

## ■ MISE AU POINT

### HIBERNATION, FAMINE ET HYPOTHERMIE – MODÈLES POUR LA MALADIE D'ALZHEIMER

TORSTEN BULLMANN, JENS STIELER, MAX HOLZER,  
WOLFGANG HÄRTIG, THOMAS ARENDT\*

La maladie d'Alzheimer appartient à une catégorie de troubles neurodégénératifs appelés « tauopathies », dans lesquelles on observe une dégénérescence neurofibrillaire, associée à la formation d'enchevêtrements constitués essentiellement de paires hélicoïdales de filaments (PHF) de protéine tau hyperphosphorylée. La protéine tau est une protéine associée au microtubule. Son degré anormalement élevé de phosphorylation dans les cerveaux malades se traduit par une réduction d'affinité pour les microtubules, et une translocation du neurite vers le compartiment somato-dendritique. Dans les conditions normales, la protéine est impliquée dans la stabilisation des microtubules et de ce fait dans l'entretien du transport axonal entre le corps cellulaire et la présynapse. On pense que la perte de la fonction de stabilisation des microtubules, résultat de la phosphorylation et de l'agrégation, est suivie par la régression synaptique et le déclin cognitif, longtemps avant la formation des enchevêtrements et la mort cellulaire. La recherche, qui s'est focalisée principalement sur les facteurs génétiques impliqués dans la pathogenèse des tauopathies, a conduit à la découverte de plusieurs mutations dans les formes familiales, par exemple dans les gènes codant pour la protéine précurseur de l'amyloïde, pour la préséniline ou pour la protéine tau, qui toutes ensemble expliquent moins de 1% de tous les cas. Contrairement aux patients porteurs de la mutation, les souris transgéniques portant ces mutations n'expriment pas le phénotype complet de la maladie d'Alzheimer.<sup>1</sup> De plus, ces modèles ne peuvent pas expliquer l'étiologie des formes « sporadiques » plus fréquentes. Aussi, nous avons l'intention de suivre une autre approche, en recherchant des modèles physiologiques d'hyperphosphorylation de la protéine tau.

#### Modèles d'hyperphosphorylation de la protéine tau dans des conditions physiologiques

Précédemment, nous avons observé une hyperphosphorylation du type de celle des PHF de la protéine tau chez des écureuils terrestres en hibernation<sup>2</sup> et nous avons pu confirmer ces résultats chez les hamsters dorés en hibernation.<sup>3</sup> On peut retrouver une distribution similaire de protéine tau phosphorylée du type de celle des PHF par immunohistochimie, dans les types cellulaires et les régions très sensibles à la neurodégénérescence dans la maladie d'Alzheimer, par exemple le cortex entorhinal, l'hippocampe<sup>2</sup> et les neurones cholinergiques du cerveau antérieur basal.<sup>3</sup> De la même manière que pour l'hibernation, l'hyperphosphorylation de type PHF de la protéine tau a été observée chez des souris privées de nourriture.<sup>4</sup> Ces deux modèles physiologiques *in vivo* sont des états d'hypométabolisme associés à une réduction marquée du taux métabolique global et à une hypothermie profonde, la température corporelle chutant aux alentours de la température ambiante. L'analyse en Western blot montre que la phosphorylation de la protéine tau comprend plusieurs épitopes en rapport avec la maladie d'Alzheimer, qu'elle est significative dans les deux modèles, et plus important, qu'elle est réversible après un réchauffement (figure 1).

\* Institut Paul-Flechsig de  
recherche sur le cerveau,  
Département de  
Neuroanatomie, Université de  
Leipzig, Jahnallee 59, 04109  
Leipzig, Allemagne

1. U. Gärtner, T. Arendt T: Animal models of Alzheimer's disease. **Animal models of neuropsychiatric diseases**. M. Koch. London, Imperial College Press, 2006. pp. 1-74.
2. T. Arendt, J.T. Stielier, A.M. Strijkstra, R. A. Hut, J. Rudiger, E.A. Van der Zee, T. Harkany, M. Holzer, W. Hartig W.: Reversible paired helical filament-like phosphorylation of tau is an adaptive process associated with neuronal plasticity in hibernating animals. **Journal of Neuroscience**, 2003, vol. 23, 6972-6981.
3. W. Härtig, J. Stielier, A.S. Boerema, J. Wolf, U. Schmidt, J. Weißfuß, T. Bullmann, A.M. Strijkstra, T. Arendt: Hibernation Model of Tau Phosphorylation in Hamsters: Selective Vulnerability of Cholinergic Basal Forebrain Neurons - Implications for Alzheimer's Disease. **European Journal of Neuroscience**, 2007, vol. 25, 69-80.
4. M. Yanagisawa, E. Plancl, K. Ishiguro, S.C. Fujita: Starvation induces tau hyperphosphorylation in mouse brain: implications for Alzheimer's disease. **FEBS Letters**, 1999, vol. 461, 329-33.

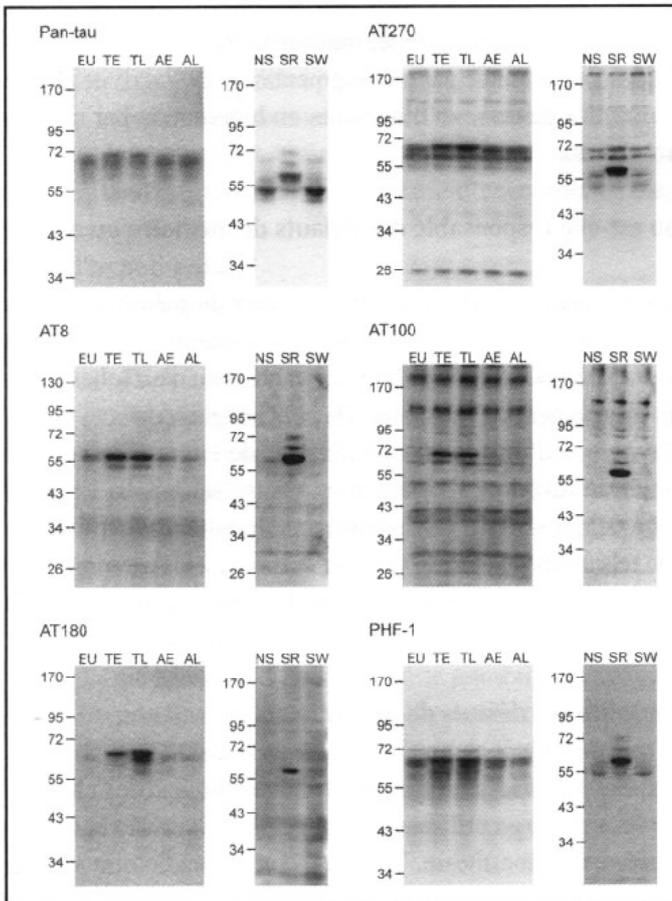


Figure 1. Phosphorylation réversible de la protéine tau chez les hamsters syriens en hibernation et chez les souris privées de nourriture. Des tests Western blots ont été utilisés pour détecter indépendamment la phosphorylation de tau (BR134), sur des épitopes spécifiques de phosphorylation de type PHF de la protéine tau (AT8, AT100, AT180, PHF-1, AT270).

EU – euthermique, TE – engourdissement précoce, TL – engourdissement tardif, AE – réveil précoce, AL – réveil tardif, NS – non affamé (ad libitum) à température ambiante (20°C), SR – affamé 2 jours à température ambiante (20°C), SW – affamé 2 jours à température ambiante (20°C) et réchauffement ultérieur pendant 2½ heures à 37°C.

### Mécanismes de l'hyperphosphorylation de la protéine tau

La phosphorylation de la sérine et de la thréonine de la protéine tau est régulée par plusieurs kinases, par exemple la kinase cycline dépendante 5 (cdk5), la glycogène synthase kinase 3 bêta (GSK3b), la protéine kinase activée par un mitogène (MAPK) et les kinases activées par le stress, ainsi que par les phosphatases, principalement la protéine phosphatase 2A (PP2A). Une série de publications<sup>4-6</sup> a clairement démontré que le manque de nourriture provoque une hypothermie chez les souris placées à température ambiante. Pendant l'hypothermie, l'activité enzymatique des phosphatases et des kinases est réduite, mais les changements sont moins prononcés pour les kinases. De ce fait, l'activité de la kinase supplante celle de la phosphatase et conduit à une hyperphosphorylation de la protéine tau. De la même manière, dans des cultures cellulaires transfectées avec un type sauvage de protéine tau, cette hyperphosphorylation peut être induite par hypothermie, alors que l'hypométabolisme à lui seul n'est pas suffisant (figure 2). Lors de l'hibernation, l'hyperphosphorylation de la protéine tau pourrait

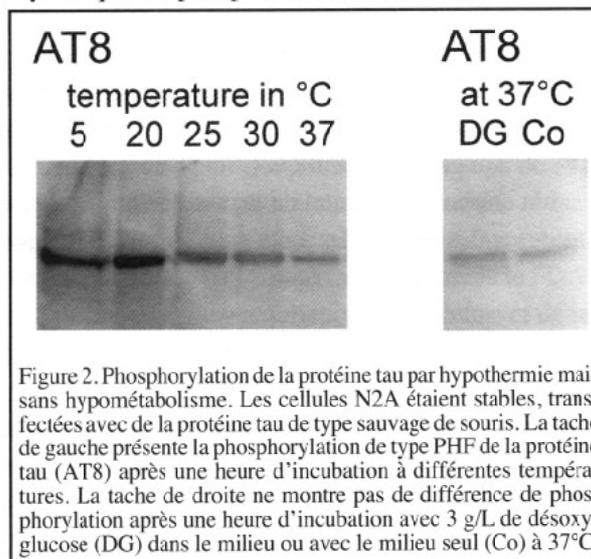


Figure 2. Phosphorylation de la protéine tau par hypothermie mais sans hypométabolisme. Les cellules N2A étaient stables, transfectées avec de la protéine tau de type sauvage de souris. La tache de gauche présente la phosphorylation de type PHF de la protéine tau (AT8) après une heure d'incubation à différentes températures. La tache de droite ne montre pas de différence de phosphorylation après une heure d'incubation avec 3 g/L de désoxyglucose (DG) dans le milieu ou avec le milieu seul (Co) à 37°C.

5. E. Planel, K. Yasutake, S.C. Fujita, K. Ishiguro K.: Inhibition of protein phosphatase 2A overrides tau protein kinase 1/glycogen synthase kinase 3 beta and cyclin-dependent kinase 5 inhibition and results in tau hyperphosphorylation in the hippocampus of starved mouse. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, vol. 276, 34298-306.

6. E. Planel, T. Miyasaka, T. Launey, D.H. Chui, K. Tanemura, S. Sato, O. Murayama, K. Ishiguro, Y. Tatebayashi, A. Takashima: Alterations in glucose metabolism induce hypothermia leading to tau hyperphosphorylation through differential inhibition of kinase and phosphatase activities: implications for Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 2004, vol. 24, 2401-2411.

ne pas être provoquée uniquement par l'hypothermie, mais également par une adaptation des cinétiques enzymatiques, par exemple par une augmentation de l'activité kinase à température basse dans les extraits de cerveau d'animaux en hibernation par rapport à ceux des animaux n'hibernant pas.

### La phosphorylation de la protéine tau est-elle responsable des défauts de mémoire ou est-ce un épiphénomène ?

L'hibernation semble effacer de manière différentielle les traces de mémoire<sup>7-9</sup> mais aussi améliorer l'apprentissage après l'hibernation.<sup>10,11</sup> Malheureusement ces résultats contradictoires ont été obtenus chez des espèces différentes et utilisent des tâches comportementales qui ne sont pas directement comparables. On peut imaginer que ces divers effets sont associés à un schéma spécifique de phosphorylation de la protéine tau lors des états d'engourdissement et de réveil de l'hibernation. On ne sait pas si l'hyperphosphorylation de la protéine tau provoquée par hypothermie induite par la privation de nourriture est associée à de tels effets délétères sur l'apprentissage et la mémoire, car toutes les études sur les souris affamées<sup>4-6</sup> ou récemment sur les souris en hypothermie associée à une anesthésie<sup>12</sup> ne comportent pas de tests comportementaux.

### La plasticité synaptique est-elle responsable des défauts de mémoire ?

Les contacts synaptiques au sein de l'hippocampe se réduisent pendant l'engourdissement et sont rétablis au réveil.<sup>2,13,14</sup> Chez les animaux qui n'hibernent pas, des changements similaires ont été observés *in vitro* en utilisant des coupes de cerveau<sup>15,16</sup> et *in vivo* lors d'une hypothermie associée à une anesthésie.<sup>17</sup> D'une façon contradictoire avec la régression synaptique, la plasticité synaptique *in vitro* présente dans la potentialisation à long terme dans les coupes d'hippocampe n'est pas affectée par un refroidissement temporaire chez le hamster<sup>18</sup> et chez le rat<sup>19</sup>. Le point faible de ces études pourrait être que ces phases d'hypothermie ont duré moins d'une heure, ce qui est beaucoup plus court que l'état d'engourdissement qui dure plusieurs jours. De plus, pour ces préparations *in vitro*, le tissu est refroidi pour éviter l'excitotoxicité provoquée par le glutamate excrété pendant la coupe, et ce refroidissement affecte déjà la plasticité synaptique. En conséquence d'autres expérimentations sur la régression synaptique en hibernation doivent être réalisées par des mesures *in vivo* de la potentialisation à long terme.

### En quoi ces modèles sont-ils utiles ?

Ces trois modèles mimant l'hyperphosphorylation de la protéine tau constatée dans la maladie d'Alzheimer et d'autres tauopathies sont extrêmement utiles pour tester des stratégies thérapeutiques. Ils présentent une augmentation fiable, durable et marquée de la phosphorylation de la protéine tau sur des épitopes en rapport avec la maladie, pendant des heures, des jours ou des mois, selon que l'hypothermie soit réalisée en culture cellulaire, chez des souris privées de nourriture ou des hamsters en hibernation. Les études pharmacologiques peuvent être menées sans interférences provenant d'autres agents. Le modèle de la culture cellulaire permet de tester la translocation de la protéine tau du neurite vers le corps cellulaire, la surveillance du transport neuronal par microscopie time-lapse et le criblage à haut débit d'agents thérapeutiques, comme les inhibiteurs de tau kinase. Même l'analyse de la fonction synaptique pourrait être réalisée dans le modèle *in vitro*, en utilisant une culture de coupe d'hippocampe ou des cultures cellulaires primaires dispersées. Les souris et les hamsters sont tous deux faciles à entretenir et ont une

7. M.C. McNamara, M.J. Riedesel: Memory and hibernation in *Citellus lateralis*. *Science*, 1973, vol. 179, 92-94.
8. H. Zhao, D.J. Bucci, M. Weltzin, K.L. Drew: Effects of aversive stimuli on learning and memory in Arctic ground squirrels. *Behavior Brain Research*, 2004, vol. 151, 219-224.
9. E. Millesi, H. Prossinger, J.P. Dittami, M. Fieder: Hibernation effects on memory in European ground squirrels (*Spermophilus citellus*). *Journal of Biological Rhythms*, 2001, vol. 16, 254-271.
10. L. Mihailovic, B. Petrovic-Minic, S. Protic, I.R. Divac: Effects of hibernation on learning and retention. *Nature*, 1958, vol. 218, 191-192.
11. M.M. Weltzin, H.W. Zhao, K.L. Drew, D.J. Bucci: Arousal from hibernation alters contextual learning and memory. *Behavior Brain Research*, 2006, vol. 167, 128-133.
12. E. Planel, K. E. Richter, C.E. Nolan, J.E. Finley, L. Lu, Y. Wen, P. Krishnamurthy, M. Herman, L. Wang, J.B. Schachter, R.B. Nelson, L.F. Lau, K.E. Duff: Anesthesia leads to tau hyperphosphorylation through inhibition of phosphatase activity by hypothermia. *Journal of Neuroscience*, 2007, vol. 287, 3090-3097.
13. V.I. Popov, L.S. Bocharova: Hibernation-induced structural changes in synaptic contacts between mossy fibres and hippocampal pyramidal neurons. *Neuroscience*, 1992, vol. 48, 53-62.
14. C.G. von der Ohe, C.C. Garner, C. Darian-Smith, H.C. Heller: Synaptic protein dynamics in hibernation. *Journal of Neuroscience*, 2007, vol. 27, 84-92.
15. S.A. Kirov, I.J. Petrak, J.C. Fiala, K.M. Harris: Dendritic spines disappear with chilling but proliferate excessively upon rewarming of mature hippocampus. *Neuroscience*, 2004, vol. 127, 69-80.
16. M. Roelandse, A. Matus: Hypothermia-associated loss of dendritic spines. *Journal of Neuroscience*, 2004, vol. 24, 7843-7847.
17. V.I. Popov, N.I. Medvedev, I.V. Patrushev, D.A. Ignatov, E.D. Morenkov, M.G. Stewart: Reversible reduction in thin dendritic spines in CA1 of rat and ground squirrel subjected to hypothermia-normothermia *in vivo*: a 3-dimensional electron microscope study. *Neuroscience*, 2007, vol. 149, 549-556.

barrière sang-cerveau intacte, ce qui est un prérequis pour le test d'agents thérapeutiques. Les deux modèles peuvent aussi être utilisés pour des études comportementales d'apprentissage et de mémoire, avec l'avantage que l'acquisition et le souvenir peuvent être obtenus sans effet sévère d'hyperphosphorylation, par exemple avant et après l'hypothermie induite par famine ou la phase d'engourdissement en hibernation.

### Après l'hypothermie ?

Bien qu'une phosphorylation du type de celles des PHF de la protéine tau ait été obtenue dans les deux modèles, aucune formation de paire hélicoïdale de filaments (PHF) n'a été observée. Ceci pourrait constituer un désavantage pour un modèle de maladie d'Alzheimer, mais signifie que l'hyperphosphorylation de tau en soi n'est pas un « point de non retour » pathologique et qu'elle pourrait assurer une « neuroprotection » physiologique contre les conséquences du déficit de fourniture d'énergie.<sup>2</sup> Des études complémentaires sur les déficits de mémoire après l'hypothermie sont nécessaires – en mettant l'accent sur le rôle de la protéine tau et de la plasticité synaptique. Les problèmes mnésiques pourraient être le prix à payer pour la neuroprotection au cours de l'hypothermie ou l'hibernation. De la même manière, une étude récente suggère que l'amnésie à la suite d'une anesthésie pourrait être provoquée par l'hyperphosphorylation de la protéine tau en raison de l'hypothermie<sup>12</sup> et pourrait rendre les patients plus sensibles à une future neurodégénérescence. Nous devrions donc être aussi conscients des risques provoqués par un état d'hypométabolisme induit chez les êtres humains en urgence, la chirurgie et les vols spatiaux de longue durée.<sup>20</sup>

TORSTEN BULLMANN, JENS STIELER, MAX HOLZER,  
WOLFGANG HÄRTIG, THOMAS ARENDT

## ■ ALZHEIMEROLOGIE

### MAUVAISES NOUVELLES POUR L'ALZHEMED

Certains espéraient beaucoup des études cliniques sur l'Alzhemed ou tramiprosate. Cette molécule (l'acide 3-amino-1-propanesulfonique ou homotaurine) de la firme Neurochem intervient sur la formation d'amyloïde. Elle a fait l'objet de deux études cliniques importantes, une aux Etats-Unis, l'autre en Europe. Les résultats de la première investigation ont été présentés par Barry Greenberg, de Neurochem, à Philadelphie le 9 novembre dernier mais on connaissait l'essentiel depuis le mois d'avril. Ils ne révèlent aucun effet significatif en ce qui concerne le critère principal, en dépit d'une tendance favorable sur les tests classiques (ADAS-Cog et CDR-SB). Sur un sous-groupe de 312 patients (sur un total de 790), les études par imagerie cérébrale monteraient une réduction dose-dépendante de l'atrophie hippocampique. En dépit de ces éléments favorables, la négativité du critère principal interdit à Neurochem d'espérer un agrément de la FDA. Dans ces conditions, la firme a décidé de mettre un terme à l'étude européenne et de se consacrer au développement d'une pro-drug du tramiprosate. Par ailleurs, Neurochem a fait savoir, ce que Greenberg a refusé de commenter, qu'elle envisageait de commercialiser l'Alzhemed comme supplément nutritionnel puisqu'il s'agit d'une substance naturelle. Il pourrait, dans ce cadre, se trouver sur le marché dès 2008. Ces mauvaises nouvelles ont entraîné un effondrement de la valeur de l'action Neurochem sur le marché boursier.

18. M.S. Krelstein, M.P. Thomas, J. M. Horowitz: Thermal effects on long-term potentiation in the hamster hippocampus. **Brain Research**, 1990, vol. 520, 115-122.
19. P. Bittar, M. Muller: Time-dependent reversal of long-term potentiation by brief cooling shocks in rat hippocampal slices. **Brain Research**, 1993, vol. 620, 181-188.
20. M. Biggiogera, M. Malatesta, C. Zancanaro: Mammalian Hibernation: Relevance to a Possible Human Hypometabolic State. Final Report of The Ariadna Project, CFP 03/6501, Contract No 18154/04/NL/MV, Department of Morphological and Biomedical Sciences, University of Verona, Italy, 2004.