souris ont une durée de vie normale et ne présentent que quelques anomalies phénotypiques en fin de vie. Pour circonvenir ce problème de l'agrégation des NFs, nous avons donc, dans la même construction, remplacé la  $\beta$ -galactosidase par un rapporteur fluorescent, l'eGFP. Cette

nouvelle protéine de fusion, NFHGFP, a permis le développement de nouveaux modèles, cellulaires et animal (1<sup>er</sup> article). Après avoir démontré l'absence d'agrégation de NFs et l'absence d'anomalie d'expression phénotypique de ce modèle, nous avons pu commencer l'étude des mécanismes de régulations et de l'expression spatiale et temporelle de NFH, en nous intéressant à une séquence de 3kb du promoteur et aux séquences intragéniques non codantes des trois introns. Cette approche a été réalisée *in vitro* et par transgénèse animale chez la souris et la grenouille (*Xenopus laevis*) (2<sup>nd</sup> article).

## 2. **Pour l'étude des lésions neuropathologiques dans certaines maladies humaines :**

Cette seconde approche avait comme objectif de vérifier si certaines hypothèses émises et résultats obtenus, en culture de cellules et chez l'animal, pouvaient être transposés en pathologie humaine. Cette démarche a d'abord concerné la protéine STOP. Nous avons montré que cette protéine, initialement associée aux MT et impliquée dans leur stabilité (résistance à la dépolymérisation induite par le froid et les drogues), se trouvait aussi associée aux NFs, à la fois *in vitro* lors de leur isolement et purification, mais aussi *in vivo*, puisqu'elle se trouve accumulée dans les agrégats de NFs chez les souris NFHLacZ (**Bocquet, soumis**). Nous avons ensuite montré que les résultats d'études bioinformatiques, déduites d'EST sur l'existence d'isoformes humaines de STOP, étaient confirmés par l'analyse histologique et biochimique de tissus humains. Ensuite nous avons montré que, comme chez l'animal, STOP était associée aux NFs et pouvait être retrouvée dans des lésions neuropathologiques riches en NFs agrégés, propres à certaines maladies neurodégénératives (3<sup>ème</sup> article). Nous nous sommes ensuite intéressés aux accumulations pathologiques de NFs. Le cytosquelette est déterminant dans la mise en place, le développement et la régénération des axones et diverses neuropathies, héréditaires ou acquises, mettent en jeu des accumulations de NFs. Mais dans 20% des cas, notamment lorsqu'il s'agit de neuropathies primitivement axonales, aucune cause, malgré une recherche exhaustive, n'est retrouvée. Dans ce groupe de neuropathies nous avons étudié, par immunohistochimie, l'expression de marqueurs du cytosquelette, afin de tenter de comprendre le ou les mécanismes physiopathologiques impliqués, et de mettre en évidence un profil d'expression pouvant orienter vers une étiologie (4<sup>ème</sup> article).

## **RÉSULTATS**



## **MODÈLES D'ÉTUDES**

## 1<sup>er</sup> Article

### **Neurofilament high molecular weight -green fluorescent protein fusion is normally expressed and transported in axons: a neuronal marker to investigate the biology of neurofilaments**

#### **Résumé :**

L'extrémité C-terminale de la sous unité lourde des Neurofilaments (NFH) est constituée par une partie riche en domaines KSP, hautement phosphorylés, et par une région chargée négativement. De nombreuses observations suggèrent que ces domaines interviennent dans le transport axonal des Neurofilaments, dans le maintien et la détermination du calibre de l'axone et sont aussi impliqués dans l'agrégation anormale des NFs observée au cours de certaines maladies neurodégénératives ou de neuropathies induites par des toxiques. Précédemment au sein de l'équipe, avait été développée une lignée transgénique (NFHLacZ) chez laquelle les NFs sont retenus et agrégés dans le corps cellulaire des neurones avec peu de conséquences sur le phénotype des animaux. Afin de mieux comprendre le rôle de ces domaines, nous avons développé une protéine de fusion entre la GFP (Green Fluorescence Protein) et l'extrémité C-terminale de NFH, appelée NFHGFP. La protéine résultante conserve la tête, le domaine central de NFH. L'extrémité C-terminale est tronquée après le 46<sup>ème</sup> motif KSP amputant NFH de 5 KSP et du domaine chargé.

En culture de cellules et chez la souris, NFHGFP, dont l'expression est neurone spécifique, est capable de s'assembler avec le réseau endogène de Filaments Intermédiaire et d'être transportée jusqu'à la synapse. En culture de cellules, l'action de drogues perturbant le réseau de FI, ou chez les souris double transgénique NFHGFP/NFHLacZ, la protéine de fusion forme des agrégats intracellulaires. Enfin les caractéristiques biochimiques de NFHGFP sont proches des NFs endogènes.

Ainsi l'ensemble de ces données montre que la suppression du domaine chargé de NFH ne modifie pas les capacités de NFHGFP de s'assembler et d'être transportée, suggérant un autre rôle à cette partie de la protéine. De plus, ce modèle devient intéressant pour étudier *in vivo* et *in vitro* le métabolisme normal et pathologique des NFs

## NEUROFILAMENT HIGH MOLECULAR WEIGHT–GREEN FLUORESCENT PROTEIN FUSION IS NORMALLY EXPRESSED IN NEURONS AND TRANSPORTED IN AXONS: A NEURONAL MARKER TO INVESTIGATE THE BIOLOGY OF NEUROFILAMENTS

F. LETOURNEL,<sup>a,b</sup> A. BOCQUET,<sup>b</sup> R. PERROT,<sup>b</sup>  
A. DECHAUME,<sup>a</sup> F. GUINUT,<sup>a</sup> J. EYER<sup>b\*</sup>  
AND A. BARTHELAIX<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Biologie Cellulaire, Centre Hospitalier Universitaire, 4 rue Larrey, 49033 Angers, Cedex, France

<sup>b</sup>UPRES EA3143, INSERM, Laboratoire Neurobiologie and Transgenese, Batiment Montclair, Centre Hospitalier Universitaire, 4 rue Larrey, 49033 Angers, Cedex, France

**Abstract**—The carboxy-terminal side arm of the neurofilament high subunit consists of a highly phosphorylated domain and a negatively charged region. Multiple evidences suggested that these domains are essential for the axonal phosphorylation and transport of neurofilaments and play a role in their abnormal accumulation following chemical intoxication or during neurodegenerative disorders such as amyotrophic lateral sclerosis. In order to investigate the consequences of altering this side arm of neurofilament high subunit we used a fusion protein (neurofilament high subunit–green fluorescent protein) between the mouse neurofilament high subunit missing a major part of the C-terminal domain and the reporter green fluorescent protein. In cell culture and in transgenic mice this fusion protein co-assembles and co-distributes with the endogenous intermediate filament network. Conditions known to disturb the cytoskeleton were also found to alter the distribution of the fusion protein in cell cultures. In transgenic mice the expression of the transgene evaluated by its fluorescent properties was found to be restricted to neurons, where the neurofilament high subunit–green fluorescent protein fusion protein is axonally transported. Biochemical approaches showed that the fusion protein is phosphorylated and co-purified with neurofilaments. Despite the presence of such a neurofilament high subunit–green fluorescent protein fusion protein, the axonal cytoskeletal density and the axonal caliber were not altered. Together these data show that removal of this portion of neurofilament high subunit does not affect the capacity of neurofilament high subunit to assemble and to be transported into axons, suggesting that this sequence is involved in another function. Moreover, the fluorescent properties of this fusion protein represent a useful marker. © 2005 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Key words:** transgenic mice, cytoskeleton, axonal transport, microtubule, neurotoxic drugs, neurodegenerative diseases.

\*Corresponding author. Tel: +33-0-2-41-35-47-26; fax: +33-0-2-41-35-47-26.

E-mail address: eyer@univ-angers.fr (J. Eyer).

**Abbreviations:** GFP, green fluorescent protein; KSP, lysine–serine–proline; NF, neurofilament(s); NFH, neurofilament high molecular subunit; NFM, neurofilament middle molecular subunit.

0306-4522/06\$30.00+0.00 © 2005 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.neuroscience.2005.08.077

Neurofilaments (NF), the major intermediate filaments expressed in mature neurons, consist of three subunits of light, middle, and high molecular weight (respectively named NFL (70 kDa), NFM (150 kDa), and NFH (200 kDa)). These subunits co-assemble as heteropolymers through their central helical domain. While each subunit consists of a short amino-terminal domain and a highly conserved central domain, the carboxy-terminal domain of NFH and NFM is particularly long, heavily charged and strongly phosphorylated. For NFH proteins, as many as 51 KSP (lysine–serine–proline) repeats are located in the first part of the C-terminal domain, while the second part is formed by numerous charged amino acids (Lee and Cleveland, 1996). Such an organization is conserved throughout the animal kingdom.

NF are synthesized and assembled in cell bodies, and then transported in axons as polymerized filaments or as oligomers by the slow axonal transport. It is well established that NF phosphorylation increases along the axon in a proximal-to-distal manner. Recently, it has been shown in cell cultures that the transport of NF consists of fast movements interrupted by long pauses (Roy et al., 2000; Wang and Brown, 2001; Yabe et al., 2001). In axons, the carboxy-terminal domains of NFM and NFH form lateral projections capable to interact with other filaments as well as with other organelles (Hirokawa, 1982). These side arms are phosphorylated by several kinases (Pant et al., 2000). The phosphorylation level of these arms modulates both the length and strength of these cross-bridges, which consequently affects the rate of their axonal transport and the axonal caliber (Hoffman et al., 1984; Eyer and Leterrier, 1988; de Waegh et al., 1992; Ackerley et al., 2003).

In several human diseases abnormally phosphorylated NF accumulate in neurons (Toyoshima et al., 1989; De Jonghe et al., 2001). Mutations in the C-terminal part of NFH were found in amyotrophic lateral sclerosis cases (Al-Chalabi et al., 1999) suggesting that alterations of the C-terminal end of NFH participate in the initiation of these pathological processes. Transgenic models based on the expression of modified NFH have been produced, but they provided puzzling results. Over-expression of mouse NFH did not affect the survival of neurons (Marszalek et al., 1996), while a modest expression of human NFH provoked a late-onset motor neuron disease (Cote et al., 1993). In both situations abnormal perikaryal aggregations of NF were observed. Inactivation of the NFH gene also provided enigmatic results. While some studies showed that NF density

and axonal caliber were affected by the absence of NFH, no major change was found in another study (Elder et al., 1998; Zhu et al., 1998). Moreover, no changes in either axonal caliber or axonal transport were detected when the phosphorylated tail of NFH was removed (Rao et al., 1998, 2002). Finally, perikaryal aggregations of NF were also observed in transgenic mice expressing a fusion protein between mouse NFH and  $\beta$ -galactosidase (Eyer and Peterson, 1994). This latter effect could be due to the removal of the C-terminal domain of NFH, or to the addition of  $\beta$ -galactosidase known to form strong interactions (Zabin, 1982).

To further investigate the consequences of altering the C-terminal tail of NFH we generated a fusion protein (NFH–green fluorescent protein (GFP)) between the mouse NFH truncated in the C-terminal domain and the reporter GFP. When expressed in cell culture or in transgenic mice this fusion protein co-assembles and co-distributes with the endogenous intermediate filament network. Drugs known to alter the cytoskeleton were found to alter in a similar way the distribution of the fusion protein in cell cultures. In transgenic mice the transgene is expressed only in neurons. While this fusion protein is similar to the NFH–LacZ model (but the LacZ was replaced by GFP), we found that contrary to the NFH– $\beta$ -galactosidase fusion protein the NFH–GFP fusion protein is transported along axons where it is phosphorylated. Following classical biochemical approaches we observed that the fusion protein co-purifies with NF. Despite the presence of the NFH–GFP fusion protein, the axonal NF density and the axonal caliber were not modified. Moreover, when expressed together with the NFH– $\beta$ -galactosidase, the NFH–GFP fusion protein is sequestered into perikaryal aggregates with the endogenous NF cytoskeleton. These data indicate that replacement of the C-terminal end of NFH by GFP does not induce the precipitation of NF in cell bodies as observed for the NFH–LacZ model, indicating that the property of  $\beta$ -galactosidase to form strong interactions is the main cause of the perikaryal accumulation of NF in NFH–LacZ transgenic mice. Moreover, these results indicate that this portion of the NFH C-terminal end can be replaced with no detectable consequences on the endogenous cytoskeleton. Finally, the fluorescent property of this NFH–GFP fusion protein provides a useful paradigm to follow the biology of NF, and an interesting neuronal marker.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Production of the NFH–GFP construct

The NFH gene was subcloned in pT7T3 plasmid (Eyer and Peterson, 1994). It was isolated using *KpnI* and *EcoRV* (Ozyme, France) and ligated into the pEGFP–N2 vector (Clontech distributed by Ozyme, France) previously digested with *KpnI* and *SmaI*. The in-frame junction between *NFH* and *GFP* genes was sequenced using “IRDye 800 Termination mixes” following the recommendations of the company (LI-COR, Cambridge, UK).

### Cell culture protocols and establishment of stable cell lines

NIH3T3 and PC12 cells were grown in DMEM media (Eurobio, France), containing 10% fetal calf serum (Biomedica, France), 1%

L-glutamine (Invitrogen, France), 1% antibiotic (Invitrogen). At 80% confluence, cells were transfected with the NFH–GFP construct, using Fugene reagent (Roche, France). The following day, cells were trypsinized, collected in two 100 mm dishes, and the selection with G418 (350  $\mu$ g/ml, Invitrogen) was started 24 h later. Clones were expanded and stored in liquid nitrogen. They were then analyzed for the presence of the NFH–GFP fusion protein by fluorescent microscopy, immunocytochemistry, and Western-blots.

### SDS-PAGE and Western-blots

At 80% confluence, cells were harvested in 500  $\mu$ l lysis buffer (Laemmli 2 $\times$ , urea 8M). Proteins were separated on a 7% SDS-PAGE, and Western-blots were processed as previously described (Letournel et al., 2003). Primary antibodies and dilutions employed were mouse anti-NFH (1:2000, clone N52, Sigma), mouse anti- $\beta$ -tubulin, (1:2000, clone 2-28-33, Sigma), and mouse anti-GFP (1:1000, clone JL-8, Ozyme), while secondary antibodies (goat anti-mouse IgG, Dako, France) were diluted 1:2000. The enhanced chemiluminescence detection system (ECL, Amersham Life Science, France) was used to detect immunoreactive polypeptides.

### Drug treatments and immunocytochemistry

At 80% confluence, cells were trypsinized and harvested on coverslips (10,000 cells per ml). They were treated during 4 h with colchicine, or acrylamide (2  $\mu$ M, Sigma). Control groups received no treatment. Coverslips were collected and cells were washed in PBST (PBS, 0.2% Triton X-100), and then fixed in PFA (4%). Unspecific sites were blocked for 1 h and then cells were incubated overnight with the primary antibody. The secondary antibody was incubated for 90 min. Slides were mounted using glycerol in PBS (90%), and examined by confocal microscopy (Olympus BX 60, with a Fluoview software). Primary or secondary antibodies were omitted as internal controls.

Primary antibodies were diluted in blocking buffer (PBS, newborn goat serum 10%, bovine serum albumin 3%) as follows: anti-NFH (1:500, Sigma), anti- $\beta$ -tubulin (1:500, Sigma), anti-vimentin (1:100, TEBU, France), anti-GFP (1:500, Ozyme), anti-GFAP (1:100, Dako) and anti-MOG (1:100, TEBU). Secondary antibodies for the fluorescence analysis were Alexa Fluor 568 goat anti-mouse, and Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit (Molecular Probes, France) diluted at 1:200.

### Transgenic mice

The NFH–GFP construct was linearized by *KpnI*, gel purified using the QUIAEX II kit (Qiagen, France), and microinjected into male pronuclei of fertilized FVB oocytes as previously described (Eyer and Peterson, 1994). Genomic DNA was extracted from tail biopsies from 1 month old pups and analyzed for the presence of GFP by PCR (GFPfwd: 5'-TGGTGAGCAAGGGCGAGGAG-3' and GFPprev: 5'-TTGTGGCTGTTGTAGTTGTA-3').

NFH–GFP transgenic mice were bred with NFH–LacZ transgenic mice. Double transgenic mice were selected for the presence of GFP as described above and for the presence of LacZ by dot-blots or PCR as described previously (Eyer and Peterson, 1994).

Tissues from one-month-old transgenic mice were processed as previously described (Eyer and Peterson, 1994). Whole tissues were examined with a Leica MacroFluo microscope (with IM500 software). Slides were examined using either a Leica DMR microscope (with IM500 software), or a confocal microscope (Olympus BX60 with Fluoview software). For electron microscopy and  $\beta$ -galactosidase analysis samples were processed as described previously in Eyer and Peterson (1994). Student test was used to compare the density of cytoskeletal components.

## NF and microtubule isolation

NF and microtubules were isolated as previously described (Eyer and Letierrier, 1988; Letournel et al., 2003). The amount of protein present in each fraction was evaluated using the BCA Protein assay (Pierce, France), and they were analyzed by Western-blot.

## RESULTS

### NFH–GFP fusion proteins co-assemble with the endogenous intermediate filaments in fibroblasts and PC12 cells (Fig. 1)

The NFH–GFP transgene includes 15 kb of the mouse NFH gene (from –3 kb of the start codon to the middle of exon 4) ligated in-frame to the GFP gene from pEGFP-N2 vector (Fig. 1A). When transfected in mouse fibroblasts (NIH3T3 cells) this transgene is expressed as revealed both by fluorescence analysis of the GFP reporter and by anti-NFH immunocytochemistry (Fig. 1B–D). These results indicate that despite the presence of genomic regulatory sequences of the mouse NFH gene the transgene is expressed in fibroblasts. Anti-vimentin immunocytochemistry combined to the GFP fluorescence indicates that the fusion protein is co-distributed with vimentin (Fig. 1E–G), as previously shown by Shea (1990). Finally, the NFH–GFP transgene is strongly expressed in PC12 cells, and the corresponding fusion protein is transported along neurites (Fig. 1H–J).

Western-blot analysis of crude extracts (Fig. 1K) from stably transfected (lanes 2 and 4) and non-transfected (lanes 3 and 5) fibroblasts (lanes 2 and 3) and PC12 cells (lanes 4 and 5) using an anti-GFP or an anti-NFH antibody (recognizing both phosphorylated and dephosphorylated epitopes), showed a band present only in transfected cells. Note that the NFH–GFP fusion protein present in fibroblast extracts migrates under the fusion protein found in transgenic mice (lane 1, see below description of NFH–GFP transgenic mice), but above the predicted molecular weight of the fusion protein (130 kDa) as deduced from theoretical calculation. When the same membrane was tested for tubulin (as an internal control), the same amount of proteins was found in both samples (Fig. 1K).

### The NFH–GFP fusion protein behaves as the endogenous NFH protein in transgenic mice (Figs. 2 and 3)

Analysis of transgenic mice expressing the NFH–GFP transgene shows that the expression of the transgene is limited to neurons. Examination of whole brain shows GFP expression of hemispheres as seen on the convexity (Fig. 2A) and the basal brain (Fig. 2B). The fluorescent signal of this fusion protein is stronger in the optic nerve (Fig. 2B, arrow), in the medulla (Fig. 2B, small arrow) and in sciatic nerve (Fig. 2C). No typical fluorescence was observed in non transgenic samples (left part of Fig. 2A, B and C, note the endogenous very low autofluorescence in non-transgenic samples). A typical localization of the fusion protein is observed in motoneurons (Fig. 2D) at higher magnification, with a prominent labeling in the initial cone of the axon

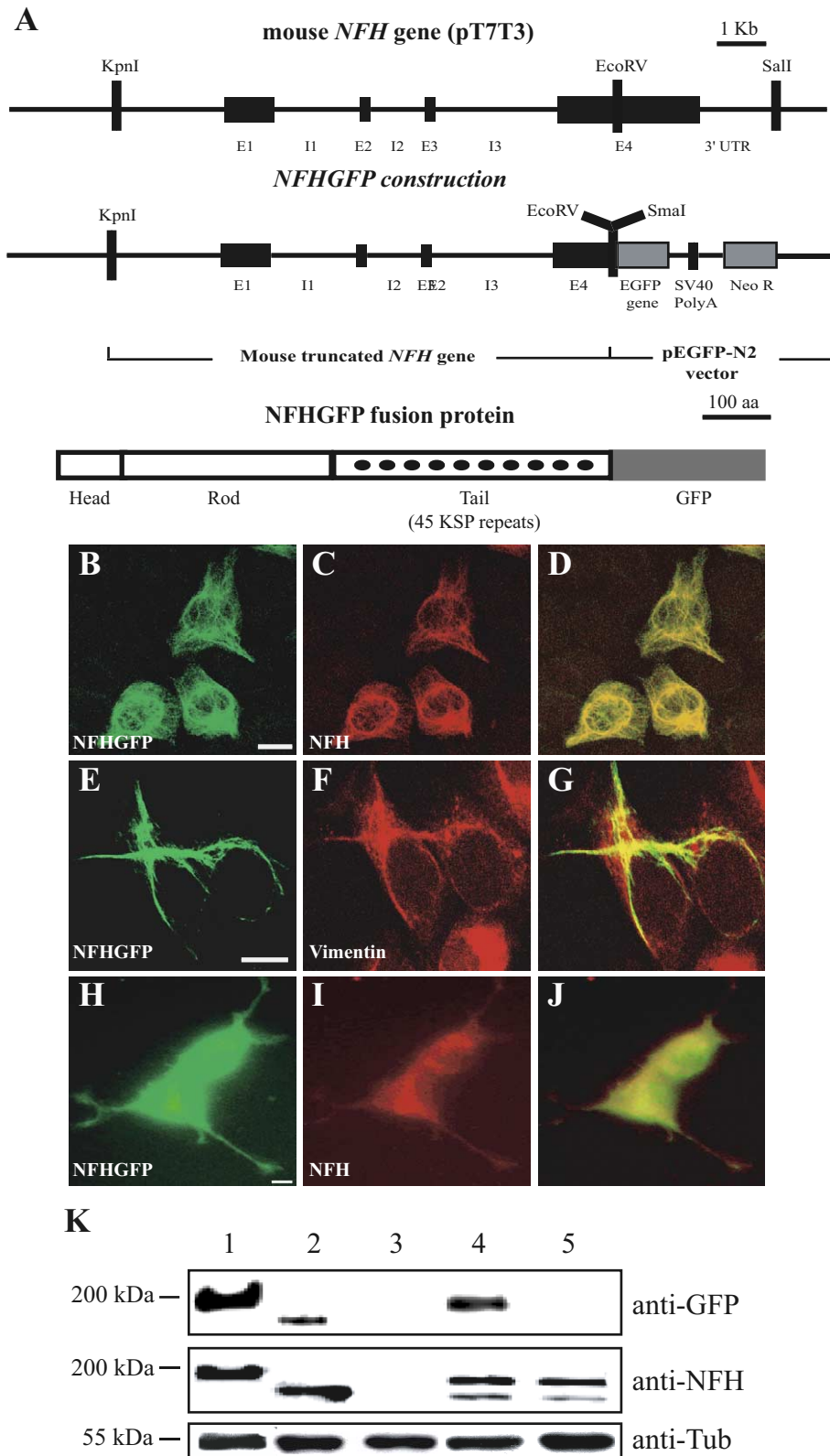
revealing the abundance of NF in this axonal compartment. In both gray and white matter of the spinal cord, axons are strongly fluorescent. Sections of sciatic nerves reveal such typical fluorescent axons (Fig. 2E and G), while their associated myelin sheaths, revealed by Nomarski phase contrast (Fig. 2F and G), are not labeled. Finally, the fusion protein is present in neuromuscular junctions and partly co-localizes with  $\alpha$ -bungarotoxin (Fig. 2H–J). No expression was detected in astrocytes and oligodendrocytes (Fig. 2K and L), nor in other tissues (liver, kidney, spleen, lung, Fig. 2M and 2N), where only the endogenous very light autofluorescence was observed.

A morphometric analysis of axons present in sciatic nerves from controls and NFH–GFP mice was performed. No obvious difference could be observed between control and transgenic samples (Fig. 3A and B). When the axonal size was measured, a typical axonal caliber distribution was observed in both genotypes (Fig. 3C), in accordance with their normal electrophysiological properties (not shown). At higher magnification, electron microscopical analysis of sciatic nerves shows that the myelin sheath is normal, as well as its thickness. The density of cytoskeletal structures was also evaluated (Fig. 3D and E). Both the density of NF ( $153 \pm 39$  NF/ $\mu\text{m}^2$  in wild type and  $174 \pm 52$  NF/ $\mu\text{m}^2$  in transgenic samples) and microtubules ( $23 \pm 19$  MT/ $\mu\text{m}^2$  in control and  $21 \pm 12$  MT/ $\mu\text{m}^2$  in transgenic sample) showed no obvious difference ( $t=0.89$ ). Finally, when analyzed by Western-blotting, no difference for the amount of NF or microtubules was detected between transgenic and control animals in both the brain, spinal cord, sciatic nerve and optic nerve (Fig. 3F). Together, these results show that NFH–GFP is expressed only in neurons and transported along axons down to the neuromuscular junction, with no obvious alteration of the endogenous cytoskeleton.

To evaluate the amount of the NFH–GFP fusion protein expressed in these mice, crude extracts of brain, spinal cord, sciatic nerve and optic nerve, from control and transgenic animals were analyzed by Western-blot (Fig. 3F). Using anti-GFP antibody, the fusion protein is detected only in transgenic animals while on the same membrane the endogenous NFH and tubulin epitopes are present in all extracts. Finally, during a typical NF purification (Fig. 3G), the NFH–GFP fusion protein is found predominantly in pellets together with the majority of NFH.

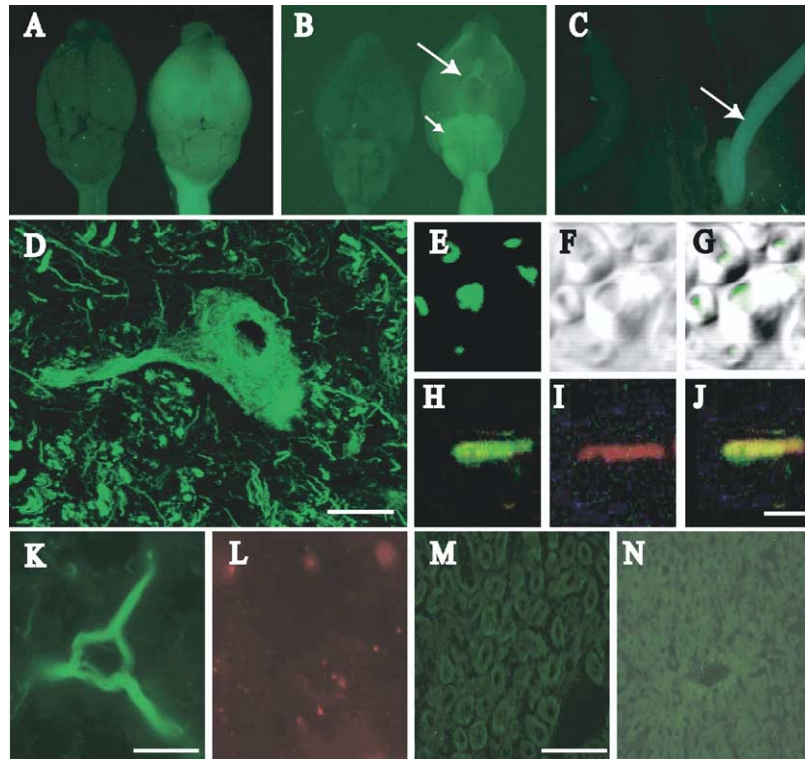
### The organization of NFH–GFP fusion proteins is altered following toxic treatments and is retained in the cell body when co-expressed with the NFH- $\beta$ -galactosidase fusion protein (Fig. 4)

Stably transfected fibroblasts were treated with acrylamide, known to disorganize intermediate filaments. As expected, acrylamide provokes the aggregation of vimentin filaments. The distribution of NFH–GFP fusion protein was also strongly affected by this treatment (Fig. 4A and B and overlay). The appearance of dot-like structures was increased under these conditions. This drug does not profoundly affect the microtubule cytoskeleton, even if the morphology of fibroblasts was altered (Fig. 4C and D and overlay). Colchicine induces depolymerization of microtu-



**Fig. 1.** NFH–GFP is functionally expressed and assembled into intermediate filaments like structures in cell cultures. (A) A *KpnI/EcoRV* long fragment of NFH was inserted in pEGFP-N2 vector (Clontech) previously cut with *KpnI/SmaI*. This transgene codes for an in-frame fusion protein between NFH and GFP, which contains the complete head and rod domain, 45 KSP repeats of the tail domain of NFH and the GFP reporter. The predicted molecular weight is 130 kDa. (B–J) The NFH–GFP fusion protein can be detected both by its fluorescence property (B, E and H) and with anti-NFH antibody





**Fig. 2.** NFH–GFP is functionally expressed in transgenic mice. Examination of whole brain shows strong fluorescence in cerebral hemispheres (A, magnification 6.8 $\times$ ) and in cerebellum of NFH–GFP transgenic animals (right) when compared with the endogenous very low autofluorescence in control non-transgenic animals (left). The GFP fluorescence is particularly strong in the optic nerves (B, arrow), in the medulla (small arrow, magnification: 6.8 $\times$ ), and in the sciatic nerve (C, arrow, magnification: 25 $\times$ ). The fluorescence associated to the fusion protein is observed only in neurons. Such a typical fluorescence is shown at higher magnification in a large motoneuron of the spinal cord (D) consistent with the abundance of NF in these cells. This fusion protein is efficiently transported along axons (E–G) up to the neuromuscular junctions (H: GFP fluorescence; I:  $\alpha$ -bungarotoxin-TRITC; J: overlap). No fluorescence is present in myelin sheaths or in the cytoplasm of Schwann cells (F: Nomarski contrast; G: overlap). No fluorescence (other than the endogenous auto-fluorescence) was observed in astrocytes (K, pyramidal neurons are fluorescent; L, anti-GFAP antibody) or in several organs like kidney (M) or liver (N). Scale bar=10  $\mu$ m.

bules, and consequently also affects intermediate filaments distribution (Fig. 4E–H and overlays). In this condition, both the NFH–GFP and vimentin distributions were profoundly modified (Fig. 4E, 4F and overlay), indicating that both the NFH–GFP and the intermediate filament network were affected by these drugs.

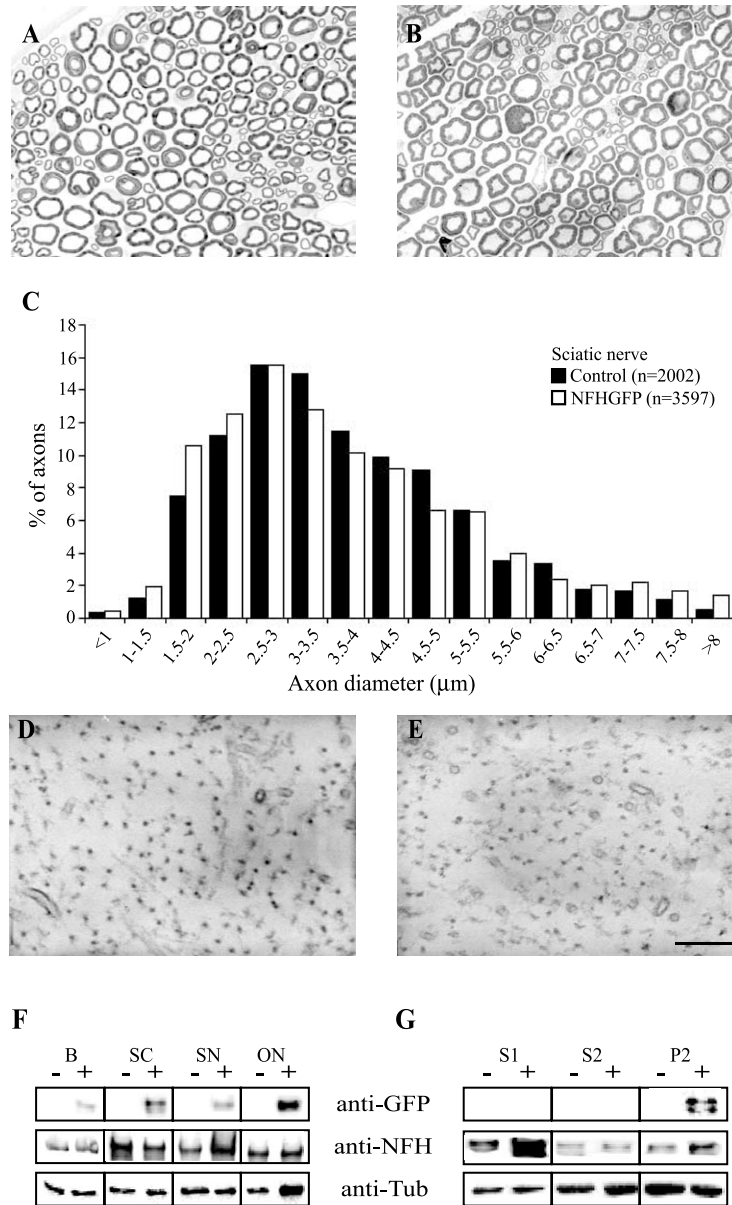
To further investigate the structure/function relationship of the C-terminal domain of NFH, NFH–GFP transgenic mice were bred with NFH–LacZ mice. The presence of  $\beta$ -galactosidase activity associated with the NFH– $\beta$ -galactosidase fusion protein is sequestered in perikaryal aggregates as observed in Purkinje cells and in motoneurons of the spinal cord (Fig. 4I and K). Interestingly, the NFH–GFP fusion protein is also sequestered mainly in these aggregates (Fig. 4J and L), indicating that alone NFH–GFP can be transported with the endogenous NF network, but in the presence of NFH– $\beta$ -galactosidase both

the intermediate filament network and the NFH–GFP fusion protein are retained in cell bodies.

## DISCUSSION

The fluorescent property of GFP provides a convenient strategy to dissect the dynamic of organelles in both cell culture and transgenic models, or to investigate the modalities of gene expression. Recently, such a strategy was used to analyze the axonal transport of NF in cell culture (Yabe et al., 1999, 2001; Roy et al., 2000; Wang et al., 2001), but such fusion proteins were not expressed in transgenic models. Here, we fused the GFP reporter at the C-terminal end of NFH following the same strategy as previously used for  $\beta$ -galactosidase (Eyer and Peterson, 1994). Interestingly, both in cell culture and in transgenic mice the replacement of the C-terminal end of NFH by the

(C and I; overlay; D and J) in mouse fibroblasts (B–G) and in PC12 (H–J). The distribution of the fusion protein can be superimposed to the endogenous vimentin (E–G). Scale bar=33  $\mu$ m (B–D and H–J) and 20  $\mu$ m (E–G). (K) Western-blot analysis of transfected (lanes 2 and 4) and non-transfected (lanes 3 and 5) mouse fibroblasts (lanes 2 and 3) and PC12 cells (lanes 4 and 5) reveals the presence of a band immunoreactive for GFP and NFH antibodies corresponding to the fusion protein only in transfected cells. When compared with the NFH–GFP fusion protein found in transgenic mice (lane 1), the fusion protein in PC12 cells migrates to a similar molecular weight.



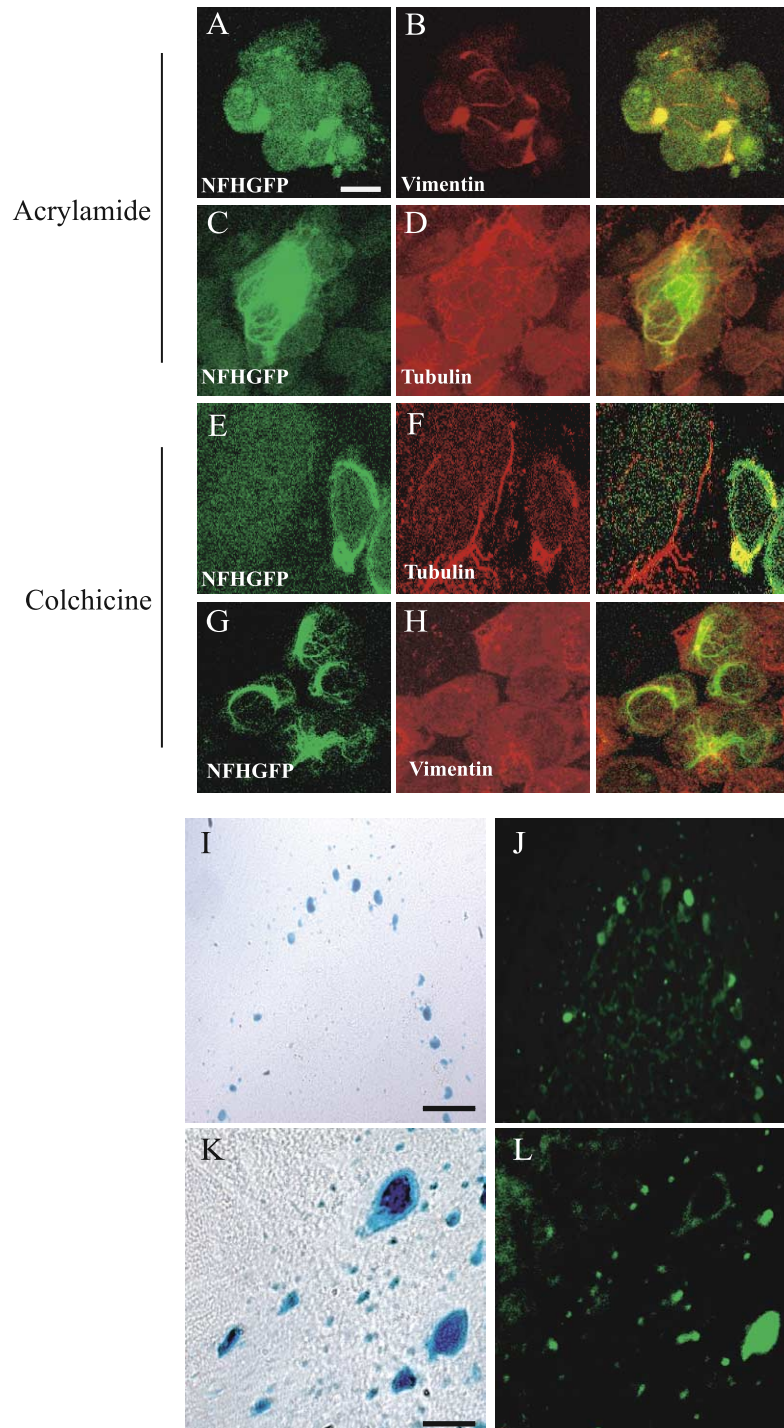
**Fig. 3.** The presence of the NFH–GFP fusion protein does not affect the morphometric properties of axons in transgenic mice. Cross-sections of sciatic nerves from control (A) and transgenic mice (B) were processed for Toluidine Blue staining, and no obvious cytological alteration could be detected in transgenic samples. Moreover, no obvious difference was observed for the distribution of the axonal diameter (C), and for the density of the axonal components (microtubules and NF) between normal (D) and transgenic nerves (E) as assessed by electron microscopical analysis (scale bar=100 nm). (F) Crude extracts from brains (B), spinal cords (SC), sciatic nerves (SN) and optic nerves (ON) from control (–) and transgenic mice (+) were analyzed by Western-blot for GFP, NFH and tubulin. GFP immunoreactivity is detected only in transgenic animals. The fusion protein migrates slightly under the molecular weight of the endogenous NFH and above NFH–GFP found in fibroblasts (cf. Fig. 2). (G) During a typical NF purification the NFH–GFP fusion protein is found mostly in pellets of transgenic animals (P2+) together with NF.

GFP reporter does not alter the normal assembly and the axonal transport of the fusion protein together with the endogenous intermediate filaments. Together, these results indicate that in the NFH–LacZ transgenic model the intermediate filament network was precipitated in cell bodies because of the presence of β-galactosidase and not because of the removal of the C-terminal end of NFH. Finally, as shown recently by Lobsiger et al., 2005, these data also indicate that the NFH carboxy-terminal tail is not essential for the normal biology of NF, but could be a major player in

a pathological situation, i.e. when a mutated form of the human SOD1 gene is expressed.

As previously described for vimentin or keratin, NFH–GFP forms “dots” in cell cultures that could represent non-filamentous intermediates or dynamic seeds necessary for the establishment of intermediate filament networks (Ho et al., 1998; Roy et al., 2000; Yabe et al., 2001). Moreover, Western blot analysis reveals a higher apparent molecular weight than the theoretical molecular weight suggesting post-translational modifications, like phosphor-





**Fig. 4.** The NFH-GFP fusion protein is redistributed *in situ* following toxic drug treatments, and is sequestered in cell bodies of NFH-GFP/NFH-LacZ double transgenic mice. (A–H) Stably transfected fibroblasts were treated with acrylamide (A–D) or colchicine (E–H) and the fluorescence associated to the NFH-GFP fusion protein (A, C, E, G), the vimentin network (detected by anti-vimentin in B and F), and the microtubule network (detected by anti-tubulin in D and H) were analyzed. In these cells acrylamide induces the aggregation of intermediate filaments (NFH-GFP and vimentin), but has no major consequence on microtubules. Colchicine depolymerizes microtubules, and also affects the intermediate filament network. Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ . (I–L) NFH-GFP transgenic mice were crossed with NFH-LacZ transgenic mice. As previously described for NFH-LacZ transgenic mice, NF together with  $\beta$ -galactosidase activity were sequestered in cell bodies, which can be typically observed in Purkinje cells (I) or motoneurons of the spinal cord (K). The fluorescence associated to the NFH-GFP fusion protein is also sequestered in these regions (J and L). Scale bars = 50  $\mu\text{m}$  (I–J), and 10  $\mu\text{m}$  (K–L).

ylation, on the NFH–GFP fusion protein. Interestingly, the molecular weight of the NFH–GFP fusion protein is lower in NIH3T3 cells than in PC12 cells or in transgenic mice. This may reflect an altered phosphorylated status of NFH–GFP in NIH3T3 cells in which NF kinases such as Cdk5 are missing (Pant et al., 2000).

Following toxic drug treatments of cells in culture, or in NFH–GFP/NFH–LacZ double transgenic animals, the NFH–GFP fusion protein is abnormally co-aggregated with the endogenous NF. Moreover, by morphometric examination of axons we were unable to detect obvious alterations in NFH–GFP transgenic samples, indicating that such a major modification (as replacing the last part of NFH by the GFP reporter) does not seem to affect the biology of the axonal cytoskeleton or the biology of neurons. Therefore, this NFH–GFP paradigm constitutes an interesting and convenient method to trace *in situ* and *in vivo* the normal or pathological metabolism of NF.

Surprisingly, despite the presence of genomic regulatory sequences of the mouse NFH gene this transgene is expressed in fibroblasts, while in transgenic mice the expression of the transgene is restricted to neurons. Similar results have been reported (Roy et al., 2000; Ackerley et al., 2003), indicating that fibroblasts are permissive cells for the expression of this neuronal gene. Therefore, differential investigation between the cellular and the transgenic models may provide a useful strategy to identify factors involved in the adequate neuronal regulation.

*Acknowledgments*—We thank L. Baron for technical assistance during sequencing analysis. We are also grateful to C. Audrain and R. Filmon (SCIAM, Service Commun d'Imagerie et d'Analyse Microscopique de l'Université d'Angers) for their technical assistance in microscope analysis, and to L. Denechaud, C. Domez and I. Viau for their helpful technical assistance in immunocytochemistry. We acknowledge Pr. C. Ferrier and Dr. H. Seegers for critical reading of the manuscript, and P. Chiron for assistance in the transgenic animal facility. This work was supported by grants from AFM (Association Française contre les Myopathies) and ARS (Association de Recherche sur la Sclérose Latérale Amyotrophique) to J. Eyer and F. Letournel.

## REFERENCES

- Ackerley S, Thornhill P, Grierson AJ, Brownlees J, Anderton BH, Leigh PN, Shaw CE, Miller CC (2003) Neurofilament heavy chain side arm phosphorylation regulates axonal transport of neurofilaments. *J Cell Biol* 161:489–495.
- Al-Chalabi A, Andersen PM, Nilsson P, Chioza B, Andersson JL, Rusc C, Shaw CE, Powell JF, Leigh PN (1999) Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 8:157–164.
- Cote F, Collard JF, Julien JP (1993) Progressive neuronopathy in transgenic mice expressing the human neurofilament heavy gene: a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell* 73:35–46.
- De Jonghe P, Mersivanova I, Nelis E, Del Favero J, Martin JJ, Van Broeckhoven C, Evgrafov O, Timmerman V (2001) Further evidence that neurofilament light chain gene mutations can cause Charcot-Marie-Tooth disease type 2E. *Ann Neurol* 49:245–249.
- de Waegh SM, Lee VM, Brady ST (1992) Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. *Cell* 68:451–463.
- Elder GA, Friedrich VL Jr, Kang C, Bosco P, Gourav A, Tu PH, Zhang B, Lee VM, Lazzarini RA (1998) Requirement of heavy neurofilament subunit in the development of axons with large calibers. *J Cell Biol* 143:195–205.
- Eyer J, Leterrier JF (1988) Influence of the phosphorylation state of neurofilament proteins on the interactions between purified filaments *in vitro*. *Biochem J* 252:655–660.
- Eyer J, Peterson A (1994) Neurofilament-deficient axons and perikaryal aggregates in viable transgenic mice expressing a neurofilament-beta-galactosidase fusion protein. *Neuron* 12:389–405.
- Hirokawa N (1982) Cross-linker system between neurofilaments, microtubules, and membranous organelles in frog axons revealed by the quick-freeze, deep-etching method. *J Cell Biol* 94:129–142.
- Ho CL, Martys JL, Mikhailov A, Gundersen GG, Liem RK (1998) Novel features of intermediate filament dynamics revealed by green fluorescent protein chimeras. *J Cell Sci* 111(Pt 13):1767–1778.
- Hoffman PN, Griffin JW, Price DL (1984) Control of axonal caliber by neurofilament transport. *J Cell Biol* 99:705–714.
- Lee MK, Cleveland DW (1996) Neuronal intermediate filaments. *Annu Rev Neurosci* 19:187–217.
- Letournel F, Bocquet A, Dubas F, Barthelax A, Eyer J (2003) Stable tubule only polypeptides (STOP) proteins co-aggregate with spherical neurofilaments in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:1211–1219.
- Lobsiger CS, Garcia ML, Ward CM, Cleveland DW (2005) Altered axonal architecture by removal of the heavily phosphorylated neurofilament tail domains strongly slows superoxide dismutase 1 mutant-mediated ALS. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:10351–10356.
- Marszalek JR, Williamson TL, Lee MK, Xu Z, Hoffman PN, Becher MW, Crawford TO, Cleveland DW (1996) Neurofilament subunit NF-H modulates axonal diameter by selectively slowing neurofilament transport. *J Cell Biol* 135:711–724.
- Pant HC, Veeranna, Grant P (2000) Regulation of axonal neurofilament phosphorylation. *Curr Top Cell Regul* 36:133–150.
- Rao MV, Garcia ML, Miyazaki Y, Gotow T, Yuan A, Mattina S, Ward CM, Calcutt NA, Uchiyama Y, Nixon RA, Cleveland DW (2002) Gene replacement in mice reveals that the heavily phosphorylated tail of neurofilament heavy subunit does not affect axonal caliber or the transit of cargoes in slow axonal transport. *J Cell Biol* 158:681–693.
- Rao MV, Houseweart MK, Williamson TL, Crawford TO, Folmer J, Cleveland DW (1998) Neurofilament-dependent radial growth of motor axons and axonal organization of neurofilaments does not require the neurofilament heavy subunit (NF-H) or its phosphorylation. *J Cell Biol* 143:171–181.
- Roy S, Coffee P, Smith G, Liem RK, Brady ST, Black MM (2000) Neurofilaments are transported rapidly but intermittently in axons: implications for slow axonal transport. *J Neurosci* 20:6849–6861.
- Shea TB (1990) Transient increase in vimentin in axonal cytoskeletons during differentiation in NB2a/d1 cells. *Brain Res* 521:338–342.
- Toyoshima I, Yamamoto A, Masamune O, Satake M (1989) Phosphorylation of neurofilament proteins and localization of axonal swellings in motor neuron disease. *J Neurol Sci* 89:269–277.
- Wang L, Brown A (2001) Rapid intermittent movement of axonal neurofilaments observed by fluorescence photobleaching. *Mol Biol Cell* 12:3257–3267.
- Yabe JT, Chylinski T, Wang FS, Pimenta A, Kattar SD, Linsley MD, Chan WK, Shea TB (2001) Neurofilaments consist of distinct populations that can be distinguished by C-terminal phosphorylation, bundling, and axonal transport rate in growing axonal neurites. *J Neurosci* 21:2195–2205.

Yabe JT, Pimenta A, Shea TB (1999) Kinesin-mediated transport of neurofilament protein oligomers in growing axons. *J Cell Sci* 112 (Pt 21):3799–3814.

Zabin I (1982) beta-Galactosidase alpha-complementation. A model of protein-protein interaction. *Mol Cell Biochem* 49:87–96.

Zhu Q, Lindenbaum M, Levavasseur F, Jacomy H, Julien JP (1998) Disruption of the NF-H gene increases axonal microtubule content and velocity of neurofilament transport: relief of axonopathy resulting from the toxin beta,beta'-iminodipropionitrile. *J Cell Biol* 143: 183–193.

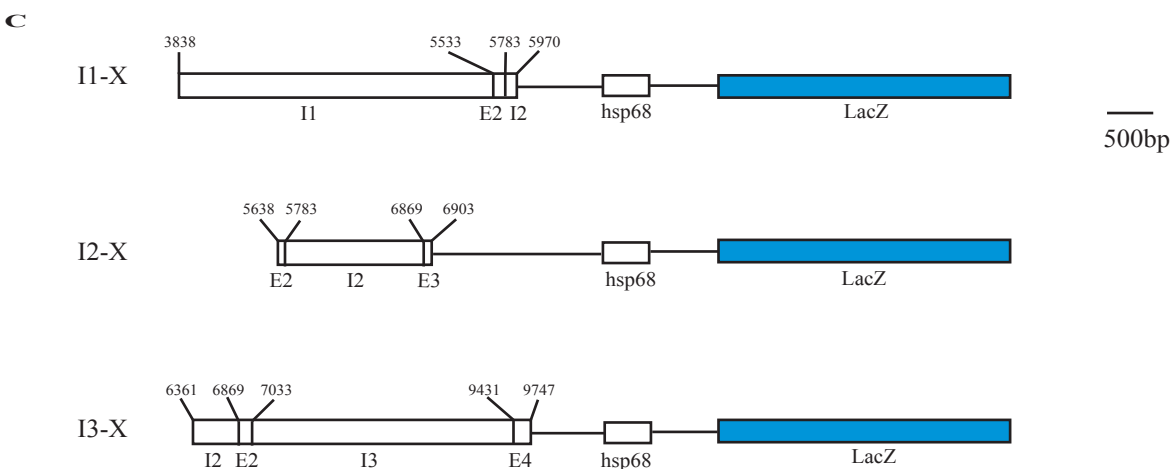
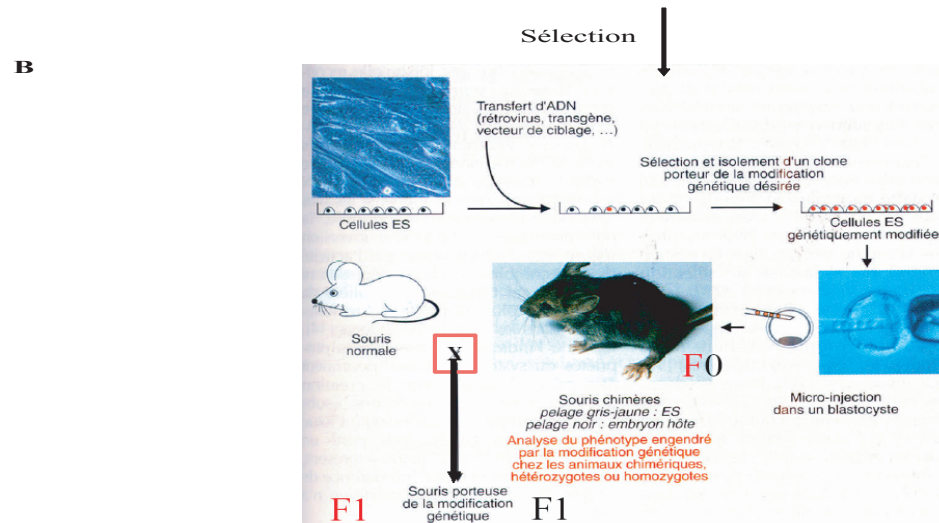
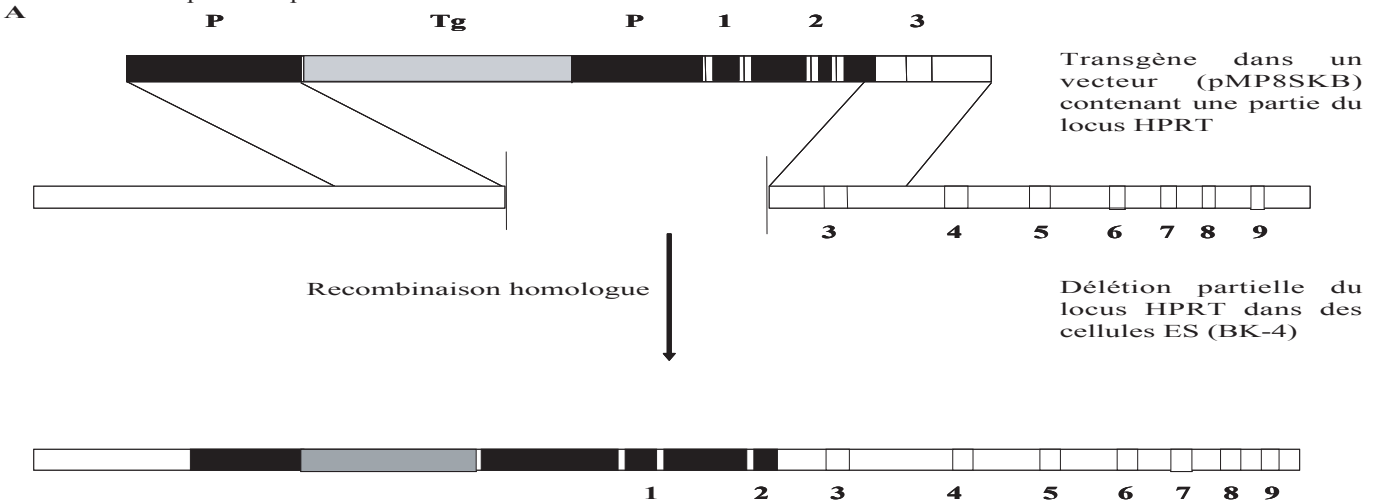
*(Accepted 26 August 2005)*  
*(Available online 11 November 2005)*

## Figure 17: Stratégie "HPRT"

A: Les cellules BK-4 présentent une délétion partielle du locus HPRT (Chromosome X). Un plasmide (pMP8SKB) possède les séquences manquantes (une partie du promoteur, les 2 premiers exons), un site de clonage dans le promoteur pour l'inclusion d'un transgène (Tg) et enfin les parties homologues (promoteur proximal exon 3, introns 2 et 3). Lors des phénomènes de recombinaisons homologues, le locus HPRT est reconstitué permettant aux clones ES de survivre dans un milieu de sélection HAT

B: Les clones survivants (rouges) peuvent alors être injectés dans des blastocystes afin d'obtenir une descendance FO, chimères. Celles-ci sont ensuite croisées pour établir une lignée de souris transgéniques (F1).

C: Les différentes constructions utilisant les introns de *NFH* sont représentées. Les chiffres représentent les limites des structures depuis l'ATG (I = Intron, E = Exon). Elles possèdent aussi le promoteur minimal hsp68 et le rapporteur LacZ. L'ensemble a été introduit dans le plasmide pPM8SKB.



## 2<sup>nd</sup> Article (en préparation)

### **Involvement of intronic sequences in the neuron-specific expression of the *NFH* gene.**

Implication des introns du gène *NFH* dans le contrôle de l'expression de la protéine.

#### **Avant propos :**

Cette partie du travail a été initiée lors de mon séjour dans le laboratoire du Pr GJ Snipes (Montreal Neurological Institute, Montréal), en collaboration avec le Pr AC Peterson (Royal Victoria Hospital, Montréal). Le point de départ en avait été les essais de réaliser, à partir des souris NFHLacZ, un modèle inductible d'expression de la protéine de fusion, par le système « Tétracycline ». Pour cela le promoteur endogène de *NFH* est remplacé par le promoteur minimal *TetO* capable de fixer l'élément de réponse de la tétracycline, TRE, en présence de cet antibiotique. L'analyse de trois lignées a montré que, parmi elles, deux présentaient une expression du rapporteur, identique aux souris NFHLacZ, impliquant la présence probable de séquence(s) de substitution dans les introns. Afin de s'affranchir des inconvénients de la transgénèse par microinjection, nous avons pris le parti d'utiliser un système utilisant les cellules ES, en ciblant le transgène dans un locus dit « permissif » : le locus *HPRT*. Ce système permet de contrôler le nombre de copies du transgène, est ciblé sur le chromosome X, et l'environnement chromosomique ne modifie pas l'expression d'un transgène incorporé. Toute la première étape a consisté en la réalisation de « constructions » associant un des trois introns de *NFH* avec un promoteur minimal (*hsp68*) et le rapporteur *LacZ*. Puis nous avons inséré chacune de ces trois constructions dans un plasmide contenant une partie du gène *HPRT* pour l'introduire dans des cellules ES déficientes, partiellement, pour cette enzyme, ceci afin de pouvoir sélectionner les cellules ayant reconstitué le locus. Les cellules ES pouvaient ensuite permettre la naissance de chimères avant d'obtenir des souris transgéniques (**Figure 17 et 18**). Plusieurs clones pour chaque « construction » ont pu être produits, et nous avons même obtenu une lignée de souris modifiée génétiquement avec le premier intron. Compte tenu cependant des difficultés d'utilisation de *LacZ*, de l'obtention de souris chimères..., nous avons décidé de recentrer cette étude en utilisant un rapporteur plus facile de manipulation (GFP), et utilisé des modèles cellulaires permettant d'obtenir des résultats plus rapides. L'objectif étant de les utiliser ensuite en transgénèse après l'isolement de séquence(s) potentiellement intéressante(s) *in vitro*. Ce sont ces résultats qui sont présentés dans ce manuscrit.

#### **Résumé :**

Plusieurs données expérimentales laissent penser que la perturbation du contrôle de régulation de certains gènes de protéines du cytosquelette, à l'exemple de *TAU*, participe à la survenue de maladies

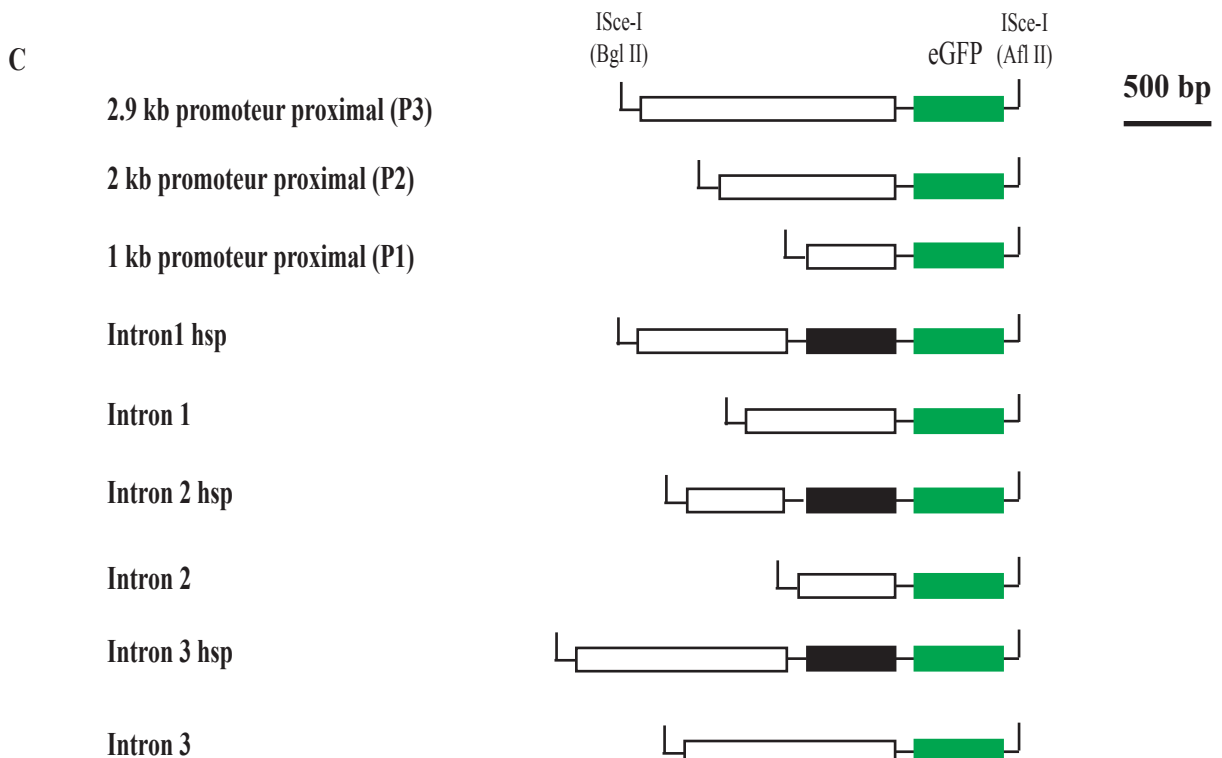
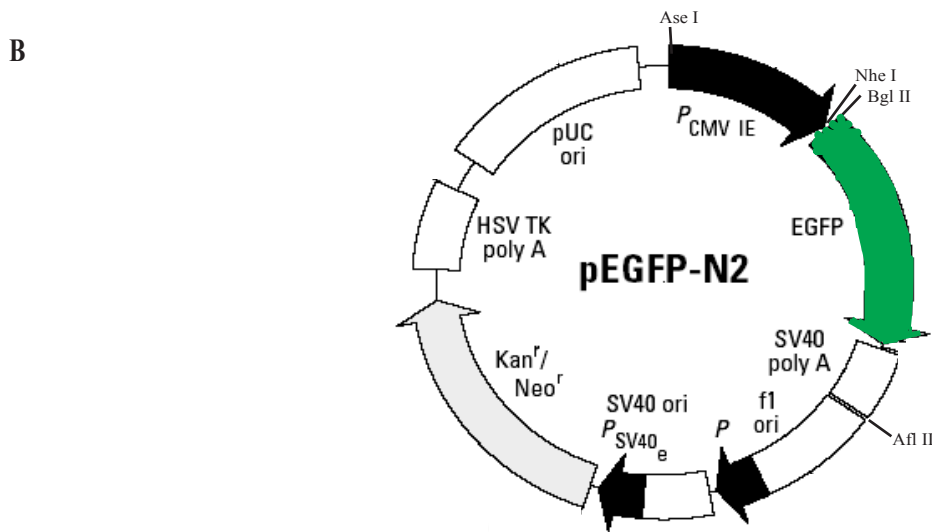
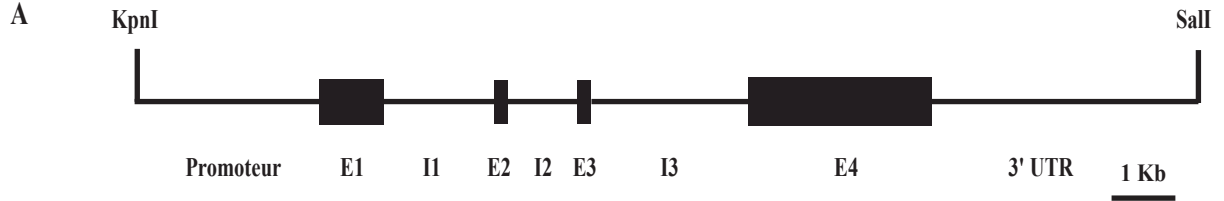
neurodégénératives. L'accumulation de Neurofilaments est suspectée jouer un rôle dans la physiopathologie de certaines maladies neurodégénératives, mais le contrôle de l'expression spatio-temporelle de ces filaments intermédiaires est un domaine encore mal connu. Des données préliminaires obtenues au laboratoire laissent penser que les introns du gène de la sous unité lourde des NFs (*NFH*) interviennent dans ce contrôle.

Nous avons isolé chacun des trois introns de *NFH* et cherché à étudier leur activité, à travers l'expression d'un rapporteur fluorescent (eGFP), en culture de cellules neuronales (PC12) et non neuronales (NIH3T3).

Les résultats obtenus nous permettent de confirmer qu'il existe des éléments régulateurs dans le promoteur de *NFH* : dans la région proximale de -1kb se situe un promoteur fort en rapport avec la présence d'une séquence palindromique. Dans les régions distales de -2 et -3kb existent des séquences inhibitrices, plus ou moins fortes en fonction du type cellulaire étudié. Le point principal est la présence d'un « enhancer », dans le second intron, conférant probablement une expression tissu spécifique de *NFH*.

## Figure 18 : Représentation schématique du gène *NFH* et des constructions utilisant ses introns

Le gène *NFH* isolé (par les enzymes KpnI et Sall) comporte trois introns (I1 à I3; A), quatre exons (E1 à E4), 2.9 kb du promoteur proximal et 3.9 kb de la région 3'UTR. Le plasmide pEGFP-N2 (Clontech) exprimant le rapporteur fluorescent eGFP (boîte verte) a été modifié comme suit: le promoteur pCMV a été retiré par les enzymes Ase I et Nhe I, puis les sites de la méganucléase ISce-I introduit en Bgl II et Afl II (B). Le plasmide ainsi créé a été utilisé pour introduire 2.9 kb du promoteur et différentes délétions (2 et 1 kb) ainsi que les différents introns de *NFH* associé ou non au promoteur minimal "hsp" (boîte noire) (C).



## Introduction

De nombreux arguments d'ordre histologique ou provenant de modèles animaux et cellulaire viennent étayer un rôle potentiel des différents filaments intermédiaires (FI) neuronaux dans la dégénérescence observée dans les principales maladies neurodégénératives et notamment dans la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA). Bien que de nombreux travaux aient été conduits pour chacun d'entre eux, aucun résultat vraiment probant ne permet d'expliquer à ce jour l'accumulation pathologique des Neurofilaments observée dans les motoneurones au cours de la SLA. Peu de travaux ont concerné des anomalies possibles de régulation des gènes de ces Neurofilaments, susceptibles d'engendrer les perturbations rencontrées. De même aucune preuve ne vient vraiment étayer les arguments conférant à ces accumulations un rôle délétère ou au contraire un rôle protecteur. Le niveau d'expression et donc le contrôle de la régulation des différentes protéines constituant les filaments intermédiaires neuronaux est un phénomène qui semble crucial dans les atteintes des motoneurones, pouvant, soit favoriser la survenue d'une dégénérescence des motoneurones soit avoir une action protectrice en piégeant des protéines qui par ailleurs seraient toxiques pour la cellule. Décrypter les régions permettant le contrôle de l'expression spatiale et temporelle de ces protéines est donc un enjeu majeur pour comprendre de façon plus précise les mécanismes physiologiques impliqués et pour, peut être, mettre au point des outils thérapeutiques.

Le gène *NFH* est situé sur le chromosome 11 chez la souris et sur le 22 (22q22.2) chez l'homme. Il contient quatre exons séparés par trois introns (**Figure 18**). Compte tenu de leur apparition dans l'évolution, les gènes des NFs ont probablement des mécanismes de régulation communs ou tout du moins proches (cf. ci-dessus §2.8 ; **Shneidman, 1992**). Néanmoins ces mécanismes demeurent mal compris et un contrôle transcriptionnel et post-transcriptionnel a été observé pendant le développement et lors de la différenciation de cellules PC12 induite par le NGF (**Lindenbaum, 1988 ; Lieberburg, 1989 ; Ikenaka, 1990**). Les études portant sur la régulation de *NFH* ont essentiellement porté sur le promoteur. Ces études sont compliquées par le fait que les séquences situées en 5' dans les promoteurs donnent une faible expression des rapporteurs (**Hsu, 1995**). Par une approche de transgénèse utilisant le système Cre/LoxP, Hirasawa *et al* (**2001**) ont montré que 8.5 kb du promoteur reproduisait *in vivo* l'expression spatiale et temporelle de *NFH* endogène. L'apparition de son expression se fait à partir de E18.5, donc au dernier stade de développement du système nerveux. Cependant dans ce modèle, l'analyse n'a porté que jusqu'à la première semaine de développement post-natal. Le fonctionnement des promoteurs de *NFL*, *NFM* et *NFH* semble effectivement proche. Chacun possède des éléments multiples « négatifs » diminuant voire inhibant la transcription de gènes rapporteurs transfectés en culture de cellules, neuronales et non neuronales. La présence d'éléments proximaux « positifs » est rapportée pour ces promoteurs notamment la présence d'une séquence palindromique nécessaire à l'activité du promoteur (**Roosa, 2000**). Finalement d'autres éléments sont nécessaires à l'expression tissu-spécifique des NFs, éléments très probablement situés dans les séquences intragéniques non codantes, comme cela a été montré pour





d'autres FIs, la Nestine ou la Périphérine (Lothian, 1997 ; Lecomte, 1999 ; Uveges, 2002). Dans le cas de *NFL* les études *in vitro* montrent que le premier Intron gouverne une forte expression (Hsu, 1995). Ces résultats sont corroborés par les études de transgénèse chez l'animal, à la fois le Xenope et la souris (Beaudet, 1992 ; Charron, 1995 ; Hsu, 1995). Dans cette séquence sont présents des sites « hypersensitifs » indicateurs de régions chromatinienne « ouvertes » dues à la fixation de facteurs de transcription (Yazdanbakhsh, 1993). Le point intéressant est que cet intron 1 est incapable d'induire l'expression d'un rapporteur lorsqu'il est placé en position 3', même en association avec le promoteur (Hsu, 1995). Il ne s'agit donc pas d'un enhancer classique, d'autant qu'il fonctionne de façon promoteur indépendant, induisant le même niveau d'expression du rapporteur lorsqu'il est associé à un promoteur hétérologue (Monteiro, 1990). Une région de 350 bp semble jouer un rôle important dans la complexité de l'expression des NFs mais sans que l'on puisse dire s'il s'agit d'une fonction par la fixation de facteurs de transcription neurones-spécifiques (qui restent à déterminer) ou par des séquences d'ADN modifiant la structure de la chromatine (Hsu, 1995). Néanmoins il ne peut s'agir que d'un épiphénomène car les introns sont capables de faciliter l'expression de gène en transgénèse (Brinster, 1998). D'autre part la présence de séquences palindromiques autour de la « TATA box » apparaît être un élément déterminant de la transcription (Desmarais, 1992 ; Shneidman, 1992, Schwartz, 1994).

Le travail proposé a pour objectif d'appréhender la ou les fonctions des séquences non codantes du gène murin de *NFH* et de voir si une perturbation au niveau de ces séquences peut entraîner une dérégulation de l'expression de *NFH*. L'appréhension du rôle de ces séquences est menée dans des modèles *in vitro* de culture de cellules (neuronales et non neuronales) et par transgénèse chez la souris et l'amphibien (*Xenopus laevis*).

## Matériel et méthodes

### Constructions (Figure 18) :

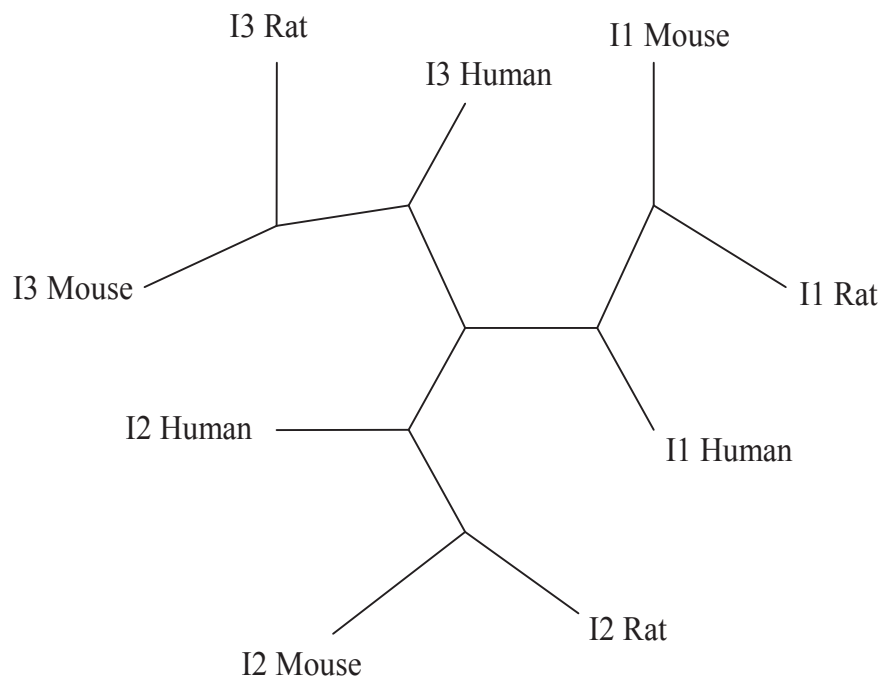
Le gène *NFH* que nous avons utilisé (Eyer, 1994) possède 2.9 kb du promoteur proximal, les quatre exons, les trois introns et 3.9 kb de la région 3'UTR. Chaque intron a été isolé et introduit dans le plasmide pEGFP-N2 (BDSciences, France) exprimant la protéine fluorescente eGFP. Au préalable le promoteur pCMV a été retiré par action des enzymes Ase I et Nhe I, et des séquences pour la méganucléase Isce-I introduites dans les sites des enzymes de restriction Bgl II et Afl II. Entre le rapporteur et l'intron a été introduit ou non le promoteur minimal de *hsp68* (Forghani, 2001). Chaque construction a été vérifiée par séquençage (MWG-Biotech, Ebersberg, Allemagne). De plus le promoteur et des fragments ont été également clonés dans ce plasmide.

Le premier intron a aussi été associé au promoteur minimal de *hsp68* et au rapporteur bactérien *LacZ* codant pour l'enzyme  $\beta$ -galactosidase (Figure 17). L'ensemble a été placé dans le plasmide pMP8SKB contenant des séquences homologues au locus *HPRT* afin d'obtenir des souris chimériques (Farhadi, 2003).

## Figure 20: Alignement des introns de *NFH*

L'arbre phylogénétique des introns de *NFH* de souris, de rat et d'homme est représenté et déduit de l'alignement des séquences effectué avec le logiciel ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) (A). Les identités de séquences (représentées par le pourcentage d'homologie) sont indiquées dans les tableaux (B). La divergence la plus importante est trouvée avec I2 (B).

A



B

	I1 Rat	I1 Human
I1 Mouse	72	48
I1 Rat	100	51

	I2 Rat	I2 Human
I2 Mouse	75	35
I2 Rat	100	35

	I3 Rat	I3 Human
I3 Mouse	61	42
I3 Rat	100	38

**Cultures de cellules :**

Les lignées cellulaires suivantes ont été utilisées : PC12, NIH3T3. Elles ont été cultivées dans du RPMI supplémenté avec de la L-Glutamine (1x, Biowhittaker, France), des acides aminés non essentiels (1x, Biowhittaker, France), des antibiotiques (Pénicilline-Streptomycine, 100U/ml ; Biowhittaker, France) et du sérum de veau fœtal (10% ; SVF, Biowhittaker, France).

**Expériences de transfection :**

A confluence les cellules ont été collectées avec de la Trypsine-EDTA (Biowhittaker, France) et réparties dans des plaques 24 puits à la densité de 10000-20000 cellules par puits sur des lamelles. 24 heures plus tard les cellules étaient transfectées avec les différentes constructions (**Figure 17**) en utilisant du FuGENE®6 Transfection Reagent (Roche, France) en suivant les recommandations du fournisseur. Pour les PC12 une partie des cellules était traitée par du NGF (150ng/ml, Promega, France) afin d'obtenir une différenciation (formation de neurites) et l'autre non.

**Immunocytochimie :**

48 heures après transfection les lamelles sont collectées et rincées au PBS. Les cellules sont ensuite fixées pendant 10 minutes avec du PFA 4%. Une immunocytochimie a ensuite été réalisée comme décrit précédemment (**Letournel, 2006**) en utilisant un anticorps anti-GFP (1/100<sup>ème</sup>, clone JL-8, BDScience, France). Les lamelles sont montées sur des lames et sont analysées avec un microscope à fluorescence (Leica, DMR, couplé au logiciel IM500).

**Western blots :**

A confluence les cellules transfectées sont reprises dans du milieu de culture, les protéines extraites et soumises à un SDS-PAGE selon le protocole déjà décrit (**Letournel, 2006**).

**FACS (Fluorescent Activated Cell Sorter) :**

A confluence les cellules sont collectées après décollement par la Trypsine-EDTA (Biowhittaker, France). Elles sont culottées (200g, 5min) et reprises dans 1.5ml de PBS avec 1% de SVF. 5000 cellules sont utilisées pour une analyse par cytométrie en flux.

**Extraction ADN et PCR :**

A confluence les cellules sont collectées après décollement par la Trypsine-EDTA (Biowhittaker, France). Elles sont culottées (300g, 5min) et reprises dans du tampon de Protéinase K (150µg/ml, 37°C). L'extraction d'ADN et la PCR sont effectuées selon la méthode précédemment décrite (**Letournel, 2006**).

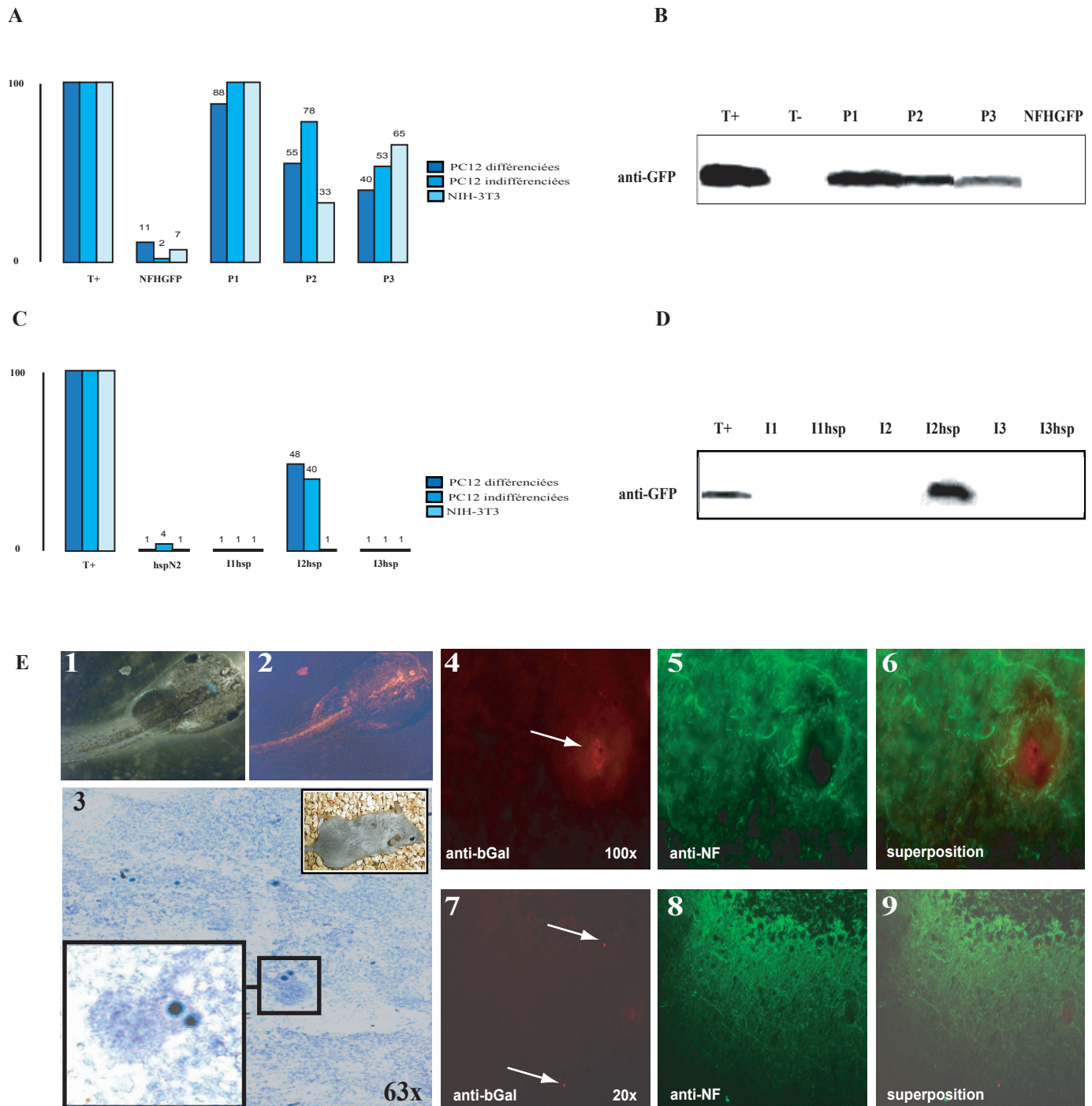
**Transgénèse chez le xénope (*Xenopus laevis*) :**

Elle a été développée par l'équipe Pr D Boujard (Equipe Canaux et Récepteurs Membranaires ; UMR 6026 CNRS, Université de Rennes 1) à partir d'une méthode décrite par Kroll et Amaya (**1996**). Brièvement le transgène inclus dans le plasmide (500 ng) est incubé 30 minutes avec la méganucléase ISce-I (**Pan, 2006**). Une partie de cette digestion, l'équivalent de 100ng de plasmide, est incubée avec les noyaux purifiés de spermatozoïdes (6100 noyaux environ) pendant 5 minutes puis dilué dans un « milieu d'injection » (**Offield, 2000**) avant d'être micro-injecté dans les ovocytes à un débit de 10 nl/sec (soit environ 2.5pg d'ADN/ovocyte). Les ovocytes sont ensuite examinés à la recherche de l'expression des rapporteurs.

## Figure 21 : Activités des séquences non codantes de *NFH*

Les différentes constructions (cf. Figure 19) ont été transfectées dans plusieurs types cellulaires, neuronal et non-neuronal. L'expression du rapporteur eGFP a été analysée par FACS. Les résultats sont montrés sous forme d'histogramme. Le plasmide pEGFP-N2 a servi de témoin positif et l'expression de GFP normalisée à 100. 5000 cellules ont été comptées. A: Transfection de la protéine de fusion NFHGFP et des fragments du promoteur endogène. B: Western-blot sur les mêmes cellules utilisant un anti-GFP. C: Transfection des introns de NFH couplés à hsp68. D: Western-blot sur les mêmes cellules utilisant un anti-GFP. Il existe une ou plusieurs séquences activatrices en proximal dans le promoteur et inhibitrices au delà de -1kb. L'intron 2 a probablement une activité de type "enhancer" neurone-spécifique.

E: une étude par transgénèse a été effectuée. Chez le xénope il a été nécessaire de mettre au point la technique à l'aide d'un plasmide test (pDsRed2-mito; 1 et 2). Chez la souris transgénétique HPRT (encart) une faible expression du rapporteur LacZ sous le contrôle de l'intron 1 et d'une partie de I2 (150bp de la région 3') est observée dans le système nerveux (3). Une immunohistochimie permet de localiser cette activité dans les neurones (cellules de Purkinje; 4, 5 et 6) ainsi que dans le neuropile (couche moléculaire du cervelet; 7, 8 et 9).



### **Obtention de souris chimériques :**

Les cellules embryonnaires (ES) BK-4 possédant le site de ciblage *HPRT* ont été mises en culture sur des fibroblastes embryonnaires (MEF) gamma-irradiés selon le protocole déjà publié (**Farhadi, 2003**). Brièvement ces cellules, déficientes pour l'enzyme HPRT, ont été électroporées avec le plasmide pMP8SKB contenant le premier Intron de *NFH*. Les clones résistants au milieu HAT (Hypoxanthine, Aminoptérine, Thymidine) ont été recueillis 14 à 21 jours après pour expansion. Ces clones ont ensuite été microinjectés dans des blastocystes de la lignée de souris C57/Bl6, transplantés ensuite dans l'utérus de femelles pseudo-gestantes. Les chimères « aguti » ainsi obtenues étaient génotypées par PCR et mises en reproduction (**Eyer, 1994**).

### **Coloration au Xgal et immunohistochimie :**

Différents tissus (cerveau, moelle épinière, foie...) étaient collectés à différents âges selon le protocole déjà décrit (**Letournel, 2006**). Des coupes de tissus congelés de 7µm étaient réalisées, séchées pendant 2 heures puis rincées dans du PBS. Elles étaient ensuite incubées pendant la nuit à 37°C dans une solution contenant 10mg/ml de Xgal. Les lames étaient ensuite rincées dans du PBS, montées et observées avec un microscope Leica DMR.

Des coupes de tissus congelés ont également été utilisées pour une étude en immunofluorescence avec des anticorps, incubés pendant la nuit, anti-β-Galactosidase (1/2000<sup>ème</sup>, Chemicon), anti-NFL (1/500<sup>ème</sup>, Sigma) et anti-GFAP (1/100<sup>ème</sup>, Chemicon). Les anticorps secondaires (Alexa 488 anti-souris et Alexa 568 anti-lapin, au 1/200<sup>ème</sup>) étaient déposés pendant 1h30 (**Letournel, 2006**). Enfin, les lames étaient montées et observées au microscope à fluorescence (Leica, DMR).

### **Alignement de séquence**

Les séquences des protéines NFH de différentes espèces (Souris, Rat et Homme) et des introns du gène *NFH* des même espèces ont été effectuées à l'aide du logiciel ClustalW<sup>®</sup> (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Les introns de *NFH* ont également été comparés entre eux et avec les introns de gènes de FI connus pour posséder des éléments régulateurs (Nestine et Périphérine en particulier). La recherche de sites potentiels de fixation de facteurs de transcription a été effectuée à l'aide des logiciels TFSearch<sup>®</sup> (Transcription Factor Search ; <http://molsun1.cbrc.aist.go.jp/research/db/TFSEARCH.html>) et TESS<sup>®</sup> (Transcription Element Search System ; <http://www.cbil.upenn.edu/tess/>).

### **Résultats et discussion**

L'alignement des séquences protéiques de NFH de rat, souris et d'homme confirme la forte identité (**pourcentage d'homologie de 80%**), notamment concernant l'extrémité C-terminale, incluant la position et le nombre des motifs KSP et la répartition des acides aminés chargés de la partie distale de la queue de NFH (**Figure 19**). L'étude bioinformatique des introns a par contre été moins informative (**Figure 20 ; Tableau 6, 7 et 8**). Elle permet néanmoins de confirmer que chaque intron apparaît proche sur l'arbre phylogénétique. Entre les rongeurs le pourcentage d'homologie entre les séquences introniques est important (>60%). Une divergence plus importante est observée avec

## Tableau 6 : Alignement des séquences des premiers introns

Les séquences des premiers introns (I1) de la sous unité lourde des Neurofilaments (NFH) de souris, de rat et d'homme (ces dernières ne sont pas représentées) ont été alignées. Les séquences présentant une homologie complète (100%) sont surlignées en rouge. Les séquences identiques dans uniquement deux introns sont représentées en bleu.

```

---GTGCGCGGAGCGCGGGGTGGGAAGGGGTCGCCCCCTCTGGCGGAGCAGTGAG---CAGCCCG-----GAGGACTCCTCTCAGAA-
-----CTAGCTAGAC---CCCTGCCAGGTGCATGCCACCTGACAAAGTAGGGTTTACCCAGACCCTCCCTTGGGGCGGCCCAACTCTGGATTTTCCTTTAGAAAA
AGGAAAACACCTCCACATTITTTATGTCTGTAAATAAACACCGGGCCAAACCCCTGTGCCCCACACTG-TTAGAC---CCCAGATTCAGACTGAFCTCCC---T
CTGAAATGGAGCAAGCCCCTCTG-----GACCAGCGTATCAGGTATCCAGCAGCC-----CTT-GCCATGCCAA-----CTCTGCCAC
CCTTTCTTGGCCACCC-TGCCCACTGGGTGCAACAGAGTATTC-CTI---CTACCAGGCTCGTCCCACTACTTGCTCAGTACATAACATCCGGAATTTTAGTAA
T-TGCTGTGTAAAAATGAAACCCATTCATTTTCAATCCGTTTCTAGCCAGTACGGAACCATCATGTGCCCTCATTCCTGT-----AAATGGC-----
TGTTAT---TAAATATCCCCTTCTCTTT-----CCCAA-----AATTTACAGGGTTCTGAGTCACTAGACTGCAGTTGCCCT
GAAACCTTACCCCTTAGCTGCAGGGTGACCTTGACCAACATGGCTTTCTCTCATTCTCATTCTTTTGGGATTC-----GGGCAAGAGTAACTGGGCTTCTTGT
---GTCAGCTGCAG-TCACTCTGTGTAGTCCCTCCCTGTAGTCACTATAAAACTGGAG-GCAAGTACAGAG-CATCTGC-GCTTTTCAAAGTCTCTGTGATCATAA
TAGCCAAGAATCCATA---CTTEAGTGCCTTTT-AAGCCTTTGCTAACAGCATGGAAAGCCAGGAAATGCTGGGATTGGA-----TGGTTGGAATTTCCCTTTTCATG
TTCTAGCCCTTTGGCGTGGCAGTCC-----CTTCCCCTCTCTGCAAGCAAGGCTCCTCCCAGAGGGGACCTCTTCTCTCTTTAGGTTTGGCCCTTCACC-AAACAG
AGCATCCAC-----GATATGTGTT---CCCAC-CAGCTGGCCTCTTCTTTCC-ACCCAGACTCA-GCTCTI-----GGATACAGGATGTTCACT
TTCTGGAGATTAAGACCATTCTT-ATTTCACCTGGC-CTGGACAAGA--TCTGAGAACCAGGTGCCAGTTGGTGGCAGAGACTCCACTG-----CTCTGG
GGCTGCTGTCTTA---AGGAGTCAAG-AGAGGAAGGGACAGAGC-CTGGGACAGGACGGGCTTCTACTCTCTATGACCTTGGACTCCGT-AGAAATCTGCAATG
AAGTTACCAATGGCTACATGTAAC-TGACCGCTGTI-----CTTCATACCTGG-GAAGTCAAGGAATATGAACTI---CCTTCCCAAGCCTGTATACCCAGCTCA
GAGTTAGGCCTCATG---CTAGCT-TGCCATCTGAACC-TCAGTGCAGTGTGCCAACCTTTGTTAAGGAACCTGCGCAGGCACTAGAAATCAACAATGGGGCTTCCCT
GTCTCCTGACTGGTTTA-TGGATC---AAGTTGAGGAGACACAGTCTG---TTTTCCTGA-----AGCCAGATAGACTCAA-
-----TTI-----
-----GAATCCTGCCACTCACTAGCAGTG-----TGGCTTTGACCAATAAC---TACTTA-ACT---CTCATAGGAAAGGGTGTATTA-AAATA
TC-CTAGCACCAGTAGGT-----CTTCAACCATGCATG-----CCACTTI-----
-----TCCTG---ATTGCAACCCAAGTTCATATGTGCTAACCCCTGTGTCTGATTCCTTCCCTACTTAG- : 1747

```

l'homme notamment en ce qui concerne le second intron. La comparaison des trois introns de *NFH* avec les séquences introniques d'autres FI n'a pas permis de mettre en évidence de courtes séquences homologues. Cela est en particulier vrai lorsque des séquences issues d'introns connus pour posséder des éléments régulateurs (intron 2 de la Nestine, intron 1 de la Périphérine) ont été testées. Enfin la recherche de motifs consensus de fixation de facteurs de transcription n'a pas non plus été déterminante dans la mise en évidence d'éléments régulateurs présents dans les introns de *NFH*. Ces résultats tendent à montrer que le fonctionnement des introns de *NFH* est différent de celui d'autres gènes de nFI en rapport avec un mode d'expression et de fonctionnement particulier aux NFs, spécifique dans le temps et dans l'espace.

L'utilisation de rapporteurs fluorescents peut alors permettre de répondre en culture de cellules à ces questions. L'utilisation de la protéine de fusion NFHGFP (Article 1) dans des fibroblastes et dans des PC12 montre que tous les éléments nécessaires à l'expression de cette protéine sont présents et situés dans le promoteur de 2.9kb et/ou dans les introns. Afin de poursuivre l'étude plusieurs constructions ont été établies (**Figure 18**). Le promoteur est connu pour posséder des séquences inhibitrices et activatrices (**Shneidman, 1992 ; Hirasawa2001**). Afin de confirmer ces résultats nous avons testé le promoteur dans son ensemble (P3), 2kb (P2) et 1kb (P1) en amont de l'ATG. Les résultats en FACS et Western blot montrent que quelque soit le type cellulaire le fragment P1 entraîne une forte expression du rapporteur *in vitro* témoin probablement de la présence de la séquence palindromique (**Figures 21A et B**). L'ajout de séquence en amont réduit l'expression du rapporteur témoin de la présence de séquences inhibitrices comme montré précédemment (**Figures 21A et B**). Par contre le comportement de ces séquences varie en fonction du type cellulaire puisque P2 a une action inhibitrice plus forte dans la lignée fibroblastique et P3 une action plus faible (**Figures 21A et B**). L'ensemble de ces données soulignent l'absence de promoteur intronique compte tenu de l'absence d'expression du rapporteur en absence d'un promoteur minimal *hsp68* (résultats non montrés). I2 possède probablement une activité de type « enhancer » tissu spécifique, résultats à rapprocher de ceux obtenus avec l'intron 2 de la Nestine (**Figures 21C et D**). Les résultats impliquent probablement que soit les introns ne fonctionnent pas seuls dans un système hétérologue (absence de facteurs de transcription spécifiques ?) soit qu'une association est nécessaire entre les introns ou avec le promoteur comme mis en évidence pour NFL et NFM (**Charron, 1995 ; Hsu, 1995 ; Roosa, 2000**).

Le xénope apparaît être un outil puissant dans l'analyse de gènes impliqués dans le développement. En effet il est accessible facilement à la transgénèse, son développement embryonnaire se déroule *ex-utero*, la maturation de son système nerveux est rapide (trois semaines) et ses téguments sont transparents. Cette dernière particularité est un atout pour l'utilisation de fluorochromes et ainsi suivre son développement sans avoir besoin de sacrifier les animaux. Afin de s'assurer de l'efficacité d'expression de promoteurs mammaliens nous avons d'abord testé un plasmide exprimant un rapporteur fluorescent sous le contrôle d'une séquence d'adressage à la sous unité VIII du cytochrome c-oxydase (pDsRed2-mito<sup>®</sup>, BD Science) de la chaîne respiratoire de la



## Tableau7 : Alignement des séquences des seconds introns

Les séquences des seconds introns (I2) de la sous unité lourde des Neurofilaments (NFH) de souris, de rat et d'homme (ces dernières ne sont pas représentées) ont été alignées. Les séquences présentant une homologie complète (100%) sont surlignées en rouge. Les séquences identiques dans uniquement deux introns sont représentées en bleu.

```

TGAGCAGAGGGGAGC-----GTGAC-----TGACTGACCTTC-----TTAGAGCAG---GACTCTGGCCT
CTG-AGTCAGACTTCACA---TCTGCTGTGTGTGACCT-GGAGAGTTCCTCTGCTTACCTGAACTAAAATTCCTCTCTGGAGTGAACTGGAAAGAAAACAGCATAA
ACCTCCGCTTTGCAGATCTGTGAAGATCTAAGAGAT-----TTAGAG-----TGCTCA-----
-----CAACCT-----TGGG-----GAC---AGAGCTCAG-----TGCTCG-----AGTGCATGA-
-----GGTC-----CTGGGCTCCG-----TCCTAGCATCTAA-----GA
AAGAATT---TAC-----TACTC-----AACTATAAATG---CTCAGCATTAATCTC-
-----GTTTAC-----AGTAGGCATTCT---AGTCACCAGTGTCTGTGGGTGTGGGCTGGG-----
-----AAGATTTCTTCTGTCA-----GTCTGGC-----GAGA---AAAGTC---TCACTTT---CA
AAAACA---GTCTGGC-----GAGC---AAAGTC---TCACTTT-----CCTAG-AA
CCTGATAAA-----CAAGTAAATGTGGAGACTA---CAGAGACACTGG-----CAGCCGG-AGAAACATTAAG---GAG---TA
AGTAAA-----GGCC---CT-ATGATGGT-----TCAC---TCTAA-
-----GGCA---GTGCTT---CCCAGCC-CTC---CTGACACTGCTGTCCTTGCATAC-AGCCCTCATGCTGTGGTG-----
---ACCC---AGTCAG---AAAA-----TTATTTTCAAT-----ACTATT-----
-----TCATAACC-----GCAATTTACT---AGTTATGA-----ATCACAAATGTA
A-----CTATT-TTTTGGAGAAA-GAGGT---TTC TT---AAACCCTGGG---AG-----AACTAC
TG---CTTTAAGCAGTGTCCAGGGAAGGAAAGTTCATCT-----GTATC-CAGTATGCTTCGG-----GTAGCCTCTGGCTTC---CAGCGAAT-
-----CAAATAGCA-----AGGTTG---ACA-CTTGCAG---GCACTTTTGGAAAGAACAGAA---AACAAAGTAACTAAG
ACTGCTCTTC---CCCCAGGTATCCCTGTGGAGTGTACCACCCCA---GCTAG---GTCT---CAACCCTTAAGC-----GAGCATTI
TCTAAG---ACATCTGTAATAAATTCACCCATCATCTC---ACTGAGTCACTG-----TCTGTTCTATTTTCATTCAGAACTTTCCTCAGGCTGAG
-----AGTTTGTCTCCAGACTTTTCCATGATTGTACAT---GCACATCGAAACTTTC-CAGGGTGGGGCTTTTCC--TCCAGCCAGC-TGGCTGAGC
-----AGGCTAGCAC-----CAGCTTACCTTGCCAAGTACTG---CTTGGC---ACATGACTCTCCTGATCTCTGATCTGTCCTCCAGG : 1135

```

mitochondrie. Par ailleurs, nous avons utilisé une technique mise au point par l'équipe du Pr. Boujard permettant d'augmenter le nombre d'animaux transgénique en utilisant une enzyme de restriction, la méganucléase Isce-I, activée lors des processus de recombinaison. Cette enzyme reconnaît une séquence de 18pb dont la fréquence de présence est estimée toutes les  $7 \times 10^{10}$  bp (**Thermes, 2002**). Elle n'a pas *a priori* de site dans le génome du xénope ( $3.1 \times 10^9$  bp) et elle n'agit que par digestion du plasmide, facilitant l'intégration du transgène (**Offield, 2000**). Nos résultats (**Figure 21E-1,2**) confirment l'efficacité de cette technique permettant d'obtenir au moins 50% des animaux se développant qui expriment de manière non mosaïque le transgène. De plus cela nous permet d'utiliser le plasmide pDsRed2-mito<sup>®</sup> à titre de contrôle interne lors de la transgénèse.

L'enzyme HPRT est codée par le chromosome X. L'utilisation de ce locus en transgénèse permet de cibler un transgène chez la souris dans un endroit précis de son génome et de contrôler le nombre de copie, avantages importants par rapport à la transgénèse « classique » par microinjection. D'autre part il s'agit d'un locus permissif n'ayant pas de retentissement sur l'expression du transgène (**Cvetkovic, 2000 ; Farhadi, 2003, Orfali, 2005**). Une souris transgénique comportant le premier intron et 150bp de la région 3' de l'intron 2 de *NFH* associé au rapporteur *LacZ* a ainsi été obtenue (**Figures 17 ; 21E-3**). L'analyse histologique montre la présence d'« amas » de  $\beta$ -galactosidase dans le cerveau. Aucune activité n'a été observée dans les tissus non neuronaux et chez les souris contrôles. L'utilisation d'un anticorps dirigé contre la  $\beta$ -galactosidase a permis de montrer que ce rapporteur était présent dans le cytoplasme de neurones (par exemple les cellules de Purkinje du cervelet **Figure 21E-4,5,6**) mais aussi dans le neuropile (couche moléculaire du cervelet, **Figure 21E-7,8,9**). Un tel aspect d'agrégat de la  $\beta$ -galactosidase a déjà été rapporté lorsque ce rapporteur était sous le contrôle d'un promoteur faible (**Peterson, données non publiées**).

## Conclusions et Perspectives

Les résultats obtenus suggèrent que les séquences régulatrices du gène *NFH* de souris ont un mode de fonctionnement comparable à celles des gènes des autres NFs, *NFM* et *NFL*. Le promoteur semble posséder des séquences activatrices proximales (dans la région de -1kb), en rapport avec une séquence palindromique, et inhibitrices (au delà de -1kb). Ces dernières apparaissent d'autant plus inhibitrices qu'elles se situent distalement. Cependant dans des lignées non neuronales leur comportement se modifie : la séquence de -1 à -2kb apparaît plus inhibitrice alors que de -2 à -3kb l'activité est moins forte que dans les PC12. Aucun promoteur intronique n'est observé. Seul l'intron 2 possède un ou plusieurs « enhanceurs ». En comparant les résultats *in vivo* et *in vitro*, la région 5' de I2 (d'environ 150bp) conserve la possibilité d'induire une expression faible d'un rapporteur ou bien a une action synergique avec II.

Afin de mieux appréhender les mécanismes de régulation du gène *NFH*, les expériences devront être complétées. *In vitro* sur des lignées cellulaires des constructions associant les introns

## Tableau 8 : Alignement des séquences des troisièmes introns

Les séquences des troisièmes introns (I3) de la sous unité lourde des Neurofilaments (NFH) de souris, de rat et d'homme (ces dernières n'ont pas été représentées) ont été alignées. Les séquences présentant une homologie complète (100%) sont surlignées en rouge. Les séquences identiques dans uniquement deux introns sont représentées en bleu.

```

GTAGATGACCAGGACG-TCAGGCAGGCTAGAAC-CCTGACCTCC-ATAAAGTACTAAGCCTTCAGTTTCA-CATCTGTGTTGCGGTGCG-TCCCTGCSTTTAGAA
ACAGAAGGCTTTTAG-----TTTTTATTTTGT- TTATTTTGTAAACAGATCTTA-----
-----CTAGATCA CAGAGAC-----CCACCTACCTCTGCA TCCCAAGTGTCTGGGATTAAGG-----
-TGTCTGTCA--TCACAATCTAGCTAAAG-----ACATCGACCAG-GGACACCT
CTG--TAGAGTCTCTCTCCTCCTACCTTTA-----CATGGGCTC--TGAGGTGGAATTCAGGCATTAAGGCCTGTGCAGCAAGCCTCTCTACTCA-----CCA
AGCCATCTTACCAGCCCAAAGT-----ATTTCAGTTGTGAGCCTTAACCCTTAAAGCTCAGCTGTCCCTCCATACTAAATTATAGTACAATATAITTTAATGATGT
ATGCTCAGCAGATGCTTCACTGGTAAAGGCACCTTCTATAAAGCCTGAGGGC---CCA-TGTTTGACAGCAGAA--TCTCC-----TGTAGACAGAGAAGCTT
TGATTCTGAAAGTTGTCATAAAGTCTGAGGGC---CCA-AGTTGGATCCAGACA---TCTAC-----CTAGAGCGAGAAGCTTTGATTCTGAAAGTTGTCCATA
ACCCTCCCTCCCACTGAGGCCTCCATGTACCCACAGCTGCGCACAGCACATGAATAAGAAAAAGTATTATAAAGTCTAATATCTTAAATGCG-----CCA
TTTTAAGAGTTTAA--AAGAACAT-GTC--TT--CGAGGCC--AGCCTG-CTCTTCA-----AAG
TGA-----GTTCCAGGAC--A--GC-CAGGCTTACACAGAGAA-----CCTGCTCTGAA-----ACCCCT
-----CCCCC-----TAAAAAAGTCAAG-TGATGTTGAA-----TTCAITTCGATATAIT
TTGT-----ATAACA-ACAC-----TCTCTCCCTCCATC-----
-----CAAAAT-----CATTGA-CTCAGGAGTGACTTCTATGCTTCTGACGCGCCCTTACA-
GTTTAAAGACCTTT--CTCTATCCCAAAGTCACTAGTCAGAGAGTTGCTTTGGAGG-AAAAGAGCCACTTACTGTCAGACACTATTACAGCCCCACCTCTATGGAG
TTTCTTAGCTTGCTTGGCTTCATTCTTTGAGAAGTAAA-TGGAGACAACAGAAACAATCCAAACCATGGTGGCTGGGAGCTCAGCCAGTCCTCTTACGAGG
T-GTCCAGCTGACACAGGTTCTGCTGG--TGCT-CACTG-----AATGTAGCCATGAGACGACCAAGTCCTCCAAAGATGAGAC-----ATCAGAGCCT
--AGCAGCATGACATCC--AGGCTCT-----TCTGCTGGTG-TCCTTGGCTTCCACCTCTG-CTCTGCTCT--AATCTGTACTCA-GTGTAGTACAG
T-----GATCCTAGAG--ATAGAAACAGGGCCCT-----GCCCCAGGG-TGTAGAT-----
-----TAAGATCTGTACTTTAACAGGATCC-----AGGATAATTC-----
-TAAGCTGTAAATTTGG-----AAGCCTGTTCTGGGGAGCCCTATGCAIT-----CCACTAAGG--AGCCACTCATCTCCGCCAAGCCCT
TAACACT-----CATTCCTTCACAGA-AGCAGCCCTCTGA-GGTAA--GGATGCTGGTATCAGCCTTTTACCA-----TGAA-GAATGAGGCTCTT--T
AGAGTCTGGGTAGCTTG-----AGGAGCTA--AGTGAAGGGGAATCCCAAAGAAATGGCTCCAAAAGGAGC-----CA
--TTAG--GAAAC--CCCTCAGCCTGAATG-----TGGGCTTC-TCATTCCCTTCAGCCATGGGAAGGGCTTACATTTTATCTGTTGGTGTG-----
-----CAGTC--CAGCTGTAGAGTTACATACAACTTCAGGAGTCATT-----CTCT-CTGT
CTCTC-AAAC-CAGAGACTCATACATACTGG--ACCAGCAATAT-GCCACCAGCTATAT--CCTGGACCCTC--AACTT--TCTCTGAAATAGGTTTTT
CTTTTGGGGGGTGGGA-----TTGTTTGAGACAGGCCTTCTCTGTAATAGTCTTGGCTC-----TC-CTGGAAGTTC-TTGTAGAACAGGCTGGCCTCGAACT
TACAGAGGTCATTTGTTTCTGCTCTCAACTGCTGA-ATTAAA-----GTCTCGTCCCAACATGCCCTGCTCT-----TGAATTAAG--TGTI--
AGTTGAGAGA-----CACGCACTGTAACTTTTGTAGTGTAGGCT-CITCTGTGAGGACCACTCTTT-----
--AGGGC-----GAAAGTTCCTCCCTTAAGCAGCA-----G
TG-----CAGC-CCCCATGA-----GGTCAAGCCTTTC--TAGCGGCCACCGG--AACAGTTCCGAAGTAACT--CTCAAAGT-CTTC
CTGCCAAGGCTGTGACTCA--GGGCAGGTAAT-TGTTAGCATAA--CTCCATCCCAGC--ACCAGAAAAATAAGTCAAGTTCAA-----AA-GT-----
-CTATTAGCAATGAAAATC-AAAAATCTGAAAAAAAGAGCAGT-----AGAGAAGCAAGTGGAGCGAGCAAGGGAGAGA-----GAGAG-ATTCC--TGCCA
T-TG-----AGTCATACCCTTCATTCACCAAACCC--TGTCCCTGCACTACTAGGCTTCAGAA-AGCCAAACAGGAGTCCA-----GCTCTGAGCTAA
CA---GTGTATCCCATATATCCACTCCACAG : 2435

```

et/ou avec le promoteur devront être testées. Afin d'affiner le rôle des introns une quantification plus précise, avec un rapporteur de type Luciférase, sera entreprise. Ces expériences seront couplées à des délétions/mutations pour permettre de cibler la ou les régions importantes pour l'expression de NFH et ainsi de chercher *in vitro* et *in-silico* des motifs de fixation de facteurs de transcription. Enfin lorsque la ou les régions seront mieux précisées, leur validation devra être confortée par des expériences de transgénèse.

## **LA PATHOLOGIE**

### 3<sup>ème</sup> Article

#### **Stable Tubule Only Polypeptide (STOP) proteins co-aggregate with Spheroids Neurofilaments in Amyotrophic Lateral Sclerosis**

##### **Résumé :**

Les neurones contiennent de grandes quantités de microtubules dits stables au froid. Cette propriété est nécessaire à la différenciation des neurones, à leur développement, notamment par la mise en place de l'axone et de la synapse, et au maintien de leur cytosquelette. Ceci confère aux neurones l'assurance d'un fonctionnement normal, quelque soit les conditions physiologiques. Cette propriété de résistance à la dépolymérisation des MT est notamment assurée par un groupe de protéines : les protéines STOPs (Stable Tubule Associated Proteins). Outre la perte d'une ou plusieurs catégories de neurones, voire de cellules gliales, les maladies neurodégénératives se définissent par des modifications profondes des éléments du cytosquelette, qui se trouvent le plus souvent agrégés dans un compartiment du neurone ou de la cellule gliale. C'est le cas de la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) qui se caractérise par la dégénérescence des motoneurones, responsable d'une paralysie motrice progressive et fatale, dont la ou les causes ne sont pas entièrement connues. Les sphéroïdes correspondent à une dilatation proximale de l'axone des motoneurones en dégénérescence et contiennent principalement des filaments intermédiaires, Neurofilaments et Périphérine. Il s'agit d'une lésion histologique fréquemment rencontrée dans cette maladie et, pour certains auteurs, dominante de l'affection.

Dans cette étude nous nous sommes attachés à déterminer la répartition et l'expression de STOP dans des tissus humains, provenant de sujets témoins et de patients atteints de SLA. Chez l'homme, des études précédentes, par analyse bioinformatique, avaient suggéré la présence d'une telle protéine. Nous avons montré, par immunohistochimie et Western Blot, que les différentes isoformes de cette protéine étaient effectivement présentes dans des tissus humains. Dans un second temps nous avons montré que STOP était systématiquement accumulée dans les sphéroïdes de patients SLA, associée aux NFs, alors que la tubuline ou d'autres MAPs (Kinésine ...) ne l'était pas toujours. Enfin aucune modification du poids moléculaire apparent de la protéine n'a été mise en évidence.

L'ensemble de ces données confirme que des isoformes humaines de STOP peuvent être détectées, et que cette protéine peut être impliquée dans la formation des sphéroïdes et dans la physiopathologie de la SLA, probablement en perturbant le fonctionnement synaptique.

## Stable Tubule Only Polypeptides (STOP) Proteins Co-Aggregate with Spheroid Neurofilaments in Amyotrophic Lateral Sclerosis

F. LETOURNEL, MD,\* A. BOCQUET,\* F. DUBAS, MD, A. BARTHELAIX, MD, PHD, AND J. EYER, PHD

**Abstract.** A major cytopathological hallmark of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is the presence of axonal spheroids containing abnormally accumulated neurofilaments. The mechanism of their formation, their contribution to the disease, and the possibility of other co-aggregated components are still enigmatic. Here we analyze the composition of such lesions with special reference to stable tubule only polypeptide (STOP), a protein responsible for microtubule cold stabilization. In normal human brain and spinal cord, the distribution of STOP proteins is uniform between the cytoplasm and neurites of neurons. However, all the neurofilament-rich spheroids present in the tissues of affected patients are intensely labeled with 3 different anti-STOP antibodies. Moreover, when neurofilaments and microtubules are isolated from spinal cord and brain, STOP proteins are systematically co-purified with neurofilaments. By SDS-PAGE analysis, no alteration of the migration profile of STOP proteins is observed in pathological samples. Other microtubular proteins, like tubulin or kinesin, are inconstantly present in spheroids, suggesting that a microtubule destabilizing process may be involved in the pathogenesis of ALS. These results indicate that the selective co-aggregation of neurofilament and STOP proteins represent a new cytopathological marker for spheroids.

**Key Words:** Amyotrophic lateral sclerosis; Microtubules; Neurofilaments; Spheroids; Stable tubule only polypeptides (STOP).

### INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an age-dependent neurodegenerative disease, starting in mid-adult life and leading to paralysis and death within 3 to 5 years. Pathologically, motor neurons are selectively affected and they present accumulations of neurofilaments in either their cell bodies or axons (spheroids). These aggregates represent a major hallmark also found in other human neurodegenerative diseases like Alzheimer and Parkinson diseases, as well as in toxin-induced neuropathies (1–4). Such lesions contain other proteins, like ubiquitin in “Skein-like” inclusions in ALS (5),  $\alpha$ -synuclein in Lewy bodies (6), or tau in neurofibrillary tangles (NFTs) (7).

Genetic investigations have identified a mutated gene encoding the cytosolic copper-zinc superoxide dismutase protein 1 (SOD1) in several ALS families (8). However, fundamental questions remain unanswered regarding the localization of this mutated protein, its toxicity to cellular organelles such as mitochondria, neurofilaments, or the Golgi apparatus, and why mutations in an ubiquitously expressed enzyme cause the selective death of motoneurons (9, 10). Compared to other neurons, motoneurons

are very large cells, and therefore require a highly specialized cytoskeletal network to maintain their function. Neurofilament mutations have been found in some sporadic forms of ALS (11), but the use of transgenic preparations, in which neurofilament organization and expression is altered, has provided contradictory results. For example, the expression of a mutated form of the light neurofilament subunit induced dramatic neurodegeneration (12), whereas massive perikaryal aggregations of neurofilaments due to the expression of a neurofilament- $\beta$ -galactosidase fusion protein did not alter motoneuron viability (13). Using this last model, it was shown that neither initiation nor progression of axonopathies induced by mutated forms of SOD1 or *dystonia muscularum* require the aggregation of axonal neurofilaments (14). While the disparity between humans and rodents limits a direct comparison, the use of transgenic models represents a powerful strategy to investigate the pathogenic mechanisms leading to these diseases.

Cytopathological markers that differentiate these lesions are crucial to understand their formation and their biological consequences. Therefore, it is fundamental to determine which molecules are abnormally sequestered in these inclusions. In such an effort, we have analyzed the distribution of stable tubule only polypeptide (STOP), a calmodulin-regulated molecule (15) shown to induce cold and drug stability both in vitro and in vivo (15–17). Three isoforms have been identified based on structure and tissue expression: an embryonic isoform (E-STOP), a fibroblastic isoform (F-STOP), and a neuronal isoform (N-STOP) (18–20). This third isoform is abundant in neurons containing significant amounts of stable microtubules and it associates preferentially with cold- and drug-stable microtubules (15, 19–21). Microinjection of

---

From Laboratoire Neurobiologie & Transgenèse (FL, AB, FD, AB, JE), Laboratoire de Biologie Cellulaire (FL, AB), and Département de Neurologie (FD), Université D’Angers, Angers, France.

Corresponding author: Dr. Joel Eyer, Laboratoire Neurobiologie & Transgenèse, UPRES EA 3143 CHU, 49033 Angers Cedex, France. E-mail: [eyer@univ-angers.fr](mailto:eyer@univ-angers.fr)

\*Both authors contributed equally to this work.

This work was supported by AFM (Association Française contre les Myopathies), ARC (Association de Recherche sur le Cancer), and ARS (Association de Recherche sur la Sclérose Latérale Amyotrophique) to J. Eyer.

TABLE  
Clinical Data from Controls and Pathological Cases

ALS Patients												
Case	Sex	Age at death	Age of beginning	Length of disease (months)	Beginning	Death	Cognitive functions	Spheroids	Anti-NF	Anti-STOP	Anti-Tub	Anti-Kinesin
1	F	61	60	12	Bulb	Pneumopathy	N	4	4	4	3	3
2	M	67	65	24	Bulb	PE	F	10	10	10	7	4
3	M	67	66	8	LMN	RF	N	5	5	5	4	3
4	F	67	63	48	LMN	Pneumopathy	N	—	—	—	—	—
5	F	52	51	12	Bulb	Pneumopathy	F	—	—	—	—	—
6	F	73	71	24	LMN	SDH	N	—	—	—	—	—
7	F	75	71	48	Bulb	GH	N	—	—	—	—	—
8	M	47	43	48	LMN	Pneumopathy	N	—	—	—	—	—
9	F	83	81	24	LMN	Pneumopathy	N	—	—	—	—	—
10	M	34	30	48	Bulb	RF	N	1	1	1	1	1
11	F	70	65	60	LMN	RF	N	4	4	4	4	2
12	M	53	51	24	LMN	Septic shock	N	3	3	3	3	3
13	F	51	48	36	LMN Bulb	RF	N	2	2	2	2	1

Controls				
Case	Sex	Age at death	Diagnosis	
1	M	62	Carcinoma	
2	F	60	Chronic neuropathy	
3	M	70	Chronic neuropathy	
4	M	40	Steinert's disease	
5	F	19	Reye syndrome	
6	M	64	Cavernous hemangioma	

Abbreviations: Bulb: Bulbar signs; LMN: Lower motor neuron signs; RF: Respiratory failure; PE: Pulmonary embolism; SDH: Sub dural hemorrhage; GH: Gastrointestinal hemorrhage; N: normal; F: Frontal signs.

STOP antibodies abolishes microtubule cold and drug stability of neurites in neuronal and NIH/3T3 cells (18, 19, 22).

In this study, STOP proteins are found to co-purify with neurofilaments and to associate with neurofilaments in the cold-stable fraction during a typical microtubule preparation. Moreover, we show that STOP proteins are systematically retained in neurofilament-labeled spheroids present in ALS, together with peripherin, another intermediate filament. However, Western blot analysis has shown no major modification of the migration profile of STOP proteins between pathological and control samples. Finally, as it has been previously shown, tubulin and kinesin epitopes are not systematically sequestered in spheroids with neurofilaments (23, 24). Taken together, these data show that the precipitation of STOP proteins together with neurofilaments is a new cytopathological hallmark of spheroids present in ALS. Such an abnormal distribution of neuronal STOP proteins, as well as the frequent lack of tubulin and kinesin in spheroids, suggests that microtubule stability is altered in these lesions, which could contribute to the pathogenesis of ALS.

## MATERIALS AND METHODS

### Human Tissues

Spinal cords and brains from autopsy cases (Neurology Department of the Hospital of Angers in agreement with our institutional committees, PHRC no. R2108) were fixed for 1 month in formalin 10% and then embedded in paraffin. Thirteen cases with a clinical ALS diagnosis were analyzed. Tissues from 1 Steinert's case, 2 chronic neuropathy cases, and 1 carcinomatous meningitis case were studied as controls. Tissues from 2 other controls (Table, cases 5 and 6) were used for biochemical investigations (microtubule and neurofilament isolation) and Western blot analysis. Spinal cord tissues from pathological cases were also frozen as described below for Western blot analysis, immunohistochemistry, and confocal microscopy. All these cases were characterized neuropathologically as indicated in the Table.

### Immunohistochemistry

Paraffin-embedded or frozen tissue (7- $\mu$ m-thick) sections from lumbar and cervical regions, brainstem, hippocampus, frontal, parietal, and temporal cortices were used alternatively for Luxol-hematein-phloxine staining and immunohistochemistry. After removal of paraffin, sections were incubated with



the diluted primary antibodies overnight at 4°C, then washed with phosphate buffer (PBS), and incubated with a biotinylated secondary antibody (1:100) for 1 hour. Localization of primary antibody was visualized by the avidin-peroxidase complex following manufacturer's recommendations (ABC kit, Dako, Trappes, France).

Frozen sections used for double immunofluorescence labeling were first incubated for 1 hour in the blocking buffer (PBS, newborn goat serum 10%, bovine serum albumin 3%). Primary and secondary antibodies were incubated sequentially for 90 min each, with 3 intervening PBS washes. Slides were mounted using glycerol in PBS (90%) and analyzed by confocal microscopy (Olympus BX 60, with Fluoview software).

Primary antibodies were diluted in blocking buffer as follows: anti-NFM (1:100, N5264, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), anti-peripherin (1:100, Polyclonal AB1530 from Chemicon, Montlucon, France), anti-STOP polyclonal 23C (1:100), anti-STOP polyclonal 23N (1:500), and anti-N-STOP monoclonal (1:1,000). STOP antibodies were kindly provided by Dr. D. Job (INSERM, CEA, Grenoble, France). Secondary antibodies for fluorescence were used at 1:200 each: Alexa Fluor 488 (goat anti-mouse) and Alexa Fluor 568 (goat anti-rabbit) (Molecular Probes, Montlucon, France).

#### Neurofilament and Microtubule Isolation

Neurofilaments were isolated according to the procedure described by Eyer and Letierrier (25), modified as follows. Spinal cord samples were homogenized in RB buffer (EGTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, MES 0.1 M, pH 6.8) (chemicals were from Sigma). Following centrifugation at 100,000 *g* for 1 hour at 4°C, the first pellet (P1) was discarded and 4 M glycerol was added to the supernatant (S1), which was incubated for 1 hour at 4°C to prevent microtubule assembly while allowing neurofilaments to form reticulated networks. This suspension was centrifuged at 100,000 *g* for 2 hours at 4°C to recover tubulin in the supernatant (S2) and neurofilaments in the pellet (P2).

Microtubules were isolated from brain. Tissues were homogenized in RB buffer then centrifuged at 100,000 *g* for 1 hour at 4°C to recover soluble proteins in the first supernatant. Four M glycerol and GTP (1 mM) were added to this supernatant and incubated for 1 hour at 37°C to allow microtubule polymerization. Microtubules were sedimented by centrifugation at 100,000 *g* for 1 hour at 37°C. Microtubules present in the resulting pellet (P2) were resuspended and incubated at 4°C to allow their depolymerization. Following centrifugation at 100,000 *g* for 1 hour at 4°C, the resulting supernatant (S3) contained free tubulin and the pellet (P3) contained cold-stable microtubules. All fractions were stored at -20°C prior to analysis. The amount of protein present in each fraction was measured using the BCA Protein assay (Pierce, Montlucon, France).

#### SDS-PAGE and Immunoblotting

Proteins (45 µg/well) were separated by SDS-PAGE and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Strasbourg, France). Membranes were washed with TBS (NaCl 0.9%, Tris 20 mM pH 7.5) and incubated overnight in the blocking solution (10% dry milk in TBS). After washing with TBS, membranes were incubated for 3 hours with the primary antibody diluted in TBS, BSA 3% w/v (Sigma), PVP

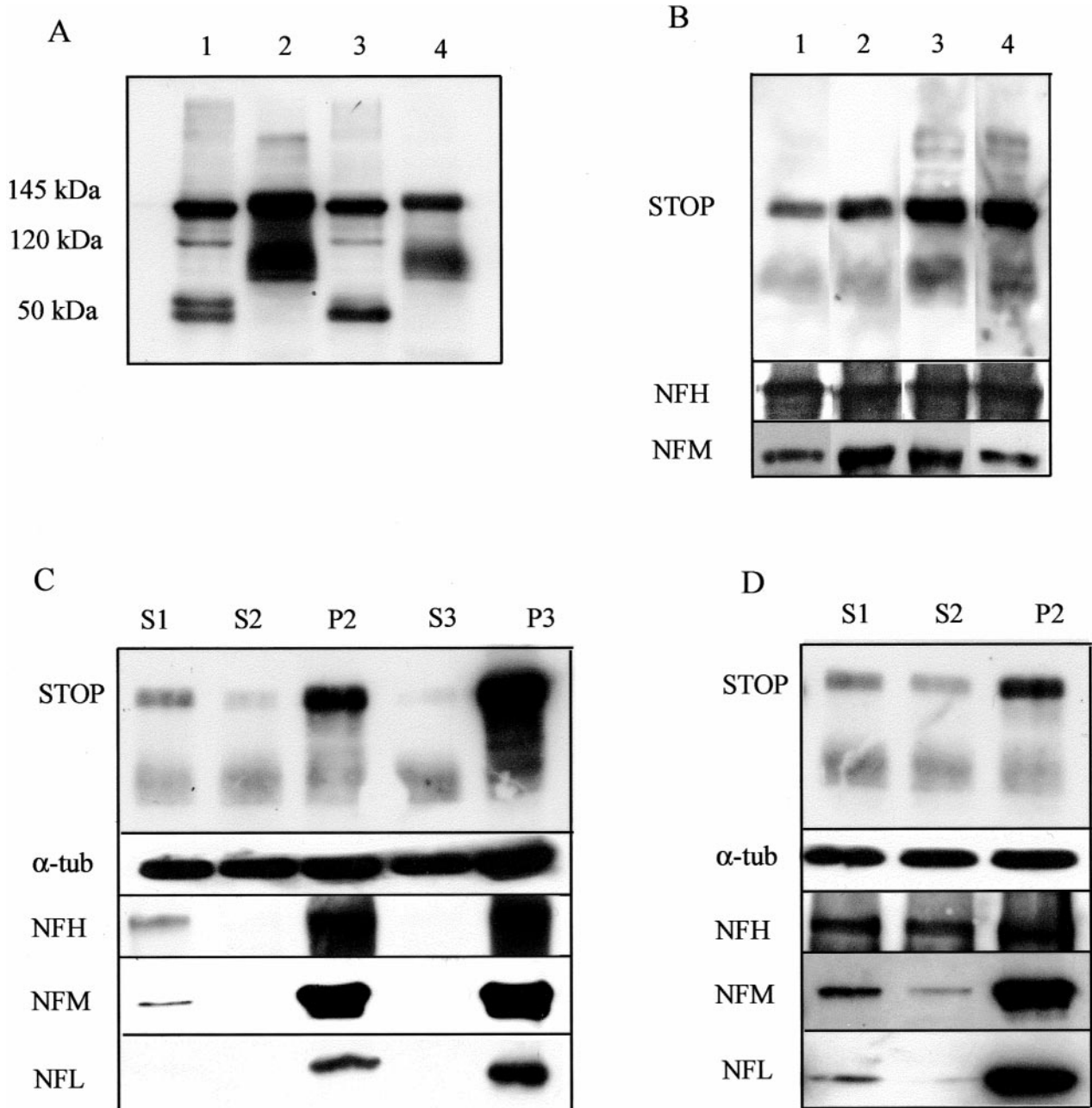
0.5% w/v (Prolabo, Strasbourg, France), and thimerosal 0.2 µg/ml (Sigma). They were then washed in TBS and TBS-Tween 0.05% and incubated for 90 min with peroxidase-conjugated secondary antibodies (goat anti-mouse IgG, 1:2,000, goat anti-rabbit IgG, 1:2,000; Dako). Primary antibodies and dilutions employed were as follows: polyclonal rabbit anti-STOP antibodies 23C or 23N (1:4,000), monoclonal anti-NFH (1:2,000) (clone N52 from Sigma), monoclonal anti-NFM (1:1,000) (clone NN18 from Sigma), monoclonal anti-NFL (1:1,000) (clone NR4 from Sigma), monoclonal anti- $\alpha$ -tubulin (1:1,000) (clone DM1A from Sigma). The enhanced chemiluminescence detection system (ECL, Amersham Life Sciences, Orsay, France) was used to detect immunoreactive polypeptides.

## RESULTS

### Composition of Human STOP Proteins in Neuronal Tissues and their Co-Purification with Neurofilaments

Protein composition of human brain and spinal cord crude extracts was analyzed by Western blotting using a monoclonal anti-STOP antibody specific to the neuronal N-STOP isoform. Mouse brain and spinal cord crude extracts were used as positive controls. A major band migrating at 145 kDa was detected in the human sample (Fig. 1A), similar to the N-STOP isoform of mouse tissue. Migrating below, another band was also revealed at 120 kDa, which could correspond to a modified form of STOP proteins or a proteolytic product. Western blot analysis of crude extracts isolated from spinal cord and brain of 3 ALS cases and 2 normal cases revealed no detectable differences in the migration profile of STOP and neurofilament proteins (Fig. 1B).

To investigate the association of STOP proteins with cytoskeletal structures we isolated microtubules and neurofilaments from human spinal cord and brain. Using a standard microtubule preparation, soluble tubulin in the first supernatant (S1) was induced to polymerize into microtubules for 1 hour at 37°C by adding GTP (1 mM) and glycerol (4 M). Such polymerized microtubules were recovered by sedimentation in the second pellet (P2) and then resuspended and incubated at 4°C for 1 hour to depolymerize them into tubulin. Following a third centrifugation, depolymerized tubulin was recovered in the third supernatant (S3), while the pellet (P3) contained cold-stable microtubules. Western blot analysis of each fraction showed that STOP proteins and neurofilaments were predominantly enriched in P3, suggesting the interaction between these molecules (Fig. 1C). To further confirm this possibility, we also isolated neurofilaments from human spinal cord. Western blot analysis revealed that neurofilaments were present in the second pellet (P2) together with STOP proteins, while tubulin was equally distributed between the different fractions (Fig. 1D). Due to the small size of the samples, it was not possible to perform a third cycle of purification. Note that the migration profile of NFH is similar in these different fractions, suggesting a similar phosphorylation level (Fig. 1C, D).



**Fig. 1.** Western blot analysis of STOP proteins in normal human and mouse nervous tissues (A), in ALS patients (B), and their association with neurofilaments during isolation of either microtubules (C) or neurofilaments (D). **A:** Analysis of crude extracts of spinal cord (1 and 2) and brain (3 and 4) with a monoclonal antibody against N-STOP reveals a major 145-kDa band migrating slightly above the mouse N-STOP. Mouse crude extracts (2 and 4) were used as internal controls for the presence of human N-STOP (1 and 3). Lighter bands were also seen at 120 and 55 kDa, which could correspond to either proteolytic products or modified forms of N-STOP. **B:** Typical Western blot analysis of STOP and neurofilament proteins (NFH and NFM) present in the crude extracts from affected (Lane 1: spinal cord from ALS case 1. Lane 3: brain from ALS case 1) and control samples (Lane 2: spinal cord from control case 6. Lane 4: brain from control case 5). Analysis with a monoclonal antibody against N-STOP reveals a 145-kDa band. The migration profiles of STOP and neurofilament proteins are similar between ALS and control samples. **C:** Following a typical microtubule preparation from human brain (Table, control case 6), STOP proteins are found predominantly in the third pellet (P3), which contains the cold-stable microtubule fraction and is also enriched for neurofilaments. **D:** During the isolation of neurofilaments from human spinal cord (Table, control case 6), STOP proteins together with neurofilaments are found mainly in the second pellet (P2).

### Distribution of STOP Proteins in Normal Human Brain and Spinal Cord

The cellular distribution of neuronal N-STOP in control human brain and spinal cord was analyzed by immunohistochemistry using the monoclonal anti-N-STOP, which recognizes a repeated epitope present only on the C-terminal domain of N-STOP. Neurons in the hippocampus were intensely labeled with the monoclonal anti-STOP antibody (Fig. 2A). Staining was regularly seen in the cytoplasm and neurites and was similar to that found using an anti-neurofilament antibody (Fig. 2B). In the spinal cord, ventral horn motoneurons together with interneurons were highly labeled with anti-STOP antibodies. In the white matter, axons were also labeled but no staining was observed in the myelin sheath (Fig. 2C). Here too, the distribution of STOP epitopes was similar to that seen using an anti-neurofilament antibody (Fig. 2D). One special feature was the labeling of corpora amylacea with the anti-N-STOP antibody (Fig. 2E). These immuno-labeled structures had a round shape with diffuse staining and were located under the pia matter. This typical staining pattern and localization was also observed when a standard stain such as hematein-phloxine was used (Fig. 2F).

### STOP Proteins Co-Aggregate Specifically with Neuronal Intermediate Filaments in Spheroids Present in ALS Tissues

To test whether STOP distribution could be perturbed by neurofilament aggregation in human neurodegenerative diseases we analyzed spinal cords from ALS patients by immunohistochemistry. Thirteen patients were selected from our database according to the El Escorial criteria (Table). Eight patients were females and 5 were males, with a median age of 61.5 years. The mean duration of the illness was 31 months.

The general pattern of anti-STOP staining in both white and gray matter was similar to controls. However, fewer gray matter motoneurons were present in pathological samples due to the disease. In 7 cases, spheroids were clearly detectable by standard staining (Fig. 3A) and anti-neurofilament immunostaining (Fig. 3B). They had a classical round shape and were primarily located in the gray matter. All the detected spheroids were also intensely labeled with anti-STOP antibodies (Fig. 3C). To test directly the colocalization of neuronal intermediate filaments with STOP proteins in these lesions, we performed a double labeling immunofluorescence study on frozen tissue. Using confocal microscopy, we routinely observed in the spheroids a co-localization of peripherin and NFM (Fig. 4A–C), as well as peripherin and STOP proteins using the monoclonal anti-STOP antibody (Fig. 4D–F). Colocalization of neurofilaments with STOP proteins was also observed using the polyclonal anti-STOP antibody

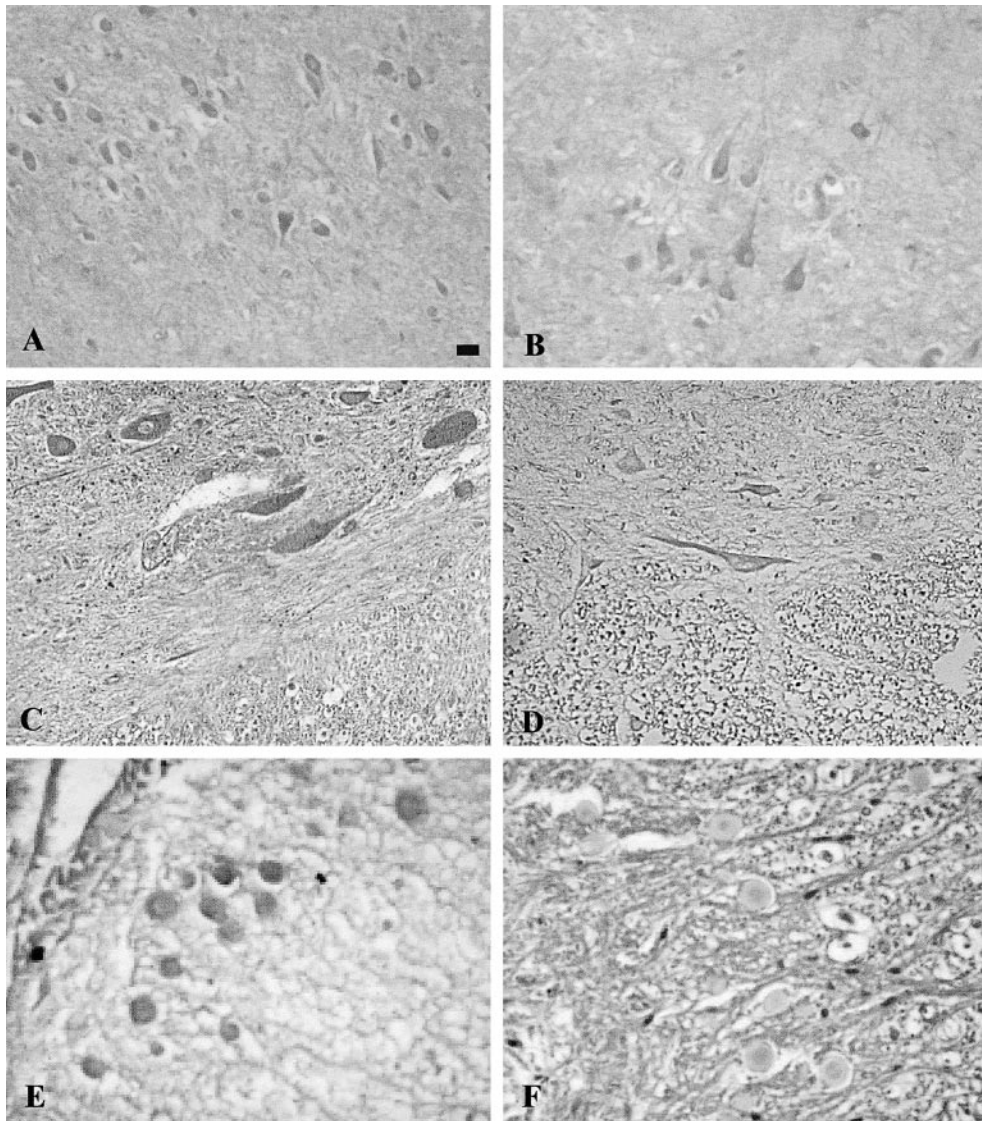
(Fig. 4G–I). However, numerous spheroids were unstained by anti-tubulin (Fig. 4J–L) or anti-kinesin antibodies (Fig. 4M–O). Quantitative analysis of spheroids in cervical spinal cross sections showed that an average of 4 spheroids per section was counted in the 7 pathological cases that were analyzed (Table). All these spheroids were stained with antibodies recognizing neurofilaments and STOP proteins. However, only 82% and 58% of the spheroids were labeled with tubulin and kinesin antibodies, respectively. Therefore, compared to tubulin and kinesin, STOP was found to be systematically present with neurofilaments in the axonal spheroids.

### DISCUSSION

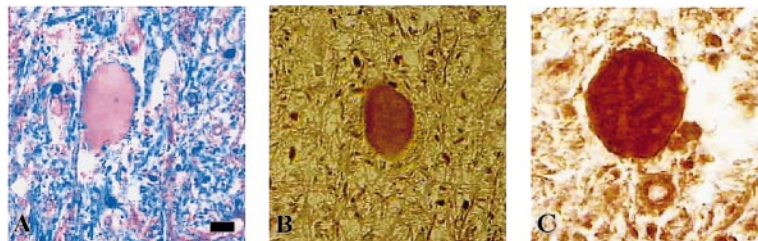
STOP proteins were previously shown to be responsible for cold and drug microtubule stabilization using cell culture, as well as rat and mouse tissue homogenates (18). However, little is known about this protein in human tissues. Based on sequence homologies, Bosc et al (26) suggested that a neuronal N-STOP isoform might exist in humans with 79% homology to the rat N-STOP. Variations between these species are mainly found in the central repeats. Five repeats are present in rodents while only 1 is present in human N-STOP. In this study we perform Western blot analysis of human nervous tissues using 3 available antibodies. The 2 polyclonal antibodies (23N and 23C) recognize the N- and C-terminal regions, respectively, of the repeated sequences present in the central domain of each STOP isoform. The monoclonal anti-STOP antibody recognizes a repeated KDQG motif present only in the C-terminal end of the neuronal isoform (21). This motif is repeated 8 times in the human N-STOP protein and 5 times in the mouse sequence. Western blot analysis confirms the presence of STOP proteins in human tissue and reveals a pattern similar to mouse brain and spinal cord extracts, with a major band migrating at 145 kDa (Fig. 1). This apparent molecular weight is higher than the mass predicted from the amino acid sequence (86 kDa), and also slightly higher than the mouse neuronal isoform. Such a peculiar migration profile suggests that the protein undergoes post-translational modifications. Among the possibilities, phosphorylation and glycosylation have been shown to modify the electrophoretic mobility of neurofilaments (27, 28), and could also act on STOP proteins. However, the analysis of the migration pattern of STOP proteins shows no difference between normal and pathological samples (Fig. 1B). This indicates that the post-translational modification of STOP proteins (detected by their migration profile on SDS-PAGE) is not altered in the ALS cases.

Neurons contain numerous microtubules that are cold- and drug-stable, properties conferred by STOP proteins (15). Here, we show that STOP proteins are present predominantly in the cold-stable microtubule fraction together with neurofilaments during a classical microtubule

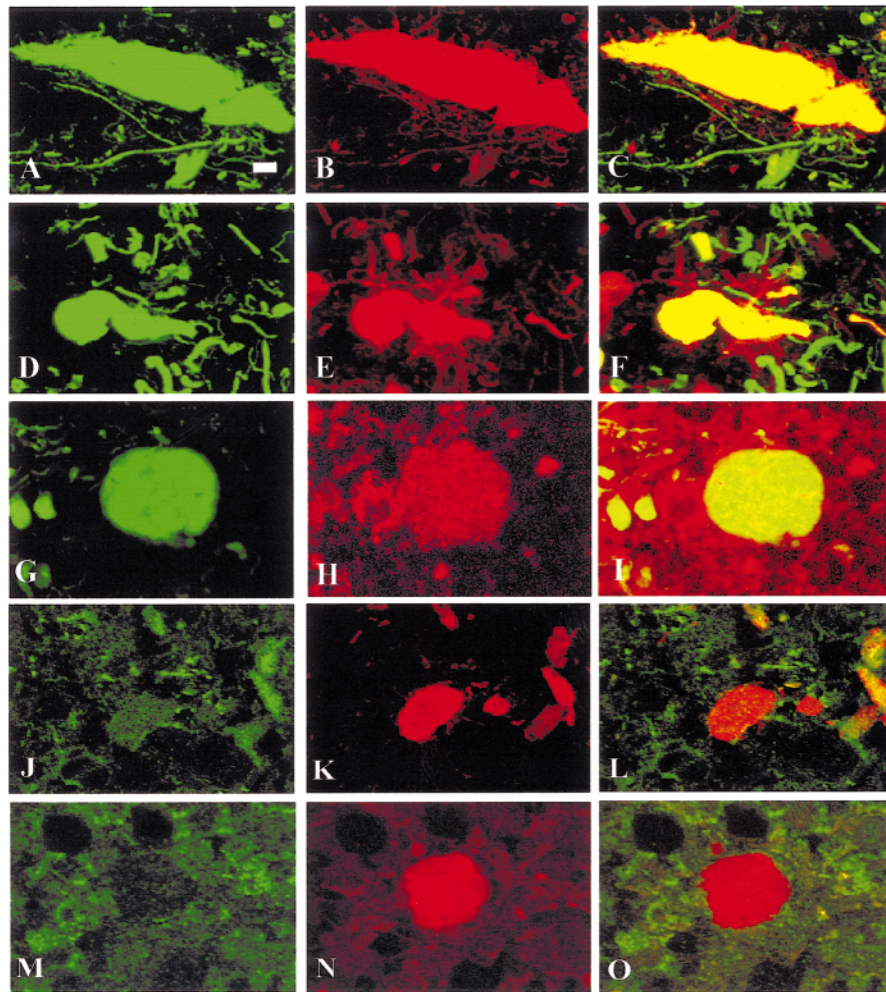




**Fig. 2.** Human N-STOP distribution in the normal central nervous system as revealed by immunohistochemistry. Using both polyclonal (23N) and monoclonal antibodies directed against STOP proteins, staining is seen in the cytoplasm of neurons in the hippocampus (A), of motoneurons present in the gray matter of the spinal cord, and in axons present in the white matter (C). This staining is similar to that observed for neurofilaments using an anti-NFM antibody (B, D). Corpora amylacea recognizable using standard staining (F) are also well labeled with anti-STOP antibodies (E). Scale bars: A, B = 50  $\mu$ m; C, D = 25  $\mu$ m.



**Fig. 3.** Spheroids of ALS patients are labeled with anti-STOP antibodies. On a fixed spinal cord sample from an ALS patient, a typical spheroid is observed using standard hematein-phloxine-Luxol staining (A). On the same tissue, such spheroids are well labeled with antibodies against the neurofilament NFM subunit (B) or STOP proteins (C). Scale bar: 10  $\mu$ m.



**Fig. 4.** STOP proteins co-aggregate with intermediate filaments in spheroids of ALS patients, but not tubulin or kinesin. A frozen sample of the spinal cord of an ALS patient (ALS case 1) was double labeled with specific antibodies recognizing neuronal intermediate filaments (peripherin and NFM) and STOP proteins. Confocal microscope analysis showed the co-localization between STOP and neuronal intermediate filaments in spheroids. However, peripherin present in spheroids did not co-localize with either tubulin or kinesin proteins. **A:** anti-NFM; **B:** anti-peripherin; **C:** anti-NFM and anti-peripherin; **D:** anti-STOP (monoclonal); **E:** anti-peripherin; **F:** anti-STOP and anti-peripherin; **G:** anti-NFM, **H:** anti-STOP (polyclonal); **I:** anti-NFM and anti-STOP; **J:** anti- $\beta$ III-tubulin; **K:** anti-peripherin; **L:** anti- $\beta$ III-tubulin and anti-peripherin; **M:** anti-kinesin; **N:** anti-peripherin; **O:** anti-kinesin and anti-peripherin. Scale bar: 10  $\mu$ m.

preparation from human brain (Fig. 1C). Moreover, when the first supernatant was incubated in the presence of 4 M glycerol to induce the formation of reticulated neurofilament networks (25) (but at 4°C and in the absence of GTP to avoid the polymerization of tubulin into microtubules), the majority of STOP proteins sedimented together with neurofilaments in the second pellet (Fig. 1D) and were deficient in the supernatant fraction enriched for unpolymerized tubulin. This indicates that STOP proteins interact preferentially with neurofilaments, and therefore could be considered as a new “neurofilament-associated protein.” The electrophoretic mobility of NFH proteins was similar in these different fractions (Fig. 1C, D), suggesting that the association of

STOP proteins is not restricted with the phosphorylated isoform of NFH.

The immunohistochemical study of normal human nervous tissues shows that STOP proteins are primarily localized to neurons. Some blood vessels were also labeled with the polyclonal antibodies, which might be due to the presence of the F-STOP isoforms in fibroblasts. In neurons, N-STOP is distributed throughout the neuronal cytoplasm, including the cell body, dendrites, and axons. In the white matter of the spinal cord and in dorsal roots, staining was restricted to axons and was similar to that observed for neurofilaments. No staining of the myelin sheaths was observed. While a similar distribution was also observed in pathological



conditions, a striking observation was the systematic co-aggregation of STOP proteins with intermediate filaments (neurofilaments and peripherin) in spheroids of ALS patients. It has been shown previously that several components, such as kinesin (23), galectin-1 (29), SOD-1 (30), and  $\beta$ -APP (31), could also be found in axonal spheroids. While we did not analyze all these proteins, we found that only 82% and 58% of these spheroids contain tubulin or kinesin, respectively, whereas they were all positive for neurofilament and STOP proteins (Fig. 4J–O). Therefore, the co-immunolabeling of spheroids for STOP and neuronal intermediate filament proteins represents an excellent cytopathological marker for spheroids.

In addition to its role in the stability of microtubules, STOP has several calmodulin-binding domains, suggesting possible regulation by calcium (26). Despite a limited proteolysis occurring during their axonal transport (32), neurofilaments are normally degraded at the synaptic level (33). However, the proteolytic mechanism responsible for their elimination when they abnormally accumulate is still unknown. One hypothesis could be that STOP proteins may be involved in the regulation of neurofilament degradation through their Ca/calmodulin-binding domains. As a consequence, when neurofilaments abnormally accumulate in axons, STOP proteins could be retained in spheroids to remove neurofilaments by activating the local degradation of these filaments. Alternatively, the accumulation of STOP proteins could be a primary event in this disease, which induces a dysregulation of the local limited proteolysis of neurofilaments, and therefore their aggregation. Another possibility could be that the microtubule network is altered in spheroids, as shown by the deficiency of tubulin and/or kinesin observed in several spheroids. As a consequence, STOP proteins are accumulated in these lesions in order to stabilize the last microtubules that are still present. Further investigations are necessary to elucidate the molecular mechanism by which such perturbations contribute directly or indirectly to the formation of axonal spheroids containing numerous neurofilaments and rare microtubules (34). In such a perspective, transgenic mice in which the STOP gene has been inactivated by homologous recombination display abnormal synaptogenesis probably as a result of an abnormal axonal transport (35). Therefore, the aggregation of STOP in axonal spheroids present in ALS patients could similarly alter the synaptic functions.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge Pr. G. J. Snipes (Baylor College of Medicine, Houston, TX), Dr. D. Job (INSERM, Grenoble, France), Dr. H. F. Farhadi (McGill University, Montreal, Canada), and Pr. C. Ferrier (University of Angers, France) for very helpful discussions, suggestions and editing. The anti-STOP antibodies were generously given to us by Dr. D. Job (INSERM, Grenoble, France). We also thank C. Dumez, I.

Viau, A. Fouillet and I. Vigneron for their technical assistance, as well as the "Service Commun d'Imageries et d'Analyses Microscopiques" from the University of Angers.

#### REFERENCES

1. Ferri GL, Cichi A, Bastone A, Gaudio RM, Frontali N, Dahl D. Experimental beta beta'-iminodipropionitrile (IDPN) neuropathy: Neurofilament profile of sensory, motor and autonomic nerves as seen by immunocytochemistry on whole-mount preparations. *Brain Res* 1994;657:315–19
2. Julien JP. Neurofilament functions in health and disease. *Curr Opin Neurobiol* 1999;9:554–60
3. Julien JP, Beaulieu J. Cytoskeletal abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis: Beneficial or detrimental effects? *J Neurol Sci* 2000;180:7–14
4. Stone JD, Peterson A, Eyer J, Sickles DW. Neurofilaments are non-essential elements of toxicant-induced reductions in fast axonal transport: Pulse labeling in CNS neurons. *Neurotoxicology* 2000; 21:447–57
5. Leigh PN, Whitwell H, Garofalo O, et al. Ubiquitin-immunoreactive intraneuronal inclusions in amyotrophic lateral sclerosis. Morphology, distribution, and specificity. *Brain* 1991;114:775–88
6. Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:492–501
7. Delacourte A, Defossez A. Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J Neurol Sci* 1986;76:173–86
8. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993;362:59–62
9. Higgins CM, Jung C, Ding H, Xu Z. Mutant Cu, Zn superoxide dismutase that causes motoneuron degeneration is present in mitochondria in the CNS. *J Neurosci* 2002;22:RC215
10. Lino MM, Schneider C, Caroni P. Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *J Neurosci* 2002;22:4825–32
11. Al-Chalabi A, Andersen P, Nilsson P, et al. Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 1999;8:157–64
12. Lee MK, Marszalek J, Cleveland DW. A mutant neurofilament subunit causes massive, selective motor neuron death: Implications for the pathogenesis of human motor neuron disease. *Neuron* 1994;13: 975–88
13. Eyer J, Peterson A. Neurofilament-deficient axons and perikaryal aggregates in viable transgenic mice expressing a neurofilament-beta-galactosidase fusion protein. *Neuron* 1994;12:389–405
14. Eyer J, Cleveland D, Wong PC, Peterson AC. Pathogenesis of two axonopathies does not require axonal neurofilaments. *Nature* 1998; 391:584–87
15. Job D, Rauch C, Fischer EH, Margolis RL. Recycling of cold-stable microtubules: Evidence that cold stability is due to substoichiometric polymer blocks. *Biochemistry* 1982;21:509–15
16. Margolis RL, Rauch C, Job D. Purification and assay of a 145-kDa protein (STOP145) with microtubule-stabilizing and motility behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:639–43
17. Bosc C, Cronk J, Pirollet F, et al. Cloning, expression, and properties of the microtubule-stabilizing protein STOP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:2125–30
18. Denarier E, Fourest-Lieuvain A, Bosc C, et al. Nonneuronal isoforms of STOP protein are responsible for microtubule cold stability in mammalian fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:6055–60
19. Guillaud L, Bosc C, Fourest-Lieuvain A, et al. STOP proteins are responsible for the high degree of microtubule stabilization observed in neuronal cells. *J Cell Biol* 1998;142:167–79

20. Pirollet F, Margolis R, Job D. Ca<sup>2+</sup>-calmodulin regulated effectors of microtubule stability in neuronal tissues. *Biochim Biophys Acta* 1992;1160:113–19
21. Pirollet F, Rauch C, Job D, Margolis RL. Monoclonal antibody to microtubule-associated STOP protein: Affinity purification of neuronal STOP activity and comparison of antigen with activity in neuronal and nonneuronal cell extracts. *Biochemistry* 1989;28:835–42
22. Valiron O, Caudron N, Job D. Microtubule dynamics. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:2069–84
23. Toyoshima I, Sugawara M, Kato, et al. Kinesin and cytoplasmic dynein in spinal spheroids with motor neuron disease. *J Neurol Sci* 1998;159:38–44
24. Wong N, He B, Strong M. Characterization of neuronal intermediate filament protein expression in cervical spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J Neuropathol Exp Neurol* 2000;59:972–82
25. Eyer J, Leterrier J. Influence of the phosphorylation of neurofilaments proteins on the interactions between purified filaments in vitro. *Biochem J* 1988;252:655–60
26. Bosc C, Frank R, Denarier E, et al. Identification of novel bifunctional calmodulin-binding and microtubule-stabilizing motifs in STOP proteins. *J Biol Chem* 2001;276;33:30904–13
27. Sharma P, Barchi J, Huang X, Amin N, Jaffe H, Pant H. Site-specific phosphorylation of Lys-Ser-Pro repeat peptides from neurofilament H by Cyclin-Dependant Kinase 5: Structural basis for substrate recognition. *Biochem* 1998;37:4759–66
28. Albach C, Klein R, Schmitz B. Do rodent and human brains have different N-glycosylation patterns? *Biol Chem* 2001;382:187–94
29. Kato T, Kurita K, Seino T, et al. Galectin-1 is a component of neurofilaments in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;282:166–72
30. Shibata N, Asayama K, Hirano A, Kobayashi M. Immunohistochemical study on superoxide dismutases in spinal cords from autopsied patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Dev Neurosci* 1996;18:492–98
31. Sasaki S, Iwata M. Immunoreactivity of beta-amyloid precursor protein in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 1999;97:463–68
32. Nixon RA, Quakenbush R, Vitto A. Multiple calcium-activated neutral proteinases (CANP) in mouse retinal ganglion cell neurons: Specificities for endogenous neuronal substrates and comparison to purified brain CANP. *J Neurosci* 1986;6:1252–63
33. Roots BI. Neurofilament accumulation induced in synapses by leupeptin. *Science* 1983;221:971–72
34. Donaghy M, King R, Thomas P, Workman J. Abnormalities of the axonal cytoskeleton in giant axonal neuropathy. *J Neurocytol* 1988;17:197–208
35. Andrieux A, Salin P, Vernet M, et al. The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. *Genes Dev* 2002;16:2350–64

Received May 27, 2003

Revision received August 8, 2003

Accepted August 18, 2003

## 4<sup>ème</sup> Article

### **Cytoskeleton abnormalities in axopathies of unknown etiology: correlations with morphometry**

#### **Résumé :**

Dans 20% des cas de neuropathies humaines de type axonal, aucune cause n'est mise en évidence. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à ce type de neuropathies en nous focalisant sur le cytosquelette. En effet peu de données disponibles dans la littérature traitent de l'intégrité du cytosquelette dans les neuropathies humaines. Nous avons sélectionné dans notre banque de biopsies nerveuses 9 cas de patients atteints d'une neuropathie axonale, pour lesquels aucune cause n'a été trouvée. Ces biopsies ont été analysées par morphométrie et par immunohistochimie avec des anticorps dirigés contre les trois sous unités des Neurofilaments et contre la  $\beta$ -Tubuline. Les résultats ont été comparés à cinq biopsies nerveuses normales.

Comme attendu, il n'y avait pas de relation entre les données morphométriques (rapport  $g...$ ) et les données cliniques et électrophysiologiques. Nous avons mis en évidence que le niveau d'expression des trois sous unités des NFs était diminué, de façon parallèle à la sévérité de la perte des fibres myélinisées. Ces données sont en accord avec la baisse de l'ARNm des NFs observée par d'autres auteurs. A l'inverse, la densité de la tubuline était augmentée et le ratio TUB/NF était donc systématiquement augmenté. Ainsi la densité des fibres était toujours corrélée de façon inverse à ce ratio. Nos résultats ressemblaient à ceux observés dans les axotomies, induisant une baisse de l'ARNm des NFs et une augmentation de l'ARNm de la  $\beta$ 2-Tubuline. Lors de la régénérescence axonale, le neurone présenterait un mode d'expression des protéines reprenant, au moins partiellement, la croissance de l'axone : les Filaments Intermédiaires verraient leur expression inhibée et celle de la Tubuline serait augmentée. Ainsi, dans les cas étudiés, une axotomie permanente se présente, comme si était réalisée une régénérescence accrue (marquée par l'augmentation de la Tubuline), mais inefficace (marquée par l'absence de maintien des NFs). Ce déficit chronique pourrait être en rapport avec une perturbation de la suppléance de facteurs trophiques, notamment de l'IGF-1.



# Cytoskeleton abnormalities in axonopathies of unknown aetiology: correlations with morphometry

Catherine Fressinaud<sup>a,\*</sup>, Isabelle Vigneron<sup>b</sup>, Franck Letournel<sup>b</sup>, Guillaume Nicolas<sup>a</sup>,  
Isabelle Jean<sup>b</sup>, Frederic Dubas<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Neurology, UPRES EA 3143, University Hospital, 4 rue Larrey, F49033 Angers Cedex 01, France

<sup>b</sup>Cell Biology Laboratory, UPRES EA 3143, University Hospital, F49033 Angers Cedex 01, France

Received 27 September 2001; accepted 21 January 2002

## Abstract

To determine if specific axonal cytoskeleton abnormalities could be demonstrated in axonopathies without aetiology, nerve biopsies from five controls and nine cases were analyzed by morphometry and immunocytochemistry with anti-neurofilament (NF, subunits L, M, H) and anti- $\beta$  tubulin (TUB) antibodies. Morphometry revealed either large fiber atrophy (decrease in large fiber density with increased density in small fibers), degeneration of large fibers (decrease in large fiber density and in total density of fibers) or of all diameter fibers. NF immunostaining density decreased (by 21–89%) only in cases with fiber loss, in parallel to myelinated fiber density as determined by morphometry. On the contrary, the density of fibers labelled for TUB increased significantly in all except two cases by 52–102% over controls. Nevertheless, in these two cases—with a severe loss of fibers—as well as in other cases, the ratio of the density of fibers labelled for TUB and NFL (TUB/NFL) increased by 48–404%. Thus, the total density of myelinated fibers was always inversely correlated with the TUB/NFL ratio. Similar abnormalities have been described only after axotomy; our cases could thus be compared to «permanent axotomy».

© 2002 Published by Elsevier Science B.V.

**Keywords:** Axonopathy; Axonal cytoskeleton; Tubulin; Neurofilament; Morphometry

## 1. Introduction

Despite cautious clinical examination and extensive laboratory tests, a number of axonopathies (around 20%) remain without aetiology even after nerve biopsy [1–3]. They sometimes lead to pronounced disability, but the extent of neuronal disorganization is still poorly documented. The integrity of the axonal cytoskeleton, and the surrounding myelin, is essential for proper nerve conduction. Alterations of these constituents, especially neurofilaments (NF) and tubulins (TUB), have been reported in experimental neuropathies induced by axotomy [4–7], intoxications with 2, 5-hexanedione [8],  $\beta$ ,  $\beta'$ -iminodipropionitrile [9], acrylamide [10], aluminium [11,12], or streptozotocin-induced diabetes [13,14]. Few reports deal with axonal cytoskeleton in human neuropathies. A decrease in NF immunoreactivity, associated with granular debris was observed in biopsy specimens from

patients suffering from axonopathies by Trojanowski et al. [15]. In severe Guillain–Barré syndromes, a decreased number of ventral root axons was immunolabelled for heavy NF (NFH) protein [16]. These results, however, were not quantified. Watson et al. [17] also reported a decreased content in NFs and TUB in Charcot–Marie–Tooth disease type 1, with an increase of the  $\beta 2$  and  $\beta 3$  isoforms of tubulins. The present study was undertaken to evaluate if specific abnormalities of the axonal cytoskeleton could be detected in axonopathies of unknown aetiology, and therefore, could suggest one or different mechanisms of nerve insults. Moreover, correlations with morphometric features, clinical signs, evolution and electrophysiology patterns were investigated. Preliminary results have been reported in abstract form [18].

## 2. Materials and methods

### 2.1. Patient selection

Five controls (patients without peripheral nerve involvement, aged  $54 \pm 2$  years) and nine cases (Table 1) were

\* Corresponding author. Tel.: +33-2-41-35-46-13; fax: +33-2-41-35-35-94.

E-mail address: Catherine.fressinaud@med.univ-angers.fr (C. Fressinaud).

Table 1  
Clinical and morphometric features

	Case number									
	0012	98043	97031	99032	97044	99017	97017	99046	0014	
Age (year)	58	63	69	71	73	22	69	53	68	
Sex	F	F	M	M	F	F	M	M	M	
Duration	9 months	10 years	24 years	6 years	7 years	3 years	2 months	8 years	15 years	
Evolution	progressive	slow progression	progressive	progressive	stable	slow progression	post-surgery subacute	aggravation	progressive	
Symptoms	dysesthesias	sensorimotor	sensorimotor	severe sensorimotor with ataxia	sensorimotor paraplegia	severe sensory	severe sensorimotor	sensory with incontinence	sensorimotor	
Distribution	lower limbs symmetric	lower limbs	lower limbs symmetric	four limbs asymmetric	lower limbs symmetric	lower limbs asymmetric	four limbs asymmetric	four limbs symmetric		
Morphometry	large fiber atrophy	large fiber atrophy	large fiber atrophy and degeneration	degeneration of large fibers	degeneration of large fibers	degeneration of large and medium fibers	degeneration of large and medium fibers	degeneration of all fibers	degeneration of all fibers	
g ratio	0.64	0.71	0.69	0.63	0.67	0.59	0.65	0.6	0.56	

Controls (five cases): means are as follows: age =  $54 \pm 2$  years, g ratio =  $0.62 \pm 0.02$  (mean of at least 200 fibers per section, measured through NIH image software at magnification  $\times 100$ ).

selected from a bank of biopsies performed for clinical diagnostic studies between 1997 and 2000. Mean age was  $60 \pm 15$  years (only one patient was less than 50 years of age), and disease duration varied from a few months (two cases) up to 24 years. In most cases, clinical signs were severe and motor impairment was present in six cases. The following laboratory tests were normal: cell blood count and erythrocyte sedimentation rate, serum glucose and creatinemia, liver function tests, serum protein electrophoresis with immunofixation electrophoresis, vitamin B12 and B9 levels, antinuclear antibodies and rheumatoid factor and thyroid function tests. Cerebrospinal fluid analysis revealed no abnormalities. In most patients, other laboratory investigations were performed and were negative: serology for Lyme's disease and HIV or hepatitis B, cryoglobulinemia, Sjögren's syndrome antibodies, plumbemia, screening for occult malignancy, . . . , etc.

Electrophysiology was performed a few weeks before biopsy and demonstrated mild reduction of nerve conduction velocities with reduced amplitude potentials, indicative of primary axonal involvement (not shown). Nerve potentials were sometimes abolished in severely affected territories.

### 2.2. Morphometry and immunohistochemistry

Specimens were musculocutaneous nerve biopsies at the level of the inferior third of the calf. A portion of each specimen was fixed in 2.5% glutaraldehyde for 2 days, postfixed in 2% osmic acid for 1 h and embedded in araldite for morphometric studies on semithin section. Sections were stained with toluidine blue and observed at an original magnification of  $\times 2500$  with a Zeiss axiophot coupled to a Lhesa camera. Computerized images were screened using the NIH image software. Myelinated fiber density was determined by counting at least 200 axons in four separate fields. Myelination was assessed by calculating the g ratio (axonal diameter/fiber diameter) [19,20]. One portion of the

biopsy was frozen in isopentane and stored at  $-180^\circ\text{C}$  until use. Cryostat sections of  $5\ \mu\text{m}$  were used for immunocytochemistry. After permeation with chloroform/methanol 2:1 (v/v), saturation of endogenous peroxydases by 0.03%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 5 minutes each, sections were incubated with normal goat serum (1/10 dilution) in 3% bovine serum albumin (for 45 minutes), and then 2 h with monoclonal antibodies (mAb) for neurofilament (NF, Sigma, St. Louis, MO) light (1/4000 dilution), medium (1/4000 dilution) and heavy chains (1/1600 dilution) or with anti- $\beta$  tubulin [21] (1/50 dilution). Biotinylated Abs (1/200 dilution, Amersham, Little Chalfont, England) were incubated for 40 minutes. Peroxydase staining was revealed using avidin-biotin method (Vectastain ABC kit, Vector, Burlingame, CA). Labelled axons were counted in at least three separate fields, using a morphometric grid at magnification  $\times 2500$ .

## 3. Results

### 3.1. Morphometry

In control nerves, myelinated fiber density was  $7595 \pm 362/\text{mm}^2$  (dotted area in Fig. 1) with a g ratio of  $0.62 \pm 0.02$ . The repartition of A $\delta$  fibers ( $<6\ \mu\text{m}$  diameter), A $\beta$  fibers ( $6\ \mu\text{m} \leq \text{diameter} < 10\ \mu\text{m}$ ) and A $\alpha$  fibers (diameter  $\geq 10\ \mu\text{m}$ ) was 46%, 23% and 30%, respectively. In pathologic cases, total density of myelinated fibers varied from normal (two cases, Fig. 1: case 0012) to moderate ( $5563/\text{mm}^2$ ) and severe ( $976/\text{mm}^2$ , Fig. 1: case 99046) fiber loss (seven cases). The g ratio (Table 1) was either elevated ( $0.65-0.71$ , four cases), diminished ( $0.59-0.56$ , two cases) (nonsignificant), or normal (three cases). Depending on fiber repartition, cases were grouped into their main abnormalities, i.e.: (i) large fiber atrophy (decreased density of large fibers with enhanced density of small fibers and preserved total density, three cases) (Fig. 1, case 0012, Fig.

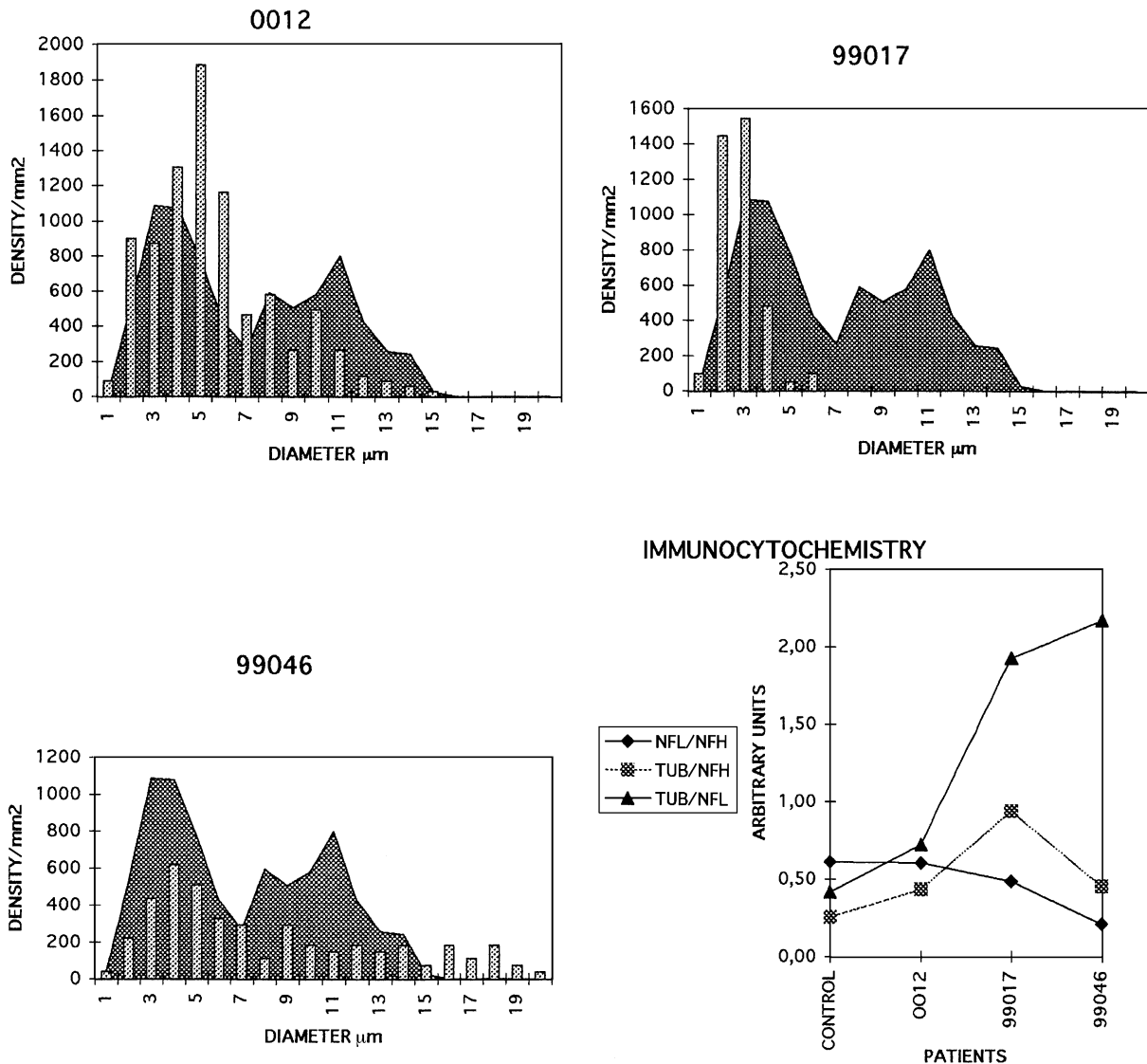


Fig. 1. Morphometry and immunohistochemistry of myelinated fibers in selected cases representative of one of the three groups: atrophy of large fibers (0012, left, disappearance of large myelinated fibers without decrease in total density of fibers), degeneration of large fibers (99017, right, with decrease in total fiber density), degeneration of all diameter fibers (99046, below). Morphometry of controls is represented by the dotted area of histograms (mean of five cases). Immunohistochemistry is presented as the ratio of the number per optic field of immunostained fibers for each class of antibody (directed against neurofilament subunits L and H, and  $\beta$  tubulin). All differences compared to controls are significant ( $p < 0.01$ , Student's *t*-test) except for the NFL/NFH ratio in case number 0012. Control values: mean of five cases (standard deviations are less than 5%, not represented).

2A), (ii) degeneration of large fibers (decreased density of large fibers with decreased total density, two cases) (Fig. 1, case 99017, Fig. 2B) and (iii) degeneration of large and medium fibers (Fig. 2C), or of all diameter fibers (decreased density of each class of fibers with decreased total density, four cases) (Fig. 1, case 99046, Fig. 2D).

### 3.2. Immunocytochemistry

In control nerves, the number of axons per optic field immunostained for NFs and TUB was, in increasing order, TUB < NFL < NFM < NFH (Figs. 3A,B and 4A). The ratios of the density of immunostained fibers for each antibody were: NFM/NFH = 0.89, NFL/NFH = 0.61, NFL/NFM =

0.68 and TUB/NFL = 0.42 (Fig. 5). In axonopathies, the density of axons labelled for NFs compared to controls was always decreased, from 97% (nonsignificant) to 50% of control values for NFH (Fig. 3C) and from 92% to 6% of controls for NFL (Fig. 3D). The NFM/NFH ratio was not significantly altered, whereas the NFL/NFH ratio was either unchanged: this corresponded to the less severe cases without degeneration (atrophy of large fibers, cases 0012–97031), or: NFL/NFH decreased by 21–89% in parallel to decreased density of myelinated fibers in the other cases which comprised fiber loss (Fig. 5). Contrary to NF staining, the number of fibers labelled for tubulin per optic field increased significantly (Fig. 4B) in all except for two cases (99046 and 0014), from 52% to 102% over control values. Nevertheless, in the

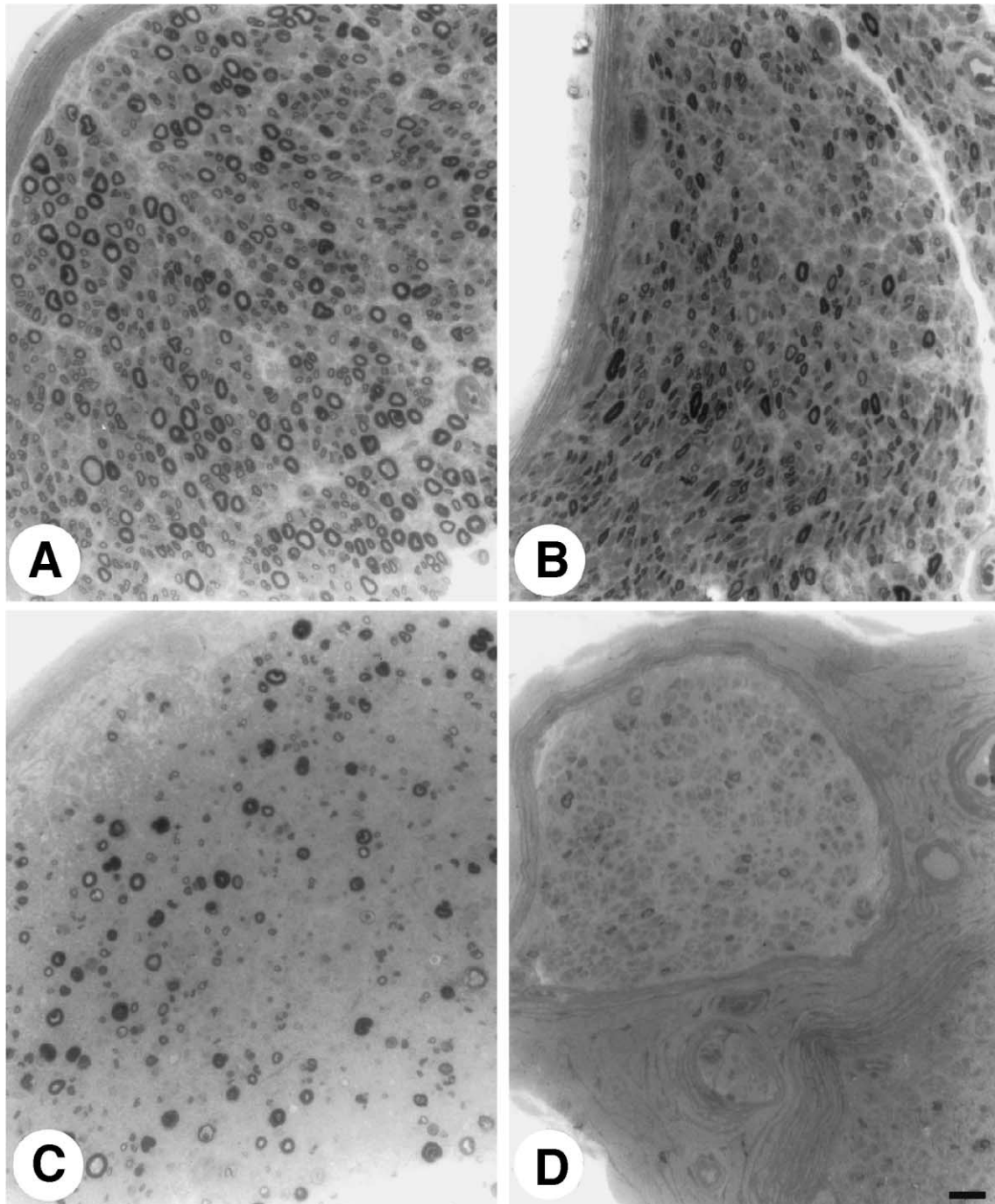


Fig. 2. Semithin sections of musculo-cutaneous nerve in four cases of axonopathies: atrophy of large myelinated fibers (A, case number 0012, disappearance of large fibers without decrease in total fiber density); degeneration of large fibers (B, case number 99032, with decrease in total density of fibers); degeneration of large and medium fibers (C, case number 97017), and degeneration of all diameter fibers (D, case number 0014). Toluidine blue staining, bar=40  $\mu\text{m}$ .

two cases without elevated TUB immunolabelling (71% and 81% of controls) and which were characterized by a severe loss of all myelinated fibers, as well as in all the other (more moderate) cases, the TUB/NFL ratio increased by 48–404% over control values (and even 1081% in the most severe case, i.e. with a total density of myelinated fibers less than  $10^3/\text{mm}^2$ ) (Fig. 5). Thus, the total density of nerve fibers was inversely correlated with the TUB/NFL density ratio.

### 3.3. Clinical and electrophysiological correlations

Electrophysiology confirmed in all cases the axonal involvement, with various severity of decrease in amplitude potentials and nerve conduction velocities. Nevertheless, these results were not accurate enough in determining a pattern comparable to that determined by morphometry (not shown).

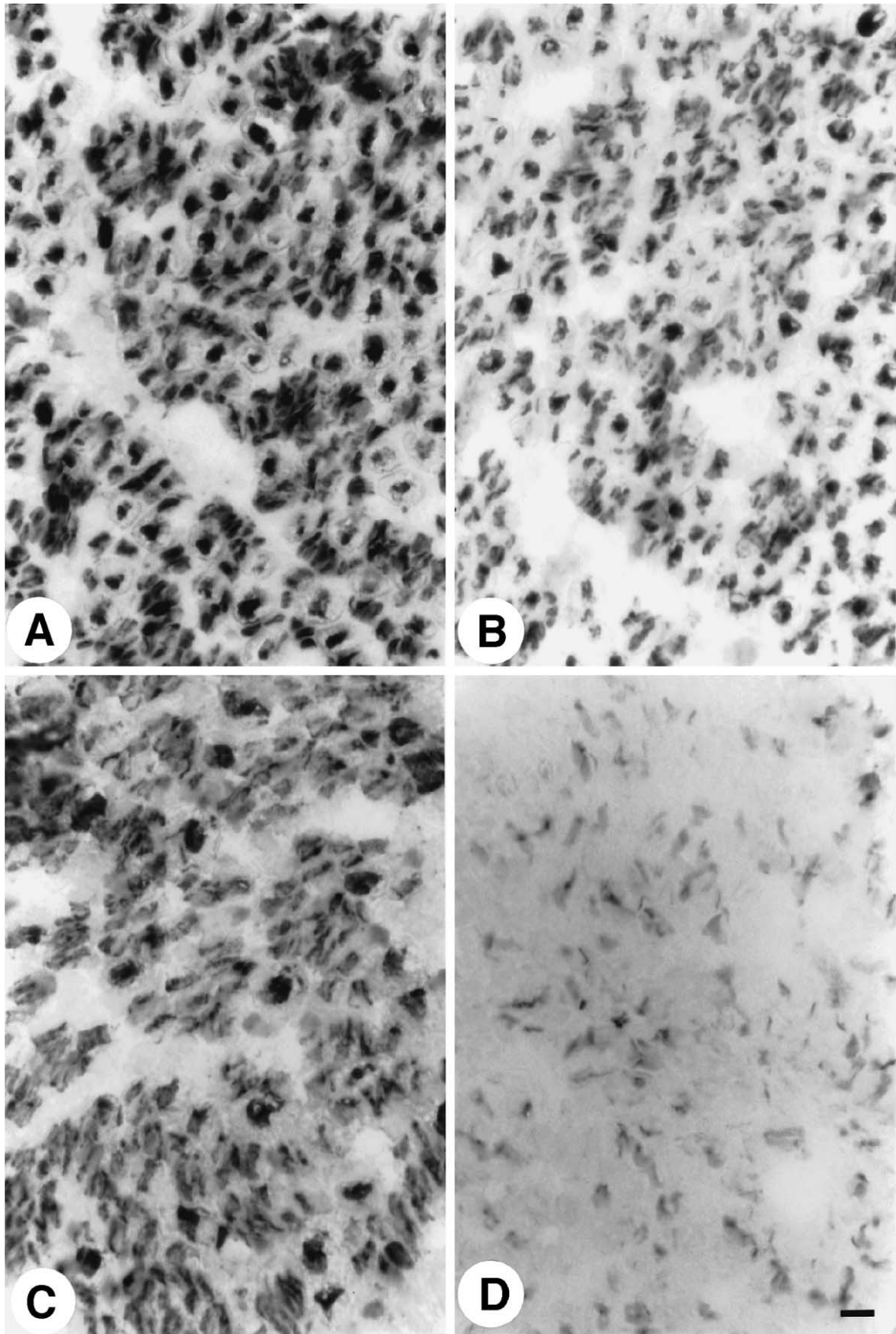


Fig. 3. Decreased immunostaining for NFH (C) and NFL (D) in case number 99046 compared to controls (A, NFH) and (B, NFL). Peroxydase staining, bar = 20  $\mu$ m.

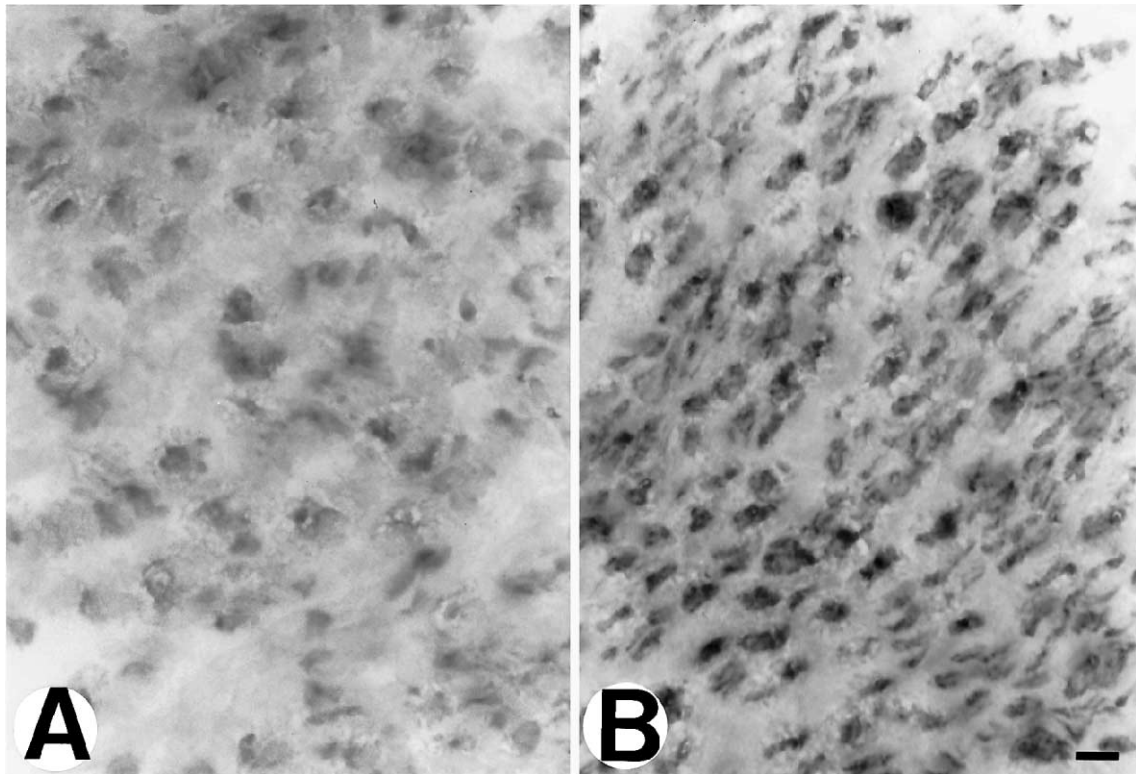


Fig. 4. Increased immunostaining for  $\beta$  tubulin coincides with atrophy of large fibers (B, case number 0012), compared to controls (A). Peroxydase staining, bar = 20  $\mu$ m.

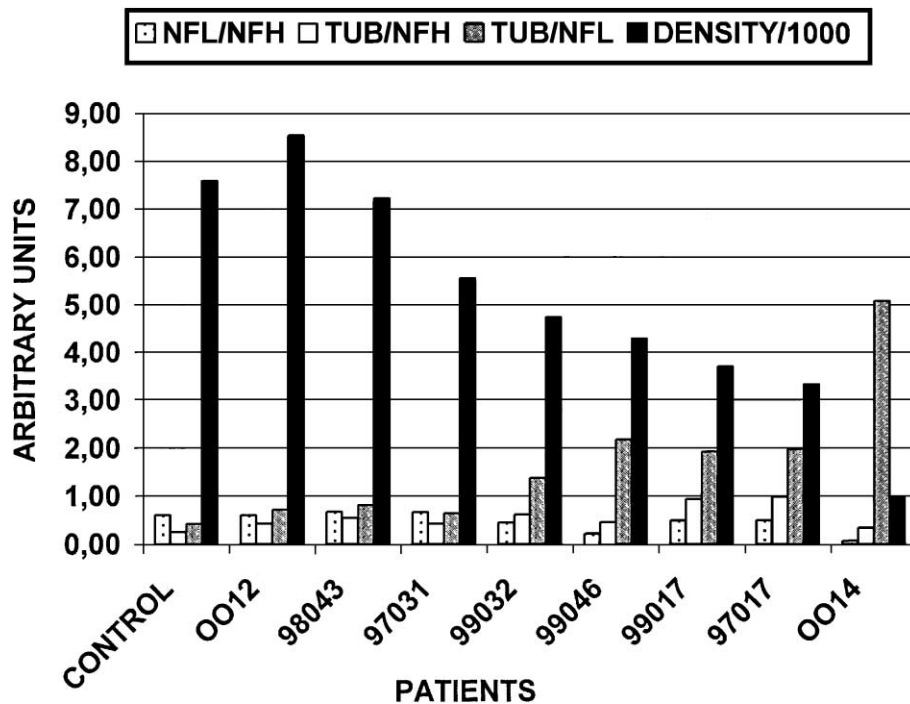


Fig. 5. Quantification of immunohistochemistry of myelinated fibers plotted against myelinated fiber density (determined by morphometry) in all the cases studied, except for case number 97044 (insufficient sample to perform immunohistochemistry). Results of immunohistochemistry are presented as the ratio of the number per optic field of immunostained fibers for each class of antibody (neurofilament subunits L and H, and  $\beta$  tubulin). All differences compared to controls are significant ( $p < 0.01$ , Student's  $t$ -test) except for NFL/NFH in case number 0012. Control values: mean of five cases (standard deviations are less than 5%, not represented).

The morphometric and immunocytochemical modifications of the axonal cytoskeleton were not correlated with disease duration. For example: one case with large fiber atrophy lasted for 9 months and another one for 10 years (Table 1). At the opposite, in two cases with degeneration of all diameter fibers, biopsy was performed after 2 months of evolution in one case and after 15 years in the other; nor were the clinical and electrophysiological patterns correlated with one specific class of fiber involvement. Indeed, selective degeneration of large fibers and degeneration of all diameter fibers resulted in the same type of immunohistochemical pattern. Instead, it could be assumed that the density in tubulin labelling increased as soon as selective atrophy of large myelinated fibers was present, with moderate decrease of NFLs and a conserved NFL/NFH density ratio. The decrease of NFL/NFH ratio coincided with myelinated fiber degeneration and was associated with a strong increase in TUB/NFL.

#### 4. Discussion

Morphometric data from our controls were in the ranges previously described [20,22–26]. Although the *g* ratio differed from our control values in six pathologic cases, it remained within normal accepted limits ( $0.6 \pm 10\%$ ) [19,23,27], and its increase in most of our cases of large fiber atrophy or degeneration, could simply reflect the shift to elevated proportions of small fibers which are less myelinated [19,23].

There was no correlation between morphometric data and the duration of the disease, or with a specific topographic distribution of clinical signs (motor versus sensory, upper versus lower limbs, or symmetry versus asymmetric distribution). Electrophysiology was also inaccurate to specify the degree of fiber loss.

In agreement with Trojanowski et al. [15], we found decreased NF immunoreactivity in our cases of axonopathy. Moreover, this decrease correlated with severity as determined by morphometry of myelinated fibers, and in two cases we observed ovoids immunostained with NFLs but also with TUB. The fact that the decrease in NFLs immunolabelling corresponded mostly to degeneration (rather than to atrophy) of fibers could be expected since NFLs represent the major determinant of axonal caliber [5,14,28]. In addition, decrease in NFLs gene expression has been reported in several experimental neuropathies. Nevertheless, a similar decrease of the NFL/NFH ratio has been described only once for NFL mRNAs to our knowledge [5]. For example, NFL and NFM mRNAs decreased after aluminium intoxication but those of NFL or TUB were not altered [12]. In experimental diabetes, NFL and NFH mRNAs were decreased, together with TUB mRNA [13]. Our results also differ from those of Watson et al. [17], who observed a global decrease of NFLs and TUB protein contents with decrease of phosphorylated forms of NFLs, and increase in  $\beta 2$  and  $\beta 3$  TUB isoforms in Charcot–Marie–Tooth disease

type 1. In dorsal root ganglia, mRNAs of the three NFL subunits decreased to the same extent after axotomy [29], whereas NFL mRNA showed a greater decline in motoneurons [6]. Despite these discrepancies concerning the NFL/NFH ratio—which could be related to the type of analysis performed (proteins versus mRNAs)—our observations resemble those of axotomy inducing a decrease of NFLs mRNAs and an increase in  $\beta 2$  TUB mRNA [5,6,30]. In this model, however, TUB and NFLs mRNAs return to control values by 56 days postaxotomy, whereas our cases could be compared to «permanent axotomy» [22,31]. This pattern of elevated density in TUB immunolabelling and decreased NFLs resembles that of developing axons. It is believed to demonstrate that developmental program for cytoskeletal gene expression is recapitulated during axonal regeneration [30,32]. Therefore, we hypothesize that in our cases of axonopathies, the regeneration is still upregulated as indicated by elevated TUB immunoreactivity (except in the two more severe cases), but is ineffective or abortive since NFLs content is not maintained. This could reflect a specific defect in NFLs synthesis, may be through inaccessibility or insufficient growth factor release. From this point of view, it is of interest to note that NFL mRNA decrease has been reported in hypotrophic sympathetic neurons during ageing [33]—but TUB was not studied—and in Alzheimer's disease [34], suggesting that this observation could be a hallmark of axonal degeneration in these pathological conditions as well as in our observations.

In the mutant strain of Japanese quail *Quv*, which do not produce NFL protein due to a nonsense mutation, decreased spinal cord axonal diameters have been reported, while the density of axons and of microtubules appeared increased [35,36]. This resembles our cases with large fiber atrophy, with a shift of the frequency histogram of axonal diameters to small size classes. Apart from this mutant and from NFH-lacZ transgenic mice, in which all NFLs accumulate in the perikarya [37], we are not aware of neuropathies with increased TUB and decreased axonal NFL. Nevertheless, in these transgenic mice, there is no sign of axonal degeneration, whereas in our cases, a decrease of NFL over 50% of control values coincides with axonal degeneration and reduced fiber density. It therefore appears that although reduced NFL content results in axonal atrophy in transgenic mice as well as in acquired neuropathies, its consequences are more dramatic when it occurs in adulthood. Indeed, NFH-lacZ transgenic mice have only a mild phenotype of locomotor impairment and reduction of nerve conduction velocities. The paucity of clinical signs in this mutant strain might also be due to compensatory mechanisms, since they present a hypermyelination of peripheral nerves. Morphometric studies demonstrated that this is not the case in our observations.

Whether axonal atrophy and degeneration represent or not a continuum of the same pathological process, is difficult to assess from morphometric criteria which represent a «snap» of nerve condition. However, it was striking that they result in closely resembling immunocytochemical



patterns that differ mainly by their severity. Clinically, the intensity of nerve insults appeared different since some cases were subacute and others have protracted evolution. Taken together, this suggests that axonal atrophy may precede degeneration as suggested by Dyck et al. [22,31] and that they represent a final common pathway to acute and chronic nerve insults that might be from different types. Axonal atrophy was first reported in uremic neuropathy and Friedreich ataxia and by the study of the permanent axotomy model [22,31]. The sequence of cellular events proposed by Dyck and co-workers was that neuronal or axonal injury may proceed to axonal atrophy, degeneration, or recovery. The role of NF during regeneration is largely controversial since NFL knockout mice [38] and *Quv* quail [39] have a delayed regeneration of sciatic nerves after crush, whereas recovery is accelerated in NFH-lacZ transgenic mice (Eyer, unpublished results). Moreover, a conditioning lesion, which results in a decrease in NFs and an increase in microtubules, accelerates regeneration [40,41].

The hypothesis of disturbances in trophic growth factor supply in these unexplained axonopathies is an exciting one. Indeed, the role of growth factors (GF) in several other neuropathies is now well known. Among the main factors involved until now is insulin-like GF (IGF-I), which mRNAs and receptors are decreased in streptozotocin-induced diabetes [42], and the administration of which prevents neuroaxonal dystrophy in this model [43–45] and in vincristine experimental neuropathy [46]. Furthermore, in diabetes, recombinant human nerve GF (rhNGF) trials demonstrated an improvement of small fiber function [47–49]. In the same way, brain-derived GF (BDNF) [50] and neurotrophin-3 (NT-3) [51] were found diminished in galactose-fed rats, and NT-3 administration improved pyridoxine-induced neuropathy [52]. Interestingly, DeLeo et al. [53] demonstrated that the patterns of interleukin (IL1 $\beta$ ), tumor necrosis factor (TNF $\alpha$ ), transforming GF (TGF $\beta$ ) and basic fibroblast GF (bFGF) elevations varied depending on the type of sciatic nerve injury (freeze lesion versus chronic constriction). Therefore, it may be that scanning GF expression in axonopathies of unknown aetiology will provide specific patterns that could orient towards one or several mechanisms. This hypothesis is under current investigation in our laboratory.

### Acknowledgements

Supported by a grant to C.F. (PHRC #9903) from the University Hospital of Angers.

### References

- [1] Bouche P, Brunet P, Vallat JM. Orientation diagnostique, épidémiologie. In: Bouche P, Vallat JM, editors. *Neuropathies périphériques*. Paris: Doin, 1992. p. 17–41.
- [2] McLeod JG. Investigation in peripheral neuropathy. *J Neurol, Neurosurg Psychiatry* 1995;58:274–83.
- [3] Wolfe GI, Barohn RJ. Cryptogenic sensory and sensorimotor polyneuropathies. *Semin Neurol* 1998;18:105–11.
- [4] Sinicropi DV, McIlwain DL. Changes in the amounts of cytoskeletal proteins within perikarya and axons of regenerating frog motoneurons. *J Cell Biol* 1983;96:240–7.
- [5] Goldstein ME, Cooper HS, Bruce J, Carden MJ, Lee VMY, Schlaepfer WW. Phosphorylation of neurofilament proteins and chromatolysis following transection of rat sciatic nerve. *J Neurosci* 1987;7:1586–94.
- [6] Hoffman PN, Cleveland DN, Griffin JW, Landes PW, Cowan NJ, Price DL. Neurofilament gene expression: a major determinant of axonal caliber. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84: 3472–6.
- [7] Muma NA, Hoffman PN, Slunt HH, Applegate MD, Lieberburg I, Price DL. Alterations in levels of mRNAs coding for neurofilament protein subunits during regeneration. *Exp Neurol* 1990;107:230–5.
- [8] Karlsson JE, Rosengren LE, Haglid KG. Quantitative and qualitative alterations of neuronal and glial intermediate filaments in rat nervous system after exposure to 2,5-hexanedione. *J Neurochem* 1991;57: 1437–44.
- [9] Gold BG, Austin DR. Regulation of aberrant neurofilament phosphorylation in neuronal perikarya: III. Alterations following single and continuous  $\beta$ ,  $\beta'$ -iminodipropionitrile administrations. *Brain Res* 1991; 563:151–62.
- [10] Gold BG, Price DL, Griffin JW, Rosenfeld J, Hoffman PN, Sternberger NH, et al. Neurofilament antigens in acrylamide neuropathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 1988;47:145–57.
- [11] Muma NA, Troncoso JC, Hoffman PN, Koo EH, Price DL. Aluminium neurotoxicity: altered expression of cytoskeletal genes. *Mol Brain Res* 1988;3:115–22.
- [12] Strong MJ, Mao K, Nerurkar VR, Wakayama I, Yanagihara R, Garruto RM. Dose-dependent selective suppression of light (NFL) and medium (NFM) but not heavy (NFH) molecular weight neurofilament mRNA levels in acute aluminium neurotoxicity. *Mol Cell Neurosci* 1994;5:319–26.
- [13] Yagihashi S, Kamijo M, Watanabe K. Reduced myelinated fiber size correlates with loss of axonal neurofilaments in peripheral nerve of chronically streptozotocin diabetic rats. *Am J Pathol* 1990;136: 1365–73.
- [14] Mohiuddin L, Fernyhough P, Tomlinson R. Reduced levels of mRNA encoding endoskeletal and growth-associated proteins in sensory ganglia in experimental diabetes. *Diabetes* 1995;44:25–30.
- [15] Trojanowski JQ, Lee VMY, Schlaepfer WW. Neurofilament breakdown products in degenerating rat and human peripheral nerves. *Ann Neurol* 1984;16:349–55.
- [16] Sobue G, Li M, Terao S, Aoki S, Ichimura M, Ieda T, et al. Axonal pathology in Japanese Guillain-Barré syndrome: a study of 15 autopsied cases. *Neurology* 1997;48:1694–700.
- [17] Watson DF, Nachtman FN, Kuncel RW, Griffin JW. Altered neurofilament phosphorylation and beta tubulin isotypes in Charcot-Marie-Tooth disease type 1. *Neurology* 1994;44:2383–7.
- [18] Fressinaud C, Vigneron I, Letourmel F, Jean I. Cytoskeleton abnormalities in axonopathies of unknown aetiology: resemblance with axotomy. *J Neurochem* 2001;78(Suppl. 1):93. Abstract AP31-03.
- [19] Behse F. Morphometric studies on the human sural nerve. *Acta Neurol Scand* 1990;82(Suppl. 132).
- [20] Thomas PK, Landon DN, King RHM. Diseases of the peripheral nerves. In: Graham DI, Lantos PL, editors. *Greenfield's neuropathology*. 6th ed. London: Arnold, 1997. p. 367–487.
- [21] Riederer BM. Differential phosphorylation of some proteins of the neuronal cytoskeleton during brain development. *Histochem J* 1992; 24:783–90.
- [22] Dyck PJ, Giannini C, Lais A. Pathology of the peripheral nervous system. In: Dyck PJ, Thomas PK, editors. *Peripheral neuropathy*. Philadelphia, PA: Saunders, 1993. p. 514–95.
- [23] Gabreëls-Festen AAWM, Gabreëls FJM, Jennekens FGI, Joosten, E.M.G., Janssen-van Kempen TW. Autosomal recessive form of hereditary motor and sensory neuropathy type 1. *Neurology* 1992;42: 1755–61.



- [24] Thomas PK. The quantitation of nerve biopsy findings. *J Neurol Sci* 1970;11:285–95.
- [25] Thomas PK, Berthold CH, Ochoa J. Microscopic anatomy of the peripheral nervous system. In: Dyck PJ, Thomas PK, editors. *Peripheral neuropathy*. Philadelphia, PA: Saunders, 1993. p. 28–91.
- [26] Vital C, Vallat JM. Morphometric features. In: Vital C, Vallat JM, editors. *Ultrastructural study of the human diseased peripheral nerve*. New York: Elsevier, 1987. p. 21–2.
- [27] Ratinahirana H, Hauw JJ. In: Bouche P, Vallat JM, editors. *Neuropathies périphériques*. Paris: Doin, 1992. p. 98–114.
- [28] Friede RL, Samorajski T. Axon caliber related to neurofilaments and microtubules in sciatic nerve fibers of rats and mice. *Anat Rec* 1970;167:379–88.
- [29] Schwartz ML, Shneidman PS, Bruce J, Schlaepfer WW. Axonal dependency of the postnatal upregulation in neurofilament expression. *J Neurosci Res* 1990;27:193–201.
- [30] Hoffman PN, Cleveland DW. Neurofilament and tubulin expression recapitulates the developmental program during axonal regeneration: induction of a specific  $\beta$ -tubulin isotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:4530–3.
- [31] Dyck PJ, Nukada H, Lais AC, Karnes JL. Permanent axotomy: a model of chronic neuronal degeneration preceded by axonal atrophy, myelin remodeling and degeneration. In: Dyck PJ, Thomas PK, Lambert EH, Bunge R, editors. *Peripheral neuropathy*. 2nd ed. Philadelphia, PA: Saunders, 1984. p. 666–706.
- [32] Schlaepfer WW, Bruce J. Simultaneous up-regulation of neurofilament proteins during the postnatal development of the rat nervous system. *J Neurosci Res* 1990;25:39–49.
- [33] Kuchel GA, Poon T, Irshad K, Richard C, Julien JP, Cowen T. Decreased neurofilament gene expression is an index of selective axonal hypotrophy in ageing. *NeuroReport* 1997;8:799–805.
- [34] Lukiw WJ, McLachlan DR. Chromatin structure and gene expression in Alzheimer's disease. *Mol Brain Res* 1990;7:227–33.
- [35] Ohara O, Gahara Y, Miyake T, Teraoka H, Kitamura T. Neurofilament deficiency in quail caused by nonsense mutation in neurofilament-L gene. *J Cell Biol* 1993;121:387–95.
- [36] Yamasaki H, Itakura C, Mizutani M. Hereditary hypotrophic axonopathy with neurofilament deficiency in a mutant strain of Japanese quail. *Acta Neuropathol* 1991;82:427–34.
- [37] Eyer J, Peterson A. Neurofilament-deficient axons and perikaryal aggregates in viable transgenic mice expressing a neurofilament-*b*-galactosidase fusion protein. *Neuron* 1994;12:389–405.
- [38] Zhu GS, Couillard-Despres S, Julien JP. Delayed maturation of regenerating myelinated axons in mice lacking neurofilaments. *Exp Neurol* 1997;148:299–316.
- [39] Jiang XM, Zhao JX, Ohnishi A, Itakura C, Mizutani M, Yamamoto T, et al. Regeneration of myelinated fiber after crush injury is retarded in sciatic nerves of mutant Japanese quails deficient in neurofilaments. *Acta Neuropathol (Berlin)* 1996;92:467–72.
- [40] Oblinger MM, Lasek RJ. A conditioning lesion of the peripheral axons of dorsal root ganglion cells accelerates regeneration of only their peripheral axons. *J Neurosci* 1984;4:1736–44.
- [41] Oblinger MM. Axotomy-induced changes in the expression of a type III neuronal intermediate filament gene. *J Neurosci* 1989;9:3766–75.
- [42] Bitar MS, Pilcher CW, Khan I, Waldbillig RJ. Diabetes-induced suppression of IGF-I and its receptor mRNA levels in rat superior cervical ganglia. *Diabetes Res Clin Pract* 1997;38:73–80.
- [43] Schmidt RE, Dorsey DA, Beaudet LN, Plurad SB, Parvin CA, Miller MS. Insulin-like growth factor I reverses diabetic autonomic neuropathy. *Am J Pathol* 1999;155:1651–60.
- [44] Zhuang HX, Snyder CK, Pu SF, Ishii DN. Insulin-like growth factor reverse or arrest diabetic neuropathy: effects on hyperalgesia and impaired nerve regeneration in rats. *Exp Neurol* 1996;140:198–205.
- [45] Zhuang HX, Wuarin L, Fei ZJ, Ishii DN. Insulin-like growth factor (IGF) gene expression is reduced in neural tissues and liver from rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus, and IGF-I treatment ameliorates diabetic neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;283:366–74.
- [46] Contreras PC, Vaught JL, Gruner JA, Brosnan C, Steffler C, Arezzo JC, et al. Insulin-like growth factor-I prevents development of a vincristine neuropathy in mice. *Brain Res* 1997;774:20–6.
- [47] Apfel SC, Kessler JA, Adornato BT, Litchy WJ, Sanders C, Rask CA. Recombinant human nerve growth factor in the treatment of diabetic polyneuropathy. NGF study group. *Neurology* 1998;51:695–702.
- [48] Elias KA, Cronin MJ, Stewart TA, Carlsen RC. Peripheral neuropathy in transgenic diabetic mice: restoration of C-fiber function with human recombinant nerve growth factor. *Diabetes* 1998;47:1637–42.
- [49] Freeman R. Human studies of recombinant human nerve growth factor and diabetic peripheral neuropathy. *Eur Neurol* 1999;41(Suppl. 1):20–6.
- [50] Mizisin AP, Bache M, DiStefano PS, Acheson A, Lindsay RM, Calcutt NA. BDNF attenuates functional and structural disorders in nerves of galactose-fed rats. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997;57:803–13.
- [51] Mizisin AP, Kalichman MW, Bache M, Dines KC, DiStefano PS. NT-3 attenuates functional and structural disorders in sensory nerves of galactose-fed rats. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998;57:803–13.
- [52] Helgren ME, Cliffer KD, Torrento K, Cavnor C, Curtis R, DiStefano PS, et al. Neurotrophin-3 administration attenuates deficits of pyridoxine-induced large-fiber sensory neuropathy. *J Neurosci* 1997;17:372–82.
- [53] DeLeo JA, Colburn RW, Rickman AJ. Cytokine, and growth factor immunohistochemical spinal profiles in two animal models of mono-neuropathy. *Brain Res* 1997;759:50–7.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les travaux effectués au cours cette thèse concernent le cytosquelette des neurones et plus particulièrement les Neurofilaments. Ils avaient comme objectifs de mieux comprendre le métabolisme physiologique de ces FI spécifiques des cellules neuronales (1<sup>ère</sup> partie) et leur possible implication en pathologie (2<sup>nd</sup> partie).

### **La protéine de fusion NFHGFP : un outil pour étudier le métabolisme physiologique et pathologique des NFs.**

L'expression de la sous unité lourde des NFs, NFH, traduit au même titre que celle des deux autres sous unités (NFL et NFM), la différenciation terminale des neurones en participant notamment à l'acquisition du diamètre définitif de l'axone. Néanmoins leurs fonctions précises restent mal élucidées, alors que la perturbation de leur métabolisme, aboutissant souvent à leur accumulation, apparaît impliquée dans la physiopathologie de maladies neurodégénératives. Dans un modèle murin préalablement créé au laboratoire, il avait été montré que la protéine de fusion entre NFH et la  $\beta$ -galactosidase (NFHLacZ) provoquait, chez l'animal, une accumulation massive des Neurofilaments dans le péricaryon et leur disparition quasi complète du compartiment axonal. Pour autant l'étude du développement neuronal, sur les plans morphologique et cellulaire, et de la durée de vie des animaux ne mettait pas en évidence d'anomalies majeures. Devant l'impossibilité d'utiliser ce modèle, en raison de l'absence de NFs dans l'axone, pour étudier le métabolisme normal des NFs nous avons donc remplacé dans la protéine de fusion, la  $\beta$ -galactosidase par la GFP. L'étude des souris transgéniques (NFHGFP) ainsi obtenues a démontré l'existence, d'une part également un phénotype normal mais avec d'autre part, point important, la présence d'un transport axonal des NFs jusqu'à la synapse. L'étude des souris NFHGFP confirme par ailleurs que l'agrégation observée chez les souris NFHLacZ est secondaire à la présence du rapporteur. Elles soulignent également que la partie C-terminale, chargée, en aval des répétitions KSP, n'apparaît pas être fondamentale au transport de NFH.

Ces souris NFHGFP peuvent servir d'outil pour comprendre les mécanismes impliqués dans la différenciation neuronale et dans les phénomènes de neurodégénérescence/régénérescence. Dans ce sens nous avons élaboré plusieurs axes d'approche :

- *dans les interactions axonomyéliniques* : Les différentes données expérimentales et humaines montrent que la perturbation du métabolisme de la myéline retentit sur l'axone. Cela a particulièrement été montré dans la Sclérose En Plaque, où le handicap clinique est très nettement

corrélé à la perte axonale. Des expériences de démyélinisation traumatique (écrasement du nerf sciatique), chimique (injection de LPS dans le corps calleux) ou immunologiques (immunisation avec le MBP) vont être débutées chez les souris NFHGFP. Ces souris seront ensuite étudiées (*in vivo* ou après sacrifice) afin, de quantifier morphologiquement et moléculairement les modifications de l'expression du rapporteur GFP et celles des partenaires, composants du cytosquelette et de la myéline.

- ***dans la sensibilité aux anesthésiques*** : De nombreuses données obtenues chez l'animal ou *in vitro*, montrent que les agents anesthésiques exercent des modifications biochimiques et électrophysiologiques au niveau de structures cérébrales. Ils agissent par l'intermédiaire des récepteurs NMDA et GABA, mais leur rôle à l'échelle moléculaire, et les conséquences sur le développement neuronal, restent difficiles à établir. Des études récentes suggèrent que les anesthésiques ont soit des effets neuroprotecteurs, comme dans les traumatismes crâniens graves, soit dans certains cas favorisent la neurodégénérescence, chez les nouveaux nés par exemple. Afin de tester cette dernière hypothèse, nous allons soumettre des femelles NFHGFP gestantes, et leurs portées, à différents anesthésiques utilisés en pratique courante. La possibilité, chez ces souris, de repérer facilement les neurones et leurs prolongements, devrait nous renseigner à l'échelon cellulaire et moléculaire, sur des éventuelles modifications induites (mort neuronale, altération de l'arbre dendritique, synaptogenèse...). Plusieurs études dans la littérature ont montré que les NFs, essentiellement NFM et NFL, étaient capables de se lier à des récepteurs (NMDA et D1) et de contrôler leur répartition. Dans le même sens, nos expériences préliminaires montrent que les souris NFHLacZ se comportent différemment des souris témoins, ainsi que des souris NFHGFP, lorsqu'elles sont soumises à l'action de différents anesthésiques. Nos résultats sur l'étude de leur comportement, mais aussi sur la quantification biochimique de différents récepteurs (NMDA et GABA), montrent une sensibilité accrue aux GABAergiques. Ces données préliminaires supportent l'hypothèse que la modification de NFH pourrait également intervenir dans l'expression de ces récepteurs.

- ***pour l'étude de la différenciation*** : Les étapes de la neurogenèse commencent à mieux être appréhendées. A travers des cultures primaires de neurones, issus de la zone sous ventriculaire et de l'hippocampe, nous allons pouvoir détailler les étapes morphologiques de la neurogenèse et tester les facteurs de transcription nécessaires aux différents stades. Ces expériences vont également permettre l'isolement de neurones, par l'apparition du fluorochrome, afin de mettre en place des greffes de ces cellules chez des souris normales ou dont les cellules neuronales et/ou astrogliales seront déficitaires. La capacité de dériver des cellules d'un tissu donné à partir d'un autre, ou transdifférenciation, apparaît être une voie d'avenir dans la thérapie cellulaire. Il est actuellement possible d'obtenir la formation de neurones à partir de fibroblastes. De telles expériences sont en cours, en collaboration, à partir de cellules issues de la moelle osseuse.

- *pour l'étude des interactions intracellulaires* : parallèlement à la lignée de souris NFHGFP, nous avons établi une lignée de souris transgéniques, « DsRed-mito ». Ces souris expriment le rapporteur fluorescent DsRed2 dans leurs mitochondries, grâce à une séquence d'adressage spécifique. Les premières études montrent que ces souris se comportent normalement, qu'il n'existe pas d'altération biochimique de la chaîne respiratoire, qu'il existe une expression du fluorochrome dans les tissus (notamment dans des fibroblastes primaires en culture). Les mitochondries ont un rôle important dans la neurogenèse, dans la mise en place du cône de croissance, dans le maintien de l'axone et dans le développement de maladies neurodégénératives. Le croisement de ces souris, avec les souris NFHLacZ et NFHGFP, permettra d'étudier le comportement des mitochondries lors de la perturbation du cytosquelette.

### **L'intron 2 intervient dans le contrôle spatial de *NFH***

Les séquences non codantes intragéniques commencent à être bien étudiées. Il est maintenant démontré qu'elles participent au contrôle de l'expression de nombreuses protéines. Elles sont aussi impliquées dans l'apparition de maladies neurodégénératives, caractérisées alors par des mutations introniques. Notre étude permet de souligner le rôle, *in vitro* et *in vivo*, du second intron de *NFH* dans sa régulation spatiale et temporelle.

Nous allons maintenant chercher, par délétions, mutagenèse dirigée..., le ou les éléments nécessaires à ce contrôle, et ainsi en déduire, par analyse comparative bioinformatique, le ou les facteurs de transcription neuronaux impliqués. Les études expérimentales en culture de cellules concernant la régulation des filaments intermédiaires, et notamment de *NFL*, indiquent qu'il existe une coopération entre les introns entre eux mais aussi avec le promoteur. Nous allons donc chercher si les introns de *NFH* coopèrent dans son expression. L'objectif est, outre la compréhension des mécanismes de la régulation de *NFH*, d'explorer chez des patients atteints de SLA, la présence d'altération des introns pouvant expliquer, en partie, les accumulations particulières observées.

### **La protéine STOP : un partenaire inattendu des NFs dont la distribution est modifiée dans la Sclérose Latérale Amyotrophique.**

Les neurones contiennent une quantité abondante de Microtubules, dont la caractéristique est d'être résistant à la dépolymérisation induite par le froid. Cette propriété apparaît être indispensable à leur développement. Cette faculté est sous le contrôle de protéines particulières, les protéines STOP. Dans un travail récent nous avons montré que chez les souris, STOP était également associée aux NFs et que sa distribution était altérée chez les souris NFHLacZ, où elle se trouvait accumulée dans le corps cellulaire des neurones. Des résultats, issus d'un travail bioinformatique, avaient suggéré la présence de forme humaine de STOP. Nous avons confirmé biologiquement, à partir de tissus

humains, que plusieurs isoformes (fibroblastiques et neuronales) étaient détectées, et que STOP se trouvait systématiquement accumulée dans les sphéroïdes de patients SLA. Ces structures correspondent à des dilatations proximales de l'axone contenant également des NFs. Chez l'animal invalidé génétiquement pour STOP (KO STOP -/-), il existe uniquement des troubles du comportement en rapport avec des anomalies synaptiques. L'accumulation de STOP dans les sphéroïdes aurait pour conséquence sa disparition de la terminaison de l'axone et pourrait ainsi expliquer les modifications synaptiques décrites dans la SLA.

En collaboration avec l'UF de cytogénétique (Pr. D.Bonneau), nous avons ainsi entrepris le séquençage du gène humain, sur de l'ADN lymphocytaire issue de 30 SLA et 30 témoins, en commençant par l'exon 4 qui code pour le domaine spécifique de la forme neuronale de STOP, sans mettre en évidence de modification de type mutation, insertion ou délétion. Le travail va se poursuivre en étendant les recherches à l'ensemble du gène, notamment à la recherche de SNPs, comme décrit dans la schizophrénie. Enfin, l'objectif est d'étendre l'analyse de la répartition de STOP dans d'autres maladies neurodégénératives. Nos résultats préliminaires font état d'une accumulation de cette protéine dans les Dégénérescences Neurofibrillaires de patients atteints de maladie d'Alzheimer et dans les corps de Lewy de patients atteints de maladie de Parkinson.

### **Les neuropathies de cause indéterminée adoptent un profil évocateur de régénérescence inefficace.**

Dans 20% des cas aucune cause n'est mise en évidence dans les neuropathies de type axonal, malgré une recherche exhaustive. A partir de 9 cas, nous nous sommes intéressés au profil d'expression protéique par immunohistochimie quantitative des différents composés du cytosquelette de l'axone. Nous montrons ainsi que les axones adoptent un profil de régénération incomplète et/ou insuffisante. En effet tout se passe comme si l'axone restait à l'état de reformation du cône de croissance, décrit *in vitro* et chez l'animal. Il apparaît y avoir une augmentation des MT accompagnée d'une baisse des NFs. Ainsi une axotomie permanente serait réalisée. S'ils n'apportent pas d'éléments étiologiques, ces résultats permettent d'expliquer sur le plan physiopathologique la persistance d'une axonopathie. Nous allons maintenant étendre cette étude à des neuropathies dont la cause est connue, et à des neuropathies liées à une atteinte primitive de la myéline.

## **RÉFÉRENCES**

## A

- Abe, K., L. H. Pan, M. Watanabe, H. Konno, T. Kato and Y. Itoyama (1997). Upregulation of protein-tyrosine nitration in the anterior horn cells of amyotrophic lateral sclerosis. **Neurol Res** 19(2): 124-8.
- Ackerley, S., A. J. Grierson, J. Brownlees, P. Thornhill, B. H. Anderton, P. N. Leigh, C. E. Shaw and C. C. Miller (2000). Glutamate slows axonal transport of neurofilaments in transfected neurons. **J Cell Biol** 150(1): 165-76.
- Ackerley, S., P. Thornhill, A. J. Grierson, J. Brownlees, B. H. Anderton, P. N. Leigh, C. E. Shaw and C. C. Miller (2003). Neurofilament heavy chain side arm phosphorylation regulates axonal transport of neurofilaments. **J Cell Biol** 161(3): 489-95.
- Ackerley, S., A. J. Grierson, S. Banner, M. S. Perkinson, J. Brownlees, H. L. Byers, M. Ward, P. Thornhill, K. Hussain, J. S. Waby, B. H. Anderton, J. D. Cooper, C. Dingwall, P. N. Leigh, C. E. Shaw and C. C. Miller (2004). p38alpha stress-activated protein kinase phosphorylates neurofilaments and is associated with neurofilament pathology in amyotrophic lateral sclerosis. **Mol Cell Neurosci** 26(2): 354-64.
- Aguezzoul, M., A. Andrieux and E. Denarier (2003). Overlap of promoter and coding sequences in the mouse STOP gene (Mtap6). **Genomics** 81(6): 623-7.
- Aguirre, T., L. Van Den Bosch, K. Goetschalckx, P. Tilkin, G. Mathijs, J. J. Cassiman and W. Robberecht (1998). Increased sensitivity of fibroblasts from amyotrophic lateral sclerosis patients to oxidative stress. **Ann Neurol** 43(4): 452-7.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter (2002). *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing.
- Al-Chalabi, A., P. M. Andersen, P. Nilsson, B. Chioza, J. L. Andersson, C. Russ, C. E. Shaw, J. F. Powell and P. N. Leigh (1999). Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis. **Hum Mol Genet** 8(2): 157-64.
- Al-Chalabi, A. and C. C. Miller (2003). Neurofilaments and neurological disease. **Bioessays** 25(4): 346-55.
- Alves-Rodrigues, A., L. Gregori and M. E. Figueiredo-Pereira (1998). Ubiquitin, cellular inclusions and their role in neurodegeneration. **Trends Neurosci** 21(12): 516-20.
- Andrieux, A., P. A. Salin, M. Vernet, P. Kujala, J. Baratier, S. Gory-Faure, C. Bosc, H. Pointu, D. Proietto, A. Schweitzer, E. Denarier, J. Klumperman and D. Job (2002). The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. **Genes Dev** 16(18): 2350-64.
- Arai, T., M. Hasegawa, Akiyama, H. Ikeda, K. Nonaka, T. Mori, H. Mann, D. Tsuchiya, K. Yoshida, M. Hashizume, Y. Oda, T. et al. (2006). "TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. **Biochem Biophys Res Commun** 351(3): 602-11.
- Aranda-Espinoza, H., P. Carl, J. F. Leterrier, P. Janmey and D. E. Discher (2002). Domain unfolding in neurofilament sidearms: effects of phosphorylation and ATP. **FEBS Lett** 531(3): 397-401.
- Avwenagha, O., G. Campbell and Bird, M. M. (2003). Distribution of GAP-43, beta-III tubulin and F-actin in developing and regenerating axons and their growth cones in vitro, following neurotrophin treatment. **J Neurocytol** 32(9): 1077-89.

## B

- Baas, P. W. and D. W. Buster (2004). Slow axonal transport and the genesis of neuronal morphology. **J Neurobiol** 58(1): 3-17.
- Bajo, M., B. C. Yoo, N. Cairns, M. Gratzner and G. Lubec (2001). Neurofilament proteins NF-L, NF-M and NF-H in brain of patients with Down syndrome and Alzheimer's disease. **Amino Acids** 21(3): 293-301.

- Balin, B. J., E. A. Clark, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (1991a). Neurofilament reassembly in vitro: biochemical, morphological and immuno-electron microscopic studies employing monoclonal antibodies to defined epitopes. **Brain Res** 556(2): 181-95.
- Balin, B. J. and V. M. Lee (1991b). Individual neurofilament subunits reassembled in vitro exhibit unique biochemical, morphological and immunological properties. **Brain Res** 556(2): 196-208.
- Banik, N. L., D. C. Matzelle, G. Gantt-Wilford, A. Osborne and E. L. Hogan (1997). Increased calpain content and progressive degradation of neurofilament protein in spinal cord injury. **Brain Res** 752(1-2): 301-6.
- Beal, M. F., R. J. Ferrante, S. E. Browne, R. T. Matthews, N. W. Kowall and R. H. Brown, Jr. (1997). Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. **Ann Neurol** 42(4): 644-54.
- Beaudet, L., G. Charron, D. Houle, I. Tretjakoff, A. Peterson and J. P. Julien (1992). Intragenic regulatory elements contribute to transcriptional control of the neurofilament light gene. **Gene** 116(2): 205-14.
- Beaulieu, J. M., M. D. Nguyen and J. P. Julien (1999a). Late onset of motor neurons in mice overexpressing wild-type peripherin. **J Cell Biol** 147(3): 531-44.
- Beaulieu, J. M., J. Robertson and J. P. Julien (1999b). Interactions between peripherin and neurofilaments in cultured cells: disruption of peripherin assembly by the NF-M and NF-H subunits. **Biochem Cell Biol** 77(1): 41-5.
- Beaulieu, J. M., H. Jacomy and J. P. Julien (2000). Formation of intermediate filament protein aggregates with disparate effects in two transgenic mouse models lacking the neurofilament light subunit. **J Neurosci** 20(14): 5321-8.
- Beaulieu, J. M. and J. P. Julien (2003). Peripherin-mediated death of motor neurons rescued by overexpression of neurofilament NF-H proteins. **J Neurochem** 85(1): 248-56.
- Belecky-Adams, T., D. C. Wight, J. J. Kopchick and L. M. Parysek (1993). Intragenic sequences are required for cell type-specific and injury-induced expression of the rat peripherin gene. **J Neurosci** 13(12): 5056-65.
- Belecky-Adams, T., M. Holmes, Y. Shan, C. S. Tedesco, C. Mascari, A. Kaul, D. C. Wight, R. E. Morris, M. Sussman, J. Diamond and L. M. Parysek (2003). An intact intermediate filament network is required for collateral sprouting of small diameter nerve fibers. **J Neurosci** 23(28): 9312-9.
- Bendotti, C. and M. T. Carri (2004). Lessons from models of SOD1-linked familial ALS. **Trends Mol Med** 10(8): 393-400.
- Blumenberg, M. (1989). Evolution of homologous domains of cytoplasmic intermediate filament proteins and lamins. **Mol Biol Evol** 6(1): 53-65.
- Bolino, A., M. Muglia, F. L. Conforti, E. LeGuern, M. A. Salih, D. M. Georgiou, K. Christodoulou, I. Hausmanowa-Petrusewicz, P. Mandich, A. Schenone, A. Gambardella, F. Bono, A. Quattrone, M. Devoto and A. P. Monaco (2000). Charcot-Marie-Tooth type 4B is caused by mutations in the gene encoding myotubularin-related protein-2. **Nat Genet** 25(1): 17-9.
- Bomont, P., L. Cavalier, F. Blondeau, C. Ben Hamida, S. Belal, M. Tazir, E. Demir, H. Topaloglu, R. Korinthenberg, B. Tuysuz, P. Landrieu, F. Hentati and M. Koenig (2000). The gene encoding gigaxonin, a new member of the cytoskeletal BTB/kelch repeat family, is mutated in giant axonal neuropathy. **Nat Genet** 26(3): 370-4.
- Bomont, P., C. Ioos, C. Yalcinkaya, R. Korinthenberg, J. M. Vallat, S. Assami, A. Munnich, B. Chabrol, G. Kurlemann, M. Tazir and M. Koenig (2003a). Identification of seven novel mutations in the GAN gene. **Hum Mutat** 21(4): 446.
- Bomont, P. and M. Koenig (2003b). Intermediate filament aggregation in fibroblasts of giant axonal neuropathy patients is aggravated in non dividing cells and by microtubule destabilization. **Hum Mol Genet** 12(8): 813-22.
- Bonnet, C., E. Denarier, C. Bosc, S. Lazereg, P. Denoulet and J. C. Larcher (2002). Interaction of STOP with neuronal tubulin is independent of polyglutamylation. **Biochem Biophys Res Commun** 297(4): 787-93.
- Bosc, C., J. D. Cronk, F. Pirollet, D. M. Watterson, J. Haiech, D. Job and R. L. Margolis (1996). Cloning, expression, and properties of the microtubule-stabilizing protein STOP. **Proc Natl Acad Sci U S A** 93(5): 2125-30.
- Bosc, C., E. Oenarier, A. Andrieux and D. Job (1999). STOP proteins. **Cell Struct Funct** 24(5): 393-9.
- Bosc, C., R. Frank, E. Denarier, M. Ronjat, A. Schweitzer, J. Wehland and D. Job (2001). Identification of novel bifunctional calmodulin-binding and microtubule-stabilizing motifs in STOP proteins. **J Biol Chem** 276(33): 30904-13.



- Bosc, C., A. Andrieux and D. Job (2003). STOP proteins. **Biochemistry** 42(42): 12125-32.
- Bouvier, D., C. Vanhaverbeke, J. P. Simorre, G. J. Arlaud, I. Bally, V. Forge, R. L. Margolis, P. Gans and J. P. Kleman (2003). Unusual Ca<sup>2+</sup>-calmodulin binding interactions of the microtubule-associated protein F-STOP. **Biochemistry** 42(39): 11484-93.
- Bouwman, P. and S. Philipsen (2002). Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. **Mol Cell Endocrinol** 195(1-2): 27-38.
- Brandt, R. (2001). Cytoskeletal mechanisms of neuronal degeneration. **Cell Tissue Res** 305(2): 255-65.
- Brettschneider, J., A. Petzold, S. D. Sussmuth, A. C. Ludolph and H. Tumani (2006). Axonal damage markers in cerebrospinal fluid are increased in ALS. **Neurology** 66(6): 852-6.
- Brinster, R. L., J. M. Allen, R. R. Behringer, R. E. Gelinas and R. D. Palmiter (1988). Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. **Proc Natl Acad Sci U S A** 85(3): 836-40.
- Brooks, B. R. (1994). El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis workshop contributors. **J Neurol Sci** 124 Suppl: 96-107.
- Brown, A. (1998). Contiguous phosphorylated and non-phosphorylated domains along axonal neurofilaments. **J Cell Sci** 111 ( Pt 4): 455-67.
- Brown, H. G. and J. H. Hoh (1997). Entropic exclusion by neurofilament sidearms: a mechanism for maintaining interfilament spacing. **Biochemistry** 36(49): 15035-40.
- Brown, H. G., J. C. Troncoso and J. H. Hoh (1998). Neurofilament-L homopolymers are less mechanically stable than native neurofilaments. **J Microsc** 191(3): 229-237.
- Brownlees, J., A. Yates, N. P. Bajaj, D. Davis, B. H. Anderton, P. N. Leigh, C. E. Shaw and C. C. Miller (2000). Phosphorylation of neurofilament heavy chain side-arms by stress activated protein kinase-1b/Jun N-terminal kinase-3. **J Cell Sci** 113 ( Pt 3): 401-7.
- Brun, P., M. Begou, A. Andrieux, L. Mouly-Badina, M. Clerget, A. Schweitzer, H. Scarna, B. Renaud, D. Job and M. F. Suaud-Chagny (2005). Dopaminergic transmission in STOP null mice. **J Neurochem** 94(1): 63-73.
- Bruno, C., E. Bertini, A. Federico, E. Tonoli, M. L. Lispi, D. Cassandrini, M. Pedemonte, F. M. Santorelli, M. Filocamo, M. T. Dotti, A. Schenone, A. Malandrini and C. Minetti (2004). Clinical and molecular findings in patients with giant axonal neuropathy (GAN). **Neurology** 62(1): 13-6.

## C

- Cairns, N. J., K. Uryu, E. H. Bigio, I. R. Mackenzie, M. Gearing, C. Duyckaerts, H. Yokoo, Y. Nakazato, E. Jaros, R. H. Perry, S. E. Arnold, V. M. Lee and J. Q. Trojanowski (2004). alpha-Internexin aggregates are abundant in neuronal intermediate filament inclusion disease (NIFID) but rare in other neurodegenerative diseases. **Acta Neuropathol (Berl)** 108(3): 213-23.
- Campagnoni, A. T., T. M. Pribyl, C. W. Campagnoni, K. Kampf, S. Amur-Umarjee, C. F. Landry, V. W. Handley, S. L. Newman, B. Garbay and K. Kitamura (1993). Structure and developmental regulation of Golli-mbp, a 105-kilobase gene that encompasses the myelin basic protein gene and is expressed in cells in the oligodendrocyte lineage in the brain. **J Biol Chem** 268(7): 4930-8.
- Canete-Soler, R., D. G. Silberg, M. D. Gershon and W. W. Schlaepfer (1999). Mutation in neurofilament transgene implicates RNA processing in the pathogenesis of neurodegenerative disease. **J Neurosci** 19(4): 1273-83.

- Carden, M. J., J. Q. Trojanowski, W. W. Schlaepfer and V. M. Lee (1987). Two-stage expression of neurofilament polypeptides during rat neurogenesis with early establishment of adult phosphorylation patterns. **J Neurosci** 7(11): 3489-504.
- Carter, J., A. Gragerov, K. Konvicka, G. Elder, H. Weinstein and R. A. Lazzarini (1998). Neurofilament (NF) assembly; divergent characteristics of human and rodent NF-L subunits. **J Biol Chem** 273(9): 5101-8.
- Casanova, L., A. Bravo, F. Were, A. Ramirez, J. J. Jorcano and M. Vidal (1995). Tissue-specific and efficient expression of the human simple epithelial keratin 8 gene in transgenic mice. **J Cell Sci** 108 ( Pt 2): 811-20.
- Chan, R. Y., C. Boudreau-Lariviere, L. M. Angus, F. A. Mankal and B. J. Jasmin (1999). An intronic enhancer containing an N-box motif is required for synapse- and tissue-specific expression of the acetylcholinesterase gene in skeletal muscle fibers. **Proc Natl Acad Sci U S A** 96(8): 4627-32.
- Chan, W. K., J. T. Yabe, A. F. Pimenta, D. Ortiz and T. B. Shea (2003). Growth cones contain a dynamic population of neurofilament subunits. **Cell Motil Cytoskeleton** 54(3): 195-207.
- Chang, L. and R. D. Goldman (2004). Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. **Nat Rev Mol Cell Biol** 5(8): 601-13.
- Chapin, S. J., C. M. Lue, M. T. Yu and J. C. Bulinski (1995). Differential expression of alternatively spliced forms of MAP4: a repertoire of structurally different microtubule-binding domains. **Biochemistry** 34(7): 2289-301.
- Charron, G., L. G. Guy, M. Bazinet and J. P. Julien (1995). Multiple neuron-specific enhancers in the gene coding for the human neurofilament light chain. **J Biol Chem** 270(51): 30604-10.
- Chertoff, R., L. Soussan, H. Roder and D. M. Michaelson (1995). Phosphorylation and dephosphorylation of distinct isoforms of the heavy neurofilament protein NF-H. **Cell Mol Neurobiol** 15(2): 269-81.
- Chien, C. L. and R. K. Liem (1994). Characterization of the mouse gene encoding the neuronal intermediate filament protein alpha-internexin. **Gene** 149(2): 289-92.
- Chin, S. S., P. Macioce and R. K. Liem (1991). Effects of truncated neurofilament proteins on the endogenous intermediate filaments in transfected fibroblasts. **J Cell Sci** 99 ( Pt 2): 335-50.
- Ching, G. Y. and R. K. Liem (1991). Structure of the gene for the neuronal intermediate filament protein alpha-internexin and functional analysis of its promoter. **J Biol Chem** 266(29): 19459-68.
- Ching, G. Y. and R. K. Liem (1993). Assembly of type IV neuronal intermediate filaments in nonneuronal cells in the absence of preexisting cytoplasmic intermediate filaments. **J Cell Biol** 122(6): 1323-35.
- Ching, G. Y., C. L. Chien, R. Flores and R. K. Liem (1999). Overexpression of alpha-internexin causes abnormal neurofilamentous accumulations and motor coordination deficits in transgenic mice. **J Neurosci** 19(8): 2974-86.
- Chou, S. M., H. S. Wang and K. Komai (1996). Colocalization of NOS and SOD1 in neurofilament accumulation within motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis: an immunohistochemical study. **J Chem Neuroanat** 10(3-4): 249-58.
- Chou, S. M. (1997). Neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis: new perspectives on an old disease. **J Formos Med Assoc** 96(7): 488-98.
- Chou, S. M., H. S. Wang, A. Taniguchi and R. Bucala (1998). Advanced glycation endproducts in neurofilament conglomeration of motoneurons in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **Mol Med** 4(5): 324-32.
- Chou, Y. H. and R. D. Goldman (2000). Intermediate filaments on the move. **J Cell Biol** 150(3): F101-6.
- Cifuentes-Diaz, C., S. Nicole, M. E. Velasco, C. Borra-Cebrian, C. Panozzo, T. Frugier, G. Millet, N. Roblot, V. Joshi and J. Melki (2002). Neurofilament accumulation at the motor endplate and lack of axonal sprouting in a spinal muscular atrophy mouse model. **Hum Mol Genet** 11(12): 1439-47.
- Cleverley, K. E., J. C. Betts, W. P. Blackstock, J. M. Gallo and B. H. Anderton (1998). Identification of novel in vitro PKA phosphorylation sites on the low and middle molecular mass neurofilament subunits by mass spectrometry. **Biochemistry** 37(11): 3917-30.

- Cochard, P. and D. Paulin (1984). Initial expression of neurofilaments and vimentin in the central and peripheral nervous system of the mouse embryo in vivo. **J Neurosci** 4(8): 2080-94.
- Cote, F., J. F. Collard and J. P. Julien (1993). Progressive neuronopathy in transgenic mice expressing the human neurofilament heavy gene: a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **Cell** 73(1): 35-46.
- Couillard-Despres, S., Q. Zhu, P. C. Wong, D. L. Price, D. W. Cleveland and J. P. Julien (1998). Protective effect of neurofilament heavy gene overexpression in motor neuron disease induced by mutant superoxide dismutase. **Proc Natl Acad Sci U S A** 95(16): 9626-30.
- Couillard-Despres, S., J. Meier and J. P. Julien (2000). Extra axonal neurofilaments do not exacerbate disease caused by mutant Cu,Zn superoxide dismutase. **Neurobiol Dis** 7(4): 462-70.
- Cui, C., P. J. Stambrook and L. M. Parysek (1995). Peripherin assembles into homopolymers in SW13 cells. **J Cell Sci** 108 ( Pt 10): 3279-84.
- Cvetkovic, B., B. Yang, R. A. Williamson and C. D. Sigmund (2000). Appropriate tissue- and cell-specific expression of a single copy human angiotensinogen transgene specifically targeted upstream of the HPRT locus by homologous recombination. **J Biol Chem** 275(2): 1073-8.

## D

- Dahlstrand, J., L. B. Zimmerman, R. D. McKay and U. Lendahl (1992). Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments. **J Cell Sci** 103 ( Pt 2): 589-97.
- Dashiell, S. M., S. L. Tanner, H. C. Pant and R. H. Quarles (2002). Myelin-associated glycoprotein modulates expression and phosphorylation of neuronal cytoskeletal elements and their associated kinases. **J Neurochem** 81(6): 1263-72.
- De Jonghe, P., I. Mersivanova, E. Nelis, J. Del Favero, J. J. Martin, C. Van Broeckhoven, O. Evgrafov and V. Timmerman (2001). Further evidence that neurofilament light chain gene mutations can cause Charcot-Marie-Tooth disease type 2E. **Ann Neurol** 49(2): 245-9.
- de Souza, S. J. (2003). The emergence of a synthetic theory of intron evolution. **Genetica** 118(2-3): 117-21.
- de Waegh, S. M., V. M. Lee and S. T. Brady (1992). Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. **Cell** 68(3): 451-63.
- Dehmelt, L. and S. Halpain (2004). Actin and microtubules in neurite initiation: are MAPs the missing link? **J Neurobiol** 58(1): 18-33.
- Denarier, E., M. Aguezoul, C. Jolly, C. Vourc'h, A. Roure, A. Andrieux, C. Bosc and D. Job (1998a). Genomic structure and chromosomal mapping of the mouse STOP gene (Mtap6). **Biochem Biophys Res Commun** 243(3): 791-6.
- Denarier, E., A. Fourest-Lieuvin, C. Bosc, F. Pirollet, A. Chapel, R. L. Margolis and D. Job (1998b). Nonneuronal isoforms of STOP protein are responsible for microtubule cold stability in mammalian fibroblasts. **Proc Natl Acad Sci U S A** 95(11): 6055-60.
- Desmarais, D., M. Fillion, L. Lapointe and A. Royal (1992). Cell-specific transcription of the peripherin gene in neuronal cell lines involves a cis-acting element surrounding the TATA box. **Embo J** 11(8): 2971-80.
- Dhe-Paganon, S., E. D. Werner, Y. I. Chi and S. E. Shoelson (2002). Structure of the globular tail of nuclear lamin. **J Biol Chem** 277(20): 17381-4.
- Dodemont, H., D. Riemer and K. Weber (1990). Structure of an invertebrate gene encoding cytoplasmic intermediate filament (IF) proteins: implications for the origin and the diversification of IF proteins. **Embo J** 9(12): 4083-94.
- Dong, D. L., Z. S. Xu, M. R. Chevrier, R. J. Cotter, D. W. Cleveland and G. W. Hart (1993). Glycosylation of mammalian neurofilaments. Localization of multiple O-linked N-acetylglucosamine moieties on neurofilament polypeptides L and M. **J Biol Chem** 268(22): 16679-87.

- Dong, D. L., Z. S. Xu, G. W. Hart and D. W. Cleveland (1996). Cytoplasmic O-GlcNAc modification of the head domain and the KSP repeat motif of the neurofilament protein neurofilament-H. **J Biol Chem** 271(34): 20845-52.
- Dowjat, W. K., H. Wisniewski and T. Wisniewski (2001). Alzheimer's disease presenilin-1 expression modulates the assembly of neurofilaments. **Neuroscience** 103(1): 1-8.
- Duprey, P. and D. Paulin (1995). What can be learned from intermediate filament gene regulation in the mouse embryo. **Int J Dev Biol** 39(3): 443-57.
- Durham, H. D., J. Roy, L. Dong and D. A. Figlewicz (1997). Aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase proteins in a culture model of ALS. **J Neuropathol Exp Neurol** 56(5): 523-30.

## E

- Elder, G. A., V. L. Friedrich, Jr., P. Bosco, C. Kang, A. Gourov, P. H. Tu, V. M. Lee and R. A. Lazzarini (1998a). Absence of the mid-sized neurofilament subunit decreases axonal calibers, levels of light neurofilament (NF-L), and neurofilament content. **J Cell Biol** 141(3): 727-39.
- Elder, G. A., V. L. Friedrich, Jr., C. Kang, P. Bosco, A. Gourov, P. H. Tu, B. Zhang, V. M. Lee and R. A. Lazzarini (1998b). Requirement of heavy neurofilament subunit in the development of axons with large calibers. **J Cell Biol** 143(1): 195-205.
- Elder, G. A., V. L. Friedrich, Jr., D. Pereira, P. H. Tu, B. Zhang, V. M. Lee and R. A. Lazzarini (1999). Mice with disrupted mid-sized and heavy neurofilament genes lack axonal neurofilaments but have unaltered numbers of axonal microtubules. **J Neurosci Res** 57(1): 23-32.
- Ellison, A. R., H. Wallace, R. al-Shawi and J. O. Bishop (1995). Different transmission rates of herpesvirus thymidine kinase reporter transgenes from founder male parents and male parents of subsequent generations. **Mol Reprod Dev** 41(4): 425-34.
- Escurat, M., K. Djabali, M. Gumpel, F. Gros and M. M. Portier (1990). Differential expression of two neuronal intermediate-filament proteins, peripherin and the low-molecular-mass neurofilament protein (NF-L), during the development of the rat. **J Neurosci** 10(3): 764-84.
- Eyer, J. and A. Peterson (1994). Neurofilament-deficient axons and perikaryal aggregates in viable transgenic mice expressing a neurofilament-beta-galactosidase fusion protein. **Neuron** 12(2): 389-405.
- Eyer, J., D. W. Cleveland, P. C. Wong and A. C. Peterson (1998). Pathogenesis of two axonopathies does not require axonal neurofilaments. **Nature** 391(6667): 584-7.

## F

- Farhadi, H. F., P. Lepage, R. Forghani, H. C. Friedman, W. Orfali, L. Jasmin, W. Miller, T. J. Hudson and A. C. Peterson (2003). A combinatorial network of evolutionarily conserved myelin basic protein regulatory sequences confers distinct glial-specific phenotypes. **J Neurosci** 23(32): 10214-23.
- Fasani, F., A. Bocquet, P. Robert, A. Peterson and J. Eyer (2004). The amount of neurofilaments aggregated in the cell body is controlled by their increased sensitivity to trypsin-like proteases. **J Cell Sci** 117(Pt 6): 861-9.
- Fedorova, L. and A. Fedorov (2003). Introns in gene evolution. **Genetica** 118(2-3): 123-31.
- Fernyhough, P., A. Gallagher, S. A. Averill, J. V. Priestley, L. Hounsom, J. Patel and D. R. Tomlinson (1999). Aberrant neurofilament phosphorylation in sensory neurons of rats with diabetic neuropathy. **Diabetes** 48(4): 881-9.
- Fernyhough, P. and R. E. Schmidt (2002). Neurofilaments in diabetic neuropathy. **Int Rev Neurobiol** 50: 115-44.

- Ferri, A., R. Gabbianelli, A. Casciati, E. Paolucci, G. Rotilio and M. T. Carri (2000). Calcineurin activity is regulated both by redox compounds and by mutant familial amyotrophic lateral sclerosis-superoxide dismutase. **J Neurochem** 75(2): 606-13.
- Figlewicz, D. A., G. A. Rouleau, A. Krizus and J. P. Julien (1993). Polymorphism in the multi-phosphorylation domain of the human neurofilament heavy-subunit-encoding gene. **Gene** 132(2): 297-300.
- Fliegner, K. H., M. P. Kaplan, T. L. Wood, J. E. Pinter and R. K. Liem (1994). Expression of the gene for the neuronal intermediate filament protein alpha-internexin coincides with the onset of neuronal differentiation in the developing rat nervous system. **J Comp Neurol** 342(2): 161-73.
- Forghani, R., L. Garofalo, D. R. Foran, H. F. Farhadi, P. Lepage, T. J. Hudson, I. Tretjakoff, P. Valera and A. Peterson (2001). A distal upstream enhancer from the myelin basic protein gene regulates expression in myelin-forming schwann cells. **J Neurosci** 21(11): 3780-7.
- Francis, F., S. Roy, S. T. Brady and M. M. Black (2005). Transport of neurofilaments in growing axons requires microtubules but not actin filaments. **J Neurosci Res** 79(4): 442-50.
- Fressinaud, C., I. Jean and F. Dubas (2003). Selective decrease in axonal nerve growth factor and insulin-like growth factor I immunoreactivity in axonopathies of unknown etiology. **Acta Neuropathol (Berl)** 105(5): 477-83.
- Fu, S. Y. and T. Gordon (1997). The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. **Mol Neurobiol** 14(1-2): 67-116.
- Fuchs, E. and D. W. Cleveland (1998). A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. **Science** 279(5350): 514-9.

## G

- Gaillard, S., C. Nasarre, B. Gonthier and D. Bagnard (2005). [The cellular and molecular basis of axonal growth]. **Rev Neurol (Paris)** 161(2): 153-72.
- Gallant, P. E., H. C. Pant, R. M. Pruss and H. Gainer (1986). Calcium-activated proteolysis of neurofilament proteins in the squid giant neuron. **J Neurochem** 46(5): 1573-81.
- Gallo, G. and P. C. Letourneau (2004). Regulation of growth cone actin filaments by guidance cues. **J Neurobiol** 58(1): 92-102.
- Gama Sosa, M. A., V. L. Friedrich, Jr., R. DeGasperi, K. Kelley, P. H. Wen, E. Senturk, R. A. Lazzarini and G. A. Elder (2003). Human mid-sized neurofilament subunit induces motor neuron disease in transgenic mice. **Exp Neurol** 184(1): 408-19.
- Garcia, M. L., A. B. Singleton, D. Hernandez, C. M. Ward, C. Evey, P. A. Sapp, J. Hardy, R. H. Brown, Jr. and D. W. Cleveland (2006). Mutations in neurofilament genes are not a significant primary cause of non-SOD1-mediated amyotrophic lateral sclerosis. **Neurobiol Dis.** 21: 102-109.
- Geisler, N. and K. Weber (1981). Self-assembly in Vitro of the 68,000 molecular weight component of the mammalian neurofilament triplet proteins into intermediate-sized filaments. **J Mol Biol** 151(3): 565-71.
- Gervasi, C., A. Thyagarajan and B. G. Szaro (2003). Increased expression of multiple neurofilament mRNAs during regeneration of vertebrate central nervous system axons. **J Comp Neurol** 461(2): 262-75.
- Ghosh, A. and A. L. Kolodkin (1998). Specification of neuronal connectivity: ETS marks the spot. **Cell** 95(3): 303-6.
- Giasson, B. I. and W. E. Mushynski (1996). Aberrant stress-induced phosphorylation of perikaryal neurofilaments. **J Biol Chem** 271(48): 30404-9.
- Giasson, B. I. and W. E. Mushynski (1997). Study of proline-directed protein kinases involved in phosphorylation of the heavy neurofilament subunit. **J Neurosci** 17(24): 9466-72.

- Gil, G. A., D. F. Bussolino, M. M. Portal, A. A. Pecchio, M. L. Renner, G. A. Borioli, M. E. Guido and B. L. Caputto (2004). c-Fos activated phospholipid synthesis is required for neurite elongation in differentiating PC12 cells. **Mol Biol Cell** 15(4): 1881-94.
- Gill, S. R., P. C. Wong, M. J. Monteiro and D. W. Cleveland (1990). Assembly properties of dominant and recessive mutations in the small mouse neurofilament (NF-L) subunit. **J Cell Biol** 111(5 Pt 1): 2005-19.
- Gold, B. G. and D. R. Austin (1991). Regulation of aberrant neurofilament phosphorylation in neuronal perikarya. III. Alterations following single and continuous beta, beta'-iminodipropionitrile administrations. **Brain Res** 563(1-2): 151-62.
- Goldstein, M. E., H. S. Cooper, J. Bruce, M. J. Carden, V. M. Lee and W. W. Schlaepfer (1987). Phosphorylation of neurofilament proteins and chromatolysis following transection of rat sciatic nerve. **J Neurosci** 7(5): 1586-94.
- Goldstein, M. E., S. R. Weiss, R. A. Lazzarini, P. S. Shneidman, J. F. Lees and W. W. Schlaepfer (1988). mRNA levels of all three neurofilament proteins decline following nerve transection. **Brain Res** 427(3): 287-91.
- Gordon-Weeks, P. R. (2004). Microtubules and growth cone function. **J Neurobiol** 58(1): 70-83.
- Gotow, T. and J. Tanaka (1994). Phosphorylation of neurofilament H subunit as related to arrangement of neurofilaments. **J Neurosci Res** 37(6): 691-713.
- Grandis, M., M. Leandri, T. Vigo, M. Cilli, M. W. Sereda, G. Gherardi, L. Benedetti, G. Mancardi, M. Abbruzzese, K. A. Nave, L. Nobbio and A. Schenone (2004). Early abnormalities in sciatic nerve function and structure in a rat model of Charcot-Marie-Tooth type 1A disease. **Exp Neurol** 190(1): 213-23.
- Grant, N. J., B. Demeneix, D. Aunis and O. K. Langley (1988). Induction of neurofilament phosphorylation in cultured chromaffin cells. **Neuroscience** 27(2): 717-26.
- Guidato, S., N. P. Bajaj and C. C. Miller (1996). Cellular phosphorylation of neurofilament heavy-chain by cyclin-dependent kinase-5 masks the epitope for monoclonal antibody N52. **Neurosci Lett** 217(2-3): 157-60.
- Guillaud, L., C. Bosc, A. Fourest-Lieuvin, E. Denarier, F. Pirollet, L. Lafanechere and D. Job (1998). STOP proteins are responsible for the high degree of microtubule stabilization observed in neuronal cells. **J Cell Biol** 142(1): 167-79.
- Gurling, H. M., G. Kalsi, J. Brynjolfson, T. Sigmundsson, R. Sherrington, B. S. Mankoo, T. Read, P. Murphy, E. Blaveri, A. McQuillin, H. Petursson and D. Curtis (2001). Genomewide genetic linkage analysis confirms the presence of susceptibility loci for schizophrenia, on chromosomes 1q32.2, 5q33.2, and 8p21-22 and provides support for linkage to schizophrenia, on chromosomes 11q23.3-24 and 20q12.1-11.23. **Am J Hum Genet** 68(3): 661-73.

## H

- Hartley, C. L., V. E. Anderson, B. H. Anderton and J. Robertson (1997). Acrylamide and 2,5-hexanedione induce collapse of neurofilaments in SH-SY5Y human neuroblastoma cells to form perikaryal inclusion bodies. **Neuropathol Appl Neurobiol** 23(5): 364-72.
- Heins, S., P. C. Wong, S. Muller, K. Goldie, D. W. Cleveland and U. Aebi (1993). The rod domain of NF-L determines neurofilament architecture, whereas the end domains specify filament assembly and network formation. **J Cell Biol** 123(6 Pt 1): 1517-33.
- Helfand, B. T., P. Loomis, M. Yoon and R. D. Goldman (2003). Rapid transport of neural intermediate filament protein. **J Cell Sci** 116(Pt 11): 2345-59.
- Herdegen, T. and J. D. Leah (1998). Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. **Brain Res Brain Res Rev** 28(3): 370-490.

- Herrmann, H. and U. Aebi (2000). Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. **Curr Opin Cell Biol** 12(1): 79-90.
- Herrmann, H. and U. Aebi (2004). Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. **Annu Rev Biochem** 73: 749-89.
- Higgins, C. M., C. Jung and Z. Xu (2003). ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. **BMC Neurosci** 4: 16.
- Hirano, A. (1996). Neuropathology of ALS: an overview. **Neurology** 47(4 Suppl 2): S63-6.
- Hirasawa, M., A. Cho, T. Sreenath, B. Sauer, J. P. Julien and A. B. Kulkarni (2001). Neuron-specific expression of Cre recombinase during the late phase of brain development. **Neurosci Res** 40(2): 125-32.
- Hirokawa, N. (1982). Cross-linker system between neurofilaments, microtubules, and membranous organelles in frog axons revealed by the quick-freeze, deep-etching method. **J Cell Biol** 94(1): 129-42.
- Hisanaga, S. and N. Hirokawa (1989). The effects of dephosphorylation on the structure of the projections of neurofilament. **J Neurosci** 9(3): 959-66.
- Hisanaga, S., M. Kusubata, E. Okumura and T. Kishimoto (1991). Phosphorylation of neurofilament H subunit at the tail domain by CDC2 kinase dissociates the association to microtubules. **J Biol Chem** 266(32): 21798-803.
- Hisanaga, S., Y. Matsuoka, K. Nishizawa, T. Saito, M. Inagaki and N. Hirokawa (1994). Phosphorylation of native and reassembled neurofilaments composed of NF-L, NF-M, and NF-H by the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. **Mol Biol Cell** 5(2): 161-72.
- Hoffman, P. N., R. J. Lasek, J. W. Griffin and D. L. Price (1983). Slowing of the axonal transport of neurofilament proteins during development. **J Neurosci** 3(8): 1694-700.
- Hoffman, P. N. and D. W. Cleveland (1988). Neurofilament and tubulin expression recapitulates the developmental program during axonal regeneration: induction of a specific beta-tubulin isotype. **Proc Natl Acad Sci U S A** 85(12): 4530-3.
- Holzbaur, E. L. (2004). Tangled NUDELS? **Nat Cell Biol** 6(7): 569-70.
- Hsu, C., S. Janicki and M. J. Monteiro (1995). The first intron of the mouse neurofilament light gene (NF-L) increases gene expression. **Brain Res Mol Brain Res** 32(2): 241-51.
- Hurd, D. D. and W. M. Saxton (1996). Kinesin mutations cause motor neuron disease phenotypes by disrupting fast axonal transport in *Drosophila*. **Genetics** 144(3): 1075-85.

## I-J

- Ikenaka, K., K. Nakahira, C. Takayama, K. Wada, H. Hatanaka and K. Mikoshiba (1990). Nerve growth factor rapidly induces expression of the 68-kDa neurofilament gene by posttranscriptional modification in PC12h-R cells. **J Biol Chem** 265(32): 19782-5.
- Ishihara, T., M. Higuchi, B. Zhang, Y. Yoshiyama, M. Hong, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (2001). Attenuated neurodegenerative disease phenotype in tau transgenic mouse lacking neurofilaments. **J Neurosci** 21(16): 6026-35.
- Jacomy, H., Q. Zhu, S. Couillard-Despres, J. M. Beaulieu and J. P. Julien (1999). Disruption of type IV intermediate filament network in mice lacking the neurofilament medium and heavy subunits. **J Neurochem** 73(3): 972-84.
- Janssen, J. C., M. Hall, N. C. Fox, R. J. Harvey, J. Beck, A. Dickinson, T. Campbell, J. Collinge, P. L. Lantos, L. Cipelotti, J. M. Stevens and M. N. Rossor (2000). Alzheimer's disease due to an intronic presenilin-1 (PSEN1 intron 4) mutation: A clinicopathological study. **Brain** 123 ( Pt 5): 894-907.

- Jean, I. and C. Fressinaud (2003). Spontaneous central nervous system remyelination is not altered in NFH-lacZ transgenic mice after chemical demyelination. **J Neurosci Res** 73(1): 54-60.
- Jolly, C., E. Denarier, F. Mongelard, M. Robert-Nicoud, C. Vourc'h, C. Bosc and D. Job (1999). Assignment of the STOP gene (MAP6) to human chromosome bands 6p12-->p11 by fluorescence in situ hybridization. **Cytogenet Cell Genet** 86(1): 25.
- Josephs, K. A., J. L. Holton, M. N. Rossor, H. Braendgaard, T. Ozawa, N. C. Fox, R. C. Petersen, G. S. Pearl, M. Ganguly, P. Rosa, H. Laursen, J. E. Parisi, G. Waldemar, N. P. Quinn, D. W. Dickson and T. Revesz (2003). Neurofilament inclusion body disease: a new proteinopathy? **Brain** 126(Pt 10): 2291-303.
- Julien, J. P. and W. E. Mushynski (1982). Multiple phosphorylation sites in mammalian neurofilament polypeptides. **J Biol Chem** 257(17): 10467-70.
- Julien, J. P., I. Tretjakoff, L. Beaudet and A. Peterson (1987). Expression and assembly of a human neurofilament protein in transgenic mice provide a novel neuronal marking system. **Genes Dev** 1(10): 1085-95.
- Julien, J. P. and J. M. Beaulieu (2000). Cytoskeletal abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis: beneficial or detrimental effects? **J Neurol Sci** 180(1-2): 7-14.
- Julien, J. P. (2001). Amyotrophic lateral sclerosis. unfolding the toxicity of the misfolded. **Cell** 104(4): 581-91.

## K

- Kato, T., K. Kurita, T. Seino, T. Kadoya, H. Horie, M. Wada, T. Kawanami, M. Daimon and A. Hirano (2001). Galectin-1 is a component of neurofilamentous lesions in sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. **Biochem Biophys Res Commun** 282(1): 166-72.
- Kesavapany, S., B. S. Li and H. C. Pant (2003). Cyclin-dependent kinase 5 in neurofilament function and regulation. **Neurosignals** 12(4-5): 252-64.
- Kikuchi, S., K. Shinpo, A. Ogata, S. Tsuji, M. Takeuchi, Z. Makita and K. Tashiro (2002). Detection of N epsilon-(carboxymethyl)lysine (CML) and non-CML advanced glycation end-products in the anterior horn of amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. **Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord** 3(2): 63-8.
- Kim, O. J., M. A. Ariano, R. A. Lazzarini, M. S. Levine and D. R. Sibley (2002). Neurofilament-M interacts with the D1 dopamine receptor to regulate cell surface expression and desensitization. **J Neurosci** 22(14): 5920-30.
- Klymkowsky, M. W. (1995). Intermediate filaments: new proteins, some answers, more questions. **Curr Opin Cell Biol** 7(1): 46-54.
- Koeberle, P. D. and M. Bahr (2004). Growth and guidance cues for regenerating axons: where have they gone? **J Neurobiol** 59(1): 162-80.
- Kong, J., V. W. Tung, J. Aghajanian and Z. Xu (1998). Antagonistic roles of neurofilament subunits NF-H and NF-M against NF-L in shaping dendritic arborization in spinal motor neurons. **J Cell Biol** 140(5): 1167-76.
- Kong, J. and Z. Xu (2000). Overexpression of neurofilament subunit NF-L and NF-H extends survival of a mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. **Neurosci Lett** 281(1): 72-4.
- Kreplak, L., U. Aebi and H. Herrmann (2004). Molecular mechanisms underlying the assembly of intermediate filaments. **Exp Cell Res** 301(1): 77-83.
- Krimm, I., C. Ostlund, B. Gilquin, J. Couprie, P. Hossenlopp, J. P. Morion, G. Bonne, J. C. Courvalin, H. J. Worman and S. Zinn-Justin (2002). The Ig-like structure of the C-terminal domain of lamin A/C, mutated in muscular dystrophies, cardiomyopathy, and partial lipodystrophy. **Structure (Camb)** 10(6): 811-23.
- Kriz, J., Q. Zhu, J. P. Julien and A. L. Padjen (2000). Electrophysiological properties of axons in mice lacking neurofilament subunit genes: disparity between conduction velocity and axon diameter in absence of NF-H. **Brain Res** 885(1): 32-44.



Kroll, K. L. and E. Amaya (1996). Transgenic *Xenopus* embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation. **Development** 122(10): 3173-83.

## L

Lariviere, R. C., M. D. Nguyen, A. Ribeiro-da-Silva and J. P. Julien (2002). Reduced number of unmyelinated sensory axons in peripherin null mice. **J Neurochem** 81(3): 525-32.

Lariviere, R. C., J. M. Beaulieu, M. D. Nguyen and J. P. Julien (2003). Peripherin is not a contributing factor to motor neuron disease in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant superoxide dismutase. **Neurobiol Dis** 13(2): 158-66.

Lariviere, R. C. and J. P. Julien (2004). Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. **J Neurobiol** 58(1): 131-48.

Latchman, D. S. (1999). POU family transcription factors in the nervous system. **J Cell Physiol** 179(2): 126-33.

Lavedan, C., S. Buchholtz, R. L. Nussbaum, R. L. Albin and M. H. Polymeropoulos (2002). A mutation in the human neurofilament M gene in Parkinson's disease that suggests a role for the cytoskeleton in neuronal degeneration. **Neurosci Lett** 322(1): 57-61.

Lecomte, M. J., M. Basseville, F. Landon, V. Karpov and M. Fauquet (1998). Transcriptional activation of the mouse peripherin gene by leukemia inhibitory factor: involvement of STAT proteins. **J Neurochem** 70(3): 971-82.

Lecomte, M. J., M. Basseville and M. Fauquet (1999). Involvement of intronic sequences in cell-specific expression of the peripherin gene. **J Neurochem** 73(5): 1806-15.

Lee, M. K., Z. Xu, P. C. Wong and D. W. Cleveland (1993). Neurofilaments are obligate heteropolymers in vivo. **J Cell Biol** 122(6): 1337-50.

Lee, M. K., J. R. Marszalek and D. W. Cleveland (1994). A mutant neurofilament subunit causes massive, selective motor neuron death: implications for the pathogenesis of human motor neuron disease. **Neuron** 13(4): 975-88.

Lee, M. K. and D. W. Cleveland (1996). Neuronal intermediate filaments. **Annu Rev Neurosci** 19: 187-217.

Lees, J. F., P. S. Shneiderman, S. F. Skuntz, M. J. Carden and R. A. Lazzarini (1988). The structure and organization of the human heavy neurofilament subunit (NF-H) and the gene encoding it. **Embo J** 7(7): 1947-55.

Leigh, P. N., H. Whitwell, O. Garofalo, J. Buller, M. Swash, J. E. Martin, J. M. Gallo, R. O. Weller and B. H. Anderton (1991). Ubiquitin-immunoreactive intraneuronal inclusions in amyotrophic lateral sclerosis. Morphology, distribution, and specificity. **Brain** 114 ( Pt 2): 775-88.

Letai, A. and E. Fuchs (1995). The importance of intramolecular ion pairing in intermediate filaments. **Proc Natl Acad Sci U S A** 92(1): 92-6.

Letourmel, F., A. Bocquet, R. Perrot, A. Dechaume, F. Guinut, J. Eyer and A. Barthelaix (2006). Neurofilament high molecular weight-green fluorescent protein fusion is normally expressed in neurons and transported in axons: A neuronal marker to investigate the biology of neurofilaments. **Neuroscience** 137(1): 103-111.

Leung, C. L., D. Sun and R. K. Liem (1999). The intermediate filament protein peripherin is the specific interaction partner of mouse BPAG1-n (dystonin) in neurons. **J Cell Biol** 144(3): 435-46.

Leung, C. L., C. Z. He, P. Kaufmann, S. S. Chin, A. Naini, R. K. Liem, H. Mitsumoto and A. P. Hays (2004). A pathogenic peripherin gene mutation in a patient with amyotrophic lateral sclerosis. **Brain Pathol** 14(3): 290-6.

Levavasseur, F., Q. Zhu and J. P. Julien (1999). No requirement of alpha-internexin for nervous system development and for radial growth of axons. **Brain Res Mol Brain Res** 69(1): 104-12.

- Levy, E., R. K. Liem, P. D'Eustachio and N. J. Cowan (1987). Structure and evolutionary origin of the gene encoding mouse NF-M, the middle-molecular-mass neurofilament protein. **Eur J Biochem** 166(1): 71-7.
- Lewis, S. A. and N. J. Cowan (1986). Anomalous placement of introns in a member of the intermediate filament multigene family: an evolutionary conundrum. **Mol Cell Biol** 6(5): 1529-34.
- Li, B. S., Veeranna, J. Gu, P. Grant and H. C. Pant (1999). Activation of mitogen-activated protein kinases (Erk1 and Erk2) cascade results in phosphorylation of NF-M tail domains in transfected NIH 3T3 cells. **Eur J Biochem** 262(1): 211-7.
- Lieberburg, I., N. Spinner, S. Snyder, J. Anderson, D. Goldgaber, M. Smulowitz, Z. Carroll, B. Emanuel, J. Breitner and L. Rubin (1989). Cloning of a cDNA encoding the rat high molecular weight neurofilament peptide (NF-H): developmental and tissue expression in the rat, and mapping of its human homologue to chromosomes 1 and 22. **Proc Natl Acad Sci U S A** 86(7): 2463-7.
- Liem, R. K., D. J. Selkoe, S. H. Yen, G. Salomon and M. L. Shelanski (1979). New insights on the composition of neurofilaments. **Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis** 57: 145-52.
- Ligon, L. A. and O. Steward (2000). Movement of mitochondria in the axons and dendrites of cultured hippocampal neurons. **J Comp Neurol** 427(3): 340-50.
- Lin, H., J. Zhai, Z. Nie, J. Wu, J. L. Meinkoth, W. W. Schlaepfer and R. Canete-Soler (2003). Neurofilament RNA causes neurodegeneration with accumulation of ubiquitinated aggregates in cultured motor neurons. **J Neuropathol Exp Neurol** 62(9): 936-50.
- Lin, H., J. Zhai and W. W. Schlaepfer (2005). RNA-binding protein is involved in aggregation of light neurofilament protein and is implicated in the pathogenesis of motor neuron degeneration. **Hum Mol Genet** 14(23): 3643-59.
- Lin, W. and B. G. Szaro (1995). Neurofilaments help maintain normal morphologies and support elongation of neurites in *Xenopus laevis* cultured embryonic spinal cord neurons. **J Neurosci** 15(12): 8331-44.
- Lindenbaum, M. H., S. Carbonetto and W. E. Mushynski (1987). Nerve growth factor enhances the synthesis, phosphorylation, and metabolic stability of neurofilament proteins in PC12 cells. **J Biol Chem** 262(2): 605-10.
- Lindenbaum, M. H., S. Carbonetto, F. Grosveld, D. Flavell and W. E. Mushynski (1988). Transcriptional and post-transcriptional effects of nerve growth factor on expression of the three neurofilament subunits in PC-12 cells. **J Biol Chem** 263(12): 5662-7.
- Liu, Q., F. Xie, S. L. Siedlak, A. Nunomura, K. Honda, P. I. Moreira, X. Zhua, M. A. Smith and G. Perry (2004). Neurofilament proteins in neurodegenerative diseases. **Cell Mol Life Sci** 61(24): 3057-75.
- Lobsiger, C. S., M. L. Garcia, C. M. Ward and D. W. Cleveland (2005). Altered axonal architecture by removal of the heavily phosphorylated neurofilament tail domains strongly slows superoxide dismutase 1 mutant-mediated ALS. **Proc Natl Acad Sci U S A** 102(29): 10351-6.
- Lothian, C. and U. Lendahl (1997). An evolutionarily conserved region in the second intron of the human nestin gene directs gene expression to CNS progenitor cells and to early neural crest cells. **Eur J Neurosci** 9(3): 452-62.
- Ludemann, N., A. Clement, V. H. Hans, J. Leschik, C. Behl and R. Brandt (2005). O-glycosylation of the tail domain of neurofilament protein M in human neurons and in spinal cord tissue of a rat model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). **J Biol Chem** 280(36): 31648-58.

## M

- Mahadevan, A., V. Santosh, N. Gayatri, E. Ratnavalli, R. NandaGopal, A. Vasanth, A. K. Roy and S. K. Shankar (2000). Infantile neuroaxonal dystrophy and giant axonal neuropathy--overlap diseases of neuronal cytoskeletal elements in childhood? **Clin Neuropathol** 19(5): 221-9.

- Manfredi, G. and Z. Xu (2005). Mitochondrial dysfunction and its role in motor neuron degeneration in ALS. **Mitochondrion** 5(2): 77-87.
- Margolis, R. L., D. Job, M. Pabion and C. T. Rauch (1986a). Sliding of STOP proteins on microtubules: a model system for diffusion-dependent microtubule motility. **Ann N Y Acad Sci** 466: 306-21.
- Margolis, R. L., C. T. Rauch and D. Job (1986b). Purification and assay of a 145-kDa protein (STOP145) with microtubule-stabilizing and motility behavior. **Proc Natl Acad Sci U S A** 83(3): 639-43.
- Marszalek, J. R., T. L. Williamson, M. K. Lee, Z. Xu, P. N. Hoffman, M. W. Becher, T. O. Crawford and D. W. Cleveland (1996). Neurofilament subunit NF-H modulates axonal diameter by selectively slowing neurofilament transport. **J Cell Biol** 135(3): 711-24.
- McGraw, T. S., J. P. Mickle, G. Shaw and W. J. Streit (2002). Axonally transported peripheral signals regulate alpha-internexin expression in regenerating motoneurons. **J Neurosci** 22(12): 4955-63.
- McQuarrie, I. G., S. T. Brady and R. J. Lasek (1989). Retardation in the slow axonal transport of cytoskeletal elements during maturation and aging. **Neurobiol Aging** 10(4): 359-65.
- Meier, J., S. Couillard-Despres, H. Jacomy, C. Gravel and J. P. Julien (1999). Extra neurofilament NF-L subunits rescue motor neuron disease caused by overexpression of the human NF-H gene in mice. **J Neuropathol Exp Neurol** 58(10): 1099-110.
- Mersiyanova, I. V., A. V. Perepelov, A. V. Polyakov, V. F. Sitnikov, E. L. Dadali, R. B. Oparin, A. N. Petrin and O. V. Evgrafov (2000). A new variant of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 is probably the result of a mutation in the neurofilament-light gene. **Am J Hum Genet** 67(1): 37-46.
- Meyer, T., A. Fromm, C. Munch, B. Schwalenstocker, A. E. Fray, P. G. Ince, S. Stamm, G. Gron, A. C. Ludolph and P. J. Shaw (1999). The RNA of the glutamate transporter EAAT2 is variably spliced in amyotrophic lateral sclerosis and normal individuals. **J Neurol Sci** 170(1): 45-50.
- Michalczyk, K. and M. Ziman (2005). Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. **Histol Histopathol** 20(2): 665-71.
- Migheli, A., T. Pezzulo, A. Attanasio and D. Schiffer (1993). Peripherin immunoreactive structures in amyotrophic lateral sclerosis. **Lab Invest** 68(2): 185-91.
- Milner, D. J., M. Mavroidis, N. Weisleder and Y. Capetanaki (2000). Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function. **J Cell Biol** 150(6): 1283-98.
- Miura, T., Y. Ohnishi, H. Kurushima, H. Horie, T. Kadoya and Y. Nakabeppu (2005). Regulation of the neuronal fate by DeltaFosB and its downstream target, galectin-1. **Curr Drug Targets** 6(4): 437-44.
- Miyasaka, H., S. Okabe, K. Ishiguro, T. Uchida and N. Hirokawa (1993). Interaction of the tail domain of high molecular weight subunits of neurofilaments with the COOH-terminal region of tubulin and its regulation by tau protein kinase II. **J Biol Chem** 268(30): 22695-702.
- Miyazawa, I., I. Nakashima, A. Petzold, K. Fujihara, S. Sato and Y. Itoyama (2007). High CSF neurofilament heavy chain levels in neuromyelitis optica. **Neurology** 68(11): 865-7.
- Monteiro, M. J., P. N. Hoffman, J. D. Gearhart and D. W. Cleveland (1990). Expression of NF-L in both neuronal and nonneuronal cells of transgenic mice: increased neurofilament density in axons without affecting caliber. **J Cell Biol** 111(4): 1543-57.
- Murayama, S., T. W. Bouldin and K. Suzuki (1992). Immunocytochemical and ultrastructural studies of eosinophilic granular bodies in astrocytic tumors. **Acta Neuropathol (Berl)** 83(4): 408-14.

## N-O

- Nagase, T., R. Kikuno and O. Ohara (2001). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XXII. The complete sequences of 50 new cDNA clones which code for large proteins. **DNA Res** 8(6): 319-27.
- Nakamura, Y., R. Hashimoto, Y. Kashiwagi, Y. Wada, S. Sakoda, Y. Miyamae, T. Kudo and M. Takeda (1999). Casein kinase II is responsible for phosphorylation of NF-L at Ser-473. **FEBS Lett** 455(1-2): 83-6.
- Nguyen, M. D., R. C. Lariviere and J. P. Julien (2000). Reduction of axonal caliber does not alleviate motor neuron disease caused by mutant superoxide dismutase 1. **Proc Natl Acad Sci U S A** 97(22): 12306-11.
- Nguyen, M. D., T. Shu, K. Sanada, R. C. Lariviere, H. C. Tseng, S. K. Park, J. P. Julien and L. H. Tsai (2004). A NUDEL-dependent mechanism of neurofilament assembly regulates the integrity of CNS neurons. **Nat Cell Biol** 6(7): 595-608.
- Nixon, R. A., R. Quackenbush and A. Vitto (1986). Multiple calcium-activated neutral proteinases (CANP) in mouse retinal ganglion cell neurons: specificities for endogenous neuronal substrates and comparison to purified brain CANP. **J Neurosci** 6(5): 1252-63.
- Nixon, R. A., S. E. Lewis and C. A. Marotta (1987). Posttranslational modification of neurofilament proteins by phosphate during axoplasmic transport in retinal ganglion cell neurons. **J Neurosci** 7(4): 1145-58.
- Nixon, R. A. and T. B. Shea (1992). Dynamics of neuronal intermediate filaments: a developmental perspective. **Cell Motil Cytoskeleton** 22(2): 81-91.
- Nixon, R. A. (1993). The regulation of neurofilament protein dynamics by phosphorylation: clues to neurofibrillary pathobiology. **Brain Pathol** 3(1): 29-38.
- Norgren, N., L. Rosengren and T. Stigbrand (2003). Elevated neurofilament levels in neurological diseases. **Brain Res** 987(1): 25-31.
- Offield, M. F., N. Hirsch and R. M. Grainger (2000). The development of *Xenopus tropicalis* transgenic lines and their use in studying lens developmental timing in living embryos. **Development** 127(9): 1789-97.
- Okamoto, K., S. Hirai, M. Shoji, Y. Senoh and T. Yamazaki (1990). Axonal swellings in the corticospinal tracts in amyotrophic lateral sclerosis. **Acta Neuropathol (Berl)** 80(2): 222-6.
- Olsson, J. E., J. W. Gordon, B. S. Pawlyk, D. Roof, A. Hayes, R. S. Molday, S. Mukai, G. S. Cowley, E. L. Berson and T. P. Dryja (1992). Transgenic mice with a rhodopsin mutation (Pro23His): a mouse model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. **Neuron** 9(5): 815-30.
- Orfali, W., R. N. Nicholson, M. C. Guiot, A. C. Peterson and G. J. Snipes (2005). An 8.5-kb segment of the PMP22 promoter responds to loss of axon signals during Wallerian degeneration, but does not respond to specific axonal signals during nerve regeneration. **J Neurosci Res** 80(1): 37-46.

## P-Q

- Pan, F. C., Y. Chen, J. Loeber, K. Henningfeld and T. Pieler (2006). I-SceI meganuclease-mediated transgenesis in *Xenopus*. **Dev Dyn** 235(1): 247-52.
- Pan, Y. A., T. Misgeld, J. W. Lichtman and J. R. Sanes (2003). Effects of neurotoxic and neuroprotective agents on peripheral nerve regeneration assayed by time-lapse imaging in vivo. **J Neurosci** 23(36): 11479-88.
- Pant, H. C. (1988). Dephosphorylation of neurofilament proteins enhances their susceptibility to degradation by calpain. **Biochem J** 256(2): 665-8.
- Pant, H. C., Veeranna and P. Grant (2000). Regulation of axonal neurofilament phosphorylation. **Curr Top Cell Regul** 36: 133-50.
- Parry, D. A. and P. M. Steinert (1999). Intermediate filaments: molecular architecture, assembly, dynamics and polymorphism. **Q Rev Biophys** 32(2): 99-187.

- Pasinelli, P., D. R. Borchelt, M. K. Houseweart, D. W. Cleveland and R. H. Brown, Jr. (1998). Caspase-1 is activated in neural cells and tissue with amyotrophic lateral sclerosis-associated mutations in copper-zinc superoxide dismutase. **Proc Natl Acad Sci U S A** 95(26): 15763-8.
- Perez-Olle, R., C. L. Leung and R. K. Liem (2002). Effects of Charcot-Marie-Tooth-linked mutations of the neurofilament light subunit on intermediate filament formation. **J Cell Sci** 115(Pt 24): 4937-46.
- Petzold, A. (2005a). Neurofilament phosphoforms: surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. **J Neurol Sci** 233(1-2): 183-98.
- Petzold, A., M. J. Eikelenboom, G. Keir, D. Grant, R. H. Lazeron, C. H. Polman, B. M. Uitdehaag, E. J. Thompson and G. Giovannoni (2005b). Axonal damage accumulates in the progressive phase of multiple sclerosis: three year follow up study. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 76(2): 206-11.
- Pollak, D., N. Cairns and G. Lubec (2003). Cytoskeleton derangement in brain of patients with Down syndrome, Alzheimer's disease and Pick's disease. **J Neural Transm Suppl**(67): 149-58.
- Prahlad, V., M. Yoon, R. D. Moir, R. D. Vale and R. D. Goldman (1998). Rapid movements of vimentin on microtubule tracks: kinesin-dependent assembly of intermediate filament networks. **J Cell Biol** 143(1): 159-70.
- Prahlad, V., B. T. Helfand, G. M. Langford, R. D. Vale and R. D. Goldman (2000). Fast transport of neurofilament protein along microtubules in squid axoplasm. **J Cell Sci** 113 ( Pt 22): 3939-46.
- Price, D. L., D. W. Cleveland and V. E. Koliatsos (1994). Motor neurone disease and animal models. **Neurobiol Dis** 1(1-2): 3-11.
- Puls, I., C. Jonnakuty, B. H. LaMonte, E. L. Holzbaur, M. Tokito, E. Mann, M. K. Floeter, K. Bidus, D. Drayna, S. J. Oh, R. H. Brown, Jr., C. L. Ludlow and K. H. Fischbeck (2003). Mutant dynactin in motor neuron disease. **Nat Genet** 33(4): 455-6.

## R

- Rao, M. V., M. K. Houseweart, T. L. Williamson, T. O. Crawford, J. Folmer and D. W. Cleveland (1998). Neurofilament-dependent radial growth of motor axons and axonal organization of neurofilaments does not require the neurofilament heavy subunit (NF-H) or its phosphorylation. **J Cell Biol** 143(1): 171-81.
- Rao, M. V., L. J. Engle, P. S. Mohan, A. Yuan, D. Qiu, A. Cataldo, L. Hassinger, S. Jacobsen, V. M. Lee, A. Andreadis, J. P. Julien, P. C. Bridgman and R. A. Nixon (2002a). Myosin Va binding to neurofilaments is essential for correct myosin Va distribution and transport and neurofilament density. **J Cell Biol** 159(2): 279-90.
- Rao, M. V., M. L. Garcia, Y. Miyazaki, T. Gotow, A. Yuan, S. Mattina, C. M. Ward, N. A. Calcutt, Y. Uchiyama, R. A. Nixon and D. W. Cleveland (2002b). Gene replacement in mice reveals that the heavily phosphorylated tail of neurofilament heavy subunit does not affect axonal caliber or the transit of cargoes in slow axonal transport. **J Cell Biol** 158(4): 681-93.
- Rao, M. V., J. Campbell, A. Yuan, A. Kumar, T. Gotow, Y. Uchiyama and R. A. Nixon (2003). The neurofilament middle molecular mass subunit carboxyl-terminal tail domains is essential for the radial growth and cytoskeletal architecture of axons but not for regulating neurofilament transport rate. **J Cell Biol** 163(5): 1021-31.
- Riederer, I. M., P. Robert, R. Porchet, J. Eyer and B. M. Riederer (2003). Selective changes in the neurofilament and microtubule cytoskeleton of NF-H/LacZ mice. **J Neurosci Res** 71(2): 196-207.
- Robertson, J., J. M. Beaulieu, M. M. Doroudchi, H. D. Durham, J. P. Julien and W. E. Mushynski (2001). Apoptotic death of neurons exhibiting peripherin aggregates is mediated by the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor- $\alpha$ . **J Cell Biol** 155(2): 217-26.
- Robertson, J., M. M. Doroudchi, M. D. Nguyen, H. D. Durham, M. J. Strong, G. Shaw, J. P. Julien and W. E. Mushynski (2003). A neurotoxic peripherin splice variant in a mouse model of ALS. **J Cell Biol** 160(6): 939-49.

- Roosa, J. R., C. Gervasi and B. G. Szaro (2000). Structure, biological activity of the upstream regulatory sequence, and conserved domains of a middle molecular mass neurofilament gene of *Xenopus laevis*. **Brain Res Mol Brain Res** 82(1-2): 35-51.
- Roots, B. I. (1983). Neurofilament accumulation induced in synapses by leupeptin. **Science** 221(4614): 971-2.
- Rosen, D. R. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. **Nature** 364(6435): 362.
- Rowland, L. P. and N. A. Shneider (2001). Amyotrophic lateral sclerosis. **N Engl J Med** 344(22): 1688-700.
- Roy, S., P. Coffee, G. Smith, R. K. Liem, S. T. Brady and M. M. Black (2000). Neurofilaments are transported rapidly but intermittently in axons: implications for slow axonal transport. **J Neurosci** 20(18): 6849-61.

## S

- Sarkar, S. and N. J. Cowan (1991). Intragenic sequences affect the expression of the gene encoding glial fibrillary acidic protein. **J Neurochem** 57(2): 675-84.
- Sasaki, S. and M. Iwata (1999). Immunoreactivity of beta-amyloid precursor protein in amyotrophic lateral sclerosis. **Acta Neuropathol (Berl)** 97(5): 463-8.
- Sasaki, S., N. Shibata, T. Komori and M. Iwata (2000). iNOS and nitrotyrosine immunoreactivity in amyotrophic lateral sclerosis. **Neurosci Lett** 291(1): 44-8.
- Sathasivam, S., P. G. Ince and P. J. Shaw (2001). Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis: a review of the evidence. **Neuropathol Appl Neurobiol** 27(4): 257-74.
- Schmitt, F. O. (1968). Fibrous proteins--neuronal organelles. **Proc Natl Acad Sci U S A** 60(4): 1092-101.
- Schwartz, M. L., C. Katagi, J. Bruce and W. W. Schlaepfer (1994). Brain-specific enhancement of the mouse neurofilament heavy gene promoter in vitro. **J Biol Chem** 269(18): 13444-50.
- Schwartz, M. L., Y. Hua and W. W. Schlaepfer (1997). In vitro activation of the mouse mid-sized neurofilament gene by an NF-1-like transcription factor. **Brain Res Mol Brain Res** 48(2): 305-14.
- Shah, J. V., L. A. Flanagan, P. A. Janmey and J. F. Leterrier (2000). Bidirectional translocation of neurofilaments along microtubules mediated in part by dynein/dynactin. **Mol Biol Cell** 11(10): 3495-508.
- Sharma, M., P. Sharma and H. C. Pant (1999). CDK-5-mediated neurofilament phosphorylation in SHSY5Y human neuroblastoma cells. **J Neurochem** 73(1): 79-86.
- Shaw, G. and K. Weber (1982). Differential expression of neurofilament triplet proteins in brain development. **Nature** 298(5871): 277-9.
- Shaw, G., C. Yang, R. Ellis, K. Anderson, J. Parker Mickle, S. Scheff, B. Pike, D. K. Anderson and D. R. Howland (2005). Hyperphosphorylated neurofilament NF-H is a serum biomarker of axonal injury. **Biochem Biophys Res Commun** 336(4): 1268-77.
- Shaw, P. J., V. Forrest, P. G. Ince, J. P. Richardson and H. J. Wastell (1995). CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients. **Neurodegeneration** 4(2): 209-16.
- Shaw, P. J. (2005). Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 76(8): 1046-57.
- Shea, T. B., M. L. Beermann, R. A. Nixon and I. Fischer (1992). Microtubule-associated protein tau is required for axonal neurite elaboration by neuroblastoma cells. **J Neurosci Res** 32(3): 363-74.

- Shea, T. B. and M. L. Beermann (1999). Neuronal intermediate filament protein alpha-internexin facilitates axonal neurite elongation in neuroblastoma cells. **Cell Motil Cytoskeleton** 43(4): 322-33.
- Shea, T. B. and L. A. Flanagan (2001). Kinesin, dynein and neurofilament transport. **Trends Neurosci** 24(11): 644-8.
- Shea, T. B., C. Jung and H. C. Pant (2003). Does neurofilament phosphorylation regulate axonal transport? **Trends Neurosci** 26(8): 397-400.
- Shneidman, P. S., J. Bruce, M. L. Schwartz and W. W. Schlaepfer (1992). Negative regulatory regions are present upstream in the three mouse neurofilament genes. **Brain Res Mol Brain Res** 13(1-2): 127-38.
- Sihag, R. K. and R. A. Nixon (1991). Identification of Ser-55 as a major protein kinase A phosphorylation site on the 70-kDa subunit of neurofilaments. Early turnover during axonal transport. **J Biol Chem** 266(28): 18861-7.
- Sihag, R. K., H. Jaffe, R. A. Nixon and X. Rong (1999). Serine-23 is a major protein kinase A phosphorylation site on the amino-terminal head domain of the middle molecular mass subunit of neurofilament proteins. **J Neurochem** 72(2): 491-9.
- Skvortsova, V., M. Shadrina, P. Slominsky, G. Levitsky, E. Kondratieva, A. Zherebtsova, N. Levitskaya, A. Alekhin, A. Serdyuk and S. Limborska (2004). Analysis of heavy neurofilament subunit gene polymorphism in Russian patients with sporadic motor neuron disease (MND). **Eur J Hum Genet** 12(3): 241-4.
- Slaughter, T. and M. M. Black (2003). STOP (stable-tubule-only-polypeptide) is preferentially associated with the stable domain of axonal microtubules. **J Neurocytol** 32(4): 399-413.
- Smith, M. D., P. J. Morris, S. J. Dawson, M. L. Schwartz, W. W. Schlaepfer and D. S. Latchman (1997). Coordinate induction of the three neurofilament genes by the Brn-3a transcription factor. **J Biol Chem** 272(34): 21325-33.
- Spira, M. E., R. Oren, A. Dormann, N. Ilouz and S. Lev (2001). Calcium, protease activation, and cytoskeleton remodeling underlie growth cone formation and neuronal regeneration. **Cell Mol Neurobiol** 21(6): 591-604.
- St Clair, D., D. Blackwood, W. Muir, A. Carothers, M. Walker, G. Spowart, C. Gosden and H. J. Evans (1990). Association within a family of a balanced autosomal translocation with major mental illness. **Lancet** 336(8706): 13-6.
- Stone, J. D., A. P. Peterson, J. Eyer, T. G. Oblak and D. W. Sickles (2001). Neurofilaments are nonessential to the pathogenesis of toxicant-induced axonal degeneration. **J Neurosci** 21(7): 2278-87.
- Strack, S., R. S. Westphal, R. J. Colbran, F. F. Ebner and B. E. Wadzinski (1997). Protein serine/threonine phosphatase 1 and 2A associate with and dephosphorylate neurofilaments. **Brain Res Mol Brain Res** 49(1-2): 15-28.
- Strelkov, S. V., H. Herrmann, N. Geisler, T. Wedig, R. Zimbelmann, U. Aebi and P. Burkhard (2002). Conserved segments 1A and 2B of the intermediate filament dimer: their atomic structures and role in filament assembly. **Embo J** 21(6): 1255-66.
- Strelkov, S. V., H. Herrmann and U. Aebi (2003). Molecular architecture of intermediate filaments. **Bioessays** 25(3): 243-51.
- Strelkov, S. V., L. Kreplak, H. Herrmann and U. Aebi (2004). Intermediate filament protein structure determination. **Methods Cell Biol** 78: 25-43.
- Strong, M. J. and R. M. Garruto (1991). Chronic aluminum-induced motor neuron degeneration: clinical, neuropathological and molecular biological aspects. **Can J Neurol Sci** 18(3 Suppl): 428-31.
- Strong, M. J. (1994). Aluminum neurotoxicity: an experimental approach to the induction of neurofilamentous inclusions. **J Neurol Sci** 124 Suppl: 20-6.
- Strong, M. J., M. M. Sopper, J. P. Crow, W. L. Strong and J. S. Beckman (1998). Nitration of the low molecular weight neurofilament is equivalent in sporadic amyotrophic lateral sclerosis and control cervical spinal cord. **Biochem Biophys Res Commun** 248(1): 157-64.
- Strong, M. J. (1999). Neurofilament metabolism in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **J Neurol Sci** 169(1-2): 170-7.
- Strong, M. J., W. L. Strong, H. Jaffe, B. Traggert, M. M. Sopper and H. C. Pant (2001). Phosphorylation state of the native high-molecular-weight neurofilament subunit protein from cervical spinal cord in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **J Neurochem** 76(5): 1315-25.

- Strong, M. J. (2004). Amyotrophic lateral sclerosis: contemporary concepts in etiopathogenesis and pharmacotherapy. **Expert Opin Investig Drugs** 13(12): 1593-614.
- Sun, D., C. L. Leung and R. K. Liem (1996). Phosphorylation of the high molecular weight neurofilament protein (NF-H) by Cdk5 and p35. **J Biol Chem** 271(24): 14245-51.
- Suzuki, M., K. Sakamoto, S. Takeda, M. Takagi and K. Katsube (1998). Molecular cloning of the chick Nau gene and analysis of its expression patterns during neurogenesis. **J Med Dent Sci** 45(2): 123-33.
- Szebenyi, G., G. M. Smith, P. Li and S. T. Brady (2002). Overexpression of neurofilament H disrupts normal cell structure and function. **J Neurosci Res** 68(2): 185-98.

## T-U

- Takuma, H., S. Kwak, T. Yoshizawa and I. Kanazawa (1999). Reduction of GluR2 RNA editing, a molecular change that increases calcium influx through AMPA receptors, selective in the spinal ventral gray of patients with amyotrophic lateral sclerosis. **Ann Neurol** 46(6): 806-15.
- Tanaka, T., M. Takeda, H. Niigawa, S. Hariguchi and T. Nishimura (1993). Phosphorylated neurofilament accumulation in neuronal perikarya by cyclosporin A injection in rat brain. **Methods Find Exp Clin Pharmacol** 15(2): 77-87.
- Tandan, R., W. G. Bradley and M. J. Fillyaw (1990). Giant axonal neuropathy: studies with sulfhydryl donor compounds. **J Neurol Sci** 95(2): 153-62.
- Tashiro, T. and Y. Komiya (1991). Changes in organization and axonal transport of cytoskeletal proteins during regeneration. **J Neurochem** 56(5): 1557-63.
- Tateno, M., H. Sadakata, M. Tanaka, S. Itoharu, R. M. Shin, M. Miura, M. Masuda, T. Aosaki, M. Urushitani, H. Misawa and R. Takahashi (2004). Calcium-permeable AMPA receptors promote misfolding of mutant SOD1 protein and development of amyotrophic lateral sclerosis in a transgenic mouse model. **Hum Mol Genet** 13(19): 2183-96.
- Terry-Lorenzo, R. T., M. Inoue, J. H. Connor, T. A. Haystead, B. N. Armbruster, R. P. Gupta, C. J. Oliver and S. Shenolikar (2000). Neurofilament-L is a protein phosphatase-1-binding protein associated with neuronal plasma membrane and post-synaptic density. **J Biol Chem** 275(4): 2439-46.
- Thermes, V., C. Grabher, F. Ristoratore, F. Bourrat, A. Choulika, J. Wittbrodt and J. S. Joly (2002). I-SceI meganuclease mediates highly efficient transgenesis in fish. **Mech Dev** 118(1-2): 91-8.
- Thompson, M. A., E. Lee, D. Lawe, E. Gizang-Ginsberg and E. B. Ziff (1992). Nerve growth factor-induced derepression of peripherin gene expression is associated with alterations in proteins binding to a negative regulatory element. **Mol Cell Biol** 12(6): 2501-13.
- Tolnay, M., M. Grazia Spillantini, C. Rizzini, D. Eccles, J. Lowe and D. Ellison (2000). A new case of frontotemporal dementia and parkinsonism resulting from an intron 10 +3-splice site mutation in the tau gene: clinical and pathological features. **Neuropathol Appl Neurobiol** 26(4): 368-78.
- Topp, K. S., K. D. Tanner and J. D. Levine (2000). Damage to the cytoskeleton of large diameter sensory neurons and myelinated axons in vincristine-induced painful peripheral neuropathy in the rat. **J Comp Neurol** 424(4): 563-76.
- Toyoshima, I., M. Sugawara, K. Kato, C. Wada, K. Hirota, K. Hasegawa, H. Kowa, M. P. Sheetz and O. Masamune (1998). Kinesin and cytoplasmic dynein in spinal spheroids with motor neuron disease. **J Neurol Sci** 159(1): 38-44.



- Toyoshima, I., K. Kato, M. Sugawara, C. Wada, S. Okawa, M. Kobayashi, O. Masamune and S. Watanabe (2000). Massive accumulation of M and H subunits of neurofilament proteins in spinal motor neurons of neurofilament deficient Japanese quail, Quv. **Neurosci Lett** 287(3): 175-8.
- Troy, C. M., N. A. Muma, L. A. Greene, D. L. Price and M. L. Shelanski (1990). Regulation of peripherin and neurofilament expression in regenerating rat motor neurons. **Brain Res** 529(1-2): 232-8.
- Tshala-Katumbay, D. D., V. S. Palmer, R. J. Kayton, M. I. Sabri and P. S. Spencer (2005). A new murine model of giant proximal axonopathy. **Acta Neuropathol (Berl)** 109(4): 405-10.
- Tu, P. H., P. Raju, K. A. Robinson, M. E. Gurney, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (1996). Transgenic mice carrying a human mutant superoxide dismutase transgene develop neuronal cytoskeletal pathology resembling human amyotrophic lateral sclerosis lesions. **Proc Natl Acad Sci U S A** 93(7): 3155-60.
- Uchida, A. and A. Brown (2004). Arrival, reversal, and departure of neurofilaments at the tips of growing axons. **Mol Biol Cell** 15(9): 4215-25.
- Uveges, T. E., Y. Shan, B. E. Kramer, D. C. Wight and L. M. Parysek (2002). Intron 1 is required for cell type-specific, but not injury-responsive, peripherin gene expression. **J Neurosci** 22(18): 7959-67.

## V-W

- van Rossum, D., J. Kuhse and H. Betz (1999). Dynamic interaction between soluble tubulin and C-terminal domains of N-methyl-D-aspartate receptor subunits. **J Neurochem** 72(3): 962-73.
- Veeranna, N. D. Amin, N. G. Ahn, H. Jaffe, C. A. Winters, P. Grant and H. C. Pant (1998). Mitogen-activated protein kinases (Erk1,2) phosphorylate Lys-Ser-Pro (KSP) repeats in neurofilament proteins NF-H and NF-M. **J Neurosci** 18(11): 4008-21.
- Veeranna, T. Kaji, B. Boland, T. Odriljin, P. Mohan, B. S. Basavarajappa, C. Peterhoff, A. Cataldo, A. Rudnicki, N. Amin, B. S. Li, H. C. Pant, B. L. Hungund, O. Arancio and R. A. Nixon (2004). Calpain mediates calcium-induced activation of the erk1,2 MAPK pathway and cytoskeletal phosphorylation in neurons: relevance to Alzheimer's disease. **Am J Pathol** 165(3): 795-805.
- Veeranna, K. T. Shetty, W. T. Link, H. Jaffe, J. Wang and H. C. Pant (1995). Neuronal cyclin-dependent kinase-5 phosphorylation sites in neurofilament protein (NF-H) are dephosphorylated by protein phosphatase 2A. **J Neurochem** 64(6): 2681-90.
- Verge, V. M., W. Tetzlaff, M. A. Bisby and P. M. Richardson (1990). Influence of nerve growth factor on neurofilament gene expression in mature primary sensory neurons. **J Neurosci** 10(6): 2018-25.
- Vickers, J. C., J. H. Morrison, V. L. Friedrich, Jr., G. A. Elder, D. P. Perl, R. N. Katz and R. A. Lazzarini (1994). Age-associated and cell-type-specific neurofibrillary pathology in transgenic mice expressing the human mid-sized neurofilament subunit. **J Neurosci** 14(9): 5603-12.
- Waetzig, V. and T. Herdegen (2004). Neurodegenerative and physiological actions of c-Jun N-terminal kinases in the mammalian brain. **Neurosci Lett** 361(1-3): 64-7.
- Wagner, O. I., J. Lifshitz, P. A. Janmey, M. Linden, T. K. McIntosh and J. F. Leterrier (2003). Mechanisms of mitochondria-neurofilament interactions. **J Neurosci** 23(27): 9046-58.
- Wagner, O. I., J. Ascano, M. Tokito, J. F. Leterrier, P. A. Janmey and E. L. Holzbaur (2004). The interaction of neurofilaments with the microtubule motor cytoplasmic dynein. **Mol Biol Cell** 15(11): 5092-100.
- Walker, K. L., H. K. Yoo, J. Undamatla and B. G. Szaro (2001). Loss of neurofilaments alters axonal growth dynamics. **J Neurosci** 21(24): 9655-66.

- Wang, L., C. L. Ho, D. Sun, R. K. Liem and A. Brown (2000). Rapid movement of axonal neurofilaments interrupted by prolonged pauses. **Nat Cell Biol** 2(3): 137-41.
- Wilbourn, A. J. (1998). Clinical neurophysiology in the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: the Lambert and the El Escorial criteria. **J Neurol Sci** 160 Suppl 1: S25-9.
- Williamson, T. L., L. I. Bruijn, Q. Zhu, K. L. Anderson, S. D. Anderson, J. P. Julien and D. W. Cleveland (1998). Absence of neurofilaments reduces the selective vulnerability of motor neurons and slows disease caused by a familial amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase 1 mutant. **Proc Natl Acad Sci U S A** 95(16): 9631-6.
- Williamson, T. L. and D. W. Cleveland (1999). Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. **Nat Neurosci** 2(1): 50-6.
- Wong, N. K., B. P. He and M. J. Strong (2000). Characterization of neuronal intermediate filament protein expression in cervical spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS). **J Neuropathol Exp Neurol** 59(11): 972-82.
- Wong, P. C. and D. W. Cleveland (1990). Characterization of dominant and recessive assembly-defective mutations in mouse neurofilament NF-M. **J Cell Biol** 111(5 Pt 1): 1987-2003.
- Wong, P. C., J. Marszalek, T. O. Crawford, Z. Xu, S. T. Hsieh, J. W. Griffin and D. W. Cleveland (1995). Increasing neurofilament subunit NF-M expression reduces axonal NF-H, inhibits radial growth, and results in neurofilamentous accumulation in motor neurons. **J Cell Biol** 130(6): 1413-22.

## X-Y-Z

- Xia, C. H., E. A. Roberts, L. S. Her, X. Liu, D. S. Williams, D. W. Cleveland and L. S. Goldstein (2003). Abnormal neurofilament transport caused by targeted disruption of neuronal kinesin heavy chain KIF5A. **J Cell Biol** 161(1): 55-66.
- Xu, G., C. R. Pierson, Y. Murakawa and A. A. Sima (2002). Altered tubulin and neurofilament expression and impaired axonal growth in diabetic nerve regeneration. **J Neuropathol Exp Neurol** 61(2): 164-75.
- Xu, Z., L. C. Cork, J. W. Griffin and D. W. Cleveland (1993). Increased expression of neurofilament subunit NF-L produces morphological alterations that resemble the pathology of human motor neuron disease. **Cell** 73(1): 23-33.
- Yabe, J. T., A. Pimenta and T. B. Shea (1999). Kinesin-mediated transport of neurofilament protein oligomers in growing axons. **J Cell Sci** 112 ( Pt 21): 3799-814.
- Yabe, J. T., C. Jung, W. K. Chan and T. B. Shea (2000). Phospho-dependent association of neurofilament proteins with kinesin in situ. **Cell Motil Cytoskeleton** 45(4): 249-62.
- Yabe, J. T., W. K. Chan, T. M. Chylinski, S. Lee, A. F. Pimenta and T. B. Shea (2001). The predominant form in which neurofilament subunits undergo axonal transport varies during axonal initiation, elongation, and maturation. **Cell Motil Cytoskeleton** 48(1): 61-83.
- Yabe, J. T., W. K. Chan, F. S. Wang, A. Pimenta, D. D. Ortiz and T. B. Shea (2003). Regulation of the transition from vimentin to neurofilaments during neuronal differentiation. **Cell Motil Cytoskeleton** 56(3): 193-205.
- Yan, Y. and A. Brown (2005). Neurofilament polymer transport in axons. **J Neurosci** 25(30): 7014-21.
- Yang, Y., J. Dowling, Q. C. Yu, P. Kouklis, D. W. Cleveland and E. Fuchs (1996). An essential cytoskeletal linker protein connecting actin microfilaments to intermediate filaments. **Cell** 86(4): 655-65.
- Yazdanbakhsh, K., P. Fraser, D. Kioussis, M. Vidal, F. Grosveld and M. Lindenbaum (1993). Functional analysis of the human neurofilament light chain gene promoter. **Nucleic Acids Res** 21(3): 455-61.
- Yin, X., T. O. Crawford, J. W. Griffin, P. Tu, V. M. Lee, C. Li, J. Roder and B. D. Trapp (1998). Myelin-associated glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons. **J Neurosci** 18(6): 1953-62.

- Yuan, A., M. V. Rao, A. Kumar, J. P. Julien and R. A. Nixon (2003). Neurofilament transport in vivo minimally requires hetero-oligomer formation. **J Neurosci** 23(28): 9452-8.
- Zabin, I. (1982). beta-Galactosidase alpha-complementation. A model of protein-protein interaction. **Mol Cell Biochem** 49(2): 87-96.
- Zhang, Z., D. M. Casey, J. P. Julien and Z. Xu (2002). Normal dendritic arborization in spinal motoneurons requires neurofilament subunit L. **J Comp Neurol** 450(2): 144-52.
- Zhu, Q., S. Couillard-Despres and J. P. Julien (1997). Delayed maturation of regenerating myelinated axons in mice lacking neurofilaments. **Exp Neurol** 148(1): 299-316.
- Zimmerman, L., B. Parr, U. Lendahl, M. Cunningham, R. McKay, B. Gavin, J. Mann, G. Vassileva and A. McMahon (1994). Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. **Neuron** 12(1): 11-24.
- Zochodne, D. W., H. S. Sun, C. Cheng and J. Eyer (2004). Accelerated diabetic neuropathy in axons without neurofilaments. **Brain** 127(Pt 10): 2193-200.

## ANNEXES

Les articles présentés en annexe témoignent de ma participation à l'activité du Laboratoire de Neurobiologie et Neuropathologie et notamment de sa partie Neuropathologie Cellulaire et Moléculaire, dirigé par Mme le Pr. A Bartheleix.

S'ils n'ont pas un rapport direct avec le sujet de thèse, ils traduisent l'activité de recherche clinique du Laboratoire et sa volonté de confronter les mécanismes physiopathologiques étudiés *in-vivo* et *in-vitro* aux données recueillies chez les patients.

Six articles sont rapportés ayant trait pour la plupart à des rapports d'observations particulières par leur expression(s) cliniques(s) et /ou neuropathologique(s). Le dernier article témoigne de la collaboration entreprise avec d'autres unités de recherche de l'Université.

## Annexe 1

### Paralysie périodique révélant une thyrotoxicose.

Penisson-Besnier, F LETOURNEL, N Kerkeni, F Dubas, Ph Alquier, V Rohmer.  
*Presse Med.* 1998, 27(28) : 1430-1.

### Résumé :

La paralysie périodique est une complication classique de l'hyperthyroïdie, survenant uniquement chez les hommes d'origine asiatique et se présente cliniquement de la même façon que la forme familiale. Son traitement repose sur celui de l'hyperthyroïdie. Sa physiopathologie implique la pompe  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ / \text{ATPase}$  dont l'activité est sous le contrôle des hormones thyroïdiennes. Il n'est pas compris pourquoi cette association ne touche que les hommes d'origine asiatique, d'autant qu'il n'y a pas de mutation sur le gène du canal calcique (CACNL1A3). Nous rapportons le cas d'un laotien de 42 ans hospitalisé pour des douleurs des membres inférieurs. Depuis plusieurs mois il présentait des épisodes régressifs associant douleurs et faiblesse des jambes. A son entrée il existait un déficit moteur profond des quatre membres. Les examens paracliniques révélaient une hypokaliémie (1,8 mmol/l), une hyperthyroïdie (FT-3 = 36 pmol/l, TSH < 0.005 mU/l) et un goitre multihétéronodulaire. La correction de l'hypokaliémie permit la disparition du déficit moteur. Après thyroïdectomie et substitution par L-thyroxine, il restait indemne de tout symptôme.

# Paralysie périodique hypokaliémique révélant une thyrotoxicose

I. Penisson-Besnier, F. Letournel, N. Kerkeni, F. Dubas, P. Alquier, V. Rohmer

R É S U M É

**INTRODUCTION :** La paralysie périodique hypokaliémique est une complication rare de l'hyperthyroïdie. Elle affecte quasi-exclusivement l'homme jeune d'origine asiatique et est sporadique. Sa présentation clinique est identique à celle des paralysies périodiques hypokaliémiques familiales et son traitement est celui de l'hyperthyroïdie.

**OBSERVATION :** Un Laotien âgé de 42 ans avait depuis quelques mois des accès de douleurs avec faiblesse des membres inférieurs. A l'occasion d'un épisode tétraparétique avec hypokaliémie, fut posé le diagnostic d'hyperthyroïdie. Le patient demeurait asymptomatique à distance de la normalisation de la fonction thyroïdienne.

**COMMENTAIRES :** La physiopathologie fait intervenir la pompe Na/K ATPase dépendante dont le nombre et l'activité sont accrus par les hormones thyroïdiennes. Le caractère ethnique et la prédominance masculine de cette affection demeurent cependant mal compris.

*Presse Med* 1998 ; 27:1430-1

© 1998, Masson, Paris

normalisation de la kaliémie après un apport de 1,50 g de ClK. Le traitement de l'hyperthyroïdie comporta dans un premier temps du carbimazole (30 mg/jour). Trois mois plus tard, le patient était euthyroïdien et aucune récurrence paralytique n'était survenue. Une thyroïdectomie totale fut pratiquée. Revu 5 mois plus tard, le patient demeurait asymptomatique sous L-T4.

DISCUSSION

Décrites pour la première fois par Rosenfeld en 1902, les paralysies périodiques hypokaliémiques associées à une hyperthyroïdie (PPT) (pour revue de la littérature, voir [2]), s'observent très préférentiellement chez l'homme jeune (20 à 40 ans) d'origine asiatique. La PPT touche 2 à 8 % des sujets hyperthyroïdiens asiatiques, contre 0,1 à 0,2 % des hyperthyroïdiens de race blanche [3]. Cependant la fréquence des PPT au Japon a chuté de 40 % en 30 ans, parallèlement à l'occidentalisation de l'alimentation [4]. Il s'agit le plus souvent d'une affection sporadique. Une prédisposition génétique est probable en raison du caractère ethnique et d'une association plus fréquente aux haplotypes A2Bw22 et Aw19B17 [5].

L'hyperthyroïdie est nécessaire à la genèse des accès paralytiques des PPT, à la différence des formes familiales où elle n'en modifie ni la fréquence, ni la gravité [6]. Elle précède les accès paralytiques dans la moitié des cas, son expression étant le plus souvent fruste. Il n'y a pas de corrélation entre sa cause ou sa gravité, et l'intensité des épisodes paralytiques. Outre l'hyperthyroïdie, les autres caractères distinctifs entre PPT et PPF sont le sex-ratio (respectivement 70/1 contre 3/1), l'âge de début (troisième-quatrième décennie contre première-seconde) et le caractère sporadique et ethnique que nous avons déjà souligné. Chez 9 patients asiatiques souffrant de PPT,

Les paralysies périodiques familiales hypokaliémiques (PPF), de transmission autosomique dominante, sont des maladies du canal calcium musculaire [1]. Ces formes sont à distinguer de tableaux sporadiques, observés de façon quasi constante chez l'homme jeune d'origine asiatique, où les accès paralytiques constituent la complication d'une hyperthyroïdie qu'ils peuvent révéler. C'est le cas de l'observation que nous rapportons ici. Bien qu'il s'agisse d'une situation rare, son identification est importante puisque le traitement de l'hyperthyroïdie entraîne la guérison.

OBSERVATION

M. T..., 42 ans, Laotien d'origine Chinoise, vivant en France depuis 17 ans, fut hospitalisé en raison

d'un déficit moteur des 4 membres. Ses antécédents étaient marqués par une hypertension artérielle, traitée depuis 4 ans par bisoprolol (10 mg par jour). Il n'y avait pas d'antécédent familial notable.

Depuis 8 mois, par périodes de 2 à 7 jours, il se plaignait de douleurs des cuisses, débutant en fin d'après midi et s'accompagnant d'une sensation de faiblesse. Elles l'obligeaient à s'allonger et avaient régressé au réveil. Lors de l'hospitalisation, les douleurs furent plus intenses et s'accompagnèrent d'un déficit proximal sévère des 4 membres. Les réflexes ostéotendineux étaient tous présents. On notait une tachycardie à 100/mn, un tremblement fin des extrémités et une hypersudation des mains. Le ionogramme sanguin montrait une hypokaliémie à 1,8 mmol/l avec une kaliurèse basse (10 mmol/l). La cortisolémie, le cortisol libre urinaire, l'aldostéronémie et l'aldostéronurie étaient normaux. La rénine active en position couchée était à 18 ng/l (3,5 à 14,5), et à 27 ng/l en position debout (6,5 à 25,5). La thyroxine libre était à 36 pmol/l (12 à 21), la TSH inférieure à 0,005 mUI/l (0,1 à 4,5), le dosage des anticorps anti-récepteur de la TSH négatif et la calcitonine inférieure à 2 ng/l. L'échographie thyroïdienne montra un goitre multinodulaire, hétérogène avec 2 nodules hyperfixants à la scintigraphie. Le diagnostic de goitre multihétéronodulaire toxique a donc été porté. L'évolution fut marquée par une régression du déficit moteur en 8 heures et une

Service de Neurologie A (IP-B, FL, FD), Hôpital Larrey, CHU, F49033 Angers Cedex 01.

Service de Réanimation médicale (NK, PA), CHU, F49033 Angers Cedex 01.

Service de Médecine C (VR), CHU, F49033 Angers Cedex 01.

Correspondance : I. Penisson-Besnier, Service de Neurologie A, Hôpital Larrey, 4, rue Larrey, F 49033 Angers Cedex 01.

Reçu le 27 mars 1998 ; accepté le 28 mai 1998.

la recherche de la mutation responsable des PPF s'est avérée négative [7].

Cliniquement, rien ne permet de distinguer les accès paralytiques des PPT, de ceux survenant au cours des PPF. Ils se manifestent par un déficit surtout proximal, d'intensité variable et prédominant aux membres inférieurs. Le début est aigu ou parfois précédé, comme dans l'observation rapportée, de myalgies, crampes ou raideur musculaire. La poursuite de l'effort lors des prodromes est susceptible de diminuer voire d'empêcher la survenue de l'épisode qui dure de 2 à 36 heures. Les réflexes ostéotendineux sont diminués voire abolis. Les facteurs déclenchants les plus classiques sont l'hyperinsulinisme suite à un repas riche en hydrates de carbone, et le repos après un effort musculaire. L'hypokaliémie est inconstante pendant l'accès paralytique. Le taux sérique de créatine kinase est normal.

La physiopathologie des PPT demeure mal comprise. Il existe une inexcitabilité musculaire, secondaire à l'hypokaliémie par transfert intracellulaire [8]. La pompe Na/K ATPase dépendante est une enzyme membranaire, et c'est dans le muscle squelettique que sa concentration est la plus grande. Il a été démontré que les hormones thyroïdiennes en augmentaient le nombre [9]. Leur activité est accrue dans les lymphocytes des sujets hyperthyroïdiens [10]. Outre les hormones thyroïdiennes, d'autres facteurs sont susceptibles de modifier l'activité de la pompe Na/K ATPase [11]. L'insuline, par un récepteur propre, active la pompe ; or, après une épreuve d'hyperglycémie provoquée par voie orale, l'hyperglycémie et l'hyperinsu-

## S U M M A R Y

### Hypokaliemic periodic paralysis disclosing thyrotoxicosis

**BACKGROUND:** Hypokaliemic periodic paralysis is an uncommon complication of hyperthyroidism occurring sporadically almost exclusively in young Asian men. The clinical presentation is the same as in familial hypokaliemic periodic paralysis. Treatment consists of conventional management for thyrotoxicosis.

**CASE REPORT:** A Laotian man aged 42 years had suffered episodes of pain and fatigue in the lower limbs lasting 2 to 7 days over the last few months. The patient was hospitalized with severe limb pain. Clinical examina-

tion found severe motor deficit involving all four limbs. Laboratory findings included hypokaliemia (1.8 mmol/l) and hyperthyroidism (free thyroxin 36 pmol/l, TSH < 0.005 mIU/l). Thyroid echography revealed multinodular goitre with two heterogeneous nodules. Strong uptake was seen on the scintigram. The motor deficit regressed within 8 hours and the kaliemia was restored with 1.50 g KCl. The patient was discharged with carbimazole (30 mg/d). Three months later he was euthyroid and symptom free. Total thyroidectomy was performed and L-

thyroxin prescribed. The patient remains symptom-free at the last follow-up, 5 months after thyroidectomy.

**DISCUSSION:** The pathogenesis of hypokaliemic periodic paralysis involves the ATPase-dependent sodium-potassium pump whose activity is stimulated by thyroid hormones. The reasons for the ethnic and male predominance are poorly elucidated.

I. Penisson-Besnier, F. Letournel,  
N. Kerkeni *et al.*

*Presse Med* 1998 ; 27:1430-1

1998, Masson, Paris

linisme sont plus importants au cours des PPT que lors des hyperthyroïdies non compliquées [12]. Les catécholamines, par l'intermédiaire de récepteurs  $\beta_2$ , stimulent également la pompe, le propranolol ayant d'ailleurs été rapporté comme pouvant prévenir les récurrences paralytiques [13]. Enfin, chez l'animal, les androgènes stimulent la pompe Na/K ATPase dépendante alors que les estrogènes ont une action inhibitrice [14]. Il demeure que l'ensemble de ces hypothèses ne permet pas de comprendre les caractéristiques essentielles des PPT, à savoir leur expression élective chez le sujet masculin d'origine asiatique, d'autant plus que l'activité de base de cette enzyme dans

les érythrocytes est constitutionnellement plus basse chez l'homme que chez la femme [15].

Le traitement de la PPT est celui de l'hyperthyroïdie permettant la disparition des accès paralytiques. Sa rechute conduit à une réapparition de la symptomatologie musculaire, d'où l'intérêt d'une opothérapie progressive si une thyroïdectomie a été nécessaire. A la phase aiguë, une supplémentation potassique peut éventuellement être proposée, sous stricte surveillance, afin d'éviter une hyperkaliémie de rebond. Il est possible d'y associer un régime pauvre en glucides. Enfin, à la différence des PPF, l'acétazolamine est inefficace dans la prévention. □

## [Références]

- Fontaine B, Vale Santos JM, Jurka-Rott K *et al.* Mapping of hypokaliemic periodic paralysis (HypoPP) to chromosome 1q31-32 in three European families. *Nature Genet* 1994 ; **6**:267-72.
- Lehmann-Horn F, Engel AG, Ricker K, Rüdell R. The Periodic Paralysis and Paramyotonia Congenita. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, eds. *Myology*, 2nd edition, New York, Mc Graw-Hill, 1994:1303-33.
- Ko JTC, Chow CC, Yeung VTF, Chan HHL, Li JKY, Cockram CS. Thyrotoxic periodic paralysis in a Chinese population. *Q J Med* 1996 ; **89**:463-8.
- Shizume K, Shishiba Y, Kuma K *et al.* Comparison of the incidence of association of periodic paralysis and hyperthyroidism in Japan in 1957 and 1991. *Endocr J* 1992 ; **39**:315-18.
- Yeo PPB, Chan SH, Lui KF. HLA and thyrotoxic periodic paralysis. *BMJ* 1978 ; **2**:930.
- Engel AG. Thyroid function and periodic paralysis. *Am J Med* 1961 ; **30**:327-33.
- Ikeda Y, Abe K, Watanabe M *et al.* A Japanese family of autosomal dominant hypokaliemic periodic paralysis with a CACNL1A3 gene mutation. *Eur J Neurosci* 1996 ; **3**:441-5.
- Shizume K, Shishiba Y, Sakuma M, Yamauchi H, Nakao K, Okinaka S. Studies on electrolyte metabolism in idiopathic and thyrotoxic periodic paralysis. I. Arteriovenous differences of electrolytes during induced paralysis. *Metabolism* 1966 ; **15**:138-44.
- Kjeldsen K, Nørgaard A, Gotzsche CO, Thomassen A, Clausen T. Effect of thyroid function on number of Na/K ATPase in human skeletal muscle. *Lancet* 1984 ; **2**:8-10.
- Oh VMS, Taylor EA, Yeo SH, Lee KO. Cation transport across lymphocyte plasma membranes in euthyroid and thyrotoxic men with and without hypokaliemic periodic paralysis. *Clin Sci* 1991 ; **78**:199-206.
- Clausen T. Regulation of active Na-K transport. *Physiol Rev* 1986 ; **66**:554-73.
- Chan A, Shinde R, Chow CC, Cockram CS, Swaminathan R. Hyperinsulinaemia and Na,K ATPase activity in thyrotoxic periodic paralysis. *Clin Endocrinol* 1994 ; **41**:213-16.
- Yeung RT, Tse TF. Thyrotoxic periodic paralysis: effect of Propranolol. *Am J Med* 1974 ; **21**:341.
- Guerra M, Rodriguez Del Castillo A, Battaner E, Mas M. Androgens stimulate optic area Na,K-ATPase activity in male rats. *Neuroscience Letters* 1987 ; **78**:97-100.
- Lasker N, Hopp L, Grossman S, Bamforth R, Aviv A. Race and sex differences in erythrocyte Na,K, and Na,K-Adenosine Triphosphatase. *J Clin Invest* 1985 ; **6**:1813-20.

## Annexe 2

### **Transsphenoidal surgery in the elderly.**

**F LETOURNEL**, Ph Menei, J-P Saint-André, G Guy.

*J Am Geriatr. Soc.* 2003. 51 (5):729-730

### **Résumé :**

Les tumeurs pituitaires sont dominées par les adénomes dont le traitement principal reste la chirurgie par voie transsphénoïdale. Peu de données dans la littérature concernent la prise en charge et le devenir d'une telle chirurgie chez les sujets âgés. L'objectif de cette étude rétrospective sur 17 ans était d'apprécier ces critères dans une telle population. Nous avons inclus 59 patients de plus de 65 ans suivis en moyenne sur 33 mois. La principale manifestation clinique résultait d'un syndrome de masse (céphalées, troubles visuels) motivant le plus souvent le geste opératoire. L'adénome était essentiellement de type gonadotrope. La mortalité était de 1.7%, comme dans les données existantes dans la littérature et notamment chez des sujets plus jeunes. Les complications (spécifiques ou non spécifiques) étaient transitoires avec une fréquence comparable à celle observée dans les autres séries. Les manifestations visuelles inaugurales étaient améliorées après exérèse chirurgicale. Cette étude a permis de confirmer que la chirurgie par voie transsphénoïdale est bien tolérée dans ce groupe de patient à risque et que l'âge seul n'est pas une contre indication à la chirurgie. D'autre part les manifestations inaugurales, le plus souvent visuelles, peuvent être attribuées faussement à une cataracte et doivent orienter sur le dépistage d'une tumeur pituitaire chez les patients âgés.



5. Haase KK, Rojas-Fernandez CI, Lane L et al. Potential interaction between celecoxib and warfarin. *Ann Pharmacother* 2000;34:666–667.
6. Celebrex (celecoxib) [package insert]. Chicago, IL: GD Searle, 1999.
7. Michalets EL. Update: Clinically significant cytochrome P-450 drug interactions. *Pharmacotherapy* 1998;18:84–112.
8. Garnett WR. Clinical implications of drug interactions with coxibs. *Pharmacotherapy* 2001;21:1223–1232.
9. Kaplan RC, Heckbert SR, Koepsell TD et al. Risk factors for hospitalized gastrointestinal bleeding among older persons. *J Am Geriatr Soc* 2001;49:126–133.

## TRANSSPHENOIDAL SURGERY IN THE ELDERLY

*To the Editor:* There are few published clinical series of elderly patients with pituitary tumors regarding management and outcome. However, the proportion of elderly in the population is increasing,<sup>1–3</sup> and the medical conditions in this age group will therefore be important. We studied patients aged 65 and older who underwent a transsphenoidal surgery in the department of neurosurgery at the Angers' University Hospital. The aim of the study was to quantify the outcome of this surgery in this age group.

Fifty-nine patients (median age 70.6) had transsphenoidal surgery between 1981 and 1998. The most common presenting feature was of mass effect (35 cases), including headache, evidence of visual impairment, and progressive ophthalmoplegia. A pituitary apoplexia was the mode of presentation in six cases. Twelve patients were diagnosed with pituitary tumors on the basis of clinical endocrinological features: six with acromegalia, five with hypopituitarism, and one with Cushing disease. Two patients had a sudden cerebrospinal fluid (CSF) leak. The last four cases were known to have a pituitary adenoma.

Transsphenoidal surgery was performed for a chiasmatic syndrome (n = 34), ophthalmoplegia (n = 8), pituitary apoplexia (n = 6), acromegalia (n = 6), CSF leak (n = 2), suspected abscess (n = 2), and Cushing disease (n = 1). Forty-nine patients had a pituitary adenoma; 25 of these were of gonadotrope type. In two cases, an empty sella was the diagnosis, presenting as sudden rhinorrhea. Two had pituitary abscess, two a pituitary carcinoma, and four a pituitary tumor of other histological type (two craniopharyngiomas, one pituitary metastasis, one lymphocytic hypophysitis).

Of the major specific complications, two patients developed meningitis, two a sellar hematoma, and one a persistent CSF leak that required re-operation. Of the nonspecific complications, one patient had shock during anesthesia, and three had phlebitis, of which one died from a pulmonary embolism 11 days after surgery. Thus, mortality was 1.7% and morbidity 13%.

For most of the patients, the outcome was favorable (Table 1). The median follow-up period was 33.5 months. The majority (39 cases) showed improvement in vision. Twenty patients had no treatment. Thirty-six required at least hydrocortisone and one gonadotrophins. Diabetes insipidus was definitive in six patients. One patient, with documented increase in tumor size, received bromocriptine therapy. Three patients died during follow-up, one from unexplained shock 4 years after transsphenoidal surgery and two from their pituitary carcinoma.

**Table 1. Outcome from Transsphenoidal Surgery in the Elderly**

Outcome	n
Death	3
Visual outcome	
Improvement	39
Stabilized	17
Impairment	2
Endocrinological outcome	
No treatment	20
Hydrocortisone	36
Androgen	1
Bromocriptine	1
Magnetic resonance imaging or computed tomography scan	
Normal	23
Stabilized residue	24
Recurrence	3
Unknown	8

This study is one of the largest reported series in the elderly (see<sup>3</sup> for review) that shows the safety<sup>4</sup> of transsphenoidal surgery in patients aged 65 and older. As with another study,<sup>3</sup> our review shows that nonfunctioning adenomas are the most common tumors detected in this age group. Gonadotrophic adenomas are the most common type (25 cases in our study).

In accordance with literature data,<sup>1,3,5</sup> our most common mode of presentation was visual impairment. Pospiech et al.<sup>6</sup> have shown that 62% of elderly patients with pituitary tumors had visual impairment at diagnosis, so it is important in this age group to pay attention to these signs and to differentiate "pituitary visual impairment" from other causes of vision disturbance, most often cataracts. Pituitary tumors are a difficult diagnosis in elderly because endocrinological signs or tests are modified,<sup>2,7,8</sup> as in our study (12 patients).

Mortality in the elderly is less than 1%<sup>9</sup> when transsphenoidal surgery is performed, the same as in younger patients. This result is similar to ours, 1.7%. Postoperative complications are rare (2–5%)<sup>4,10</sup> and are most often transient and benign.<sup>10</sup> Diabetes insipidus (Table 1) was permanent in six cases. Thirty-six patients needed at least hydrocortisone, without increase in cardiovascular complications, as described in one report.<sup>1</sup> The majority of our patients (Table 1) had visual improvement, which is similar to other series.<sup>1,3,4,7,10</sup> No patient had radiotherapy.

In conclusion, transsphenoidal surgery is a well-tolerated treatment in elderly patients with few life-threatening complications even though there is a high incidence of other medical conditions in patients aged 65 and older. Age alone should not be a deterrent to this surgery. Because of age, visual impairment could be misattributed to cataract. We think that visual examination is important in this age group, looking for a chiasmatic syndrome; the majority of patients show visual improvement after transsphenoidal surgery.

*Franck Letournel, MD  
Cellular Biology Laboratory*

*Philippe Menei, MD, PhD  
Gilles Guy, MD  
Department of Neurosurgery*

*Jean-Paul Saint-Andre, MD  
Pathological Anatomy Laboratory  
Center Hospitalier Universitaire D'Angers  
Cedex, France*

## REFERENCES

1. Benbow SJ, Foy P, Jones B et al. Pituitary tumours presenting in the elderly: Management and outcome. *Clin Endocrinol* 1997;46:657-660.
2. Turner HE, Wass JA. Pituitary tumours in the elderly. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1997;11:407-422.
3. Turner HE, Adams CB, Wass JA. Pituitary tumors in the elderly: A 20 year experience. *Eur J Endocrinol* 1999;140:383-389.
4. Kurosaki M, Lüdecke DK, Flitsch J et al. Surgical treatment of clinically non-secreting pituitary adenomas in elderly patients. *Neurosurgery* 2000;47:843-849.
5. Cohen DL, Bevans JS, Adams CB. The presentation and management of pituitary tumours in the elderly. *Age Ageing* 1989;18:247-252.
6. Pospiech J, Stolke D, Pospiech FR. Surgical treatment of pituitary adenomas in elderly. *Acta Neurochir* 1981;65:35-36.
7. Fraioli B, Pastore FS, Signoreti S et al. The surgical treatment of pituitary adenomas in the eighth decade. *Surg Neurol* 1999;55:261-267.
8. Mindermann T, Wilson CB. Age-related and gender occurrence of pituitary adenomas. *Clin Endocrinol* 1994;41:359-364.
9. Chanson Ph. Traitement des adénomes hypophysaires. *Press Med* 1998;27:2077-2087.
10. Giovanelli M, Losa M, Mortini P. Surgical therapy of pituitary adenomas. *Metabolism* 1996;45:115-116.

## Annexe 3

### **Two clinicopathological cases of a dominantly inherited, adult-onset orthochromatic leukodystrophy.**

**F LETOURNEL**, F Etcharry-Bouyx, C Verny, A Barthelaix, F Dubas.

*J Neurol Neurosurg Psychiat.* 2003.74 (5): 671-673

#### **Résumé:**

Les leucodystrophies orthochromatiques (LDO) sont un groupe hétérogène de maladies affectant la myéline du système nerveux central. Elles surviennent le plus souvent chez l'enfant et le déficit enzymatique est le plus souvent inconnu. Dans cet article nous rapportons les caractéristiques anatomo-cliniques d'une nouvelle famille de LDO définie par trois traits remarquables : une transmission probablement autosomique dominante, la présence de deux phénotypes cliniques en fonction de l'âge de début et la pauvreté des anomalies radiologiques dans l'un des cas.

## SHORT REPORT

## Two clinicopathological cases of a dominantly inherited, adult onset orthochromatic leucodystrophy

F Letournel, F Etcharry-Bouyx, C Verny, A Bartheleix, F Dubas

*J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;**74**:671–673

Leucodystrophies of orthochromatic type are a heterogeneous group that occur mainly in childhood and have no known enzyme deficiency. We report here the clinicopathological features of a new family of orthochromatic leucodystrophy with three main characteristics: a probably autosomal dominant inheritance; two phenotypes based on age of onset; and very few abnormalities of white matter on MRI findings in one case.

The first patient, aged 58 years, had frontal dementia and epilepsy; the second, aged 38 years, had motor signs and dementia, but no epilepsy. The histopathological features of our two cases were leucodystrophy of orthochromatic subtype. However, the radiological features (MRI and mostly FLAIR sequences) of the first case did not suggest leucodystrophy.

Primary leucodystrophies are rare disorders characterised by involvement of white matter, caused by metabolic defects of transport or catabolism of myelin sphingolipids or specific proteins. These diseases are considered to be genetic disorders that occur mainly in childhood. However, some are of adult onset including metachromatic leucodystrophy (MLD),<sup>1</sup> Krabbe's disease,<sup>2</sup> or adrenoleucodystrophy (ALD).<sup>3</sup> There is a heterogeneous group, which has no known enzyme deficiency, called non-metachromatic leucodystrophy or orthochromatic leucodystrophy.<sup>4</sup> The lipid catabolism in this group is of sudanophilic type. Most cases are sporadic but a few families with a dominant inheritance have been described. They can be a pigmentary type of orthochromatic leucodystrophy,<sup>5</sup> associated with cerebellar ataxia and dementia,<sup>6</sup> or mimicking chronic multiple sclerosis (cerebellar ataxia, pyramidal dysfunction, disturbance of autonomic nervous system) and related to chromosome 5q31.<sup>7,8</sup>

We report here the clinicopathological features of a new family of orthochromatic leucodystrophy with three main characteristics: a probably autosomal dominant inheritance, two phenotypes based on age of onset, and very few abnormalities of white matter on MRI findings in one case.

## CASE REPORTS

## The family

The family (fig 1A) is of north Italian origin. It came to our attention when propositus III-1, aged 57, and III-9, aged 38, were examined by two of us (FL and FD). There was no consanguinity. The grandfather (I-1) died around 45 years of age from a myocardial infarction, and his wife (I-2) from an unknown aetiology, before the age of 50.

## Case III-1

This 57 year old woman (fig 1A), without personal history, had a six months history of difficulties in executive functions, mainly regarding learning new tasks. She then had three generalised convulsions with a right hemiparesia lasting for 48

hours. The first neurological examination was normal. Neuropsychological examination showed predominantly a frontal dysfunction. There were some linguistics anomalies (severe reduction of verbal fluency test), impairment on Luria's motor examination tasks,<sup>9</sup> and conceptual apraxia with no constructional apraxia or agnosia. Her intellectual efficiency was poor (on the Wechsler Adult Intelligence Scale-Revised verbal,<sup>10</sup> IQ of 72, performance IQ of 81, and total IQ of 74). Some memory difficulties and even more severe frontal dysfunction were seen in classic executive function tests (Tower of London planning test,<sup>11</sup> Stroop colour word test,<sup>12</sup> modified card sorting test,<sup>13</sup> and trail making test<sup>14</sup>). Routine blood tests were normal. A moderate increase of proteins (1.3 g/l) in her cerebrospinal fluid (CSF), without cells, was noted. Levels of arylsulphatases A and B, very long chain fatty acids (VLCFA), hexosaminidases A and B, mannosidases, fucosidases, and galactosidases were normal. Computed tomography (CT) scan showed frontal atrophy and enlarged ventricles. Brain magnetic resonance imaging (MRI) confirmed a predominantly frontal cortical and corpus callosum atrophy. Few hyperintensities in the frontal white matter and periventricular zone were seen, even on FLAIR sequences (fig 1B). She died three years after the onset of the disease, with severe frontal dementia (MMSE impossible), grasping reflex, mutism, and parkinsonism. At the end of her life, MRI showed few hyperintensities in the white matter. Her mother (II-2) had the same symptoms (bulimia, severe reduction of verbal fluency, apathy, grasping reflex, convulsions) and frontal atrophy seen on gaseous encephalography. Her symptoms started at the same age and lasted for the same period (homochrony).

The whole brain showed a frontal atrophy. Coronal sections showed diffuse pallor of the white matter, gelatinous aspect, and a frontal predominance as the aspect as in III-9 (fig 1F). The brain stem, cerebellum, and infratentorial white matter were normal. On haematoxylin-phloxin staining, demyelination was evident (fig 1C), sparing U fibres. A cavitation was seen. Posteriorly lesions were less severe. Axons were relatively spared, and an occasional perivascular inflammation reaction was noted (fig 1C). Macrophages were sparse, containing luxol and Sudan Red positive material (fig 1D). No pigmented glial cells were seen. The grey matter, thalamus, caudate, optic tracts, cerebellar grey and white matter, brain stem nuclei, and long tracts were unremarkable.

## Case III-9

This 38 year old man (fig 1A), without personal history, presented with pyramidal syndrome of the right leg which had been present for several months. The first neurological examination showed a right hemiparesia with pyramidal signs. Brain tomodensitometry (CT scan) showed marked,

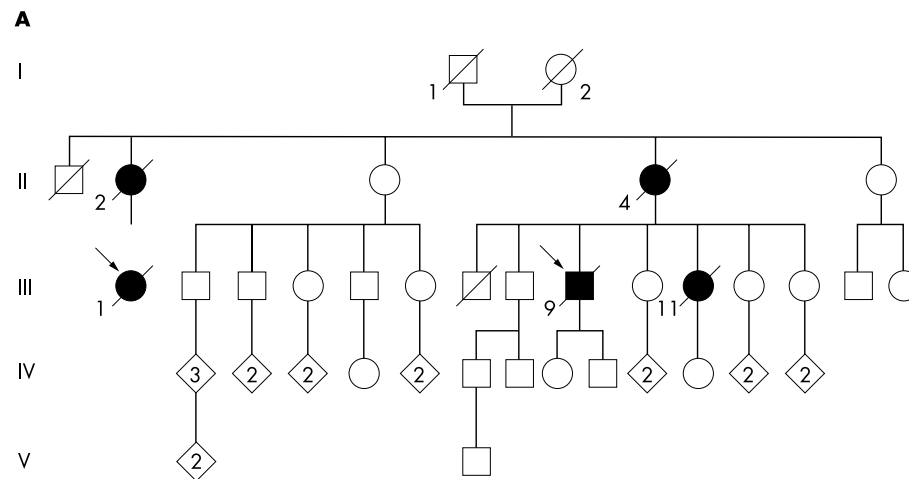
**Abbreviations:** ALD, adrenoleucodystrophy; CSF, cerebrospinal fluid; CT, computed tomography; MLD, metachromatic leucodystrophy; MRI, magnetic resonance imaging; VLCFA, very long chain fatty acids

diffuse, and symmetric hypodensities of the white matter (fig 1E). There was no sign of atrophy. Routine blood tests were normal. CSF examination was unremarkable and arylsulphatases A and B were normal. His symptoms were progressive with a right hemiplegia and cortical blindness at the end of the evolution. Neuropsychological examination showed a spatial dysgraphia, a constructional apraxia (0 at cubes on the Wechsler Adult Intelligence Scale). Some memory difficulties were present and his intellectual efficiency was poor. There were neither comportmental abnormalities nor agnosia. These results were in favour of a diffuse neuropsychological alteration. No convulsion was noted during the illness. He died after two years. His mother (II-4) and one of his sisters (III-11) had the same clinical signs (homochrony) ascertained by neurological examination, which differed from those of their cousin (III-1).

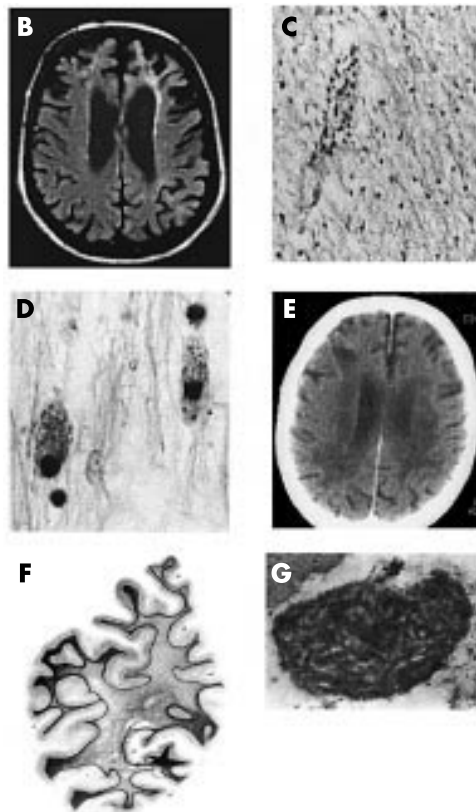
The whole brain showed no gross abnormality. Coronal sections and microscopic examination showed the same lesions as III-1, with demyelination sparing U fibres (fig 1F). However, demyelination was more prominent in the occipital white matter and macrophagic reaction was more evident without pigments. No pigmented glial cells were seen. Ultrastructural study showed electron dense lamellar inclusions with curved or parallel arrangement giving a fingerprint pattern (fig 1G). These macrophagic inclusions were not membrane bound. The grey matter, thalamus, caudate, optic tracts, cerebellar grey and white matter, brain stem nuclei, and long tracts were unremarkable.

## DISCUSSION

Orthochromatic leucodystrophy is a rare heterogeneous group of primary leucodystrophy,<sup>3</sup> in which most cases are sporadic.



**Figure 1** Imagery, histological features, and pedigree of the kindred. (A) Pedigree of the kindred with hereditary orthochromatic leucodystrophy. Affected subjects are indicated by solid symbols, deceased subjects by slashed symbols, females by circles, males by squares, and subjects of both sexes by diamonds. (B) Axial MRI (FLAIR sequence) of patient 1 showed frontal atrophy and few hyperintensities in the white matter. (C) Haematoxylin-phloxin staining of patient 1 showed demyelination, perivascular reaction, and preservation of axons. (D) Sudan Red staining of patient 1 showed lipid accumulation in macrophages. (E) CT scan of patient 2 showed hypodensities of the white matter. (F) Woelcke staining of patient 2 showed intense and diffuse demyelination sparing U fibres. (G) Fingerprint inclusion; patient 2.



The primary metabolic defect is not known, although the defect in one family has been linked to chromosome 5.<sup>8</sup> Adult onset dominant families have rarely been described; they may have cerebellar signs and dementia,<sup>6</sup> or cerebellar, pyramidal, and autonomic abnormalities,<sup>15</sup> and symptoms can mimic chronic multiple sclerosis (as in our second case).<sup>7,16</sup> However, for dementia, the least common aetiology is primary leucodystrophy.

The second case was misdiagnosed as chronic progressive multiple sclerosis and the first as having a ceroid lipofuscinosis. There was no history of consanguinity. Case II-2 had the same signs as III-1, but no histopathological data were available. Clinical symptoms of II-4 and III-11 were identical to III-9. Except for III-11, in whom hypodensities of the white matter (CT scan) were noted, no radiological or histopathological data are available. In this family a homochrony does exist; based on clinical features two phenotypes can be individualised: one, after 55 years of age, including frontal dementia and epilepsy; and the second in the fourth decade, including motor signs and dementia, but no epilepsy.

The histopathological features of our two cases proved to be leucodystrophy of orthochromatic subtype. Lesions were bilateral, symmetrical, sparing peripheral nerves and U fibres, with macrophages containing sudanophilic, non-metachromatic lipids. The striking macrophage reaction, more prominent in the second case, was most probably related to the short term evolution (two years). However, one interesting feature is the occipital dominance of lesions in the second case, as usually they are frontal.<sup>17,18</sup> ALD and MLD were excluded in this family because of the levels of arylsulphatases A and B, and VLCFA.<sup>1</sup> Binswanger's disease was unlikely as no evidence of infarcts was noted. Fingerprint inclusions have been observed in various types of ceroid lipofuscinosis. However, they have been reported in pigmentary leucodystrophies,<sup>17</sup> and are compatible with this diagnosis.

The inheritance of our family is most likely dominant since both a parent and a child of both sexes are affected over two generations. However, the phenotype does not resemble other phenotypes in the literature.<sup>6,7,15,19</sup>

CT findings were compatible with a white matter disease in the second case (III-9), including diffuse, but symmetric, hypodensities. However, the radiological features of the first case were not in favour of leucodystrophy, until the postmortem examination. MRI and mostly FLAIR sequences are supposed to be a very sensitive tool to detect white matter abnormalities, even before clinical signs.<sup>3,20</sup> To our knowledge this is the first case report of a primary leucodystrophy in which no evident hyperintensities are noted on MRI; however, normal neuroimaging has been reported in a case of proven adult onset Krabbe's disease.<sup>21</sup> It might related to a poor macrophagic reaction or a lack of sensitivity of MRI, even if FLAIR sequences have been done. This means that absence of pathological changes of the white matter does not rule out the diagnosis of leucodystrophy.

In conclusion, we have described a new hereditary orthochromatic leucodystrophy characterised by late adult onset, probably dominant inheritance, a phenotype depending

on age of onset, a relatively short term evolution (two to three years after clinical onset) and, at least in one case, MRI findings not immediately suggestive of white matter disease.

#### Authors' affiliations

**F Letournel, A Barthelaix**, Cell Biology Laboratory, CHU, 49033 Angers, France

**F Dubas, F Etcharry-Bouyx, C Verny**, Department of Neurology, CHU, 49033 Angers, France

Correspondence to: Professor F Dubas, Department of Neurology, CHU, 49033 Angers, France; [FrDubas@chu-angers.fr](mailto:FrDubas@chu-angers.fr)

Received 20 August 2002

Accepted 3 December 2002

#### REFERENCES

- Baumann N**, Carreau V, Lefevre M, *et al.* Adult forms of metachromatic leucodystrophy: clinical and biochemical approach. *Dev Neurosci* 1991;**13**:211–15.
- Kolodony EH**, Raghavan S, Krivit W. Late onset Krabbe disease (globoid cell leukodystrophy): clinical and biochemical features of 15 cases. *Dev Neurosci* 1991;**13**:232–9.
- Baumann N**, Turpin JC. Adult-onset leucodystrophy. *J Neurol* 2000;**247**:751–9.
- Turpin JC**, Gray F, Baumann N. Leucodystrophies. In: *Encyclopédie médico-chirurgicale*. Paris, 17-076-D-10.
- Constantinidis J**, Wisniewski TM. The dominant form of the pigmentary orthochromatic leucodystrophy. *Acta Neuropathol* 1991;**82**:483–7.
- Tagawa A**, Ono S, Inoue K, *et al.* A new familial adult onset leucodystrophy manifesting as cerebellar ataxia and dementia. *J Neurol Sci* 2001;**183**:47–55.
- Eldridge R**, Anayiotos CP, Schlesinger S, *et al.* Hereditary adult-onset leucodystrophy simulating chronic progressive multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1984;**311**:948–53.
- Coffeen C**, McKenna CE, Koeppen AH, *et al.* Genetic localization of an autosomal dominant leucodystrophy mimicking chronic progressive multiple sclerosis to chromosome 5q31. *Hum Nat Genet* 2000;**9**:787–93.
- Luria AR**. *Higher cortical functions in man*. New York: Basic Books Consultants Bureau, 1966.
- Wechsler D**. *Echelle d'Intelligence de Wechsler pour Adultes (forme révisée)*. Paris: Adaptation et traduction du Centre de Psychologie Appliquée, 1989.
- Shallice T**. Specific impairments of planning. In: Broadbent DE, Weiskrantz L, eds. *The neuropsychology of cognitive functions*. London: The Royal Society, 1982:199–209.
- Stroop JR**. Studies of interferences in serial verbal reactions. *J Exp Neurol* 1935;**18**:643–62.
- Nelson HE**. A modified card sorting test sensitive to frontal lobe defect. *Cortex* 1976;**12**:313–24.
- Reitan RM**. Validity of the trail making test as an indication of brain damage. *Percept Mot Skills* 1958;**8**:271–6.
- Asahara H**, Yoshimura T, Sada S, *et al.* A Japanese family with probably autosomal dominant adult-onset leucodystrophy. *Rinsho Shinkeigaku* 1996;**36**:968–72.
- Schwankhaus JD**, Katz DA, Elridge R, *et al.* Clinical and pathological features of an autosomal dominant, adult-onset leucodystrophy simulating chronic progressive multiple sclerosis. *Arch Neurol* 1994;**51**:757–66.
- Gray F**, Destee A, Bourre JM, *et al.* Pigmentary type of orthochromatic leucodystrophy (OLD): a new case with ultrastructural and biochemical study. *J Neuropathol Exp Neurol* 1987;**46**:585–96.
- Knopman D**, Sung JH, Davis D. progressive familial leucodystrophy of late onset. *Neurology* 1996;**46**:429–34.
- Abe K**, Ikeda M, Watase K, *et al.* A kindred of hereditary adult-onset leucodystrophy with sparing the optic radiations. *Neuroradiology* 1993;**35**:281–3.
- Bergui M**, Bradac GB, Leombruni S, *et al.* MRI and CT in an autosomal-dominant, adult-onset leucodystrophy. *Neuroradiology* 1997;**39**:423–6.
- Bajaj NP**, Waldman A, Orrell R, *et al.* Familial adult onset of Krabbe's disease resembling hereditary spastic paraplegia with normal neuroimaging. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;**72**:635–8.

## Annexe 4

### **Syndrome de Garcin révélant un lymphome malin non hodgkinien.**

**F LETOURNEL**, P Lejeune, N Josselin, A Barthelaix, F Dubas.

*Rev Neurol.* 2004. 160(10):952-5

#### **Résumé :**

En 1926 R Garcin décrit un syndrome associant une atteinte unilatérale et progressive des nerfs crâniens associé le plus souvent à un carcinome de la base du crâne. Dans cette observation nous rapportons le cas d'un homme de 74 ans présentant des manifestations cliniques traduisant une atteinte du V<sup>ème</sup> nerf crânien gauche suivi d'une atteinte du VI, VII et VIII du même côté et finalement de l'atteinte du IX et X homolatéraux. L'IRM mettait en évidence une prise de contraste anormale de ces nerfs et une anomalie de signal du pont en fin d'évolution. Les différentes explorations paracliniques ne montraient aucune anomalie particulière à l'exception d'une hyperlymphocytose modérée dans le Liquide Cérébro-Spinal, sans atypie cytonucléaire. Le patient décédait après un an d'évolution. L'examen neuropathologique permettait de porter le diagnostic de lymphome malin non-hodgkinien de type B, de topographie cérébrale. Bien que rare, cette hypothèse doit être soulevée et activement recherchée lorsque aucun carcinome de la sphère ORL ou de la base du crâne n'est trouvée dans le cas d'un syndrome de Garcin.





## Syndrome de Garcin révélant un lymphome malin non hodgkinien

F. Letournel<sup>1</sup>, P. Lejeune<sup>2</sup>, N. Josselin<sup>3</sup>, A. Barthelaix<sup>1</sup>, F. Dubas<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Biologie Cellulaire, CHU, Angers.

<sup>2</sup> Service de Neurologie, CHD, La Roche-sur-Yon.

<sup>3</sup> Service d'Anatomie Pathologique, CHU, Angers.

<sup>4</sup> Département de Neurologie, CHU, Angers.

Reçu le : 05/06/2003 ; Reçu en révision le : 29/01/2004 ; Accepté le : 23/02/2004.

### RÉSUMÉ

**Introduction.** Le syndrome de Garcin (atteinte unilatérale, progressive et successive des nerfs crâniens) révèle ou complique un carcinome de la sphère ORL. **Observation.** Un homme de 74 ans présenta une atteinte du nerf trijumeau gauche, douloureuse, suivi deux mois plus tard d'une paralysie du nerf abducens gauche, puis un mois après d'une atteinte du paquet acoustico-facial ipsilatéral. L'imagerie par résonance magnétique nucléaire montra un rehaussement isolé de signal des racines des nerfs V, VI, VII et VIII gauche après injection de gadolinium. Le patient décéda un an après le premier symptôme, sans qu'il fût possible de mettre en évidence un carcinome, notamment de la sphère ORL. L'autopsie permit de découvrir un lymphome non hodgkinien de type B, primitif du système nerveux, infiltrant les nerfs crâniens et s'étendant dans le tronc cérébral. **Discussion et conclusion.** L'hypothèse diagnostique d'un lymphome doit être faite lors d'un syndrome de Garcin, quand l'enquête étiologique échoue à mettre en évidence un carcinome.

**Mots-clés :** Syndrome de Garcin • Lymphome • IRM • Neuropathologie

### SUMMARY

**Malignant non-Hodgkin lymphoma presenting with Garcin's syndrome.**

F. Letourne, P. Lejeune, N. Josselin, A. Barthelaix, F. Dubas, Rev Neurol (Paris) 2004 ; 160 : 10, 952-955.

**Introduction.** R Garcin described progressive unilateral cranial nerve palsy in 1926. Garcin syndrome is characterized by progressive involvement of the cranial nerves culminating in total unilateral paralysis of all cranial nerves. Carcinoma of the skull base or ENT regions is the most common etiology. **Case report.** A 74-year-old man developed signs involving the left V<sup>th</sup> (V2 and V3) cranial nerve then the VI<sup>th</sup>, VII<sup>th</sup> and VIII<sup>th</sup> cranial nerves and finally the IX<sup>th</sup> and X<sup>th</sup>. MRI showed involvement of these cranial nerves with gadolinium uptake and involvement of the pons at the terminal phase. Careful ENT explorations failed to reveal a cause. The lymphocyte count was elevated in the cerebrospinal fluid. The patient died one year after diagnosis and the general autopsy was normal. The neuropathological studies led to the post-mortem diagnosis of type B non-Hodgkin lymphoma. **Conclusion.** In patients with Garcin syndrome, lymphoma is a possible diagnosis when carcinoma of the ENT regions or of the skull bases are not present.

**Keywords:** Garcin syndrome • Lymphoma • MRI • Neuropathological exam

### INTRODUCTION

Le syndrome de Garcin, décrit en 1927 (Garcin, 1927), correspond à l'atteinte unilatérale, successive et progressive des nerfs crâniens. Il débute par n'importe quel nerf crânien ou association de nerfs crâniens aux différents étages du tronc cérébral, pour se compléter progressivement. L'absence d'atteinte des voies longues et d'hypertension intracrânienne doit être exigée pour ce diagnostic ; la lésion est en effet extracérébrale. Il est relativement rare et

ses causes sont le plus souvent néoplasiques, soit par extension par contiguïté d'un carcinome de la sphère ORL, soit par des métastases osseuses ou méningées de la base du crâne (Rohmer *et al.*, 1979). Les causes hématologiques, rarement rapportées, sont dominées par les myélomes (Tappin *et al.*, 1996) ou plus rarement les lymphomes (Kaya *et al.*, 1995). Nous décrivons l'observation d'un homme dont le syndrome de Garcin était en rapport avec un lymphome malin non hodgkinien (LMNH) du système nerveux cérébral.

**Tirés à part :** F. DUBAS, Département de Neurologie, CHU, 49033 Angers Cedex. E-mail : FrDubas@chu-angers.fr



## OBSERVATION

*Cas n° 96 798.* — Un homme de 73 ans, droitier, agriculteur à la retraite, avait comme principaux antécédents une broncho-pneumopathie obstructive et une hypertension artérielle. Il consulta pour la première fois en novembre 2000 devant l'apparition de douleur faciale à type de décharge électrique dans le territoire des branches maxillaire et mandibulaire du nerf trijumeau gauche. Son examen neurologique et général était normal. Le diagnostic de névralgie essentielle du nerf trijumeau fut porté. Le traitement associant, Tégrétol®-Neurontin®-Rivotril® ne permit qu'une amélioration incomplète de la symptomatologie. En mai 2001, apparut une diplopie horizontale et une sensation d'instabilité dans un contexte fébrile conduisant à l'hospitalisation. Son examen clinique révélait, outre la névralgie, une hypoesthésie dans le même territoire, une parésie faciale gauche, une parésie du VI<sup>e</sup> nerf crânien gauche et une ataxie à la marche. Le reste de l'examen clinique était sans particularité. L'examen ORL confirmait une baisse de l'acuité auditive gauche et un syndrome vestibulaire périphérique. Les examens biologiques usuels montraient un syndrome inflammatoire (VS = 51 mm à la 1<sup>re</sup> heure, CRP = 109,2 mg/ml) sans autre anomalie. Une hyperprotéïnorachie à 0,65 g/l associée à une réaction cellulaire (23 éléments) faite de petits lymphocytes de morphologie normale était présente dans le liquide céphalo-rachidien (LCR). L'immunophénotypage ne trouvait pas de caractère monoclonal. Les différents prélèvements à visée infectieuse étaient négatifs. L'IRM encéphalique montrait une prise de contraste anormale des V<sup>e</sup>, VI<sup>e</sup>, VII<sup>e</sup> et VIII<sup>e</sup> nerfs crâniens (*fig. 1a et 1b*). Aucune anomalie intraparenchymateuse n'était observée. Le scanner X thoraco-abdominal, la biopsie des glandes salivaires, le myélogramme et la biopsie osseuse étaient normaux. L'évolution fut favorable avec une régression de la diplopie et de la parésie faciale sans modification de la névralgie, après une introduction d'une corticothérapie (1 mg/kg/jour).

En novembre 2001, la diplopie et la parésie faciale gauche réapparaissaient, puis en décembre s'y associait une atteinte des nerfs mixtes homolatéraux responsable d'une dysphonie et d'une dysphagie compliquée d'une pneumopathie de déglutition. En outre, des signes d'atteinte des voies longues existaient sous la forme de fasciculations (bras, avant bras, épaules) et d'un syndrome pyramidal droit. L'IRM révélait l'apparition de lésions intra-axiales de la partie latérale du pont (*fig. 1c*) et a moindre degré du bulbe (*fig. 1d*), et une extension des lésions aux nerfs mixtes gauches et au ganglion de Gasser gauche (*fig. 1e*). L'examen au nasofibroscope était toujours normal. L'évolution fut marquée par l'aggravation de la symptomatologie et l'apparition de troubles de la vigilance responsable du décès du patient après un an d'évolution.

L'autopsie générale mit en évidence une broncho-pneumopathie d'origine infectieuse, sans lésion néoplasique. L'examen macroscopique de l'encéphale montrait plusieurs processus hémorragiques de l'angle pontocérébelleux gauche, de l'hémisphère cérébelleux gauche et de la partie haute de la protubérance, sans anomalie à l'étage supratentorial. La racine du V<sup>e</sup> nerf crânien gauche apparaissait grisâtre et atrophique. Il existait une infiltration méningée et tissulaire de la région du pont, faite d'éléments d'allure lymphoïde avec une nette anisocytose et anisocaryose. La chromatine apparaissait fine et de nombreuses mitoses anormales étaient visibles. L'étude immunohistochimique (anticorps anti-CD45, -CD20, -CD79a et -CD3) montrait une population de type lymphocytaire B, exprimant vivement les antigènes CD45 et CD20 (*fig. 1f*) et faiblement CD79a, mais négative pour l'antigène CD3. Le diagnostic de lymphome non hodgkinien de haut grade de malignité, diffus à grandes cellules B fut porté.

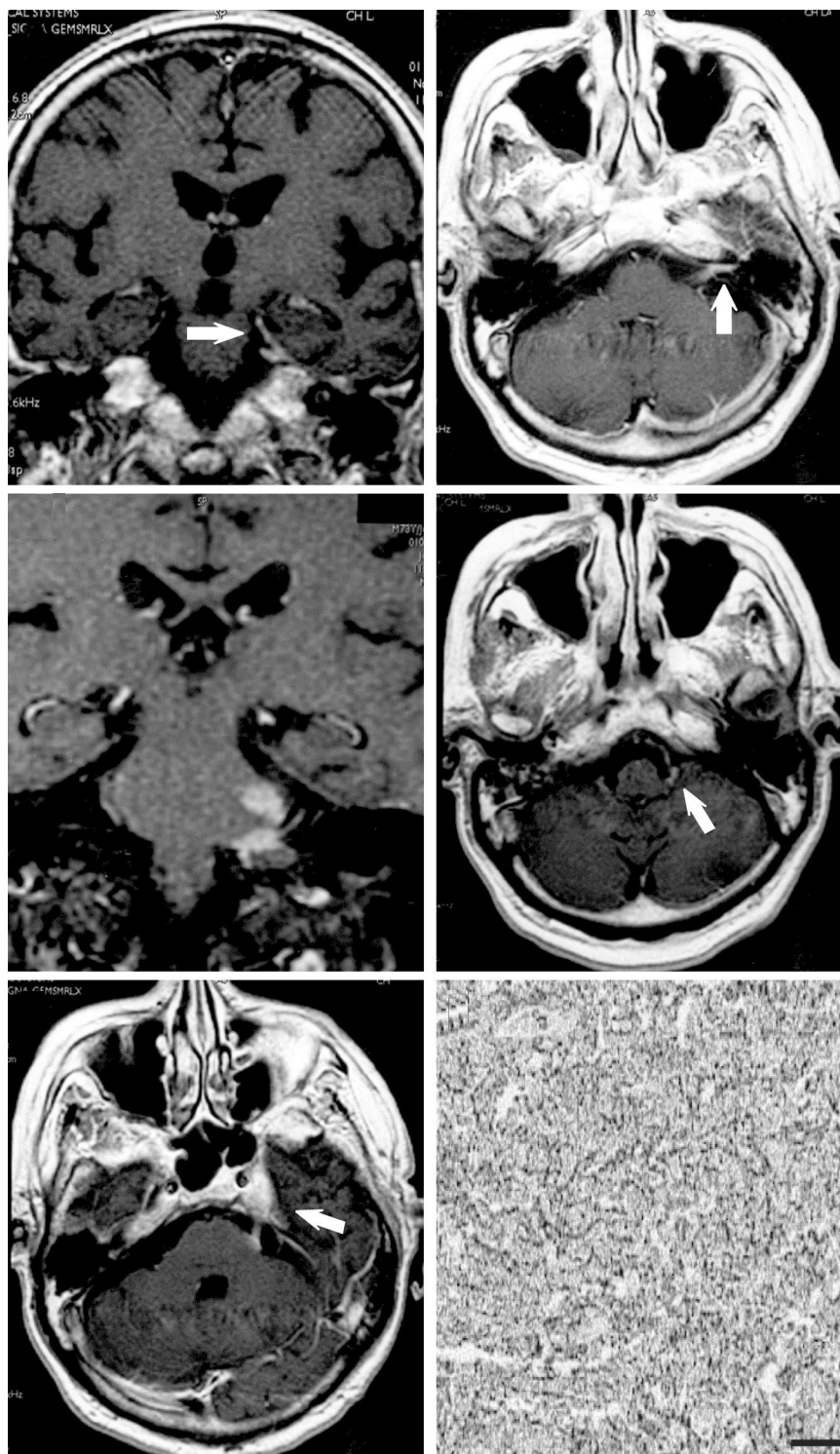
## DISCUSSION

Dans sa description classique, le syndrome de Garcin se caractérise par l'atteinte progressive, unilatérale et complète de l'ensemble des nerfs crâniens. Cependant, tous les syndromes de Garcin rapportés ne s'accompagnent pas d'une atteinte complète. L'atteinte est le plus souvent partielle probablement par la précocité de la réalisation de l'imagerie cérébrale et notamment de la sensibilité de l'IRM. Il reste néanmoins un élément caractéristique qu'est le caractère extensif de l'atteinte. Nous suggérons donc, comme dans l'observation rapportée, que ce syndrome peut être compris comme une « marche de Garcin » (Kaya *et al.*, 1995).

L'origine néoplasique est souvent en cause (Mubaidin *et al.*, 1990). Il s'agit d'une extension par contiguïté d'un carcinome de la sphère ORL, rhinopharyngé particulièrement, ou de métastases osseuses ou méningées de la base du crâne (Rohmer *et al.*, 1979). Les tumeurs hématologiques peuvent être plasmocytaires (Tappin *et al.*, 1996) ou des lymphomes (Nogami *et al.*, 1993). Bien que classique, cette étiologie est rarement rapportée dans la littérature. Nous insistons donc sur la nécessité d'envisager cette hypothèse lorsqu'un examen ORL approfondi n'a pas mis en évidence de tumeur de cette sphère. La recherche de cellules lymphomateuses dans le LCR peut être contributive, même si ce ne fut pas le cas dans cette observation. En effet, la sensibilité de la ponction lombaire est de 40-50 p. 100 dans cette recherche et s'élève à 85-90 p. 100 après plusieurs ponctions (Roma *et al.*, 2002). De plus, le diagnostic de lymphome peut être rendu difficile par la présence d'une réaction lymphocytaire comme dans cette observation. Certaines équipes proposent la réalisation systématique, en parallèle de la ponction lombaire, d'une cytométrie de flux (Roma *et al.*, 2002 ; Urbanits *et al.*, 2002). Cette technique est déjà largement utilisée pour la détection de cellules lymphoïdes ou myéloïdes dans les ganglions lymphatiques, le sang ou la moelle osseuse. Elle a en effet l'avantage d'être plus précise et reproductible que l'immunohistochimie et permet l'étude du réarrangement des chaînes légères d'immunoglobulines par biologie moléculaire (Tsifh, 1993).

Les lymphomes malins cérébraux primitifs se manifestent souvent par des lésions multifocales prenant le contraste à l'imagerie (Basso *et al.*, 2002). L'atteinte leptoméningée isolée n'est rencontrée que dans 7 p. 100 des cas, ce qui rend d'autant plus intéressant cette observation, en particulier au stade initial de la présentation. Conformément aux données de la littérature, il s'agit d'un lymphome B de haut grade de malignité diffus et à grandes cellules (Basso *et al.*, 2002). Le caractère « primitivement cérébral » est argumenté par l'absence d'adénopathies ou d'atteinte extra crânienne retrouvées.

En conclusion, l'hypothèse d'un lymphome cérébral doit être évoquée et activement recherchée devant un syndrome de Garcin, quand une enquête étiologique échoue à mettre en évidence une tumeur de la base du crâne, notamment de la sphère ORL.



a	b
c	d
e	f

Fig. 1. – **a)** IRM pondérée en T1 avec injection de gadolinium montrant une prise de contraste au niveau de la racine du V<sup>e</sup> nerf crânien gauche. **b)** IRM pondérée en T1 avec injection de gadolinium montrant une prise de contraste au niveau du paquet acoustico-facial gauche. **c)** IRM pondérée en T1 avec injection de gadolinium montrant une prise de contraste au niveau du pont. **d)** IRM pondérée en T1 avec injection de gadolinium montrant une prise de contraste au niveau de la fossette latérale du bulbe. **e)** IRM pondérée en T1 avec injection de gadolinium montrant une prise de contraste au niveau du ganglion de Gasser. **f)** Infiltrat cellulaire dense fait de cellules mononucléées, présentant de nombreuses atypies et marquées par l'anticorps anti-CD20 (Barre d'échelle = 25 µm).

*a) T1 weighted MRI with gadolinium injection shows contrast uptake at the root of the left fifth cranial nerve. b) T1 weighted MRI with gadolinium; injection shows contrast uptake in the left acoustic facial bundle. c) T1 weighted MRI with gadolinium injection shows contrast uptake in the pons. d) T1 weighted MRI with gadolinium injection shows contrast uptake in the lateral bulb fossa. e) T1 weighted MRI with gadolinium injection shows contrast uptake in the Gasser ganglion. f) Dense cell infiltration composed of anti-CD20-positive mononucleated cell with several areas of atypia (bar=25µm).*

## RÉFÉRENCES

- BASSO U, BRANDES A. (2002). Diagnostic advances and new trends for the treatment of primary central nervous system lymphoma. *Eur J Cancer*, 38: 1298-1312.
- GARCIN RL. (1927). Le syndrome paralytique unilatéral global des nerfs crâniens. Contribution à l'étude des tumeurs de la base du crâne. Thèse de médecine, Paris.
- KAYA H, NAKAMURA S, MATANO S *et al.* (1995). Acute nonlymphocytic leukemia complicated by Garcin's syndrome. *Acta Haematol*, 94: 142-143.
- MUBAIDIN SI, SUNNA JB, BEIRUTI MA, SHENNAK MM, AYOUB MS. (1990). Renal cell carcinoma presenting as Garcin's syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 53: 613-614.
- NOGAMI R, MAEKAWA Y. (1993). A case of CD8+ T cell lymphoma occurring during treatment for in situ malignant melanoma of the palate. *J Dermatol*, 20: 369-373.
- ROHMER F, COLLARD M, STRUBEL-STREICHER D, CHABRIER G. (1979). Garcin's syndrome and its limits. 11 cases. *Rev Otoneuroophthalmol*, 51: 455-460.
- ROMA AA, GARCIA A, AVAGNINA A, RESCIA C, ELSNER B. (2002). Lymphoid and myeloid neoplasms involving cerebrospinal fluid: comparison of morphologic examination and immunophenotyping by flow cytometry. *Diagn Cytopathol*, 27: 271-275.
- TAPPIN JA, SATCHI G, CORLESS JA, ASHWORTH F. (1996). Multiple myeloma presenting as the Collet-Sicard syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 60: 14.
- TSIFH S. (1993). Color atlas-text of flow cytometric analysis of haematologic neoplasms. Igaku Shoin Medical Publishers.
- URBANITS S, GRIESMACHER A, HOPFINGER G *et al.* (2002). FACS analysis-a new and accurate tool in the diagnosis of lymphoma in the cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta*, 317: 101-107.

## Annexe 5

### **Hématome intracérébral au cours d'une épreuve d'effort : intérêt médico-légal.**

C Leray, **F LETOURNEL**, R Gervais, J Broussaud, C Muntean, F Chedeville, J Letournel.

*Archives des Maladies du Cœur et des Vaisseaux*. 2004. 98 (2): 153-156

#### **Résumé :**

Les causes d'hématomes intracérébraux sont dominées par l'hypertension artérielle. Les données de la littérature montrent qu'il n'y a pas de relation particulière entre leur survenue et la pratique d'un effort. Nous rapportons l'observation d'une patiente de 64 ans, hypertendue, hospitalisée pour une dyspnée d'effort sans douleur thoracique. L'ensemble du bilan réalisé ne montrait aucune anomalie significative. Une épreuve d'effort fut donc réalisée en accord avec les recommandations de la Société Française de Cardiologie. A l'acmé de l'effort apparaissait brutalement une hémiplégie gauche. La tomodensitométrie cérébrale permettait de la rattacher à la présence d'un hématome capsulothalamique droit. L'intérêt de cette observation ne repose pas sur sa description mais sur son versant médico-légal. En effet une plainte fut déposée par la famille incriminant l'épreuve d'effort et donc le médecin prescripteur comme responsable de la survenue de cet hématome. L'étude des données de la littérature montrait qu'aucun cas index n'avait été rapporté jusqu'à présent. Enfin le jugement du tribunal n'impliquait aucune faute quant à l'indication ou à la réalisation de l'épreuve d'effort, ni concernant l'information des risques potentiels de cet examen.

# Hématome intracérébral au cours d'une épreuve d'effort

## Intérêt médico-légal

Ce travail relate les péripéties médicales et juridiques déclenchées par la survenue d'une hémiplegie au cours d'une épreuve d'effort.

La construction des rapports d'expertises a permis de mettre en évidence la vacuité de la littérature médicale sur les variations du débit, de la pression et des résistances intracérébrales au cours d'un effort dynamique.

En outre, ce travail montre l'importance de l'information des patients.

J.P. Broustet

### Summary

#### Intracerebral haematoma during a stress test

C. Le Ray\*, F. Letournel\*\*\*,  
R. Gervais\*, J. Broussaud\*,  
C. Muntean\*, F. Chedeville\*\*  
et J. Letournel\*

We report the case of a 64 year-old moderately hypertensive patient investigated for dyspnoea on exertion with no chest pain.

After informing the patient, an ergometric test following a gentle protocol was performed, according to the French Society of Cardiology guidelines. At the peak of effort the patient developed a sudden left hemiplegia with a right capsulo-thalamic haematoma on cranial CT. No other case has been described and a literature search showed no relationship between physical effort and cerebral haematoma.

Following an administrative tribunal enquiry, no medical fault was attributed regarding the indication and performing the test; no failure to inform could be established for a risk that was unknown at the time of the test. Arch Mal Cœur 2005 ; 98 : 153-6.

### Résumé

Nous rapportons l'observation d'une patiente de 64 ans, hypertendue modérée, vue en consultation pour dyspnée d'effort sans douleur thoracique.

Après information de la patiente, un test ergométrique selon un protocole doux est réalisé, selon les recommandations de la Société française de cardiologie. À l'acmé de l'effort, la patiente a une hémiplegie gauche brutale avec, au scanner cérébral, un hématome capsulo-thalamique droit. Aucun autre cas similaire n'avait été décrit et la recherche bibliographique ne permet pas de relier l'effort physique à un hématome cérébral.

Après introduction d'une requête en responsabilité devant le tribunal administratif, la cour ne retiendra aucune faute médicale quant à l'indication et au déroulement de l'épreuve ; aucun défaut d'information ne peut être retenu pour un risque inconnu à la date des faits. Arch Mal Cœur 2005 ; 98 : 153-6.

(\*) Service de cardiologie ;

(\*\*) Service de neurologie, CHBA Vannes, 56015 Vannes Cedex.

(\*\*\*) Laboratoire de biologie cellulaire, neuropathologie et neuro-immunologie, CHU, 4, rue Larrey, 49033 Angers Cedex.

(Tirés à part : Dr F. Letournel).

Article reçu en juillet 2002 et accepté en novembre 2004.

Quel que soit le mode d'exercice de la cardiologie, les tests ergométriques sont de pratique courante et bien codifiés sous l'autorité des sociétés savantes [1, 2]. Si les complications cardiovasculaires sont bien connues, les accidents neurologiques sont exceptionnellement décrits.

Nous rapportons ici l'observation d'une hémiplegie secondaire à une hémorragie intracérébrale survenue chez une femme de 64 ans au cours d'une épreuve d'effort à visée diagnostique. Un aspect médico-légal s'ajoute à cette observation.



## OBSERVATION

Le 29 octobre 1996, Madame L. 64 ans, est adressée en consultation de cardiologie par son médecin traitant pour une dyspnée d'effort invalidante d'évolution progressivement croissante depuis 2 mois, sans douleur thoracique. Cette dyspnée est majorée à la marche contre le vent et par temps froid.

Les antécédents sont marqués par une pseudo-polyarthrite rhizomélique traitée par corticoïdes. Ce traitement est stoppé en avril 1996, sans évolution clinique ultérieure. Un surpoids ancien s'est vu accentué par cette thérapeutique, sans anomalie du bilan lipidique et glucidique. Il n'y a pas d'intoxication alcool-tabagique. Il existe une insuffisance veineuse des membres inférieurs ancienne, traitée chirurgicalement et par sclérothérapie.

Au niveau familial, le père est décédé dans un tableau d'accidents vasculaires cérébraux à répétition.

Une tendance hypertensive a été observée depuis plusieurs années, avec des chiffres systoliques maximaux à 160 mmHg. Aucun traitement spécifique n'a été entrepris, la patiente étant considérée comme neurotonique. Elle a fait, il y a 10 ans, un court séjour en milieu psychiatrique pour syndrome dépressif. Son traitement comporte un veinotonique, un antihistaminique et un traitement hormonal substitutif par dydrogestérone.

Lors de la consultation, l'examen clinique se révèle normal, la pression artérielle est mesurée à 130/89 mmHg, l'ECG et l'échocardiographie ne montrent aucune anomalie. Il est proposé à la patiente un test ergométrique diagnostique afin

d'éliminer une pathologie ischémique silencieuse compte tenu de l'âge, du terrain et des caractéristiques de la dyspnée. Une lettre sera dictée devant madame L. pour son médecin traitant.

Elle se présente 1 mois et demi plus tard pour réaliser son épreuve, après avoir pris elle-même son rendez-vous. Entre temps, la symptomatologie est restée similaire ; son examen clinique retrouve une pression artérielle modérément élevée à 170/110 mmHg dans un contexte d'anxiété à l'idée de pratiquer le test d'effort. Son ECG est strictement normal.

La technique de l'examen lui est clairement expliquée ; il est décidé de le pratiquer selon un protocole doux, démarrage 30 W puis augmentation par paliers de 10 W toutes les minutes. Durant l'effort, la dyspnée se reproduit sans douleur thoracique,

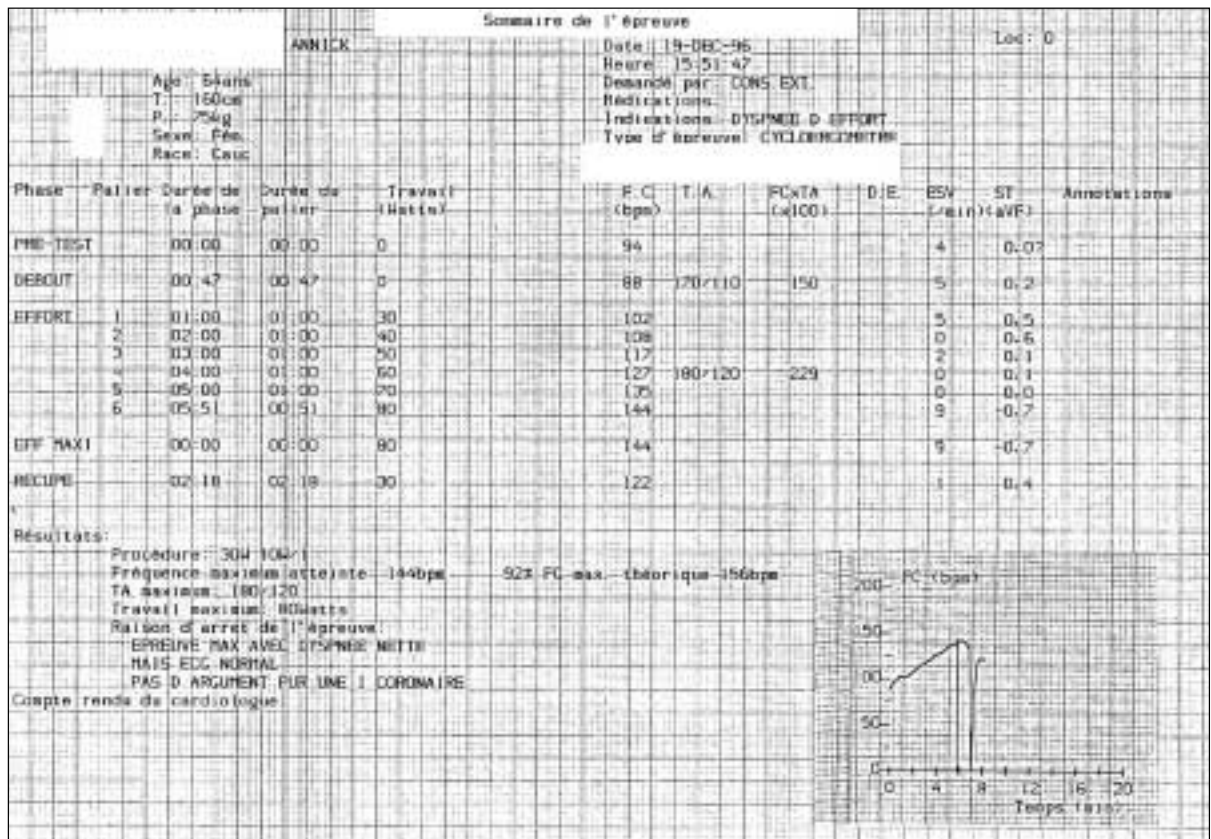
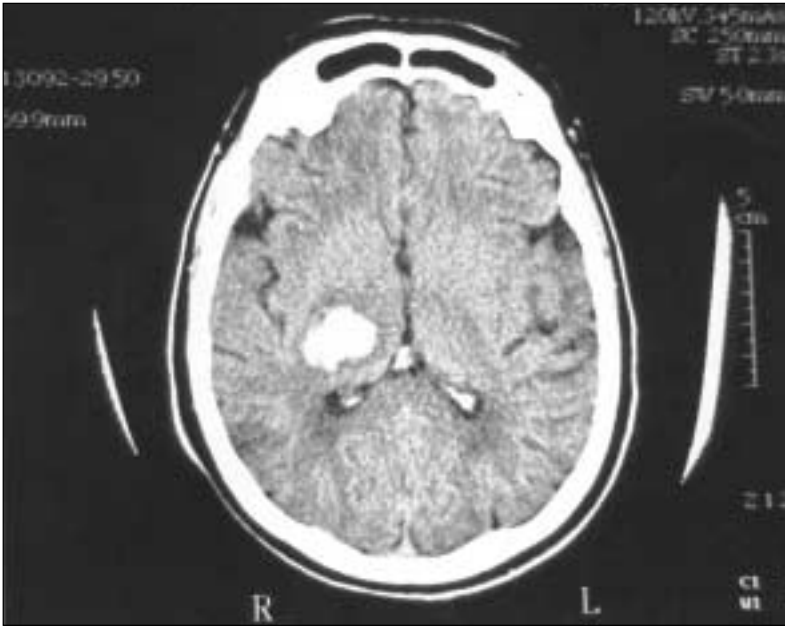


Fig. 1 - Résumé de l'épreuve d'effort.

Fig. 1 - Summary of the stress test.



**Fig. 2 - Examen tomodensitométrique réalisé 3 heures environ après l'apparition des signes cliniques : important hématome intraparenchymateux dans la zone capsulo-thalamique droite.**  
 FIG. 2 – CT scan performed approximately 3 hours after the appearance of clinical signs: large intraparenchymal haematoma in the right capsulo-thalamic area.

la fréquence maximale est atteinte à la 6<sup>e</sup> minute pour un palier de 60 W. Le tracé ECG est normal, l'adaptation tensionnelle est normale avec une élévation maximale à 180/110 mmHg pour une fréquence cardiaque à 127 batt/min (fig. 1).

Dans la minute précédant le maximum de l'effort, des paresthésies du membre supérieur gauche sont notées, gagnant ensuite l'hémicorps. L'épreuve d'effort est arrêtée, mais apparaît une hémiplégié gauche complète. La tomographie cérébrale réalisée à la 5<sup>e</sup> heure révèle un hématome capsulo-thalamique droit (fig. 2).

L'évolution est marquée par la persistance de cette hémiplégié avec une récupération faible, limitée à quelques pas à l'aide d'une canne anglaise, madame L. devenant dépendante d'une tierce personne dans les actes de la vie courante.

Le 3 mars 1999, elle décide d'introduire une requête en responsabilité devant le tribunal administratif et fixe l'ensemble de son préjudice à 986 210 euros.

## DISCUSSION

### Aspect médical

La simple pratique clinique des tests d'effort montre le caractère exceptionnel de cette éventuelle complication. Dans notre service, est réalisée depuis plus de 20 ans une moyenne annuelle de 1 500 tests sans que nous ayons eu à déplorer un événement similaire. Il en va de même dans d'autres centres plus importants que nous avons interrogés. L'étude de la littérature confirme ce point de vue. En effet, nous n'avons retrouvé qu'une observation pouvant se rapprocher de la nôtre [3]. Celle-ci rapporte le cas d'un patient de 51 ans hypertendu, traité par anticoagulant pour un infarctus myocardique dans les 3 mois précédents. Le test d'effort est lui aussi pratiqué selon le protocole doux, mené à la fréquence maximale à la 11<sup>e</sup> minute pour une PA à 200/110 mmHg, sans aucun accident cardiologique ; 20 minutes après l'exercice, le patient fait une hémiplégié gauche avec, à l'IRM, une hémorragie thalamique et

mésencéphalique droite, compliquée d'une inondation ventriculaire avec hydrocéphalie aiguë. Les auteurs soulignent le caractère unique de cette observation sur les 8 000 tests pratiqués dans leur centre de 1981 à 1993.

En se tournant vers la littérature neurologique, il nous semble que notre observation s'inscrit dans ce qu'il est convenu d'appeler un hématome intracérébral spontané [4]. L'hypertension artérielle, les traitements anticoagulants et les malformations vasculaires sont les causes les plus référencées. Une élévation chronique de la pression artérielle favorise la création de microanévrismes de Charcot et Bouchard pouvant se rompre à n'importe quel moment sans relation avec l'effort ou une élévation tensionnelle [5]. L'élévation brutale des chiffres tensionnels lors de circonstances particulières comme l'exposition au froid, une douleur dentaire sévère, une migraine ou dans les suites d'endarterectomie carotidienne ou de chirurgie cardiaque, peut s'accompagner d'une hémorragie cérébrale. En aucun cas l'effort physique n'est décrit comme une cause favorisante.

Un travail récent [6] semble innocenter l'effort physique. Dans cette étude évaluant la protection myocardique par de faibles doses d'aspirine, 21 820 médecins masculins âgés de 40 à 84 ans ont été suivis pendant une durée moyenne de 11,1 années, la moitié prenant de l'aspirine, l'autre du  $\beta$ -carotène. À la fin de l'étude, 533 participants ont été victimes d'un accident vasculaire cérébral. Après ajustements pour les autres facteurs de risque cardiovasculaire, le risque relatif d'attaque est similaire entre les sédentaires et les non-sédentaires (0,8 vs 1), le bénéfice étant plus net pour les hémorragies cérébrales que pour les infarctus cérébraux. La conclusion des auteurs de cette étude est que l'activité physique n'est pas significativement corrélée avec les accidents cérébraux.

Dans notre observation, lors de son test, la patiente a réalisé un effort contrôlé et modéré (60 W), correspondant approximativement à la montée de 2 étages ou à une

marche à bon pas sur terrain plat pendant 200 mètres. En outre, les mesures tensionnelles ne mettent pas en évidence de poussée hypertensive majeure.

Tout concorde dans le sens d'une coïncidence malheureuse et il n'est pas possible d'incriminer l'examen comme responsable de cette hémorragie cérébrale.

### Aspect juridique

Il va de soi qu'il existe dans cette observation un lien chronologique évident entre le test ergométrique et l'hémorragie intracérébrale. Pour autant, le lien de causalité est-il direct et certain ?

Après une longue procédure ne comportant pas moins de quatre synthèses, un premier jugement a été rendu le 6 mai 2002 :

- aucune faute n'a été retenue vis-à-vis d'un examen qui a été fait selon les règles de l'art. C'est dire ici l'importance des recommandations de la Société française de cardiologie sur lesquelles nous nous sommes appuyés pour défendre, tant l'indication que les conditions techniques de l'examen ;
- la requête de la patiente a été rejetée au motif qu'il s'agit d'une complication inconnue de l'épreuve d'effort : « considérant, dit la cour, que le seul cas alors répertorié dans une publication médicale parue en 1995 concerne un patient sous anticoagulant administré dans les suites d'un infarctus et ne pouvant donc tenir lieu de référence » ;
- il ne peut pas, et cela va de soi, nous être reproché de ne pas avoir informé la patiente d'un risque inconnu à la date des faits.

La patiente renoncera à faire appel de cette décision, qui fait donc jurisprudence.

### CONCLUSION

Les tests ergométriques bien conduits comportent des risques minimes qu'il convient sans aucun doute d'expliquer aux patients. Les risques sont négligeables par rapport aux avantages diagnostiques et thérapeutiques dont les patients peuvent bénéficier.

S'il s'agit ici d'une observation malheureuse et dramatique, il est important que le raisonnement judiciaire coïncide avec le raisonnement médical pour ne pas attribuer aux tests ergométriques conduits selon les recommandations éprouvées des complications incertaines.

**MOTS CLÉS :** épreuve d'effort, hématome intracérébral spontané, hypertension artérielle.

### Références

1. **Sellier P, Monpère C, Broustet JP et al.** Recommandations de la Société française de cardiologie concernant la pratique des épreuves d'effort chez l'adulte en cardiologie. *Arch Mal Cœur* 1997 ; 90 : 77-91.
2. **Dargie HJ.** On behalf of the ESC Working group on exercise physiology, physiopathology and electrocardiography Guidelines for cardiac exercise testing. *Eur Heart J* 1993 ; 14 : 969-88.
3. **Omnis E, Montisci R, Corda L et al.** Intracranial haemorrhage during exercise testing. *Eur Heart J* 1995 ; 16 : 282-4.
4. **Samson M.** Hématome intracérébral spontané. Ed Techniques, *Encycl Med Chir (Paris, France) Neurologie* ; 1991 : 17496 A 10.
5. **Gras P, Girard M, Dumas R.** Hémorragies intraparenchymateuses ; Accidents vasculaires cérébraux. In Bogoussavsky J, Boussier MF (eds) 1993 ; Ed. Paris : Darin, 1993 : 477-90.
6. **Min-Lee I, Hennekens HC, Berger K, Buring EJ, Manson EJ.** Exercise and risk of stroke in male physicians. *Stroke* 1999 ; 30 : 1-6.



## Annexe 6

### **Phenotype associated with APP duplication in five families.**

Cabrejo L, Guyant-Marechal L, Laquerriere A, Vercelletto M, De La Fourniere F, Thomas-Anterion C, Verny C, LETOURNEL F, Pasquier F, Vital A, Checler F, Frebourg T, Campion D, Hannequin D.

*Brain*, 2006

### **Résumé:**

Nous rapportons cinq familles présentant un tableau clinique caractérisé par une maladie d'Alzheimer de début précoce et de transmission autosomique dominante et par une angiopathie amyloïde cérébrale en rapport avec une duplication sur le gène de l'*APP* (Protéine Précurseur de l'Amyloïde). Les caractéristiques cliniques, neuropsychologiques, radiologiques et neuropathologiques sont décrites. Le tableau clinique n'était pas en relation avec la taille de la duplication et aucun argument clinique n'était en faveur d'une trisomie 21. Tous les patients étaient déments. Six patients avaient une histoire d'hémorragie intracérébrale et chez 12 patients sur 21 une épilepsie était rapportée. Le début de la démence allait de 42 à 59 ans, celui de l'hémorragie de 53 à 64 ans et l'âge de décès variait de 46 à 75 ans. L'examen neuropathologique de cinq patients confirmait le diagnostic de maladie d'Alzheimer et d'angiopathie cérébrale sévère. L'ensemble des lésions rappelait celles observées dans la trisomie 21 avec une particularité histologique sous forme d'accumulation intraneuronale de peptide A $\beta$ 1-40 dans les neurones de la couche granulaire du gyrus denté et dans les cellules pyramidales de la corne d'Ammon.

# Phenotype associated with *APP* duplication in five families

Lucie Cabrejo,<sup>1,\*</sup> Lucie Guyant-Maréchal,<sup>1,2,3,\*</sup> Annie Laquerrière,<sup>4</sup> Martine Vercelletto,<sup>5</sup> François De La Fournière,<sup>6</sup> Catherine Thomas-Antérion,<sup>7</sup> Christophe Verny,<sup>8</sup> Franck Letournel,<sup>9</sup> Florence Pasquier,<sup>10</sup> Anne Vital,<sup>11</sup> Frédéric Checler,<sup>12</sup> Thierry Frebourg,<sup>2,3</sup> Dominique Campion<sup>2</sup> and Didier Hannequin<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurology, University Hospital, <sup>2</sup>Inserm U614, Faculty of Medicine, IFRMP, <sup>3</sup>Department of Genetics, University Hospital, <sup>4</sup>Department of Neuropathology, University Hospital, Rouen, <sup>5</sup>Department of Neurology, University Hospital, Nantes, <sup>6</sup>Department of Geriatrics, CHG Pau, <sup>7</sup>Department of Neurology, University Hospital, Saint-Etienne, <sup>8</sup>Department of Neurology, <sup>9</sup>Laboratoire de Biologie Cellulaire, University Hospital, Angers, <sup>10</sup>Department of Neurology and EA2691, University Hospital, Lille, <sup>11</sup>Department of Pathology, University Hospital, Bordeaux and <sup>12</sup>Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR6097 CNRS/UNSA, Equipe labellisée Fondation pour la Recherche Médicale, Valbonne, France

Correspondence to: Didier Hannequin, Department of Neurology, 1 rue de Germont, 76031 Rouen, Cedex, France  
E-mail: Didier.hannequin@chu-rouen.fr

\*These authors have contributed equally to this work.

**Different duplications of the *APP* locus have been identified in five families with autosomal dominant early onset Alzheimer's disease (ADEOAD) and A $\beta$ -related cerebral amyloid angiopathy (CAA). This study describes the phenotype of this new entity. Clinical, neuropsychological, imagery and neuropathological data were reviewed. The phenotype was not dependent on the size of the duplication and there was no clinical feature of Down's syndrome. Dementia was observed in all cases; intracerebral haemorrhage (ICH) was reported in 6 (26%) and seizures occurred in 12 (57%) of 21 patients. Age of onset of dementia ranged from 42 to 59 years, ICH from 53 to 64 years and age at death from 46 to 75 years. The neuropathological findings in five cases demonstrated Alzheimer's disease and severe CAA lesions that were reminiscent from those reported in brains of Down's syndrome patients. A striking feature consisted in intraneuronal A $\beta$ x-40 accumulation located in the granular cell layer of the dentate gyrus and in the pyramidal cell layer of the Ammon's horn.**

**Keywords:** amyloid angiopathy; Alzheimer's disease; *APP* duplication; Down's syndrome; intracerebral haemorrhage

**Abbreviations:** A $\beta$  = amyloid  $\beta$  peptides; ADEOAD = autosomal dominant early onset Alzheimer's disease; BG = basal ganglia; CAA = cerebral amyloid angiopathy; HE = haematoxylin–eosin; ICH = intracerebral haemorrhage; WMC = white matter changes

Received July 10, 2006. Revised August 4, 2006. Accepted August 8, 2006

## Introduction

Cerebral amyloid angiopathy (CAA) is a microangiopathy defined by the deposition of amyloid peptides in the media and adventitia of leptomeningeal and cortical arteries and arterioles (Vonsattel *et al.*, 1991). The most common clinical manifestations of CAA are lobar haemorrhagic stroke and progressive dementia (Greenberg, 1998). In Alzheimer's disease and Down's syndrome, CAA is caused by deposition of amyloid  $\beta$  peptides (A $\beta$ ) and associated with pathological hallmarks of Alzheimer's disease (Ellis *et al.*, 1996; Jellinger, 2002; Pfeifer *et al.*, 2002). Autosomal dominant A $\beta$ -related CAA had been mainly associated with rare missense

mutations of the *APP* gene located within the A $\beta$  coding sequence. In these families, some members had dementia while others had vascular cognitive decline and intracerebral haemorrhage (ICH) or infarcts (Levy *et al.*, 1990; Hendriks *et al.*, 1992; Grabowski *et al.*, 2001; Nilsberth *et al.*, 2001; Bugiani, 2004; Rossi *et al.*, 2004; Obici *et al.*, 2005). Alzheimer's disease and CAA without ICH had also been described with some missense mutations of *presenilin-1* (*PSEN1*) (Verkkoniemi *et al.*, 2000; Mann *et al.*, 2001) and *presenilin-2* genes (Nochlin *et al.*, 1998). In the present paper, clinical, neuropsychological, imagery and

neuropathological data were collected to describe the phenotype of the five French families with autosomal dominant early onset Alzheimer's disease (AEOAD) and CAA in which duplications of the *APP* locus have been recently reported (Rovelet-Lecrux *et al.*, 2006). We compare these features with those found in Down's syndrome patients.

## Patients and methods

### Clinical assessment

Clinical and molecular investigations were performed with the informed consent of participating family members according to a protocol approved by the ethics committees of the CCPPRB Pitié-Salpêtrière and Paris-Necker. The patients were recruited between 1956 and 2005 in six departments of neurology. Patients were considered as affected if they had Alzheimer's disease according to DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) criteria (American Psychiatric Association, 1994) or vascular dementia following ICH according to NINDS-AIREN criteria (Roman *et al.*, 1993). Age of onset, bedridden stage and death, neurological signs and vascular risk factors were collected by personal examination, interviews of family members and general practitioners, and medical records. Absence of dysmorphism described in Down's syndrome was evaluated by using a checklist of 25 signs in still alive patients (Jackson *et al.*, 1976).

### Neuropsychological assessment

Mini-Mental State Examination (Folstein *et al.*, 1975) score was available in 10 patients. A similar battery of neuropsychological tests had been used in six patients: Mattis Dementia Rating Scale (Schmidt *et al.*, 1994), oral naming (Deloche and Hannequin, 1997), Grober and Buschke Verbal Learning Test (Grober and Buschke, 1987) or Wechsler Memory Scale (Wechsler, 1970), Frontal Assessment Battery (Dubois *et al.*, 2000), Rey-Osterrieth complex figure copy (Rey, 1970) and 2 min verbal fluency tasks (Cardebat *et al.*, 1990).

### Neuroimaging

CT and MRI scans of 12 affected patients have been reviewed to evaluate ICH, white matter (WMC) and basal ganglia (BG) changes and atrophy. The age-related white matter changes scale (Wahlund *et al.*, 2001) with the same criteria applicable to both CT and MRI scans was used to rate the degree and distribution of WMC and BG changes on a 4-point scale. Five regions (frontal, parieto-occipital, temporal, infra-tentorial areas and BG) were rated in both hemispheres except for patient F037/II.3, because of a right ICH. In case of repeated CT or MRI, only the latest images were considered for rating. Six CT scans were used, with a slice thickness varying from 3.75 to 10 mm. MRI equipment used operated at 1.0 or 1.5 T. Six T<sub>2</sub>-sequences were used with a slice thickness varying from 4 to 9 mm. Additionally, T<sub>2</sub>\*-weighted sequences were performed in patients F037/II.5 and F037/II.7. The extent of cortical atrophy was scored individually by three raters on a 4-point rating scale from 0 (no atrophy) to 3 (severe) at three regions (frontal, temporal, parieto-occipital). For each region, the score was the one chosen by  $\geq 2$  raters/3; otherwise scoring was obtained by consensus reading. Five patients had brain single photon emission computed tomography (SPECT) with

<sup>99m</sup>Tc-ECD (F037/II.5, II.6, II.7; F229/II.4, II.5) and two with <sup>99m</sup>Tc-HMPAO (F019/II.3; F009/II.3), from 1 to 6 years after onset of dementia.

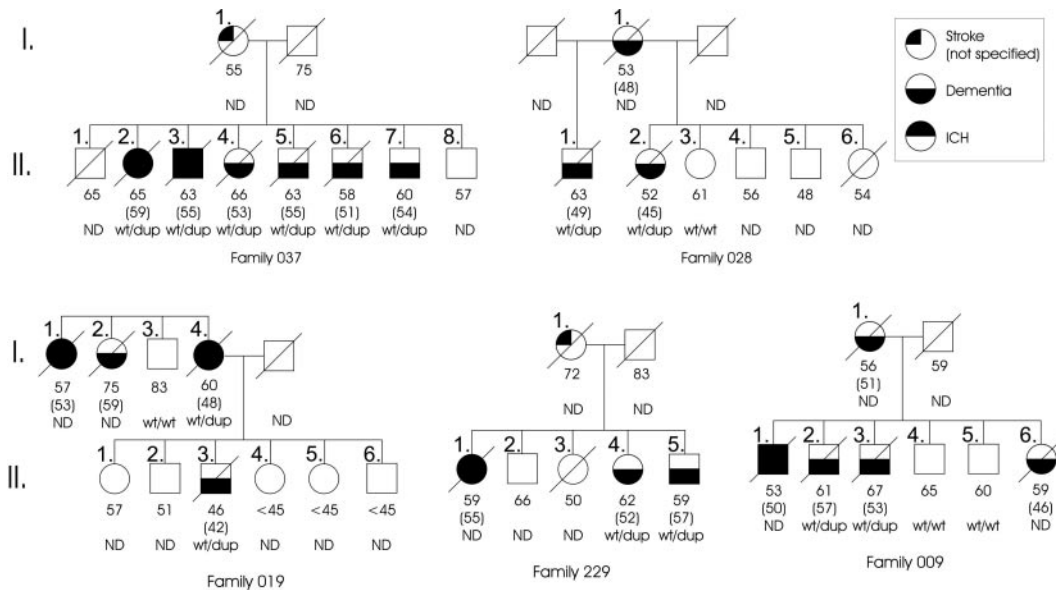
### Neuropathological evaluation

An autopsy restricted to the brain was performed on five patients (F037/II.5, II.6; F028/II.1, II.2; F019/II.4). After extraction of the brain, 1 cm-thick coronal slices obtained from the left hemisphere were stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until use. The right hemisphere, and the whole brainstem and cerebellum were fixed in a 10% formaldehyde solution buffer. Tissue samples were taken from representative areas, including middle frontal gyrus, superior temporal gyrus, temporal pole, inferior parietal gyrus, anterior cingulate gyrus, insular and motor cortex, calcarine fissure, hippocampus, nucleus basalis of Meynert, BG, cerebral peduncles, pons, medulla oblongata and cerebellum (vermis, right hemisphere and dentate nucleus). Seven-micrometre sections were cut from paraffin-embedded blocks and stained with haematoxylin-eosin (HE), periodic acid Schiff (PAS), Orcein, Luxol-Phloxine and the modified Bielschowski silver impregnation method. Routine immunohistochemical studies were carried out using antibodies directed against alpha-synuclein (diluted 1/200) (Zymed, Clinisciences, Montrouge, France), the PHF tau (AT8, 1/20) (Innogenetics, Gent, Belgium), glial fibrillary acidic protein (GFAP, 1/300), PrP (1:50), ubiquitin (1/100) and the macrophagic marker CD68 (1/300) (Dakopatts, Trappes, France). Vascular and intraparenchymatous amyloid deposits were characterized using  $\beta$ -amyloid protein (diluted 1/100) and cystatin C (1/500) (Dakopatts, Trappes, France). Further characterization of  $\beta$ -amyloid deposits was performed using anti-A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 antibodies (FCA 3340, 1/400 and FCA 3542, 1/200) (Barelli *et al.*, 1997).

## Results

### Patients' characteristics

The familial entity described in this article was characterized by a combination of AEOAD and ICH. Pedigrees are indicated in Fig. 1. Twenty-one patients were identified (Table 1). Fourteen patients with DNA analysis (Fig. 1) harboured a chromosome 21q21 duplication including the *APP* gene. Among families, the duplicated segments had different sizes ranging from 0.58 Mb (F028), 0.78 Mb (F037), 1.98 Mb (F009), 3.96 Mb (F019) to 6.37 Mb (F229) and contained 5, 5, 8, 12, 12 annotated genes, respectively (Rovelet-Lecrux *et al.*, 2006). Age of onset of dementia ranged from 42 to 59 years, ICH from 53 to 64 years and age at death from 46 to 75 years. Dementia was observed in all cases, and results of the neuropsychological assessment in six demented patients with no associated ICH fulfilled criteria for Alzheimer's disease (Table 2). ICH were reported in six patients (26%). In three cases, imagery has been reviewed (Fig. 2); in two cases (F009/II.1, II.3), ICH was mentioned in the medical reports, and for patient F019/II.1, interview of siblings reported that she had been operated for ICH, but the medical record was not available. Vascular risk factors were present in eight cases but only one patient with ICH had previous hypertension (Table 1). One ICH



**Fig. 1** Pedigrees of the five French families with APP duplications. ND = not done; wt = wild-type; dup = duplication; age at death or current age and age of disease onset (in parentheses) are indicated.

occurred in a patient (F037/II.3) receiving vitamin K antagonist for supraventricular tachycardia (prothrombin time was 45%). Three patients received neuroleptic drugs (F037/II.2; F009/II.1, II.3) before ICH. It could be added that the mothers of two probands (F037/I.1; F229/I.1) died from unspecified stroke at age of 55 and 72, respectively (see Fig. 1).

Seizures were observed in 12 of 21 patients: in four cases, they were associated with or followed ICH, while in the other eight cases seizures occurred from 1 to 9 years after evolution of dementia. Two additional individuals, F229/II.3 and F028/II.6, with unknown genotype could have been possibly affected because they died after status epilepticus at age of 50 and 54, respectively. Nevertheless, interview of their siblings did not find arguments for previous cognitive decline or behavioural impairment and CT scans did not find focal lesion.

One patient (F019/II.3) had surgery at 39 years old for one cavernoma of the cervical spinal cord responsible for left hemiparesis 3 years before the dementia onset. For the others, neurological examinations were normal except for focal neurological deficits caused by the location of the haemorrhages. None of the cases had ataxia or cerebellar signs. None of the 21 patients had mental retardation. Retrospective analysis of medical records and personal examination did not reveal any clinical feature suggestive of Down's syndrome.

## Neuroimaging

The three available CT scans demonstrated that ICH (Fig. 2) was either small and cortical, or large frontoparietal with an extension involving BG. WMC were found in 6 of 12 patients and were predominant in parieto-occipital

regions (Fig. 2). The rating scores of WMC, according to location and side, are presented in Table 1. Among the 115 analysed regions, the three raters agreed unanimously in 76%, and 24% were rated according to the majority. Regarding cortical atrophy, among the 69 analysed regions, the three raters agreed unanimously in 38%, 53% were rated according to the majority and 9% by consensus reading. Eleven affected patients among 12 had symmetric cortical atrophy with parietal location predominance.  $T_2^*$ -weighted sequences performed in two patients did not reveal microbleeds. There were neither cerebral calcifications nor leptomeningeal gadolinium enhancement. SPECT hypoperfusion was diffuse in four patients (F037/II.5, II.7, F019/II.3, F229/II.4), parieto-temporal in F037/II.6, temporal in F229/II.5 and parietal in F009/II.3.

## Neuropathological findings

### Macroscopic examination

Detailed macroscopic data were available in three patients (F019/I.4, F037/II.5, II.6). Brain weight varied from 1200 to 1235 g. External examination revealed a diffuse atrophy, more pronounced in the temporoparietal area. The leptomeninges appeared thick and creamy, particularly around the vessels. The substantia nigra and the locus coeruleus were depigmented. On coronal sections, the cerebral and cerebellar white matter were irregularly discoloured. Caudate nuclei were not atrophic, conversely to temporal, parietal and hippocampal gyri. Cerebral ventricular dilatation was also noted. In patient F019/I.4, ventricular dilatation was severe, and lacunae as well as old and recent haemorrhages in the temporal and hippocampal gyri were macroscopically observed.

**Table 1** Clinical and radiological characteristics and APOE status of 21 patients

Family	Dementia AOO (years)	ICH delay	MMSE/30 (delay)	Seizures delay	Bedridden delay	Death delay	APOE	Risk factors	WMC and BG R/L (delay)	Atrophy R/L
037	II.2 59	5	ND	5	5	6	3/3	-	0/0 (5)	F: 1/1; T: 1/1; PO: 2/2
	II.3 55	0	ND	0	0	8	3/3	Vit K antagonist	F: ND/1; IT: ND/1; PO: ND/3 (7)	F: ND/2; T: ND/2; PO: ND/2
	II.4 53	-	8 (3) 0 (4)	9	9	13	3/3	HTA, current smoker	0/0 (3)	T: 1/1; PO: 2/2
	II.5 55	-	9 (4) 6 (6)	-	6	8*	3/3	Alcohol	0/0 (6)†	T: 1/1; PO: 1/1
	II.6 51	-	12 (4) 5 (5) 2 (6)	-	6	7*	3/3	Alcohol, current smoker	F: 1/1; PO: 3/3 (7)†	F: 1/1; T: 1/1; PO: 2/2
	II.7 54	-	15 (5)	4	-	Alive	3/3	HTA Alcohol	0/0 (4)†	PO: 1/1
	028									
I.1 48	-	ND	3	ND	5	ND	ND	ND	ND	
II.1 49	-	5 (12)	7	8	14*	3/4	-	ND	ND	
II.2 45	-	ND	7	6	7*	3/3	Diabetes, dyslipidaemia	F: 2/2; PO: 3/3 (4)†	F: 0/1; T: 2/2; PO: 2/2	
019										
	I.1 53	0	ND	ND	0	4	ND	ND	ND	ND
	I.2 59	-	ND	-	12	16	ND	-	ND	ND
	I.4 48	-	ND	6	10	12*	3/3	-	0/0 (6)	PO: 1/1
	II.3 42	-	18 (1)	1	3	4	3/3	-	PO: 1/2; IT: 1/0; BG: 1/1 (1)†	F: 1/1; T: 1/1; PO: 2/2
229										
	II.1 55	4	ND	4	4	4	ND	HTA	0/0 (5)	0/0
	II.4 52	-	16 (3)	-	10	Alive	3/3	HTA	PO: 1/0 (5)†	F: 1/1; PO: 3/3
	II.5 57	-	22 (2)	-	-	Alive	3/3	-	F: 2/2; PO: 2/2; IT: 1/0 (3)†	F: 1/1; PO: 3/3
	009									
I.1 51	-	ND	-	ND	5	ND	ND	ND	ND	
II.1 50	3	ND	-	3	3	ND	ND	ND	ND	
II.2 57	-	7 (2)	3	ND	4	3/4	-	ND	ND	
II.3 53	7	0 (4)	7	7	14	3/4	Dyslipidaemia	ND	ND	
II.6 46	-	ND	-	ND	13	ND	ND	ND	ND	

AOO = age of onset; delay = post-onset time (years); a '0' delay means that the sign was initial; ICH = intracerebral haemorrhage; MMSE = Mini-Mental State Examination score;

WMC = white matter changes; BG = basal ganglia; R = right; L = left; ND = not done; - = absent; F = frontal; T = temporal; PO = parieto-occipital; IT = infra-tentorial;

HTA = arterial hypertension.

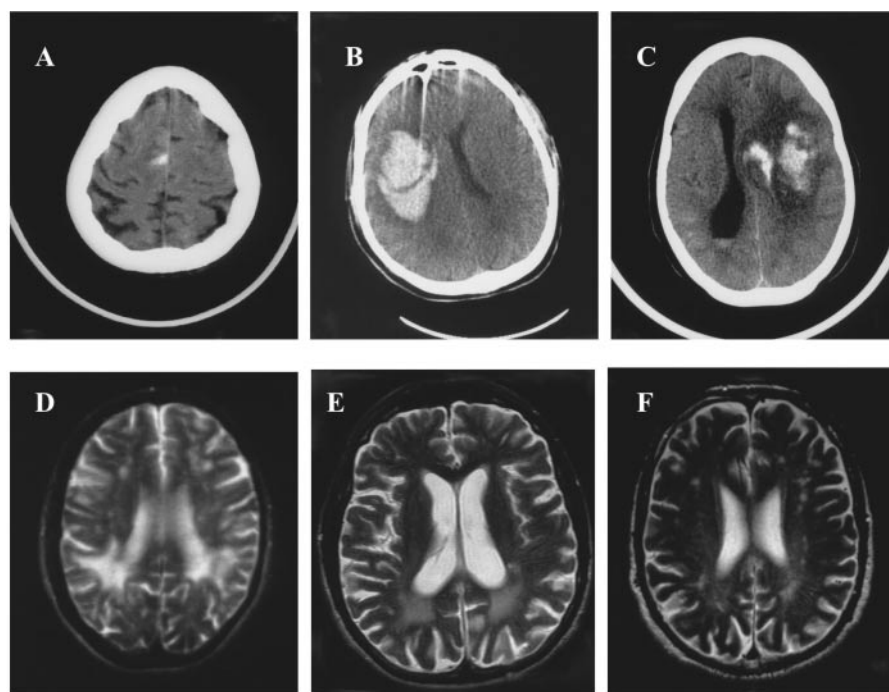
\*Pathological examination.

†MRI evaluation.

**Table 2** Neuropsychological results of six patients with no stroke

Family/no. of affected	F037/II.4	F037/II.5	F037/II.7	F019/II.3	F229/II.4	F229/II.5
Disease duration (years)	3	4	6	1	7	1
Age at evaluation (years)	56	59	60	43	53	58
MMSE/30	8	9	15	18	18	22
MDRS/144	32	89	99	87	ND	117
Attention/37	23	32	29	34		37
Initiation/37	5	16	17	20		30
Construction/6	1	5	5	6		6
Concept/39	3	25	22	21		33
Memory/25	0	11	8	6		11
GBLVT	ND			ND		
IR/16		3	1		10	12
TR3/16		1	0		7	9
DTR/16		0	0		4	ND
WMS-MQ	ND	ND	ND	55	ND	ND
DO80	ND	74	71	79	77	79
2 mn verbal fluency 'p'	ND	ND				
Animals			5	4	6	9
FAB/18	ND	ND	8	16	10	18
Rey figure copy/36	ND	13	25	ND	7	14
						31

MMSE = Mini-Mental State Examination score; MDRS = Mattis Dementia Rating Scale; ND = not done; GBLVT = Grober and Buschke Verbal Learning Test; IR = immediate recall; TR3 = third total recall; DTR = delayed total recall; WMS-MQ = Wechsler Memory Scale—Memory Quotient; DO80 = oral naming; 2 mn verbal fluency = 2 minutes verbal fluency tasks; FAB = Frontal Assessment Battery.



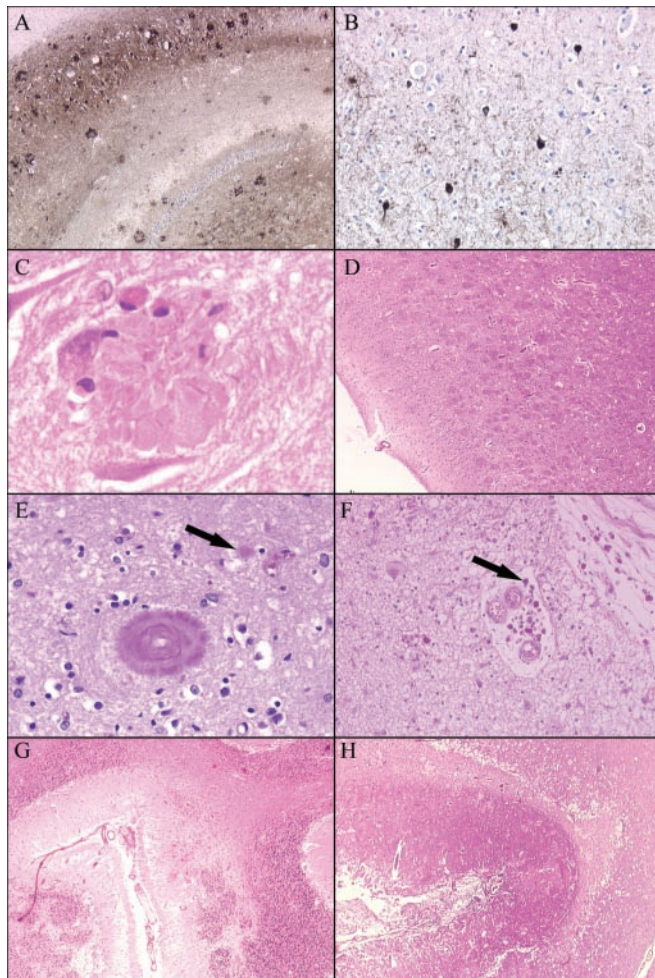
**Fig. 2** CT scans showing cortical haemorrhage close to falx cerebri (patient F037/II.2) (**A**), intracerebral hemispheric haemorrhage (respectively patients F037/II.3 and F229/II.1) (**B** and **C**). T<sub>2</sub>-weighted MRI disclosed symmetrical parieto-occipital WMC (patients F028/II.2, F037/II.6, F229/II.5, respectively) (**D–F**).

### Microscopic findings

In all five cases studied, the pigmented nuclei of the brainstem displayed neuronal loss, interstitial pigment deposition and gliosis, but Lewy bodies were never observed.

Neuronal loss was also noted in the BG. All cortical structures studied were severely affected. The lesions associated neuronal loss, microvacuolization of layers II and III, as well as vanishing cortical lamination with a relative sparing of





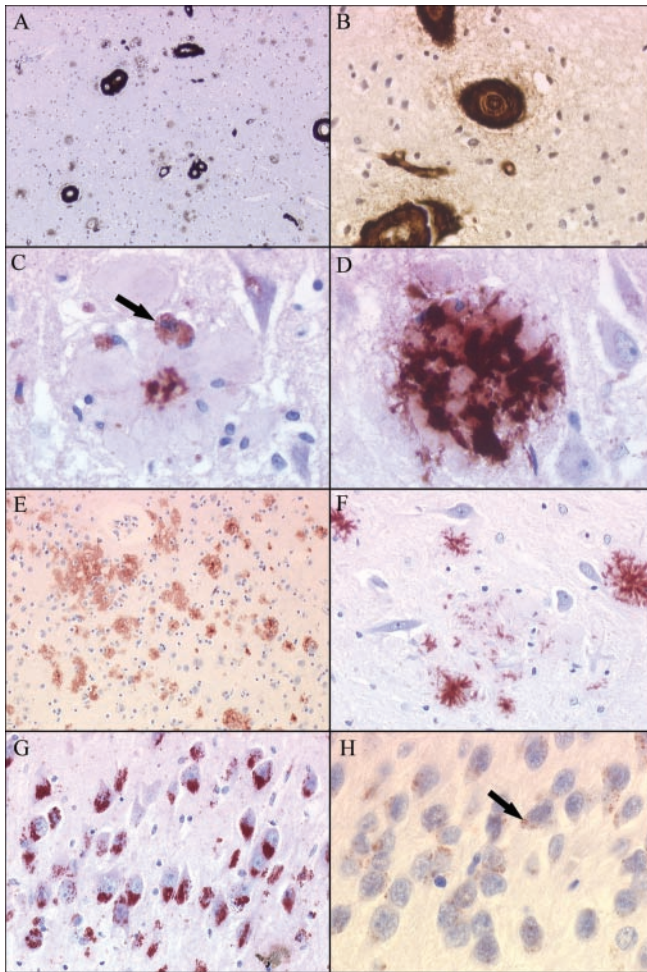
**Fig. 3** Anti-Tau immunohistochemistry in the Ammon's horn showing numerous DNFs, NFTs and dystrophic neuritic network (A) (original magnification:  $\times 25$ ). Anti-Tau immunohistochemistry in the frontal cortex revealing multiple DNFs and NFTs (B) (original magnification:  $\times 25$ ). Rose petal-like cored plaques in the hippocampus (C) (HE, original magnification:  $\times 400$ ). Multiple diffuse amyloid deposits in the frontal cortex (D) (HE, original magnification:  $\times 25$ ). Severe arteriolar amyloidosis in the cortex, associated with early plaques (E) (HE, original magnification:  $\times 400$ ). Severe changes around the amyloid-laden vessels with multiple siderophages (arrowhead), and pallor of the neuropil (F) (HE, original magnification  $\times 250$ ). Patchy superficial old infarcts in the molecular and granular layers of the cerebellar cortex (G) (HE, original magnification:  $\times 25$ ). Recent extensive ischaemic necrosis of the frontal cortical ribbon (H) (HE, original magnification:  $\times 25$ ).

the occipital cortex. The cerebellar cortex displayed a marked loss of Purkinje cells, and to a lesser extent, of internal granule cells. Using tau and ubiquitin immunohistochemistry, numerous fibrillary tangles, senile plaques and neuropil threads were observed in the hippocampal cortex (Fig. 3A), the limbic system and the isocortex (Fig. 3B), the topography and the density of which is consistent with a definite diagnosis of Alzheimer's disease according to CERAD (Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's

disease) criteria (Mirra *et al.*, 1991) with Braak stage V–VI (Braak and Braak, 1991). Alzheimer's disease lesions were less prominent in the thalamus, the putamen and the caudate nucleus. Alpha-synuclein and PrP antibodies were always negative in all structures studied. In the Ammon's horn, diffuse amyloid deposits were present, as well as amyloid plaques, sometimes arranged in rose petal-like formations (Fig. 3C). Close to the plaques, scarce inflammatory cells could be seen, as evidenced by CD68 immunocytochemistry. Numerous amyloid deposits were observed in all isocortical areas (Fig. 3D), as well as in the pyramidal cell layer and in the dentate gyrus granular cell layer of the hippocampal formation. In the cerebellum, variable amounts of amyloid deposits could be observed in the molecular and granular cell layer, in the vicinity of the Purkinje cells.

CAA was diffuse, consisting of an acellular thickening of the leptomeningeal vessels, as well as superficial and deep intraparenchymatous small arteries, capillaries and veinules. The internal elastic lamella was fragmented and the media severely disorganized, as evidenced by Orcein staining. Abundant circumferential deposits invaded the arteriolar walls, extending over the adventitia, with densely packed fibrils radiating from the affected vessels into the surrounding neuropil (Fig. 3E). Around the majority of vessels, pallor of focal areas of demyelination was observed, corresponding to ischaemic changes, and sometimes containing iron-laden macrophages (Fig. 3F). Microaneurysms were present in two patients (F019/I.4 and F037/II.6). In the parietal and occipital lobes, CAA lesions were most often calcified. Numerous microcalcifications were also observed into the surrounding neuropil. PAS stains revealed not only CAA but also small dense deposits corresponding to amyloid preplaques. Moreover, several patchy superficial small infarcts were noted in the cerebellum, resulting in the disruption of the cerebellar cortical lamination by a loose fibrillar network containing reactive astrocytes (Fig. 3G). Similar lesions were observed in other cerebral areas such as the brainstem, the frontal (Fig. 3H) and the entorhinal cortex. In the hemispheric white matter, microinfarcts were always located at a short distance from the affected vessels. Old and recent haemorrhages, as well as haemosiderin deposits were noted in patient F019/I.4.

The amyloid-laden vessels were strongly positive for A $\beta$  antibodies (Fig. 4A) and cystatin C. A $\beta$  immunolabelling was strongly positive on nearly all meningeal vessels, on amyloid deposits, on the cores of plaques and on perivascular deposits, with an antero-posterior gradient of severity. Using FCA 3340, which selectively recognizes A $\beta$ -species ending at the 40th residue of the human A $\beta$  peptide sequence (Barelli *et al.*, 1997), vascular deposits were strongly positive with a reinforcement in the intimal zone, close to the internal elastic lamella (Fig. 4B). Plaques were also densely positive, particularly around and within the core (Fig. 4C), where some amyloid-laden macrophages could be observed. In contrast, diffuse deposits were



**Fig. 4** Anti-beta amyloid protein immunostaining of the intraparenchymatous arteriolar and capillary amyloid angiopathy, associated with numerous amyloid deposits in the cortex **(A)** (original magnification:  $\times 25$ ). Anti-beta amyloid protein immunostaining showing the severe disorganization of the amyloid-laden vessel, with a double outline pattern **(B)** (original magnification:  $\times 250$ ). FCA 3340 antibody decorating the core of rose petal-like plaques, and the  $A\beta x-40$ -laden macrophages **(C)** (arrow) (original magnification  $\times 400$ ). FCA 3542 immunolabelling of the dystrophic neurites in a mature plaque **(D)** (original magnification:  $\times 400$ ). Extensive isocortical diffuse deposits immunostained using FCA 3542 antibody **(E)** (original magnification:  $\times 25$ ). FCA 3542 immunostaining of the spicular pattern of dystrophic neurites in a cored plaque **(F)** (original magnification:  $\times 250$ ). Massive intraneuronal vesicular accumulation of  $A\beta x-40$  peptide using FCA 3340 antibody: the strong immunoreactivity of nearly all pyramidal cells of the CA1-CA2 fields may be noted **(G)** (original magnification:  $\times 250$ ). Vesicular  $A\beta x-40$  immunoreactivity in the granular cells of the dentate gyrus: arrowhead pointing at the small scattered vesicles in the perikaryon indicated by arrow **(H)** (original magnification:  $\times 400$ ).

exceptionally immunolabelled. On the contrary, FCA 3542, which recognizes  $A\beta$  species ending at the 42nd amino acid of the human  $A\beta$  peptide (Barelli *et al.*, 1997), was strongly positive on the dystrophic neuritis of cored plaques (Fig. 4D). It was diffusely positive in intraparenchymatous

diffuse deposits (Fig. 4E), particularly in the microvacuolated layers II and III. Sub-pial deposits were also positive. In the majority of the plaques, only the core was positive. Nevertheless, in some plaques, this antibody was also positive in dystrophic neurites, with the presence of spheroids or radiating spicular formations (Fig. 4F). In the vessels, FCA  $A\beta x-42$  immunoreactivity was observed in the intima and in the adventitia, creating a double outline pattern. But the most striking feature, in all cases studied, consisted in intracellular  $A\beta x-40$  immunoreactivity of numerous neurons, located either in the granular cell layer of the dentate gyrus or in the pyramidal cell layer of the Ammon's horn, and to a lesser extent, in the entorhinal and parahippocampal cortices. The immunostaining had a granular or vesicular pattern, and was concentrated in the perikarya (Fig. 4G and H). Other cortical or sub-cortical structures remained negative. In particular, lipofuscin-laden neurons of associative cortex remained negative in each patient. Furthermore, in none of the cases, intraneuronal  $A\beta x-42$  immunoreactivity could be detected.

## Discussion

We described five French families with ADEOAD and CAA caused by a novel molecular mechanism of *APP* gene duplication. A similar clinical, neuropsychological, radiological and neuropathological phenotype was observed in the five families. This phenotype could be compared with the features associated with the rare mutations in the  $A\beta$  coding sequence of *APP*. The recently described L705V mutation was exclusively associated with CAA and ICH (Obici *et al.*, 2005). The E693Q mutation that causes hereditary cerebral haemorrhage with amyloidosis of the Dutch type (HCHWA-D) is associated with severe CAA and diffuse plaques with absent or limited neurofibrillary pathology (Maat-Schieman *et al.*, 2005). Affected individuals suffer primarily from strokes and those who survive develop a progressive dementia (Natte *et al.*, 1998; van den Boom *et al.*, 2005). Exceptionally, cognitive deterioration may develop in the absence of vascular lesion on brain imaging. Roughly 25% of patients with the Flemish A692G *APP* mutation present ICH and others develop presenile dementia (Roks *et al.*, 2000; Brooks *et al.*, 2004). ICH was also described as recurrent in three Italian families with E693K *APP* mutation, but prevalence was not provided (Miravalle *et al.*, 2000). On the other hand, to our knowledge, the Arctic E693G *APP* mutation has been associated with CAA, but ICH has not been reported (Nilsberth *et al.*, 2001). There is also considerable phenotypic variability for the same mutation: ICH were totally absent in the original Iowa pedigree, but were reported in 50% of affected members of a Spanish family (Grabowski *et al.*, 2001) carrying the same D694N *APP* mutation (Greenberg *et al.*, 2003). The A713T *APP* mutation was associated with definite Alzheimer's disease and multiple infarcts, and in one case, ICH was secondary to cerebral



biopsy (Rossi *et al.*, 2004). In the present study, ICH was found in 6 among 21 patients and was not associated with vascular risk factors (Table 1). It has been proposed that possession of *APOE*  $\epsilon$ 2 allele may be a risk factor for ICH due to CAA (Nicoll *et al.*, 1997). None of our patients carried this risk factor (11/14 had an *APOE*  $\epsilon$ 3/ $\epsilon$ 3 genotype, Table 1).

As regards WMC, frequency was 50%, which may be underscored since MRI were performed in only 7/12 patients (Table 1). This result may explain a slightly inferior frequency compared with the 60 to 100% frequency based on MRI studies in patients carrying *APP* mutations associated with CAA (Roks *et al.*, 2000; Greenberg *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2004; Panegyres *et al.*, 2005; van den Boom *et al.*, 2005). As in our cases (Fig. 2), distribution of WMC in these patients was symmetrical and preferentially located in periventricular and parieto-occipital regions on T<sub>2</sub>-weighted and FLAIR (fluid attenuated inversion recovery) images. A similar distribution has also been exceptionally reported in Alzheimer's disease patients carrying *PSEN1* mutations (Aoki *et al.*, 1997; O'Riordan *et al.*, 2002). Severity of WMC could be different according to the various *APP* mutations but also between carriers of the same *APP* mutation or *APP* duplication as in the present cases. Again, such intrafamilial diversity could suggest the potential role of additional risk factors. Among six patients with an elevated WMC score, only three had vascular risk factors (Table 1).

We checked each patient for additional clinical features that could imply contribution of other genes in the duplicated regions. None had previous mental retardation, and no dysmorphism, cardiological malformation and no haematological disease reminiscent of the Down's syndrome phenotype were observed. A high prevalence of seizures in the five families (12/21 patients and 2 at-risk relatives with unknown genotype) has to be underlined, because it is higher than the none to 33% frequency reported in ADEOAD/CAA cases associated with *APP* mutations (Roks *et al.*, 2000; Grabowski *et al.*, 2001; Brooks *et al.*, 2004). This high prevalence rate has to be compared with the frequency of seizures in adult patients with Down's syndrome, which ranges from 26% (McDermott *et al.*, 2005) to 46% over the age of 50 years (McVicker *et al.*, 1994) and reaches from 50 to 84% in cases with associated dementia (Van Buggenhout *et al.*, 1999; Menendez, 2005). This suggests that either *APP* duplication itself, or duplication of other genes in this region, contributes to the occurrence of seizures. One affected patient (F019/II.3) had a particular association with one unique cervical cavernoma. We are presently considering this association as fortuitous because this cavernoma was unique, and no linkage data have been reported between the *APP* locus and cavernoma.

Our results would suggest a high prevalence of dementia and ICH due to CAA in Down's syndrome patients over 50 years of age. Prevalence of Alzheimer's disease in Down's syndrome patients is age-related, ranging from 11% between

ages 40 and 49 (Visser *et al.*, 1997) to 55% between 50 and 59 (Lai and Williams, 1989), 77% between 60 and 69 and 100% over 70 years old (Visser *et al.*, 1997). Moreover, CAA is detected in Down's syndrome brains, even in young patients in their 30s, but tended to be more abundant in older patients (Vonsattel *et al.*, 1991; Iwatsubo *et al.*, 1995; Lemere *et al.*, 1996). Prevalence of cerebrovascular as the main cause of death was found to be more frequent in the Down's syndrome population than expected in general population according to age and sex (Day *et al.*, 2005). Nevertheless, we did not find large cohort studies of aged Down's syndrome patients reporting either MRI WMC or stroke prevalence, and there have been only occasional reports of ICH (Belza and Urich, 1986; Donahue *et al.*, 1998; McCarron and Nicoll, 1998). This discrepancy between the ICH phenotype of our cases occurring in their 50s and the rare ICH in Down's syndrome patients could be partly explained by shorter life expectancy (Strauss and Shavelle, 1998; Glasson *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002). Alternatively, for some genuine reason, the present cases may have more severe clinical expression of CAA than equally old patients with Down's syndrome.

Exhaustive neuropathological examination established definite Alzheimer's disease in all cases (Braak and Braak, 1991; Mirra *et al.*, 1991). Nevertheless, one of the major features consisted of CAA, whose location, extent and intensity were different from those observed in classical Alzheimer's disease, with an anteroposterior gradient of severity (although CAA lesions remained significant in the frontal areas), as well as a relative sparing of infra-tentorial structures. Vascular lesions were similar in all cases studied, consisting of severe CAA (Vonsattel *et al.*, 1991), and were characterized by a severe disruption of the vascular architecture, with a 'double outline' barrelling and micro-aneurysm formation, associated with multiple perivascular leakage of blood, and with white matter hypoxic-ischaemic chronic changes related to stenoses observed in most vessels. In classical Alzheimer's disease, CAA affects as a rule cortical and leptomeningeal arterioles and capillaries, whereas white matter is usually spared (Revesz *et al.*, 2002), in opposition to our cases where multiple areas of myelin pallor, mainly perivascular and closely related to amyloid-laden small vessels, could be observed. In our cases the CAA was similar to that reported in middle aged patients with Down's syndrome, with deposition of both A $\beta$ x-40 and A $\beta$ x-42 in the cerebral vessel walls, with a predominance of A $\beta$ x-40 (Iwatsubo *et al.*, 1995). As regards parenchymal lesions, some particularities were observed, that is, the presence of huge petal rose-like amyloid plaques in the hippocampal formation, associated with a macrophagic resorption, with no immunohistochemically proven microglial activation differing from Mori *et al.*'s (2002) report, and with no prominent astrocytosis or amyloid-laden astrocytes, in contrast to the findings of Gyure *et al.* (2001). But the most striking feature, in all cases studied, consisted in intraneuronal A $\beta$ x-40 accumulation located in

the granular cell layer of the dentate gyrus, in the pyramidal cell layer of the Ammon's horn, and to a lesser extent, in the entorhinal and parahippocampal cortices. Transient intraneuronal accumulation of A $\beta$ 42 peptide in the pyramidal neurons of the hippocampus and entorhinal cortex of patients with early Alzheimer's disease pathology has been reported, but intraneuronal immunoreactivity was less noticeable with disease progression, when the number of extracellular plaques was high, suggesting an inverse relationship between intraneuronal A $\beta$ 42 content and extracellular A $\beta$ 42 deposition (Gouras *et al.*, 2000). Subcellular intraneuronal localization of A $\beta$  peptide has been studied in Alzheimer's disease brains (Takahashi *et al.*, 2002; Cataldo *et al.*, 2004) as well as in the neurons of APPxPSEN1 transgenic mice, in which both A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 species accumulate intracellularly (Langui *et al.*, 2004). It was found that A $\beta$  immunoreactivity was concentrated (Takahashi *et al.*, 2002; Langui *et al.*, 2004) in multivesicular bodies that are vesicles carrying cargo from neuronal terminals to the cell body for degradation in lysosomes or in early endosomes (Cataldo *et al.*, 2004). On the other hand, studies performed on Down's syndrome brains have consistently demonstrated intraneuronal deposition of A $\beta$  peptides, with a similar vesicular pattern of accumulation in the perikarya (Gyure *et al.*, 2001; Mori *et al.*, 2002; Cataldo *et al.*, 2004). Nevertheless, the nature of amyloid varied among studies, demonstrating either an accumulation of A $\beta$ 42 peptide (Mori *et al.*, 2002) predominance of A $\beta$ 40 (Gyure *et al.*, 2001) or accumulation of both peptides (Cataldo *et al.*, 2004). The study of Mori *et al.* (2002) was limited to the temporal cortex, but the two other studies (Gouras *et al.*, 2000; Gyure *et al.*, 2001; Takahashi *et al.*, 2002; Cataldo *et al.*, 2004) examined more extended cortical regions and demonstrated the presence of intraneuronal A $\beta$  peptide in associative cortices, in particular in the frontal cortex, in contrast to our cases where the intraneuronal A $\beta$ x-40 remained restricted to the limbic structures. The cause of these discrepancies remains unclear, but could be related to inclusion of patients at different stages of the disease process, or to binding of A $\beta$  to chaperone proteins preventing antibodies from detecting some epitopes (Mori *et al.*, 2002). We conclude that, although minor discrepancies exist, lesions in patients with APP gene duplication are reminiscent of those found in Down's syndrome.

In autosomal dominant A $\beta$ -related CAA associated with mutations of the APP gene, peculiar neuropathological features are, in a large part, due to the specific fibrillogenic properties of the mutant peptides (Fraser *et al.*, 1992; De Jonghe *et al.*, 1998; Watson *et al.*, 1999; Nilsberth *et al.*, 2001; Walsh *et al.*, 2001; Maat-Schieman *et al.*, 2005). In Down's syndrome and the present ADEOAD/CAA cases, alteration of gene dosage is the only variable to be considered. How this alteration in gene dosage affects gene expression and protein amount is insufficiently known. However, in brains of aged patients with Down's syndrome or in human foetal cells from pregnancies affected by

trisomy 21, levels of APP mRNA are elevated  $\cong$ 1.5-fold as compared with those of controls (Oyama *et al.*, 1994; Fitzpatrick *et al.*, 2002). An immunohistochemical study has revealed overexpression of APP protein in adult Down's syndrome brain (Griffin *et al.*, 1998). It has also been reported that APP levels are elevated in the hippocampus of segmental trisomy 16 mouse model of Down's syndrome (Ts25Dn) compared with their littermates at 12 months of age (Seo and Isacson, 2005). Although the exact ratio at which A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 are produced in the brain of subjects carrying three doses of the APP gene is not known, both peptides are deposited in vascular and parenchymal lesions. In Down's syndrome, it is well established that the initial species initially deposited as diffuse plaques in the 30s is A $\beta$ 42; A $\beta$ 40 only appears a decade later (Iwatsubo *et al.*, 1995; Lemere *et al.*, 1996). A $\beta$ 42 is essential to seed both parenchymal and vascular deposits (McGowan *et al.*, 2005) but a high A $\beta$ 40/A $\beta$ 42 ratio influences the extent of vascular versus parenchymal deposition (Herzig *et al.*, 2004). Altering the ratio of A $\beta$ 40/A $\beta$ 42 has influence on time to onset of deposition, type of deposit and extent of CAA. It could be speculated that in subjects expressing three doses of the APP gene, both an overproduction of the A $\beta$  peptide and a possible shift toward a high A $\beta$ 40/A $\beta$ 42 ratio account for the pathological hallmarks of the disease.

## Acknowledgements

We thank Drs P. Ahtoy, T. Edouard, J. Godard, P. Lainé, A. Libert, J. P. Mary, F. Mounier-Vehier and A. Verrier for having provided information on the history of some patients. This work was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (F.C.).

## References

- Aoki M, Abe K, Oda N, Ikeda M, Tsuda T, Kanai M, et al. A presenilin-1 mutation in a Japanese family with Alzheimer's disease and distinctive abnormalities on cranial MRI. *Neurology* 1997; 48: 1118–20.
- American Psychiatric Association. AP. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition (DSM-IV). Washington, DC: APA; 1994.
- Barelli H, Lebeau A, Vizzavona J, Delaere P, Chevallier N, Drouot C, et al. Characterization of new polyclonal antibodies specific for 40 and 42 amino acid-long amyloid beta peptides: their use to examine the cell biology of presenilins and the immunohistochemistry of sporadic Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy cases. *Mol Med* 1997; 3: 695–707.
- Belza MG, Ulrich H. Cerebral amyloid angiopathy in Down's syndrome. *Clin Neuropathol* 1986; 5: 257–60.
- Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl)* 1991; 82: 239–59.
- Brooks WS, Kwok JB, Halliday GM, Godbolt AK, Rossor MN, Creasey H, et al. Hemorrhage is uncommon in new Alzheimer family with Flemish amyloid precursor protein mutation. *Neurology* 2004; 63: 1613–7.
- Bugiani OA. Beta-related cerebral amyloid angiopathy. *Neurol Sci* 2004; 25 (Suppl 1): S1–S2.
- Cardebat D, Doyon B, Puel M, Goulet P, Joanne Y. [Formal and semantic lexical evocation in normal subjects. Performance and dynamics of production as a function of sex, age and educational level]. *Acta Neurol Belg* 1990; 90: 207–17.

- Cataldo AM, Petanceska S, Terio NB, Peterhoff CM, Durham R, Mercken M, et al. Abeta localization in abnormal endosomes: association with earliest Abeta elevations in AD and Down syndrome. *Neurobiol Aging* 2004; 25: 1263–72.
- Day SM, Strauss DJ, Shavelle RM, Reynolds RJ. Mortality and causes of death in persons with Down syndrome in California. *Dev Med Child Neurol* 2005; 47: 171–6.
- De Jonghe C, Zehr C, Yager D, Prada CM, Younkin S, Hendriks L, et al. Flemish and Dutch mutations in amyloid beta precursor protein have different effects on amyloid beta secretion. *Neurobiol Dis* 1998; 5: 281–6.
- Deloche G, Hannequin D. DO80. Paris: Edition du Centre de Psychologie Appliquée; 1997.
- Donahue JE, Khurana JS, Adelman LS. Intracerebral hemorrhage in two patients with Down's syndrome and cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol (Berl)* 1998; 95: 213–6.
- Dubois B, Slachevsky A, Litvan I, Pillon B. The FAB: a frontal assessment battery at bedside. *Neurology* 2000; 55: 1621–6.
- Ellis RJ, Olichney JM, Thal LJ, Mirra SS, Morris JC, Beekly D, et al. Cerebral amyloid angiopathy in the brains of patients with Alzheimer's disease: the CERAD experience, part XV. *Neurology* 1996; 46: 1592–6.
- Fitzpatrick JL, Mize AL, Wade CB, Harris JA, Shapiro RA, Dorsa DM. Estrogen-mediated neuroprotection against beta-amyloid toxicity requires expression of estrogen receptor alpha or beta and activation of the MAPK pathway. *J Neurochem* 2002; 82: 674–82.
- Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. 'Mini-Mental State'. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975; 12: 189–98.
- Fraser PE, Nguyen JT, Inouye H, Surewicz WK, Selkoe DJ, Podlisy MB, et al. Fibril formation by primate, rodent, and Dutch-hemorrhagic analogues of Alzheimer amyloid beta-protein. *Biochemistry* 1992; 31: 10716–23.
- Glasson EJ, Sullivan SG, Hussain R, Petterson BA, Montgomery PD, Bittles AH. The changing survival profile of people with Down's syndrome: implications for genetic counselling. *Clin Genet* 2002; 62: 390–3.
- Gouras GK, Tsai J, Naslund J, Vincent B, Edgar M, Checler F, et al. Intra-neuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am J Pathol* 2000; 156: 15–20.
- Grabowski TJ, Cho HS, Vonsattel JP, Rebeck GW, Greenberg SM. Novel amyloid precursor protein mutation in an Iowa family with dementia and severe cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol* 2001; 49: 697–705.
- Greenberg SM. Cerebral amyloid angiopathy: prospects for clinical diagnosis and treatment. *Neurology* 1998; 51: 690–4.
- Greenberg SM, Shin Y, Grabowski TJ, Cooper GE, Rebeck GW, Iglesias S, et al. Hemorrhagic stroke associated with the Iowa amyloid precursor protein mutation. *Neurology* 2003; 60: 1020–2.
- Griffin WS, Sheng JG, McKenzie JE, Royston MC, Gentleman SM, Brumback RA, et al. Life-long overexpression of S100beta in Down's syndrome: implications for Alzheimer pathogenesis. *Neurobiol Aging* 1998; 19: 401–5.
- Grober E, Buschke H. Genuine memory deficits in dementia. *Dev Neuropsychol* 1987; 13–36.
- Gyure KA, Durham R, Stewart WF, Smialek JE, Troncoso JC. Intra-neuronal abeta-amyloid precedes development of amyloid plaques in Down syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 2001; 125: 489–92.
- Hendriks L, van Duijn CM, Cras P, Cruts M, Van Hul W, van Harskamp F, et al. Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nat Genet* 1992; 1: 218–21.
- Herzig MC, Winkler DT, Burgermeister P, Pfeifer M, Kohler E, Schmidt SD, et al. Abeta is targeted to the vasculature in a mouse model of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis. *Nat Neurosci* 2004; 7: 954–60.
- Iwatsubo T, Mann DM, Odaka A, Suzuki N, Ihara Y. Amyloid beta protein (A beta) deposition: A beta 42(43) precedes A beta 40 in Down syndrome. *Ann Neurol* 1995; 37: 294–9.
- Jackson JF, North ER III, Thomas JG. Clinical diagnosis of Down's syndrome. *Clin Genet* 1976; 9: 483–7.
- Jellinger KA. Alzheimer disease and cerebrovascular pathology: an update. *J Neural Transm* 2002; 109: 813–36.
- Lai F, Williams RS. A prospective study of Alzheimer disease in Down syndrome. *Arch Neurol* 1989; 46: 849–53.
- Langui D, Girardot N, El Hachimi KH, Allinquant B, Blanchard V, Pradier L, et al. Subcellular topography of neuronal Abeta peptide in APPxPS1 transgenic mice. *Am J Pathol* 2004; 165: 1465–77.
- Lemere CA, Blusztajn JK, Yamaguchi H, Wisniewski T, Saido TC, Selkoe DJ. Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation. *Neurobiol Dis* 1996; 3: 16–32.
- Levy E, Carman MD, Fernandez-Madrid IJ, Power MD, Lieberburg I, van Duinen SG, et al. Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science* 1990; 248: 1124–6.
- Maat-Schieman M, Roos R, van Duinen S. Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis-Dutch type. *Neuropathology* 2005; 25: 288–97.
- Mann DM, Pickering-Brown SM, Takeuchi A, Iwatsubo T. Amyloid angiopathy and variability in amyloid beta deposition is determined by mutation position in presenilin-1-linked Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 2001; 158: 2165–75.
- McCarron MO, Nicoll JA. High frequency of apolipoprotein E epsilon 2 allele is specific for patients with cerebral amyloid angiopathy-related haemorrhage. *Neurosci Lett* 1998; 247: 45–8.
- McDermott S, Moran R, Platt T, Wood H, Isaac T, Dasari S. Prevalence of epilepsy in adults with mental retardation and related disabilities in primary care. *Am J Ment Retard* 2005; 110: 48–56.
- McGowan E, Pickford F, Kim J, Onstead L, Eriksen J, Yu C, et al. Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice. *Neuron* 2005; 47: 191–9.
- McVicker RW, Shanks OE, McClelland RJ. Prevalence and associated features of epilepsy in adults with Down's syndrome. *Br J Psychiatry* 1994; 164: 528–32.
- Menendez M. Down syndrome, Alzheimer's disease and seizures. *Brain Dev* 2005; 27: 246–52.
- Miravalle L, Tokuda T, Chiarle R, Giaccone G, Bugiani O, Tagliavini F, et al. Substitutions at codon 22 of Alzheimer's abeta peptide induce diverse conformational changes and apoptotic effects in human cerebral endothelial cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 27110–6.
- Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, et al. The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 1991; 41: 479–86.
- Mori C, Spooner ET, Wisniewski KE, Wisniewski TM, Yamaguchi H, Saido TC, et al. Intra-neuronal Abeta42 accumulation in Down syndrome brain. *Amyloid* 2002; 9: 88–102.
- Natte R, Vinters HV, Maat-Schieman ML, Bornebroek M, Haan J, Roos RA, et al. Microvasculopathy is associated with the number of cerebrovascular lesions in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis, Dutch type. *Stroke* 1998; 29: 1588–94.
- Nicoll JA, Burnett C, Love S, Graham DI, Dewar D, Ironside JW, et al. High frequency of apolipoprotein E epsilon 2 allele in hemorrhage due to cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol* 1997; 41: 716–21.
- Nilsberth C, Westlind-Danielsson A, Eckman CB, Condron MM, Axelman K, Forsell C, et al. The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation. *Nat Neurosci* 2001; 4: 887–93.
- Nochlin D, Bird TD, Nemens EJ, Ball MJ, Sumi SM. Amyloid angiopathy in a Volga German family with Alzheimer's disease and a presenilin-2 mutation (N141I). *Ann Neurol* 1998; 43: 131–5.
- O'Riordan S, McMonagle P, Janssen JC, Fox NC, Farrell M, Collinge J, et al. Presenilin-1 mutation (E280G), spastic paraparesis, and cranial MRI white-matter abnormalities. *Neurology* 2002; 59: 1108–10.
- Obici L, Demarchi A, de Rosa G, Bellotti V, Marciano S, Donadei S, et al. A novel AbetaPP mutation exclusively associated with cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol* 2005; 58: 639–44.
- Oyama F, Cairns NJ, Shimada H, Oyama R, Titani K, Ihara Y. Down's syndrome: up-regulation of beta-amyloid protein precursor and tau mRNAs and their defective coordination. *J Neurochem* 1994; 62: 1062–6.

- Panegyres PK, Kwok JB, Schofield PR, Blumbergs PC. A Western Australian kindred with Dutch cerebral amyloid angiopathy. *J Neurol Sci* 2005; 239: 75–80.
- Pfeifer LA, White LR, Ross GW, Petrovitch H, Launer LJ. Cerebral amyloid angiopathy and cognitive function: the HAAS autopsy study. *Neurology* 2002; 58: 1629–34.
- Revesz T, Holton JL, Lashley T, Plant G, Rostagno A, Ghiso J, et al. Sporadic and familial cerebral amyloid angiopathies. *Brain Pathol* 2002; 12: 343–57.
- Rey A. Test de copie et de reproduction de mémoire de figures géométriques complexes. Paris: Edition du Centre de Psychologie Appliquée; 1970.
- Roks G, Van Harskamp F, De Koning I, Cruts M, De Jonghe C, Kumar-Singh S, et al. Presentation of amyloidosis in carriers of the codon 692 mutation in the amyloid precursor protein gene (APP692). *Brain* 2000; 123: 2130–40.
- Roman GC, Tatemichi TK, Erkinjuntti T, Cummings JL, Masdeu JC, Garcia JH, et al. Vascular dementia: diagnostic criteria for research studies. Report of the NINDS-AIREN International Workshop. *Neurology* 1993; 43: 250–60.
- Rossi G, Giaccone G, Maletta R, Morbin M, Capobianco R, Mangieri M, et al. A family with Alzheimer disease and strokes associated with A713T mutation of the APP gene. *Neurology* 2004; 63: 910–2.
- Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerriere A, Vital A, et al. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet* 2006; 38: 24–6.
- Schmidt R, Freidl W, Fazekas F, Reinhart B, Grieshofer P, Koch M, et al. The Mattis Dementia Rating Scale: normative data from 1,001 healthy volunteers. *Neurology* 1994; 44: 964–6.
- Seo H, Isacson O. Abnormal APP, cholinergic and cognitive function in Ts65Dn Down's model mice. *Exp Neurol* 2005; 193: 469–80.
- Strauss D, Shavelle R. Life expectancy of persons with chronic disabilities. *J Insur Med* 1998; 30: 96–108.
- Takahashi RH, Milner TA, Li F, Nam EE, Edgar MA, Yamaguchi H, et al. Intraneuronal Alzheimer abeta42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology. *Am J Pathol* 2002; 161: 1869–79.
- Van Buggenhout GJ, Trommelen JC, Schoenmaker A, De Bal C, Verbeek JJ, Smeets DF, et al. Down syndrome in a population of elderly mentally retarded patients: genetic-diagnostic survey and implications for medical care. *Am J Med Genet* 1999; 85: 376–84.
- van den Boom R, Bornebroek M, Behloul F, van den Berg-Huysmans AA, Haan J, van Buchem MA. Microbleeds in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis-Dutch type. *Neurology* 2005; 64: 1288–9.
- Verkkoniemi A, Somer M, Rinne JO, Myllykangas L, Crook R, Hardy J, et al. Variant Alzheimer's disease with spastic paraparesis: clinical characterization. *Neurology* 2000; 54: 1103–9.
- Visser FE, Aldenkamp AP, van Huffelen AC, Kuilman M, Overweg J, van Wijk J. Prospective study of the prevalence of Alzheimer-type dementia in institutionalized individuals with Down syndrome. *Am J Ment Retard* 1997; 101: 400–12.
- Vonsattel JP, Myers RH, Hedley-Whyte ET, Ropper AH, Bird ED, Richardson EP Jr. Cerebral amyloid angiopathy without and with cerebral hemorrhages: a comparative histological study. *Ann Neurol* 1991; 30: 637–49.
- Wahlund LO, Barkhof F, Fazekas F, Bronge L, Augustin M, Sjøgren M, et al. A new rating scale for age-related white matter changes applicable to MRI and CT. *Stroke* 2001; 32: 1318–22.
- Walsh DM, Hartley DM, Condron MM, Selkoe DJ, Teplow DB. In vitro studies of amyloid beta-protein fibril assembly and toxicity provide clues to the aetiology of Flemish variant (Ala692→Gly) Alzheimer's disease. *Biochem J* 2001; 355: 869–77.
- Watson DJ, Selkoe DJ, Teplow DB. Effects of the amyloid precursor protein Glu693→Gln 'Dutch' mutation on the production and stability of amyloid beta-protein. *Biochem J* 1999; 340: 703–9.
- Wechsler D. Echelle clinique de mémoire. Forme 1. Paris: Edition du Centre de Psychologie Appliquée; 1970.
- Yang Q, Rasmussen SA, Friedman JM. Mortality associated with Down's syndrome in the USA from 1983 to 1997: a population-based study. *Lancet* 2002; 359: 1019–25.

## Annexe 7

### **Neuron growth engineering on a photoinduced surface relief grating: a tool for plastic neuroelectronics**

R. Barille, S. Ahmadi Kandjani, S. Dabos-Seignon, and J.-M. Nunzi, **F. LETOURNEL**, E. Ortyl, S. Kucharski

*Proceedings of SPIE : Biophotonics and New Therapy Frontiers*. 2006. 6191: 405-412

#### **Résumé:**

Des cellules neuronales (PC12) ont été mises en culture sur un polymère dont la surface a été déterminée et contrôlée par un laser. De cette façon une auto-organisation des molécules a pu être observée sous l'action de la lumière. L'adhérence et l'orientation des cellules ont ensuite été analysées. Les PC12 sont capables de s'attacher au substrat de la même manière que sur un substrat organique comme la poly-Lysine. Ces cellules issues d'un phéochromocytome de rat ont la particularité d'acquérir un phénotype dit « neuronal » lorsqu'elles sont soumises à l'action d'un facteur neurotrophique, le NGF (Nerve Growth Factor), en particulier par l'émission de neurites. Dans cette étude nous montrons que ces extensions s'orientent préférentiellement dans le sens des sillons induits par le laser. Ainsi l'utilisation de films fin de polymères, modulables optiquement, peut servir à des applications d'ingénierie cellulaire, en particulier pour la création de réseaux neuronaux.



# Neuron growth engineering on a photoinduced surface relief grating: a tool for plastic neuroelectronics

R. Barille, S. Ahmadi Kandjani, S. Dabos-Seignon, and J.-M. Nunzi,

*Laboratoire POMA*

*UMR 6136 - Université d'Angers*

*4, Boulevard Lavoisier, B.P 2018,*

*49016 Angers, France*

F. Letournel

*Laboratoire de Neurobiologie et Neuropathologie*

*UPRES EA 3143 - CHU*

*4, rue Larrey,*

*49033, Angers Cedex 01*

E. Ortyl, S. Kucharski

*Institute of organic and polymer technology*

*Wroclaw Technical University,*

*50-370, Wroclaw, Poland*

## ABSTRACT

The orientation and attachment of neuronal cells were controlled by submicron-scale topographical patterns. The surface structure is realized with a laser beam and photo-responsive azobenzene polymer thin films. A surface relief grating (SRG) can be produced by self-organization of molecules under the action of light. The cells are attached onto the SRG and preferentially grown along the groove direction. The use of polymer thin films is good candidate for cellular engineering applications.

## 1. INTRODUCTION

We propose with photoinduced surface relief gratings an easier fabrication of submicron-scale topographical structures for cell guidance in studies on neuronal signal processing.

Biological engineering for the development of cellular patterning has attracted much attention due to huge potentialities for medicine or electronics. Basically this domain of interest can be divided in two parts depending on the nature of the adhesion for the cell growth. The cellular adhesion can be chemical promoting proteins and the nature and localization of the mechanosensor are important to understand.

It can also be purely physical. Cells respond to the topography of their surroundings. Then an understanding of conditions that influence cell positioning and alignment are important not only in development biology but also in tissue engineering.

Most of the studies are focused on the role of the molecular basis for the contact guidance. However, the response of cells to topographical features of a substratum surface is far from misunderstanding [1, 2]. The use of photolithography and non-lithographic methods has allowed more detailed and systematic investigation on the effects of various grooves and ridge dimensions but these technologies don't allow facilities in the study. The modification of topographical structures for additional purpose, for example forming a new groove to change the cell orientation is impossible.

On the other hand the combination of microelectronics and of circuits with nerve cells was pure science fiction 20 years ago but now a hybrid circuit of a semiconductor chip and synaptically connected neurons was recently implemented [3]. This new technology needs networks of nerve cells.

Photoinduced surface relief gratings result from light excitation whose wavelength lies in the azo polymers absorption band, cis-trans isomerization takes place, leading to further thermal orientation diffusion which enables a molecular rotation within the polymer matrix. This finally leads to a full reorientation of the azo-dye molecules [4]. An interference pattern of coherent light beams was used for irradiation of the materials and the film surface modification was controlled by the light interference pattern [5]. Two beams are usually necessary but it was also recently demonstrated that a single beam interaction can induce well ordered structures [6-7]. Our original technique uses only one beam with controlled polarization in order to photoinduce a SRG whose wave-vector direction depends on the light polarization.

We present a simple technique to produce submicron-scale surface relief grating. The material used is photo-responsive polymer with azo-chromophores for holographic patterns. These patterns results from self-organization. This one beam experiment allows submicron-scale topological control scheme during cell growing. Further implementations of defined cell network can be reconfigured easily and extended on the polymer surface. The paper is organized with the following directions. First we will show the technique and the way to realize self-organized pattern then we will examine the preferred attachment and orientation of cell on the surface modulation.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1 Photoinduced polymer thin films

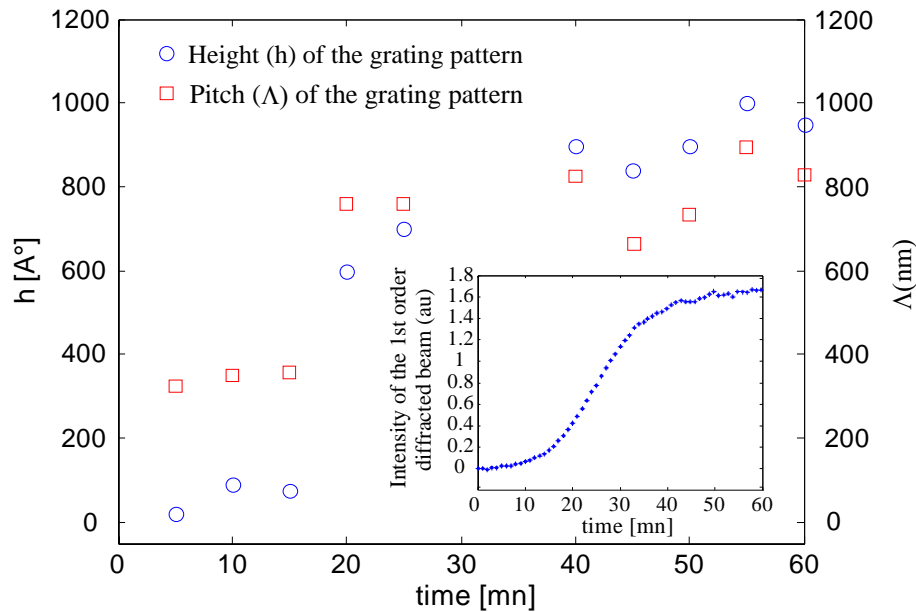


Figure 1: Evolution of the height and pitch of the grating as a function of time at the beginning of the surface relief grating recording for a beam intensity of  $450 \text{ mW/cm}^2$ . The insert shows the second order diffraction intensity measured as a function of time up to the saturation of the recorded grating.

The samples are polymer films made from a highly photoactive azobenzene derivative containing heterocyclic sulfonamide moieties: 3-[[4-[(E)-4-[(2,6-dimethylpyrimidin-4-yl) amino] sulfonyl]phenyl] diazenyl]phenyl]-(methyl)amino]propyl 2-methylacrylate [8]. Thin films on glass substrates were prepared by spin-coating of the polymer from THF solutions with a concentration of 50 mg/ml. Thickness measured with a Dektak-6M Stylus Profiler was around  $1 \mu\text{m}$ . Absorbance at  $\lambda = 438 \text{ nm}$  maximum is 1.9 The  $\lambda = 476.5 \text{ nm}$  laser line of a continuous argon ion laser is

used to excite the azo polymer absorption close to its absorption maximum. Absorbance at working wavelength is 1.6. Incoming light intensity is controlled by the power supply. Polarization direction of the laser beam is varied using a half-wave plate. Sample is set perpendicular to the incident laser beam. The size of the collimated laser beam impinging onto the polymer sample is controlled with an afocal. Sample is irradiated with different polarizations using different laser beam intensities with a defect beam size of 4 mm diameter at  $1/e^2$ .

In order to get information on the surface relief evolution during the recording period, we have printed different gratings on the same sample during different times with a laser intensity of  $450 \text{ mW/cm}^2$ . Both the height and the pitch of the grating were retrieved as a function of time with a contact-mode AFM.

Insert in figure 1 presents the first order self-diffraction intensity as a function of time up to the saturation intensity at which a stable and permanent grating is printed. All results in figure 2, for a  $450 \text{ mW/cm}^2$  intensity, either for the grating's height or pitch and diffraction show a threshold-like evolution with inflexion around 20 mn.

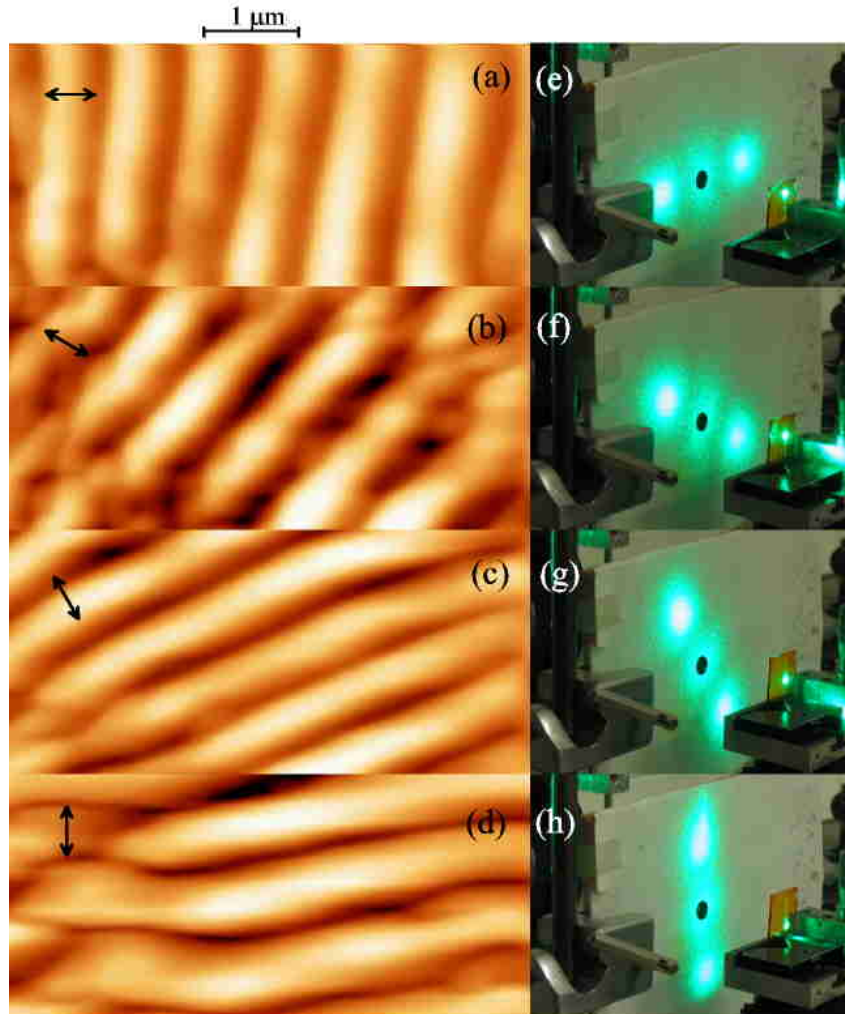


Figure 2 (a-d) shows AFM images of permanent structures induced with four different polarizations of the input laser beam: at  $0^\circ$ ,  $30^\circ$ ,  $60^\circ$  and  $90^\circ$  with respect to the initial polarization. Laser beam intensity was  $450 \text{ mW/cm}^2$ . Growth time for these gratings was one hour. It corresponds to the first order diffracted beam intensity reaching a maximum. AFM measurements retrieve angle values which are in a good agreement with the input polarization direction. Surface gratings have a depth of  $50 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ , whatever the polarization used. Grating pitch is  $\Lambda = 800 \text{ nm} \pm 30 \text{ nm}$ , which is in agreement with the value given by second order diffraction theory in the  $\theta = 32.6^\circ$  direction:  $\Lambda = 2\lambda/2 \sin \theta$ . Figure 2 (e-h) shows camera pictures of the self-diffracted beam for each



polarization angle. Measurements using different beam sizes between 3 and 6 mm confirmed that the time to reach a permanent grating is a function of power density only.

## 2.2 Topographic surface

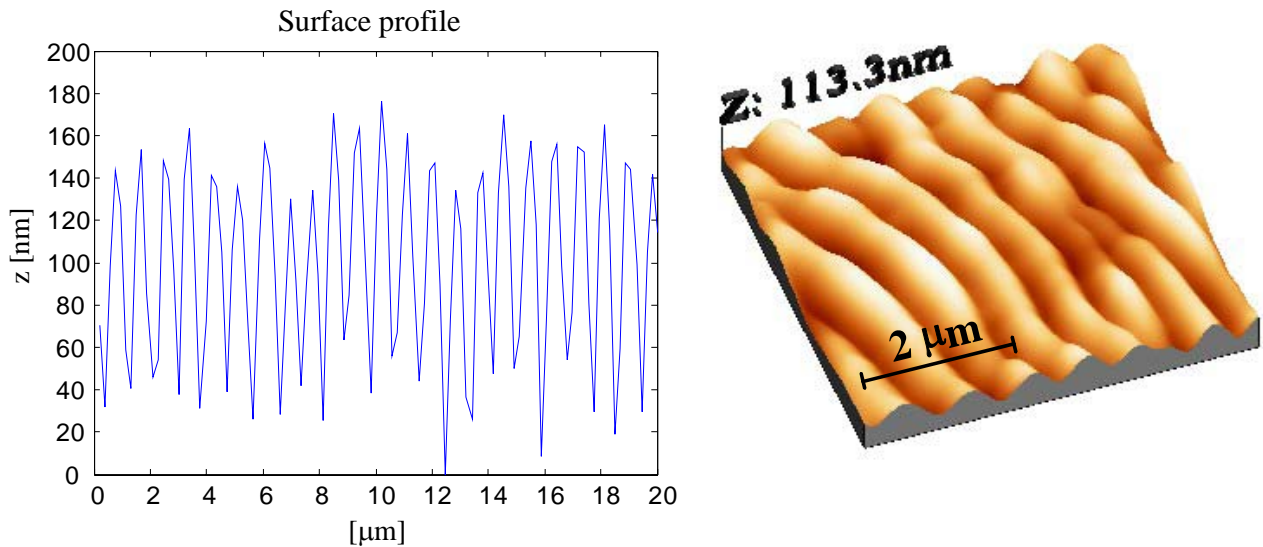


Figure 3 : Surface profile of the photoinduced azopolymer thin films after beam exposure measured by Atomic Force Microscopy. The typical grating depth is about 100 nm and the period is  $\Lambda = 800 \text{ nm} \pm 30 \text{ nm}$ .

## 2.3 Cell culture

Fibroblasts NIH-3T3 and neuronal PC12 cells were grown in DMEM media (Eurobio, France), containing 10 % fetal calf serum (Biomedica, France), 1 % L-Glutamin (Invitrogen, France), 1 % antibiotic (Invitrogen, France) [9]. At 80 % confluence, cells were trypsinized and harvested on coverslips (10 000 cells per ml) that were previously coated with the polymer. PC12 cells were differentiated with Nerve Growth Factor (NGF 7S, 150ng/ml, Promega, France) for 48 hours. Coverslips were collected and cells were washed in PBST (PBS, 0.2 % Triton-X100), and fixed in PFA (4 %). Azopolymer grating samples were mounted using glycerol in PBS (90 %) and assessed using a Leica DMR microscope (with a IM500 software).

# 3. Results and discussion

## 1. Cell adhesion and orientation on submicronic patterns

The NIH3T3 and PC12 were tested for growing on the SRG. The cells were first let during one week on the polymer surface in petri dishes and immersed in liquid PBS.

The neurites of neurons grow parallel to the direction of the grooves and in the perpendicular direction of the pitch with a relatively higher rate in the parallel orientation while outside the SRG the neurites expand in random directions. The contact guidance can be obtained with grooves as shallow as one hundred of nanometers where the effect is less available. The circularity which relates cell's shape has been evaluated to be close to 0.2 giving a linear shape.

Moreover, cells can survive where there is no spatially chemistry comprising protein absorbing and non-absorbing areas that allow control over the absorption of cell-adhesive glycoproteins.

The figure 4 shows cultured cells on the patterned surface. We see that the on the SRG, the cell proliferation is still toward the groove direction.

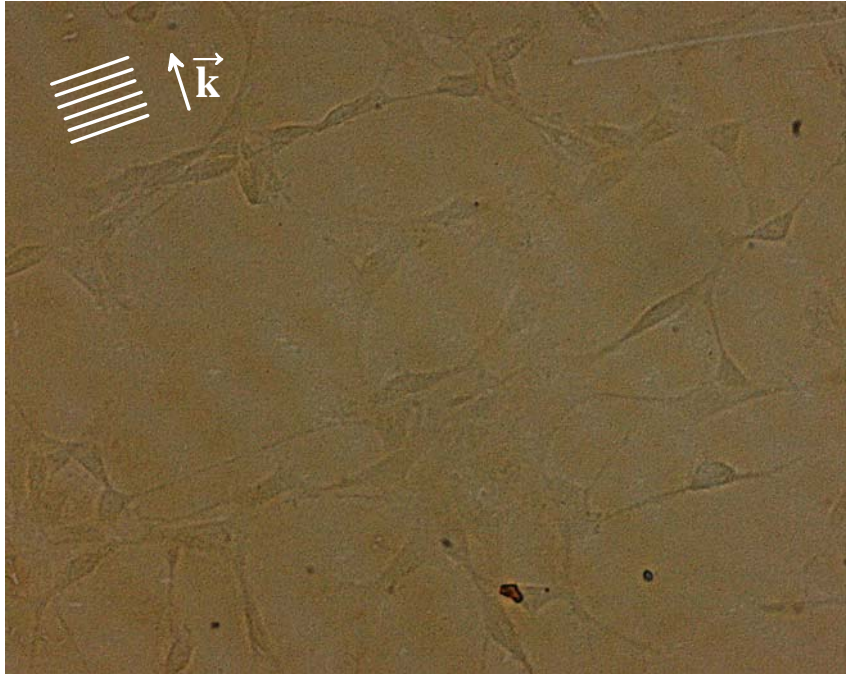


Figure 4 : Controlled cell orientation toward the groove direction after one week of inoculation in PBS liquid. Most of the cells are in a preferred direction normal to the grating vector and elongated along the groove lines.

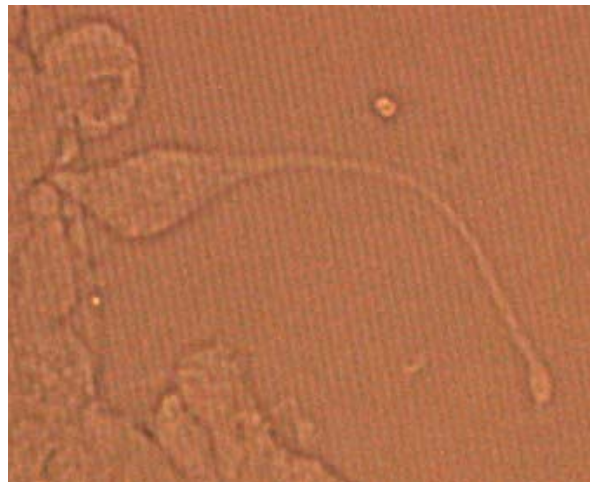


Figure 5 : Detail for the direction of growing. The cell begin to grow randomly and then is attracted by the groove direction.

A detail of the preference for the cell attachment on the SRG is presented on the figure 5. These results show that the cells can be attached on gratings with a depth as shallow as 100 nm where the topological effect are the less available. This confirms precedent studies of contact guidance on grooved quartz [10] where the maximum of orientation response for rat hippocampal neuritis is done with groove depth of 130 nm. Deeper grooves don't allow best results. Moreover

for *Xenopus* spinal neuritis, the direction of neurite growth reaches 100% at the threshold of 130 nm with the same results with larger values of groove deep. Then it seems that 100 nm is the greatest perpendicular threshold response.

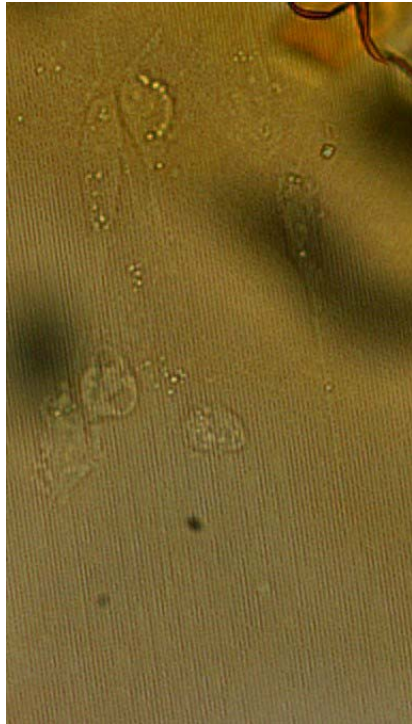


Figure 6 : The calculation for frequency calculation of cells in the parallel or perpendicular direction is done by calculating the edge detection of cells according to grating direction.

We have controlled the frequencies of parallel or perpendicular neurites in a oriented population of neurons. The procedure is done by counting the number of cells in the direction of grooves as in the figure 6. We use an image processing in order to calculate the cell's edge detection then the number of object inside each image is calculated.

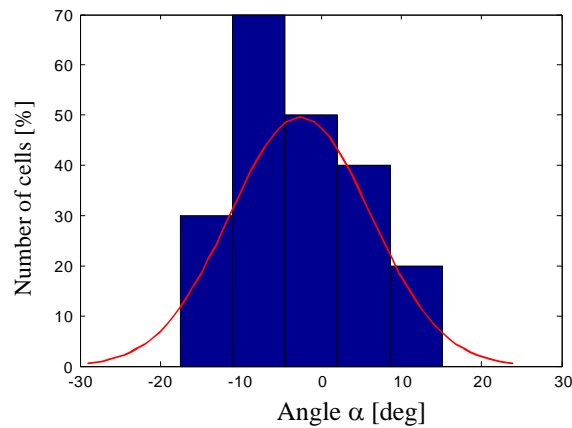


Figure 6 : Statistics of the cellular orientation relative to the surface submicron grooves of the SRG

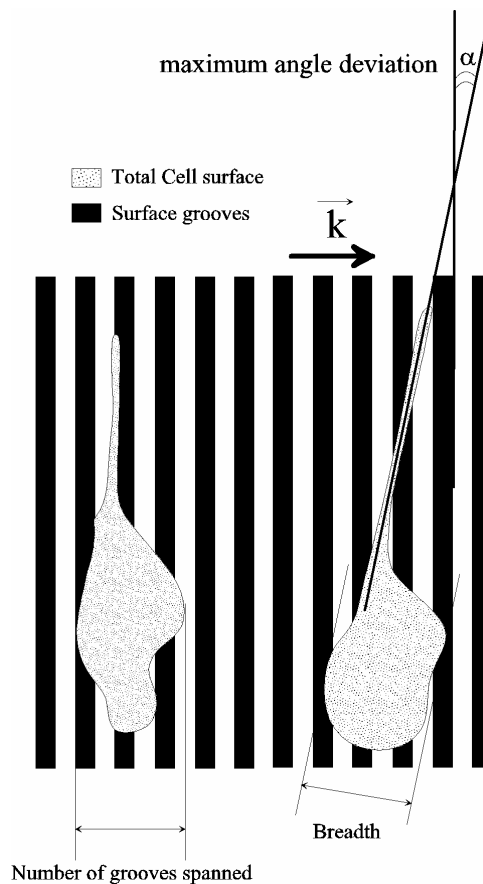


Figure 7 : Image analysis parameter taking to calculate the statistics of cellular orientation.  $\alpha$  represents the angle of cellular orientation relative to the SRG.

The parameter used in the calculation is the angle between the cellular neuritis and the groove direction (figure 7). The results are given on the figure 6. The maximum percentage of cells have an angle of orientation in the groove direction. This statistics for angles is the same for both cells (NIH3T3 and PC12). We didn't calculate the statistics of cell direction with respect to the grooves as a function of time during the cell growth.

#### 4. Conclusion

The self-organized pattern leading to holographic SRG is an efficient method for controlling the direction of cell growth and in particularly for attachment and orientation. The laser induces a mass transport at the surface of a polymer thin film. It is realized by the use of a photo-responsive azobenzene polymer as a culture substrate. The self-organized pattern allows the formation of submicron-scale physical structures. In spite of the shallowness in SRG depth relative to other structures realized on quartz typically about 100 nm the neuronal cells are highly oriented along the groove direction.

Moreover the easy generation of two dimensional patterns with different parameters such as pitch and orientation with different beam characteristics allows the generation of controlled cell network with specific shape and can be in the future used to perform neuronal electric guides.

In the future the next step is to understand the different influence of the pattern characteristics on different types of neuronal cells

This work is particularly useful and promising in plastic neuroelectronics engineering [11].

## References

- [1] R. G. Harrison, 'On the stereotropism of embryonic cells', *Science* 34, 279, (1911).
- [2] Y. A. Rovinsky, I. L. Slavnaya, 'Spreading of fibroblast-like cells on grooved surfaces', *Exp. Cell. Res.*, 84, 199-206, (1973).
- [3] G. Zeck and P. Fromherz, 'Noninvasive neuroelectronic interfacing with synaptically connected snail neurons immobilized on a semiconductor chip', *PNAS*, 98(18), 10457 – 10462, (2001).
- [4] D. Kim, S. Tripathy, L. Lian, J. Kumar, 'Laser-induced holographic surface-relief gratings on non-linear optical polymer films', *Appl. Phys. Lett.*, 66, 1166 – 1169, (1995).
- [5] P. Rochon, E. Batalla and A. Natansohn, 'Optically induced surface gratings on azoaromatic polymer films', *Appl. Phys. Lett.*, 66, 136-138, (1995).
- [6] P. Lefin, C. Fiorini, and J.-M. Nunzi, *Pure Appl. Opt.*, 7, 71, (1998).
- [7] C. Hubert, C. Fiorini-Debuisschert, I. Maurin, J.-M. Nunzi, P. Raimond, 'Spontaneous patterning of hexagonal structures in an azo-polymer using light-controlled mass transport', *Advanced Materials* **14**, 729-732, (2002).
- [8] E. Ortyl, S. Kucharski, 'Refractive Index Modulation in Polymeric Photochromic Films', *Centr. Eur. J. Chem.*, 2, 138 - 158 (2003).
- [9] F. Letournel, A. Bocquet, R. Perrot, A. Dechaume, F. Guinut, J. Eyer and A. Barthelaix, Neurofilament high molecular weight–green fluorescent protein fusion is normally expressed in neurons and transported in axons: A neuronal marker to investigate the biology of neurofilaments *Neuroscience*, Volume 137, Issue 1, 103-111, (2006).
- [10] I. Nagata, A. Kawana, N. Nakatsuji, 'Perpendicular contact guidance of CNS neuroblasts on artificial microstructures', *Development*, 117, 401 – 408, (1993).
- [11] J. C. Chang, G. J. Brewer, B. C. Wheeler, 'Modulation of neural network activity by patterning', *Biosensors & Bioelectronics*, 16, 527 – 533, (2001).

## RESUME :

Le cytosquelette des neurones matures est majoritairement composé de Neurofilaments. Ils sont nécessaires à la mise en place et au maintien de l'axone. Parmi les trois sous unités qui composent le neurofilament, celle de haut poids moléculaire (NFH) apparaît le plus tardivement lors de la différenciation de la synapse et sa fonction précise est mal connue. Une perturbation du métabolisme des Neurofilaments (à l'échelon de la protéine et/ou du gène) est impliquée dans certaines pathologies du système nerveux. Dans les maladies neurodégénératives, en particulier dans la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) ou dans des neuropathies périphériques, l'agrégation de NFs dans le corps cellulaire et dans l'axone, avec perturbation du flux axonal, est un événement fondamental. Nous avons développé un outil cellulaire et moléculaire, utilisant une protéine de fusion NFHGFP, permettant, grâce à un fluorochrome (eGFP), de suivre le métabolisme de NFH. En culture de cellules ou chez des souris transgéniques, l'expression de cette protéine de fusion ne modifie pas leur fonctionnement ni leur comportement en présence notamment de drogues susceptibles d'entraîner leur agrégation. L'utilisation de cet outil, en particulier en association avec l'expression de la protéine NFHLacZ, ouvre la voie pour de nouvelles études en situation physiologique et pathologique : différenciation neuronale, interactions intracellulaires et axono-myéliniques, études de neurotoxicité...

Les travaux présentés portent également sur les mécanismes de régulation intragénique de NFH. Nous avons montré que, comme pour les deux autres sous unités (NFL et NFM), les séquences introniques, en particulier le second intron, permettaient de contrôler dans le temps et dans l'espace l'expression d'un rapporteur.

Dans un objectif de transposition des résultats de la recherche fondamentale et expérimentale à la recherche clinique, nous avons démontré qu'une protéine initialement décrite comme associée aux microtubules (STOP) était également associée aux neurofilaments dans les tissus humains normaux et pathologiques (SLA). Enfin nous avons pu établir que le profil d'expression de la tubuline et des Neurofilaments dans des neuropathies périphériques de cause indéterminée reproduisait celui de la croissance axonale, et qu'une régénération inefficace pouvait également être à l'origine de certaines neuropathies.

**Mots-clés :** cytosquelette, neurofilaments, transgénèse, introns, neuropathologie

## ABSTRACT :

Neurofilaments (NFs) are the major and specific Intermediate Filaments (IF) of neurons. They are required for the maintenance and proper function of axons. Among the three subunits, the high molecular NFH, is the last to appear during neurogenesis and synaptogenesis. However its precise role is unknown. Accumulation of cytoskeleton components is a fundamental event in neurodegenerative diseases, such as Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS), or in peripheral neuropathies, including Neurofilaments. Their aggregation in the cytoplasm or in axon may perturb the axonal flow. We develop a cellular and molecular tool through a fusion protein, NFHGFP, which allows us to follow the metabolism of NFH using the fluorochrome eGFP. The expression of NFHGFP, in cell culture experiments or in transgenic mice, does not modify the metabolism of IF, nor NFHGFP aggregation induced with specific IF toxic drugs or in double transgenic mice (NFHLacZ/NFHGFP). NFHGFP appears to be a new tool that could help to dissect the mechanisms of neuronal differentiation, intracellular and axono-myelinic interactions, neurotoxicity...

We also show that regulatory elements are present in the second intron of *NFH*. These results are in accordance with those described for *NFM* and *NFL*.

After having described, in mice, that a microtubule associated protein, STOP, is also associated with Neurofilaments, we demonstrated that STOP is also present in human nervous tissues and is associated with Neurofilaments. The protein is also aggregated in pathological neuronal structures known to be enriched in NFs, the spheroids. Finally, in axonal peripheral neuropathies of unknown aetiology, we point up that expression of Tubulin and NFs, is the same as in axonal growth and we postulate that chronic failure of regeneration may explain the pathophysiology of these neuropathies.

**Key words:** cytoskeleton, neurofilaments, transgenesis, introns, neuropathology