

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté des Sciences

Ecole Doctorale ED 258

UMR-CNRS 6101- Laboratoire de Neuro-immunologie

N° 20 - 2003

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Option : IMMUNOLOGIE, NEUROSCIENCE

Présentée et soutenue publiquement par

Christophe LAUTRETTE

Le 1<sup>er</sup> Juillet 2003

ETUDE DU RÉCEPTEUR PRO-APOPTOTIQUE FAS  
DANS DES CELLULES NEURONALES ET  
LYMPHOCYTAIRES T HUMAINES

Directeur de Thèse : Pr. Marie-Odile JAUBERTEAU-MARCHAN

Dr C. AYER-LE LIEVRE, DR-CNRS (Université de Limoges)	PRESIDENT
Dr N. BAUMANN, DR - INSERM (Université de Paris VI)	RAPPORTEUR
Dr JC. LECRON, MCU-PH (Université de Poitiers)	RAPPORTEUR
Pr MH. RATINAUD, PU (Université de Limoges)	EXAMINATEUR
Pr MO. JAUBERTEAU-MARCHAN, PU-PH (Université de Limoges)	DIRECTEUR

A mes parents, mes grands-parents, mon frère et ma sœur,

A Caroline,

# Remerciements

Nous exprimons toute notre reconnaissance au professeur Marie-Odile Jauberteau-Marchan qui est à l'origine de cette étude réalisée sous sa direction. Ses compétences scientifiques et sa constante disponibilité nous ont permis de mener à bien ce travail. Nos sincères remerciements lui sont adressés.

Nous sommes très sensibles à l'honneur que nous fait le Docteur Nicole Baumann en acceptant de juger ce travail et nous lui exprimons toute notre reconnaissance et notre profond respect.

Nous exprimons tous nos remerciements au Docteur Jean-Claude Lecron qui nous fait l'honneur de juger ce travail et nous lui témoignons toute notre reconnaissance et notre profond respect.

Nous remercions sincèrement le Docteur Christiane Ayer-Le Lièvre qui nous fait l'honneur de présider ce jury. Nous lui exprimons notre profond respect.

Nous remercions vivement le professeur Marie-Hélène Ratinaud d'avoir accepté de participer à ce jury. Nous lui témoignons toute notre reconnaissance.

Je remercie vivement la société Diaclone de m'avoir fourni gracieusement les anticorps nécessaires à cette étude. Mes remerciements s'adressent plus particulièrement à M. J. Widjenes et à Mme C. Vermot-Desroches qui ont toujours soutenu ces travaux. J'espère sincèrement que les publications issues de ces études contribueront à mieux faire connaître l'excellence de leurs réactifs.

Je remercie aussi tout particulièrement le Conseil Régional du Limousin pour son soutien financier au cours de cette étude.

Je remercie aussi vivement l'école doctorale Science - Technologie – Santé, toujours à l'écoute de nos problèmes doctoraux, et dont les formations ont été très enrichissantes. Je remercie tout particulièrement Mr Vareille, directeur de ED-258, et Melle Gaëlle Peyrat.

Merci à tout notre laboratoire. A Stéphanie pour l'aide apportée dans ce travail, sa gentillesse, et sa patience devant nos concepts personnels du rangement. Je remercie aussi vivement Bertrand pour son aide, son soutien, et ses conseils ; une grande partie de ces travaux a été soutenue par ses qualités. Merci également à Elodie, pour l'aide qu'elle m'a apportée dans cette étude, mais aussi pour sa grande gentillesse et sa constante bonne humeur. Je tiens aussi à remercier Murielle pour son aide et ses compétences scientifiques précieuses qu'elle a toujours partagées; et pour sa gentillesse et sa disponibilité. Je remercie vivement le Dr Caroline Boda pour sa gentillesse, son écoute, et son aide indispensable à l'étude et aux soins de mes souris.

Je remercie beaucoup également Caroline et Cathy. Toujours à notre écoute, les avoir comme voisines fut un grand plaisir.

Je remercie vivement le laboratoire de Mme Ayer-Le Lièvre avec qui nous avons souvent travaillé : Fafa ; Isabelle pour son aide précieuse dans mes travaux, mais surtout pour son amitié très importante dans la réalisation de cette étude ; et Barbara, toujours prête à rendre service.

Je remercie aussi le laboratoire de Michel Cogné qui m'a apporté son aide à diverses occasions. Je citerai tout particulièrement Krap, Florence, Zelia, et Hei Lanne...

Une petite ligne à part pour Laurence qui m'a bien souvent aidé, tant pour des conseils techniques que pour retrouver des réactifs perdus... Merci surtout pour ta constante bonne humeur communicative.

Merci aussi à toute l'équipe de Marie-Hélène Ratinaud, de Danielle Troutaud et de Mireille Verdier. Un petit mot à Thomas, pour toutes nos excellentes discussions sur l'apoptose et autres.

Merci également au laboratoire du Pr Cardot et à Serge Battu pour son aide et ses conseils. Travailler ensemble fut pour moi très enrichissant.

Mes remerciements à Christophe Lejeune pour son aide et la bonne humeur quotidienne qu'il apporta au laboratoire. Merci aussi à Dominique qui nous permet de travailler dans des locaux toujours propres.

Merci aussi à Sophie Collot pour sa gentillesse et son aide à diverses occasions.

Je souhaite également remercier le personnel des Laboratoires d'Immunologie et d'Anatomo-Pathologie du CHU de Limoges pour avoir facilité ce travail. Je remercie tout particulièrement le Dr Mireille Drouet pour son aide en cytométrie en flux et le Pr F. Labrousse pour les études histopathologiques des souris.

Ces remerciements s'adressent également au personnel du service de gynécologie obstétrique, sans l'aide duquel une partie importante de ces travaux n'aurait pas pu être réalisée.

De nombreux remerciements, pour leur aide indispensable et leur constante disponibilité, sont adressés à Jacques, de l'animalerie du CHU ; ainsi qu'à Florence et Sylvie, de l'animalerie de la Faculté de médecine. Merci aussi à Monsieur Herblot pour son aide dans mes travaux photos.

Merci enfin à tous mes amis : Anne, Yann, Marie, Thomas, Corinne, Fred, Sylvie, Valérie, Stéphanie et Gilles.

Mes derniers remerciements s'adressent à toute ma famille. Je remercie tout particulièrement Sophie, ma sœur, Alexis, mon frère, mes parents et mes grands-parents, qui m'ont toujours aidé, soutenu et encouragé au cours de mes études et, bien évidemment, de cette thèse qui sans leur soutien n'aurait pu être réalisée. Merci enfin à Caroline pour son aide et son soutien inconditionnel.

## Résumé

Le récepteur Fas est un récepteur membranaire capable d'induire l'apoptose des cellules qui l'expriment. Il joue un rôle fondamental dans l'homéostasie du système immunitaire, mais est aussi impliqué dans le système nerveux. La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurogénérative au cours de laquelle on observe une destruction sélective des neurones moteurs. Nos résultats ont permis de mettre en évidence que 26 % des sérums de malades atteints de SLA présentaient des taux élevés d'autoanticorps dirigés contre Fas. Nous avons montré que ces autoanticorps pouvaient induire l'apoptose par la voie de Fas dans les cellules d'une lignée neuroblastique humaine et dans des motoneurones issus de cultures mixtes de cerveaux ou de moelles épinières de rat. Ces données renforcent l'hypothèse auto-immune évoquée au cours de la pathogénie de la SLA. De plus, nous avons également montré l'expression du récepteur Fas à la surface des neurones moteurs, *in vitro* dans les cultures mixtes de cerveaux et de moelles épinières de rats, et *ex vivo* sur des coupes tissulaires. Nous avons également mis en évidence, pour la première fois, l'expression de Fas par les motoneurones fœtaux humains de cerveaux et de moelles épinières dans des cultures mixtes et dans des coupes tissulaires. Nous avons aussi montré que FasL induisait spécifiquement l'apoptose de 30 % des neurones moteurs humains fœtaux en culture mixte, et que cette apoptose était bloquée par l'inhibiteur de la caspase-8. Ces résultats confirment la fonctionnalité de Fas dans les motoneurones humains fœtaux. Les cellules de la lignée neuroblastique SH-SY5Y sont hétérogènes tant au niveau morphologique que dans leur expression membranaire de Fas. Le tri des cellules selon leur taille et leur densité grâce à la SdFFF a permis d'obtenir 3 populations différentes. Ces populations différaient par des critères morphologiques mais également par l'expression de Fas et de la N-CAM. Nos résultats suggèrent que la lignée neuroblastique SH-SY5Y présente une population de cellules très immatures, une population de différenciation intermédiaire, et une population plus différenciée. Ceci permet d'envisager l'utilisation des populations triées par SdFFF à partir de la lignée SH-SY5Y comme modèle d'étude de stades précoces de différenciation des neuroblastes. Enfin, nous avons mis en évidence la phosphorylation extracellulaire des agrégats de Fas de 116 kDa par des ectokinases C (ecto-PKC) dans la lignée lymphocytaire T Jurkat. Cette phosphorylation inhibe la formation spontanée, par le domaine de pré-association de Fas, d'agrégats de haut poids moléculaire (> 200 kDa). L'inhibiteur d'ecto-PKC K252b entraîne une augmentation du regroupement membranaire de Fas et de l'apoptose de la lignée Jurkat, en présence ou en absence de FasL. Ces résultats mettent en évidence que les ecto-PKC inhibent l'oligomérisation membranaire de Fas à la surface cellulaire de la lignée Jurkat et inhibent ainsi l'apoptose. Ceci nous permet d'évoquer un nouveau mécanisme de régulation extracellulaire de la voie Fas.

Mots clés : Fas, apoptose, motoneurones, ectokinases, autoanticorps.

**Résumé de 1000 caractères :**

**ETUDE DU RÉCEPTEUR PRO-APOPTOTIQUE FAS DANS DES CELLULES  
NEURONALES ET LYMPHOCYTAIRES T HUMAINES**

Cette étude porte sur le récepteur pro-apoptotique Fas dans le système nerveux et immunitaire. La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurogénérative avec une destruction sélective des neurones moteurs. Nous avons montré que 26 % des sérums de malades atteints de SLA présentaient des taux élevés d'autoanticorps dirigés contre Fas qui induisaient l'apoptose d'une lignée neuroblastique humaine et des motoneurons de rat. L'expression du récepteur Fas a été mise en évidence *in vitro* et *ex vivo* dans les neurones moteurs murins et humains. Les cellules de la lignée neuroblastique SH-SY5Y sont hétérogènes. Le tri des cellules par SdFFF a permis d'obtenir 3 populations présentant des stades distincts de différenciation. Nous avons mis en évidence dans la lignée lymphocytaire T Jurkat la phosphorylation extracellulaire des agrégats de Fas de 116 kDa par des ectokinases C qui inhibent ainsi l'oligomérisation membranaire de Fas à la surface cellulaire et l'apoptose.

Mots clés : Fas, apoptose, motoneurons, ectokinases, autoanticorps

## Abstract

### **STUDY OF THE PRO-APOPTOTIC RECEPTOR FAS IN HUMAN NEURONAL AND T LYMPHOID CELLS**

This study is about the pro-apoptotic Fas receptor in immune and central nervous systems. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease with selective motor neuron death. About 26% of sera from ALS patients have elevated autoantibodies against the Fas protein which induced apoptosis by the Fas pathway in a human neuroblastic cell line and in rat motoneurons. Fas expression was detected *in vivo* and *ex vivo* in rat and human motoneurons. Cells from the neuroblastic cell line SH-SY5Y appeared heterogeneous. Cell separation by SdFFF based on size and density allowed us to obtain three populations with different differentiation stage. We have detected in the human T cell line Jurkat an extracellular phosphorylation of Fas 116 kDa aggregate by ectokinase C which inhibited Fas clustering at the cell membrane and apoptosis, suggesting a new extra-cellular regulation mechanism for the Fas pathway.

**KEYWORDS :** Fas, apoptosis, motoneurons, ectokinase, autoantibodies



# TABLE DES MATIÈRES

<b>ABREVIATIONS</b> .....	1
<b>INTRODUCTION</b> .....	4
<b>DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	7
<b>Première partie : L'APOPTOSE</b> .....	8
<b>.I Apoptose et nécrose</b> .....	8
.I.1 La nécrose .....	9
.I.2 L'apoptose .....	10
<b>.II Mécanisme de l'apoptose</b> .....	11
<b>.III Effecteurs de l'apoptose</b> .....	12
.III.1 Aspects moléculaires de l'apoptose .....	12
.III.2 Rôle mitochondrial .....	13
.III.3 Rôle des caspases .....	15
.III.3.1 Structure des caspases .....	15
.III.3.2 Mécanisme d'action des caspases .....	16
.III.4 Les récepteurs de mort cellulaire .....	17
.III.5 Inhibiteurs de l'apoptose .....	20
.III.5.1 Les protéines FLIP .....	20
.III.5.2 Protéine de la famille de Bcl-2 .....	21
.III.5.3 Les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) .....	21
.III.5.4 Rôle des phosphorylations .....	22
<b>Deuxième partie : LE RECEPTEUR FAS</b> .....	23
<b>.I Structure de la protéine Fas</b> .....	23
.I.1 Partie extracellulaire .....	23
.I.2 Partie intra-cellulaire .....	24
<b>.II Voies de l'apoptose induite par Fas</b> .....	25
.II.1 Initiation du signal .....	25
.II.2 Transduction du signal .....	25
.II.2.1 Voies apoptotiques .....	25
.II.2.1.1 Formation du complexe de signalisation de mort induite (DISC) .....	25
.II.2.1.2 Rôle de la voie mitochondriale : cellules de type I et de type II .....	27
.II.2.2 Voie proliférative .....	30
.II.3 Régulateurs de la transduction du signal de Fas .....	31

.II.3.1	Fas et NF $\kappa$ B .....	31
.II.3.2	Fas et les protéines kinases activées par la mitose .....	32
.II.3.3	Fas et Protéine Kinase C .....	33
.II.3.4	Sphingomyélinases, céramides, et regroupements membranaires du récepteur Fas .....	33
<b>.III</b>	<b>Rôle physiologique et pathologique .....</b>	<b>34</b>
.III.1	Rôle dans le système immunitaire.....	34
.III.1.1	Régulation des populations lymphocytaires.....	34
.III.1.2	Élimination des cellules pathogènes .....	35
.III.2	Système nerveux .....	36
.III.2.1	Fas et neurones .....	36
.III.2.2	Fas et cellules gliales.....	37
	<b>Troisième partie : LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL MOTEUR .....</b>	<b>38</b>
<b>.I</b>	<b>Développement embryonnaire .....</b>	<b>38</b>
.I.1	La transformation du neurectoderme .....	38
.I.2	Précurseurs neuronaux et gliaux .....	39
.I.3	Différenciation du tube neural.....	40
.I.3.1	La moelle épinière.....	40
.I.3.2	Le cerveau .....	40
.I.4	Maturation du cerveau.....	40
.I.5	Des neuroblastes aux neurones matures.....	41
.I.5.1	Différenciation neuronale et N-CAM .....	41
.I.5.2	Rôle des facteurs trophiques .....	42
.I.6	Caractérisation des neurones moteurs adultes.....	43
<b>.II</b>	<b>Pathologie du système nerveux central moteur : la sclérose latérale amyotrophique.....</b>	<b>45</b>
.II.1	Excitotoxicité .....	47
.II.2	Stress oxydatif .....	49
.II.3	Modification du cytosquelette.....	51
.II.4	Autoimmunité.....	53
.II.5	Rôle de l'apoptose dans la SLA.....	55
	<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>57</b>
<b>.I</b>	<b>Conditions de cultures cellulaires .....</b>	<b>57</b>
.I.1	Lignées humaines .....	57

.I.1.1	Lignée lymphocytaire T Jurkat .....	57
.I.1.2	Lignée neuroblastique SH-SY5Y.....	57
.I.1.3	Ensemencement des lignées .....	57
.I.2	Cultures primaires de système nerveux central.....	58
.I.2.1	Cultures mixtes de cerveaux et de moelles épinières de rat.....	58
.I.2.2	Cultures de neurones humains.....	59
<b>.II</b>	<b>Sérums humains</b> .....	<b>59</b>
<b>.III</b>	<b>Dosage du FasL soluble dans les sérums humains</b> .....	<b>60</b>
<b>.IV</b>	<b>Conditions de stimulation des cellules</b> .....	<b>61</b>
.IV.1	Etude de l'apoptose induite par les sérums humains dans les cellules de la lignée neuroblastique humaine ou des cultures primaires de cerveaux et de moelles épinières de rat .....	61
.IV.2	Etude de l'apoptose induite par la voie Fas dans les cellules des lignées humaines ou des cultures primaires de SNC murin et humain .....	61
<b>.V</b>	<b>Séparation des cellules par la technique de fractionnement par couplage flux - force de sédimentation (SdFFF)</b> .....	<b>63</b>
.V.1	Principe de la SdFFF .....	63
.V.2	Préparation des cellules .....	63
<b>.VI</b>	<b>Etudes immunocytochimiques et immunohistochimiques par immunofluorescence indirecte</b> .....	<b>64</b>
.VI.1	Fixation des cellules en culture .....	64
.VI.2	Préparation des coupes de tissus .....	65
.VI.3	Anticorps primaires .....	65
.VI.3.1	Détection des réactivités d'autoanticorps sériques avec la lignée neuroblastique .....	66
.VI.3.2	Détection spécifique d'antigène cellulaire .....	66
.VI.4	Anticorps secondaires .....	68
<b>.VII</b>	<b>Détection de l'apoptose</b> .....	<b>69</b>
.VII.1	Détection par la méthode TUNEL .....	69
.VII.2	Détection de la libération des nucléosomes solubles par ELISA–apoptose.....	70
<b>.VIII</b>	<b>Détection d'autoanticorps anti-Fas sériques par ELISA</b> .....	<b>71</b>
.VIII.1	Recherche d'autoanticorps anti-Fas dans des sérums humains de SLA et contrôles .....	71

.VIII.2	Recherche d'autoanticorps anti-Fas dans des sérums de souris immunisées par la protéine Fas purifiée .....	72
<b>.IX</b>	<b>Analyse des réactivités protéiques en Western-Blotting</b> .....	72
.IX.1	Préparation des protéines .....	73
.IX.1.1	Lysat cellulaire total .....	73
.IX.1.2	Dosage de la concentration protéique .....	73
.IX.2	Séparation des protéines par électrophorèse .....	74
.IX.3	Révélation des études en Western-blot par immunochimie .....	75
<b>.X</b>	<b>Extraction de protéines</b> .....	76
.X.1	Purification d'Ig G de sérum humain .....	76
.X.2	Immunopurification de la protéine Fas neuroblastique et lymphocytaire .....	76
.X.2.1	Préparation de la colonne d'immunopurification de Fas .....	76
.X.2.2	Extraction de la protéine Fas .....	77
<b>.XI</b>	<b>Etude des phosphorylations extracellulaires de Fas sur la lignée lymphocytaire T Jurkat</b> .....	77
.XI.1	Etude de la phosphorylation extracellulaire de Fas.....	77
.XI.1.1	Stimulation des cellules.....	77
.XI.1.2	Incorporation extracellulaire de [P <sup>32</sup> ] par Fas .....	78
.XI.2	Etude du regroupement des récepteurs Fas à la surface membranaire.....	78
.XI.3	Rôle des ectokinases C dans l'apoptose induite par Fas .....	79
<b>.XII</b>	<b>Immunsation de souris par la protéine Fas neuronale et lymphocytaire</b> .....	79
.XII.1	Préparation des protéines .....	79
.XII.2	Immunsation des souris .....	80
.XII.3	Etudes physiologiques des souris .....	80
.XII.3.1	Test de la cheminée .....	80
.XII.3.2	Test de la traction .....	81
<b>.XIII</b>	<b>Analyse moléculaire de Fas</b> .....	81
.XIII.1	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) .....	81
.XIII.2	Clonage et séquençage .....	82
<b>RESULTATS</b>	.....	84
<b>ROLE DE FAS DANS L'APOPTOSE MOTONEURONALE AU COURS DE LA SLA</b>	.....	85
<b>.I</b>	<b>Les sérums de SLA induisent l'apoptose des cellules neuroblastiques</b> .....	85

<b>.II</b>	<b>Détection d'autoanticorps dirigés contre la protéine Fas dans les sérums de malades atteints de SLA</b>	86
.II.1	Détection par Western-blot	86
.II.2	Détection par ELISA	88
<b>.III</b>	<b>Détection de FasL soluble dans les sérums de SLA</b>	88
<b>.IV</b>	<b>Rôle pro-apoptotique des anticorps anti-Fas présents dans les sérums de SLA sur la lignée neuroblastique humaine</b>	89
<b>.V</b>	<b>Réactivité des sérums de SLA avec les cellules neuroblastiques et les motoneurones de rats</b>	89
<b>.VI</b>	<b>Expression du récepteur Fas par les motoneurones murins</b>	91
<b>.VII</b>	<b>Induction de l'apoptose motoneuronale par la voie de Fas dans des cultures mixtes de SNC de rats</b>	92
<b>IMMUNISATION DE SOURIS PAR LA PROTEINE FAS HUMAINE DE NEUROBLASTES OU DE LYMPHOCYTES T</b>		94
<b>.I</b>	<b>Observations et analyses histologiques</b>	94
.I.1	Détection d'ascite	94
.I.2	Mise en évidence d'anomalie de la motricité	95
.I.3	Etudes macroscopiques des souris	95
<b>.II</b>	<b>Recherche d'anticorps anti-Fas</b>	96
.II.1	Etude par ELISA	96
.II.2	Etude par Western-Blotting	97
<b>.III</b>	<b>Analyse de la réactivité de l'ascite par Western-blot</b>	98
<b>EXPRESSION DE FAS DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL FOETAL HUMAIN</b>		99
<b>.I</b>	<b>Expression de Fas dans des cultures primaires de cerveaux et de moelles épinières fœtales humaines</b>	99
<b>.II</b>	<b>Apoptose des motoneurones fœtaux humains induite par FasL</b>	102
<b>.III</b>	<b>Effet de l'inhibiteur de la caspase-8 sur l'apoptose des motoneurones fœtaux humains induite par FasL</b>	104
<b>PURIFICATION DE CELLULES NEURONALES IMMATURES DE LA LIGNEE SH-SY5Y PAR SdFFF</b>		105
<b>.I</b>	<b>Aspects microscopiques</b>	105
.I.1	Observation en microscopie inversée des cultures de la lignée neuroblastique SH-SY5Y	105

.I.2	Aspects en microscopie inversée des cellules SH-SY5Y contenues dans les fractions séparées par SdFFF .....	106
<b>.II</b>	<b>Caractérisation par IFI.....</b>	<b>107</b>
.II.1	Caractérisation de la lignée cellulaire SH-SY5Y.....	107
.II.2	Expression de Fas et N-CAM par les cellules SH-SY5Y .....	108
.II.2.1	Etude sur la population totale.....	108
.II.2.2	Etude des populations séparées par SdFFF.....	109
	<b>PHOSPHORYLATION EXTRACELLULAIRE DE LA PROTÉINE FAS.....</b>	<b>110</b>
<b>.I</b>	<b>Détection de la protéine Fas monomérique et agrégée immunopurifiée à partir de la lignée lymphocytaire Jurkat.....</b>	<b>110</b>
<b>.II</b>	<b>Phosphorylation extracellulaire de Fas par le [<math>\gamma</math>P<sup>32</sup>] ATP .....</b>	<b>110</b>
<b>.III</b>	<b>Des inhibiteurs extracellulaires de la PKC bloquent la phosphorylation de Fas et augmentent son agrégation.....</b>	<b>111</b>
<b>.IV</b>	<b>Absence de mutation de la protéine Fas dans la lignée Jurkat étudiée.....</b>	<b>112</b>
<b>.V</b>	<b>La phosphorylation extracellulaire diminue le regroupement membranaire des récepteurs Fas.....</b>	<b>113</b>
<b>.VI</b>	<b>Rôle des ectokinases C dans la modulation de l'apoptose transmise par Fas.....</b>	<b>115</b>
	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>117</b>
	<b>ROLE PRO-APOPTOTIQUE D'AUTOANTICORPS ANTI-FAS DANS LES SERUMS DE MALADES ATTEINTS DE SLA.....</b>	<b>118</b>
	<b>IMMUNISATION DE SOURIS PAR LA PROTEINE FAS .....</b>	<b>124</b>
	<b>EXPRESSION DE FAS PAR LES NEURONES MOTEURS HUMAINS FOETAUX .....</b>	<b>129</b>
	<b>PURIFICATION DE CELLULES NEURONALES IMMATURES .....</b>	<b>134</b>
	<b>PHOSPHORYLATION EXTRACELLULAIRE DU RÉCEPTEUR FAS .....</b>	<b>137</b>
	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>142</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>145</b>
	<b>ANNEXES.....</b>	<b>193</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Gènes impliqués dans l'apoptose chez <i>C. Elegans</i> et chez les mammifères (d'après Couzinet et al., 2002). .....	13
Figure 2. Activation en cascade des caspases (d'après Couzinet et al., 2002). .....	17
Figure 3. Nouvelle nomenclature des récepteurs et des ligands de la superfamille du TNF (d'après Kwon et al., 1999). .....	18
Figure 4. Voies de signalisation apoptotique des récepteurs de mort et de leurs ligands (d'après Ashkenazi et al., 1999). .....	19
Figure 5. Domaines protéiques du récepteur Fas. ....	24
Figure 6. Modélisation du signal initial de l'activation de la voie Fas (d'après Algeciras-Schimmich et al., 2002). .....	27
Figure 7. Voies d'activation de Fas dans les cellules de type I ou de type II (d'après Couzinet et al., 2002). .....	29
Figure 8. Elimination des cellules pathogènes par les lymphocytes T CD8+. .....	36
Figure 9. Le cortex moteur chez l'homme. ....	41
Figure 10. Schéma classique d'un neurone. ....	44
Figure 11. Motoneurones en culture mixte de cortex de rats et dans une coupe transversale de moelle épinière de rat de 8 jours. ....	45
Figure 12. Détection par TUNEL et ELISA-apoptose de l'apoptose induite par les sérums de malades atteints de SLA ou les contrôles sains après 48h ou 72h d'incubation avec les cellules de la lignée neuroblastique humaine. ....	85
Figure 13. Détection d'anticorps anti-Fas dans les sérums de malades par Western-blotting après électrophorèse en gel de polyacrylamide à 12 % contenant un lysat de protéines neuroblastiques (A) ou la protéine Fas humaine recombinante (B). ....	87
Figure 14. Mise en évidence de la réactivité d'un sérum de malade atteint de SLA (A) avec des motoneurones identifiés par l'anticorps monoclonal SMI-32 (B) en double-marquage dans des cultures primaires de cerveaux de rats embryonnaires. (X 200). ....	90
Figure 15. Mise en évidence de la réactivité d'un sérum de malade atteint de SLA (A) et de l'anticorps monoclonal anti-Fas B-G34 (B) en double-marquage avec des neurones de cultures primaires de cerveaux de rats embryonnaires. (X 200). ....	90
Figure 16. Double-marquage en immunofluorescence indirecte des neurones de cultures mixtes d'encéphales de rats E 16 par les anticorps monoclonaux B-G27 et SMI-32. ....	91
Figure 17. Apoptose des motoneurones murins induite par un sérum de SLA. ....	92

Figure 18.	Détection d'autoanticorps anti-Fas par ELISA sensibilisé avec la protéine Fas neuroblastique dans les sérums des souris contrôles (C 1-5) ou immunisées avec la protéine Fas neuroblastique (N 1-5) ou lymphocytaire (J 1-5). .....	96
Figure 19.	Comparaison des taux sériques d'anticorps anti-Fas des souris du lot N détectés par ELISA sensibilisé avec les protéines Fas neuroblastique ou lymphocytaire	97
Figure 20.	Réactivité des ascites des souris N1 (A) et N2 (B) avec des lysats de protéines extraites des lignées humaines neuroblastiques (1), lymphocytaires (2), ou d'un foie de souris adulte normale (3). C : Identification de la protéine Fas par l'anticorps monoclonal anti-Fas clone 13. La protéine Fas immunopurifiée à partir de la lignée Jurkat est utilisée comme contrôle (4). .....	98
Figure 21.	Observation en microscopie inversée d'une culture primaire de cerveaux fœtaux humains de 14 jours. (X 200). .....	99
Figure 22.	Expression de Fas dans les cultures primaires de cerveaux de fœtus humains. ....	100
Figure 23.	Expression de Fas (vert) par un motoneurone humain fœtal (rouge) dans une culture mixte de cerveaux embryonnaires humains. ....	101
Figure 24.	Etude immunohistochimique de l'expression de Fas par les neurones moteurs dans une coupe transversale de la zone ventrale de la moelle épinière dorsale d'un embryon humain âgé de 10 semaines. ....	101
Figure 25.	Apoptose des motoneurones par la voie de Fas. ....	103
Figure 26.	Apoptose induite par FasL dans des cultures mixtes de neurones en présence ou non de l'inhibiteur de la caspase-8. La lignée Jurkat est utilisée comme contrôle positif. ....	104
Figure 27.	Aspect en microscopie inversée des cellules de la lignée SH-SY5Y. (X 200). ....	105
Figure 28.	Caractérisation du lignage neuronal des cellules SH-SY5Y. ....	107
Figure 29.	Expression hétérogène de la protéine Fas par les cellules SH-SY5Y. ....	108
Figure 30.	Expression de Fas et de la N-CAM par les cellules neuroblastiques humaines triées par SdFFF. ....	109
Figure 31.	Phosphorylation des agrégats de Fas de 116 kDa par des ecto-PKC. ....	112
Figure 32.	Sites potentiels de phosphorylation extracellulaire de Fas par les PKC. ....	113
Figure 33.	Rôle de FasL et de K252b dans le regroupement membranaire de Fas à la surface des cellules de la lignée lymphocytaire T Jurkat. ....	114



Figure 34.	Détection par IFI avec l'anticorps anti-Fas B-G27 des regroupements membranaires fluorescents de Fas dans les cellules de la lignée Jurkat à l'état basal (A) ou après stimulation par FasL (C et D), en présence de l'inhibiteur d'ecto-PKC K252b (B et D). .....	115
Figure 35.	Apoptose des cellules Jurkat détectée par TUNEL (A) ou par ELISA-apoptose (B) après 24h d'exposition à FasL, en présence ou non de l'inhibiteur d'ecto-PKC K252b. ....	116
Figure 36.	Marquage TUNEL des cellules Jurkat après exposition des cellules à FasL (C et D) et à l'inhibiteur d'ecto-PKC K252b (B et D).....	116

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau I.	Activateurs et inhibiteurs de la voie Fas .....	62
Tableau II.	Tableau des anticorps primaires utilisés en immunofluorescence indirecte. ...	67
Tableau III.	Anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence indirecte.....	69
Tableau IV.	Tableau des anticorps primaires utilisés en Western-blott.....	75

# ABBREVIATIONS

a.a : acide aminé

Ac : Anticorps.

AchE : acétylcholinestérase.

AIF : facteur inducteur de l'apoptose.

ASK-1 : « apoptosis signal-regulating kinase-1 »

BAR : « bifunctional apoptosis regulator »

BSA : Sérum albumine bovine

COX : cyclooxygénase.

CRD : cystein-rich domain

DcR : « decoy récepteur »

DD: « death domain »

DED : « death effector domain »

DISC : « death inducing signaling complex »

DO : densité optique

ELISA : « Enzyme-linked immunosorbent assay »

ELISA-apoptose : Méthode de dosage des cellules apoptotiques par dosage des nucléosomes solubles intra-cytoplasmiques

ERK : kinases régulées par des voies extracellulaires

FADD : « Fas associated death domain »

FAP-1 : « Fas-associated phosphatase »

FasL : Fas ligand

FLIP : « FLICE inhibitory protein »

IAP : protéine inhibitrice de l'apoptose

IFN- $\gamma$  : Interféron-gamma

Ig : Immunoglobuline

LBD : « ligand binding domain »

MBE : Milieu basal de Eagle

NB : Neuroblaste

NF : Neurofilament

NGF : « nerve growth factor »

NGFR : « nerve growth factor receptor »

PBS : Tampon phosphate salin à pH 7,2

PBSi : PBS contenant 1mM de Vanadate et 0.1mM de NaF

pdb : paires de bases

PKC : Protéine kinase C

PLAD : « pre-ligand association domain »

SAN : Sérum d'agneau normal

SLA : Sclérose latérale amyotrophique

SN : Système nerveux

SNC : Système nerveux central

SAM : « sterile-alpha motif »

SDS : sodium dodécyl sulfate

SdFFF : technique de fractionnement par couplage flux - force de sédimentation

SIMP : « soluble inter membrane mitochondrial proteins »

SOD : Cu/Zn superoxyde dismutase

SVF<sub>d</sub> : Sérum de veau foetal décomplémenté

TA : Température ambiante

TNF : « tumor necrosis factor »

TRAIL : « TNF-related apoptosis-inducing ligand »

TUNEL : « TdT-mediated dUTP nick end labelling »

UA : unités arbitraires

XIAP : IAP liée au chromosome X

# INTRODUCTION

L'apoptose est un processus physiologique de mort cellulaire au cours duquel des mécanismes complexes sont activés pour aboutir à la destruction de la cellule. Ce « suicide cellulaire » est un événement clé en biologie car il permet l'équilibre entre prolifération et dégénérescence cellulaire dans les organismes pluricellulaires, c'est à dire le maintien de leur homéostasie. De plus, l'apoptose est un mécanisme « silencieux » pour l'organisme et il permet donc la régulation des populations cellulaires tout en respectant l'intégrité de l'organisme.

L'apoptose survient naturellement au cours de l'embryogenèse, du renouvellement tissulaire et lors du vieillissement. Cependant, elle peut également se produire dans diverses conditions pathologiques. De plus, un dysfonctionnement des mécanismes régulateurs de l'apoptose va donner lieu à de graves pathologies. Ainsi, un défaut d'apoptose va entraîner des syndromes prolifératifs associés à un processus de tumorigenèse, tout particulièrement au niveau des tissus à renouvellement rapide comme le système immunitaire (lymphome, leucémie). A l'inverse, une activation anormale va donner lieu à un phénomène de dégénérescence, comme cela est observé au cours de nombreuses maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, ou la sclérose latérale amyotrophique.

Parmi les molécules impliquées dans l'activation du processus apoptotique, le récepteur Fas (Apo 1 ou CD95) est l'un des plus étudiés. Fas est un récepteur appartenant à la superfamille des récepteurs au *tumor necrosis factor* (TNF) / *nerve growth factor* (NGF). La fixation de son ligand naturel (FasL), ou d'un anticorps anti-Fas agoniste, permet son oligomérisation et entraîne le recrutement et l'activation de la caspase-8 grâce à la protéine adaptatrice FADD (« Fas associated death domain »). La caspase-8 va à son tour activer la caspase-3, soit directement par clivage, soit en activant la voie apoptotique mitochondriale. La caspase-3, véritable exécutrice de l'apoptose, va permettre l'activation des molécules effectrices de l'apoptose.

Le récepteur Fas joue un rôle crucial au niveau du système immunitaire, tant pour la régulation des populations lymphocytaires après une réponse immunitaire, que pour le maintien dans l'organisme de la tolérance aux autoantigènes. Au cours de la réponse immunitaire, le récepteur Fas va également être impliqué dans l'élimination des cellules infectées par des virus ou des parasites, ou des cellules tumorales. Bien que l'expression et le rôle de la protéine Fas dans le système nerveux ne soient pas clairement définis, elle a été impliquée au cours de pathologies neurodégénératives telles que l'ischémie ou la maladie d'Alzheimer.

Des travaux antérieurs au laboratoire suggéraient que le récepteur pro-apoptotique Fas jouait également un rôle dans la sclérose latérale amyotrophique (SLA). La SLA est une pathologie grave du système nerveux central au cours de laquelle on observe une dégénérescence sélective des neurones moteurs. Cette destruction des motoneurons entraîne une paralysie musculaire progressive, puis la mort, qui survient entre 3 et 5 ans après l'identification des premiers signes cliniques. Les mécanismes qui entraînent l'apparition d'une SLA ne sont pas encore clairement identifiés, mais seules 10 % des formes sont familiales. Plusieurs hypothèses ont été largement étayées quant aux causes des formes sporadiques, telles que l'excitotoxicité, le stress oxydatif, des modifications du cytosquelette et l'autoimmunité. Ces différents facteurs suggèrent que l'étiologie de la SLA est multifactorielle, mais il est toutefois intéressant de noter que des immunoglobulines (Ig) monoclonales sont retrouvées dans 60 % des sérums de malades. De ce fait, des anomalies immunitaires sont potentiellement associées à la SLA, bien que l'on ignore actuellement si les désordres auto-immuns sont à l'origine de la pathologie ou bien s'il s'agit d'une de ses conséquences qui aggrave éventuellement la neurodégénérescence.

Le but de cette étude était initialement d'étudier les facteurs sériques pro-apoptotiques présents dans le sérum de malades atteints de SLA. Il s'agit d'autoanticorps anti-Fas inducteurs d'apoptose motoneuronale. De ce fait, l'expression du récepteur Fas par des motoneurons du système nerveux central a été recherchée dans des cultures contenant des motoneurons murins.

Afin de relier les résultats obtenus au cours de cette étude à la pathologie humaine, l'expression et le rôle du récepteur Fas ont également été étudiés au niveau des motoneurons fœtaux humains, et d'une lignée neuroblastique humaine.

Pour préciser le rôle pathogène d'autoanticorps anti-Fas au cours de la SLA, et pour rechercher une possible spécificité cellulaire de la protéine Fas, nous avons étudié des souris immunisées par Fas et produisant des anticorps anti-Fas. Ces immunisations ont été obtenues avec des protéines Fas extraites soit de cellules neuroblastiques, soit de cellules lymphocytaires T humaines.

Enfin, une nouvelle régulation de la voie de signalisation apoptotique du récepteur Fas, par des phosphorylations extracellulaires, a été mise en évidence dans les cellules de la lignée lymphocytaire T Jurkat.



## **DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES**

# Première partie : L'APOPTOSE

## .I Apoptose et nécrose

L'apoptose est un phénomène actif, génétiquement contrôlé, qui aboutit à la mort des cellules sénescents ou endommagées. Ce phénomène a été identifié par Kerr et al. (1972) au cours d'une étude sur l'ischémie hépatique. Ces auteurs ont décrit deux modes distincts de mort cellulaire sur la base de critères morphologiques. Le premier type de mort cellulaire, dénommé nécrose, est caractérisé par une augmentation rapide du volume cellulaire, la perte précoce de l'intégrité membranaire et mitochondriale, et le relargage du contenu lysosomal provoquant une lésion et une réaction inflammatoire au niveau du tissu environnant. Au contraire, l'apoptose se caractérise par le maintien de l'intégrité membranaire jusque dans les phases tardives du processus et une diminution du volume cellulaire. La structure des organelles est préservée alors que la chromatine se condense et se fragmente. La cellule se fragmente également en corps apoptotiques mais préserve son contenu lysosomal. *In vivo*, ces corps apoptotiques sont alors phagocytés alors qu'ils subissent, *in vitro*, un processus de nécrose secondaire. Enfin, à la différence de la nécrose, l'apoptose ne déclenche pas, *in vivo*, de réaction inflammatoire.

L'apoptose est un processus physiologique de mort cellulaire faisant appel à la mise en œuvre d'un véritable programme de destruction de la cellule. Ce « suicide cellulaire » est un événement clé en biologie qui survient naturellement au cours de l'embryogenèse, du renouvellement tissulaire et lors du vieillissement. Il peut également se produire dans des conditions pathologiques variées telles que l'infection virale, l'hypoxie ou l'exposition à des toxines. La nécrose, qui se produit de façon accidentelle, est un processus relativement bien connu. Cependant, l'apoptose est un phénomène complexe qui nécessite l'exécution d'un programme génétique bien ordonné. Ces deux processus se caractérisent par des circonstances de survenue, des modifications morphologiques et des mécanismes moléculaires distincts.

## .I.1 La nécrose

La mort cellulaire nécrotique est un processus passif résultant d'une séquence d'événements cellulaires et tissulaires, qui survient à la suite de perturbations profondes de l'environnement cellulaire. Elle se produit dans des conditions pathologiques telles que l'hypoxie sévère, la privation de glucose, le traumatisme, la variation de l'osmolarité, de la température de l'environnement, et du pH, ainsi qu'à l'exposition à des toxines et des agents infectieux. A l'échelle du tissu ou de l'organe, la nécrose peut affecter un groupe de cellules contiguës. Les cellules attenantes, en libérant des substances toxiques pour les cellules voisines, entraînent une expansion du phénomène nécrotique. La nécrose conduit à une perte cellulaire toujours secondaire à des conditions pathologiques (Choi et al., 1999) et elle se caractérise de façon constante par une réaction inflammatoire.

Les anomalies morphologiques observées dans la nécrose résultent des perturbations des fonctions cellulaires. Au niveau de la cellule, deux phénomènes principaux conduisent irréversiblement à la mort des cellules nécrotiques affectées : la perte de l'intégrité membranaire et l'altération des fonctions mitochondriales. Dans la mort cellulaire par nécrose, un des premiers événements est la rupture de la membrane plasmique et donc la perte de sa capacité à réguler les gradients osmotiques et ioniques. Cela engendre une entrée massive d'eau accompagnée d'électrolytes, provoquant ainsi un gonflement de la cellule et une augmentation de la perméabilité aux molécules extracellulaires. Ainsi les morphologies cellulaires sont rapidement modifiées et vont s'accompagner d'une augmentation du volume cellulaire, d'un gonflement des organites et du noyau.

Dans le cytoplasme, les organites commencent à dégénérer et de profondes perturbations de l'activité mitochondriale sont observées. La mitochondrie et le réticulum endoplasmique se dilatent, des vacuoles intracytoplasmiques se forment et les polysomes se détachent du réticulum endoplasmique. Les organites intracellulaires sont dispersés dans l'espace extracellulaire. La structure nucléaire est également perturbée, le noyau est gonflé et la chromatine digérée par des protéases et des endonucléases et ainsi l'ADN nucléaire va être dégradé de manière " aléatoire " (Bicknell et Cohen, 1995 ; Dong et al., 1997) générant des fragments dépourvus d'extrémité 3' sortante.

La masse de cellules nécrotiques peut se limiter à une nécrose localisée, ou évoluer vers une nécrose diffuse qui résulte de l'action d'enzymes lysosomiales dérivées de la cellule elle-même (autolyse) ou de celles voisines (hétérolyse). La mort cellulaire par nécrose déclenche souvent une forte réaction inflammatoire locale. Les cellules nécrotiques lysées libèrent des substances dont les leucotriènes qui sont générés par la peroxydation des lipides membranaires, et des composants de la mitochondrie activant le complément (Giclas et al., 1979) qui ne sont pas encore identifiés (Kagiyama et al., 1989). Ces substances induisent une réaction inflammatoire typique de la nécrose (Kroemer et al., 1998) et les débris cellulaires sont alors phagocytés par les cellules immunitaires de l'inflammation.

## .I.2 L'apoptose

Toutes les cellules ont la capacité de se détruire en activant un programme intrinsèque dont l'exécution conduit à une forme de mort cellulaire, l'apoptose. Par opposition à la nécrose, l'apoptose est considérée comme une mort cellulaire "ordonnée", procédant par différentes phases (Kerr et al., 1972 ; Duvall and Wyllie, 1986) qui permettent l'interruption planifiée des processus biologiques et la destruction des macrostructures de manière à faciliter leur élimination.

De nombreux signaux tant physiologiques que pathologiques, extracellulaires ou intracellulaires (drogues cytotoxiques, déprivation en facteur de croissance, TNF-  $\alpha$ , FasL, p53...), sont capables d'induire l'apoptose de nombreux types cellulaires. D'une manière générale, l'apoptose est considérée comme un mécanisme majeur impliqué dans des processus tant physiologiques que pathologiques. Ainsi, ce phénomène de mort cellulaire intervient dans l'élimination des cellules âgées ou endommagées et dans la dégénérescence des cellules surnuméraires, en particulier lors du développement embryonnaire. A ce titre, l'apoptose est impliquée dans les phénomènes de vieillissement cellulaire, dans le fonctionnement et l'homéostasie du système immunitaire, le renouvellement tissulaire et le développement du système nerveux. Une résistance accrue à l'apoptose entraîne l'apparition de pathologies telles que les maladies auto-immunes ou le cancer. A l'inverse, un accroissement des taux d'apoptose participe à l'émergence de maladies telles que les maladies neurodégénératives.

## **.II Mécanisme de l'apoptose**

Dans un premier temps, les cellules en apoptose vont s'isoler des autres cellules (perte des contacts intercellulaires).

La mitochondrie de la cellule apoptotique va subir plusieurs modifications majeures : relargage du cytochrome c dans le cytoplasme (Kluck et al., 1997 ; Yang et al., 1997), diminution du potentiel membranaire  $\Delta\Psi_m$  et modification de la perméabilité mitochondriale (Marchetti et al., 1996 ; Zamzami et al., 1996 ; Vander Heiden et al., 1997). La reconnaissance des corps apoptotiques par les phagocytes est facilitée par la translocation des phosphatidylsérines au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique.

L'un des points morphologiques caractéristiques de l'apoptose est l'importante condensation à la fois du noyau (et de sa chromatine) et du cytoplasme ce qui induit une diminution significative du volume cellulaire. La chromatine est clivée en fragments réguliers de taille multiples de 180 paires de bases (pdb) (Wyllie et al., 1980 et 1984) sous l'action d'endonucléases donnant un profil caractéristique dit en "barreaux d'échelle".

La membrane cellulaire, bien que conservant son intégrité, commence à bourgeonner. Finalement, toute la cellule se fragmente en vésicules entourées d'une membrane renfermant une partie du cytoplasme de la cellule: les corps apoptotiques. Ceux-ci sont rapidement phagocytés par les cellules voisines évitant ainsi toute possibilité d'inflammation locale, contrairement à ce qui s'observe dans la mort cellulaire par nécrose. Ce processus permet d'éviter toute libération du contenu cellulaire et de prévenir ainsi d'éventuelles lésions des cellules voisines.

L'apoptose joue un rôle déterminant au cours de processus physiologiques aussi différents que le développement, et le contrôle du renouvellement cellulaire et tissulaire. La régulation de l'apoptose est également fondamentale pour l'homéostasie du système hématopoïétique et du système immunitaire car elle permet de contrôler étroitement la taille des sous-populations cellulaires.

### **.III Effecteurs de l'apoptose**

De nombreux signaux très différents, physiologiques comme pathologiques, intra comme extracellulaires ont été identifiés comme pouvant déclencher l'apoptose. Ainsi, l'apoptose peut être induite par la carence en facteurs de croissance (NGF, IL-2...), par certains récepteurs membranaires (Fas, TNF) lorsqu'ils sont liés à leurs ligands, ou par des lésions cellulaires (radiations ionisantes, agents cytotoxiques, chocs osmotiques, hyperthermie). Ces signaux doivent alors être intégrés par la cellule qui, en fonction de son degré de différenciation et d'activation, va orienter sa réponse soit vers la mort, soit vers la survie, la prolifération ou la différenciation. Cette intégration fait appel à un certain nombre de médiateurs intracellulaires qui sont soit anti- soit pro-apoptotiques, soit les deux, selon le contexte cellulaire.

#### **.III.1 Aspects moléculaires de l'apoptose**

La mort cellulaire par apoptose résulte de l'intervention d'une machinerie spécialisée, conservée dans les espèces, et responsable de modifications morphologiques comparables, quel que soit l'agent inducteur. Ce caractère conservé a permis, par des études génétiques réalisées chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, d'identifier quatre gènes centraux impliqués dans la régulation de l'apoptose au cours du développement de ce nématode. Parmi ces gènes, *ced-4* et *ced-3* (*Caenorhabditis elegans death*) sont requis pour l'initiation et l'exécution de l'apoptose. Le gène *ced-9* agit en amont des gènes *ced-4* et *ced-3* et inhibe leurs activités proapoptotiques. Le gène *egl-1* (*egg-laying defective*) agit en amont des gènes *ced-9*, *ced-4* et *ced-3* et régule négativement l'activité de *ced-9* (Metzstein et al., 1998).

Des analyses fonctionnelles des interactions des produits de ces gènes ont permis de définir un modèle d'activation de l'apoptose chez *C. elegans*. Dans ce modèle, la protéine Ced-3 est la protéine effectrice de l'apoptose. La protéine Ced-4 interagit avec Ced-3 et permet l'activation de Ced-3 et l'initiation de l'apoptose. L'activation de Ced-3 par Ced-4 est inhibée par la protéine Ced-9 qui séquestre Ced-4 et/ou le complexe Ced-4/Ced-3 au niveau des membranes intracellulaires. Suite à un stimulus de mort cellulaire, la protéine Egl-1

interagit avec Ced-9, permettant ainsi l'activation de la protéase Ced-3 par Ced-4 dans le cytoplasme (Metzstein et al., 1998).

Les homologues des gènes *ced-3*, *ced-4*, *ced-9* et *egl-1* ont été identifiés chez les mammifères ce qui suggère que certains des mécanismes fondamentaux de la mort cellulaire programmée ont été conservés au cours de l'évolution (figure 1). La protéine Ced-3 appartient à la famille des protéases à cystéine ou caspases, dont on connaît actuellement 14 membres. Ced-9 et Egl-1 présentent des homologies avec le proto-oncogène Bcl-2 qui est le premier membre identifié d'une grande famille de protéines régulatrices de l'apoptose. Ced-4 enfin est l'homologue de Apaf-1 (*apoptosis activating factor*), et Flash / Nod-1 / Card-4 (Zou et al., 1997 ; Bertin et al., 1999 ; Imai et al., 1999 ; Inohara et al., 1999). L'activation de la caspase-9 par Apaf-1 est régulée négativement ou positivement par les différents membres de la famille des Ced-9/Egl-1/Bcl (Li et al., 1997 ; Hu et al., 1998 ; Luo et al., 1998 ; Pan et al., 1998). Si le schéma général d'activation de l'apoptose est conservé entre nématodes et mammifères, la multiplicité des gènes impliqués dans l'apoptose chez les mammifères augmente le niveau de complexité des mécanismes de régulation de la mort cellulaire programmée chez les organismes supérieurs.

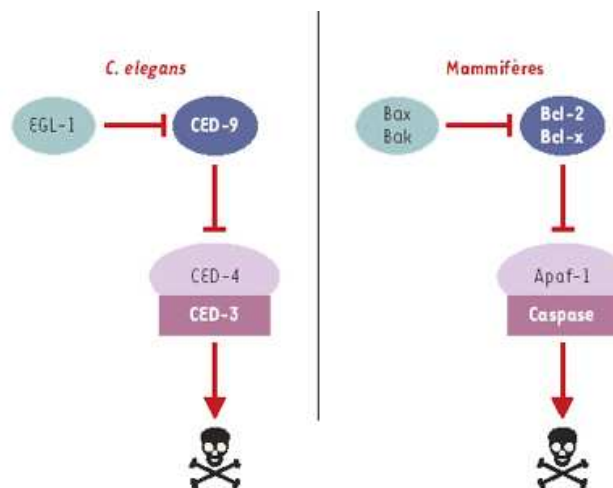


Figure 1. Gènes impliqués dans l'apoptose chez *C. Elegans* et chez les mammifères (d'après Couzinet et al., 2002).

### .III.2 Rôle mitochondrial

La mitochondrie, depuis longtemps identifiée comme l'organite indispensable à la production d'ATP, a été également impliquée dans la régulation des mécanismes moléculaires de mort cellulaire. En effet, dans une cellule engagée dans un processus de mort cellulaire (à la suite de stimuli engendrant un stress ou un dommage cellulaire, que ce soit à la suite d'un choc thermique ou osmotique, de radiations ionisantes, ou d'un sevrage en cytokines), on observe une perméabilisation des membranes mitochondriales (à l'origine de la libération de protéines pro-apoptotiques de l'espace inter-membranaire vers le cytosol) accompagnée dans la plupart des cas d'une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). Le mécanisme précis de cette perméabilisation membranaire reste encore controversé.

Les protéines mitochondriales libérées par cette perméabilisation sont maintenant regroupées sous le nom générique de SIMP (pour « soluble inter membrane mitochondrial proteins ») et possèdent toutes une activité pro-apoptotique. Une première classe de SIMP agit sur la voie classique d'apoptose dépendante des caspases. On y distingue des pro-caspases, le cytochrome c et un répresseur d'inhibiteur de caspases, la protéine Smac/DIABLO. Une fois libéré dans le cytosol, le cytochrome c interagit avec la protéine Apaf-1 et la pro-caspase 9, formant ainsi, en présence d'ATP, un complexe multiprotéique appelé apoptosome à l'origine du clivage de la pro-caspase-9, et donc de la formation de sa forme active (Zou et al., 1999). Cette dernière activera à son tour d'autres caspases exécutrices comme les caspases 3 ou 7. La protéine Smac/DIABLO, quant à elle, se lie aux protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) et les inactive.

Le facteur inducteur de l'apoptose (AIF pour « apoptosis inducing factor ») est, pour l'instant, le seul représentant d'une autre classe de SIMP : il s'agit d'une flavoprotéine qui déclenche, d'une manière indépendante des caspases, la fragmentation de la chromatine en particules de haut poids moléculaire (Susin et al., 1999).

Les membres de la famille Bcl-2 ont une importance cruciale dans la régulation des voies de signalisation de la mort cellulaire. Cette famille comprend aussi bien des protéines pro-apoptotiques (comme Bax, Bak, Bad, Bid, Bim) qu'anti-apoptotiques (comme Bcl-2 et Bcl-XL). L'alignement de leurs séquences protéiques a permis de définir quatre régions de forte conservation appelées domaines BH (pour « Bcl-2 homology ») 1 à 4. Certaines molécules pro-apoptotiques contiennent les domaines BH1, BH2 et BH3 (Bak), tandis que d'autres ne contiennent que le domaine BH3 (Bid, Bim, Bad). Le domaine BH4 est quant à lui



spécifique des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1, Diva). Ces protéines interagissent entre elles formant des homodimères ou des hétérodimères, le niveau relatif de chaque protéine dans la cellule déterminant sa sensibilité à un signal de mort (Adams et al., 1998).

Par ailleurs, une grande majorité d'entre elles contiennent une partie carboxy-terminale hydrophobe qui assure leur ancrage au niveau de la membrane externe mitochondriale, mais également des membranes externes du réticulum endoplasmique et du noyau. Les molécules anti-apoptotiques seraient localisées dans la mitochondrie tandis que les protéines pro-apoptotiques posséderaient une localisation différente (cytosol ou microtubules). À la suite d'un signal apoptotique, ces dernières s'inséreraient dans la membrane mitochondriale et induiraient sa perméabilisation (Crompton et al., 2000). Il a été proposé que cette capacité d'insertion soit liée à leur similitude de structure avec certaines toxines bactériennes, leur permettant de former des pores transmembranaires modulant ainsi la libération des SIMP (Schendel et al., 1998).

### .III.3 Rôle des caspases

#### .III.3.1 Structure des caspases

En dépit de la diversité de ces signaux, toutes les cellules engagées dans le processus apoptotique montrent des modifications morphologiques et biochimiques similaires suggérant l'existence d'une phase effectrice commune à tous les types cellulaires. Cette signalisation aboutit alors à l'activation irréversible de molécules effectrices. Parmi les principaux effecteurs contribuant à la destruction de la cellule, on distingue d'une part les protéases à cystéine, également appelées caspases (pour cysteinyl aspartate-specific proteinases) ; et d'autre part les nucléases.

La première protéase à cystéine identifiée chez les mammifères a été ICE (pour interleukin-1  $\beta$  converting enzyme) plus tard renommée caspase-1. Les cibles des caspases sont des protéines dont la dégradation aboutit soit à la perte de leur fonction, soit à l'acquisition de nouvelles activités enzymatiques.

On connaît maintenant 14 caspases différentes. L'ensemble des membres de cette famille d'endoprotéases possède un site catalytique comprenant un résidu cystéine directement impliqué dans le processus catalytique localisé dans un motif QACxG (où le résidu x est R, Q ou G). Ces enzymes reconnaissent, puis clivent des chaînes polypeptidiques au niveau d'un résidu aspartique de la partie carboxy-terminale.

Les caspases sont présentes dans le cytoplasme sous une forme inactive (zymogène). Comme elles clivent spécifiquement leurs substrats au niveau d'un résidu Asp, elles ont la capacité de s'autoactiver et/ou de s'activer mutuellement, ce qui aboutit à une activation protéolytique en cascade. Leur protéolyse provoque la dimérisation des formes zymogènes conduisant à leur clivage. Un premier clivage libère une première sous-unité (p10/p12), tandis qu'un second clivage engendrera une sous-unité de taille plus importante portant le site catalytique (p17/p20). L'enzyme ainsi formée par l'association des deux sous-unités est composée de deux hétérodimères qui comprennent chacun deux sites catalytiques actifs (Budihardjo et al., 1999) (figure 2).

### .III.3.2 Mécanisme d'action des caspases

En plus de leurs sous-unités actives, les pro-caspases possèdent un pro-domaine de longueur variable à leur extrémité NH<sub>2</sub>-terminale qui permet de les diviser en deux sous-groupes.

Les caspases à long pro-domaine, dites caspases d'amont ou initiatrices, contiennent des motifs d'interaction protéine-protéine, tels que les domaines DED (« death effector domain ») pour les caspases 8 et 10 ou CARD (« caspase recruitment domain ») pour les caspases 1, 2, 4 et 9. Ces domaines permettent leur recrutement par des protéines adaptatrices au niveau de complexes protéiques d'initiation de l'apoptose. Le recrutement des pro-caspases initiatrices au niveau de ces sites spécifiques entraîne l'oligomérisation des proenzymes et leur activation par autocatalyse (Kumar and Colussi, 1999).

Les caspases 3, 6, 7 et 14 possèdent quant à elles un pro-domaine plus court (10 à 40 résidus) et sont dites caspases d'aval. Elles ne possèdent pas de domaine leur permettant d'être recrutées et de s'oligomériser ; elles sont activées à la suite de leur clivage par une autre

caspase (à pro-domaine court ou long) ou par le granzyme B, ce qui aboutit à un fonctionnement dit en cascade. Leur activation conduit au clivage de diverses protéines substrats (Thornberry et al., 1998) à l'origine de la plupart des événements biochimiques, structuraux ou morphologiques de l'apoptose.

De nombreux substrats des caspases ont, à ce jour, été identifiés. Le premier substrat identifié est l'enzyme poly-ADP-ribose-polymérase (PARP) dont la coupure, au niveau de la séquence DEVD-G, est l'un des premiers signes détectables de l'apoptose. Le clivage protéolytique a pour conséquences, soit l'activation de protéines impliquées dans le déroulement de l'apoptose (procaspases, endonucléases, PKC-d, facteurs de transcription SREBP-1,-2), soit l'inactivation de protéines contribuant au maintien de l'intégrité cellulaire (actine, lamines nucléaires, fodrine, facteur ICAD/DFP45 ) ou à la régulation de la réparation de l'ADN (PARP, DNA-PK) ou du cycle cellulaire (RB).

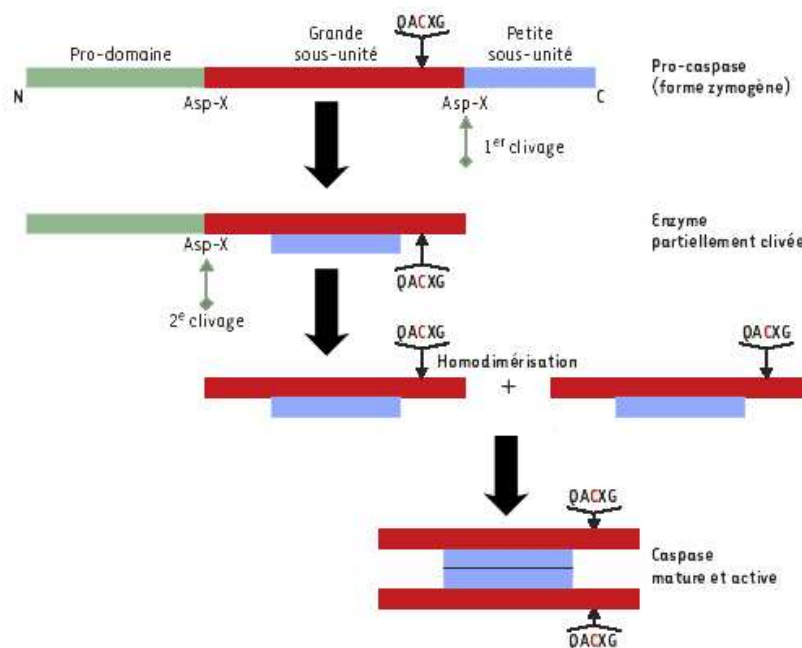


Figure 2. Activation en cascade des caspases (d'après Couzinet et al., 2002).

### .III.4 Les récepteurs de mort cellulaire

Les membres de la famille du TNF-R sont des protéines transmembranaires de type 1 possédant dans leur domaine extracellulaire de une à six régions riches en cystéines,

impliquées dans la liaison du ligand. Ils peuvent promouvoir, selon le contexte cellulaire, soit la survie, soit la mort soit les deux. Ainsi, les récepteurs CD27 (Camerini et al., 1991), CD30 (Durkop et al., 1992), CD40 (Stamenkovic et al., 1989), TNF-RII (Smith et al., 1990), Ox40 (Mallett et al., 1990), et p75 NGFR (pour « nerve growth factor receptor ») (Johnson et al., 1986) sont généralement impliqués dans la survie cellulaire. A l'inverse, CD95 (Fas/APO-1) (Itoh et al., 1991 ; Oehm et al., 1992), TNF-RI (Loetscher et al., 1990 ; Schall et al., 1990), DR3 (Chinnaiyan et al., 1996), DR4 (Chaudhary et al., 1997), DR5 (Chaudhary et al., 1997) et DR6 (Pan et al., 1998) sont généralement impliqués dans la mort cellulaire.

Certains des membres de la superfamille des récepteurs au TNF, connus sous le nom de « récepteurs de mort », possèdent dans leur portion intracellulaire une région conservée appelée le « domaine de mort » (DD), un motif protéique d'environ 80 acides aminés nécessaire à la transmission du signal de mort par ces récepteurs (Tartaglia et al., 1993 ; Chaudhary et al., 1997 ; Nagata et al., 1997). On connaît actuellement 7 de ces récepteurs: Fas (CD95/APO-1), TNFR1 (p55/CD120a), DR3, DR6, p75 NGFR, ainsi que les deux récepteurs du ligand de Apo-2 ou TRAIL (pour « TNF-related apoptosis-inducing ligand »), les molécules DR4 (TRAIL-R1) et DR5 (TRAIL-R2) (Locksley et al., 2001). La capacité d'induction de mort cellulaire relayée par le récepteur Fas est parmi toutes ces voies de signalisation la plus étudiée et décrite. Il est à noter que récemment une nouvelle nomenclature a été proposée pour classer les récepteurs et les ligands de la superfamille du TNF (figure 3).

LIGANDS		RECEPTEURS	
Ancienne	Nouvelle	Ancienne	Nouvelle
LT- $\alpha$	TNFSF1	TNF-RI	TNFRSF1A
TNF- $\alpha$	TNF (TNFSF2)	TNF-RII	TNFRSF1B
LT- $\beta$	TNFSF3	LT- $\beta$ R	TNFRSF3
OX40L	TNFSF4	OX40	TNFRSF4
CD40L	TNFSF5	CD40	TNFRSF5
FasL	TNFSF6	Fas	TNFRSF6
CD27L	TNFSF7	DeR3	TNFRSF6B
CD30L	TNFSF8	CD27	TNFRSF7
4-1BBL	TNFSF9	CD30	TNFRSF8
TRAIL	TNFSF10	4-1BB	TNFRSF9
TRANCE	TNFSF11	TRAIL-R1	TNFRSF10A
TWEAK	TNFSF12	TRAIL-R2	TNFRSF10B
APRIL	TNFSF13	TRAIL-R3	TNFRSF10C
LIGHT	TNFSF14	TRAIL-R4	TNFRSF10D
TL1	TNFSF15	RANK	TNFRSF11A
NA	TNFSF16	OPG/OCIF/ODF/FDCR-1	TNFRSF11B
NA	TNFSF17	DR3	TNFRSF12
AITR-L	TNFSF18	NA	TNFRSF13
		HVEM/HveA/LIGHTR/ TR2/ATAR	TNFRSF14
		NA	TNFRSF15
		NGFR	TNFRSF16
		BCMA	TNFRSF17
		AITR/GITR	TNFRSF18

Figure 3. Nouvelle nomenclature des récepteurs et des ligands de la superfamille du TNF (d'après Kwon et al., 1999).

De façon générale, les voies de signalisation apoptotique des récepteurs de mort de la famille du récepteur au TNF conduisent à l'activation des caspases et en sont directement dépendantes (Enari et al., 1995 ; Longthorne et Williams, 1997). Les récepteurs de mort sont activés par la fixation de leur ligand et vont recruter des protéines intracellulaires dites adaptatrices. Ces protéines vont alors à leur tour recruter les caspases initiateuses (principalement la 8 et la 10) et induire leur activation par auto-clivage. De ce fait, il semble que la voie de Fas qui est décrite dans le chapitre suivant corresponde au processus généralement observé.

Il est à noter cependant l'existence d'un autre sous-groupe de récepteurs homologues au récepteur au TNF : les decoy récepteurs (DcR). On distingue actuellement le DcR1 (Sheridan et al., 1997) et le DcR2 (Marsters et al., 1997) qui sont des récepteurs membranaires ; et le DcR3 (Pitti et al., 1998) qui est une protéine soluble sécrétée (figure 4). Ces récepteurs auraient un rôle d'inhibiteur des récepteurs de mort plutôt qu'un rôle de transduction d'un signal. En effet, les domaines extracellulaires de DcR1 et DcR2 sont tous les deux capables de fixer TRAIL et sont ainsi en compétition avec DR4 et DR5. Cependant, DcR1 ne possède pas de région cytoplasmique, et celle de DcR2, plus courte qu'un domaine de mort typique, ne permet pas la transmission d'un signal apoptotique. DcR3 présente 4 domaines riches en cystéine et est une protéine soluble qui peut se fixer à FasL avec la même affinité que Fas. De ce fait, DcR3 inhiberait, par compétition de fixation avec Fas, l'apoptose induite par FasL mais son rôle physiologique n'est pas encore clairement établi.

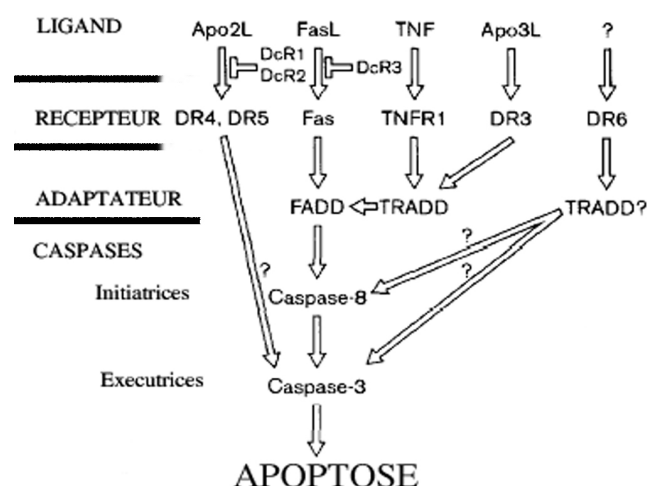


Figure 4. Voies de signalisation apoptotique des récepteurs de mort et de leurs ligands (d'après Ashkenazi et al., 1999).

### .III.5 Inhibiteurs de l'apoptose

Les virus ont développé diverses stratégies très efficaces afin d'inhiber la mort cellulaire et la libération de cytokines pro-inflammatoires par les cellules infectées dans le but d'achever son cycle de réplication et ainsi d'infecter de nouvelles cellules. À ce jour, de nombreuses molécules virales, mais aussi cellulaires animales et même végétales (Thatte et al., 2000), ont été décrites comme ayant une activité inhibitrice de l'apoptose.

#### .III.5.1 Les protéines FLIP

Les récepteurs de mort décrits précédemment vont, après leur activation, recruter des protéines adaptatrices qui vont à leur tour activer les caspases initiatrices. Cette étape de recrutement peut être régulée par une protéine appelée FLIP (pour « FLICE inhibitory protein ») (Irmeler et al., 1997). FLIP contient deux domaines effecteurs de mort cellulaire (DED) qui vont lui permettre de se lier aux pro-domaines des caspases-8 ou -10 et ainsi empêcher leur recrutement aux récepteurs de mort (notamment Fas et TNF-RI) (Bump et al., 1995). Cette famille d'inhibiteurs de caspases a été identifiée à l'origine chez le virus de l'herpès et le virus molluscipox (Bertin et al., 1997 ; Thome et al., 1997). Il existe une grande variété de transcrits de FLIP (Komiyama et al., 1994). Le transcrit le plus long (FLIP<sub>L</sub>) possède, en plus des deux DEDs, l'équivalent d'un domaine caspase inactif. La forme courte (FLIP<sub>S</sub>), pour sa part, ne présente que les deux DEDs. FLIP a été décrit comme pouvant protéger de l'apoptose (Hu et al., 1997 ; Irmeler et al., 1997 ; Srinivasula et al., 1997 ; Rasper et al., 1998) ou induire l'apoptose (Han D.K. et al., 1997 ; Inohara et al., 1997 ; Shu et al., 1997) selon la nature du transcrit et le type cellulaire considéré. Cependant, dans des conditions physiologiques, FLIP semble fonctionner comme un inhibiteur de la pro-caspase-8. Ainsi, il a été montré que la sensibilité des cellules T à l'apoptose induite par Fas était corrélée avec la diminution du taux d'ARN messager de FLIP (Thome et al., 2001 ; Lens et al., 2002).

En définitive, il apparaît que le rôle de FLIP dans la modulation de l'apoptose semble très complexe. Son effet semble dépendre de la nature du transcrit, du type cellulaire considéré, ainsi que du niveau d'expression de chacune des isoformes mais son effet généralement reconnu est celui d'inhibiteur de la caspase-8.

### .III.5.2 Protéine de la famille de Bcl-2

Comme cela a été décrit précédemment dans le rôle apoptotique de la mitochondrie, la grande famille des protéines homologues à Bcl-2 joue un rôle majeur dans la régulation de l'apoptose. Cette régulation passe principalement par la modulation de la voie apoptotique mitochondriale et des caspases associées, notamment la caspase-9. Ainsi, en empêchant la libération du cytochrome c par la mitochondrie, Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> inhibent la formation du complexe Apaf-1/cytochrome c/caspase-9 qui est nécessaire à l'apoptose.

### .III.5.3 Les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP)

Les baculovirus possèdent une autre protéine capable d'inhiber l'apoptose : IAP (pour inhibitor of apoptosis protein). Au moins 5 homologues ont été identifiés chez les mammifères. La protéine inhibitrice de l'apoptose neuronale (NAIP) est un de ces homologues et joue un rôle important dans l'atrophie musculaire spinale (Liston et al., 1996) ou son gène serait en partie délété chez les malades atteints d'atrophie musculaire spinale de type I. Les homologues cIAP-1 (Roy et al., 1997) [aussi appelé hIAP-2 (Liston et al., 1996) ; cIAP-2 (Rothe et al., 1995) [également nommé hIAP-1 (Liston et al., 1996)] et XIAP (pour IAP lié au chromosome X) (Rajcan-Separovic et al., 1996) inhibent les caspases de façon similaire mais par un processus distinct de celui de NAIP. Enfin, la survivine est largement exprimée au cours de la vie embryonnaire mais absente des tissus différenciés. Son expression va être retrouvée dans les lignées tumorales et les cancers les plus courants, ainsi que dans 50% des lymphomes de Hodgkin (Ambrosini et al., 1997).

L'effet protecteur des IAPs est dû à leur capacité à inhiber l'activation et donc l'activité de certaines caspases. Ainsi, XIAP, cIAP-1 et cIAP-2 inhibent les caspases 3, 7 et 9 mais pas les caspases 1, 6 et 8 (Deveraux et al., 1997 ; Roy et al., 1997 ; Deveraux et al., 1998). NAIP, pour sa part, est incapable d'inhiber les caspases 1, 3, 6, 7 ou 8 (Roy et al., 1997).

Les IAP, à l'exception de la survivine, sont caractérisées par 3 domaines BIRs (« baculovirus IAP repeats ») dans leur partie N-terminale et un domaine d'interaction protéine-protéine contenant un atome de zinc (RING finger) dans leur partie C-terminale. La

survivine ne contient que les domaines BIRs. Différentes études ont montré que seul BIR2 était requis pour inhiber les caspases 3 et 7 et que le domaine RING n'était pas nécessaire (Deveraux et al., 1997 ; Takahashi et al., 1998). De plus, il semble que cIAP-1 et cIAP-2 puissent se lier à TRAF-1 et 2 (TNF-R associated factors) grâce à leur motif BIR (Rothe et al., 1995 ; Roy et al., 1997). Ces travaux montrent que les IAP, tant cellulaires que viraux, exercent des effets inhibiteurs sur l'activation des caspases en aval des récepteurs de mort (Wang C.Y. et al., 1998 ; Vucic et al., 1998).

Tout dernièrement, une nouvelle protéine nommée selon les auteurs Diablo (Verhagen et al., 2000) ou Smac (Du et al., 2000) a été décrite. Cette protéine, une fois synthétisée est importée dans la mitochondrie. Au cours de l'apoptose, Diablo/Smac est libérée et se lie aux IAPs empêchant leur action protectrice et permettant ainsi aux caspases contenues dans l'apoptosome de s'activer.

#### .III.5.4 Rôle des phosphorylations

De nombreuses études ont rapporté que l'apoptose pouvait être régulée par des protéines kinases et des protéines phosphatases (Anderson, 1997 ; Downward, 1998 ; Martins et al., 1998). L'étude de Martins et al. en 1998 indique que les caspases peuvent être phosphorylées *in vivo*. De plus, un marquage métabolique de cellules au phosphate radiomarqué suivi d'un stimulus pro-apoptotique a révélé que plusieurs caspases contenaient un radioélément (Martins et al., 1998). La même étude a montré que la déphosphorylation des caspases était corrélée à une augmentation de leur capacité à cliver la PARP, impliquant la possibilité que la phosphorylation puisse inhiber le clivage de certains substrats par ces protéases. Enfin, la kinase Akt, qui joue un rôle important dans le système nerveux dans la cascade des kinases induites par les récepteurs aux neurotrophines (Yuan et al., 2000) peut phosphoryler spécifiquement la pro-caspase-9 humaine et ainsi inhiber son activation (Cardone et al., 1998).



## Deuxième partie : LE RECEPTEUR FAS

### .I Structure de la protéine Fas

Comme cela a été précédemment évoqué, Fas appartient à la superfamille des récepteurs au TNF / NGF qui est caractérisée par la présence de 2 à 5 domaines riches en cystéine situés dans la partie extracellulaire du récepteur. Dans cette famille, Fas (également appelé CD95 ou Apo1) est le mieux décrit des récepteurs de mort, qui sont également caractérisés par la présence d'un domaine DD intracellulaire crucial dans l'induction du signal pro-apoptotique.

Fas est une protéine de 335 acides aminés (a.a.) et d'un poids moléculaire variant de 45 à 52 Kda (Oehm et al., 1992) suivant les études, probablement en raison de différences de glycosylation du récepteur (Keppler et al., 1999). De plus, des formes solubles du récepteur, générées par un épissage alternatif au niveau du domaine transmembranaire, ont été décrites et contribuent à la régulation de l'apoptose induite par FasL (Cheng et al., 1994 ; Papoff et al, 1999).

#### .I.1 Partie extracellulaire

La partie extracellulaire du récepteur Fas comprend les 156 premiers a.a. de l'extrémité N-terminale. Elle est caractérisée par la présence de 3 domaines riches en cystéine (CRD pour « cystein-rich domain ») qui vont des a.a. 28 à 65 pour CRD1 ; de 65 à 112 pour CRD2 et enfin de 112 à 149 pour CRD3. Des travaux récents, réalisés à partir de récepteur Fas tronqué dans la partie extracellulaire, ont mis en évidence que les deux domaines les plus proches de la partie trans-membranaire correspondaient à la zone de fixation du ligand de Fas ou LBD (pour « ligand binding domain »). Plus récemment, le troisième domaine a été identifié comme étant la zone d'oligomérisation indépendante du ligand du récepteur, qui est

indispensable dans la transduction du signal apoptotique de Fas (Papoff et al., 1999). Cette oligomérisation indépendante du ligand est liée à la présence d'un domaine d'auto-association indépendante du ligand ou « PLAD » (pour « pre-ligand association domain ») qui va des a.a. 1 jusqu'à 65 du récepteur Fas (Siegel et al., 2000) (figure 5).

## I.2 Partie intra-cellulaire

La partie intra-cellulaire de Fas ne contient aucune séquence consensus qui pourrait prédire la présence d'une activité enzymatique (Sartorius et al., 2001). Les 15 a.a. de la partie C-terminale de Fas servent de zone d'interaction avec la protéine tyrosine phosphatase FAP-1 (pour « Fas-associated phosphatase »), et leur délétion entraîne une augmentation de l'apoptose transmise par Fas (Sato et al., 1995). Tartaglia et al. ont défini en 1993 par délétion et mutagenèse dirigée une région de 80 a.a. au niveau du TNF-R1 indispensable à la transmission du signal de mort cellulaire. Itoh et al. (1993) ont montré qu'une zone de 68 a.a. hautement conservée entre Fas et le TNF-R1 correspond au domaine de mort de Fas (figure 5). Ce domaine comprend notamment le résidu Valine 238 dont la mutation chez les souris *lpr<sup>sg</sup>* abolit le signal apoptotique.

De plus, un site de phosphorylation a été mis en évidence en dehors du DD, au niveau de la zone proximale avec la membrane plasmique (Kennedy et al., 1998).

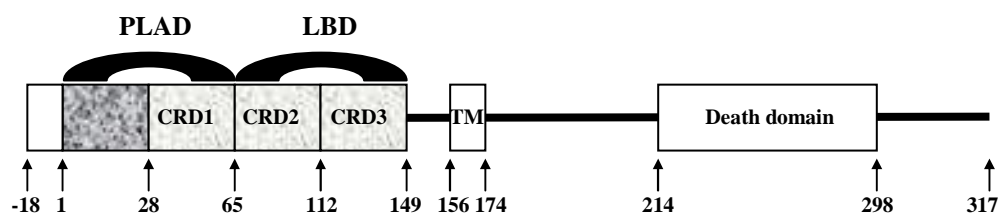


Figure 5. Domaines protéiques du récepteur Fas.

## **.II Voies de l'apoptose induite par Fas**

### **.II.1 Initiation du signal**

Jusqu'à présent, il avait été supposé que le ligand de Fas sous forme homotrimérique (composé de trois monomères identiques) ou un anticorps anti-Fas agoniste engageaient trois monomères de Fas, conduisant ainsi à l'assemblage d'un récepteur trimérique et à l'agrégation des domaines de mort sous la membrane (Orlinick et al., 1997).

Des travaux récents ont mis en évidence que non seulement Fas possédait la capacité de s'assembler en trimères indépendamment de l'engagement de son ligand, mais que ce pré-assemblage des monomères en trimères était un prérequis à la liaison de FasL et donc à la transmission du signal de mort (Papoff et al., 1999 ; Siegel et al., 2000). La région nécessaire à cette trimérisation de Fas appelée PLAD est constituée des 49 premiers acides aminés de la région amino-terminale de la portion extracellulaire de Fas et est donc distincte du domaine de liaison à Fas-L. Ainsi, indépendamment de la présence d'un ligand, des trimères et des monomères de Fas co-existent dans la membrane plasmique.

### **.II.2 Transduction du signal**

#### **.II.2.1 Voies apoptotiques**

##### **.II.2.1.1 Formation du complexe de signalisation de mort induite (DISC)**

Comme Fas ne contient aucune activité enzymatique propre, le signal de mort doit être transmis par l'intermédiaire de protéines qui s'associent au récepteur après sa stimulation. La transmission du signal apoptotique de Fas passe par la formation d'un complexe multiprotéique formé par l'agrégation des récepteurs Fas, la protéine FADD ( pour « Fas-associated death domain ») et la caspase-8. Ce complexe est nommé « complexe de signalisation de la mort induite » ou DISC (pour death inducing signaling complex).

En 1995, Kischkel et al. ont identifié la protéine nommée FADD qui se fixe à Fas après stimulation par son ligand ou un anticorps agoniste. FADD possède un domaine de mort homologue à celui de Fas qui permet son association avec celui-ci (Boldin et al., 1995 ;

Chinnaiyan et al., 1995). A son autre extrémité (N-terminale), FADD possède un domaine effecteur de mort ou DED (pour « death effector domain ») qui est indispensable au recrutement et à l'activation de la caspase-8 et, de ce fait, une protéine FADD possédant son domaine DD mais tronquée dans son domaine DED ne peut induire l'activation de l'apoptose (Chinnaiyan et al., 1996).

Les travaux de Muzio et al. (1996) ont montré la présence des formes zymogènes et activées de la caspase-8 dans le DISC, reliant ainsi directement le récepteur Fas à la cascade des caspases. Après activation du récepteur Fas, FADD et la pro-caspase-8 sont recrutés et la formation d'oligomères de pro-caspase-8 suffit à activer son auto-protéolyse qui libère ainsi la sous-unité catalytique de la caspase-8 dans le cytoplasme (Martin et al., 1998 ; Salvesen et al., 1999).

La caspase-8 va alors activer par clivage la caspase-3 qui va initier une cascade de caspases effectrices qui vont conduire de façon inéluctable à la mort apoptotique de la cellule (Slee et al., 1999). Il est à noter que la caspase-8 est essentielle à la mort cellulaire induite par Fas (Varfolomeev et al., 1998).

Les travaux récents de Algeciras-Schimmich et al. (2002) ont permis de mieux définir l'ordre de la signalisation initiale de la voie de Fas. Ainsi, il a été montré que la fixation de FasL induit la formation de microagrégats de Fas. Ceci permet alors la formation du DISC selon un processus faisant intervenir les filaments d'actine et l'activation de la caspase-8 mais avec trop peu d'efficacité pour la transduction d'un signal apoptotique. Cependant, la formation de caspase-8 activée permet la formation à la surface cellulaire de larges regroupements membranaires de protéines Fas. Il est à noter que ce regroupement du récepteur fait également intervenir la voie des sphingomyélinases sur laquelle nous reviendrons ultérieurement (Gulbins et al., 2002). Ces regroupements membranaires de récepteurs Fas vont permettre d'augmenter le signal transmis et l'activation de la caspase-8 pour induire le signal apoptotique. Le complexe Fas / FasL serait alors internalisé, grâce à la formation de vésicules d'endocytose par un processus encore mal défini (figure 6).

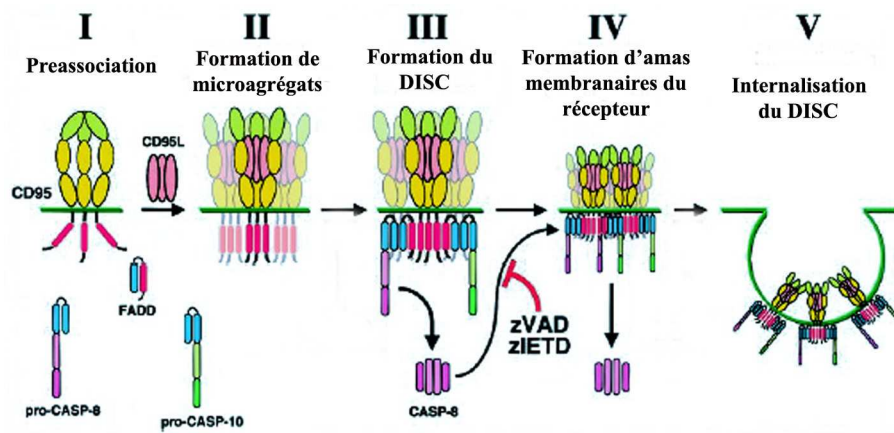


Figure 6. Modélisation du signal initial de l'activation de la voie Fas (d'après Algeciras-Schimmich et al., 2002).

#### .II.2.1.2 Rôle de la voie mitochondriale : cellules de type I et de type II

L'importance de la voie mitochondriale a été récemment démontrée dans la mort induite par Fas au moins dans certaines cellules (Fulda et al., 1998). En fait, selon l'utilisation de l'une de ces voies apoptotiques en aval de Fas, deux types de cellules ont pu être définies (Scaffidi et al., 1998) (figure 7).

Les cellules de type I seraient indépendantes d'une activité apoptotique des mitochondries et utiliseraient uniquement une activité directe des caspases telle que décrite précédemment.

Les cellules de type II seraient dépendantes de l'activation de la voie apoptotique mitochondriale. Mis à part la quantité de pro-caspase-8 recrutées et clivées au niveau du DISC (faible dans les cellules de type II et importante dans les cellules de type I), aucune différence moléculaire n'a permis à ce jour d'expliquer cette différence d'activation entre les deux types de cellules.

Un membre de la famille de Bcl-2, la molécule Bid (Luo et al., 1998), constitue un des liens entre la voie du récepteur Fas et la voie mitochondriale (Li et al., 1998). Un fragment de la protéine Bid, issu du clivage par la caspase 8, est transféré du cytoplasme à la mitochondrie. En effet, Bid, en se liant à Bax, un autre membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2 présent sous forme monomérique dans le cytosol, induit l'oligomérisation de ce dernier

et son intégration dans la membrane externe mitochondriale, entraînant l'ouverture de mégapores mitochondriaux à l'origine de la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial et de la libération du cytochrome c (Eskes et al., 2000). Une autre protéine faisant la jonction entre les deux voies a été identifiée. Il s'agit de la protéine régulatrice BAR pour « bifunctional apoptosis regulator » (Zhang et al., 2000), qui possède la capacité de s'associer à la fois aux molécules anti-apoptotiques Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub> (*via* un domaine d'interaction protéine-protéine SAM pour « sterile-alpha motif ») et à la caspase-8 (*via* un domaine DED-like).

De ce fait, le rôle inhibiteur de Bcl-2 dans la mort induite par Fas dépend directement de l'identification des cellules de type I ou de type II. En effet, Bcl-2 ne jouerait aucun rôle dans la mort provoquée par Fas dans les cellules au sein desquelles une activation directe des caspases est suffisante (type I). En revanche, dans des cellules pour lesquelles une amplification du signal d'activation *via* la voie mitochondriale (type II) est nécessaire, la mort induite par Fas serait modulée par des protéines de la famille Bcl-2.

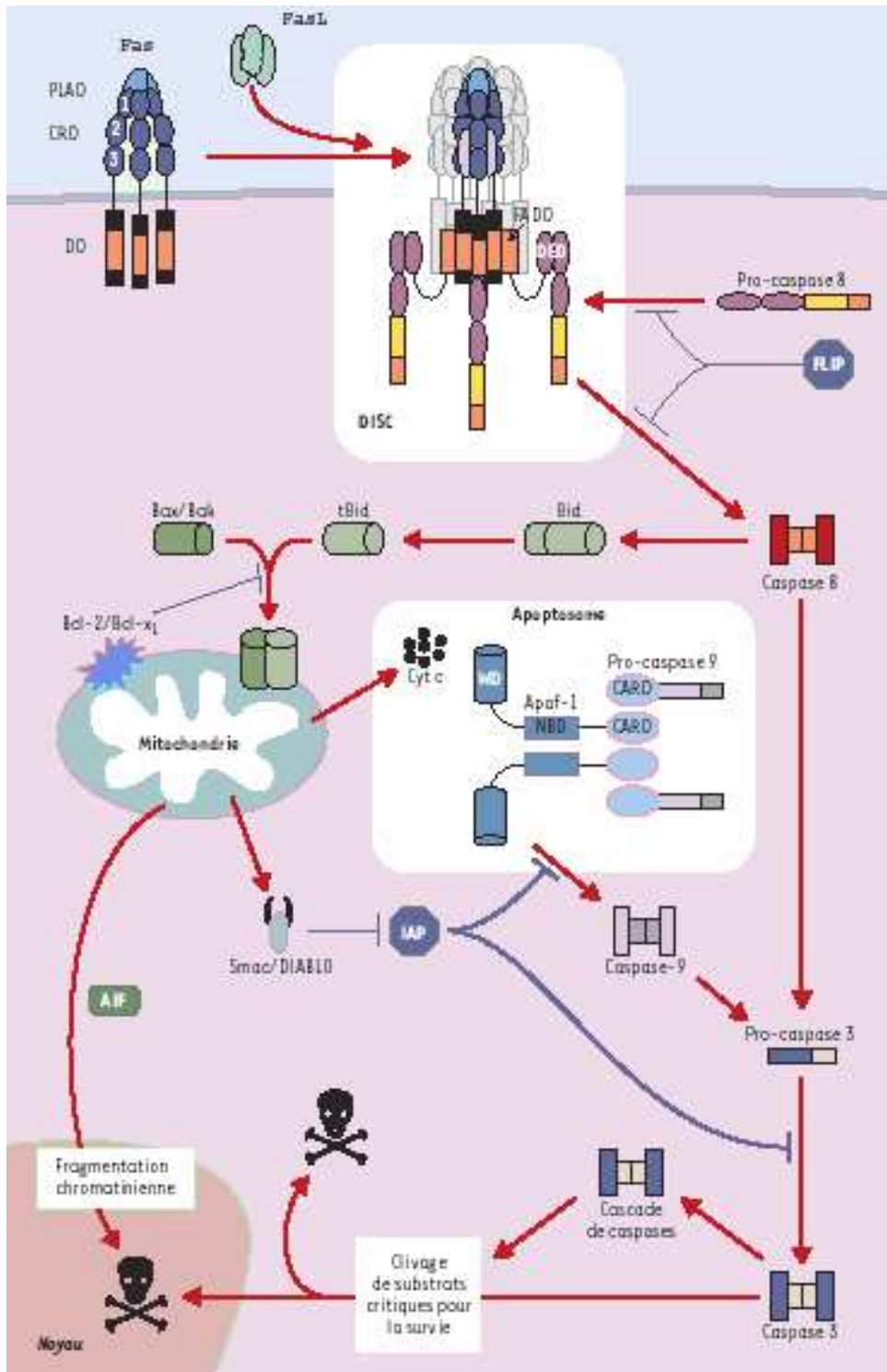


Figure 7. Voies d'activation de Fas dans les cellules de type I ou de type II (d'après Couzinet et al., 2002).

## .II.2.2 Voie proliférative

Paradoxalement, il a aussi été montré que l'activation du récepteur Fas déclenche la prolifération de cellules T stimulées par leur TCR et des thymocytes humains purifiés (Alderson et al., 1993). De plus, la seule stimulation de Fas est suffisante pour induire significativement la prolifération de fibroblastes humains de peau (Freiberg et al., 1997 ; Jelaska et al., 1998). De même, FasL peut induire l'activation de ERK1/2, un activateur moléculaire de prolifération, sur des fibroblastes en privation de sérum (Ahn et al., 2001). Néanmoins, selon les conditions utilisées, l'activation de Fas peut aussi induire l'apoptose des fibroblastes (Freiberg et al., 1997 ; Jelaska et al., 1998). Les voies de signalisation qui conduisent de la stimulation de Fas à la prolifération des fibroblastes sont actuellement complètement inconnues.

Cependant, la prolifération des cellules T humaines purifiées activées par la co-stimulation de Fas semble impliquer l'activation de caspases sans induire l'apoptose (Miossec et al., 1997 ; Wilhelm et al., 1998 ; Alam et al., 1999 ; Kennedy et al., 1999). L'activation de caspases dans des cellules T polyclonales stimulées a été fonctionnellement reliée à la prolifération induite par le TCR car celle-ci est bloquée en présence d'inhibiteurs à large spectre des caspases (Kennedy et al., 1999 ; Alam et al., 1999). La stimulation du TCR, entre autres conséquences, induit l'augmentation de l'expression de FasL (Nagata et al., 1995). Ceci et le rôle de co-stimulation de FasL dans l'activation des cellules T suggèrent la possibilité d'une boucle autocrine d'activation de FasL et de Fas, médiée par le TCR, qui déclenche une voie de signalisation non-apoptotique, caspase-dépendante, et indispensable à la prolifération des cellules T (Kennedy et al., 1999).

De plus, le Fas-Fc (un antagoniste de Fas) bloque la prolifération des cellules T stimulées par des quantités suboptimales d'anticorps d'anti-TCR bien que ceci ne soit pas observé avec de fortes concentrations d'anticorps anti-TCR, suggérant que d'autres récepteurs de mort tels que TRAIL-R1, TRAIL-R2, DR3 ou DR6 peuvent se substituer à la voie de Fas (Kennedy et al., 1999). Ceci pourrait également expliquer pourquoi ce défaut de prolifération des cellules T n'affecte pas les souris *lpr* (déficientes en Fas) (Watanabe-Fukunaga et al., 1992) et *gld* (déficientes en FasL) (Ramsdell et al., 1994).



Alors que l'activation des caspases après la stimulation du TCR a été clairement établie (Kennedy et al., 1999 ; Alam et al., 1999), des données différentes ont été rapportées concernant les caspases impliquées et leurs substrats. Kennedy et al. (1999) ont montré l'activation de la caspase-8, mais n'ont pas détecté le clivage de la caspase-3 et de son substrat, la PARP. Par opposition, Alam et al. (1999) ont montré l'activation des caspases-3, -6, -7 et -8 de même que le clivage sélectif de quelques substrats de la caspase-3 tels que la PARP. Cependant, l'ensemble de ces travaux montre que la prolifération des cellules T induite par la voie de Fas est initiée par la caspase-8, qui s'autoactive après avoir été recrutée par FADD.

## .II.3 Régulateurs de la transduction du signal de Fas

### .II.3.1 Fas et NF $\kappa$ B

La voie de signalisation du facteur nucléaire NF $\kappa$ B peut être activée par une grande variété de stimuli tels que les cytokines, les ultra-violets, et les produits bactériens ou viraux pour finalement activer les facteurs de transcription appartenant à la famille de protéine NF $\kappa$ B/Rel (Silverman et al., 2001 ; Ghosh et al., 2002 ; Karin et al., 2002).

Il a été montré que l'activation de NF $\kappa$ B et l'induction de l'apoptose, en particulier par les récepteurs de mort, sont liées par des boucles de rétro-contrôle inhibitrices. De ce fait, la voie de signalisation NF $\kappa$ B régule négativement l'apoptose induite par les récepteurs de mort en augmentant l'expression de protéines anti-apoptotiques. De plus, l'apoptose interfère avec l'activation de NF $\kappa$ B par l'intermédiaire des caspases qui clivent plusieurs composants de la voie de signalisation de NF $\kappa$ B (Wajant H et al, 2003). Ainsi, l'inhibition de l'apoptose augmente fortement l'activation de NF $\kappa$ B par la voie de Fas (Mandal et al., 1996 ; Wajant et al., 2000). Bien que les mécanismes exacts d'activation de NF $\kappa$ B par Fas demeurent mal connus, il semble qu'ils fassent intervenir la protéine FADD et la caspase-8 (Hu et al., 2000). Bien que cette voie soit masquée par la voie apoptotique de Fas, elle peut être observée lorsque cette dernière est bloquée. Ainsi, l'activation de NF $\kappa$ B augmente l'expression de la protéine FLIP (Kreuz et al., 2001) qui, en empêchant l'activation de la caspase-8 par FADD, est un puissant inhibiteur de la voie apoptotique de Fas. De plus, FLIP va également

augmenter l'activation de NF $\kappa$ B (Kataoka et al., 2000) formant ainsi une boucle d'autoactivation.

### .II.3.2 Fas et les protéines kinases activées par la mitose

Les cascades de protéines kinases activées par la mitose (MAPK) sont formées par 3 cascades fonctionnellement distinctes : les kinases régulées par des voies extracellulaires (ERK), la voie de la kinase p38 et la voie de la kinase terminale cJun (JNK). La voie de JNK peut être activée par divers signaux tels que les facteurs de croissance, les cytokines, l'osmolarité ou les ultra-violets. Elle va ensuite activer par phosphorylation des facteurs de transcription (tels que cJun, ATF2). La voie de signalisation de JNK a été impliquée dans la prolifération, la différenciation et dans l'induction, mais aussi la prévention de l'apoptose (Pinkoski et al., 1999 ; Davis et al., 2000 ; Shaulian et al., 2002).

La protéine Daxx (Yang et al., 1997), bien que dépourvue de DD, est capable de s'associer à celui de Fas mais dans une région distincte de celle de FADD. *In vitro*, Daxx potentialise l'apoptose induite par Fas, mais ne permet pas de compenser l'absence de FADD dans des lignées cellulaires dépourvues de cette dernière. La voie passant par Daxx fait intervenir la kinase ASK-1 (pour « apoptosis signal-regulating kinase-1 ») et active la cascade des kinases JNK et SAPK qui participent à la régulation de la prolifération cellulaire (Chang et al., 1998).

Dans le contexte de l'activation de la voie Fas, la voie des JNK a particulièrement été étudiée pour son effet pro-apoptotique. L'activation des JNK par la voie de Fas est régulièrement associée à l'apoptose. Cette activation des JNK par la voie de Fas est probablement transmise par les caspases (Cardone et al., 1997 ; Deak et al., 1998 ; Widmann et al., 1997 et 1998). De plus, plusieurs études ont montré que l'inhibition des caspases bloque non seulement l'apoptose, mais également l'activation des JNK (Lenczowski et al., 1997 ; Deak et al., 1998 ; Low et al., 1999 ; Sabapathy et al., 1999. Wilson et al., 1999 ; Rochat-Steiner et al, 2000). Cependant, dans la plupart des cas, l'inhibition des JNK n'a aucun effet ou seulement un effet modéré sur l'apoptose induite par Fas et l'activation des JNK n'est pas une étape obligatoire dans la mort de la cellule par la voie de Fas.

### .II.3.3 Fas et Protéine Kinase C

Plusieurs études ont montré que l'activation de la protéine kinase C (PKC) peut réprimer l'apoptose cellulaire, et notamment l'apoptose induite par la voie de Fas (Gomez-Angelats et al., 2000; Herrant et al., 2002, Busuttil et al., 2002). Ainsi, Ruiz-Ruiz et al. (1997) ont montré dans la lignée lymphocytaire T Jurkat que l'activation de la PKC diminue dès les premiers stades de l'apoptose induite par la voie Fas par deux mécanismes distincts. L'un utilise la voie des MAPK et l'autre, majoritaire, est un mécanisme MAPK-indépendant (Ruiz-Ruiz et al., 1999). De plus, Gomez-Angelats (2001) a montré que la PKC module la voie de Fas en amont du recrutement de FADD et de la caspase-8 en modifiant l'efficacité de la formation du DISC.

### .II.3.4 Sphingomyélinases, céramides, et regroupements membranaires du récepteur Fas

Bien que la stimulation de l'apoptose induite par Fas soit essentiellement dépendante de l'interaction avec FADD, d'autres voies potentielles d'induction ont été décrites. Il a été notamment montré que l'activation de Fas entraîne celle des sphingomyélinases acides et neutres permettant ainsi la libération de céramides (Hetz et al., 2002). Cependant, chez les souris déficientes en sphingomyélinase acide (Santana et al., 1996) comme chez les patients atteints du syndrome de Niemann-Pick (présentant un déficit de cette enzyme) (Cock et al., 1998), la voie Fas n'est pas affectée. De ce fait, bien que le rôle exact des céramides dans la voie de Fas ne soit pas encore clairement déterminé, ils ne semblent pas directement impliqués dans l'apoptose induite par Fas (Hsu et al., 1998).

Des travaux plus récents ont cependant mis en évidence le rôle crucial des céramides dans le regroupement membranaire et la polarisation des récepteurs Fas à la membrane cellulaire. En effet, les céramides libérés par l'activation de Fas forment au niveau des microdomaines présents dans la membrane de larges domaines enrichis en céramides (Gulbins et al., 2002). Ces domaines servent de support pour le regroupement membranaire et la polarisation des molécules de récepteur Fas (Gulbins et al., 2003). Cette polarisation des

regroupements membranaires est indispensable pour la transmission optimale du signal apoptotique par la voie de Fas (Cremesti et al., 2001 ; Scheel-Toellner et al., 2002).

### **.III Rôle physiologique et pathologique**

Le récepteur de mort Fas a été identifié à l'origine comme un antigène présent à la surface cellulaire des lymphocytes B et de fibroblastes humains (Trauth et al., 1989 ; Yonehara et al., 1989). Il a depuis été montré que Fas est exprimé physiologiquement de façon constitutive dans un grand nombre de cellules tels les lymphocytes B et T activés, les hépatocytes, les cellules épithéliales du colon (Strater et al., 2000) et de l'endomètre utérin (Tanaka et al., 1999), les cellules musculaires cardiaques (Aoyama et al., 2002), ou encore les cellules endothéliales (Lidington et al., 1999). Cependant, une inactivation de la protéine Fas chez l'homme n'a de conséquence directe que sur le système immunitaire (Le Deist et al., 1996).

#### **.III.1 Rôle dans le système immunitaire**

##### **.III.1.1 Régulation des populations lymphocytaires**

Les interactions de Fas et de son ligand contrôlent la survie périphérique des lymphocytes et participent ainsi fortement au maintien de la tolérance immunitaire aux autoantigènes (Green et al., 1994. Ju et al., 1995). Le rôle du récepteur Fas dans l'élimination périphérique des lymphocytes autoréactifs a été largement mis en évidence par l'étude des souris dont le gène Fas est invalidé *lpr* et *lpr<sup>es</sup>* (Watanabe-Fukunaga et al., 1992). En effet, on observe chez ces souris différents désordres auto-immuns liés à une prolifération lymphocytaire anormale, avec notamment une prolifération anarchique des lymphocytes T et leur accumulation dans la rate et les ganglions lymphatiques (hyperplasie). De plus, l'absence de délétion des lymphocytes B autoréactifs conduit à des anomalies auto-immunes liées à des autoanticorps similaires à ceux qui sont observés au cours du lupus érythémateux systémique humain. Chez l'homme, différentes mutations de Fas ont été mises en évidence, associées à un syndrome immunoprolifératif auto-immun et, plus rarement, à une lymphadénopathie

massive (Fisher et al., 1995 ; Rieux-Laucat et al., 1995). De ce fait, ces études ont mis en évidence la présence d'autoanticorps dans le sérum de certains patients, (Fisher et al., 1995) montrant que la prolongation de la survie périphérique des lymphocytes B et T, consécutive à un défaut de régulation par la voie Fas, peut inhiber la sélection négative des cellules auto-immunes et l'élimination des cellules B autoréactives (Rathmell et al, 1994). De ce fait, le récepteur Fas joue un rôle capital dans la régulation des populations lymphocytaires B et T, non seulement en éliminant les lymphocytes périphériques autoréactifs, mais également en induisant l'apoptose des lymphocytes activés après leur prolifération en réponse à un antigène (Krammer P. H., 2000).

### .III.1.2 Elimination des cellules pathogènes

Outre son rôle dans la régulation des lymphocytes, le récepteur Fas joue un rôle capital dans l'élimination des cellules tumorales ou infectées par un virus par les cellules T activées cytotoxiques qui expriment à leur surface le ligand de Fas. Celles-ci vont ainsi induire le suicide des cellules infectées ou en voie de tumorigénèse qui expriment physiologiquement le récepteur Fas (figure 8). Néanmoins, des mécanismes d'échappement à cette induction d'apoptose par le système immunitaire ont été décrits dans un grand nombre de cellules tumorales et correspondent à l'inhibition de l'expression de Fas à leur membrane (Muschen et al., 2000) ou au contraire à une expression de FasL (Whiteside et al., 2002) qui déclenche l'apoptose des lymphocytes activés spécifiques exprimant Fas. D'autres cellules, tumorales ou infectées par un virus, échappent à ce suicide induit par le système immunitaire en développant des mécanismes de résistance à l'apoptose induite par la voie de Fas tels que la sur-expression de FLIP, de Bcl2 ou de « decoy receptor » (Whiteside et al., 2002).

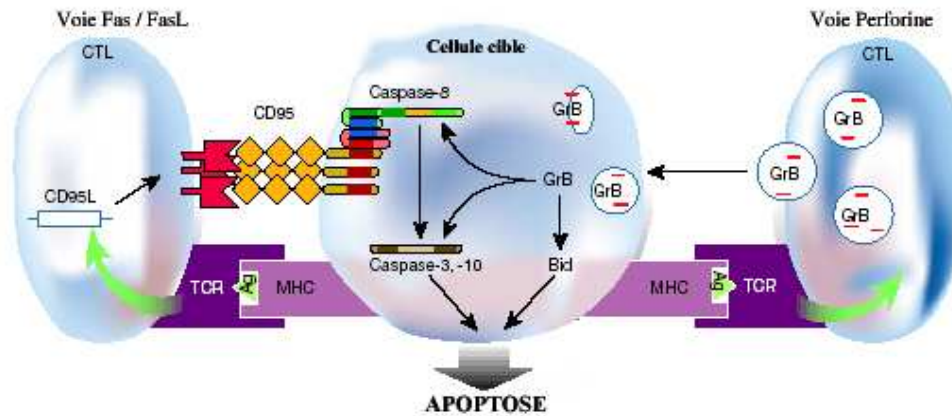


Figure 8. Elimination des cellules pathogènes par les lymphocytes T CD8+.

### .III.2 Système nerveux

L'apoptose est aussi un mécanisme important qui intervient de façon physiologique au cours de la formation du système nerveux embryonnaire, en éliminant les neurones surnuméraires qui n'établissent pas de connexions synaptiques fonctionnelles (Oppenheim et al., 2000). Chez l'adulte, une augmentation de l'apoptose neuronale a été impliquée dans un certain nombre de maladies neurodégénératives, telles que la sclérose latérale amyotrophique, la maladie d'Alzheimer ou lors des accidents vasculaires cérébraux ischémiques (Honig et al., 2000).

#### .III.2.1 Fas et neurones

Bien que la voie du récepteur Fas soit la principale voie d'apoptose décrite dans de nombreux systèmes, l'expression de Fas par les neurones est très peu documentée. Dans des conditions normales, il a été montré que Fas est exprimé transitoirement par des neuroblastes dans le cortex de rat et, de façon plus importante, à des stades plus différenciés dans des cultures primaires murines (Cheema et al., 1999). Dans des études réalisées *ex vivo*, l'expression neuronale de Fas a aussi été détectée par des méthodes immunohistochimiques dans le cerveau de souris juvéniles normales, sans précision cependant sur la population de neurone impliquée (Park et al., 1998). En 1999, Raoul et al. ont montré que les motoneurones embryonnaires de rat coexpriment Fas et FasL et rentrent rapidement en apoptose par la voie

de Fas quand ils sont cultivés en absence de facteur trophique. L'expression de Fas a également été détectée dans les neurones de rats au cours de l'ischémie expérimentale (Sakurai et al., 1998). Toutefois, dans une étude avec des cultures de cellules issues de cerveaux de fœtus humains à 12-16 semaines de gestation (Becher et al., 1998), Fas n'a pas été détecté. Enfin, l'expression de Fas par des neurones humains a été montrée dans des conditions pathologiques, comme la maladie d'Alzheimer (De la Monte et al., 1997), ou après exposition à l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) (Rensing-Ehl et al., 1996). En outre, des travaux récents suggèrent que les fonctions non-apoptotiques de Fas joueraient un rôle important dans le système nerveux. En effet, les souris *lpr* présentent une atrophie progressive des neurites des neurones du SNC (Sakic et al., 1998). Plus récemment, Desbarat et al. (2003) ont mis en évidence dans la lignée neuroblastique humaine SH-SY5Y et dans des cultures primaires de neurones sensitifs humains que Fas induisait la croissance neuritique, par une voie indépendante de la caspase-8, liée à l'activation des ERK.

### .III.2.2 Fas et cellules gliales

Au niveau des cellules gliales, des études réalisées chez la souris ont montré une expression constitutive de Fas par les astrocytes cultivés et la microglie isolée du cerveau néonatal (Lee et al., 2000) mais chez l'homme, l'expression de Fas par les cellules gliales est controversée. Dans l'étude de Choi et al. (1999) avec des cultures primaires de cellules gliales de fœtus humain ou de cerveau adulte, l'expression constitutive de Fas est limitée aux astrocytes, et peut être augmentée par l'interleukine-1, l'interleukine-6, l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$ . Cependant, dans une autre étude, Fas a été détecté seulement au niveau des oligodendrocytes dans le cerveau adulte (D'Souza et al., 1996), et était également inductible en présence d'IFN- $\gamma$  (Pouly et al., 2000). Dans une autre étude réalisée avec des cultures primaires de système nerveux central de fœtus humains (12-16 semaine de gestation), l'expression de Fas a été détectée uniquement au niveau des astrocytes (Becher et al., 1998).

# **Troisième partie : LE SYSTEME NERVEUX**

## **CENTRAL MOTEUR**

### **.I Développement embryonnaire**

Le système nerveux (SN) embryonnaire apparaît très tôt au cours du développement, dès le 18ème jour embryonnaire chez l'homme (E18). Préalablement au développement du SN, l'embryon se compose de trois couches de cellules concentriques également appelées feuillettes: l'ectoderme qui donnera l'épiderme et le système nerveux, le mésoderme qui donnera les muscles, le squelette et les tissus conjonctifs, et l'endoderme qui donnera la couche interne des viscères. Ce stade de développement s'appelle l'embryon à 3 feuillettes. Le tissu nerveux apparaît à la suite d'envoi de signaux du mésoderme vers l'ectoderme. Ce phénomène, appelé l'induction neurale, se traduit par la transformation d'une partie de l'ectoderme en tissu nerveux primitif : la plaque neurale ou neurectoderme. La période pendant laquelle se forme et s'organise le neurectoderme sur la face dorsale de l'embryon correspond à la neurulation.

#### **.I.1 La transformation du neurectoderme**

Le neurectoderme va ensuite évoluer à travers 4 étapes pour former les ébauches des systèmes nerveux périphériques et centraux. Cette évolution se fait dans le sens antéro-postérieur. La différenciation du tissu nerveux primitif est précoce au niveau de la tête (partie rostrale) et plus tardive vers le bassin (partie caudale). Lors de sa formation, le neurectoderme s'épaissit par rapport au reste de l'ectoderme pour former la plaque neurale (E18) qui est marquée en son centre par un sillon neural qui suit l'axe longitudinal de l'embryon. La plaque neurale se creuse, s'invagine de manière à former la gouttière neurale. Les bords de la gouttière, les bourrelets neuraux, prolifèrent et donnent les crêtes neurales (E 20). Les



bourrelets neuraux se rejoignent fermant ainsi la gouttière neurale, les crêtes neurales se séparent ensuite de l'ancienne gouttière et forment des filets continus au-dessus du tube neural primaire né de la fermeture de la gouttière. A ce moment là, le tissu nerveux est situé à l'intérieur de l'embryon, recouvert par l'ectoderme (E 21). Une fois complètement fermé, le tube neural grossit et délimite en son centre une cavité qui donnera les cavités encéphaliques et le canal de l'épendyme. La partie centrale du tube donnera la substance grise (contenant le corps cellulaires des neurones) et la partie externe de la paroi donnera la substance blanche (essentiellement les fibres nerveuses avec leurs cellules gliales). Les crêtes neurales migrent pour former les divers éléments du système nerveux périphérique, comportant les nerfs et les ganglions rachidiens ainsi que les ganglions du système nerveux autonome et des paraneurones. Dans la partie céphalique, certaines crêtes neurales constituent du mesectoderme qui formera une grande partie du squelette et du conjonctif de la face du crane et du cou.

## .I.2 Précurseurs neuronaux et gliaux

Le neurectoderme présente 2 types de cellules :

- les neuroblastes, qui sont des neurones embryonnaires immatures qui peuvent encore se diviser contrairement aux neurones matures qui ne peuvent entrer en mitose. Cependant, des précurseurs neuronaux subsistent chez les mammifères adultes dans le SNC, au niveau de la couche sous-grulaire du gyrus dentelé dans l'hippocampe (Alvarez-Buylla et al., 2002 ; Kemperman et al., 2002) et la zone sous-ventriculaire des ventricules latéraux (Morshead et al., 1994).
- les précurseurs gliaux, qui donneront naissance aux astrocytes, oligodendrocytes, cellules microgliales, cellules choroïdiennes et cellules épendymaires dans le système nerveux central, et aux cellules gliales et cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique. Il est à noter que les cellules gliales jouent un rôle essentiel dans la différenciation (Lemke et al., 2001) et la survie des neurones (Bär et al., 2000).

## .I.3 Différenciation du tube neural

### .I.3.1 La moelle épinière

Le tube neural est le futur système nerveux central. La partie postérieure du tube (ou tube neural médullaire) formera la moelle épinière contenant le canal de l'épendyme issu de la cavité du tube neural. La paroi du tube neural médullaire qui donne la moelle se subdivise en substance blanche à la périphérie et en substance grise au centre. D'un point de vue fonctionnel, la moelle épinière sert d'interface entre le système nerveux périphérique et le cerveau, elle assure la conduction des influx entre ces deux structures et est aussi le centre d'activités nerveuses indépendantes, les réflexes.

### .I.3.2 Le cerveau

Il est constitué à partir de la zone antérieure du tube neural (tube neural encéphalique) et apparaît pendant la période E28-E30. Cette structure va se développer considérablement pour former le cerveau embryonnaire à 3 vésicules puis, vers E 39, le stade à 5 vésicules. Ces 5 vésicules délimitent le système cavitaire cérébral qui se compose (selon l'axe rostro-caudal) des 2 ventricules hémisphériques dans le télencéphale, du 3ème ventricule dans le diencéphale, de l'aqueduc de Sylvius dans le mésencéphale et du 4ème ventricule délimité, à la fois, par le mésencéphale, le myélocéphale, et le cervelet.

## .I.4 Maturation du cerveau

Le télencéphale se développe énormément en se repliant sur l'arrière et finit par recouvrir complètement le diencéphale. La différenciation du télencéphale conduit à la formation du cortex cérébral, du système limbique (les amygdales, le septum, le bulbe olfactif et l'hippocampe) et le striatum (noyaux caudés et putamen).

Le cortex continue à se développer en se plissant pour former des circonvolutions, de manière à augmenter sa surface, et se divise en 2 hémisphères cérébraux composés chacun de 4 lobes. Le lobe frontal est impliqué dans les processus cognitifs de prévision, décision et d'action préméditée (cortex préfrontal), dans la vision, le langage et la motricité (cortex prémoteur) (figure 9). Le lobe temporal est impliqué dans l'intégration de l'audition, la mémoire, l'olfaction et le langage. Le lobe pariétal centralise les informations sensibles. Et enfin le lobe occipital est spécialisé dans la vision.

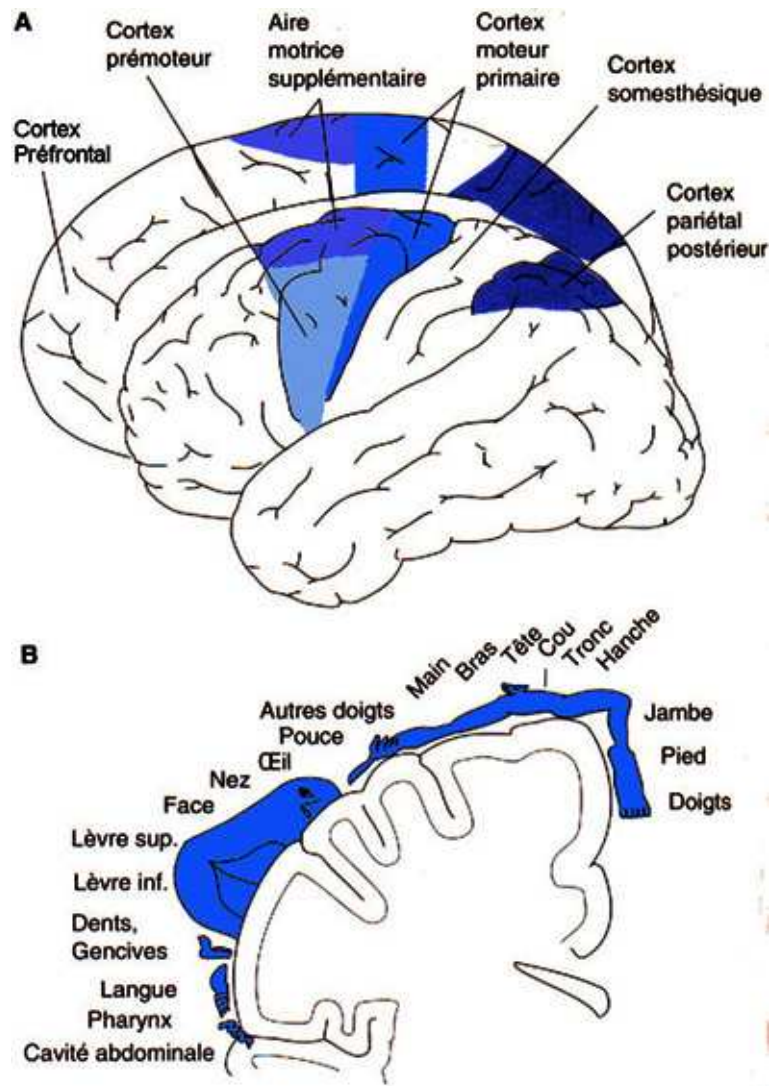


Figure 9. Le cortex moteur chez l'homme.

## .I.5 Des neuroblastes aux neurones matures

### .I.5.1 Différenciation neuronale et N-CAM

Les neuroblastes sont des précurseurs neuronaux issus de la division des cellules neuroépithéliales. La multiplication de ces cellules germinales débute à la 6<sup>ème</sup> semaine pour s'achever à la 20<sup>ème</sup> semaine de gestation. Ces cellules post-mitotiques perdent alors toute capacité de division et migrent à la partie externe le long des prolongements de la glie radiaire pour gagner leur zone d'implantation (Gasser et al., 1990).

L'expression de la molécule d'adhésion de cellules neuronales (N-CAM) polysialylée (PSA-NAM) va jouer un rôle fondamental au cours du développement du système nerveux central (Rutishauser et al, 1996) en modulant les interactions cellulaires.

Ainsi, la PSA-N-CAM est largement exprimée au cours du développement du système nerveux central où elle permet les migrations cellulaires en inhibant les interactions homophiliques N-CAM-N-CAM et, de façon générale, empêche les interactions cellule-cellule (Kiss et Rougon, 1997 ; Bruses et al., 1998). Elle va ainsi jouer un rôle important dans le guidage et le ciblage des axones (Tang et al., 1992 et 1994) ou la migration des précurseurs neuronaux (Ono et al., 1994 ; Hu et al., 1996) et gliaux (Wang et al., 1996). De plus, la persistance chez l'adulte de l'expression de la PSA-N-CAM dans certaines régions du système nerveux central est corrélée avec la maintenance de la plasticité des interactions cellulaires (Seki et al., 1993).

L'expression temporelle de la PSA-N-CAM est strictement régulée au cours du développement et, de ce fait, elle est exprimée uniquement au niveau des neurones immatures (Seki et al., 2002). Dans les neurones matures, seule la N-CAM est exprimée sans résidu polysialylé.

#### .I.5.2 Rôle des facteurs trophiques

Au cours du développement des vertébrés supérieurs, les motoneurones sont produits en excès. Dans la moelle épinière de rat, environ 6000 motoneurones sont présents au 14<sup>ème</sup> jour de la vie embryonnaire. Ces neurones vont développer un axone qui va établir un contact avec son tissu cible, le muscle squelettique qui va lui apporter des facteurs trophiques indispensables à sa survie (Hamburger, 1992). Cette compétition pour l'accès à ces facteurs de survie entraîne une sélection et environ 50% des motoneurones vont mourir jusqu'au 3<sup>ème</sup> jour post-natal. Ce mécanisme est appelé mort cellulaire physiologique des motoneurones (Oppenheim, 1991 ; Sendtner et al., 2000). Lors de la découverte du 1<sup>er</sup> facteur neurotrophique, le NGF, il a été montré que sa production par le tissu cible est nécessaire à la survie des neurones sensoriels formés (Levi-Montalcini et al., 1954). L'importance des facteurs trophiques du muscle squelettique dans la survie motoneuronale a été mise en évidence chez le poulet (Oppenheim, 1985) et plus récemment chez la souris (Grieshammer et

al., 1998). Cependant, des travaux récents chez la souris ont mis en évidence le rôle capital des facteurs trophiques apportés par les cellules gliales, et tout particulièrement par les cellules de Schwann, et ce tant au cours du développement embryonnaire des motoneurones que pour leur survie chez l'adulte (Riethmacher et al., 1997).

Plusieurs facteurs trophiques capables de promouvoir la survie des motoneurones ont été aujourd'hui identifiés. Il s'agit notamment des neurotrophines (NT) BDNF (« brain-derived neurotrophic factor »), NT-3 et NT-4 mais pas le NGF (Sendtner et al., 1992 ; Hughes et al. 1993 ; Henderson et al. 1993). D'autres facteurs sont identifiés comme le CNTF (« ciliary neurotrophic factor ») (Arakawa et al., 1990), le LIF (« leukemia inhibitory factor ») (Hughes et al. 1993), le CT-1 (« cardiotrophin 1 ») (Pennica et al. 1995) ou la CLC (« cardiotrophin like cytokine ») (Pennica et al. 1995 ; Senaldi et al. 1999 ; Shi et al. 1999). Le GDNF (« glial-derived neurotrophic factor ») (Henderson et al. 1994 ; Zurn et al. 1994 ; Rakowicz et al., 2002), ainsi que l'IGF (« insuline growth factor ») (Arakawa et al. 1990 ; Hughes et al. 1993 ; Neff et al. 1993) et le HGF (« hepatocyte growth factor ») (Wong et al. 1997 ; Ebens et al. 1996 ; Yamamoto et al. 1997) permettent également la survie des motoneurones.

## .I.6 Caractérisation des neurones moteurs adultes

Le neurone est une cellule capable de réagir à une stimulation en produisant un influx nerveux. C'est donc une cellule hautement spécialisée, qui permet la transmission, le traitement et le stockage de l'information. Pour cela, le neurone présente une morphologie caractéristique (figure 10). Son cytosquelette est principalement constitué de neurofilaments (NF) qui constituent la base de son architecture et jouent donc un rôle fondamental dans le maintien de son intégrité structurale et fonctionnelle comme cela est décrit dans le chapitre suivant. Au niveau de son corps cellulaire, des dendrites réalisent les connexions avec les cellules afférentes. L'axone est un prolongement du corps du neurone qui permet le transport de l'influx nerveux. L'axone présente fréquemment une gaine de myéline, discontinue au niveau des nœuds de Ranvier. Cette gaine, synthétisée par les oligodendrocytes dans le SNC et les cellules de Schwann dans le SN périphérique, joue un rôle fondamental dans la propagation de l'influx nerveux le long de l'axone. Enfin la terminaison axonale est constituée par la synapse, qui connecte les neurones entre eux. Elle est composée d'un bouton

synaptique, d'un espace inter-synaptique de l'ordre de 20 nanomètres, et de la membrane post-synaptique du neurone afférent. Cette membrane est munie de canaux ioniques, de récepteurs et enzymes de régulation. Les récepteurs contrôlent l'activation de canaux ioniques de différents types. La transmission de l'information dans la synapse est réalisée par des neuromédiateurs contenus dans les vésicules synaptiques des neurones.

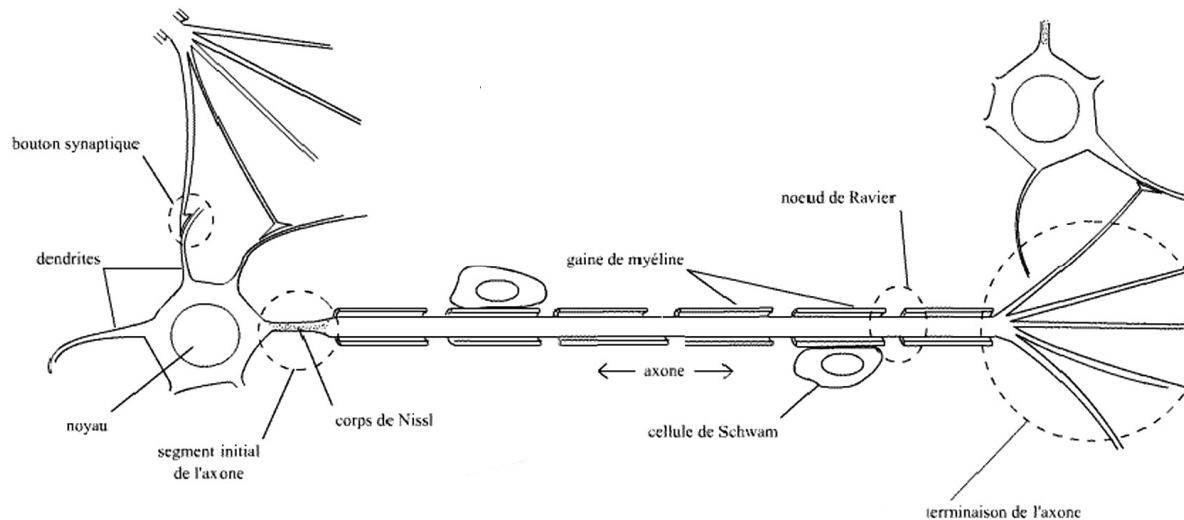


Figure 10. Schéma classique d'un neurone.

Les neurones moteurs sont caractérisés par une très grande taille ce qui, par ailleurs, est fréquemment utilisé comme un des critères de leur identification (Carpenter et al., 1983 ; Morrison et al., 1996). Les motoneurons du cortex présentent en outre une morphologie pyramidale facilement identifiable du fait de leur grande taille (figure 11).

Les neurones moteurs sont localisés dans des aires motrices bien définies, dans le lobe frontal au niveau du cerveau (figure 9) et dans la partie ventrale de la moelle épinière (figure 11).

Les neurones moteurs possèdent exclusivement des synapses cholinergiques et, de ce fait, les marqueurs cholinergiques (choline acétyl-transférase et acétylcholinestérase) peuvent être utilisés comme un critère d'identification (Carriedo et al., 1996 ; Delfs et al., 1997 ; Morrison et al., 1996 ; Bär et al., 2000). Chez le poulet, il a été montré que les neurones moteurs du cortex et de la moelle épinière en cours de différenciation expriment le gène *Islet-1* (Ericson et al., 1992 ; Tsuchida et al., 1994 ; Varela-Echavarria et al., 1996).

Actuellement, l'anticorps monoclonal SMI-32 (Sternberger et al., 1983), qui reconnaît un épitope de la sous-unité lourde des neurofilaments non phosphorylée des neurones cholinergiques (Mesulam et al., 1991 ; Geula et al., 1995), et marque spécifiquement les motoneurones pyramidaux et médullaires (Campbell et Morrison, 1989 ; Carriedo et al., 1995), est considéré comme un des marqueurs les plus fiables des neurones moteurs chez l'homme et le rat (Tsang et al., 2000 ; Bär et al., 2000).

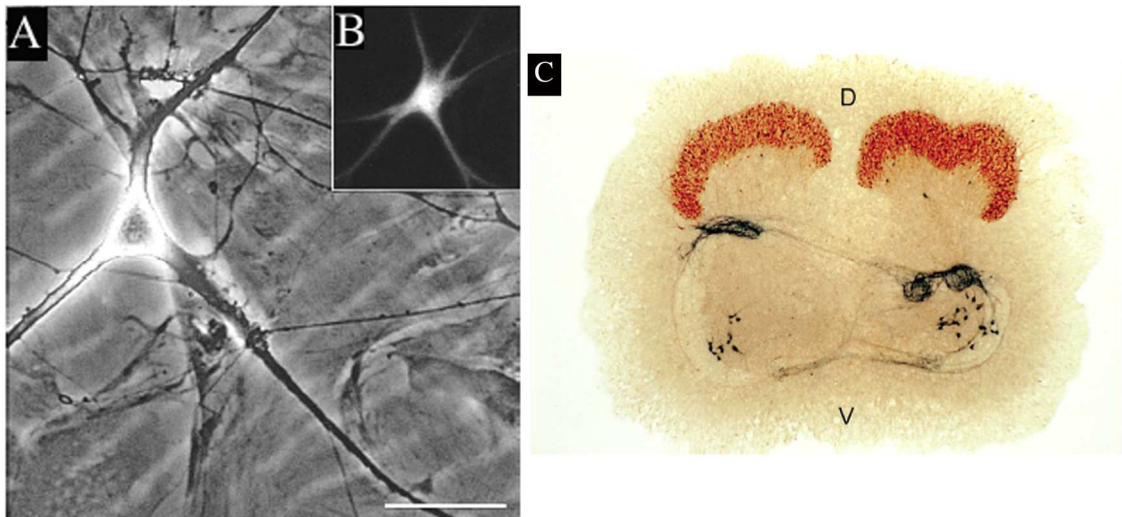


Figure 11. Motoneurones en culture mixte de cortex de rats et dans une coupe transversale de moelle épinière de rat de 8 jours.

A : Neurone moteur de rat de grande taille, avec une forme pyramidale caractéristique, de nombreuses ramifications dendritiques et un long axone. B : Marquage des motoneurones par l'anticorps SMI-32 (Herpes et al., 1999). Barre = 50  $\mu$ m. C : Double-marquage sur une coupe de moelle épinière de rat âgé de 8 jours, des neurones moteurs situés dans la corne ventrale par un Ac anti-acétylcholinestérase (en noir) ; et des interneurones de la corne dorsale par un Ac anti-calrétinine (en rouge) (Kaal et al., 2000).

## **.II Pathologie du système nerveux central moteur : la sclérose latérale amyotrophique**

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une affection neurodégénérative décrite pour la première fois par Charcot en 1874. Elle est caractérisée par la disparition progressive

des motoneurones de la corne antérieure de la moelle et du bulbe rachidien, et la dégénérescence des voies pyramidales. Elle conduit à une paralysie musculaire progressive puis à la mort, souvent par paralysie des muscles respiratoires, liée à l'atteinte bulbaire. Il est à noter que plus l'âge de début de la pathologie est précoce, plus l'évolution de la maladie est rapide. Généralement, cette maladie entraîne la mort dans un délai moyen de deux à trois ans après l'identification des premiers signes cliniques. De plus, il n'existe actuellement aucun traitement curatif efficace. Cependant, fondée sur l'hypothèse excitotoxique l'utilisation du riluzole, un inhibiteur des neuro-médiateurs excitateurs, permet d'obtenir un allongement modeste de la survie (Bensimon et al, 2002).

L'incidence annuelle de la maladie est d'environ 1 à 2 cas pour 100.000 habitants et la prévalence de la forme sporadique est estimée à 4 à 6 pour 100.000 (Rowland, 1994). La maladie affecte plus souvent les hommes que les femmes dans une proportion de 1.5 pour 1. Elle peut survenir à n'importe quel âge, mais la plus grande incidence se situe entre 50-60 ans.

La SLA est généralement sporadique et seulement 10 % des cas sont familiaux (Siddique et al, 1989), avec une hérédité qui est en règle autosomale dominante. Environ 20 % de ces formes familiales autosomales dominantes sont liées à une mutation sur le chromosome 21q21 du gène de la Cu-Zn superoxyde dismutase (SOD) (Rosen et al, 1994). Contrairement à la forme sporadique, il n'y a pas de différence selon le sexe.

L'étiologie de cette maladie reste inconnue. Néanmoins, des progrès considérables ont été effectués, notamment grâce à la découverte des mutations du gène codant pour la SOD chez certains sujets atteints de SLA (Rosen et al, 1993), car près de 20 % des cas familiaux sont porteurs de telles mutations (Siddique, 1996). Les causes des formes habituelles, sporadiques, restent mystérieuses. Les mécanismes pathogéniques de l'atteinte neuronale sont encore inconnus et relèvent vraisemblablement de plusieurs origines comme le suggèrent l'hétérogénéité des aspects cliniques et de l'évolutivité, qui doivent donc faire considérer la SLA comme un syndrome. Différents mécanismes pathogéniques doivent être envisagés et devraient ainsi permettre l'élaboration de stratégies thérapeutiques cohérentes. Plusieurs hypothèses pathogéniques, reposant sur des arguments cliniques et expérimentaux, sont actuellement évoquées pour la compréhension de la destruction neuronale qui pourrait relever de facteurs toxiques tels que l'excitotoxicité de l'acide glutamique et de ses analogues (Zeman



et al, 1994 ; Hugon et al, 1996 ; Louvel et al, 1997), le stress oxydatif lié aux radicaux libres, les anomalies du cytosquelette (Cleveland, 1996) et l'auto-immunité (Appel et al, 1991 ; Smith et al, 1992 ; Smith et Appel, 1995). Il est possible que certains de ces différents facteurs pathogènes puissent jouer un rôle dans l'initiation du processus pathogène, ou que la pathogénèse de la SLA soit multifactorielle.

Parmi ces différentes hypothèses pathogéniques, un nombre croissant de données *in vitro* et *in vivo* suggèrent que l'apoptose est impliquée dans la dégénérescence des motoneurones observée dans la SLA. Il s'avère également que l'apoptose neuronale est associée à des dépôts d'Ig comme le rapportent des études immunohistochimiques *post-mortem* (Martin, 1999). Cependant, le rôle des autoanticorps dans le processus de dégénérescence des motoneurones est inconnu.

## .II.1 Excitotoxicité

L'hypothèse excitotoxique dans la physiopathologie de la SLA est liée à la découverte chez les malades de taux anormalement élevés d'acides aminés excitateurs (AAE) et de leurs analogues, probablement à la suite d'anomalies de leur métabolisme. En effet, plusieurs études ont mis en évidence une augmentation significative du métabolisme des AAE, notamment du glutamate et de l'aspartate, dans le plasma et dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) des patients ayant une SLA (Plaitakis et Carosco, 1987 ; Rothstein et al, 1990 ; Perry et al, 1990). Des niveaux élevés de glutamate peuvent être toxiques car, en activant directement les récepteurs perméables au calcium ou les canaux calciques voltages dépendants, ils induisent des niveaux élevés d'ions calcium libres. De ce fait, une anomalie de la régulation du taux de glutamate dans la synapse pourrait être à l'origine d'une dégénérescence neuronale. A la différence d'autres neurotransmetteurs tels que l'acétylcholine, il n'existe pas d'enzyme endogène de dégradation du glutamate qui est capté par des récepteurs situés au niveau des cellules gliales dont certains seraient modifiés au cours de la SLA (Rothstein et al, 1995 et 1999). Cependant, le riluzole, un inhibiteur du glutamate, a récemment été testé chez l'homme, mais les premiers essais cliniques ne permettent pas d'enrayer définitivement le processus neurodégénératif (Desai et al, 1998).

Ces changements des concentrations intrathécales et plasmatiques d'AAE dans le LCR et dans le plasma pourraient en partie résulter d'une anomalie des mécanismes de recapture. Celle-ci pourrait conduire à une augmentation des concentrations d'AAE au niveau pré-synaptique et par conséquent entraîner la mort neuronale par excitotoxicité.

En effet, la recapture du glutamate était diminuée sur des préparations de synaptosomes obtenues à partir de moelle épinière et cerveau de patients atteints de SLA (Rothstein et al, 1992). Cette diminution serait liée à la perte sélective du transporteur exclusivement glial du glutamate nommé EAAT-2 (pour « excitatory amino-acid transporter-2 ») (Bristol et al, 1996). Le niveau des ARNm de ce transporteur n'était pas modifié et cette perte serait liée à la présence d'ARNm aberrants de EAAT-2 détectés chez les patient atteints de SLA sporadique (Lin et al, 1998). L'expression *in vitro* de ces ARNm aberrants entraîne la perte de l'activité de la protéine EAAT-2. Curieusement, la présence de tels ARNm inhabituels ne semble pas être liée à des anomalies du gène codant pour le transporteur EAAT-2 (Aoki et al, 1998).

Dans les cultures organotypiques de moelle épinière de rat de 8 jours, l'inhibition chronique de la recapture du glutamate conduit à une mort sélective des motoneurones (Rothstein et al, 1993). Cette toxicité peut être inhibée par un antagoniste des récepteurs AMPA/ kainate (le 6-Cyano-7-NitroQuinoXaline-2,3-dione, ou CNQX). De plus, des LCR de patients atteints de SLA sont toxiques pour les neurones corticaux en culture (Couratier et al., 1993). La nature du facteur toxique reste à déterminer mais la neurotoxicité des LCR est efficacement bloquée par le CNQX, ce qui suggère que cette toxicité peut résulter de l'activation des récepteurs AMPA/ kainate. Enfin, des effets similaires sont obtenus dans un autre modèle d'inhibition de la recapture du glutamate en injectant des oligonucléotides anti-sens du transporteur au glutamate de type 1 (Rothstein et al, 1996). Ces résultats montrent qu'un déficit du transport du glutamate peut être à l'origine de la dégénérescence sélective des motoneurones.

La neurotoxicité pourrait également être liée à une augmentation du flux calcique intracellulaire par les récepteurs au glutamate AMPA (pour alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid) situés à la surface neuronale (Van Den Bosch et al., 2000). Celle-ci serait liée à l'absence de la sous-unité 2 lors de l'assemblage du récepteur (Heath et al., 2002). La faible expression de cette sous-unité 2 du récepteur au glutamate a été mise en

évidence spécifiquement au niveau de neurones moteurs spinaux (Heath et al., 2002 ; Kawahara et al., 2003). De ce fait, les motoneurones seraient prédisposés aux atteintes excitotoxiques par la présence majoritaire à sa surface de récepteur au glutamate ne présentant pas la sous-unité 2.

Cependant, le fait que les radicaux libres oxygénés inhibent la recapture du glutamate par les astrocytes (Volterra et al, 1994 ; Trotti et al, 1996) est un argument en faveur d'un lien entre excitotoxicité et le stress oxydatif.

## .II.2 Stress oxydatif

Le transport de la cystéine à l'intérieur des neurones et des cellules gliales est toujours associé à une sortie de glutamate. Ainsi, si le niveau de glutamate extracellulaire est augmenté, ce co-transport est bloqué et la cellule n'est plus fournie en cystéine. Or, celle-ci est indispensable à la synthèse du glutathion, un anti-oxydant cellulaire qui protège la cellule des agressions induites par les radicaux libres, produits par la mitochondrie au cours de la synthèse d'ATP. De ce fait, l'augmentation de la neurotoxicité du glutamate peut entraîner un déficit en glutathion (Kato et al, 1992) et donc l'apparition d'un stress cellulaire oxydatif.

Dans une autre étude, des auteurs ont montré que la concentration plasmatique de glutathion peroxydase (une enzyme qui permet la synthèse du glutathion) est significativement diminuée chez les patients atteints de SLA (Moumen et al, 1997). Cette même étude a également montré que les concentrations plasmatiques de la Cu/Zn superoxyde dismutase (SOD) extracellulaire et de la malone dialdéhyde (un indicateur de la lipopéroxydation), sont augmentées chez les patients atteints de SLA sporadique en comparaison à des sujets témoins. Ces résultats renforcent le rôle du stress oxydatif dans la physiopathologie de la SLA.

Cependant, la théorie du stress oxydatif a pris réellement de l'importance avec la découverte de mutations dans le gène codant pour la SOD-1 chez 20% des patients atteints de formes familiales de SLA (Rosen et al, 1993). Cette enzyme catalyse la dismutation de l' $O_2^{\bullet-}$  en  $H_2O_2$  qui est par la suite converti en radical  $\bullet OH$ , l'espèce radicalaire la plus réactive. De

ce fait, une diminution de l'activité de la SOD-1 entraîne une accumulation de l' $O_2^{\bullet-}$  (Olanow, 1993). L' $O_2^{\bullet-}$  peut interagir avec le NO pour former le radical peroxy-nitrite (Padmaja et Huie, 1993) qui détruit la bi-couche lipidique membranaire, oxyde les résidus thiols et méthionines des protéines (Koppenol et al, 1992), et peut aussi réagir avec la SOD-1 pour produire un radical nitronium  $NO^{2+}$  qui modifie les tyrosines (Beckman et al, 1992).

Toutes ces perturbations vont finalement conduire à la dégénérescence neuronale.

En effet, dans des cultures organotypiques de moelle épinière, le blocage de la SOD-1 entraîne une apoptose neuronale dans la plupart des neurones spinaux (Rothstein et al, 1994). Or, les mutations de la SOD-1 dans la SLA familiale n'entraînent pas de modifications importantes de l'activité de la SOD (Borchelt et al, 1994). Il a été également montré que la chélation du cuivre prévient l'apoptose dans les cellules transfectées par la SOD mutée (Wiedau-Pazos et al, 1996). Ces travaux suggèrent qu'un gain de fonction de l'enzyme mutée pourrait aussi contribuer à la maladie. Les expériences avec des souris transgéniques exprimant la SOD humaine mutée soutiennent cette hypothèse (Gurney et al, 1994). En effet, ces souris développent une paralysie des membres et meurent prématurément. Sur le plan histopathologique, une dégénérescence sélective des motoneurones a lieu. Cette dégénérescence est similaire à celle qui est observée dans les tissus de patients atteints de SLA, suggérant que l'action toxique de la SOD-1 mutée serait liée à son agrégation dans les motoneurones et non pas au stress oxydatif (Bruijn et al, 1998) renforçant l'idée d'un gain de fonction de la protéine mutée.

Cependant, des travaux récents sur le modèle de SLA de souris SOD1-G93A ont mis en évidence le rôle de la cyclooxygénase (COX)-2, un enzyme qui joue un rôle important dans les cascades inflammatoires mais aussi dans les activités neuronales normales. En effet, elle permet dans les astrocytes et les neurones spinaux la synthèse de la prostaglandine E2 qui permet le relargage du glutamate par les astrocytes. D'autre part, elle joue également un rôle clé dans la production des cytokines pro-inflammatoires et des radicaux libres (Drachman et al., 2002). La neuroinflammation est une caractéristique qui affecte les tissus dans de nombreuses maladies neurodégénératives et qui a été décrite au cours de la SLA (McGeer et al., 2002). De plus, une augmentation de la COX-2 a été mise en évidence dans le cerveau et la moelle épinière de malades atteints de SLA. Chez des souris modèles SOD-1, cette augmentation a également été observée (Pompl et al., 2003) et l'inhibition de la COX-2

augmente la survie et diminue les troubles ce qui suggère une possible application thérapeutique des inhibiteurs de la COX-2 tel que le nimesulide (McGeer et al., 2002 ; Pompl et al., 2003).

### .II.3 Modification du cytosquelette

Les neurofilaments (NF) constituent la base architecturale du cytosquelette neuronal. Ils sont formés par la co-polymérisation de trois protéines de la famille des filaments intermédiaires spécifiques des neurones, les sous-unités légère (NF-L), moyenne (NF-M) et lourde (NF-H) des neurofilaments. Les NF sont parmi les constituants les plus abondants des neurones, particulièrement dans les axones myélinisés tels que ceux des motoneurones spinaux. Les NF jouent également un rôle important dans le développement et le maintien du calibre axonal (Hoffman et al, 1987 ; Cleveland et al, 1991) ce qui est un déterminant crucial pour la vitesse de conduction des axones (Voyvodic, 1989). De ce fait, le dysfonctionnement des NF pourrait contribuer à la pathogénèse de certaines maladies neurodégénératives, particulièrement au cours de la dégénérescence motoneuronale dont la forme la plus fréquente est la SLA (Hirano et al, 1984).

L'étude histopathologique *post-mortem* de patients atteints de SLA montre que les motoneurones restants présentent des anomalies morphologiques, notamment un gonflement du corps cellulaire et une dispersion du réticulum endoplasmique (corps de Nissl) (Wakayama et al., 1992). De plus, des ballonnements axonaux, qui peuvent parfois atteindre la taille du corps cellulaire, sont fréquemment observés (Carpenter, 1968) et sont riches en NF comme ceci a été démontré en immunohistochimie (Hirano et al, 1984).

Des souris transgéniques exprimant des niveaux importants de NF-L ou de NF-H présentent des anomalies histopathologiques similaires à celles observées dans la SLA (Cote et al, 1993 ; Xu et al, 1993). De plus, différentes mutations dans le gène codant pour la chaîne lourde des NF-H ont été détectées chez des malades atteints de SLA sporadique par plusieurs équipes (Figlewicz et al, 1994 ; Tomkins et al., 1998 ; Al-Chalabi et al., 1999) mais le rôle de ces mutations reste controversé pour les formes familiales (Vechio et al., 1996). Actuellement, ces mutations des NF-H seraient la cause primaire de seulement 1% des cas de

SLA (Julien et Beaulieu, 2000). Dans certains cas de patients atteints de SLA sporadique, la délétion d'une partie du gène codant le domaine phosphorylé Lys-Ser-Pro a été mise en évidence pour les NF-H (Figlewicz et al, 1994), suggérant que la délétion ou la mutation du domaine phosphorylé pourrait être responsable de quelques cas de SLA. Par ailleurs, les études de souris transgéniques surexprimant le gène NF-L de souris ou humain (Lee et al, 1994) ont montré une désorganisation des neurofilaments et le développement d'une SLA expérimentale. Presque tous les motoneurones spinaux avaient un corps cellulaire élargi, ballonné ainsi qu'un noyau excentré. Des ballonnements axonaux chargés de NF étaient aussi observés. Ces modifications sont similaires à celles qui ont été décrites dans la maladie humaine.

L'étude ultrastructurale montre que tous les compartiments des motoneurones présentent des accumulations massives de NF. Ces études indiquent que des altérations des NF peuvent conduire au dysfonctionnement neuronal et à la mort neuronale. L'accumulation anormale de NF dans la partie proximale de l'axone des motoneurones représente une des caractéristiques pathologiques de la SLA (Hirano et al, 1984). On les détecte chez plus de 70 % des patients atteints de SLA. Ce phénomène était considéré comme un effet secondaire de la dégénérescence, résultant probablement d'un transport axonal défectueux. Ainsi, l'accumulation de NF dans la partie proximale de l'axone des motoneurones pourrait résulter de l'augmentation de la synthèse *de novo* des NF et la diminution de leur dégradation. Elle pourrait également résulter de la présence de mutations ponctuelles des gènes codant pour les NF ou de l'altération des NF par les radicaux libres (Chou et al., 1996), entraînant une désorganisation et une diminution du transport axonal (Robertson et al., 2002). Par ailleurs, l'accumulation anormale de NF dans les neurones lésés s'accompagne souvent de la diminution de concentration de l'ARNm codant pour NF-L. Notamment, une diminution de 60 % de l'ARNm de NF-L était rapportée dans les motoneurones des patients atteints de SLA (Bergeron et al, 1994). Une telle réduction de la synthèse des NF pourrait entraîner une plus grande fragilité des axones et une diminution de leur calibre. En outre, il est possible que la réduction de la synthèse de NF-L dans la SLA, perturbant la stoechiométrie, pourrait contribuer à la formation de dépôts de NF.

De plus, des modifications post-traductionnelles (hyperphosphorylation) qui peuvent influencer la formation des NF et conduire au blocage du transport axonal des NF, ont été

évoquées. En général, dans plusieurs types neuronaux, les NF phosphorylés sont exclusivement présents dans les axones et les dendrites. Au cours de la SLA, on note la présence de NF phosphorylés dans les corps cellulaires des motoneurones (Rao et al., 1995). Cependant, des travaux récents montrent que cette hyperphosphorylation est un phénomène secondaire lié à l'accumulation des NF décrite auparavant (Strong et al., 2001). Toutefois, il a également été montré dans les souris SOD que cette hyperphosphorylation pourrait être consécutive à une dérégulation de la cdk5 (« cyclin-dépendant kinase 5 ») (Patzke et al., 2002 ; Nguyen et al, 2003).

Des travaux plus récents mettent en évidence le rôle d'une autre protéine du cytosquelette de 57 kDa, la périphérine, qui comme les neurofilaments fait partie des filaments intermédiaires neuronaux. La surexpression de cette protéine chez des souris entraîne la mort sélective des motoneurones (Beaulieu et al., 1999). De plus, son expression est augmentée de 300% après une lésion du nerf sciatique (Troy et al., 1990) alors que l'expression des 3 sous-unités des neurofilaments diminue (Muma et al., 1990). La surexpression de la périphérine va entraîner la formation d'inclusions de filament intermédiaire au niveau du périkaryon et de l'axone des neurones moteurs comme ceux retrouvés au cours de la SLA (Robertson et al., 2002).

## .II.4 Autoimmunité

En plus des hypothèses précédentes, il existe de nombreux arguments pour penser que des dysfonctionnements du système immunitaire contribuent au processus dégénératif motoneuronal. Cette hypothèse repose sur la détection en immunohistochimie de dépôts d'immunoglobulines (Ig) de la classe des Ig G dans les motoneurones de malades (Engelhardt et Appel, 1990 ; Fishman et Drachman, 1995). De plus, les sérums de SLA ou leur fraction immunoglobulinique  $\gamma$  sont toxiques pour les neurones *in vitro* (Wolfgram et Myers, 1973 ; Alexianu et al, 1994). Enfin, la fréquence élevée d'Ig monoclonales dans 60 % des sérums de SLA pourrait révéler également un dysfonctionnement du système immunitaire (Duarte et al, 1991).

Les données expérimentales sont également en faveur d'un mécanisme autoimmun. Des modèles animaux reproduisant la maladie ont été obtenus après immunisation de cobayes avec des neurones moteurs de moelle épinière bovine (Engelhardt et al, 1989). Ce modèle a mis en évidence que l'immunisation spécifique d'animaux avec des motoneurones pouvait reproduire un équivalent de maladie humaine, caractérisée par une destruction motoneuronale associée à la présence d'anticorps spécifiquement dirigés contre les neurones moteurs, à des dépôts d'Ig G au niveau des jonctions neuromusculaires et des motoneurones dans la moelle épinière mis en évidence par immunohistochimie. Des modèles expérimentaux murins de cette maladie ont aussi été obtenus par le transfert passif de sérums de SLA (Appel, et al, 1991). Plus récemment, il a été montré que l'injection à des souris d'Ig G, extraites de sérums de malades atteints de SLA, permet de reproduire les anomalies ultrastructurales observées dans les motoneurones au cours de la SLA avec, en outre, une augmentation de la concentration calcique intracellulaire, prouvant que les Ig G présentes dans les sérums de malades ont un effet cytoxique sur les motoneurones (Pullen et al., 2000).

Les spécificités fines ainsi que les mécanismes pathogéniques de ces autoanticorps ne sont pas actuellement parfaitement définis. Concernant la cible antigénique, des autoanticorps anti-glycosphingolipides, dirigés soit contre le ganglioside GM1 (Li et Pestronk, 1991) soit contre le sulfoglucuronyl-paragloboside (Ben Younes-Chennoufi et al, 1995), ont été détectés dans 4 à 6 % des cas de SLA sporadiques (Sanders et al, 1993). Par ailleurs, des titres élevés d'anticorps anti-GM1 ont été détectés dans 5 à 10 % des sérums de SLA (Pestronk, 1991).

D'autres spécificités d'autoanticorps ont été décrites, notamment des IgG dirigées contre les canaux calciques voltage-dépendants (sous-unité L) de la jonction neuro-musculaire (Kimura et al, 1994). Ces anticorps ont été détectés par ELISA (« Enzyme-linked immunosorbent assay ») dans le sérum de 75 % de malades atteints de SLA (Smith et al, 1992, Offen et al., 1998). De plus, ces IgG anti-canaux calciques étaient cytotoxiques pour une lignée murine de cellules hybrides neuroblastiques motoneuronales (Smith et al, 1994). Enfin, des autoanticorps d'isotype  $\mu\lambda$ , dirigés contre les neurofilaments sont détectés dans 25 % des sérums de SLA sporadiques (Couratier et al, 1998).

Bien qu'un grand nombre d'études soutiennent l'hypothèse autoimmune dans la pathogénie de la SLA, les traitements immunosuppresseurs ou immunomodulateurs testés à ce jour n'ont pas fait la preuve de leur efficacité dans cette maladie, qu'il s'agisse de



corticothérapie par voie intrathécale, de plasmaphérèses (Olarte et al, 1980), de traitements par cyclophosphamide (Smith et al, 1994), cyclosporine (Appel et al, 1988) ou d'Ig par voie intra-veineuse (Dalakas et al, 1994). Deux hypothèses découlent donc de ces données : les désordres immunitaires pourraient être précoces et inducteurs de la perte motoneuronale mais inaccessibles à l'effet des traitements immunomodulateurs classiques (Drachman et al, 1994) ; ou la réponse autoimmune est une réponse secondaire à des lésions motoneuronales primitives, relevant d'un autre mécanisme.

Des travaux récents ont cependant également mis en évidence le rôle du récepteur pour le fragment constant des Ig G dans la pathologie de la SLA. Celui-ci permettrait, au niveau des synapses, l'internalisation des IgG plasmatiques dans les motoneurones. Ces Ig seraient alors transportées de façon rétrograde au niveau du corps cellulaire motoneuronal où elles stimuleraient alors l'augmentation du calcium intracellulaire entraînant un processus neurotoxique (Obal et al., 2002) ainsi que le relargage d'acétylcholine au niveau de la terminaison axonale (Mohamed et al., 2002).

## .II.5 Rôle de l'apoptose dans la SLA

La mort neuronale intervient au cours du vieillissement normal. Cependant elle peut avoir lieu de façon pathologique dans les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la SLA. Ces maladies sont caractérisées par la perte de sous-populations spécifiques de neurones. Le rôle d'un déficit en facteurs trophiques a été évoqué comme étiologie possible de ces maladies. Les mécanismes conduisant à la mort neuronale peuvent dépendre de phénomènes de nécrose et d'apoptose, comme cela a été démontré dans un modèle excitotoxique (Bonfoco et al, 1995). La prédominance d'un de ces deux mécanismes serait sous la dépendance de l'intensité et de la durée de l'exposition à ce facteur toxique (Nath et al, 1998). Plusieurs études suggèrent que l'apoptose intervient dans la mort des motoneurones au cours de la SLA (Alexaniu et al, 1994 ; Yoshiyama et al, 1994 ; Troost et al, 1995).

Le rôle de l'apoptose dans les maladies neurodégénératives fait l'objet d'un important débat. Ainsi, l'apoptose a été détectée par TUNEL (« Terminal deoxynucleotide transferase-

mediated dUTP Nick-End Labeling ») sur des tissus *post-mortem* au cours de la maladie d'Alzheimer et de la SLA (Troost et al, 1995). Le rôle de l'apoptose dans la dégénérescence neuronale a été argumenté par les données expérimentales mettant en évidence une induction d'apoptose neuronale par des sérums de malade atteints de SLA (Alexianu et al, 1994). Par ailleurs, il a été montré que les auto-anticorps anti-canaux calciques entraînaient l'apoptose d'une lignée de motoneurones (Alexianu et al, 1994). Plus récemment, Martin et al. (1999) ont montré, au niveau de la corne antérieure de la moelle épinière et du cortex moteur de malades atteints de SLA, la présence d'apoptose, détectée par des critères morphologiques et la fragmentation de l'ADN, ainsi que l'activation de la caspase-8.

Les dernières études soutiennent l'hypothèse que l'apoptose jouerait un rôle dans le processus de la mort neuronale au cours de la SLA (Mattson, 2000 ; Sathasivam et al., 2001) et suggèrent l'implication de la protéine pro-apoptotique anti-tumorale p53 qui est surrexprimée dans les neurones moteurs et les astrocytes au cours de la SLA (Martin, 2000).

# MATERIELS ET METHODES

## **.I Conditions de cultures cellulaires**

### **.I.1 Lignées humaines**

#### **.I.1.1 Lignée lymphocytaire T Jurkat**

La lignée lymphocytaire T Jurkat est une lignée cellulaire dont les cellules poussent en suspension. Elle a été entretenue en flasques de 75 cm<sup>2</sup> dans du milieu RPMI 1640 (Gibco, Paisley, UK) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (Seromed, Berlin, Allemagne) décomplémenté (SVFd) par 30 minutes de chauffage à 56°C, 2 mM de L-glutamine, 50 UI / ml de pénicilline, 50 µg / ml de streptomycine et 0,1 % de fungizone (Gibco). Les cultures étaient maintenues à 37°C dans un incubateur sous 5 % CO<sub>2</sub>, en atmosphère humide (95 %).

#### **.I.1.2 Lignée neuroblastique SH-SY5Y**

La lignée SH-SY5Y est une lignée neuroblastique issue du sous-clonage de la lignée hétérogène SK-N-SH (Muller et al., 1988). Elle a été cultivée dans le même milieu que la lignée Jurkat additionné de 10 % de pyruvate de sodium (Gibco). Comme il s'agit d'une lignée adhérente, le réensemencement des cellules nécessite un traitement par 0,25 % de trypsine (Gibco) pendant 10 minutes à 37°C. Après inactivation de l'enzyme par addition de milieu supplémenté en SVF, les cellules sont centrifugées à 100 g pendant 10 min, puis ensemencées à différentes densités selon les expérimentations (comme décrit dans le chapitre suivant) et maintenue en culture pendant au moins 3 jours avant toute expérimentation.

#### **.I.1.3 Ensemencement des lignées**

-  $2 \times 10^4$  cellules par puits dans les chambres de culture à 8 puits (Lab-Tek, Nunc, VWR, France) pour les marquages en immunofluorescence indirecte et les études d'apoptose par TUNEL.

-  $10^4$  cellules par puits dans les plaques de 96 puits (Nunc) pour les tests immunoenzymatiques d'étude de l'apoptose par ELISA-apoptose (Méthode de dosage des cellules apoptotiques par dosage des nucléosomes solubles intra-cytoplasmiques).

-  $10^5$  cellules dans les flasques de  $75 \text{ cm}^2$  dans du milieu RPMI 1640 pour l'entretien des cellules ou les cultures réalisées pour extraction de protéines.

## .I.2 Cultures primaires de système nerveux central

### .I.2.1 Cultures mixtes de cerveaux et de moelles épinières de rat

Des rates à 16 jours de gestation, période à laquelle débute la différenciation neurale chez le rat, sont sacrifiées et les embryons prélevés. Les cultures sont réalisées à partir de cerveaux ou de moelles épinières prélevées sur les rats fœtaux à 16 jours de gestation (E16). Les conditions de culture sont adaptées de celles de Tardieu et al. (1986).

Le cerveau ou la moelle épinière de chaque fœtus est prélevé stérilement sous loupe binoculaire, puis disséqué dans du milieu basal de Eagle avec sels de Earles (MBE) (Life technology, France). Les méninges sont retirées afin de limiter la contamination fibroblastique. Les prélèvements sont ensuite fragmentés avec des ciseaux puis dissociés par incubation avec 0.25 % de trypsine à  $37^\circ\text{C}$  pendant 10 minutes. La dissociation est interrompue par l'adjonction de SVFd contenu dans le milieu de culture. Il s'agit de MBE supplémenté par 10 % de SVFd, 6 g/l de glucose (Sigma), 2,5 g/l de bicarbonate de sodium (Sigma), 1 % de glutamine, 1 % de pénicilline-streptomycine et 0.1 % fungizone. Les cellules sont sédimentées par centrifugation (800 g pendant 10 minutes). Le culot est alors repris dans du MBE supplémenté puis homogénéisé pour comptage cellulaire à la cellule de Malassez.

Environ  $3.10^5$  cellules sontensemencées dans des puits de 14 mm de diamètre. Il s'agit soit de plaques 24 puits (Nunc) dans lesquels ont été déposées des lamelles de verre préalablement stérilisées et recouvertes de collagène (Calbiochem, San Diego, CA) ; soit des

chambres de culture à 4 puits en verre, également recouvertes de collagène. Les cultures sont maintenues à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub> en atmosphère humide. La totalité du milieu de culture est changée au 2<sup>ème</sup> jour de culture pour éliminer les débris cellulaires puis le milieu est renouvelé par moitié tous les 3 jours. Les divisions cellulaires rapides (astrocytes, fibroblastes) sont bloquées par l'addition de 10<sup>-5</sup>M de cytosine-arabinoside (Sigma, Saint Louis, MO) pendant 24 h au début de la confluence cellulaire, entre les 5<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jours de culture (Jauberteau et al., 1993).

### .I.2.2 Cultures de neurones humains

Les cultures primaires de neurones humains sont réalisées avec des cerveaux et des moelles épinières de fœtus humains âgés de 9 semaines issus d'interruption volontaire de grossesse par aspiration. Ces travaux suivent les règles du comité d'éthique national français et ont été approuvés par le comité d'éthique régional de l'hôpital universitaire de Limoges (n° 89-11 et 95.01.01). Pour chaque culture, les cellules corticales ou spinales issues de 3 fœtus sont rassemblées.

Le cerveau et la moelle épinière de chaque fœtus est identifié sous loupe binoculaire selon des critères morphologiques. Après retrait des méninges, ils sont ensuite disséqués stérilement puis dissociés selon les conditions précédentes. Les cellules sont ensuite ressuspendues dans du milieu de culture complet, puis ensemencées dans des chambres de culture à 4 puits en verre recouvertes de collagène avec 5.10<sup>5</sup> cellules par puits.

Les cultures sont maintenues à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub> en atmosphère humide. La totalité du milieu de culture est changée au 2<sup>ème</sup> jour de culture pour éliminer les débris cellulaires puis le milieu est renouvelé par moitié tous les 3 jours. Les divisions cellulaires rapides (astrocytes, fibroblastes) sont bloquées par l'addition de cytosine-arabinoside dans les conditions décrites précédemment.

## **.II Sérums humains**

Les sérums humains ont été prélevés avec le consentement éclairé des personnes et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur utilisation.

Nous avons utilisé au cours de cette étude 31 sérums (17 hommes et 14 femmes) de malades atteints de SLA sporadique (Brooks et al., 1994) dont la moyenne d'âge au moment du prélèvement était de 64 ans. Nous avons également étudié 33 sérums (13 hommes et 20 femmes) de contrôles sains qui proviennent du centre de transfusion sanguine (CTS) dont la moyenne d'âge au moment du prélèvement était de 61,5 ans. Nous avons aussi testé, à titre de contrôle neurologique, 27 sérums de malades atteints de maladie d'Alzheimer 6 sérums de patients souffrant d'une paraplégie post-traumatique survenue dans les 3 à 6 mois précédant le prélèvement.

Les taux d'anticorps anti-glycosphingolipides ont été déterminés dans le laboratoire d'Immunologie du CHU de Limoges (Jauberteau et al., 1990). Tous les sérums, de contrôles sains et de malades, sont négatifs afin d'écartier les syndromes moteurs apparentés à la SLA (neuropathies motrices à blocs de conduction).

### **.III Dosage du FasL soluble dans les sérums humains**

Le taux de FasL soluble a été déterminé dans les sérums humains à l'aide d'un test ELISA commercial (soluble FasL ELISA Kit, Diaclone, Besançon, France) suivant les instructions du fournisseur.

Le dosage du FasL dans les sérums normaux a été utilisé comme référence. Un taux de FasL, dans les sérums de SLA, supérieur à la moyenne de celui des sérums contrôle sains plus 2 déviations standards a été considéré comme positif.

## **.IV Conditions de stimulation des cellules**

### **.IV.1 Etude de l'apoptose induite par les sérums humains dans les cellules de la lignée neuroblastique humaine ou des cultures primaires de cerveaux et de moelles épinières de rat**

Afin d'étudier les mécanismes de la mort neuronale induite par les sérums de SLA, les cultures primaires de cerveaux et de moelles épinières de rats ont été incubées pendant 24h avec les sérums (malades ou contrôles) dilués au 1/10 dans le milieu de culture.

L'effet apoptotique des sérums (malades ou contrôles) a également été étudié sur les cellules de la lignée neuroblastique SH-SY5Y après exposition pendant 48h ou 72h à ces sérums dilués au 1/10.

### **.IV.2 Etude de l'apoptose induite par la voie Fas dans les cellules des lignées humaines ou des cultures primaires de SNC murin et humain**

Le rôle de Fas dans l'apoptose a été étudié en incubant les cellules des lignées ou des cultures primaires avec différents inducteurs ou inhibiteurs de la voie de Fas dans les conditions décrites dans le tableau suivant.

<b>Nom</b>	<b>Nature</b>	<b>Concentration finale</b>	<b>Fournisseur</b>
Z-IETD-FMK	inhibiteur irréversible de la caspase-8	50 µM	Calbiochem
Z-DEVD-FMK	inhibiteur irréversible de la caspase-3	50 µM	Calbiochem
B-G34	IgG1 de souris anti-Fas Sans effet sur les lymphocytes humains	100 µg/ml	Diaclone
B-G27	IgG2a de souris anti-Fas Agoniste de Fas sur les lymphocytes humains	100 µg/ml	Diaclone
B-D29	IgG1 de souris anti-Fas Antagoniste de Fas sur les lymphocytes humains	100 µg/ml	Diaclone
B-K14	IgG1 de souris anti-Fas	100 µg/ml	Diaclone
Soluble FasL	protéine recombinante humaine surnageant de cellules COS	20 ng / ml	Diaclone
sFasL	« Super Fas ligand » humain recombinant	20 ng / ml	Alexis Biochemicals

Tableau I. Activateurs et inhibiteurs de la voie Fas



## **.V Séparation des cellules par la technique de fractionnement par couplage flux - force de sédimentation (SdFFF)**

### **.V.1 Principe de la SdFFF**

La SdFFF permet en un temps limité, sans marquage préalable, et en respectant l'intégrité cellulaire, de séparer des cellules hétérogènes en fonction de leurs différentes propriétés physico-chimiques : taille, densité et forme. Ainsi, à densité égale, les particules de plus grande taille seront éluées avant les particules de plus faible diamètre.

Les conditions de séparation (force du champ externe appliqué et flux de phase mobile) doivent être déterminées spécifiquement dans nos conditions. Le respect de la viabilité cellulaire de cette technique a été montré au cours de l'étude de l'éluion de différents types cellulaires tels que des fibroblastes de plexus choroïdes de moutons ou des cellules neurales de cerveaux d'embryons de rat. Aucun accroissement spécifique de la mortalité cellulaire n'a été détecté après éluion en SdFFF.

Cette technique a été réalisée par le Dr S. Battu, dans le laboratoire de Chimie Analytique et Bromatologie du Pr P. Cardot à la Faculté de Pharmacie de Limoges.

### **.V.2 Préparation des cellules**

Le système de séparation est décontaminé par une solution à 3 % d'hypochlorite de sodium, suivi d'un rinçage durant une nuit par de l'eau distillée stérile et apyrogène. Quelques heures avant utilisation, cette phase mobile est remplacée par une solution de PBS stérile additionné de 50 UI / ml de pénicilline, 50 µg / ml de streptomycine et 0,1 % de fungizone (PBSa).

Les cellules de la lignée neuroblastique SH-SY5Y ont été lavées une fois avec du PBS stérile, puis séparées par un solution de 0,25 % de trypsine (Gibco) en PBS pendant 10 minutes à 37°C. La trypsine est inactivée par l'adjonction de milieu de culture complet

contenant du SVFd. Les cellules sont alors lavées puis remises en suspension dans du PBSa. Une fraction est prélevée pour une numération à la cellule de Malassez. La viabilité cellulaire est réalisée par la méthode d'exclusion au bleu trypan ajouté à la suspension cellulaire, à la concentration finale de 0,1 % ; les cellules colorées en bleu sont considérées comme mortes. La concentration cellulaire est ajustée à la concentration finale de  $10^6$  cellules viables / ml. Cette suspension cellulaire constitue la population cellulaire totale des cellules SH-SY5Y (PT).

## **.VI Etudes immunocytochimiques et immunohistochimiques par immunofluorescence indirecte**

L'expression des protéines dans les cellules a été recherchée par immunofluorescence indirecte (IFI) dans les différentes lignées cellulaires, dans les cultures mixtes de SNC murines et humaines ou bien sur des coupes histologiques de cerveaux et de moelles épinières.

La technique du double-marquage en immunofluorescence va permettre d'une part, de rechercher la co-expression de deux protéines distinctes dans les cellules. D'autre part, dans les cultures mixtes neurales, l'IFI permet de vérifier la présence d'autoanticorps dirigés contre des constituants du système nerveux dans les sérums humains ou l'expression de protéine à l'aide d'un premier marquage, tout en identifiant les types cellulaires à l'aide du second.

### **.VI.1 Fixation des cellules en culture**

Après un lavage en PBS, les cellules sont fixées avec une solution de paraformaldéhyde à 4 % en PBS pendant 30 minutes à température ambiante (TA) puis lavées 3 fois en PBS. Les cellules non adhérentes de la lignée lymphocytaire T Jurkat sont alors fixées rapidement par séchage sur une lame en verre pour immunofluorescence à 16 puits, recouverte de poly-D-Lysine (Sigma). Pour la détection d'antigène intracellulaire, les cellules sont perméabilisées par une solution à 90 % d'éthanol glacial pendant 1 minute et lavées 3 fois en PBS ; ou bien par une solution à 10 % de triton X100 en PBS pour la détection d'apoptose par la méthode TUNEL.

## .VI.2 Préparation des coupes de tissus

Cette technique a permis de détecter et caractériser au niveau des constituants du système nerveux central la réactivité des sérums de patients atteints de SLA et l'expression de la protéine Fas.

Pour l'étude du système nerveux central murin, les moelles épinières de rats adultes ont été prélevées après dissection du rachis puis rapidement congelées dans l'azote liquide. Des coupes transverses de 5  $\mu\text{m}$  sont réalisées au cryostat et fixées pendant 10 minutes à l'acétone glaciale.

Pour l'étude du système nerveux central humain, le cerveau et la moelle épinière d'un embryon humain âgé de 10 semaines, obtenu après une interruption non-thérapeutique de grossesse, ont été prélevés puis rapidement congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Des coupes de 12  $\mu\text{m}$  sont réalisées dans le plan sagittal pour les hémisphères cérébraux et transversal pour la moelle épinière dorsale.

Les cryosections sont collectées sur des lames Superfrost/Plus slides (Menzel-Glazer, Freiburg, Allemagne), séchées à l'air libre puis conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour les études immunohistochimiques.

## .VI.3 Anticorps primaires

Une étape de saturation visant à bloquer les sites de fixation non spécifique est réalisée par l'incubation des lames avec une solution saturante de sérum d'agneau normal (SAN) à 10 % dans du PBS pendant 30 minutes à TA.

Les cellules sont ensuite incubées avec un (simple marquage) ou deux (double marquage) anticorps primaires pendant 2 heures à TA.

Un contrôle isotypique est systématiquement effectué pour chaque anticorps primaire, avec selon les cas, des immunoglobulines irrelevantes IgG1 ou IgG2a purifiées chez la souris (Immunotech, France).

### .VI.3.1 Détection des réactivités d'autoanticorps sériques avec la lignée neuroblastique

Pour la détection d'autoanticorps dans les sérums de malades atteints de SLA ou de contrôles normaux et neurologiques, les cellules ont été incubées avec ces sérums dilués au 1/100 dans la solution saturante, pendant trois heures à température ambiante.

### .VI.3.2 Détection spécifique d'antigène cellulaire

La liste des anticorps primaires utilisés au cours de cette étude, leur spécificité, leur dilution et leur fournisseur sont indiqués dans le tableau suivant (tableau II).

Après incubation avec l'anticorps primaire, les cellules sont lavées 3 fois dans du PBS.

Nom	Antigène	Hôte	Isotype	Couplage	Dilution	Fournisseur	Propriété
SMI-32	NF-H (200 kDa)  non phosphorylé	souris	Ig G1		1/1000	Affiniti, Mamhead, UK	Marqueur des neurones moteurs
B-G27	Fas humain	souris	IgG2a	Aucun  FITC  Phycoérythrine	1/50  1/5  1/5	Diaclone Besançon France	
B-D29	Fas humain	souris	IgG1		1/50	Diaclone	
B-G30	Fas humain	souris	IgG1		1/50	Diaclone	
B-G34	Fas humain	souris	IgG1		1/50	Diaclone	
Anti-AchE	Enzyme acétylcholine estérase	Lapin	P		1/50	Santa Cruz Biotechnology	Marqueur des neurones cholinergiques
Anti-GFAP	Protéine gliale fibrillaire acide	lapin	P		1/100	Dako Glostrup Danemark	Marqueur des astrocytes
Ki-M7	CD-68	souris	IgG1		1/100	Dako	Marqueur des cellules microgliales
NN18	NF-M (160 kDa)	souris	Ig G1		1/100	Dako	Marqueur des cellules neuronales
2F11	NF-L (68 kDa)	souris	Ig G1		1/50	Dako	Marqueur des cellules neuronales
NKH-1	N-CAM	souris	IgG1	Phycoérythrine	1/5	Dako	Coulter, Fullerton, CA, USA

\* P: polyclonal

Tableau II. Tableau des anticorps primaires utilisés en immunofluorescence indirecte.

## .VI.4 Anticorps secondaires

Les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire pendant 30 minutes à TA. Le type d'anticorps secondaire utilisé dépend de l'espèce et de l'isotype de l'anticorps primaire (tableau précédent). Pour chaque expérience, l'absence de fixation non spécifique de l'anticorps secondaire est testée avec des cellules non exposées préalablement à un anticorps de première couche.

Les anticorps secondaires sont couplés à la fluorescéine ou à la rhodamine pour les études en double-marquage. Pour les études réalisées en microscopie confocale, les anticorps secondaires sont couplés à un conjugué Alexa fluor 594 ou 488.

Un des anticorps secondaires est parfois couplé à la biotine pour permettre une amplification du signal au cours d'une étape supplémentaire d'incubation (30 minutes à TA) avec un complexe streptavidine-FITC (1/200 en PBS, Dako, Glostrup, Danemark) ou streptavidine-phycoérythrine (1/200 en PBS, Immunotech, Marseille, France) ou streptavidine-Alexafluor 594 (1/2000, Molecular Probes, Leiden, Netherlands).

La liste des anticorps secondaires utilisés est indiquée dans le tableau III.

Après 3 lavages dans du PBS et un rinçage rapide à l'eau, les cellules sont montées entre lame et lamelle dans une solution de glycérol-gélatine (Gibco) et observées au microscope à fluorescence (Zeiss) ou en microscopie confocale (Zeiss, LSM510).

<b>SPECIFICITE</b>	<b>HOTE</b>	<b>CONJUGUE</b>	<b>FOURNISSEUR</b>	<b>DILUTION</b>
Ig totales de lapin	Chèvre	Biotine	Dako	1/500
Ig totales humaines	Chèvre	Biotine	Amersham (Les Ulis, France)	1/1000
Ig totales de souris	Lapin	Rhodamine	Dako	1/200
Ig G1 de souris	Chèvre	Biotine	The Binding Site (Grenoble, France)	1/100
Ig G2a de souris	Chèvre	Biotine	The Binding Site	1/100
Ig G1 de souris	Chèvre	FITC	Southern Biotechnology (Birmingham, UK)	1/100
Ig totales de souris	Lapin	FITC	Dako	1/200
Ig totales de souris	Chèvre	Alexa Fluor 488	Molecular Probes Leiden, Netherlands	1/2000
Ig totales de souris	Chèvre	Alexa Fluor 594	Molecular Probes	1/2000
Ig totales de lapin	Chèvre	Alexa Fluor 488	Molecular Probes	1/2000
Ig totales de lapin	Chèvre	Alexa Fluor 594	Molecular Probes	1/2000

Tableau III. Anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence indirecte.

## **.VII Détection de l'apoptose**

### **.VII.1 Détection par la méthode TUNEL**

La présence d'apoptose est évaluée par la méthode TUNEL selon les instructions du fournisseur (Promega, Charbonnières, France ou Boehringer, Mannheim, Allemagne). Les cellules sont fixées et perméabilisées comme décrit au précédent. Elles sont alors incubées 1 heure à 37°C avec une solution de polymères nucléotidiques conjugués à la fluorescéine contenant la terminale deoxynucléotidyl transférase qui va catalyser leur polymérisation à l'extrémité 3'OH libre des brins d'ADN générés au cours de l'apoptose. La réaction est arrêtée par l'incubation pendant 5 minutes dans une solution de citrate de sodium 2X puis les cellules sont lavées en PBS.

Pour les études réalisées sur les lignées cellulaires, une contre-coloration au bleu-Evans pendant 5 minutes permet de colorer l'ensemble des cellules qui sont ensuite lavées et montées entre lame et lamelle comme décrit précédemment.

Pour les cultures mixtes de SNC murin et humain, les cellules en apoptose sont identifiées par un marquage en IFI, réalisé avant le marquage TUNEL, dans les conditions décrites précédemment. Afin de vérifier la spécificité du double-marquage TUNEL et SMI-32, un anticorps irrelevant anti-GFAP spécifique des astrocytes sera utilisé comme contrôle négatif du double-marquage en immunofluorescence dans les mêmes conditions.

Les cellules en apoptose sont alors comptées (au moins 6 champs et 150 cellules par essais) sous un microscope à fluorescence (Zeiss).

## .VII.2 Détection de la libération des nucléosomes solubles par ELISA–apoptose.

La présence d'apoptose a également été évaluée pour les lignées neuroblastiques SH-SY5Y et lymphocytaires T Jurkat par le dosage des nucléosomes solubles générés au cours de l'apoptose. Ce dosage a été réalisé par ELISA selon les instructions du fournisseur (« ELISA-cell death » ; Boehringer).

L'index apoptotique des cellules est déterminé en fonction de chacune des conditions par rapport à l'état basal, où il est arbitrairement fixé à 1. Chaque expérimentation a été réalisée au moins 3 fois avec 2 essais distincts pour chacune.



## **.VIII Détection d'autoanticorps anti-Fas sériques par ELISA**

### **.VIII.1 Recherche d'autoanticorps anti-Fas dans des sérums humains de SLA et contrôles**

La recherche d'autoanticorps dans les sérums a été réalisée par la méthode ELISA (au moyen de plaques de microtitration à 96 puits de haute sensibilité (Maxisorp, Nunc, Roksilde, Danemark).

La sensibilisation des plaques a été réalisée avec 50 ng par puits de la protéine Fas humaine recombinante (Fas $\Delta$ TM, Pharmingen) diluée dans 50  $\mu$ l de tampon carbonate-bicarbonate 0,1 M, pH 9,2 pendant une nuit à 4°C. Des puits contrôles, comportant du PBS sans antigène, permettaient de mesurer les fixations non spécifiques des sérums. Après lavage en PBS - 0,01 % de Tween-20, les sites de fixation non spécifiques étaient bloqués par 200  $\mu$ l par puits d'une solution de PBS comportant 3 % d'albumine bovine (BSA) pendant 2 heures à 37°C.

Les sérums de malades ou de contrôles, dilués au 1 / 100 dans une solution de PBS-1,5 % BSA ont été incubés pendant une nuit à 4°C sous agitation lente. Chaque sérum a été testé au niveau de 2 puits sensibilisés (pour déterminer la densité optique (DO) avec l'antigène) et de 2 puits dépourvus d'antigène (pour déterminer la DO des fixations non spécifiques) afin d'évaluer la DO corrigée (DO des puits sensibilisés avec l'antigène - DO des fixations non spécifiques). Comme contrôle positif, l'anticorps anti-Fas B-G27 a été utilisé dans les mêmes conditions.

Après 6 lavages en PBS, un antisérum de chèvre anti-Ig totales humaines biotinylé (1/1000, Amersham) dilué dans du PBS est ajouté pendant 1h à 37°C. L'isotype des anticorps a été déterminé pour les sérums positifs par des anticorps monospécifiques d'Ig humaines, anti- $\mu$  ou anti- $\gamma$  (1 / 10 000, Immunotech). Puis, après 6 lavages en PBS, un complexe streptavidine-péroxydase (Amersham) dilué au 1/1000 dans du PBS est ajouté pendant 30 minutes à 37°C. L'anticorps monoclonal B-G27 a été révélé avec antisérum de chèvre anti-souris couplé à la peroxydase (1/1000, Dako) dans les mêmes conditions.

La réaction colorimétrique est ensuite développée après lavages, par l'addition de 100 µl d'une solution à 0,4 % d'orthophénylènediamine (Sigma), 0,012 % d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en tampon citrate 17mM-phosphate de sodium 65 mM, pH6, pendant 15 minutes à l'obscurité et à TA. La réaction est stoppée par addition de 50 µl d'acide sulfurique 8N. Les DO sont lues à 492 nm. Les résultats sont exprimés en DO corrigées pour chaque sérum. La positivité des sérums testés a été déterminée comme étant supérieure à la moyenne + 2 écart-types des valeurs de DO corrigées avec les sérums de sujets sains.

## .VIII.2 Recherche d'autoanticorps anti-Fas dans des sérums de souris immunisées par la protéine Fas purifiée

Pour la recherche d'autoanticorps anti-Fas dans les sérums de souris immunisées par Fas, le protocole précédent a été adapté.

Ainsi, les plaques ont été sensibilisées avec 50 ng par puits de protéine Fas immunopurifiée (voir chapitre X.2.) à partir de lignées lymphocytaire (Jurkat) ou neuroblastique (SH-SY5Y).

Le sang des souris contrôles ou immunisées avec la protéine Fas a été prélevé par ponction du sinus veineux orbital. Le sérum a été obtenu par centrifugation 10 minutes à 800 g et utilisé dilué au 1/10. L'anticorps B-G27 dilué au 1/100 est utilisé comme contrôle positif.

Les autoanticorps anti-Fas et B-G27 ont été révélés par un antisérum de chèvre anti-Ig totales de souris couplé à la peroxydase (1/1000, Dako) pendant 1 heure à 37°C.

## **.IX Analyse des réactivités protéiques en Western-Blotting**

La technique de Western Blotting a été utilisée pour :

- Déterminer la présence d'autoanticorps dirigés contre des protéines cellulaires des lignées neuroblastique et Jurkat dans les sérums humains et murins ainsi que dans les ascites de souris.

- Etudier les expressions protéiques.
- Vérifier la phosphorylation extracellulaire de Fas purifié de la lignée Jurkat.

Dans tous les cas, les analyses ont été comparées à des marqueurs de poids moléculaires couplés à la biotine (Sigma) et l'absence de fixation non spécifique des conjugués était contrôlée par l'emploi des anticorps secondaires sans anticorps de première couche.

## .IX.1 Préparation des protéines

### .IX.1.1 Lysat cellulaire total

Pour les lignées Jurkat et SH-SY5Y, un lavage rapide en PBS est effectué. Après numération, environ  $10^6$  cellules sont remises en suspension dans 500  $\mu$ l de tampon de lyse (150 mM NaCl, 1 % NP40, 50mM Tris HCl, 1mM Ethylene Diamine Tetraacetic Acide disodium, 1mM de Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride, 2 $\mu$ g/ml Anti-Protease cocktail (Calbiochem), 1 mM Vanadate, 0.1mM NaF) pendant 5 minutes à 4°C. La solution est alors homogénéisée puis centrifugée à 3000 g pendant 10 minutes. Le surnageant qui contient les protéines cellulaires totales est conservé à -20°C.

Pour la réalisation d'un lysat protéique de foie de souris, le foie d'une souris normale a été lavé abondamment en PBS. Environ 10 mg ont été dissociés mécaniquement dans du PBS puis passés plusieurs fois au travers d'une aiguille de 0,5 mm de diamètre. Les fragments tissulaires sont éliminés par passage de la suspension au travers d'un tamis cellulaire (VWR). Les cellules sont alors lavées 3 fois par centrifugation dans du PBS puis ressuspendues dans le tampon de lyse pendant 10 minutes sur glace. Le lysat cellulaire est alors centrifugé à 3000 g pendant 10 minutes et le surnageant qui contient les protéines cellulaires totales est conservé à -20°C.

### .IX.1.2 Dosage de la concentration protéique

Un dosage de Lowry (Lowry et al., 1951) ou à l'aide d'un réactif de Bradford (Sigma) est alors effectué et la concentration en protéines est ajustée par du PBS à 8 µg/µl pour les lysats cellulaires totaux et à 1 µg/µl pour la protéine Fas immunopurifiée.

## .IX.2 Séparation des protéines par électrophorèse

Les protéines ont été diluées au 1/2 dans du tampon de Laemmli modifié (1970) adapté pour les études électrophorétiques [Tris 0,25 M, pH 6,8 ; SDS (sodium dodécyl sulfate) 4 % ; glycérol 10 % ; bleu de bromophenol 0,006 % et β-mercaptoethanol 2 %]. Elles ont ensuite été dénaturées pendant 5 minutes dans un bain marie à ébullition.

Dans chaque piste sont déposés 80 µg de protéines de lysats cellulaires total, ou 1 µg de protéine Fas humaine recombinante (PharMingen) ou de protéine Fas immunopurifiée à partir de l'une ou l'autre des lignées. Un marqueur de masse moléculaire couplé à la biotine ("Biotinylated SDS molecular weight standard mixtures", Sigma, Saint Louis, MO) est utilisé comme référence selon les recommandations du fournisseur.

La séparation protéique était réalisée par migration électrophorétique en gel de polyacrylamide avec du sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE, « polyacrylamide gel electrophoresis »).

Le pourcentage d'acrylamide du gel dépend du poids moléculaire de la protéine recherchée. Ainsi, les protéines ont été séparées par des électrophorèses réalisées avec des gels à 7,5 ; 10 et 12 % d'acrylamide sur une hauteur de 6 cm de gel à 0,75 mm d'épaisseur. La migration se déroule à ampérage constant (20 mA par gel) dans du tampon de migration (Tris 190 mM, glycine 150 mM, SDS 0,1 % pH 8,5). Un transfert sur membrane de nitrocellulose (HAHY 0,45 µM, Millipore, St Quentin-Yvelines, France) est ensuite effectué (transfert semi-sec, Biométra, Polylabo, Strasbourg, France) pendant 1 heure à 1,1 mA dans le tampon de transfert suivant : Tris 250 mM, glycine 200 mM, méthanol 20 %, pH 8,2.

Après transfert, les protéines sont colorées au rouge Ponceau pour vérifier le transfert et la qualité de migration.

Les membranes sont saturées 90 minutes à TA dans une solution de PBS à 3 % d'albumine bovine sérique (BSA) (Sigma) ou pour la détection des agrégats de Fas dans du PBS contenant 5 % de lait écrémé.

### .IX.3 Révélation des études en Western-blot par immunochimie

Les bandes de nitrocellulose ont ensuite été incubées pendant une nuit à 4°C sous agitation avec l'anticorps primaire. Une bande servant de contrôle sera exposée seulement à l'anticorps secondaire.

Les anticorps utilisés en Western-blot sont rassemblés dans le tableau IV.

Nom	Antigène	Hôte	Dilution	Fournisseur	Remarque
Clone 13	Fas	Ig G1 souris	1/400	Transduction Laboratories	Epitope situé dans la partie extracellulaire de FAs
C-20	Partie C- terminale de Fas humain	Polyclonal lapin	1/200	Santa Cruz Biotechnology	Reconnaît les agrégats de Fas
3D5	Domaine cytoplasmique de Fas humain	Ig G1 souris	1/500	Alexis Biochemicals	Reconnaît les agrégats de Fas
D66	$\beta$ -tubulines	Ig G1 souris	1/500	Sigma	
MFCD00145889	Actine	Ig G1 souris	1/500	Sigma	
G254-274	Fas	Ig G1 souris	1/400	Pharmingen	
2F11	NF-L	Ig G1 souris	1/100	Dako	

Tableau IV. Tableau des anticorps primaires utilisés en Western-blott.

Après 6 lavages en PBS, la révélation était effectuée en utilisant un réactif chémiluminescent (Abcys, France) selon les indications du fournisseur. La réaction était révélée en exposant la membrane à un film Kodack X-Omat AR (Amersham).

La réaction pouvait également être développée en incubant les bandes avec une solution de 5 mg de diaminobenzidine (Sigma) dilués dans 10 ml de PBS et 10 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (et 0,03 % de CoCl<sub>2</sub> pour amplifier la coloration).

## **.X      Extraction de protéines**

### **.X.1      Purification d'Ig G de sérum humain**

Les immunoglobulines (principalement les Ig G) présentes dans les sérum humains (malades ou contrôle) sont extraites selon les instructions du fournisseur adaptées à nos conditions. Le sérum (1 ml) est dilué au 1/2 dans du PBS. Il est ensuite incubé avec 0,5 ml de protéine A couplée à des billes (Proteine A Ceramic HyperD F, Biosepra, Life Technologies), sous agitation légère, pendant 2 heures à température ambiante pour permettre l'accrochage des Ig sur les billes de protéine A. La protéine A est ensuite lavée 3 fois par centrifugation (3000 g, 5 minutes) avec du PBS-500mM NaCl. Les Ig sont alors éluées par 2 ml de tampon citrate pH 2,5 et rapidement transférées dans un volume équivalent de tampon Tris-base pH 8,9. Une dialyse (Spectra/pore, 12000 Da, VWR) est réalisée pendant une nuit à 4°C contre du PBS. Les immunoglobulines sont ensuite concentrées par centrifugation (vivaspin 5 kDa, VWR) pour être ramenées à leur concentration initiale dans le sérum (soit un volume final de 1 ml).

### **.X.2      Immunopurification de la protéine Fas neuroblastique et lymphocytaire**

#### **.X.2.1      Préparation de la colonne d'immunopurification de Fas**

La protéine A couplée à des billes (Proteine A Ceramic HyperD F, Biosepra, Life Technologies) est lavée trois fois dans du tampon borate 0,1M pH 8,2. L'accrochage de 150

µg d'anticorps anti-Fas (B-G27, Diaclone) sur 1 ml de billes de protéine A est réalisé pendant une nuit à +4°C sous agitation légère. Après un lavage en tampon borate, puis un lavage en tampon triéthanolamine 0,2 M pH 8,2, l'anticorps B-G27 est bloqué sur les billes de protéine A par une incubation dans 20 ml de tampon triéthanolamine 0,2M avec 15 mM de diméthylpimélimidate dihydrochloride pH 8,2 pendant 45 minutes à TA sous agitation lente. La réaction est arrêtée par une incubation dans du tampon éthanolamine 0,2 M pH 8,2 durant 5 minutes. Les billes de protéine A couplées à l'anticorps anti-Fas B-G27 sont ensuite lavées 3 fois en tampon borate avant de pouvoir être utilisées.

#### .X.2.2 Extraction de la protéine Fas

Dans un premier temps, un lysat cellulaire total a été réalisé selon le protocole décrit précédemment. Puis, la protéine Fas a été extraite du lysat en incubant celui-ci avec des billes de protéine A couplées à l'Ac anti-Fas monoclonal B-G27 durant une nuit à +4°C sous agitation lente. Après un lavage en PBS-0,1 % NP40 puis un lavage en PBS-0,1 % NP40 avec 1M de NaCl, la protéine Fas est éluée par une solution de glycine 100 mM pH 2,6 et rapidement transférée dans un volume équivalent de tampon Tris-base pH 8,9. Une dialyse (Spectra/pore, 12000 Da, VWR) est réalisée une nuit à 4°C dans du PBS. La protéine Fas est alors concentrée par centrifugation (vivaspin 5 kDa, VWR) pour être ramenée à un volume final de 200 µl.

## **.XI Etude des phosphorylations extracellulaires de Fas sur la lignée lymphocytaire T Jurkat**

### .XI.1 Etude de la phosphorylation extracellulaire de Fas

#### .XI.1.1 Stimulation des cellules

Pour les études d'ectophosphorylation, les cellules Jurkat ont été exposées pendant 2 heures à un inhibiteur d'ectokinase C, soit K252b (10µM, Calbiochem), soit le peptide

inhibiteur de PKC 19-36 (200 $\mu$ M, Calbiochem). Des cellules non exposées à l'inhibiteur servent de contrôle basal.

L'activation du récepteur Fas a été induite par l'ajout de FasL (20 ng/ml) afin d'étudier la phosphorylation extracellulaire de Fas après son agrégation, en présence ou en absence des inhibiteurs d'ectokinase C, dans les mêmes conditions que décrites précédemment.

#### .XI.1.2 Incorporation extracellulaire de [ $P^{32}$ ] par Fas

Les cellules lymphocytaires T Jurkat ont été exposées durant 15 minutes à 37° C à 70  $\mu$ Ci de [ $\gamma$ -32]ATP puis ensuite lavées 2 fois avec une solution de 1 mM Vanadate et 0,1 mM NaF dans du PBS (PBSi). Afin de vérifier que les phosphorylations observées sont strictement extracellulaires, des contrôles ont été réalisés dans les mêmes conditions avec en plus de l'ATP 1nM (Sigma) ou du Pi 1 nM (Sigma) comme compétiteurs de la phosphorylation.

Les cellules sont alors lysées et la protéine Fas extraite puis dialysée (Spectra/pore, 12000 Da, VWR) pendant 2h à +4°C dans du PBSi. La protéine Fas extraite est ensuite concentrée selon les conditions précédemment décrites et conservée à -80°C pour les analyses en Western-blot.

#### .XI.2 Etude du regroupement des récepteurs Fas à la surface membranaire

Pour les études du rôle des ectokinases dans le regroupement membranaire du récepteur Fas, les cellules Jurkat ont été exposées durant 1 heure avec ou sans l'inhibiteur d'ectokinase C K252b, en présence ou non de FasL (20 ng / ml) pour étudier l'effet de l'activation du récepteur Fas.

La protéine Fas est identifiée à la surface cellulaire par immunofluorescence indirecte avec l'anticorps B-G27. La formation de regroupements membranaires de Fas à la surface d'une cellule correspond à la concentration du marquage observé au microscope confocal sur une zone égale ou supérieure à 25 % de la surface cellulaire.



### .XI.3 Rôle des ectokinases C dans l'apoptose induite par Fas

Les cellules ont été exposées pendant 24 heures avec ou sans l'inhibiteur d'ectokinase C K252b, en présence ou non de FasL (20 ng / ml) pour étudier l'effet de l'activation du récepteur Fas.

La présence d'apoptose a été détectée par la méthode TUNEL et par ELISA-apoptose suivant le protocole décrit précédemment.

## **.XII Immunisation de souris par la protéine Fas neuronale et lymphocytaire**

### .XII.1 Préparation des protéines

La protéine Fas a été extraite des lignées neuroblastiques SH-SY5Y et lymphocytaires Jurkat par immunopurification suivant le protocole décrit précédemment.

Plusieurs extractions de la protéine Fas ont été réalisées pour chacune des lignées et les protéines ainsi immunopurifiées ont été rassemblées afin d'obtenir une quantité finale de 200 µg de protéine pour chacune des lignées. La concentration finale en protéine Fas a été ajustée à 50 µg / ml dans du PBS stérile. La solution protéique est alors filtrée sous hotte stérile à travers une membrane de 0,25 µm et stockée à -80°C.

La purification des protéines Fas lymphocytaires et neuroblastiques ainsi extraites a été vérifiée par Western-blot avec les anticorps monoclonaux anti-Fas clone 13 et c-20 et par une coloration au bleu de Coomassie. Cette technique permet de détecter toutes les protéines contenues dans un gel de polyacrylamide à la suite d'une coloration obtenue par immersion du gel dans la solution de Bleu de Coomassie à 0,2 % en méthanol 50 % et acide acétique 10 %, pendant 30 minutes. Le gel est alors décoloré par une solution de 50 % de méthanol et 10 % d'acide acétique pendant 30 minutes puis la coloration résiduelle du gel est éliminée avec une solution contenant 7 % de méthanol et 5 % d'acide acétique pendant une nuit.

## .XII.2 Immunisation des souris

Pour cette étude, 3 lots de 5 souris Swiss femelles âgées de 6 semaines ont été utilisés. Le premier lot a été immunisé avec du PBS stérile afin de servir de contrôle (lot C), le deuxième avec la protéine Fas lymphocytaire (lot L), et le dernier avec la protéine Fas neuroblastique (lot N).

A chacune des injections, chaque souris a reçu 10 µg de protéine Fas (lymphocytaire ou neuroblastique) ou 200 µl de PBS stérile, volume équivalent à chacune des injections.

Pour la première injection, la protéine Fas (ou le PBS) a été dilué au demi dans de l'adjuvant complet de Freund (Sigma).

A 15 jours d'intervalle, une deuxième injection a été réalisée avec les protéines diluées au demi dans de l'adjuvant incomplet de Freund.

Une troisième injection identique à la seconde est réalisée 15 jours après celle-ci.

## .XII.3 Etudes physiologiques des souris

Les tests de la cheminée et de la traction nous ont permis d'évaluer le tonus musculaire et la coordination motrice des souris afin de déceler l'apparition d'éventuels troubles moteurs. Ils ont été réalisés tous les 21 jours à compter de la date de la dernière injection immunisante.

### .XII.3.1 Test de la cheminée

Les souris ont été placées la tête en bas au fond d'un cylindre de verre. Celui-ci est alors placé en position verticale. Instinctivement, une souris normale remonte vers l'extrémité supérieure en reculant.

Tout animal ne possédant pas un tonus musculaire convenable ou une coordination motrice normale ne peut remonter dans le cylindre en moins de 30 secondes.

#### .XII.3.2 Test de la traction

Les souris ont été suspendues par les pattes antérieures à une tige métallique horizontale. Une souris normale effectue immédiatement un rétablissement sur ce support. Le test est positif si les animaux se rétablissent en moins de 5 secondes. Le test est négatif si les animaux se rétablissent en plus de 5 sec ou refusent de saisir le fil.

Tout animal ne possédant pas un tonus musculaire convenable ainsi qu'une bonne coordination motrice, éprouve des difficultés, voire est incapable d'effectuer ce rétablissement.

### **.XIII Analyse moléculaire de Fas**

#### .XIII.1 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La réaction de PCR a été utilisée pour amplifier les transcrits du récepteur Fas dans les cellules neuroblastiques SH-SY5Y et lymphocytaires T Jurkat.

L'ARN des cellules a été isolé selon le protocole « SV Total RNA Isolation System » (Promega, Madison, USA), puis leur quantité évaluée par mesure de la densité optique à 260 nm.

L'ADNc a été obtenu par transcription inverse (RT) de 1 µg d'ARN selon le kit « 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) » (Boehringer) à l'aide d'amorces polyT.

Pour chaque réaction de PCR, 2 µl des ADNc de Fas obtenus à partir des 2 lignées sont amplifiés suivant le protocole du fournisseur de la Taq DNA polymérase (Amersham Pharmacia biotech, Piscataway, USA) à l'aide d'un appareil à PCR (Applied Biosystems gene Amp, PCR system 2400, Foster City, CA). Deux paires d'amorces distinctes ont été choisies

pour amplifier spécifiquement l'ADNc de Fas. La première paire (F5 / F6) amplifiait la zone codant la partie intracellulaire de Fas, et la seconde (F7 / F8) sa partie extracellulaire. Les amorces utilisées sont les suivantes :

F5 : 5' ACACCAAGTGCAAAGAGGAAGGAT<sup>3'</sup>

F6 : 5' GACCAAGCTTTGGATTTTCATTTCTG<sup>3'</sup>

Le programme d'amplification qui a été utilisé pour les amorce F5/F6 est le suivant :

[3 min à 94°C]<sub>1</sub> + [40 sec à 94°C + 45 sec à 61°C + 1 min à 72°C]<sub>35</sub> + [5 min à 72°C]<sub>1</sub>

F7 : 5' ATCGTCCAAAAGTGTTAATGCC<sup>3'</sup>

F8 : 5' ACAAAGCCACCCCAAGTTAGAT<sup>3'</sup>

Le programme d'amplification qui a été utilisé pour les amorces F7/F8 est le suivant :

[3 min à 94°C]<sub>1</sub> + [40 sec à 94°C + 40 sec à 60°C + 1 min à 72°C]<sub>35</sub> + [5 min à 72°C]<sub>1</sub>

Comme contrôle positif, le même protocole a été réalisé avec des amorces spécifiques de la  $\beta$ -actine (sens : 5'-CGTTGACATCCGTAAAGACC-3'; anti-sens : 5'-TCGTA C T C C T G C T T G C T G A T - 3').

Pour détecter d'éventuelles contaminations, un échantillon contenant uniquement de l'eau stérile a été utilisé comme contrôle.

Les produits de PCR obtenus sont alors analysés en gel d'agarose à 2 % en Tris-borate EDTA et marquage au bromure d'éthidium.

## .XIII.2 Clonage et séquençage

Le séquençage a été réalisé afin de vérifier la séquence amplifiée par PCR.

Les ADNc amplifiés ont été clonés dans le vecteur pGEM-T Easy Vector puis amplifiés dans des bactéries compétentes JM109 selon le protocole pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems (Promega). La purification de l'ADN plasmidique contenu dans les bactéries a été réalisée selon le kit WIZARD plus SV Minipreps (Promega). La digestion des plasmides purifiés par l'enzyme de restriction *Eco RI* a permis de vérifier que le fragment d'intérêt a bien été inséré dans le vecteur.

Le séquençage des clones bactériens contenant un insert des zones codant les parties intracellulaire ou extracellulaire du récepteur Fas a été réalisée selon la méthode de Sanger et al. (1977) et le produit de la réaction de séquence est analysé en électrophorèse capillaire sur un séquenceur automatique (ABI Prism, Applied Biosystems).

## **RESULTATS**

# ROLE DE FAS DANS L'APOPTOSE MOTONEURONALE AU COURS DE LA SLA

Ces résultats ont été publiés (Yi et al., 2000) (publication n°1).

## **.I Les sérums de SLA induisent l'apoptose des cellules neuroblastiques**

Les taux d'apoptose induite par les 31 sérums de malades atteints de SLA avec les cellules de la lignée neuroblastique étaient significativement élevés par rapport aux sérums de contrôles sains, avec la méthode TUNEL ( $p < 0,0001$  à 48h et  $p < 0,05$  à 72h), ou par le dosage des nucléosomes solubles par ELISA-apoptose ( $p < 0,0001$  à 48h et 72h).

Méthode	Sérums de SLA incubation		Sérums controles sains incubation		Ac anti-CD95 (B-G30) incubation 48h
	48h	72h	48h	72h	
<b>TUNEL :</b> <b>% cellules</b> <b>en apoptose</b>	3,5 ± 2,3	5,2 ± 8,6	1,1 ± 0,7	1,8 ± 0,9	10
<b>ELISA</b> <b>index apoptotique</b>	1,7 ± 0,5	1,9 ± 1,3	0,8 ± 0,3	0,9 ± 0,4	1,6

Figure 12. Détection par TUNEL et ELISA-apoptose de l'apoptose induite par les sérums de malades atteints de SLA ou les contrôles sains après 48h ou 72h d'incubation avec les cellules de la lignée neuroblastique humaine.

Par la méthode TUNEL, 16 sérums de SLA induisaient des taux d'apoptose significativement élevés par rapport aux sérums de contrôles sains (moyenne des sérums contrôles plus 2 déviations standards) avec 5 % de cellules en apoptose après 48h

d'exposition aux sérums et 9 % après 72h. De plus, les Ig G extraites du sérum d'un malade atteint de SLA qui présentait un taux significativement élevé d'autoanticorps anti-Fas induisaient l'apoptose des neuroblastes dans des proportions similaires à celles observées lorsque les cellules sont exposées avec le sérum du malade (8 %). Par ELISA-apoptose, 15 sérums de SLA induisaient l'apoptose des cellules de la lignée neuroblastique, avec un index apoptotique de 2,6 après 48h d'exposition, et de 2,75 à 72h. L'anticorps monoclonal agoniste anti-Fas B-G30 permet d'induire l'apoptose des neuroblastes à des taux similaires à ceux observés avec les sérums de SLA (figure 12).

La combinaison des deux méthodes de détection de l'apoptose permet d'observer que 23 sérums de malades atteints de SLA induisaient l'apoptose des cellules neuroblastiques, bien que seulement 8 de ces sérums soient positifs avec les deux techniques de détection.

Au contraire, parmi les sérums de contrôles neurologiques, seuls deux sérums de malades atteints de la maladie d'Alzheimer induisaient significativement l'apoptose des neuroblastes après 48h d'exposition. Le taux moyen d'apoptose induit par les sérums de malades atteints de la maladie d'Alzheimer est significativement plus faible que celui des sérums de SLA ( $0,96 \% \pm 0,9$ ,  $p < 0,0001$ ). Aucune apoptose significative n'est observée pour les sérums de malades ayant eu un traumatisme de la moelle épinière.

De plus, 8 sérums de SLA qui induisaient l'apoptose des cellules neuroblastiques ont également été étudiés avec la lignée lymphocytaire T Jurkat. Aucune apoptose significative induite par ces sérums après n'a pu être détectée après une exposition de 48h (index apoptotique =  $0,53 \pm 0,35$  ;  $p = 0,0001$ ) par comparaison avec l'index apoptotique déterminé dans les mêmes conditions avec la lignée neuroblastique.

## **.II Détection d'autoanticorps dirigés contre la protéine Fas dans les sérums de malades atteints de SLA**

### **.II.1 Détection par Western-blot**



Par Western-blotting, avec des lysats protéiques extraits des cellules de la lignée neuroblastique, on observait un marquage prédominant correspondant à une protéine de 50 kDa qui était reconnue par tous les sérums de malades atteints de SLA sauf deux, contre un seul des sérums de contrôles sains. Cette protéine présentait une mobilité électrophorétique identique à celle reconnue par un anticorps monoclonal anti-Fas (Pharmingen) alors que des anticorps spécifiques de la protéine Fas-L, de la  $\beta$ -tubuline et de l'actine marquaient des protéines de mobilités électrophorétiques différentes (figure 13). En outre, la réactivité des sérums de malades avec la protéine recombinante de Fas humain, testée en parallèle par Western-blotting, a permis de vérifier que les anticorps présents dans les sérums de SLA reconnaissaient bien la protéine Fas (figure 13).

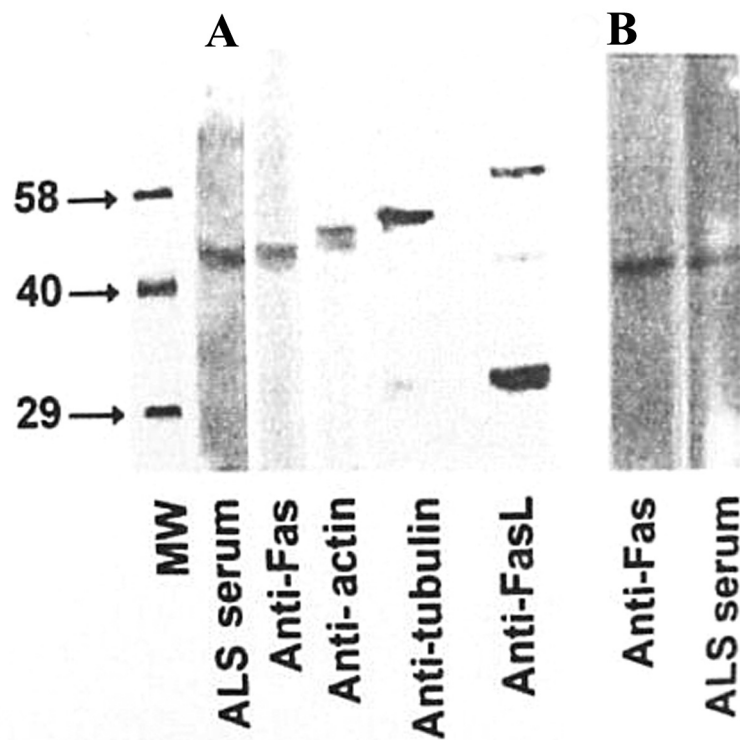


Figure 13. Détection d'anticorps anti-Fas dans les sérums de malades par Western-blotting après électrophorèse en gel de polyacrylamide à 12 % contenant un lysat de protéines neuroblastiques (A) ou la protéine Fas humaine recombinante (B).

Les bandes sont révélées par un sérum de malade ou par un anticorps anti-Fas monoclonal comme indiqué ci-dessus.

## **.II.2 Détection par ELISA**

Afin de déterminer l'importance du taux d'anticorps anti-Fas présent dans les sérums des malades atteints de SLA, un ELISA utilisant la protéine Fas humaine recombinante a été réalisé. Les valeurs sont exprimées en DO corrigées. A partir des taux d'anticorps anti-Fas de l'ensemble de nos contrôles normaux, nous avons déterminé un seuil de positivité de détection des anticorps anti-Fas sériques (moyenne des DO corrigées des contrôles normaux + 2 écarts types).

Des taux significativement élevés d'anticorps anti-Fas ont été détectés dans les sérums de malades ( $DO = 0,68 \pm 0,25$ ) par rapport aux sérums de contrôles normaux ( $DO = 0,39 \pm 0,27$  ;  $p = 0,0003$ ) et neurologiques ( $DO = 0,41 \pm 0,12$  ;  $p < 0,0001$ ).

Aucun des sérums de contrôles neurologiques ne contenait de taux détectable d'anticorps anti-Fas, y compris les 2 sérums de malades ayant une maladie d'Alzheimer et qui induisaient l'apoptose de la lignée neuroblastique. Au contraire, 8 sérums de SLA présentaient des taux significativement élevés d'anticorps anti-Fas. De plus, la réactivité anti-Fas des sérums de SLA corrèle avec leur capacité à induire l'apoptose détectée par ELISA-apoptose après 48h et 72h d'incubation (respectivement  $p = 0,0057$  et  $p = 0,01$ ). Tous les sérums de SLA sauf un induisent une apoptose significative détectée par TUNEL et par ELISA. Les anticorps anti-Fas sont des IgG et des IgM. Aucune corrélation significative n'a pu être établie entre les taux d'autoanticorps anti-Fas et les signes cliniques ou l'évolution de la maladie.

## **.III Détection de FasL soluble dans les sérums de SLA**

Parmi les 29 sérums de SLA testés, un seul contenait un taux de FasL soluble (469 pg / ml) légèrement supérieur au seuil limite de positivité établi à 449 pg / ml à partir des sérums contrôles normaux. Ce sérum induisait l'apoptose des cellules neuroblastiques et ne contenait pas de taux significativement élevé d'anticorps anti-Fas.

De ce fait, les sérums de SLA ne contenaient pas de FasL soluble à des taux significativement élevés à l'inverse des taux d'anticorps anti-Fas.

#### **.IV Rôle pro-apoptotique des anticorps anti-Fas présents dans les sérums de SLA sur la lignée neuroblastique humaine**

Les inhibiteurs des caspases -8 et -3 bloquaient chacun l'apoptose des cellules neuroblastiques induite par les sérums de SLA ayant des taux élevés d'anticorps anti-Fas. Ainsi, par la méthode ELISA-apoptose, l'index apoptotique moyen de ces sérums après 48h d'exposition était de  $2,67 \pm 0,31$  contre  $0,9 \pm 0,47$  et  $0,79 \pm 0,32$  en présence, respectivement, des inhibiteurs de la caspase-8 et de la caspase-3. Comme contrôle positif, les inhibiteurs bloquaient également de façon similaire l'apoptose induite par l'anticorps anti-Fas monoclonal agoniste B-G30. De façon intéressante, ces inhibiteurs ne modifiaient pas l'apoptose des cellules neuroblastiques induite par 2 sérums de SLA ne contenant pas de taux élevés d'Ac anti-Fas, ni le faible taux d'apoptose observé en présence des sérums de contrôles normaux.

De plus, la pré-incubation des cellules neuroblastiques humaines avec l'Ac anti-Fas antagoniste B-G34 permettait de diminuer de façon significative l'effet apoptotique des sérums de SLA qui contenaient des taux élevés d'autoanticorps anti-Fas ( $2,1 \pm 1,06$  contre  $4,27 \pm 3,76$  sans B-G34;  $p < 0,002$ ). Au contraire, B-G34 n'affectait pas l'apoptose des neuroblastes induite par 3 sérums de SLA sans Ac anti-Fas ( $2,82 \pm 1,45$  contre  $1,75 \pm 0,33$ ;  $p > 0,5$ ).

#### **.V Réactivité des sérums de SLA avec les cellules neuroblastiques et les motoneurones de rats**

En immunofluorescence indirecte, les sérums de SLA qui contenaient des taux élevés d'autoanticorps anti-Fas marquaient fortement la membrane d'environ 30 % des cellules

neuroblastiques humaines. Ces cellules étaient également fortement marquées par l'Ac anti-Fas B-G27.

Les sérums de SLA ayant des taux d'anticorps anti-Fas significatifs réagissaient également avec la membrane des neurones dans les cultures primaires de cerveaux et de moelles épinières de rat. Les études réalisées en double marquage avec l'anticorps monoclonal SMI-32 ont permis de montrer que ces sérums de SLA réagissaient exclusivement avec les neurones marqués par l'Ac SMI-32 (figure 14) ou par l'anticorps anti-Fas B-G34 (figure 15).

Aucun marquage n'a été observé avec les conjugués employés sans anticorps de première couche ni avec les contrôles isotypiques.

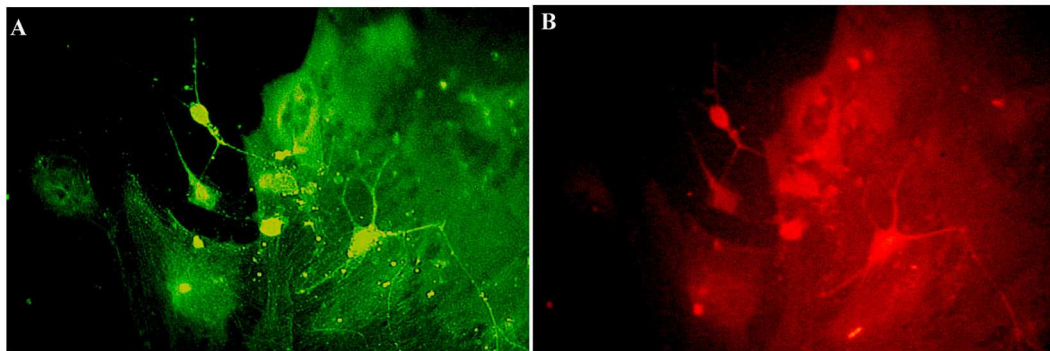


Figure 14. Mise en évidence de la réactivité d'un sérum de malade atteint de SLA (A) avec des motoneurones identifiés par l'anticorps monoclonal SMI-32 (B) en double-marquage dans des cultures primaires de cerveaux de rats embryonnaires. (X 200).

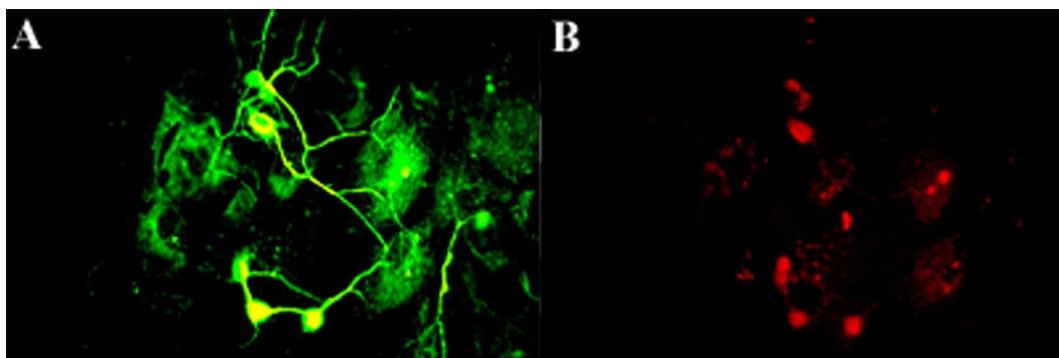


Figure 15. Mise en évidence de la réactivité d'un sérum de malade atteint de SLA (A) et de l'anticorps monoclonal anti-Fas B-G34 (B) en double-marquage avec des neurones de cultures primaires de cerveaux de rats embryonnaires.(X 200).

## .VI Expression du récepteur Fas par les motoneurones murins

L'expression d'une protéine membranaire reconnue par l'anticorps monoclonal anti-Fas a été recherchée au niveau des neurones de cultures mixtes d'encéphale ainsi que de moelle épinière de rat E16 avec l'anticorps monoclonal B-G27 (IgG2a) directement couplé à la fluorescéine. Un marquage homogène de la membrane, intéressant le corps cellulaire et les prolongements neuronaux a été observé uniquement au niveau des cellules doublement marquées par l'anticorps monoclonal SMI-32 (IgG1) (figure 16).

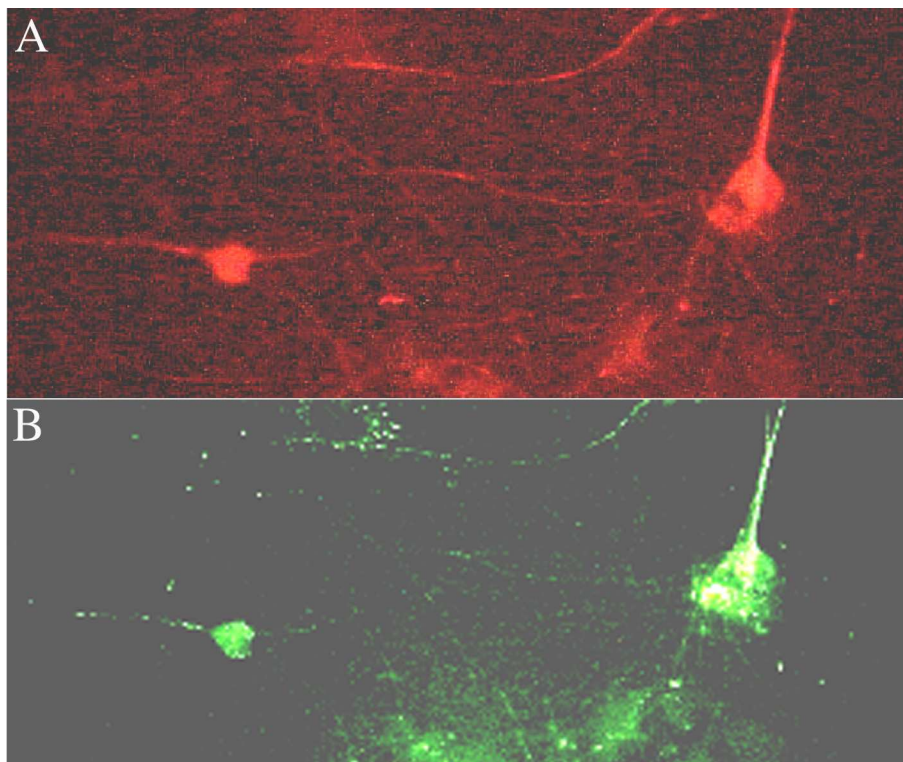


Figure 16. Double-marquage en immunofluorescence indirecte des neurones de cultures mixtes d'encéphales de rats E 16 par les anticorps monoclonaux B-G27 et SMI-32.

A : marquage cytoplasmique des motoneurones par l'anticorps SMI-32 (1/1000) révélé par un antisérum de chèvre anti-Ig G1 de souris couplé à la biotine puis par un conjugué streptavidine-phycoérythrine. B : même champs, double- marquage membranaire des même cellules par l'anticorps anti-Fas B-G27 couplé à la fluorescéine. (X 200).

## **.VII Induction de l'apoptose motoneuronale par la voie de Fas dans des cultures mixtes de SNC de rats**

Par la méthode TUNEL, nous avons observé que l'incubation, pendant 24h, avec du FasL soluble ou un anticorps anti-Fas agoniste (B-K14) induisait exclusivement l'apoptose des neurones marqués par l'anticorps SMI-32 contenus dans les cultures mixtes de cerveaux ou de moelles épinières de rats. De plus, l'apoptose induite par FasL ou par l'anticorps B-K14 était complètement inhibée en présence d'un inhibiteur de la caspase-8.

Pour contrôler la spécificité du double-marquage par SMI-32 et la méthode TUNEL des neurones en apoptose, l'expérimentation a été réalisée avec un anticorps irrelevant anti-GFAP qui ne marquait que le cytoplasme de cellules TUNEL négatives, de morphologie astrocytaire.

De plus, l'effet apoptotique de 17 sérums de SLA a été étudié, dont 7 présentaient des taux élevés d'anticorps anti-Fas et induisaient l'apoptose des cellules de la lignée neuroblastique humaine (figure 17). Après 24h d'incubation, un marquage TUNEL, restreint aux neurones marqués par l'Ac SMI-32, était alors observé pour 9 des 17 sérums. En outre, l'apoptose induite par les sérums de SLA était bloquée par l'inhibiteur de la caspase-8 pour tous sauf deux des sérums de SLA.

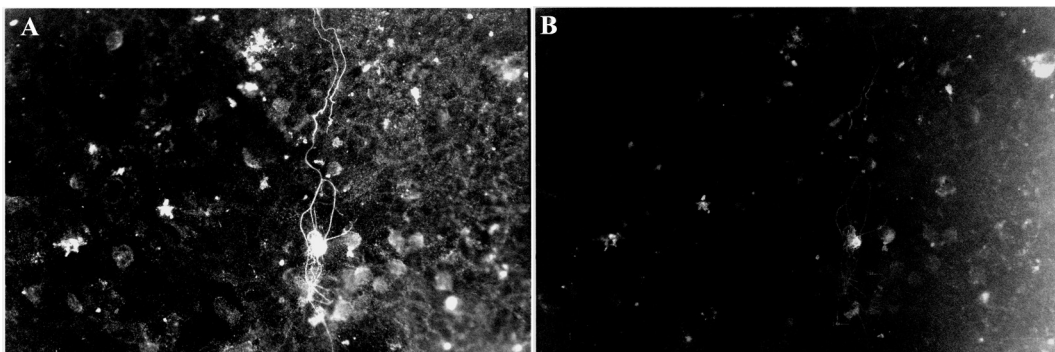


Figure 17. Apoptose des motoneurones murins induite par un sérum de SLA.

L'apoptose induite par un sérum de malade atteint de SLA (dilution 1/10 pendant 24 heures) au niveau des neurones moteurs, identifiés par double-marquage avec l'anticorps SMI-32 (A) est détectée par la méthode TUNEL (B) dans des cultures mixtes d'encéphales de rats E16.

Au contraire, seuls deux des 16 sérums de contrôles normaux testés induisaient l'apoptose de cellules contenues dans les cultures mixtes de SNC de rat et, de plus, le marquage TUNEL n'était pas restreint aux neurones marqués par SMI-32 puisque des cellules de morphologie neuronale mais SMI-32-négatives étaient détectées après exposition aux sérums de sujets normaux.

# **IMMUNISATION DE SOURIS PAR LA PROTEINE FAS HUMAINE DE NEUROBLASTES OU DE LYMPHOCYTES T**

Cette étude a été réalisée avec l'aide du Dr Caroline BODA, vétérinaire et doctorante à l'institut d'épidémiologie et de neurologie tropicale (Pr. M. DUMAS).

## **.I Observations et analyses histologiques**

Les souris ont été examinées quotidiennement après la dernière injection de la protéine Fas (t=0) afin d'observer l'apparition de troubles moteurs et/ou comportementaux. Durant toute la durée de nos expérimentations, aucun trouble moteur apparent (paralysie) n'a pu être observé chez aucune des souris.

### **.I.1 Détection d'ascite**

Au bout de 34 jours, les souris 1 et 2 du lot immunisé avec la protéine Fas neuroblastique (lot N) ont développé une ascite révélée par un gonflement abdominal. Une ponction intra-péritonéale a ramené 10 ml de liquide citrin pour chacune des souris N1 et N2. Deux autres ponctions d'ascite ont été par la suite effectuées, de 4 ml chacune chez les souris N1 et N2. Aucun agent infectieux n'a été détecté dans ces 2 ascites par les analyses effectuées dans le service de bactériologie et de virologie du CHU de Limoges (Pr F. Denis).

Les liquides d'ascite ont été examinés par le Pr F. Labrousse (Service d'Anatomie Pathologique du CHU de Limoges). Ils révèlent une réaction inflammatoire constituée en majorité de polynucléaires neutrophiles non altérés auxquels sont associés des lymphocytes,



des macrophages et des cellules mésothéliales réactionnelles. Aucune cellule suspecte de malignité n'a été identifiée.

Trois mois après la dernière immunisation, une diminution de l'activité motrice des souris N1 et N2 était observable par rapport aux autres souris des lots N, J et C.

Les souris ont été sacrifiées 7 mois après la dernière immunisation (sauf la souris N1 morte spontanément à 5 mois). Des prélèvements ont été effectués au niveau du foie, du cerveau, et de la moelle épinière pour des analyses anatomo-pathologiques et des études ultérieures en microscopie électronique.

## .I.2 Mise en évidence d'anomalie de la motricité

Afin de déterminer une éventuelle atteinte motoneuronale, des épreuves motrices ont été réalisées. Les souris des lots N, J et C ont toujours réussi le test de la cheminée et aucun trouble moteur n'a pu être décelé par ce test.

Au contraire, les souris N1 et N2 ont toujours échoué au test de la traction à partir d'un mois après la dernière injection, période qui coïncide avec la détection de l'ascite chez ces souris. Trois mois après la dernière injection, la souris N3 a également échoué à ce test et, à partir du quatrième mois après la dernière injection, toutes les souris du lot N échouaient au test de la traction. A l'inverse, les souris des lots C et J ont toutes réussi ce test jusqu'à la fin de l'étude au 7<sup>ème</sup> mois.

## .I.3 Etudes macroscopiques des souris

L'examen *post-mortem* des souris N1, N2, N3, et N4 montrait, macroscopiquement, une fibrose péritonéale diffuse avec adhérence péri-hépatique. Une ascite légère a pu également être observée, avec une décoloration du foie associée à une augmentation du volume hépatique. La rate était également augmentée de volume et associée à de nombreux ganglions lymphatiques hypertrophiés abdominaux pour les souris N1, N2 et N4. En outre, la souris N2 présentait une atteinte inflammatoire avec une fibrose généralisée de la cavité

abdominale. Le reste des organes (cœur, muscle, poumons) était d'aspect normal. L'examen histologique du foie de la souris N2, qui présentait les signes macroscopiques les plus marqués, a été effectué par le Pr Labrousse et a montré que les lésions hépatiques correspondaient à une hépatite chronique inflammatoire.

Les souris des lots J et C ne présentaient aucune lésion macroscopique hépatique ou spléno-ganglionnaire, ni d'ascite dans la cavité abdominale.

## .II Recherche d'anticorps anti-Fas

### .II.1 Etude par ELISA

La technique ELISA de dosage des anticorps anti-Fas nous a permis de détecter la présence d'anticorps dirigés contre la protéine Fas dans les sérums des souris. Les résultats, exprimés en DO corrigée, sont positifs pour un seuil de DO corrigée établi lors de chaque expérimentation d'après les résultats obtenus avec les sérums des souris contrôles (moyenne plus 2 écart-type) et fixé à 0,5.

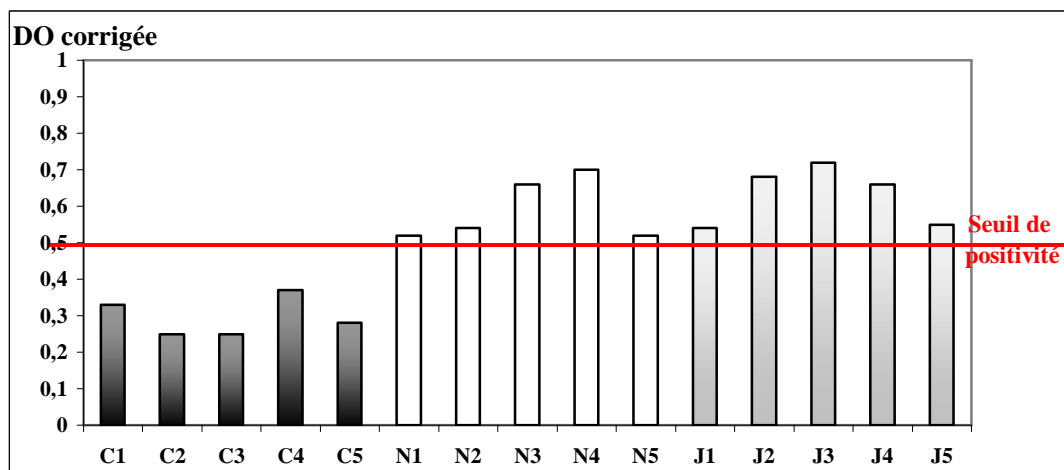


Figure 18. Détection d'autoanticorps anti-Fas par ELISA sensibilisé avec la protéine Fas neuroblastique dans les sérums des souris contrôles (C 1-5) ou immunisées avec la protéine Fas neuroblastique (N 1-5) ou lymphocytaire (J 1-5).

Les tests ELISA réalisés avec la protéine Fas neuroblastique comme antigène ont montrés la présence d'anticorps dirigés contre cette protéine dans le sérum de toutes les souris des lots N et J à des taux supérieurs au seuil de positivité établi (figure 18). Le test ELISA sensibilisé avec la protéine Fas lymphocytaire comme substrat a montré des résultats similaires pour toutes les souris à l'exception de N1 et N2 pour lesquelles les taux sériques d'anticorps anti-Fas étaient alors inférieurs au seuil de positivité établi (figure 19).

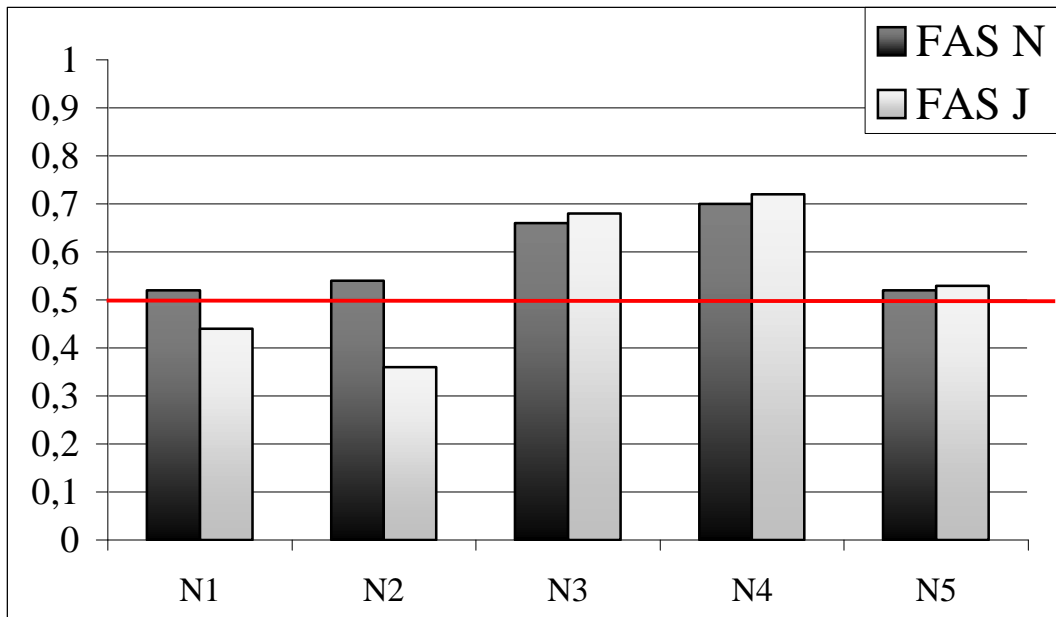


Figure 19. Comparaison des taux sériques d'anticorps anti-Fas des souris du lot N détectés par ELISA sensibilisé avec les protéines Fas neuroblastique ou lymphocytaire

## .II.2 Etude par Western-Blotting

Par Western-blotting réalisé avec des lysats cellulaires totaux de cellules Jurkat ou de cellules neuroblastiques, la protéine Fas identifiée avec l'anticorps anti-Fas Clone 13 correspondait à une protéine de 50 kDa dans les 2 types de lysats. Cette protéine de 50 kDa a été également reconnue dans les deux types de lysats par les sérums de toutes les souris des lots N et J prélevés à 60 jours, avec une intensité similaire ce qui conforte la présence d'une réactivité anti-Fas dans les sérums de ces souris immunisées. Au contraire, les sérums des souris contrôles C ne présentaient aucune réactivité vis à vis des lysats de cellules neuroblastiques ni lymphocytaires.

### .III Analyse de la réactivité de l'ascite par Western-blot

L'analyse en Western-blot des ascites des souris N1 et N2 avec des lysats totaux de neuroblastes ou de cellules Jurkat révèle une réactivité unique vis à vis d'une protéine exclusivement neuroblastique d'environ 70 kDa. En outre, la réactivité des ascites vis à vis de lysats de protéines totales de foie de souris a été explorée. Nous avons alors mis en évidence une forte réactivité de l'ascite pour une protéine de 50 kDa qui était également reconnue par l'anticorps monoclonal anti-Fas clone 13 (figure 20).

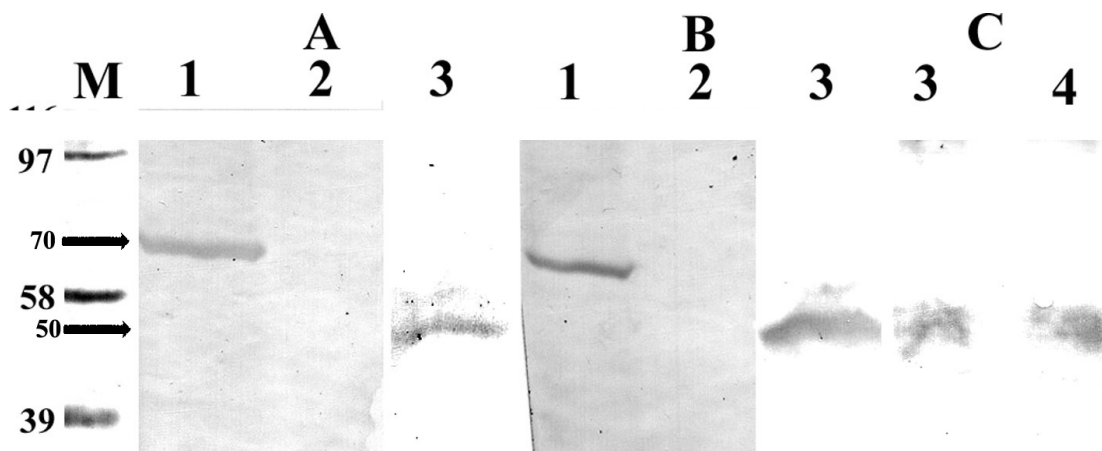


Figure 20. Réactivité des ascites des souris N1 (A) et N2 (B) avec des lysats de protéines extraites des lignées humaines neuroblastiques (1), lymphocytaires (2), ou d'un foie de souris adulte normale (3). C : Identification de la protéine Fas par l'anticorps monoclonal anti-Fas clone 13. La protéine Fas immunopurifiée à partir de la lignée Jurkat est utilisée comme contrôle (4).

SDS-PAGE à 12% d'acrylamide. La réactivité est révélée par un antisérum de chèvre anti-Ig totales de souris couplé à la peroxydase suivie par une coloration à la diaminobenzidine.

La protéine de 70 kDa n'est pas actuellement caractérisée, sa migration électrophorétique était comparable à celle de la protéine reconnue par l'Ac anti-NF (2F11) étudié dans les mêmes conditions. L'hypothèse d'une réactivité du liquide d'ascite avec la sous-unité légère du neurofilament reste à déterminer par séquençage.

# EXPRESSION DE FAS DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL FOETAL HUMAIN

Ces résultats ont été publiés (Lautrette et al., 2003) (publication n°3).

## **.I Expression de Fas dans des cultures primaires de cerveaux et de moelles épinières fœtales humaines**

Les cultures primaires réalisées à partir de cerveaux ou de moelles épinières isolées de foetus humains de 8 à 10 semaines présentaient après 10 jours de culture des amas de neurones, émettant des expansions neuritiques, qui se développaient sur un tapis de cellules gliales adhérentes constitué d'astrocytes (figure 21). L'identification des cellules a été réalisée par IFI avec des anticorps spécifiques de chaque marqueurs cellulaires (GFAP, NF, CD68).

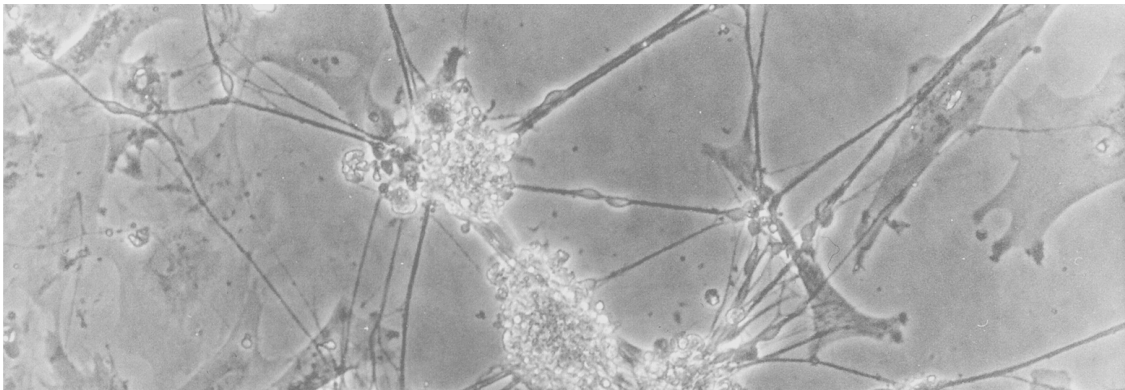


Figure 21. Observation en microscopie inversée d'une culture primaire de cerveaux fœtaux humains de 14 jours. (X 200).

Seules les cellules ayant une morphologie neuronale sont marquées par les anticorps anti-Fas B-G27 et B-G30 (figure 22, A2). L'expression de Fas était restreinte aux cellules neuronales (NF-positives) ; les cellules astrocytaires (GFAP-positives) et microgliales (CD68-positives) ne présentaient aucun marquage Fas.

De plus, les double-marquage réalisés d'une part avec l'anticorps anti-Fas B-G27 et l'anticorps SMI-32 (figure 22, A1), ou, d'autre part, avec l'anticorps anti-Fas B-G30 (figure 22, A4) et avec l'anticorps anti-acétylcholinestérase (AChE) (figure 22, A3) étaient strictement superposables, tant pour les cultures primaires issues de cerveaux que de moelles épinières.

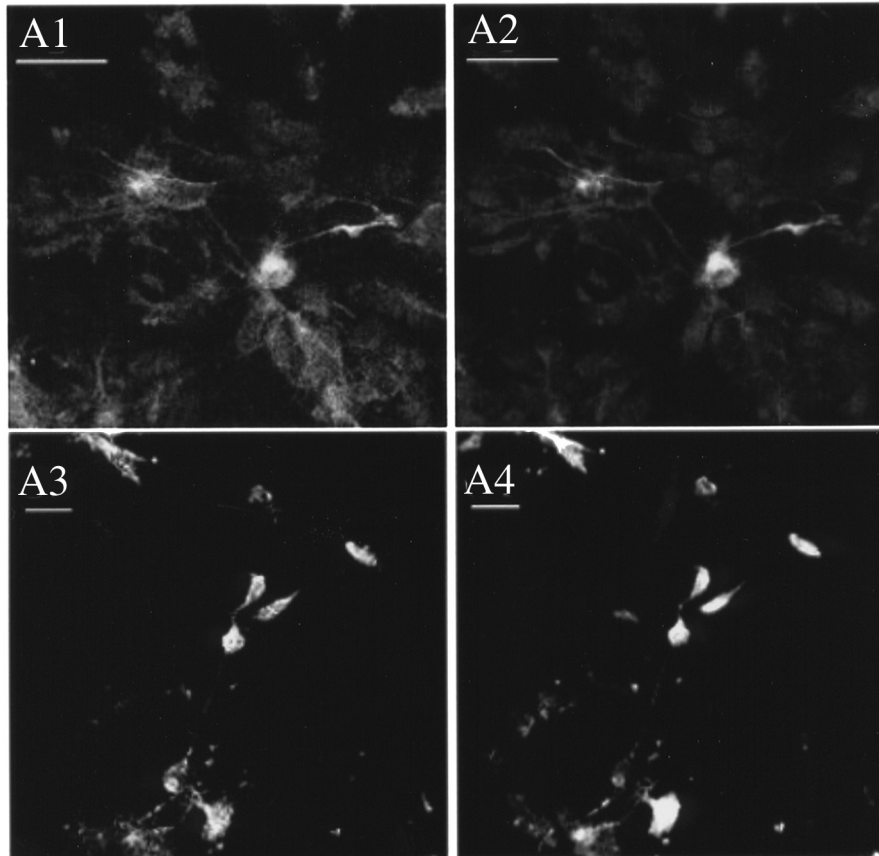


Figure 22. Expression de Fas dans les cultures primaires de cerveaux de foetus humains.

Double-marquage des motoneurones soit avec l'Ac SMI-32 (A1) et l'Ac anti-Fas B-G27-FITC(A2) ; soit avec l'Ac anti-acétylcholinestérase (A3) et l'Ac anti-Fas B-G30 (A4). Barre = 20 µm.

De plus, l'analyse en microscopie confocale a montré que le récepteur Fas n'était pas réparti uniformément à la surface des cellules motoneuronales mais que son expression était localisée à certaines zones de la membrane (figure 23).

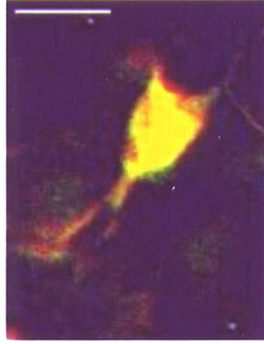


Figure 23. Expression de Fas (vert) par un motoneurone humain fœtal (rouge) dans une culture mixte de cerveaux embryonnaires humains.

L'expression de Fas (révélé par l'anticorps anti-Fas monoclonal B-G27-FITC) est détectée dans un neurone moteur identifié avec le marqueur SMI-32 révélé par un anti-Ig G1 de souris couplé à la biotine et révélé par un complexe streptavidine-phycoérythrine. (microscopie confocale, barre = 10  $\mu$ m).

En outre, l'étude immunohistochimique réalisée avec des sections de tissus de moelles épinières fœtales a révélé au niveau des zones motrices ventrales une co-localisation du marquage obtenu avec les anticorps B-G27 et SMI-32 (figure 24). De même, l'Ac anti-AchE marque la même aire corticale de cerveau fœtal humain que l'anticorps anti-Fas B-G30.

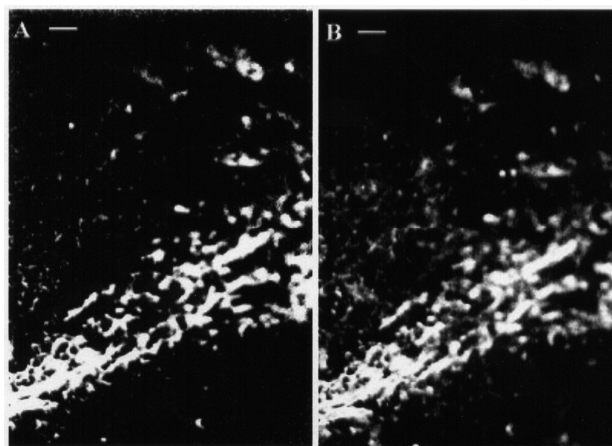


Figure 24. Etude immunohistochimique de l'expression de Fas par les neurones moteurs dans une coupe transversale de la zone ventrale de la moelle épinière dorsale d'un embryon humain âgé de 10 semaines.

Le même protocole que précédemment a été utilisé.

## **.II Apoptose des motoneurones fœtaux humains induite par FasL**

Dans des conditions basales de culture, un marquage des noyaux apoptotiques par la méthode TUNEL était détecté pour 8,7 % des cellules de cultures primaires issues de cerveaux, ou 9,1 % dans celles issues de moelle épinière. Ces cellules étaient toutes doublement marquées par l'anticorps anti-GFAP, le marqueur astrocytaire. Aucun double marquage n'était détectable avec les anticorps anti-CD68, -160 kDa NF et SMI-32. La lignée cellulaire Jurkat, utilisée comme contrôle de référence dans l'apoptose induite par FasL, présentait un taux d'apoptose basale de  $5,5 \pm 0,5$  % (figure 26).

Après 48 heures d'exposition à FasL, l'apoptose cellulaire globale était de 9,2 % pour les cultures issues de cerveaux, et 9,7 % dans les cultures issues de moelles épinières. Cette apoptose induite par FasL ne concernait pas les cellules gliales astrocytaires. En effet, 7,8 % des cellules des cultures de cerveaux, et 8,2 % pour celles de moelles épinières, présentaient un double-marquage par la méthode TUNEL et l'Ac anti-GFAP, qui était similaire aux conditions de culture basales ( $p = 0,64$  ; test du  $X^2$ ).

Au contraire, après exposition des cultures primaires de SNC à FasL pendant 48 heures, une augmentation de l'apoptose des neurones moteurs (identifiés par l'anticorps SMI-32 et les caractéristiques morphologiques) était détectée. En effet,  $28,5 \pm 3,3$  % (pour le cerveau) et  $29,4 \pm 6,3$  % (pour la moelle épinière) des motoneurones présentaient un marquage par la méthode TUNEL (figure 25 et 26). Cette augmentation de l'apoptose motoneuronale induite par FasL était significative par rapport aux conditions basales de culture ( $p < 0,05$ ) pour les deux tissus (figure 25 et 26). Le contrôle positif Jurkat présentait  $71 \pm 3,5$  % de cellules marquées en TUNEL après 48 heures d'exposition à FasL (augmentation significative par comparaison aux conditions basales ;  $p < 0,05$ ) (figure 25 et 26). Par contre, 24 heures d'exposition à FasL n'augmentait pas l'apoptose des cellules motoneuronales dans les cultures primaires de SNC. Ceci contraste avec ce qui est observé dans les cellules de la lignée Jurkat dont 45 % des cellules étaient en apoptose (détectée par la méthode TUNEL).



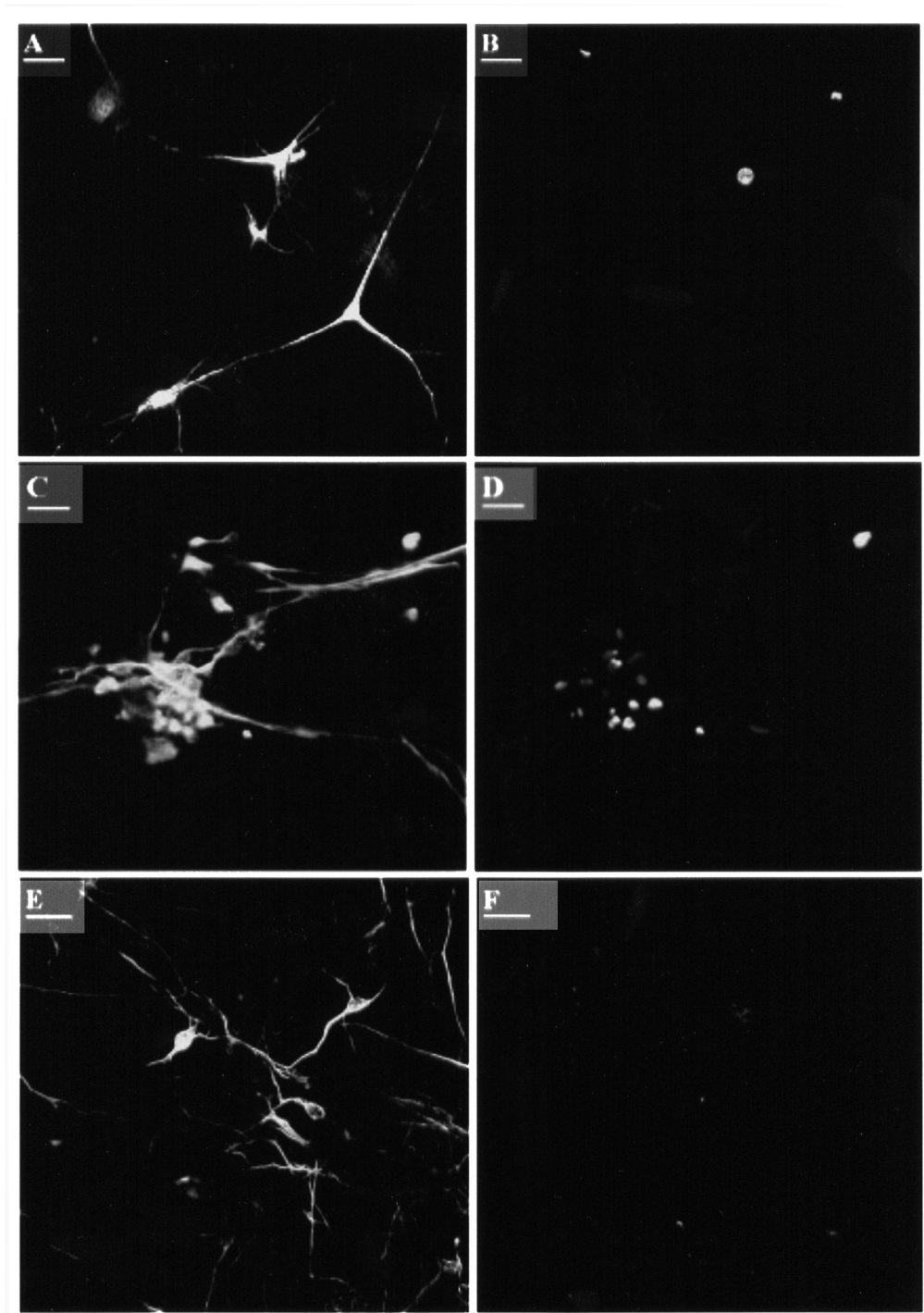


Figure 25. Apoptose des motoneurones par la voie de Fas.

Apoptose (marquage TUNEL en B, D et F) des motoneurones de culture de moelle épinière humaine (identifiés avec l'anticorps monoclonal SMI-32 en A, C and E) après exposition à FasL pendant 48 heures avec (E, F) ou sans (C, D) inhibiteur de caspase-8. L'apoptose détectée dans des conditions basales (milieu de culture seul) (B) ne correspond pas aux cellules marquées par SMI-32 (A). (microscopie confocale, barre = 20  $\mu\text{m}$ ).

### .III Effet de l'inhibiteur de la caspase-8 sur l'apoptose des motoneurones fœtaux humains induite par FasL

L'incubation avec l'inhibiteur de la caspase-8 ne modifiait pas l'apoptose basale des cellules de la lignée Jurkat ni des culture primaires fœtales humaines de SNC ( $p = 0,9$  par comparaison aux conditions basales). En double marquage, ces cellules en apoptose n'étaient marquées que par l'anticorps anti-GFAP et non par le marqueur neuronal NF-M, ou microglial (CD68) ou motoneuronal (SMI-32).

En présence de FasL, l'inhibiteur de la caspase-8 inhibait complètement l'apoptose des motoneurones (identifiés par l'Ac SMI-32) dans les cultures primaires fœtales de cerveau ou de moelle épinière ( $p = 0,022$ ; test de Fisher) (figure 25 et 26). Les cellules TUNEL-positives étaient toutes doublement marquées par l'anticorps anti-GFAP. Pour les cellules contrôles Jurkat, l'inhibiteur de caspase-8 diminuait fortement l'apoptose induite par FasL (4,7 %,  $p < 0,05$ ) (figure 26).

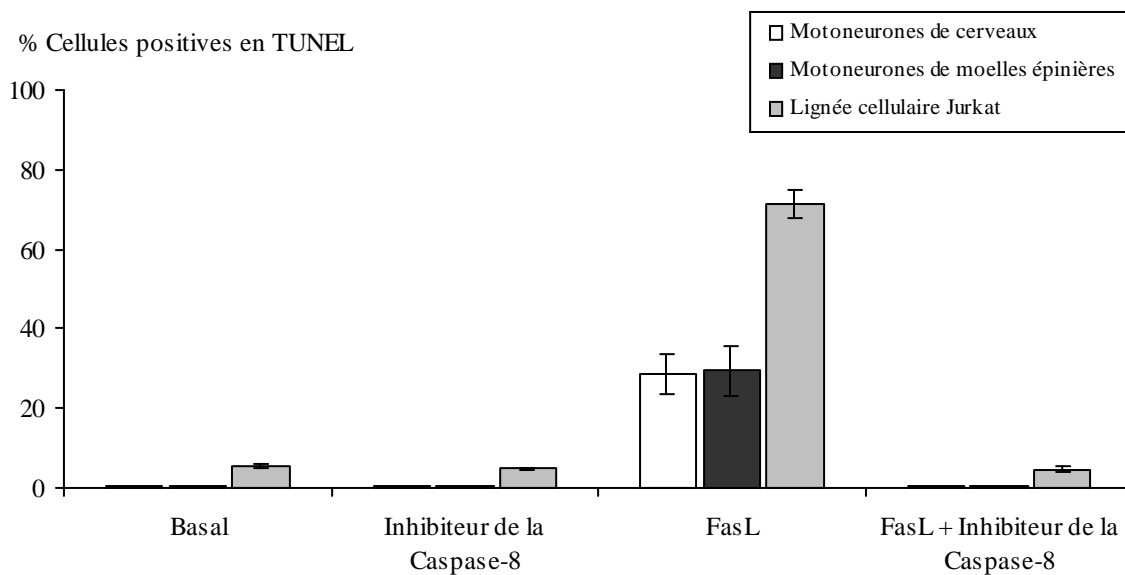


Figure 26. Apoptose induite par FasL dans des cultures mixtes de neurones en présence ou non de l'inhibiteur de la caspase-8. La lignée Jurkat est utilisée comme contrôle positif.

# **PURIFICATION DE CELLULES NEURONALES IMMATURES DE LA LIGNEE SH-SY5Y PAR SdFFF**

Ces résultats ont été publiés (Lautrette et al., 2003) (publication n°2).

## **.I Aspects microscopiques**

### **.I.1 Observation en microscopie inversée des cultures de la lignée neuroblastique SH-SY5Y**

La lignée neuroblastique SH-SY5Y présentait en microscopie inversée deux types cellulaires morphologiquement distincts dans nos conditions de culture. Le premier aspect était celui de cellules adhérentes de grande taille avec des expansions neuritiques. Le second correspondait à des cellules de petite taille, sphériques, sans expansion neuritique et regroupées en amas formant des neurosphères (figure 27).

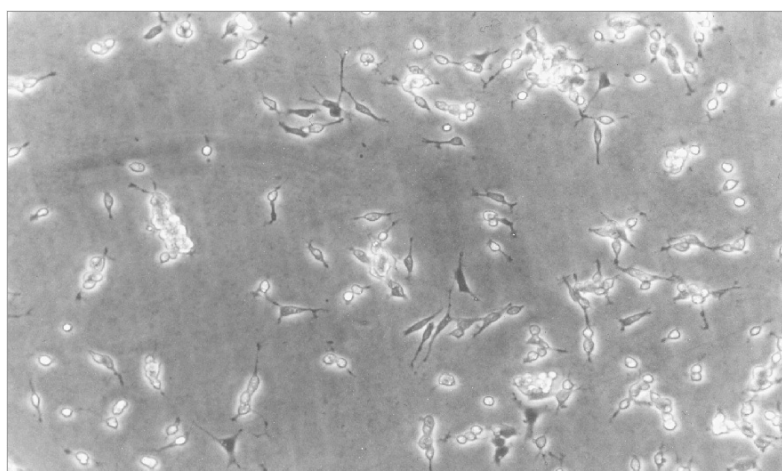


Figure 27. Aspect en microscopie inversée des cellules de la lignée SH-SY5Y. (X 200).

## .I.2 Aspects en microscopie inversée des cellules SH-SY5Y contenues dans les fractions séparées par SdFFF

La technique de SdFFF nous a permis de séparer dans la lignée neuroblastique trois populations cellulaires présentant des caractéristiques de taille et de poids distinctes. La fraction F1 représentait la population des cellules de grande taille, la fraction F2 celle des cellules de taille moyenne, et la fraction F3 celle des cellules de plus petite taille. La fraction TP correspond à la totalité des cellules éluées par l'appareil de séparation et sert de contrôle des altérations cellulaires induites par l'élué. Une partie des cellules (N) ne subit aucune séparation et correspond aux cellules de la lignée totale dans les conditions normales de culture.

La numération au bleu Evans montrait que  $95 \pm 3\%$  des cellules étaient viables dans la population normale (N) contre  $91 \pm 0,5\%$  dans les fractions TP, F1, F2, et F3. Chacune des fractions éluées était remise en culture dans des conditions identiques à celle de la population N. La moitié du milieu était renouvelée tous les 3 jours.

La fraction F2 a permis d'observer après 3 jours de culture une population cellulaire mixte regroupant les différents aspects morphologiques observés dans les conditions de culture normale. Les mêmes résultats ont également été obtenus avec les fractions TP et N. Les cellules de F2 remises en culture ont rapidement proliféré pour atteindre leur confluence en 6 jours. Il s'agissait de cellules de grande taille et adhérentes et de cellules sphériques de plus petite taille regroupées en neurosphères. La mortalité cellulaire était alors comparable entre les fractions éluées par SdFFF ( $4 \pm 1\%$  dans les fraction F2 et TP et  $4 \pm 2\%$  pour la fraction normale).

La fraction F1 après 3 jours de culture, contenait uniquement des cellules de grande taille et adhérentes et présentant des expansions neuritiques. Cependant, aucune prolifération cellulaire n'était observable après 6 jours de culture. A cette période, les cellules ont alors toutes dégénéré.

La fraction F3 était constituée de petites cellules sphériques, très faiblement adhérentes, et regroupées en amas. Aucune prolifération cellulaire n'a été observée après 6 jours de maintien en culture, période à laquelle les cellules ont rapidement dégénéré.

## **.II Caractérisation par IFI**

### **.II.1 Caractérisation de la lignée cellulaire SH-SY5Y**

La pureté de la lignée SH-SY5Y a été vérifiée au moyen de marqueur cellulaire neuronaux (anti-NF-M), astrocytaires (anti-GFAP) et microglial (anti-CD68). La totalité des cellules était marquée par l'anticorps anti-NF-M (figure 28) et aucun marquage n'a été détecté avec les anticorps anti-GFAP et anti-CD68, confirmant le strict lignage neuronal de notre lignée SH-SY5Y.

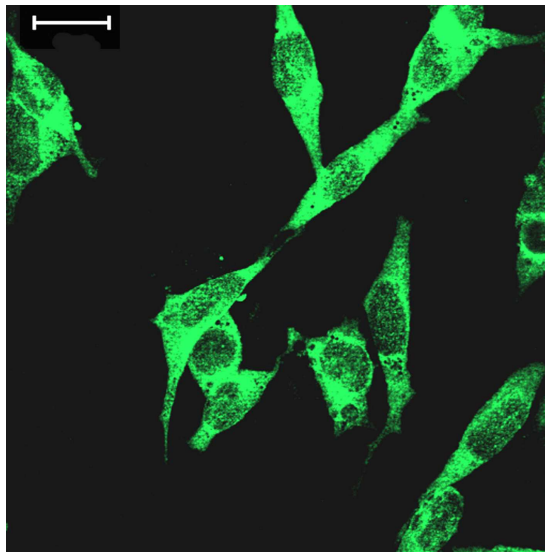


Figure 28. Caractérisation du lignage neuronal des cellules SH-SY5Y.

Marquage cytoplasmique des cellules de la lignées neuroblastique SH-SY5Y par l'anticorps anti-NF-M (NN18) révélé par un antiserum de chèvre anti-Ig totale de souris couplé à l'alexafleur-488. Barre = 10  $\mu$ m.

## .II.2 Expression de Fas et N-CAM par les cellules SH-SY5Y

### .II.2.1 Etude sur la population totale

Par IFI réalisée avec les Ac anti-Fas B-G27 et B-G30, une forte expression du récepteur Fas est détectée à la surface des cellules de petite taille regroupée en neurosphères. A l'inverse, aucun marquage significatif n'était observé à la surface des cellules adhérentes de grande taille (figure 29).

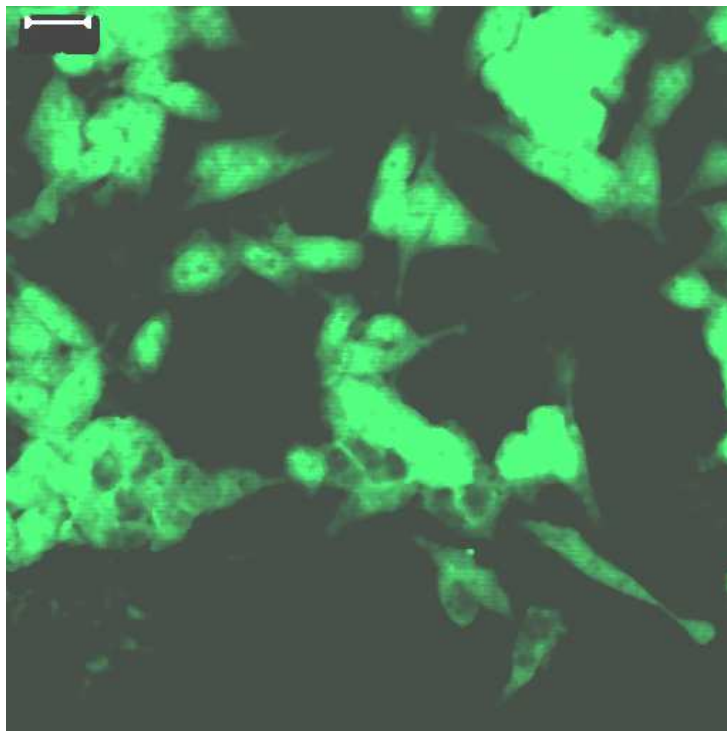


Figure 29. Expression hétérogène de la protéine Fas par les cellules SH-SY5Y.

Marquage membranaire des cellules de la lignées neuroblastique SH-SY5Y par l'anticorps anti-Fas B-G27 révélé par un antisérum de chèvre anti-Ig totale de souris couplé à l'alexfluor-488. Barre = 10  $\mu$ m.

L'Ac anti-N-CAM marquait fortement la membrane des cellules neuroblastiques adhérentes et de grande taille à l'inverse des petites cellules sphériques regroupées en amas où aucun marquage n'était détectable.

## .II.2.2 Etude des populations séparées par SdFFF

Les fractions contrôles TP et N présentaient un pourcentage similaire de cellules exprimant Fas ( $71 \pm 2,3$  % pour TP et  $68 \pm 1,15$  % pour N) ainsi que la fraction d'éluion F2 bien que légèrement plus élevé ( $80,4 \pm 2,9$  %). L'expression de N-CAM était similaire à celle de Fas pour ces 3 fractions ( $67 \pm 3,1$  % pour TP et  $65 \pm 4$  % pour N et  $80,8 \pm 0,5$  % pour F2).

Au niveau de la fraction F1, qui correspond aux cellules de plus grande taille, très peu de cellules exprimaient Fas ( $4,5 \pm 2,6$  %) mais en revanche,  $96,8 \pm 2,1$  % des cellules exprimaient N-CAM.

Dans la fraction F3, correspondant aux cellules sphériques de plus petite taille, seulement  $5,7 \pm 3,3$  % des cellules exprimaient la N-CAM mais  $98 \pm 1,2$  % d'entre elles exprimaient le récepteur Fas (figure 30).

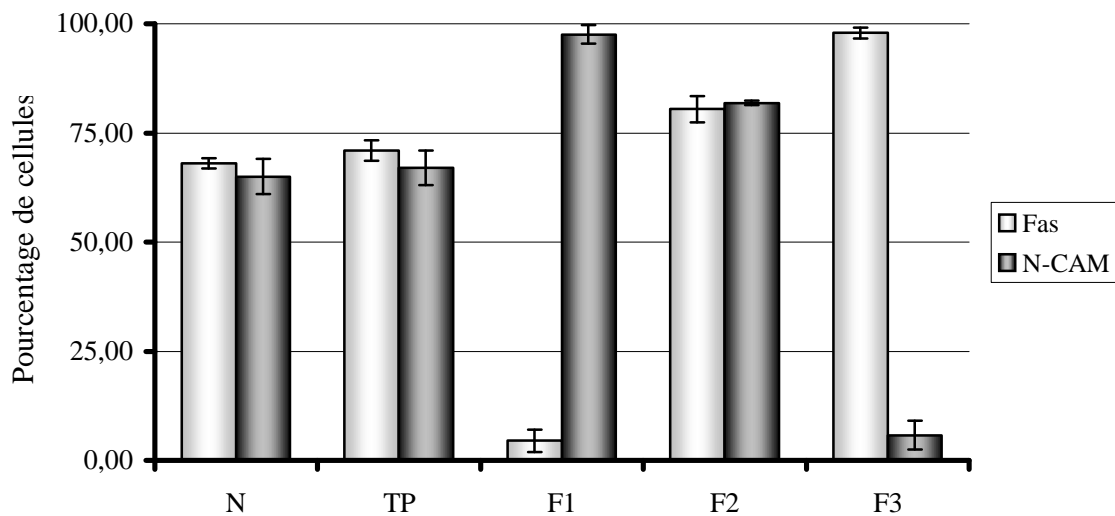


Figure 30. Expression de Fas et de la N-CAM par les cellules neuroblastiques humaines triées par SdFFF.

# **PHOSPHORYLATION EXTRACELLULAIRE DE LA PROTÉINE FAS**

## **.I Détection de la protéine Fas monomérique et agrégée immunopurifiée à partir de la lignée lymphocytaire Jurkat**

La protéine Fas immunopurifiée par l'anticorps monoclonal anti-Fas B-G27 a été analysée par Western-blotting à l'aide de deux Ac anti-Fas distincts dirigés contre la partie intracellulaire carboxy-terminale du récepteur : l'antisérum de lapin C-20 et l'Ac monoclonal de souris 3D5 qui reconnaissent tous les deux en Western-blot la protéine Fas sous forme agrégée et sous forme monomérique (Kamitani et al., 1997 ; Ruiz-Ruiz et al., 1999 ; Lee et al., 2001).

Les mêmes résultats ont été obtenus avec ces deux Ac. Dans des conditions basales, l'immunomarquage majeur correspondait à la protéine Fas monomérique de 50 kDa. Deux autres protéines d'environ 116 kDa et 180 kDa sont plus faiblement marquées et correspondraient à la protéine Fas sous forme agrégée (Yeh et al., 1997; Lopez-Rivas et al., 1999) (figure 31).

Après stimulation des cellules par FasL, la réactivité des deux Ac anti-Fas avec la protéine de 50 kDa était identique. Par contre, une augmentation du marquage des protéines de 116 et 180 kDa était détectée et s'associait à une nouvelle réactivité avec une protéine de 220 kDa pouvant correspondre aux agrégats de haut poids moléculaire de Fas (figure 31).

## **.II Phosphorylation extracellulaire de Fas par le [ $\gamma$ P<sup>32</sup>] ATP**



Les études de la phosphorylation extracellulaire de la protéine Fas purifiée à partir de la lignée lymphocytaire T Jurkat ont été réalisées avec le  $[\gamma\text{P}^{32}]\text{ATP}$ . Les analyses au « phosphoimager » et en autoradiographie ont montré que la bande de 116 kDa était phosphorylée dans des conditions basales. Aucune autre phosphorylation n'a été détectée (figure 31).

Afin de vérifier que cette phosphorylation était vraiment extracellulaire, des tests de phosphorylation compétitive ont été réalisés. En présence d'ATP en excès (1 mM) par rapport au  $[\gamma\text{P}^{32}]\text{ATP}$ , aucune phosphorylation n'a pu alors être détectée. De plus, en présence de Pi (1 mM) également en excès, aucune modification de la phosphorylation n'était détectée, prouvant que la phosphorylation du récepteur Fas observée était bien strictement extracellulaire et n'était pas un artefact lié à la dégradation du  $[\gamma\text{P}^{32}]\text{ATP}$  par des phosphatases extracellulaires (qui auraient alors permis l'incorporation du  $\gamma\text{P}^{32}$  ainsi généré à de l'ATP intracellulaire utilisé à son tour comme substrat de phosphorylation intracellulaire).

### **.III Des inhibiteurs extracellulaires de la PKC bloquent la phosphorylation de Fas et augmentent son agrégation**

Après incubation des cellules Jurkat avec le K252b, un inhibiteur extracellulaire de la PKC (Zhu et al., 1997 ; Saito et al., 1999 ; Teshima et al., 1999), les analyses par Western-blotting montraient, après immunopurification, que la protéine de 50 kDa correspondant au Fas monomérique était toujours détectée. De même, les protéines de 116 et 180 kDa correspondant aux agrégats étaient également détectées mais avec un marquage plus intense comparé à celui qui était observé dans des conditions basales de cultures sans inhibiteur. De plus, dans ces conditions, une protéine de 220 kDa correspondant aux agrégats de haut poids moléculaire de Fas était alors détectée.

Les mêmes résultats ont été obtenus lorsque les cellules étaient exposées à la fois à FasL et à l'inhibiteur K252b.

L'utilisation d'un autre inhibiteur d'ecto-PKC, le peptide 19-36, a permis d'obtenir les mêmes résultats que ceux observés avec l'inhibiteur K252b.

Aucune phosphorylation n'a été détectée au « phosphoimager » ni en autoradiographie en présence de l'un ou l'autre des inhibiteurs de PKC extracellulaire tant au niveau de Fas que de ses agrégats (figure 31).

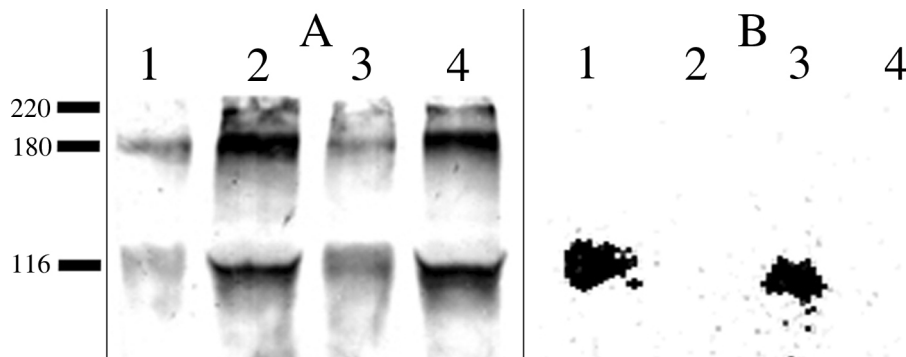


Figure 31. Phosphorylation des agrégats de Fas de 116 kDa par des ecto-PKC.

SDS-PAGE à 10% d'acrylamide contenant les protéines Fas immunopurifiées à partir de la lignée lymphocytaire Jurkat après incorporation de  $[\gamma\text{P}^{32}]\text{ATP}$  ; à l'état basal (1) ou après exposition à FasL (3 et 4) en présence de l'inhibiteur d'ecto-PKC k252b (2 et 4). Western-blotting avec l'anticorps anti-Fas c-20 (A) ou exposé au phosphoimager (B).

#### **.IV Absence de mutation de la protéine Fas dans la lignée Jurkat étudiée**

Afin de vérifier l'absence de mutation spontanée de Fas dans la lignée Jurkat utilisée pour cette étude, la séquence correspondant à Fas a été analysée. Les ARN de la lignée Jurkat ont été extraits et par transcription inverse leurs ADNc ont été obtenus. Par PCR, les zones codant les parties intra et extracellulaire du récepteur Fas ont été amplifiées puis clonées dans un vecteur plasmidique utilisé pour transformer des bactéries compétentes. Le séquençage nucléique de trois clones contenant un insert a été réalisé pour chacune des parties intra et extracellulaire de Fas.

Les séquences obtenues ont été comparées à celle de l'ADNc de Fas issue de la banque de gène de l'EMBL (HSFASANT\_4; M67454) avec le logiciel ALIGNn (Myers, 1988). Aucune différence n'a été détectée entre le transcrit de Fas extrait de la lignée Jurkat

étudiée et la séquence de référence ce qui atteste de l'absence de mutation de la protéine Fas dans la lignée utilisée pour cette étude.

Afin de vérifier la possibilité théorique d'une phosphorylation extracellulaire de Fas par la PKC, nous avons recherché les sites potentiels de phosphorylation par la PKC dans le domaine extracellulaire de la protéine Fas grâce aux logiciels PhosphoBase (Kreegipuu et al, 1999) et PROSITE (Bucher et al., 1994; Falquet et al., 2002). Trois sites de phosphorylation par la PKC ont été identifiés dans la partie extracellulaire de Fas, au niveau des acides aminés 3 (sérine), 76 (thréonine) et 82 (sérine). Le premier site est localisé au début de la zone de pré-association de Fas indépendante de son ligand (PLAD). Les autres sont juxtaposés à proximité de la zone PLAD, dans la zone de fixation du ligand FasL (figure 32).

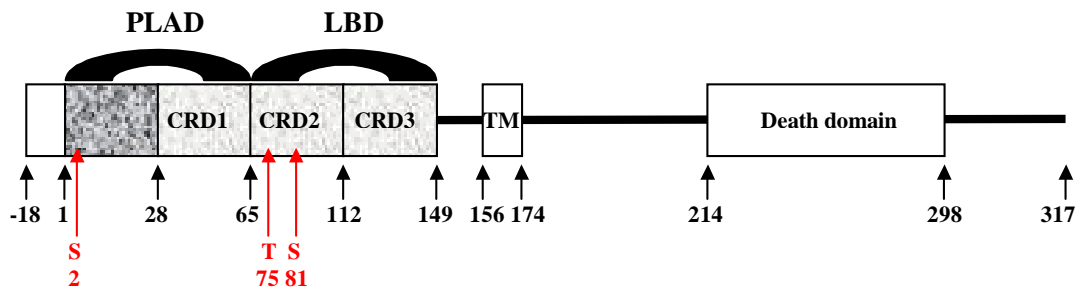


Figure 32. Sites potentiels de phosphorylation extracellulaire de Fas par les PKC.

## **.V La phosphorylation extracellulaire diminue le regroupement membranaire des récepteurs Fas**

Afin de préciser si la phosphorylation extracellulaire du récepteur Fas modulait son regroupement à la surface de la membrane cellulaire dans les conditions de stimulation décrites précédemment, nous avons étudié par IFI avec l'anticorps monoclonal anti-Fas B-G27 la répartition de Fas à la surface cellulaire. Une cellule est considérée comme présentant des regroupements membranaires de Fas si les zones de fluorescence de Fas sont d'une taille égale ou supérieure à 25% de la surface de la cellule. De plus, une cellule présentant une polarisation membranaire du marquage Fas était également considérée comme positive.

A l'état basal, l'IFI révélait que Fas était distribué uniformément à la surface cellulaire et seulement  $12\% \pm 0,75$  des cellules présentaient des regroupements de fluorescence membranaire de Fas.

En présence de l'inhibiteur d'ectokinase C K252b, le nombre de cellules présentant des regroupements de fluorescence augmentaient significativement ( $21\% \pm 1,2$  ;  $p = 0.019$ ).

La stimulation des cellules par leur incubation préalable avec FasL induisait également une augmentation du nombre de cellules présentant des regroupements membranaires fluorescents de Fas ( $23 \pm 0,95$  %). En outre, l'effet combiné de FasL et de l'inhibiteur d'ecto-PKC sur les cellules Jurkat permet d'observer une forte augmentation du nombre de cellules présentant des regroupements membranaires fluorescents de Fas ( $35 \pm 1,29$  % ;  $p = 0.02$ ) (figure 33 et 34).

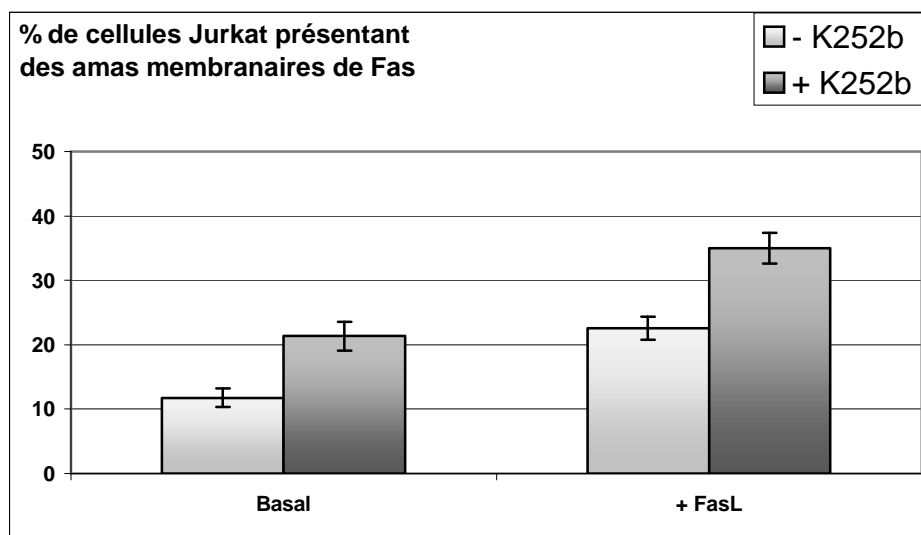


Figure 33. Rôle de FasL et de K252b dans le regroupement membranaire de Fas à la surface des cellules de la lignée lymphocytaire T Jurkat.

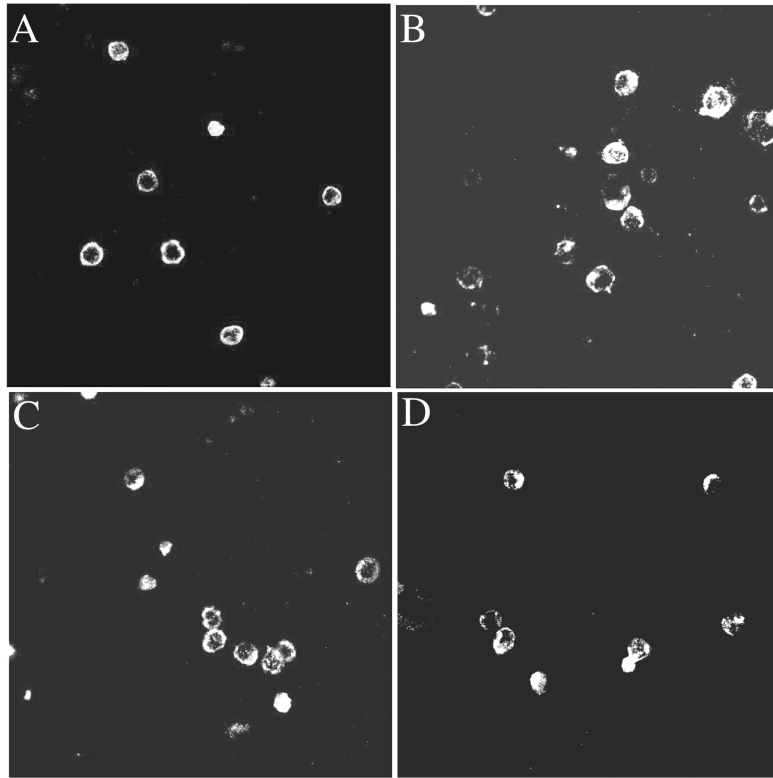


Figure 34. Détection par IFI avec l'anticorps anti-Fas B-G27 des regroupements membranaires fluorescents de Fas dans les cellules de la lignée Jurkat à l'état basal (A) ou après stimulation par FasL (C et D), en présence de l'inhibiteur d'ecto-PKC K252b (B et D).

## **.VI Rôle des ectokinases C dans la modulation de l'apoptose transmise par Fas.**

Pour déterminer le rôle de la phosphorylation extracellulaire de Fas dans la modulation de l'apoptose induite par cette voie, des études de l'apoptose ont été réalisées par ELISA-apoptose et par la méthode TUNEL. Elles ont permis de montrer de façon similaire que la phosphorylation extracellulaire du récepteur Fas était inhibitrice de l'apoptose transmise par l'activation de Fas comme le montre de façon significative les statistiques réalisées avec l'inhibiteur K252b. En effet, dans les conditions basales, en l'absence d'activation de Fas, une augmentation de l'apoptose des cellules Jurkat était détectée après exposition à l'inhibiteur d'ectokinase C ( $6,8 \pm 0,32$  % de cellules apoptotique contre  $2,7 \pm 0,2$  % ; à l'état basal ;  $p=0,04$ ). En présence de FasL, l'apoptose était fortement augmentée (soit  $27 \pm 1,52$  %) et

atteignait  $44 \pm 1,89$  % ( $p = 0,04$ ) en présence de K252b. De plus, l'apoptose des cellules Jurkat induite par FasL était inhibée significativement par l'inhibiteur de la caspase-8 ( $13 \pm 0,2$  %) mais de façon moindre en présence de l'inhibiteur d'ectokinase C K252b (soit  $20 \pm 0,2$  % ;  $p = 0,04$ ) (figure 35 et 36).

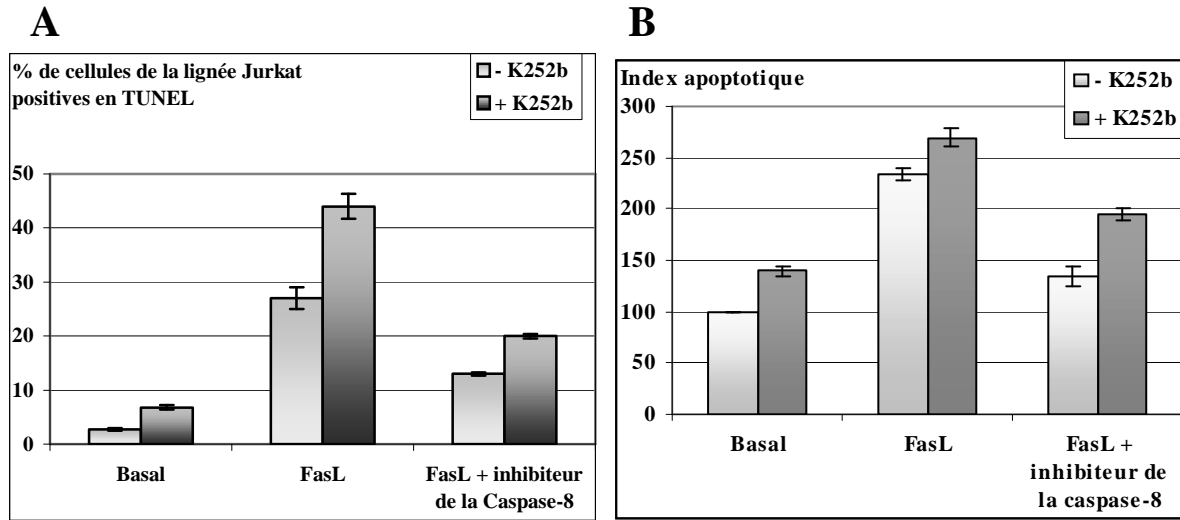


Figure 35. Apoptose des cellules Jurkat détectée par TUNEL (A) ou par ELISA-apoptose (B) après 24h d'exposition à FasL, en présence ou non de l'inhibiteur d'ecto-PKC K252b.

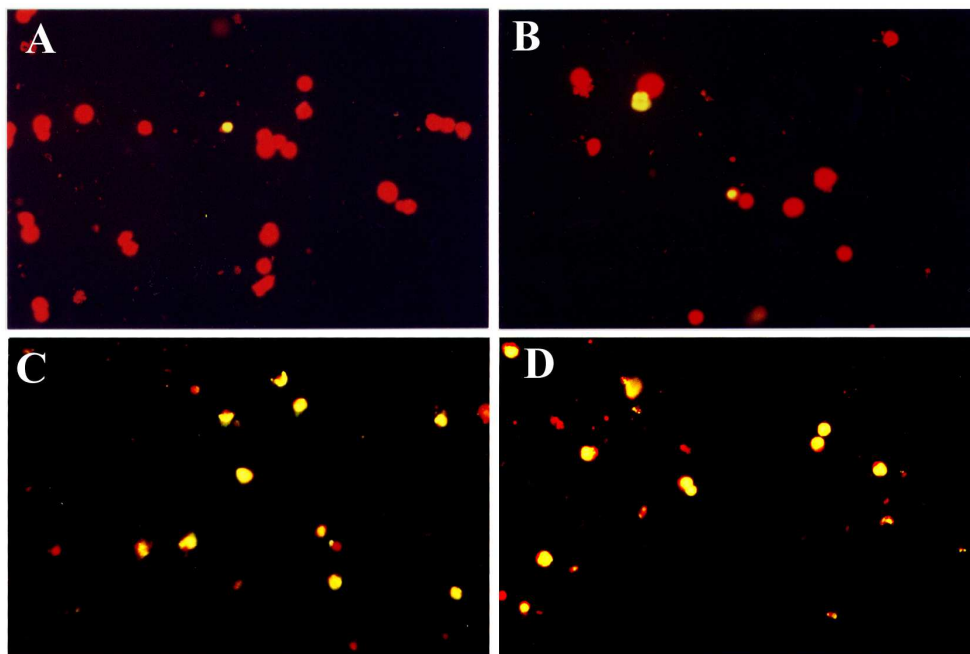


Figure 36. Marquage TUNEL des cellules Jurkat après exposition des cellules à FasL (C et D) et à l'inhibiteur d'ecto-PKC K252b (B et D).

## **DISCUSSION**

# **ROLE PRO-APOPTOTIQUE D'AUTOANTICORPS ANTI-FAS DANS LES SERUMS DE MALADES ATTEINTS DE SLA**

Ces résultats, associés à ceux obtenus par le Dr Yi, ont été publiés à participation égale des deux auteurs (Yi et al, 2000) (Publication n°1).

Le rôle de l'apoptose au cours de la mort motoneuronale a précédemment été rapporté dans la SLA (Yoshiyama et al., 1994; Troost et al., 1995; de la Monte et al., 1998) et nos résultats confortent les données actuelles qui s'accordent sur la présence d'un phénomène apoptotique au cours de la SLA (Mattson et al., 2000 ; Sathasivam et al., 2001).

En effet, nos travaux ont mis en évidence que 74 % des sérums de malades atteints de SLA sporadique testés induisent, *in vitro*, l'apoptose des cellules neuroblastiques humaines. L'étude de l'apoptose induite par les sérums de SLA et de contrôles normaux par marquage au iodure de propidium a permis d'obtenir les mêmes résultats (Yi FH, thèse de l'Université de Limoges, 1999). De plus, un taux significatif d'apoptose est détecté pour 26 % des sérums de SLA par les méthodes TUNEL et ELISA-apoptose. A l'inverse, aucun des sérums contrôles neurologiques n'induisait l'apoptose des cellules neuroblastiques après 48h ou 72h d'exposition, à l'exception de 2 des 27 sérums de malades atteints de la maladie d'Alzheimer.

En outre, cette activité pro-apoptotique des sérums est corrélée de façon significative avec leur marquage membranaire détecté par immunofluorescence indirecte dans les cellules neuroblastiques humaines et les motoneurons de rats et les Ig G extraites d'un sérum de SLA permettent d'obtenir le même taux d'apoptose que celui induit par le sérum complet.

Ceci nous a conduit à rechercher la présence d'anticorps anti-Fas dans les sérums de malades atteints de SLA.

Des autoanticorps anti-Fas ont été préalablement détectés dans le sérum de patients infectés par le virus HIV. Ils seraient induits par la protéine virale gp120, et pourraient ainsi



contribuer à la déplétion des lymphocytes T (Silvestris et al., 1996). De plus, il a été montré que des anticorps anti-Fas agonistes pouvaient induire une hépatite auto-immune dans un modèle murin (Ogasawara et al., 1993, Rodriguez et al, 1996 ; Nishimura et al., 1997) et des autoanticorps dirigés contre FasL ont été décrits dans le lupus érythémateux aigu disséminé (Suzuki et al., 1998).

Par ELISA, avec la protéine Fas humaine recombinante, nous avons détecté une faible réactivité dans les sérums normaux, ce qui suggère la présence d'anticorps naturels anti-Fas dans des conditions non-pathologiques. Ces données rejoignent celles de Prasad et al. (1998) qui ont décrit que des Ac anti-Fas présents dans des préparations thérapeutiques d'IgG normales pouvaient induire l'apoptose. Ces autoanticorps pourraient donc être des autoanticorps naturels dirigés comme d'autres anticorps naturels contre les principales molécules du système immunitaire (Coutinho et al., 1995). En outre, les sérums normaux de cette étude induisent de très faibles taux d'apoptose, significativement plus faibles que ceux induits par les sérums de SLA. Des taux d'anticorps anti-Fas élevés (sur la base de la réactivité moyenne des sérums normaux +2 déviations standards) ont été détectés dans 26 % des sérums de malades atteints de SLA et aucun pour les sérums contrôles neurologiques. De plus, tous les sérums présentant des taux élevés d'anticorps anti-Fas (sauf un) induisaient l'apoptose de la lignée neuroblastique humaine.

Les analyses par Western-blotting contenant des protéines de lysats cellulaires de la lignée neuroblastique montrent que tous les sérums de SLA (sauf deux) présentent une réactivité pour la protéine Fas, contre aucun des sérums contrôles (sauf un). Cette différence entre les résultats obtenus par ELISA et par Western-blot s'explique probablement par le fait que l'ELISA permet une analyse quantitative des autoanticorps anti-Fas sériques, et a été en outre réalisé avec une protéine Fas humaine recombinante.

De plus, nous avons réalisé des gels à 12 % d'acrylamide afin de rechercher les protéines présentant une masse molaire proche de celle de Fas, mais des conditions différentes pourraient permettre de détecter d'autres autoanticorps. De ce fait, notre laboratoire a précédemment rapporté la présence d'anticorps anti-NF dans certains sérum de malades atteints de SLA (Couratier et al., 1998).

Les effets pro-apoptotiques d'Ac anti-Fas agonistes ou de FasL sur la lignée neuroblastique humaine sont comparables à ceux observés avec les sérums de SLA présentant des taux élevés d'autoanticorps anti-Fas. De plus, le blocage de la caspase-8 ou de la caspase-3 inhibe l'apoptose induite par les sérums de SLA pro-apoptotiques présentant des taux élevés d'autoanticorps anti-Fas, mais n'a pas d'effet sur celle induite par les sérums de SLA ne contenant pas ces autoanticorps. Enfin, aucun taux significatif de FasL soluble n'a été détecté dans ces sérums (sauf pour un) par rapport aux sérums contrôles ce qui montre que FasL n'est pas impliqué dans l'induction de l'apoptose des neuroblastes. Ces résultats sont en faveur du rôle pathogène de ces anticorps anti-Fas au cours de la SLA. En outre, cette apoptose neuroblastique induite par les sérums de SLA anti-Fas positifs peut être inhibée par la pré-incubation des cellules avec un anticorps anti-Fas antagoniste, ce qui apporte la preuve directe de l'implication de la voie de Fas dans le processus apoptotique. Le fait que deux sérums (un sérum normal et un sérum de SLA) présentant des taux élevés d'anticorps anti-Fas mais qui n'induisaient pas l'apoptose des cellules de notre lignée neuroblastique peut être expliqué par des différences de concentration sérique ou d'affinité des autoanticorps anti-Fas (Fadeel et al., 1997 ; Komada et al., 1999).

Cependant, il est surprenant que les sérums de SLA n'induisaient pas l'apoptose des cellules lymphocytaire T de la lignée Jurkat, connue pour exprimer fortement le récepteur Fas. Mais, il est à présent bien établi que le signal de transduction de Fas n'induit pas uniquement la mort cellulaire, mais peut activer d'autres voies comme la prolifération ou la différenciation, en fonction du type cellulaire (Seino et al., 1997 ; Ottonello et al., 1999, Abreu-Martin et al., 1999 ; Desbarats et al., 2003), ou de co-signaux et des stades d'activation des cellules comme cela est largement documenté au niveau des lymphocytes (Klas et al., 1993, Alderson et al., 1993 et 1994 ; Lynch et al., 1995 ; Rathmell et al., 1996 ; Foote et al., 1996, Sakata et al., 1998 ; Kennedy et al., 1999). De plus, il est à noter qu'il n'y a pas de développement anormal du système nerveux chez les souris ayant des mutations du gène Fas (*lpr*) ou du gène FasL (*gld*) ni chez des malades présentant des mutations inactivant la voie de Fas (syndrome autoimmun lymphoprolifératif ou ALPS). Ceci contraste avec la gravité des anomalies immunitaires (hyperplasie lymphoïde, maladie auto-immune systémique liée à des autoanticorps) consécutives au déficit d'apoptose lymphocytaire (Watanabe-Fukunaga et al., 1992 ; Adachi et al., 1995 ; Bettinardi et al., 1997 ; Nagata, 1998 ; Martin et al., 1999. Strauss et al., 1999). Ces données suggèrent l'existence de différences fonctionnelles entre les

neurones et les lymphocytes dans la voie de signalisation de Fas. Celles-ci sont discutées dans le chapitre suivant.

Afin de rechercher le rôle pathogène des autoanticorps *in vitro*, nous avons également étudié le rôle potentiel des autoanticorps anti-Fas détectés dans les sérums de SLA dans des cultures primaires de cerveaux et de moelles épinières de rats. De plus, nous avons recherché l'expression de Fas dans des neurones en cultures mixtes pour préciser le rôle pathogène des autoanticorps dans l'apoptose motoneuronale.

L'expression constitutive de Fas a été précédemment montrée durant la différenciation du cortex chez le rat (Cheema et al., 1999), ainsi qu' *in vivo* sur des coupes de cerveaux de souris juvéniles normales (Park et al., 1998). Le double marquage réalisé en immunofluorescence par l'anticorps anti-CD95 (B-G27) et l'anticorps SMI-32 montre que la protéine Fas est exprimée par les neurones moteurs des cultures mixtes de cerveaux ou de moelles épinières de rat. De plus, FasL ou l'anticorps anti-Fas B-D29 induisait uniquement l'apoptose des neurones moteurs dans les cultures mixtes issues de cerveaux murins. Enfin, l'apoptose motoneuronale induite par FasL ou par l'anticorps anti-Fas B-D29 est inhibée en présence de l'inhibiteur de la caspase-8. Nos résultats concernant l'expression de Fas et son rôle pro-apoptotique au niveau des motoneurones embryonnaires de rats sont en accord avec ceux de Raoul et al. (1999).

De plus, 8 sérums de malades qui présentaient des taux importants d'Ac anti-Fas marquaient uniquement les motoneurones (identifiés par le double marquage avec l'anticorps SMI-32) dans les cultures mixtes de cerveaux ou de moelles épinières de rat. En outre, ces sérums induisaient, de manière sélective, l'apoptose des neurones moteurs de rat. Enfin, cette apoptose pouvait également être bloquée par un inhibiteur de la caspase 8.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que des autoanticorps anti-Fas pourraient être impliqués dans le processus pathogénique de l'atteinte motoneuronale d'une sous-population de malades atteints de SLA. Cependant, ces résultats ont été obtenus *in vitro* à partir d'une lignée neuroblastique humaine ou de cultures primaires contenant des neurones murins et leur signification *in vivo* reste inconnue. Ainsi, alors que les cellules neuroblastiques expriment fortement Fas, comme le confirme notre étude, l'expression de Fas n'avait pas été mise en évidence dans les travaux antérieurs utilisant des cultures de neurones humains (Becher et al.

1998). Chez l'homme, l'expression de Fas dans le SNC restait cependant controversée. Choi et al. (1999) avaient détecté *in vitro* l'expression de Fas au niveau d'astrocytes humains. Pour d'autres, l'expression de Fas est restreinte aux oligodendrocytes (D'Souza et al., 1996 ; Becher et al., 1998). Nous n'avons pas observé l'expression de Fas par les astrocytes ni la microglie dans nos conditions de culture. Ces divergences concernant l'expression de Fas pourraient être inhérentes aux conditions de culture et au degré de différenciation des cellules qui seront plus largement discutés dans le chapitre suivant.

Néanmoins, Fas apparaît fortement exprimé dans plusieurs conditions pathologiques et expérimentales (tumeurs cérébrales, maladies d'Alzheimer et de Parkinson, accidents vasculaires cérébraux, processus infectieux chroniques) (Leithauser et al., 1993 ; Matsuyama et al., 1994 ; Nishimura et al., 1995 ; Dowling et al., 1996). Cette expression de Fas par les neurones a été observée lors de la maladie d'Alzheimer (de la Monte et al., 1997) et dans certaines conditions expérimentales (ischémie, excitotoxicité, hypoglycémie) (Sakurai et al., 1998) au cours desquelles l'activation de la caspase-3 a également été mise en évidence (Nath et al., 1998). De ce fait, il est possible que des lésions encore indéterminées, probablement liées aux mécanismes déjà connus dans la SLA tels que le stress oxydatif, l'excitotoxicité, ou l'infection virale (herpes-virus ou enterovirus) (Rothsein et al., 1992 ; Abe et al., 1995 ; Louvel et al., 1997 ; Berger et al., 2000 ; Sola et al., 2002) pourraient induire l'expression de Fas par les neurones. Un tel mécanisme a été décrit par Shin et al. (1998) pour l'excitotoxicité. Il est alors possible qu'un processus inflammatoire entraîne une rupture de la barrière hémato-encéphalique, permettant alors aux anticorps anti-Fas sériques d'activer le récepteur Fas motoneuronal. Dans cette hypothèse, le rôle pathogène des autoanticorps anti-Fas ne serait pas primaire, mais ils pourraient cependant contribuer à la dégénérescence motoneuronale.

Toutefois, ce processus ne concerne pas tous les cas de SLA, puisqu'un grand nombre de sérums de SLA qui induisaient l'apoptose des neuroblastes ne présentaient pas de taux significatif d'Ac anti-Fas. Ces travaux confirment donc l'hétérogénéité de la SLA et notamment des facteurs sériques, responsables de l'apoptose neuroblastique.

De plus, une concentration élevée d'Ac anti-Fas dans ¼ des sérums de SLA peut être reliée à une étude précédente où les auteurs avaient identifié un facteur sérique (probablement des immunoglobulines) qui était inducteur de la mort d'une lignée hybride motoneuronale. Ce

facteur sérique était aussi détecté dans ¼ des sérums de malades atteints de SLA (Alexianu et al., 1994).

Cependant, l'origine de ces autoanticorps est à préciser. Ils pourraient correspondre à des anomalies du système immunitaire favorisant l'émergence d'autoanticorps. Cette hypothèse est étayée par la plus grande fréquence de syndromes lymphoprolifératifs et d'Ig monoclonales chez ces malades (Younger et al., 1991 ; Duarte et al., 1991). Ces autoanticorps pourraient également être induits par un antigène exogène, comme ceci a été démontré au cours de maladies autoimmunes du système nerveux périphérique, tels que les syndromes de Guillain-Barré et de Miller-Fischer, au cours desquels des anticorps polyclonaux de la classe des IgG, dirigés contre les gangliosides GM1 et GQ1b, sont induits par un mécanisme de mimétisme moléculaire en raison d'épitopes osidiques partagés avec *Campylobacter jejuni* (Yuki et al., 1993 ; Jacobs et al., 1996).

Une autre hypothèse est que ces anticorps pourraient être induits secondairement, en réponse à la dégénérescence primitive des motoneurones, ce qui pourrait jouer un rôle aggravant dans l'évolution de la maladie.

Afin d'évaluer le rôle potentiel des autoanticorps anti-Fas détectés dans les sérums de malades dans le déclenchement de la SLA, nous avons immunisé des souris avec la protéine Fas purifiée de lignées cellulaires humaines.

# IMMUNISATION DE SOURIS PAR LA PROTEINE FAS

Par la technique de Western-blotting, nous avons mis en évidence la présence d'anticorps anti-Fas dans les sérums des souris des lots L (immunisées avec la protéine Fas lymphocytaire) et N (immunisées avec la protéine Fas neuroblastique). Ces autoanticorps reconnaissent à la fois la protéine Fas extraite des lignées neuroblastiques et lymphocytaire T.

Ces autoanticorps anti-Fas dans le sérum de ces souris ont été quantifiés par ELISA. On détecte chez toutes les souris des lots L et N des taux d'anticorps anti-Fas supérieurs au seuil de positivité établi à partir des souris du lot contrôle.

Aucun trouble moteur (paralysie) n'a pu être observé visuellement. Cependant, les tests fonctionnels utilisés pour évaluer la motricité des souris ont permis de mettre en évidence, chez les souris du lot N uniquement, des troubles de la motricité dont l'apparition s'est déroulée progressivement et plus ou moins rapidement selon les souris. Toutefois, les tests fonctionnels ne permettaient pas tous la détection d'anomalies motrices. En effet, même si 3 mois après la dernière immunisation, les souris du lot N échouaient toutes au test de la traction, elles réussissaient le test de la cheminée jusqu'à leur sacrifice.

Il est surprenant de constater que 2 souris du lot N ont développé une ascite importante dont l'apparition coïncidait avec leur premier échec au test moteur. Les études *ex vivo* ont montré que l'ascite était associée à une importante réaction inflammatoire péritonéale. Par ailleurs, deux autres souris de ce lot (N3 et N4) avaient également de l'ascite mais de volume plus faible, ainsi que des lésions hépatiques observables macroscopiquement. De plus, l'ascite était la conséquence d'une hépatite inflammatoire autoimmune. De ce fait, il peut être discuté que l'atteinte motrice observée soit en réalité un artefact lié à l'atteinte hépatique.

Toutefois, bien qu'il soit possible que les échecs des tests moteurs soit associés à l'atteinte hépatique, une souris (N5) du lot N, présentait des autoanticorps anti-Fas, et une atteinte motrice décelable par le test de la potence, sans que des atteintes hépatiques aient été

détectées. Les analyses actuellement en cours au laboratoire d'anatomo-pathologie permettront peut-être de déceler également des lésions hépatiques microscopiques ainsi que la caractérisation de lésions du SNC. Comme les atteintes motrices de la SLA s'installent progressivement, il pourrait être nécessaire de répéter ces études sur une période plus longue pour observer des troubles moteurs plus évolués. Néanmoins, l'atteinte hépatique associée complique ces observations par le caractère évolutif et plus rapidement létal de l'hépatite induite par l'immunisation de souris contre la protéine Fas neuroblastique.

Il est intéressant de constater que les souris immunisées par la protéine Fas lymphocytaire n'ont pas développé de trouble moteur malgré la présence d'autoanticorps sérique. Ces résultats suggèrent que les anticorps anti-Fas pourraient ne pas être responsables des troubles moteurs observés dans le lot N. Ceci est également suggéré par le fait que l'immunisation des souris par les protéines Fas neuronales ou lymphocytaires induit des pathologies distinctes, ce qui implique donc des réponses immunitaires différentes.

Cependant, l'analyse électrophorétique des protéines immunopurifiées et colorées au bleu de Coomassie révèle un profil strictement identique entre les immunopurifications réalisées avec les lignées L et N, qui comportent dans les deux cas une bande de 50 kDa majoritaire (Fas monomérique) et des protéines moins abondantes de 116kDa, 180 kDa et 220 kDa qui correspondent à des agrégats de Fas. Dans tous les cas, ces protéines étaient également reconnues par l'anticorps polyclonal anti-Fas C-20.

Ces résultats suggèrent donc l'existence de différences de structure concernant les sites épitopiques immunodominants qui différencieraient selon l'origine lymphocytaire ou neuroblastique de la protéine Fas. Cette hypothèse est étayée par le fait que les souris N1 et N2 avaient des taux d'anticorps anti-Fas significativement élevés lors des tests ELISA réalisés avec la protéine Fas neuroblastique, mais inférieurs au seuil de positivité établi à partir des souris contrôles lorsque ce test est réalisé avec la protéine Fas lymphocytaire. De plus, ces souris N1 et N2 sont celles qui présentaient également une hépatite inflammatoire très importante.

L'apparition chez des souris d'une hépatite auto-immune chronique induite par des anticorps agonistes dirigés contre le récepteur Fas a déjà été décrite par plusieurs auteurs (Ogasawara et al., 1993, Rodriguez et al, 1996 ; Nishimura et al., 1997). L'hépatite auto-

immune chronique ne peut être prévenue par le blocage des lymphocytes T CD8, mais le blocage des lymphocytes B et T, ou seulement des lymphocytes T CD4, permet d'inhiber l'apparition de l'hépatite auto-immune chronique. Ces résultats ont montré l'implication des lymphocytes T CD4 dans l'hépatite auto-immune chronique, ainsi que le rôle important du relargage de cytokines pro-inflammatoires, et tout particulièrement de l'IFN- $\gamma$  (Tiegs et al., 1992). De plus, il a été montré que l'atteinte hépatique impliquerait la voie Fas/FasL. En effet, aucun symptôme n'est observable avec les modèles de souris *lpr* et *lpr<sup>cs</sup>* dont le récepteur Fas est muté (Ogasawara et al., 1993). D'autre part, une hépatite auto-immune chronique peut également être reproduite par l'injection systémique FasL soluble à des souris (Rensing-Eh et al., 1995). Plus récemment, Song et al. (2003) ont montré que le blocage de l'expression de Fas, par la technique d'interférence des ARN, permet de protéger les souris contre l'hépatite fulminante induite par l'injection intra-péritonéale d'un anticorps anti-Fas agoniste. Cependant, c'est à notre connaissance la première fois qu'un syndrome hépatique auto-immun est obtenu par l'immunisation de souris avec la protéine Fas, bien que ce type d'immunisation soit réalisé couramment dans le but notamment de réaliser des hybridomes synthétisant des anticorps anti-Fas.

Ces constatations et l'absence de pathologie observée chez les souris du lot L, nous amène à nous poser la question d'une spécificité neuronale de la protéine Fas. Dans cette hypothèse, plusieurs travaux récents ont mis en évidence des différences dans les pathologies induites par des anticorps anti-Fas agonistes distincts. Ainsi, l'anticorps anti-Fas RK-8, administré en intra-péritonéal à des souris, induit de graves lésions thymiques mais seulement une très faible atteinte de la rate et du foie. A l'inverse, l'anticorps anti-Fas Jo2 induit, dans les mêmes conditions, une hépatite fulminante rapidement létale (Nishimura-Morita et al., 1997). De façon plus surprenante, l'anticorps RK-8, permet chez des souris *gld* déficientes en FasL de prévenir les syndromes lymphoprolifératifs associés à cette mutation ce qui prouve son effet agoniste dans le système immunitaire. Cependant, il ne provoque pas d'atteinte hépatique contrairement à Jo2 (Nishimura-Morita et al., 1997). Plus récemment, il a été montré que l'anticorps anti-Fas HFE7A injecté à des souris induit l'apoptose des thymocytes sans hépatotoxicité. De plus, cet anticorps protégeait les souris de l'hépatite fulminante induite par Jo2 (Ichikawa K et al., 2000). Ces travaux étayent l'hypothèse de plus en plus avancée de l'existence d'une spécificité cellulaire de la protéine Fas et laissent espérer l'apparition de nouvelles thérapies immunologiques basées sur l'utilisation d'anticorps



agonistes ou bloquants de Fas spécifiques du type cellulaire à traiter. Il pourrait ainsi être mis au point des traitements spécifiques du type cellulaire impliqué dans des pathologies aussi variées que l'hépatite fulminante, les syndromes lymphoprolifératifs, ou les maladies autoimmunes (Yonehara et al., 1999).

Dans notre modèle murin immun, seule l'immunisation par la protéine Fas neuroblastique a permis d'observer une atteinte hépatite chez 4 des 5 souris de ce lot. Les analyses ont permis de confirmer que cette hépatite était d'origine auto-immune, et n'impliquait pas un phénomène infectieux ou tumoral mais bien un processus lymphocytaire inflammatoire. L'étude des anticorps présents dans les ascites des souris N1 et N2 a permis de détecter, en Western-blot, une réactivité pour une protéine de 70 kDa exclusivement neuronale qui reste à identifier. De plus, il a également été détecté une forte réactivité contre une protéine du foie de 50 kDa, et présentant la même mobilité électrophorétique que celle reconnue par un anticorps anti-Fas. Ce résultat suggère que, comme lors des études réalisées par les autres auteurs sur l'hépatite auto-immune chronique (Ogasawara et al., 1993 ; Rodriguez et al, 1996 ; Nishimura et al., 1997, Song et al., 2003), l'atteinte hépatique observée pourrait être induite par la voie de Fas et d'anticorps agonistes induits. Ceci renforce également l'hypothèse de la spécificité cellulaire de Fas et évoque l'existence, au niveau hépatique, d'une forme protéique de Fas qui partagerait des épitopes communs avec la protéine Fas neuroblastique.

De façon plus surprenante encore, les ascites des souris N1 et N2 présentaient également en Western-blot une réactivité unique pour une protéine de 70 kDa exclusivement neuronale. De plus, une protéine de migration électrophorétique identique était reconnue par l'anticorps anti-NF-L, ce qui suggère une réactivité des anticorps contenus dans le liquide d'ascite dirigée contre la sous-unité légère des neurofilaments. Il est possible que ces anticorps anti-NF-L soient induits par une réactivité croisée entre la protéine Fas hépatique et la sous-unité légère des neurofilaments et pourrait correspondre à un épitope commun à ces deux protéines. Des travaux précédents, réalisés par le Dr Yi (thèse de l'Université de Limoges, 1999) dans notre laboratoire, étayaient cette hypothèse puisque, en Western-blot, des anticorps anti-Fas commerciaux peuvent reconnaître la protéine NF-L et inversement. De plus, l'immunisation de souris avec des neurofilaments permet de détecter dans leurs sérums la présence d'anticorps anti-Fas (Girard M., thèse de l'Université de Limoges, 2000).

En outre, les anticorps anti-NF-L sont associés pour 3 des 5 souris du lot N à des troubles moteurs et nous pouvons donc nous interroger sur leur rôle potentiel dans leur apparition. La présence d'anticorps anti-neurofilament a déjà été mise en évidence dans 25 % des sérums de malades atteints de SLA (Couratier et al, 1998) de même que le rôle important du dérèglement de l'expression de la sous-unité légère des neurofilaments dans le processus dégénératif motoneuronal (Lee et al, 1994). De ce fait, il est possible que ces autoanticorps anti-NF-L soit à l'origine des troubles moteurs détectés chez les souris du lots N, mais que le syndrome hépatique ne permette pas une survie à long terme suffisante des souris pour observer des syndromes moteurs marqués par une paralysie.

# **EXPRESSION DE FAS PAR LES NEURONES MOTEURS HUMAINS FOETAUX**

L'ensemble de ces résultats a été publié (Lautrette et al., 2003) (Publication n°2).

Les études réalisées par immunofluorescence dans des cultures primaires de cerveaux et de moelles épinières d'embryons humains âgés de 9 semaines, avec deux anticorps monoclonaux distincts, dirigés contre la protéine Fas humaine, ont montré que les motoneurones humains expriment de façon constitutive le récepteur Fas ce qui n'avait jamais été précédemment rapporté.

L'identification des motoneurones a été basée sur les caractéristiques morphologiques (corps cellulaire de grande taille, cellules de forme pyramidale) et les données immunocytochimiques obtenue avec l'Ac SMI-32 qui est un marqueur reconnu des motoneurones humain spinaux. Cependant, l'Ac SMI-32 marque également un sous-ensemble de neurones non cholinergiques du locus niger dans le cerveau adulte (Gai et al., 1994). De ce fait, nous avons également utilisé un Ac anti-acétylcholinestérase pour identifier les neurones cholinergiques en double marquage avec un autre Ac monoclonal anti-Fas (B-G30), bien que l'expression de l'acétylcholinestérase ait été aussi rapportée dans le locus niger, le locus coeruleus et les noyaux du raphé chez le macaque (Mesulam et al., 1984) et chez l'homme (Mizukawa et al., 1986). De ce fait, on ne peut exclure que l'expression de Fas dans le cerveau foetal humain pourrait ne pas être limitée à la population motoneuronale. Cependant, la combinaison des caractéristiques morphologiques et des résultats de double immunomarquage rendent cette hypothèse peu probable.

De plus, l'étude des coupes de cerveau et moelle épinière d'embryon humain de 10 semaines a donné des résultats similaires avec une corrélation pour le marquage des aires motrices par les Ac SMI-32 et anti-acétylcholinestérase, et le marquage par les Ac anti-Fas B-G27 et B-G30. Ces résultats prouvent que l'expression de Fas par les motoneurones fœtaux humains est constitutive et non un artefact lié à nos conditions de culture. De plus, une seule zone qui correspond à l'aire motrice a été marquée au niveau des coupes de cerveau et moelle

épineux, ce qui donne un argument supplémentaire en faveur d'une expression de Fas restreinte aux neurones moteurs. Une telle spécificité d'expression de Fas suggère que ce récepteur membranaire pourrait jouer un rôle important au cours du développement des aires motrices. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment obtenus avec les cultures primaires de cerveaux et de moelles épinières fœtales de rat (Raoul et al., 1999; Yi et al., 2000). De plus, dans des expériences réalisées *ex vivo*, l'expression neuronale de Fas a aussi été détectée par des méthodes immunohistochimiques dans le cerveau de souris juvénile normale, sans précision cependant sur la population de neurones impliquée (Park et al., 1998).

Dans nos conditions de culture, les cellules astrocytaires ou microgliales humaines ne sont pas marquées par les anticorps anti-Fas. Ceci contraste avec les données précédemment obtenues chez la souris qui ont montré une expression constitutive de Fas dans les cultures d'astrocytes et de microglie isolés du cerveau de souris nouveau-nés (Lee et al., 2000). Chez l'homme cependant, l'expression de Fas par les cellules gliales humaines reste controversée. Dans l'étude de Choi et al. (1999) sur des cultures primaires de cellules gliales de fœtus ou de cerveaux adultes, l'expression de Fas était constitutive, restreinte aux astrocytes, et augmentée par l'IL-1, l'IL-6, l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$ . Cependant, dans une autre étude, l'expression de Fas a été détectée seulement au niveau des oligodendrocytes dans le cerveau adulte (D'Souza et al., 1996), et celle-ci pouvait également être augmentée par l'IFN- $\gamma$  (Pouly et al., 2000). Enfin, dans une étude réalisée avec des cultures primaires de cerveaux de fœtus âgés de 12 à 16 semaines (soit 3 semaines plus tard que dans notre étude), Fas était détecté par immunomarquage au niveau des astrocytes mais pas dans les neurones (Becher et al., 1998). Ces controverses suggèrent l'existence de variations dans l'expression de la protéine Fas selon le stade de développement considéré et la présence possible de facteurs de stimulation contenus dans le milieu de culture. Cette dernière possibilité montre par ailleurs l'importance de l'étude de l'expression de Fas sur des sections tissulaires qui a confirmé les données obtenues en culture.

Un autre facteur qui pourrait influencer l'expression de Fas dans les cultures primaires est le choix du substrat. D'après l'expérience antérieure du laboratoire, les puits de culture ont été revêtus de collagène afin de servir de support d'adhérence cellulaire aux cultures mixtes contenant des astrocytes étalés sur lesquels se développent des neurones regroupés en amas (Jauberteau et al., 1993; Yi et al., 2000). Bien que cette technique soit plus fréquemment

utilisée pour obtenir des populations gliales, nous avons observé que ces conditions permettent d'obtenir une croissance des neurones avec une fasciculation des neurites, similaire à celle qui est observée dans des conditions physiologiques. Beaucoup de substrats ont été employés dans les cultures de neurones, notamment des composants de la matrice extracellulaire tels que le collagène IV, la laminine, la fibronectine, mais aussi des substrats artificiels comme la poly-D-lysine. Le collagène a été depuis longtemps décrit comme étant extrêmement sélectif de la croissance neuronale (Kondratyev et al., 1989), mais plusieurs auteurs ont montré que le substrat utilisé pour la culture des neurones pouvait influencer la morphologie cellulaire (Lochter et al., 1995) ou la croissance des neurites (Detrait et al., 1998; Savettieri et al., 1998) de façon différente selon les types de neurones. Les composants de la matrice extracellulaire peuvent aussi réguler la différenciation des neurones corticaux (Ferri and Levitt, 1995). De plus, les astrocytes sécrètent le facteur de stimulation des neurites qui peut stimuler la croissance des axones dans les cellules PC12 (Wujek et Akeson, 1987; Wujek et al., 1990). De ce fait, plusieurs conditions de cultures motoneuronales ont été décrites (Bär, 2000) avec divers substrats d'adhérence cellulaire et l'expression de Fas pourrait différer dans ces différents modèles. Cependant, l'expression de Fas par les motoneurones fœtaux a été détectée *in vitro* mais aussi *ex vivo* au niveau des sections de tissu suggérant que cette expression est constitutive et non induite par nos conditions de culture.

Dans les conditions basales de culture, seules quelques cellules de type astrocytaire (GFAP-positive) sont en apoptose. Cette apoptose n'est probablement pas liée à la voie de Fas, car elle ne varie pas après exposition à FasL et n'est pas inhibée par l'inhibiteur de la caspase-8. Cette apoptose basale est probablement liée à nos conditions de culture, notamment l'addition de cytosine-arabinozide pendant 24h qui peut activer l'apoptose par la voie oxydative (Michel et al., 1997). Au niveau des motoneurones, FasL induit significativement leur apoptose et celle-ci peut être bloquée par un inhibiteur de la caspase-8. Ces résultats prouvent que le récepteur Fas exprimé par les neurones moteurs est fonctionnel, et que la caspase-8 est impliquée dans la voie de signalisation de l'apoptose par Fas dans les motoneurones. En accord avec ces résultats, la caspase-8, qui est la caspase initiatrice dominante de la voie apoptotique Fas dans d'autres types cellulaires (Varfolomeev et al., 1998), est présente dans les cultures de motoneurones de rat et dans le cerveau et la moelle épinière d'embryons de souris (Raoul et al., 1999). Plus récemment, chez des souris transgéniques portant une forme mutante de la SOD1 (reproduisant le modèle expérimental de

la SLA) ainsi que dans des motoneurones murins embryonnaires normaux, Raoul et al (2002) ont montré que la mort cellulaire des motoneurones induite par Fas est initiée par la caspase-8.

Dans nos travaux précédents, nous avons constaté que les motoneurones murins (Yi et al., 2000) étaient plus résistants à l'apoptose induite par FasL que les cellules lymphoïdes T Jurkat. De même, dans l'étude actuelle, tandis que 45% des cellules Jurkat sont en apoptose après 24 heures d'incubation avec FasL, aucune apoptose des motoneurones n'est détectée et seulement une partie de la population motoneuronale est positive en TUNEL au bout de 48 heures d'incubation. Ceci suggère l'existence de différences dans les voies de signalisation de Fas entre les deux lignées. Parmi les hypothèses, la voie de signalisation de Fas pourrait être régulée par l'inhibiteur cellulaire de l'apoptose FLIP (pour FLICE [Fas-associated death-domain-like IL-1beta-converting enzyme]-inhibitory protein), un inhibiteur endogène de l'activation de la caspase-8 (Irmeler et al., 1997). En effet, FLIP est fortement exprimée par les motoneurones embryonnaires de rat et de souris, et pourrait être impliqué dans la résistance de 50 % des motoneurones à l'apoptose induite par FasL (Raoul et al., 1999). De même, les regroupements membranaires des récepteurs Fas à la surface des motoneurones pourraient jouer un rôle fonctionnel important dans l'initiation du signal apoptotique de Fas. En effet, l'agrégation de Fas est une condition préalable pour l'induction de l'apoptose. Cremesti et al. (2001) ont montré que la polarisation des regroupements membranaires de Fas est nécessaire pour une signalisation optimale de la voie Fas dans des cultures primaire d'hépatocytes et dans la lignée lymphoïde T Jurkat. De ce fait, les différences de sensibilité des motoneurones à FasL pourraient être dues à des différences de répartition des regroupements membranaires de Fas entre les motoneurones et d'autres études doivent être réalisées pour étudier les regroupements de Fas à la surface membranaire lors de son activation. Enfin, il est aussi possible que les récepteurs Fas présents à la surface des motoneurones qui sont résistants à l'apoptose induite par FasL exercent d'autres fonctions non apoptotiques, comme cela a déjà été montré dans d'autres lignées de cellules. En effet, Fas peut également stimuler des processus cellulaires tels que l'induction du facteur de transcription NF-kB (Kataoka et al., 2000) ou la croissance neuritique (Desbarats et al., 2003). De plus, l'activation de la caspase-8 par le récepteur Fas (Kennedy et al., 1999) et FADD (Newton et al., 2001) est nécessaire pour la prolifération des cellules T.

L'expression d'un récepteur Fas fonctionnel à la surface des neurones moteurs humains est importante du fait de sa capacité à induire l'apoptose. En effet, une apoptose liée à la voie de Fas a été impliquée dans plusieurs pathologies du système nerveux humain telles que la sclérose en plaques (D' Souza et al., 1996) ou son modèle expérimental l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (Ciusani et al., 2001); la maladie d'Alzheimer (Morishima et al., 2001; Ferrer et al., 2001); et, de façon plus controversée, dans la maladie de Parkinson (Jellinger, 2000; Gomez et al., 2001). Nous avons également mis en évidence lors de l'étude précédente le rôle de l'apoptose par la voie Fas dans la SLA (Yi et al., 2000). Fas est aussi impliqué dans l'apoptose associée à l'ischémie des accidents vasculaires cérébraux (Matsuyama et al., 1995; Martin-Villalba et al., 2001). Cependant, les facteurs qui régulent l'expression de Fas et sa voie de signalisation au cours du développement embryonnaire normal ou dans ces pathologies restent inconnus et importants à déterminer.

# **PURIFICATION DE CELLULES NEURONALES IMMATURES**

L'ensemble de ces résultats a été publié (Lautrette et al., 2003) (Publication n°3).

L'étude morphologique de la lignée neuroblastique SH-SY5Y suggère fortement la présence de deux stades de différenciations distincts au sein de la même lignée en culture. En effet, les cellules sphériques, regroupées en neurosphères, et de faible adhérence, présentent des critères caractéristiques des cellules neuronales immatures. A l'inverse, les cellules étalées, adhérentes et avec des expansions neuritiques présentent un phénotype de cellules neuronales plus différenciées.

L'absence de marquage avec l'anticorps anti-GFAP d'une part, et le marquage au niveau de toutes les cellules par l'Ac anti-NF-M ou NF-L d'autre part, montrent que cette lignée est constituée exclusivement de cellules neuronales. De ce fait, l'hétérogénéité morphologique observée ne peut être expliquée que par la présence de cellules neuronales à différents stades de différenciation.

Ceci est conforté par le tri en SdFFF qui isole 3 populations bien distinctes.

Les cellules de la fraction intermédiaire F2 présentent un profil d'expression de Fas et de N-CAM similaire à celui qui est observé pour la fraction totale d'élution (TP) avec des cellules co-exprimant pour la plupart les récepteurs Fas et N-CAM. De façon intéressante, près de 97 % des cellules de la fraction F1, constituée par les cellules étalées et adhérentes, expriment la molécule d'adhésion N-CAM alors que très peu d'entre elles expriment le récepteur Fas. Au contraire, la population F3, composée des petites cellules faiblement adhérentes organisées en amas, est constituée de cellules exprimant presque uniquement le récepteur Fas (98 % des cellules expriment Fas et seulement 4 % la N-CAM).

Ces résultats suggèrent que la technique de SdFFF permet de purifier, au sein de la lignée SH-SY5Y, deux stades de maturation des cellules neuronales qui présentent des propriétés distinctes tant au niveau morphologique que par l'expression de Fas et de N-CAM.



Les cellules de grande taille éluées dans la fraction F1 correspondraient aux cellules neuronales les plus différenciées, identifiées d'après leur morphologie mais également par l'expression de la N-CAM qui est restreinte aux populations neuronales différenciées.

Les cellules de la fraction F2 pourraient être définies comme un stade de différenciation intermédiaire, la majorité des cellules de cette fraction coexprimant le récepteur Fas et la protéine N-CAM.

La population F3 exprimant le récepteur Fas correspondrait à des cellules neuronales très immatures, peu adhérentes et formant des neurosphères comme cela a été décrit précédemment pour les précurseurs neuronaux (Rao et al., 1999 ; Singleton et al., 2000). L'expression de Fas par les cellules les plus immatures pourrait suggérer que celui-ci joue un rôle important au cours du développement embryonnaire. Or, l'apoptose intervient au niveau du SN durant le développement embryonnaire au cours d'une période appelée 'période de mort cellulaire physiologique' (Oppenheim, 1991) pour éliminer les neurones dont les connexions synaptiques ne sont pas établies ou fonctionnelles (Catsicas et al., 1987). De plus, le rôle potentiel de l'expression de Fas dans la régulation de l'apoptose neuronale au cours du développement a été récemment suggéré (Cheema et al., 1999). Cependant, Fas peut également induire la prolifération cellulaire (Alderson et al., 1993 ; Miossec et al., 1997 ; Wilhelm et al., 1998 ; Alam et al., 1999 ; Kennedy et al., 1999). De ce fait, les cultures de la fraction F3 pourraient servir de modèle d'étude *in vitro* facilement accessible pour étudier l'activation de Fas par FasL dans des populations neuronales très immatures, ainsi que son rôle dans le développement et la mort apoptotique neuronale.

Un point important est l'absence de prolifération ou de différenciation des cellules des fractions F1 ou F3 remises en culture, alors que la fraction F2 ou TP reproduit une culture normale. Ces résultats suggèrent qu'une coopération cellulaire est nécessaire entre les populations différenciées et immatures pour permettre la différenciation et la prolifération cellulaire. Des travaux doivent être poursuivis afin de déterminer les populations qui sont responsables de prolifération ou de différenciation, ainsi que celles qui sont capables d'activer l'une ou l'autre de ces voies.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que la lignée neuroblastique SH-SY5Y est hétérogène, et contient des cellules neuronales à différents stades de différenciation cellulaire dont une très immature qui exprime Fas et forme des neurosphères.

Ces travaux permettent d'envisager un nouveau type d'étude des cellules souches neuronales à partir de lignées neuroblastiques. En effet, la numération au bleu Evans montre que la séparation en SdFFF ne diminue pas la viabilité cellulaire après la remise en culture des fractions triées. De ce fait, la SdFFF permet d'obtenir rapidement et de façon reproductible des cellules neuronales à des stades de différenciation distincts, à partir d'une lignée cellulaire.

Celles-ci pourraient être utilisées afin d'étudier les mécanismes de différenciation neuronale, et tout particulièrement les facteurs capables d'induire des populations de neurones moteurs ou dopaminergiques. De même, leurs propriétés prolifératives pourraient également être étudiées ainsi que l'action d'activateur ou d'inhibiteur de la prolifération dans les fractions immatures et différenciées.

Enfin, ces études pourraient également être effectuées *in vivo*, avec des greffes chez des souris normales ou présentant des modèles de pathologies neuronales, ce qui permettrait d'étudier leurs propriétés tumorigènes ou neuro-régénératrices.

# PHOSPHORYLATION EXTRACELLULAIRE DU RÉCEPTEUR FAS

L'ensemble de ces résultats est en préparation pour soumission à publication.

Alors que l'implication des phosphorylations dans la voie Fas est à présent clairement établie (Holmstrom et al., 2000 ; Chen et al., 1999), les cibles, les mécanismes et le rôle biologique des kinases impliquées ne sont pas encore élucidés. Or, l'activité ectokinase est à présent bien établie (Skubitz et al., 1991 ; Piroton et al., 1992 ; Dusenbery et al., 1988 ; Chen et al., 1996 ; Hatmi et al., 1996 ; Paas et al., 1999 ; Babinska et al., 2000) et a été plus récemment mise en évidence à la surface des cellule T et impliquée dans la régulation des fonctions du TCR (Redegeld and al., 1997). De ce fait, nous avons étudié une possible phosphorylation extracellulaire du récepteur Fas par ces kinases et leur implication éventuelle dans la régulation de ses fonctions pro-apoptiques.

Dans des conditions basales de culture, nous avons détecté par Western-blot à l'aide d'anticorps anti-Fas distincts (C-20 et 3D5) la protéine Fas monomérique (50 kDa) ainsi que les agrégats de Fas de 116 et 180 kDa. Ces agrégats de la protéine Fas ont déjà été décrits par plusieurs auteurs (Kamitani T, 1997 ; Ruiz-Ruiz C et al., 1999; Lee Y et al., 2001) mais uniquement après l'exposition des cellules à FasL ou à un anticorps anti-Fas agoniste. Cependant, grâce à l'utilisation d'un système double-hybride, Papoff et al. (1999) ont montré que Fas possédait un domaine d'oligomérisation indépendant de son ligand. De plus, Siegel et al. (2000) ont montré que des complexes de récepteurs Fas pré-associés existaient dans la membrane des cellules vivantes en l'absence de FasL. En accord avec ces travaux, nous avons pu détecter par Western-blotting des agrégats de Fas dans des conditions basales.

Cependant, aucune phosphorylation de la protéine Fas monomérique n'a été détectée dans les conditions basales. En revanche, une phosphorylation a été détectée au niveau de l'agrégat de Fas de 116 kDa mais pas dans l'agrégat de 180 kDa. C'est à notre connaissance la première fois qu'une phosphorylation extracellulaire du récepteur Fas est rapportée. La phosphorylation des agrégats de Fas de 116 kDa dans des conditions basales suggère que

l'activité ectokinase à la surface des cellules T Jurkat est constitutive. Cependant, l'absence de phosphorylation du récepteur Fas monomérique montre que l'agrégation de Fas est un pré-requis pour la formation d'un site conformationnel actif de phosphorylation extracellulaire.

Après exposition des cellules à FasL, les monomères de Fas ainsi que les agrégats de 116 et 180 kDa sont toujours clairement détectés ainsi que des agrégats de 220 kDa déjà décrits par d'autres auteurs (Kamitani et al., 1997; Ruiz-Ruiz et al., 1999; Lee et al., 2001) mais les phosphorylations extracellulaires étaient toujours restreintes aux agrégats de 116 kDa.

L'utilisation d'inhibiteurs extracellulaires de la protéine kinase C (K252b ou le peptide inhibiteur de PKC 19-36) permet de bloquer complètement la phosphorylation extracellulaire des agrégats de Fas à 116 kDa, montrant que celle-ci implique des ecto-PKC. De plus, ces inhibiteurs d'ecto-PKC augmentent la quantité d'agrégats de Fas de façon plus importante que FasL, et permettent également de détecter l'agrégat de haut poids moléculaire de 220 kDa même dans des conditions basales. Ces résultats suggèrent donc que les protéines kinases C extracellulaires régulent la formation des agrégats de haut poids moléculaire de 220 kDa en phosphorylant les agrégats de 116 kDa. L'absence de phosphorylation au niveau des agrégats de haut poids moléculaire (180 et 220 kDa) suggère que seuls les agrégats non-phosphorylés peuvent former des agrégats de plus haut poids moléculaire et que, en outre, une activité ectophosphatase (Zhang et al., 2002) pourrait contrebalancer ces ecto-PKC pour induire la formation d'agrégats de haut poids moléculaire.

Cette régulation extracellulaire de l'agrégation de Fas pourrait jouer un rôle capital dans sa voie de signalisation. En effet, Papoff et al. (1999) ont montré que la formation des complexes de pré-association de Fas dépendait d'un domaine extracellulaire d'oligomérisation indépendant du ligand. De plus, ces complexes sont un pré-requis pour la fixation de FasL et la transmission du signal apoptotique (Siegel et al., 2000). De ce fait, nous pouvons supposer que la phosphorylation extracellulaire de Fas par les ecto-PKC régule la formation des complexes de pré-association de Fas par l'ajout de résidus chargés négativement qui les déstabilisent et empêche ainsi une oligomérisation spontanée des récepteurs. Une telle régulation des fonctions de Fas par des molécules chargées négativement a déjà été proposée dans le cas de la sialylation de surface de Fas (Keppler et al., 1999).

Bien qu'aucune donnée préalablement rapportée n'ait mis en évidence une phosphorylation extracellulaire du récepteur Fas, la phosphorylation du récepteur Fas a déjà été mise en évidence dans le domaine intracytoplasmique proximal de la membrane (Kennedy et al., 1998).

Comme aucune différence n'a été détectée entre la séquence nucléique des ADNc de Fas de la lignée lymphocytaire T Jurkat utilisée et celle qui a été décrite dans la littérature, cette ectophosphorylation n'est pas un artefact dû à une mutation du gène de Fas dans la lignée utilisée pour cette étude. La prédiction des sites potentiels de phosphorylation par la protéine kinase C dans la partie extracellulaire de Fas a permis de mettre en évidence 3 sites potentiels. De façon intéressante, le premier est situé dans le domaine de pré-association indépendante du ligand, décrit par Siegel et al. en 2000. De ce fait, la phosphorylation de ce site par des ecto-PKC pourrait directement moduler l'oligomérisation de Fas indépendante de son ligand et l'activation de l'apoptose. Ce mécanisme de modulation extracellulaire de Fas a été suggéré par Papoff et al. (1999) et décrit par Siegel et al. (2000) bien qu'aucun des deux n'en aient identifié le facteur.

Les deux autres sites de phosphorylation sont situés dans le domaine de fixation du ligand, au niveau de sa jonction avec le PLAD. De ce fait, ils pourraient également agir sur l'oligomérisation de Fas indépendante de son ligand, mais également sur l'affinité de liaison de FasL à Fas et moduler ainsi sa voie de signalisation.

Le rôle de l'ectophosphorylation de Fas dans la modulation des regroupements membranaires du récepteur et l'induction d'apoptose, selon le modèle proposé par Algeciras-Schimmich et al. (2002), au cours de la signalisation de Fas après son activation, peut être ainsi proposé. Nos résultats montrent que l'inhibition des ecto-PKC augmente fortement le regroupement de Fas à la membrane, mais également l'apoptose (détectée par TUNEL ou ELISA-apoptose), et ce dans les conditions basales ou après activation de Fas par FasL. Ces résultats prouvent l'implication des ecto-PKC dans le regroupement membranaire de récepteurs Fas et l'apoptose induite par ceux-ci.

L'inhibition des ecto-PKC augmente fortement l'apoptose même à l'état basal. De façon similaire, Rudert et al. (1997), à l'aide de récepteurs chimériques CD40/CD95, ont également montré que Fas peut induire l'apoptose en absence de FasL, et ceci sous une forme

simplement dimérique, pourvu que sa conformation spatiale permette la transmission de son signal. Ces résultats suggèrent donc que les ecto-PKC agissent en amont du signal transmis par la fixation du ligand, de façon très précoce dans la voie de signalisation de Fas, probablement au niveau des complexes pré-associés de Fas.

De plus, le blocage des ecto-PKC après exposition des cellules à FasL entraîne une forte augmentation des regroupements membranaires de Fas et des cellules en apoptose. Cette apoptose est diminuée de moitié par l'inhibiteur de la caspase-8, et ce avec ou sans blocage des ecto-PKC. Ces résultats montrent que les ecto-PKC régulent négativement l'apoptose induite par la voie de Fas, en agissant de façon précoce au niveau de la formation des regroupements membranaires de Fas à la membrane plasmique, prévenant ainsi l'apoptose induite.

Plusieurs travaux précédents ont montré que l'activation des PKC par des esters de phorbol prévient l'apoptose induite par Fas (Ruiz-Ruiz et al., 1997 ; Gomez-Angelats, 2001 ; Herrant et al., 2002 ; Busuttil et al., 2002). De plus, Ruiz-Ruiz et al. ont montré en 1999 que le PDBu permet de prévenir l'agrégation de Fas à la membrane et l'apoptose induite par FasL par une voie dépendante de la PKC. Les esters de phorbol sont des activateurs puissants des PKC qui activent également les ecto-PKC, cette activation pouvant être complètement bloquée par l'inhibiteur d'ectokinase K252b (Saito et al., 1999). Après exposition à FasL, le PDBu prévient l'apoptose induite par FasL (Gomez-Angelats, 2001 ; Herrant et al., 2002 ; Busuttil et al., 2002). Or, Ruiz-Ruiz et al. (1999) ont montré que l'inhibition du regroupement membranaire de Fas et de son apoptose par la PKC était indépendante de la voie des MAPK. De ce fait, nous pouvons proposer, d'après nos propres travaux que cette inhibition est due à des ecto-PKC.

L'implication du domaine extracellulaire de Fas pour l'inhibition de sa voie de signalisation par la PKC a déjà été montrée par Rudert et al en 1997, mais c'est à notre connaissance la première fois qu'il est montré une régulation de la voie de signalisation de Fas par la phosphorylation de son domaine extracellulaire.

D'après l'ensemble des résultats obtenus dans cette étude, nous pouvons proposer un nouveau modèle de régulation de la voie de signalisation du récepteur Fas, par des protéines kinase C extracellulaires. Ces ecto-PKC agirait de façon très précoce dans la voie de Fas, en

phosphorylant les agrégats de Fas de faible poids moléculaire. Elles permettraient ainsi d'éviter la formation spontanée d'agrégats de Fas de haut poids moléculaire, par le domaine extracellulaire d'oligomérisation indépendant du ligand. Ce mécanisme permettrait de réguler la quantité de Fas présent sous forme pré-associée à la membrane et pourrait de ce fait prévenir le regroupement de Fas à la membrane cellulaire, et donc l'apoptose.

Cette nouvelle voie de régulation de Fas pourrait jouer un rôle très important car le récepteur Fas possède un rôle clé dans l'organisme, tout particulièrement au niveau du système immunitaire, où Fas permet d'une part, de réguler les populations lymphocytaires, et d'autre part, d'éliminer les cellules de l'organisme infectées par un virus ou tumorales. De ce fait, le blocage de la mort cellulaire induite par Fas induit la survie de populations lymphocytaires auto-réactives comme cela est observé chez les souris *lpr* et *lpr<sup>cg</sup>* possédant un gène Fas non –fonctionnel et qui développent diverses pathologies autoimmunes tels qu'un syndrome « lupus-like » et une glomérulonéphrite (Adachi et al., 1993). Chez l'homme, les mutations du gène Fas entraînent des pathologies lymphoprolifératives T (Le Deist et al., 1996). Le blocage des ecto-PKC pourrait ainsi permettre de sensibiliser à l'apoptose induite par Fas des cellules normalement résistantes comme cela est retrouvé dans plusieurs processus tumorigènes (Hug et al, 1997), permettant ainsi la destruction de ces cellules anormales par le système immunitaire.

Cependant, d'autres études doivent être menées concernant la régulation des ecto-PKC ainsi que des ecto-phosphatases qui leur sont associées. En outre, il est possible que l'activité des kinases et phosphatases extracellulaires diffèrent selon les types cellulaires, jouant éventuellement un rôle dans la spécificité cellulaire de la protéine Fas mise en évidence dans nos études précédentes. Enfin, comme elles modulent aussi directement le regroupement membranaire de Fas et l'apoptose, elles pourraient jouer un rôle clé dans les pathologies liées à la protéine Fas (Redegeld et al., 1999), telles que la tumorigénèse, l'hépatite auto-immune, ou encore des maladies neurologiques (sclérose latérale amyotrophique).

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les mécanismes pathogéniques de l'atteinte sélectivement motoneuronale de la SLA sont encore inconnus. Nos travaux apportent des arguments en faveur, d'une part de l'implication d'un processus apoptotique au cours de la SLA, et d'autre part de l'hypothèse d'une participation autoimmune à la pathogénie de certains cas de formes sporadiques de la SLA. En effet, la découverte d'autoanticorps anti-Fas dans 26 % des sérums de malades atteints de SLA pose la question de leur rôle dans la dégénérescence motoneuronale, d'autant plus que l'apoptose induite par ces sérums de malades sur des cellules humaines neuroblastiques ou des motoneurons murins est bloquée par l'inhibiteur de la caspase-8, ce qui suggère le rôle pro-apoptotique de ces autoanticorps, au moins *in vitro*.

L'implication de ces autoanticorps dans le processus neurodégénératif de la SLA est en outre renforcée par la mise en évidence que les neurones moteurs de rat expriment le récepteur Fas *in vivo* et *in vitro*, et de plus sont sensibles à l'apoptose induite par la stimulation du récepteur par FasL ou un anticorps agoniste. Enfin, les études réalisées chez l'homme avec des cultures primaires de neurones fœtaux mais aussi avec des coupes de moelle épinière et de cerveau de fœtus de 10 semaines ont permis de montrer que le récepteur Fas est exprimé par les motoneurons humains et d'étudier leur sensibilité à l'apoptose induite par son ligand. Cependant, les motoneurons humains apparaissent relativement résistants à l'apoptose induite par la voie Fas, et des études complémentaires doivent être réalisées pour déterminer les facteurs impliqués dans cette résistance et les voies de signalisation de Fas dans les neurones moteurs. Celles-ci pourraient aboutir à la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques inhibitrices de la voie de Fas qui pourraient être envisagées dans le traitement des formes sporadiques de SLA associées à des taux élevés d'autoanticorps anti-Fas.

Il semble également important de préciser le rôle du récepteur Fas au niveau des neurones humains fœtaux. Comme la culture de cellules neuronales fœtales ne permet pas de disposer de grandes quantités de cellules, nous l'avons également étudié avec la lignée neuroblastique humaine SH-SY5Y. Dans cette lignée, nous avons mis en évidence une



hétérogénéité de l'expression de Fas. Le tri des cellules de cette lignée neuroblastique par SdFFF a permis d'obtenir trois populations distinctes, d'une part, selon des critères morphologiques, et d'autre part, dans l'expression à leur surface du récepteur Fas et de la molécule d'adhérence N-CAM. Cette étude suggère la présence dans cette lignée de cellules neuroblastiques à des stades distincts de différenciation. La SdFFF permet de séparer ces populations qui pourraient servir de modèle d'étude *in vitro* des stades de différenciation neuroblastiques. Des études doivent être menées afin de mieux caractériser les stades de différenciation de ces populations et d'étudier les facteurs induisant leur prolifération et leur différenciation.

A l'issue de ces travaux, deux questions majeures ont été évoquées. La première concernait l'origine et le rôle de ces autoanticorps anti-Fas. Ces autoanticorps sont-ils à l'origine de la dégénérescence motoneuronale, ou bien sont-ils induits consécutivement au processus neurodégénératif pour lequel ils auraient éventuellement un rôle aggravant ? La seconde question concernait la spécificité de ces autoanticorps anti-Fas, car alors que le récepteur Fas est exprimé par un grand nombre de cellules de l'organisme dont les cellules hépatiques et du système immunitaire, aucune manifestation sévère associée à Fas dans ces types cellulaires n'a été jusque-là décrite au cours de la SLA. De plus, les Ig purifiées d'un sérum de malade présentant un taux important d'autoanticorps anti-Fas induisaient l'apoptose d'une lignée neuroblastique humaine mais pas celle d'une lignée lymphocytaire T.

De ce fait, nous avons poursuivi nos travaux en développant un modèle de souris immunisées par les protéines Fas neuroblastique ou lymphocytaire humaines. De façon surprenante, bien que les deux lots de souris aient développé des taux significatifs et identiques d'autoanticorps anti-Fas, seules les souris immunisées avec la protéine Fas neuroblastique ont développé une pathologie. En effet, plusieurs de ces souris ont développé une hépatite autoimmune, comme cela a déjà été décrit par d'autres auteurs avec l'injection d'un anticorps monoclonal anti-Fas agoniste. Ces travaux suggèrent l'existence d'une spécificité cellulaire de la protéine Fas au niveau des neurones comme d'autres auteurs l'ont déjà suggéré pour les cellules hépatiques et immunitaires. Cependant, le rôle des autoanticorps anti-Fas dans l'atteinte motrice doit être confirmé par des études histologiques. Cependant, l'absence de lésion chez les souris immunisées avec la protéine Fas lymphocytaire suggère que les autoanticorps anti-Fas obtenus avec le lot immunisé par la protéine Fas

neuroblastique possèdent des spécificités fines différentes de celles des autoanticorps induits par la protéine Fas lymphocytaire. Il semble donc important de répéter ces travaux afin d'une part, de confirmer les résultats obtenus, et d'autre part, de créer des hybridomes à partir des lymphocytes B de souris pour caractériser les spécificités des anticorps induits. En outre, l'obtention d'anticorps spécifiques d'un type cellulaire de Fas pourrait permettre d'envisager de nouvelles thérapies immunologiques à l'aide d'anticorps anti-Fas bloquants pour les hépatites auto-immunes ou la SLA, ou bien des anticorps anti-Fas agonistes pour l'élimination de cellules tumorales telles que celles des lymphomes.

Enfin, de nombreux travaux, dont ceux réalisés au cours de cette étude, suggèrent l'existence d'une spécificité cellulaire de la protéine Fas. Celle-ci pourrait être due à des modifications post-traductionnelles du récepteur Fas, grâce à des phosphorylations ou des glycosylations. Dans cette hypothèse, nous avons mis en évidence la phosphorylation extracellulaire du récepteur Fas par des protéines kinases C extracellulaires. De plus, nous avons également montré que cette ecto-phosphorylation régule de façon précoce le signal apoptotique de Fas et empêche l'oligomérisation de Fas à la membrane en l'absence de son ligand. De ce fait, il semble important d'étudier la phosphorylation extracellulaire de Fas dans d'autres types cellulaires afin de déterminer son rôle dans la sensibilité spécifique des cellules à l'apoptose induite par FasL et éventuellement dans la spécificité cellulaire de Fas. Toutefois, la glycosylation de Fas semble également un point important à vérifier car de nombreux auteurs ont montré qu'elle variait selon les types cellulaires et ainsi ces résidus glucidiques pourraient jouer un rôle important dans la spécificité cellulaire de Fas.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

Abe K, Pan LH, Watanabe M, Kato T, Itoyama Y. Induction of nitrotyrosine-like immunoreactivity in the lower motor neuron of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* 1995, 199, 152-154.

Abreu-Martin MT, Palladino AA, Faris M, Carramanzana NM, Nel AE, Targan SR. Fas activates the JNK pathway in human colonic epithelial cells: lack of a direct role in apoptosis. *Am J Physiol.* 1999, 276(3), 599-605.

Adachi M, Suematsu S, Kondo T, Ogasawara J, Tanaka T, Yoshida N, Nagata S. Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver. *Nat Genet.* 1995, 11(3), 294-300.

Adachi M, Watanabe-Fukunaga R, Nagata S. Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of lpr mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993, 90(5), 1756-60.

Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science.* 1998, 281, 1322-6.

Ahn JH, Park SM, Cho HS, Lee MS, Yoon JB, Vilcek J. Non-apoptotic signaling pathways activated by soluble Fas ligand in serum-starved human fibroblasts. Mitogen-activated protein kinases and NF- $\kappa$ B-dependent gene expression. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 47100-6.

Alam A, Cohen LY, Aouad S, Sekaly RP. Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. *J. Exp. Med.* 1999, 190, 1879-90.

Al-Chalabi A, Andersen PM, Nilsson P, Chioza B, Andersson JL, Russ C, Shaw CE, Powell JF, Leigh PN. Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet.* 1999, Feb 8, (2), 157-64.

Alderson MR, Armitage RJ, Maraskovsky E, Tough TW, Roux E, Schooley K. Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1993, 178, 2231-5.

Alderson MR, Tough TW, Braddy S, Davis-Smith T, Roux E, Schooley K, Miller RE, Lynch DH. Regulation of apoptosis and T cell activation by Fas-specific mAb. *Int Immunol.* 1994, 6(11), 1799-806.

Alexianu ME, Mohamed AH, Smith RG, Colom LV, Appel SH. Apoptotic cell death of a hybrid motoneuron cell line induced by immunoglobulins from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 1994, 63(6), 2365-8.

Algeciras-Schimmich A, Shen L, Barnhart BC, Murmann AE, Burkhardt JK, Peter ME. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol. Cell. Biol.* 2002, 22(1), 207-20.

Alvarez-Buylla A, Seri B, Doetsch F. Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain. Res. Bull.* 2002, 57(6), 751-8.

Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med.* 1997, 3(8), 917-21.

Anderson, P. Kinase cascades regulating entry into apoptosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1997, 61, 33-46.

Aoki M, Lin CL, Rothstein JD, Geller BA, Hosler BA, Munsat TL, Horvitz HR, Brown RH Jr. Mutations in the glutamate transporter EAAT2 gene do not cause abnormal EAAT2 transcripts in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 1998, 43(5), 645-53.

Aoyama T, Takemura G, Maruyama R, Kosai K, Takahashi T, Koda M, Hayakawa K, Kawase Y, Minatoguchi S, Fujiwara H. Molecular mechanisms of non-apoptosis by Fas stimulation alone versus apoptosis with an additional actinomycin D in cultured cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* 2002, 55(4), 787-98.

Appel SH, Engelhardt JI, Garcia J, Stefani E. Autoimmunity and ALS: a comparison of animal models of immune-mediated motor neuron destruction and human ALS. *Adv. Neurol.* 1991, 56, 405-12.

Appel SH, Engelhardt JI, Garcia J, Stefani E. Immunoglobulins from animal models of motor neuron disease and from human amyotrophic lateral sclerosis patients passively transfer

physiological abnormalities to the neuromuscular junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1991, 88(2), 647-51.

Appel SH, Stewart SS, Appel V, Harati Y, Mietlowski W, Weiss W, Belendiuk GW. A double-blind study of the effectiveness of cyclosporine in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch. Neurol.* 1988, 45(4), 381-6.

Arakawa Y, Sendtner M, Thoenen H. Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture: comparison with other neurotrophic factors and cytokines. *J Neurosci.* 1990, 10, 3507-3515.

Arakawa Y, Sendtner M, Thoenen H. Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture: comparison with other neurotrophic factors and cytokines. *J Neurosci.* 1990, 10, 3507-3515.

Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 1999, 11(2), 255-60.

Babinska A, Hogan MV, Sobocki T, Sobocka MB, Ehrlich YH, Kordecki E. Identification of ecto-PKC on surface of human platelets: role in maintenance of latent fibrinogen receptors. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2000, 278(6), 2008-19

Bar PR. Motor neuron disease in vitro: the use of cultured motor neurons to study amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Pharmacol.* 2000, 405(1-3), 285-95.

Beaulieu JM, Nguyen MD, Julien JP. Late onset death of motor neurons in mice overexpressing wild-type peripherin. *J. Cell Biol.* 1999, 147, 531-544.

Becher B, D'Souza SD, Troutt AB, Antel JP. Fas expression on human foetal astrocytes without susceptibility to fas-mediated cytotoxicity. *Neuroscience.* 1998, 84(2), 627-634.

Beckman JS, Ischiropoulos H, Zhu L, van der Woerd M, Smith C, Chen J, Harrison J, Martin JC, Tsai M. Kinetics of superoxide dismutase- and iron-catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 1992, 298(2), 438-45.

Ben Younes-Chennoufi A, Rozier A, Dib M, Bouche P, Lacomblez L, Mombo N, Ben Simon G, Yu RK, Baumann N, Meininger V. Anti-sulfoglucuronyl paragloboside IgM antibodies in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 1995, 57(1-2), 111-5.

Bensimon G, Lacomblez L, Delumeau JC, Bejuit R, Truffinet P, Meininger V; Riluzole/ALS Study Group II. A study of riluzole in the treatment of advanced stage or elderly patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol.* 2002, May 249, (5), 609-15.

Berger MM, Kopp N, Vital C, Redl B, Aymard M, Lina B. Detection and cellular localization of enterovirus RNA sequences in spinal cord of patients with ALS. *Neurology.* 2000, Jan 11, 54, (1), 20-5.

Bergeron C, Beric-Maskarel K, Muntasser S, Weyer L, Somerville MJ, Percy ME. Neurofilament light and polyadenylated mRNA levels are decreased in amyotrophic lateral sclerosis motor neurons. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1994, 53(3), 221-30.

Bertin J, Armstrong RC, Otilie S, Martin DA, Wang Y, Banks S, Wang GH, Senkevich TG, Alnemri ES, Moss B, Lenardo MJ, Tomaselli KJ, and Cohen JJ. Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1997, 94, 1172-6.

Bertin J, Nir WJ, Fischer CM, Tayber OV, Errada PR, Grant JR, Keilty JJ, Gosselin ML, Robison KE, Wong GH, Glucksmann MA, DiStefano PS. Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB *J Biol Chem* 1999 May 7;274(19):12955-8.

Bettinardi A, Brugnoli D, Quiros-Roldan E, Malagoli A, La Grutta S, Corra A, Notarangelo LD. Missense mutations in the Fas gene resulting in autoimmune lymphoproliferative syndrome: a molecular and immunological analysis. *Blood.* 1997, 89(3), 902-9.

Bicknell GR, and Cohen GM. Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995, 207, 40-7.

Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH, Wallach D. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J. Biol. Chem.* 1995, 270(14), 7795-8.

Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1995, 92(16), 7162-6.

Borchelt DR, Lee MK, Slunt HS, Guarnieri M, Xu ZS, Wong PC, Brown RH Jr, Price DL, Sisodia SS, Cleveland DW. Superoxide dismutase 1 with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1994, 91(17), 8292-6.

Bristol LA, Rothstein JD. Glutamate transporter gene expression in amyotrophic lateral sclerosis motor cortex. *Ann. Neurol.* 1996, 39(5), 676-9.

Brooks, B.R. El Escorial world federation of neurology criteria for the diagnosis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 1994, 124 (suppl), 96-107.

Brujin LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Ohama E, Reaume AG, Scott RW, Cleveland DW. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science.* 1998, 281(5384), 1851-4.

Bruses J.L., Rutishauser U. Regulation of neural cell adhesion molecule polysialylation: evidence for nontranscriptional control and sensitivity to an intracellular pool of calcium. *J. Cell. Biol.* 1998, 140(5), 1177-86.

Bucher P, Bairoch A. A generalized profile syntax for biomolecular sequences motifs and its function in automatic sequence interpretation. ISMB-94; Proceedings 2nd International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology. Altman R, Brutlag D, Karp P, Lathrop R, Searls D, Eds, pp53-61, AAAIPress, Menlo Park, 1994.

Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 1999, 15, 269-90.



Bump NJ, Hackett M, Hugunin M, Seshagiri S, Brady K, Chen P, Ferenz C, Franklin S, Ghayur T, Li P. Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science*. 1995, 269, 1885-8.

Busuttill V, Bottero V, Frelin C, Imbert V, Ricci JE, Auberger P, Peyron JF. Blocking NF-kappaB activation in Jurkat leukemic T cells converts the survival agent and tumor promoter PMA into an apoptotic effector. *Oncogene* 2002, 21(20), 3213-24.

Camerini D, Walz G, Loenen WA, Borst J, Seed B. The T cell activation antigen CD27 is a member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor gene family. *J. Immunol.* 1991, 147, 3165-9.

Campbell MJ, Morrison JH. Monoclonal antibody to neurofilament protein (SMI-32) labels a subpopulation of pyramidal neurons in the human and monkey neocortex. *J. Comp. Neurol.* 1989, 282(2), 191-205.

Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, and Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*. 1998, 282, 1318-21.

Cardone MH, Salvesen GS, Widmann C, Johnson G, Frisch SM. The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell*. 1997, 90, 315-23.

Carpenter MB, Sutin J. *Human neuroanatomy*. Williams and Wilkins, Baltimore, 1983.

Carpenter S. Proximal axonal enlargement in motor neuron disease. *Neurology*. 1968, 18(9), 841-51.

Carriedo SG, Yin HZ, Lamberta R, Weiss JH. In vitro kainate injury to large, SMI-32 (+) spinal neurons is Ca<sup>2+</sup> dependent. *Neuroreport*. 1995, 6, 945-948.

Carriedo SG, Yin HZ, Weiss JH. Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury in vitro. *J. Neurosci.* 1996, 16(13), 4069-79.

Chang HY, Nishitoh H, Yang X, Ichijo H, Baltimore D. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science*. 1998, 281, 1860-3.

Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A, Bookwalter A, Murray J, Hood L. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity*. 1997, 7, 821-30.

Cheema ZF, Wade SB, Sata M, Walsh K, Sohrabji F, Miranda RC. Fas/Apo [apoptosis]-1 and associated proteins in the differentiating cerebral cortex: induction of caspase-dependent cell death and activation of NF-kappaB. *J. Neurosci*. 1999, 19, 1754-1770.

Chen CY, Faller DV. Selective inhibition of protein kinase C isozymes by Fas ligation. *J. Biol. Chem*. 1999, 274(22), 15320-8.

Chen W, Wieraszko A, Hogan MV, Yang HA, Kornecki E, Ehrlich YH. Surface protein phosphorylation by ecto-protein kinase is required for the maintenance of hippocampal long-term potentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1996, 93(16), 8688-93.

Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science*. 1994, 263(5154), 1759-62.

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*. 1995, 81(4), 505-12.

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Yu GL, Lyons RH, Garg M, Duan DR, Xing L, Gentz R, Ni J, Dixit VM. Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science*. 1996, 274, 990-2.

Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, O'Rourke K, Kischkel FC, Hellbardt S, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem*. 1996, 271(9), 4961-5.

Choi C, Park JY, Lee J, Lim JH, Shin EC, Ahn YS, Kim CH, Kim SJ, Kim JD, Choi IS, Choi IH. Fas ligand and Fas are expressed constitutively in human astrocytes and the expression increases with IL-1, IL-6, TNF-alpha, or IFN-gamma. *J. Immunol*. 1999, 162, 1889-1895.

Chou SM, Wang HS, Taniguchi A. Role of SOD-1 and nitric oxide/cyclic GMP cascade on neurofilament aggregation in ALS/MND. *J Neurol Sci.* 1996, Aug 139, Suppl:16-26.

Ciusani E, Gelati M, Frigerio S, Pollo B, Massa G, Sacerdote P, Panerai AE, Salmaggi A. Modulation of experimental allergic encephalomyelitis in lewis rats by administration of a Peptide of fas ligand. *J. Autoimmun.* 2001, 17, 273-280.

Cleveland DW, Bruijn LI, Wong PC, Marszalek JR, Vechio JD, Lee MK, Xu XS, Borchelt DR, Sisodia SS, Price DL. Mechanisms of selective motor neuron death in transgenic mouse models of motor neuron disease. *Neurology.* 1996, 47(4 Suppl 2), 54-61.

Cleveland DW, Monteiro MJ, Wong PC, Gill SR, Gearhart JD, Hoffman PN. Involvement of neurofilaments in the radial growth of axons. *J. Cell. Sci. Suppl.* 1991, 15, 85-95.

Cock JG, Tepper AD, de Vries E, van Blitterswijk WJ, Borst J. CD95 (Fas/APO-1) induces ceramide formation and apoptosis in the absence of a functional acid sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 7560-5.

Cote F, Collard JF, Julien JP. Progressive neuronopathy in transgenic mice expressing the human neurofilament heavy gene: a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell.* 1993, 73(1), 35-46.

Couratier P, Hugon J, Sindou P, Vallat JM, Dumas M. Cell culture evidence for neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis being linked to glutamate AMPA/kainate receptors. *Lancet.* 1993, 341(8840), 265-8.

Couratier P, Yi FH, Preud'homme JL, Clavelou P, White A, Sindou P, Vallat JM, Jauberteau MO. Serum autoantibodies to neurofilament proteins in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 1998, 154(2), 137-45.

Coutinho A, Kazatchkine MD, Avrameas S. Natural autoantibodies. *Curr. Opin. Immunol.* 1995, 7, 812-818.

Couzinet A, Hérincs Z, Hueber AO. Régulation de la mort cellulaire programmée : vers une conception plus dynamique. *MEDECINE/SCIENCES*. 2002, 18, 841-52.

Cremeri A, Paris F, Grassme H, Holler N, Tschopp J, Fuks Z, Gulbins E, Kolesnick R. Ceramide enables fas to cap and kill. *J Biol Chem*. 2001 Jun 29;276(26):23954-61.

Crompton M. Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis. *Curr. Opin. Cell. Biol*. 2000, 12, 414-9.

Dalakas MC, Stein DP, Otero C, Sekul E, Cupler EJ, McCrosky S. Effect of high-dose intravenous immunoglobulin on amyotrophic lateral sclerosis and multifocal motor neuropathy. *Arch. Neurol*. 1994, 51(9), 861-4.

Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. 2000, 103, 239-52.

De la Monte SM, Sohn YK, Ganju N, Wands JR. p53- and CD95-associated apoptosis in neurodegenerative diseases. *Lab. Invest*. 1998, 78, 401-411

De la Monte SM, Sohn YK, Wands JR. Correlates of p53- and Fas (CD95)-mediated apoptosis in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci*. 1997, 152, 73-83.

Deak JC, Cross JV, Lewis M, Qian Y, Parrott LA, Distelhorst CW. Fas-induced proteolytic activation and intracellular redistribution of the stress-signaling kinase MEKK1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998, 95, 5595-600.

Deigner HP, Haberkorn U, Kinscherf R. Apoptosis modulators in the therapy of neurodegenerative diseases. *Expert Opinion Investigating Drugs*. 2000, 9, 747-764.

Delfs JR, Saroff DM, Nishida Y, Friend J, Geula C. Effects of NMDA and its antagonists on ventral horn cholinergic neurons in organotypic roller tube spinal cord cultures. *J. Neural. Transm*. 1997, 104(1), 31-51.

Desai J, Sharief M, Swash M. Riluzole has no acute effect on motor unit parameters in ALS. *J. Neurol. Sci*. 1998, 160 (Suppl 1), 69-72.

Desbarats J, Birge RB, Mimouni-Rongy M, Weinstein DE, Palerme JS, Newell MK. Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nat Cell Biol.* 2003, Feb 5, (2), 118-25.

Detrait E, Lhoest JB, Knoops B, Bertrand P, van den Bosch de Aguilar P. Orientation of cell adhesion and growth on patterned heterogeneous polystyrene surface. *J. Neurosci. Methods.* 1998, 84, 193-204.

Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *Embo J.* 1998, 17, 2215-23.

Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature.* 1997, 388, 300-4.

Dong Z, Saikumar P, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *Am. J. Pathol.* 1997, 151, 1205-13.

Dowling P, Shang G, Raval S, Menonna J, Cook S, Husar W. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in multiple sclerosis brain. *J Exp Med.* 1996, 184(4), 1513-8.

Downward, J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 1998, 10, 262-7.

Drachman DB, Chaudhry V, Cornblath D, Kuncl RW, Pestronk A, Clawson L, Mellits ED, Quaskey S, Quinn T, Calkins A. Trial of immunosuppression in amyotrophic lateral sclerosis using total lymphoid irradiation. *Ann. Neurol.* 1994, 35(2), 142-50.

Drachman DB, Frank K, Dykes-Hoberg M, Teismann P, Almer G, Przedborski S, Rothstein JD. Cyclooxygenase 2 inhibition protects motor neurons and prolongs survival in a transgenic mouse model of ALS. *Ann. Neurol.* 2002, 52(6), 771-8.

D'Souza SD, Bonetti B, Balasingam V, Cashman NR, Barker PA, Troutt AB, Raine CS, Antel JP. Multiple sclerosis: Fas signaling in oligodendrocyte cell death. *J. Exp. Med.* 1996, 184, 2361-2370.

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 2000, 102, 33-42

Duarte F, Binet S, Lacomblez L, Bouche P, Preud'homme JL, Meininger V. Quantitative analysis of monoclonal immunoglobulins in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 1991, 104(1), 88-91.

Durkop H, Latza U, Hummel M, Eitelbach F, Seed B, Stein H. Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease. *Cell.* 1992, 68, 421-7.

Dusenbery KE, Mendiola JR, Skubitz KM. Evidence for ecto-protein kinase activity on the surface of human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988, 153(1), 7-13

Duvall E, Wyllie AH. Death and the cell. *Immunol. Today.* 1986, 7, 115-19.

Ebens A, Brose K, Leonardo ED, Hanson MGJ, Bladt F, Birchmeier C, Barres BA, Tessier-Lavigne M. Hepatocyte growth factor/scatter factor is an axonal chemoattractant and a neurotrophic factor for spinal motor neurons. *Neuron.* 1996, 17, 1157-1172.

Enari M, Hug H, Nagata S. Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature.* 1995, 375, 78-81.

Engelhardt JI, Appel SH, Killian JM. Experimental autoimmune motoneuron disease. *Ann. Neurol.* 1989, 26(3), 368-76.

Engelhardt JI, Appel SH. IgG reactivity in the spinal cord and motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch. Neurol.* 1990, 47(11), 1210-6.

Ericson J, Thor S, Edlund T, Jessell TM, Yamada T. Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene *Islet-1*. *Science.* 1992, 256(5063), 1555-60.

Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol. Cell. Biol.* 2000, 20, 929-35.

Fadeel B, Thorpe CJ, Yonehara S, Chiodi F. Anti-Fas IgG1 antibodies recognizing the same epitope of Fas/APO-1 mediate different biological effects *in vitro*. *Int. Immunol.* 1997, 9, 201-209.

Falquet L, Pagni M, Bucher P, Hulo N, Sigrist CJ, Hofmann K, Bairoch A. The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Res.* 2002, 30, 235-238.

Ferrer I, Puig B, Krupinsk J, Carmona M, Blanco R. Fas and Fas ligand expression in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2001, 102, 121-131.

Ferri RT, Levitt P. Regulation of regional differences in the differentiation of cerebral cortical neurons by EGF family-matrix interactions. *Development.* 1995, 121, 1151-60.

Figlewicz DA, Krizus A, Martinoli MG, Meininger V, Dib M, Rouleau GA, Julien JP. Variants of the heavy neurofilament subunit are associated with the development of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* 1994, 3(10), 1757-61.

Fisher G. H. et al. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* .1995, 81, 935-946.

Fishman PS, Drachman DB. Internalization of IgG in motoneurons of patients with ALS: selective or nonselective?. *Neurology.* 1995, 45(8), 1551-4.

Foot LC, Schneider TJ, Fischer GM, Wang JK, Rasmussen B, Campbell KA, Lynch DH, Ju ST, Marshak-Rothstein A, Rothstein TL. Intracellular signaling for inducible antigen receptor-mediated Fas resistance in B cells. *J Immunol.* 1996, 157(5), 1878-85.

Freiberg RA, Spencer DM, Choate KA, Duh HJ, Schreiber SL, Crabtree GR, et al. Fas signal transduction triggers either proliferation or apoptosis in human fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 1997, 108, 215-9.

Fulda S, Scaffidi C, Pietsch T, Krammer PH, Peter ME, Debatin KM. Activation of the CD95 (APO-1/Fas) pathway in drug- and gamma-irradiation-induced apoptosis of brain tumor cells. *Cell Death Differ.* 1998, 5(10), 884-93.

Gagliardini V, Fernandez PA, Lee RK, Drexler HC, Rotello RJ, Fishman MC, Yuan J. Prevention of vertebrate neuronal death by the crmA gene [see comments] [published erratum appears in *Science*. 1994, 264(5164), 1388]. *Science*. 1994, 263, 826-8.

Gai WP, Vickers JC, Blumbergs PC, Blessing WW. Loss of non-phosphorylated neurofilament immunoreactivity, with preservation of tyrosine hydroxylase, in surviving substantia nigra neurons in Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 1994, 57, 1039-46.

Gasser UE, Hatten ME. Central nervous system neurons migrate on astroglial fibers from heterotypic brain regions in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1990, 87(12), 4543-7.

Geula C, Mesulam MM, Kuo CC, Tokuno H. Postnatal development of cortical acetylcholinesterase-rich neurons in the rat brain: permanent and transient patterns. *Exp. Neurol*. 1995, 134, 157-78.

Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF $\kappa$ B puzzle. *Cell*. 2002, 109, S81-96.

Giclas PC, Pinckard RN, Olson MS. In vitro activation of complement by isolated human heart subcellular membranes. *J. Immunol*. 1979, 122(1), 146-51.

Goillot E, Raingeaud J, Ranger A, Tepper RI, Davis RJ, Harlow E. and Sanchez, I. Mitogen-activated protein kinase-mediated Fas apoptotic signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997, 94, 3302-3307.

Gomez C, Reiriz J, Pique M, Gil J, Ferrer I, Ambrosio S. Low concentrations of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion induce caspase-mediated apoptosis in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J. Neurosci. Res*. 2001, 63, 421-428.

Gomez-Angelats M, Bortner CD, Cidlowski JA. Protein kinase C (PKC) inhibits fas receptor-induced apoptosis through modulation of the loss of K<sup>+</sup> and cell shrinkage. A role for PKC upstream of caspases. *J. Biol. Chem*. 2000, 275(26), 19609-19.

Gomez-Angelats M, Cidlowski JA. . Protein kinase C regulates FADD recruitment and death-inducing signaling complex formation in Fas/CD95-induced apoptosis. *J. Biol. Chem*. 2001, 276(48), 44944-52.



Green DR. Activation-induced apoptosis in lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 1994, 6, 476-487.

Grieshammer U, Lewandoski M, Pevette D, Oppenheim RW, Martin GR, Pettmann B, Henderson CE. Muscle-specific cell ablation conditional upon Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice leads to massive spinal and cranial motoneuron loss neuronal cell death. *Neuron.* 1998, 20, 633-647.

Gulbins E, Grassme H. Ceramide and cell death receptor clustering. *Biochim. Biophys. Acta.* 2002, 1585(2-3), 139-45.

Gulbins E. Regulation of death receptor signaling and apoptosis by ceramide. *Pharmacol. Res.* 2003, 47(5), 393-9.

Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science.* 1994, 264(5166), 1772-5.

Hamburger V. History of the discovery of neuronal death in embryos. *J Neurobiol.* 1992, 23(9), 1116-23.

Han DK, Chaudhary PM, Wright ME, Friedman C, Trask BJ, Riedel RT, Baskin DG, Schwartz SM, Hood L. MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1997, 94, 11333-8.

Hatmi M, Gavaret JM, Elalamy I, Vargaftig BB, Jacquemin C. Evidence for cAMP-dependent platelet ectoprotein kinase activity that phosphorylates platelet glycoprotein IV (CD36). *J. Biol. Chem.* 1996, 271(40), 24776-80.

Heath PR, Shaw PJ. Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve.* 2002, 26(4), 438-58.

Heath PR, Tomkins J, Ince PG, Shaw PJ. Quantitative assessment of AMPA receptor mRNA in human spinal motor neurons isolated by laser capture microdissection. *Neuroreport.* 2002, 13(14), 1753-7.

Henderson CE, Camu W, Mettling C, Gouin A, Poulsen K, Karihaloo M, Rullamas J, Evans T, McMahon SB, Armanini MP, Berkemeier L, Phillips HS, Rosenthal A. Neurotrophins promote motor neuron survival and are present in embryonic limb bud. *Nature*. 1993, 363, 266-270.

Henderson CE, Phillips HS, Pollock RA, Davies AM, Lemeulle C, Armanini M, Simpson LC, Moffet B, Vandlen RA, Koliatsos VE. GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science* 1994, 266, 1062-1064.

Herpers BL, Schrama LH, Kaal EC, Joosten EA, Dop Bar PR. Microinjection of catalase cDNA prevents hydrogen peroxide-induced motoneuron death. *Neuroreport* 1999 Aug 20;10(12):2647-50.

Herrant M, Luciano F, Loubat A, Auberger P. The protective effect of phorbol esters on Fas-mediated apoptosis in T cells. Transcriptional and postranscriptional regulation. *Oncogene*. 2002, 21(32), 4957-68.

Hetz CA, Hunn M, Rojas P, Torres V, Leyton L, Quest AF. Caspase-dependent initiation of apoptosis and necrosis by the Fas receptor in lymphoid cells: onset of necrosis is associated with delayed ceramide increase. *J. Cell. Sci.* 2002, 115(23), 4671-83.

Hirano A, Donnemfeld H, Sasaki S, Nakano I. Fine structural observations of neurofilamentous changes in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1984, 43(5), 461-70.

Hoffman PN, Cleveland DW, 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(10), 3472-6.

Holmstrom TH, Eriksson JE. Phosphorylation-Based signaling in Fas receptor-mediated apoptosis. *Crit. Rev. Immunol.* 2000, 20(2), 121-52.

Honig LS, Rosenberg RN. Apoptosis and neurologic disease. *Am .J. Med.* 2000, 108, 317-330.

Hsu SC, Wu CC, Luh TY, Chou CK, Han SH, Lai MZ. Apoptotic signal of Fas is not mediated by ceramide. *Blood*. 1998, 91, 2658-63.

Hu H, H Tomaszewicz, T Magnuson, Rutishauser U. The role of polysialic acid in the migration of olfactory interneuron precursors in the subventricular zone. *Neuron*. 1996, 16, 735-743.

Hu S, Vincenz C, Ni J, Gentz R, Dixit VM. I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *J. Biol. Chem*. 1997, 272, 17255-7.

Hu WH, Johnson H, Shu HB. Activation of NF- $\kappa$ B by FADD, Casper, and Caspase-8. *J. Biol. Chem*. 2000, 275, 10838-44.

Hu YM, Benedict MA, Wu DY, Inohara N, Nunez G. Bcl-X-L interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998, 95, 4386-4391.

Hug H. Fas-mediated apoptosis in tumor formation and defense. *Biol. Chem*. 1997, 378(12), 1405-12.

Hughes RA, Sendtner M, Thoenen H. Members of several gene families influence survival of rat motoneurons in vitro and in vivo. *J Neurosci Res* 1993, 36, 663-671.

Hughes RA, Sendtner M, Thoenen H. Members of several gene families influence survival of rat motoneurons in vitro and in vivo. *J Neurosci Res*. 1993, 36, 663-671.

Hugon J, Vallat JM, Dumas M. Role of glutamate and excitotoxicity in neurologic diseases. *Rev. Neurol. (Paris)*. 1996, 152(4), 239-48.

Ichikawa K, Yoshida-Kato H, Ohtsuki M, Ohsumi J, Yamaguchi J, Takahashi S, Tani Y, Watanabe M, Shiraishi A, Nishioka K, Yonehara S, Serizawa N. A novel murine anti-human Fas mAb which mitigates lymphadenopathy without hepatotoxicity. *Int. Immunol*. 2000, 12(4), 555-62.

Imai Y, Kimura T, Murakami A, Yajima N, Sakamaki K, Yonehara S. The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature*. 1999, 398, 777-785.

Inohara N, Ding L, Chen S, and Nunez G. harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *Embo J.* 1997, 16, 1686-94.

Inohara N, Koseki T, del Peso L, Hu Y, Yee C, Chen S, Carrio R, Merino J, Liu D, Ni J, and G N. Nod-1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 14560-14567.

Irmeler M, Hofmann K, Vaux D, Tschopp J. Direct physical interaction between the *Caenorhabditis elegans* 'death proteins' CED-3 and CED-4. *FEBS Lett.* 1997, 406, 189-90.

Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature.* 1997, 388, 190-5.

Itoh N, Nagata S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J. Biol. Chem.* 1993, 268(15), 10932-7.

Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell.* 1991, 66(2), 233-43.

Jacobs BC, van Doorn PA, Schmitz PI, Tio-Gillen AP, Herbrink P, Visser LH, Hooijkass H, van der Meche FG. *Campylobacter jejuni* infections and anti-GM1 antibodies in Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol.* 1996, 40(2), 181-7.

Jauberteau MO, Brindel I, Baumann N, Preud'homme JL. Reactivity of a human monoclonal anti-GM1 and anti-GD1b IgM antibody with human neurons in cultures. *J. Neuroimmunol.* 1993, 48, 53-58.

Jauberteau MO, Cook JM, Drouet M, Preud'homme JL. Affinity immunoblotting detection of serum monoclonal immunoglobulins reactive with glycosphingolipids. *J. Immunol. Methods.* 1990, 134, 107-112.

Jelaska A, Korn JH. Anti-Fas induces apoptosis and proliferation in human dermal fibroblasts: differences between foreskin and adult fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* 1998, 175, 19–29.

Jellinger, K. A. Cell death mechanisms in Parkinson's disease. *J. Neural. Transm.* 2000, 107, 1-29.

Johnson D, Lanahan A, Buck CR, Sehgal A, Morgan C, Mercer E, Bothwell M, Chao M. Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell.* 1986, 47, 545-54.

Ju ST, Panka DJ, Cui H, Ettinger R, el-Khatib M, Sherr DH, Stanger BZ, Marshak-Rothstein A. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature.* 1995, 373(6513), 444-8.

Julien JP, Beaulieu JM. Cytoskeletal abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis: beneficial or detrimental effects? *J Neurol Sci.* 2000, Nov 1, 180, (1-2), 7-14.

Kagiyama A, Savage HE, Michael LH, Hanson G, Entman ML, Rossen RD. Molecular basis of complement activation in ischemic myocardium: identification of specific molecules of mitochondrial origin that bind human C1q and fix complement. *Circ Res.* 1989, Mar 64, (3), 607-15.

Kamitani T, Nguyen HP, Yeh ET. Activation-induced aggregation and processing of the human Fas antigen. Detection with cytoplasmic domain-specific antibodies. *J. Biol. Chem.* 1997, 272(35), 22307-14

Karin M, Lin A. NF $\kappa$ B at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.* 2002, 3, 221–7.

Kataoka T, Budd RC, Holler N, Thome M, Martinon F, Irmeler M, Burns K, Hahne M, Kennedy N, Kovacovics M, Tschopp J. The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Curr. Biol.* 2000, 10, 640-648.

Kato S, Negishi K, Mawatari K, Kuo CH. A mechanism for glutamate toxicity in the C6 glioma cells involving inhibition of cystine uptake leading to glutathione depletion. *Neuroscience.* 1992, 48(4), 903-14.

Kawahara Y, Kwak S, Sun H, Ito K, Hashida H, Aizawa H, Jeong SY, Kanazawa I. Human spinal motoneurons express low relative abundance of GluR2 mRNA: an implication for excitotoxicity in ALS. *J. Neurochem.* 2003, 85(3), 680-689.

Kempermann G. Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. *J. Neurosci.* 2002, 22(3), 635-8.

Kennedy NJ, Budd RC. Phosphorylation of FADD/MORT1 and Fas by kinases that associate with the membrane-proximal cytoplasmic domain of Fas. *J. Immunol.* 1998, 160(10), 4881-8.

Kennedy NJ, Kataoka T, Tschopp J, Budd RC. Caspase activation is required for T cell proliferation. *J. Exp. Med.* 1999, 190, 1891-6.

Keppler OT, Peter ME, Hinderlich S, Moldenhauer G, Stehling P, Schmitz I, Schwartz-Albiez R, Reutter W, Pawlita M. Differential sialylation of cell surface glycoconjugates in a human B lymphoma cell line regulates susceptibility for CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis and for infection by a lymphotropic virus. *Glycobiology.* 1999, 9.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 1972, 26, 239-57.

Kimura F, Smith RG, Delbono O, Nyormoi O, Schneider T, Nastainczyk W, Hofmann F, Stefani E, Appel SH. Amyotrophic lateral sclerosis patient antibodies label Ca<sup>2+</sup> channel alpha 1 subunit. *Ann. Neurol.* 1994, 35(2), 164-71

Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J.* 1995, 14(22), 5579-88.

Kiss JZ, Rougon G. Cell biology of polysialic acid. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1997, 7(5), 640-6.

Klas C, Debatin KM, Jonker RR, Krammer PH. Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int Immunol.* 1993, 5(6), 625-30.

Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*. 1997, 275, 1132-6.

Komada Y, Inaba H, Li QS, Azuma E, Zhou YW, Yamamoto H, Sakurai M. Epitopes and functional responses defined by a panel of anti-Fas (CD95) monoclonal antibodies. *Hybridoma*. 1999, 18(5), 391-8.

Komiyama T, Ray CA, Pickup DJ, Howard AD, Thornberry NA, Peterson EP, Salvesen G. Inhibition of interleukin-1 beta converting enzyme by the cowpox virus serpin CrmA. An example of cross-class inhibition. *J. Biol. Chem*. 1994, 269, 19331-7.

Kondratyev AD, Zotova EE, Loginov BV, Tsirenina ML, Melnik EI, Severin ES. Production and immunohistochemical characterization of primary cultures of human embryo brain cells. *Neuroscience*. 1989, 32, 261-8.

Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem. Res. Toxicol*. 1992, 5(6), 834-42.

Krammer P. H. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*. 2000, 407.

Kreegipuu A, Blom N, Brunak S. PhosphoBase, a database of phosphorylation sites: release 2.0. *Nucleic Acids Res*. 1999, 27(1), 237-239

Kreuz S, Siegmund D, Scheurich P, Wajant H. NF- $\kappa$ B inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol. Cell. Biol*. 2001, 21, 3964-73.

Kroemer G. The mitochondrion as an integrator/coordinator of cell death pathways. *Cell Death Differ*. 1998, Jun 5(6), 547.

Kumar S, Colussi PA. Prodomains adaptors-oligomerization: the pursuit of caspase activation in apoptosis. *Trends Biochem. Sci*. 1999, 24, 1-4.

Kwon B, Youn BS, Kwon BS. Functions of newly identified members of the tumor necrosis factor receptor/ligand superfamilies in lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 1999, 11(3), 340-5.

Lautrette C, Cardot PJ, Vermot-Desroches C, Wijdenes J, Jauberteau MO, Battu S. Sedimentation field flow fractionation purification of immature neural cells from a human tumor neuroblastoma cell line. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003 Jul 5;791(1-2):149-60.

Lautrette C, Giraud S, Vermot-Desroches C, Preud'homme JL, Jauberteau MO. Expression of a functional Fas death receptor by human foetal motoneurons. *Neuroscience.* 2003;119(2):377-85.

Le Deist F, Emile JF, Rieux-Laucat F, Benkerrou M, Roberts I, Brousse N, Fischer A. Clinical, immunological, and pathological consequences of Fas-deficient conditions. *Lancet.* 1996, 348(9029), 719-23.

Lee MK, Marszalek JR, Cleveland DW. A mutant neurofilament subunit causes massive, selective motor neuron death: implications for the pathogenesis of human motor neuron disease. *Neuron.* 1994, 13(4), 975-88.

Lee SJ, Zhou T, Choi C, Wang Z, Benveniste EN. Differential regulation and function of Fas expression on glial cells. *J. Immunol.* 2000, 164, 1277-1285.

Lee Y, Shacter E. Fas aggregation does not correlate with Fas-mediated apoptosis. *J. Immunol.* 2001, 167(1), 82-9.

Leithauser F, Dhein J, Mechtersheimer G, Koretz K, Bruderlein S, Henne C, Schmidt A, Debatin KM, Krammer PH, Moller P. Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab Invest.* 1993, 69(4), 415-29.

Lemke G. Glial control of neuronal development. *Annu. Rev. Neurosci.* 2001, 24, 87-105.



Lenczowski JM, Dominguez L, Eder AM, King LB, Zacharchuk CM, Ashwell JD. Lack of a role for Jun kinase and AP-1 in Fas-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 1997, 17, 170–81.

Lens SM, Kataoka T, Fortner KA, Tinel A, Ferrero I, MacDonald RH, Hahne M, Beermann F, Attinger A, Orbea HA, Budd RC, Tschopp. The caspase 8 inhibitor c-FLIP(L) modulates T-cell receptor-induced proliferation but not activation-induced cell death of lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* 2002, 22(15), 5419-33.

Li F, Pestronk A. Autoantibodies to GM1 ganglioside: different reactivity to GM1-liposomes in amyotrophic lateral sclerosis and lower motor neuron disorders. *J. Neurol. Sci.* 1991, 104(2), 209-14.

Li HL, Zhu H, Xu CJ, Yuan JY. Cleavage of Bid by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 1998, 94, 491-501.

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 1997, 91, 479-489.

Lidington EA, Moyes DL, McCormack AM, Rose ML. A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of immune interactions. *Transpl. Immunol.* 1999, 7(4), 239-46.

Lin CL, Bristol LA, Jin L, Dykes-Hoberg M, Crawford T, Clawson L, Rothstein JD. Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron.* 1998, 20(3), 589-602.

Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeda JE, MacKenzie A, Korneluk RG. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature.* 1996, 379, 349-53.

Lochter A, Taylor J, Braunewell KH, Holm J, Schachner M. Control of neuronal morphology in vitro: interplay between adhesive substrate forces and molecular instruction. *J. Neurosci. Res.* 1995, 42, 145-58.

Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001, 104, 487-501.

Loetscher H, Pan YC, Lahm HW, Gentz R, Brockhaus M, Tabuchi H, Lesslauer W. Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell*. 1990, 61, 351-9.

Longthorne VL, Williams GT. Caspase activity is required for commitment to Fas-mediated apoptosis. *Embo J*. 1997, 16, 3805-12.

Louvel E, Hugon J, Doble A. Therapeutic advances in amyotrophic lateral sclerosis. *Trends Pharmacol. Sci*. 1997, 18(6), 196-203.

Low W, Smith A, Ashworth A, Collins M. JNK activation is not required for Fas-mediated apoptosis. *Oncogene*. 1999, 18, 3737-41.

Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 1998, 94, 481-90.

Lynch DH, Ramsdell F, Alderson MR. Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. *Immunol Today*. 1995, 16(12), 569-74.

Mallett S, Fossum S, Barclay AN. Characterization of the MRC OX40 antigen of activated CD4 positive T lymphocytes--a molecule related to nerve growth factor receptor. *Embo J*. 1990, 9, 1063-8.

Mandal M, Maggirwar SB, Sharma N, Kaufmann SH, Sun SC, Kumar R. Bcl-2 prevents CD95 (Fas/APO-1)-induced degradation of lamin B and poly(ADP-ribose) polymerase and restores the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *J. Biol. Chem*. 1996, 271, 30354-9.

Marchetti P, Hirsch T, Zamzami N, Castedo M, Decaudin D, Susin SA, Masse B, Kroemer G. Mitochondrial permeability transition triggers lymphocyte apoptosis. *J. Immunol*. 1996, 157, 4830-6

Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Huang A, Skubatch M, Baldwin D, Yuan J, Gurney A, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A. A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol.* 1997, Dec 1, 7, (12), 1003-6.

Martin DA, Siegel RM, Zheng L, Lenardo MJ. Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal. *J. Biol. Chem.* 1998, 273(8), 4345-9.

Martin DA, Zheng L, Siegel RM, Huang B, Fisher GH, Wang J, Jackson CE, Puck JM, Dale J, Straus SE, Peter ME, Krammer PH, Fesik S, Lenardo MJ. Defective CD95/APO-1/Fas signal complex formation in the human autoimmune lymphoproliferative syndrome, type Ia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999, 96(8), 4552-7.

Martin LJ. Neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis is apoptosis: possible contribution of a programmed cell death mechanism. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1999, 58(5), 459-71.

Martin LJ. p53 is abnormally elevated and active in the CNS of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* 2000, 7(6), 613-2.

Martins LM, Kottke TJ, Kaufmann SH, Earnshaw WC. Phosphorylated forms of activated caspases are present in cytosol from HL-60 cells during etoposide-induced apoptosis. *Blood.* 1998, 92, 3042-9.

Martin-Villalba A, Hahne M, Kleber S, Vogel J, Falk W, Schenkel J, Krammer PH. Therapeutic neutralization of CD95-ligand and TNF attenuates brain damage in stroke. *Cell Death Differ.* 2001, 8, 679-686.

Martin-Villalba A, Herr I, Jeremias I, Hahne M, Brandt R, Vogel J, Schenkel J, Herdegen T, Debatkin KM. CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. *J. Neurosci.* 1999, 19, 3809-3817

Matsuyama T, Hata R, Tagaya M, Yamamoto Y, Nakajima T, Furuyama J, Wanaka A, Sugita M. Fas antigen mRNA induction in postischemic murine brain. *Brain Res.* 1994, 657(1-2), 342-6.

Matsuyama T, Hata R, Yamamoto Y, Tagaya M, Akita H, Uno H, Wanaka A, Furuyama J, Sugita M. Localization of Fas antigen mRNA induced in postischemic murine forebrain by in situ hybridization. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1995, 34, 166-72.

Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2000, 1(2), 120-9.

McGeer PL, McGeer EG. Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve.* 2002, 26(4), 459-70.

Mesulam M, Geula C. Differential distribution of a neurofilament protein epitope in acetylcholinesterase-rich neurons of human cerebral neocortex. *Brain Res.* 1991, 544(1), 169-73.

Mesulam MM, Mufson EJ, Levey AI, Wainer BH. Atlas of cholinergic neurons in the forebrain and upper brainstem of the macaque based on monoclonal choline acetyltransferase immunohistochemistry and acetylcholinesterase histochemistry. *Neuroscience.* 1984, 12, 669-86.

Metzstein MM, Stanfield GM, Horvitz HR. Genetics of programmed cell death in *C. Elegans* - past, present and future. *Trends Genet.* 1998, 14, 410-416.

Michel PP, Ruberg M, Agid Y. Rescue of mesencephalic dopamine neurons by anticancer drug cytosine arabinoside. *J. Neurochem.* 1997, 69, 1499-507.

Miossec C, Dutilleul V, Fassy F, Diu-Hercend A. Evidence for CPP32 activation in the absence of apoptosis during T lymphocyte stimulation. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 13459-62.

Mizukawa K, McGeer PL, Tago H, Peng JH, McGeer EG, Kimura H. The cholinergic system of the human hindbrain studied by choline acetyltransferase immunohistochemistry and acetylcholinesterase histochemistry. *Brain Res.* 1986, 379, 39-55.

Mohamed HA, Mosier DR, Zou LL, Siklos L, Alexianu ME, Engelhardt JI, Beers DR, Le WD, Appel SH. Immunoglobulin Fc gamma receptor promotes immunoglobulin uptake,

immunoglobulin-mediated calcium increase, and neurotransmitter release in motor neurons. *J. Neurosci. Res.* 2002, 69(1), 110-6.

Morishima Y, Gotoh Y, Zieg J, Barrett T, Takano H, Flavell R, Davis RJ, Shirasaki Y, Greenberg ME. Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J. Neurosci.* 2001, 21, 7551-7560.

Morrison BM, Gordon JW, Ripps ME, Morrison JH. Quantitative immunocytochemical analysis of the spinal cord in G86R superoxide dismutase transgenic mice: neurochemical correlates of selective vulnerability. *J. Comp. Neurol.* 1996, 373(4), 619-31.

Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, Weiss S, van der Kooy D. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron.* 1994, Nov 13, (5), 1071-82.

Moumen R, Nouvelot A, Duval D, Lechevalier B, Viader F. Plasma superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 1997, 151(1), 35-9.

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(3), 230-5.

Muschen M. et al. Defining CD95 as a tumor suppressor gene. *J. Mol. Med.* 2000, 78, 312-325.

Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell.* 1996, 85(6), 817-27.

Myers EW, Miller W. Optimal alignments in linear space. *Comput. Appl. Biosci.* 1988, 4, 11-17.

- Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science*. 1995, 267, 1449–56.
- Nagata S. Apoptosis mediated by the Fas system. *Prog. Mol. Sub-cell. Biol.* 1996, 16, 87-103.
- Nagata S. Human autoimmune lymphoproliferative syndrome, a defect in the apoptosis-inducing Fas receptor: a lesson from the mouse model. *J Hum Genet.* 1998, 43(1), 2-8.
- Nagata, S. Apoptosis by death factor. *Cell*. 1997, 88, 355-65
- Nath R, Probert A Jr, McGinnis KM, Wang KK. Evidence for activation of caspase-3-like protease in excitotoxin- and hypoxia/hypoglycemia-injured neurons. *J. Neurochem.* 1998, 71(1), 186-95.
- Neff NT, Prevet D, Houenou LJ, Lewis ME, Glicksman MA, Yin Q-W, Oppenheim RW. Insulin-like growth factors: putative muscle-derived trophic agents that promote motoneuron survival. *J Neurobiol.* 1993, 24, 1578-1588.
- Newton K, Harris AW, Bath ML, Smith KGC, Strasser A. A dominant interfering mutant of FADD/MORT1 enhances deletion of autoreactive thymocytes and inhibits proliferation of mature T lymphocytes. *Embo J.* 1998, 17, 706–18.
- Newton K, Kurts C, Harris AW, Strasser A. Effects of a dominant interfering mutant of FADD on signal transduction in activated T cells. *Curr. Biol.* 2001, 11, 273-276.
- Nguyen MD, Boudreau M, Kriz J, Couillard-Despres S, Kaplan DR, Julien JP. Cell cycle regulators in the neuronal death pathway of amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant superoxide dismutase 1. *J Neurosci* 2003 Mar 15;23(6):2131-40.
- Nishimura T, Akiyama H, Yonehara S, Kondo H, Ikeda K, Kato M, Iseki E, Kosaka K. Fas antigen expression in brains of patients with Alzheimer-type dementia. *Brain Res.* 1995, 695(2), 137-45.
- Nishimura Y, Hirabayashi Y, Matsuzaki Y, Musette P, Ishii A, Nakauchi H, Inoue T, Yonehara S. In vivo analysis of Fas antigen-mediated apoptosis: effects of agonistic anti-mouse Fas mAb on thymus, spleen and liver. *Int. Immunol.* 1997, 9(2), 307-16.

Nishimura-Morita Y, Nose M, Inoue T, Yonehara S. Amelioration of systemic autoimmune disease by the stimulation of apoptosis-promoting receptor Fas with anti-Fas mAb. *Int. Immunol.* 1997, 9(12), 1793-9.

Obal I, Siklos L, Engelhardt JI. Altered calcium in motoneurons by IgG from human motoneuron diseases. *Acta Neurol. Scand.* 2002, 106(5), 282-91.

Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, Li-Weber M, Richards S, Dhein J, Trauth BC, et al. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J. Biol. Chem.* 1992, 267(15), 10709-15.

Offen D, Halevi S, Orion D, Mosberg R, Stern-Goldberg H, Melamed E, Atlas D. Antibodies from ALS patients inhibit dopamine release mediated by L-type calcium channels. *Neurology.* 1998, 51(4), 1100-3.

Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, Itoh N, Suda T, Nagata S. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature.* 1993, 364(6440), 806-9.

Olanow CW. A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 1993, 16(11), 439-44.

Olarte MR, Schoenfeldt RS, McKiernan G, Rowland LP. Plasmapheresis in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 1980, 8(6), 644-5.

Ono K, Tomasiewicz H, Magnuson T, Rutishauser U. N-CAM mutation inhibits tangential neuronal migration and is phenocopied by enzymatic removal of polysialic acid. *Neuron.* 1994, 13, 595-609.

Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 1991, 14, 453-501.

Oppenheim RW. Naturally occurring cell death during neural development. *Trends Neurosci.* 1985, 8, 487-493.

Oppenheim, R. W. Cell death during development of the nervous system. *Ann. Rev. Neurosci.* 2000, 14, 453-501.

Orlinick JR, Vaishnaw A, Elkon KB, Chao MV. Requirement of cysteine-rich repeats of the Fas receptor for binding by the Fas ligand. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 28889-94.

Otonello L, Tortolina G, Amelotti M, Dallegri F. Soluble Fas ligand is chemotactic for human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol.* 1999, 162(6), 3601-6.

Paas Y, Bohana-Kashtan O, Fishelson Z.. Phosphorylation of the complement component, C9, by an ecto-protein kinase of human leukemic cells. *Immunopharmacology.* 1999, 42(1-3), 175-85.

Padmaja S, Huie RE. The reaction of nitric oxide with organic peroxy radicals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993, 195(2), 539-44.

Pan G, Bauer JH, Haridas V, Wang S, Liu D, Yu G, Vincenz C, Aggarwal BB, Ni J, Dixit VM. Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. *FEBS Lett.* 1998, 431, 351-6.

Pan GH, Orourke K, Dixit VM. Caspase-9, Bcl-X-L, and Apaf-1 form a ternary complex. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 5841-5845.

Papoff G, Hausler P, Eramo A, Pagano MG, Di Leve G, Signore A, Ruberti G. Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. *J. Biol. Chem.* 1999, 274(53), 38241-50.

Park C, Sakamaki K, Tachibana O, Yamashima T, Yamashita J, Yonehara S. Expression of Fas antigen in the normal mouse brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, 252, 623-628.

Patzke H, Tsai LH. Cdk5 sinks into ALS. *Trends Neurosci* 2002 Jan;25(1):8-10.

Pennica D, Shaw KJ, Swanson TA, Moore MW, Shelton DL, Zioncheck KA, Rosenthal A, Taga T, Paoni NF, Wood WI. Cardiotrophin-1. Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor/gp130 signaling complex. *J Biol Chem* 1995, 270, 10915-10922.



Perry TL, Bergeron C, Steele JC, McLachlan DR, Hansen S. Brain amino acid contents are dissimilar in sporadic and Guamanian amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 1990, Oct 99(1), 3-8.

Pestronk A. Invited review: motor neuropathies, motor neuron disorders, and antiglycolipid antibodies. *Muscle Nerve.* 1991, 14(10), 927-36.

Pinkoski MJ, Green DR. Fas ligand, death gene. *Cell Death Differ.* 1999, 6, 1174-81.

Piroton S, Bouterin-Falson O, Robaye B, Boeynaems JM. Ecto-phosphorylation on aortic endothelial cells exquisite sensitivity to staurosporine. *Biochem. J.* 1992, 285 (Pt 2), 585-91

Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, Roy M, Kischkel FC, Dowd P, Huang A, Donahue CJ, Sherwood SW, Baldwin DT, Godowski PJ, Wood WI, Gurney AL, Hillan KJ, Cohen RL, Goddard AD, Botstein D, Ashkenazi A. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature.* 1998, 396(6712), 699-703.

Plaitakis A, Caroscio JT. Abnormal glutamate metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 1987, 22(5), 575-9.

Pompl PN, Ho L, Bianchi M, McManus T, Qin W, Pasinetti GM. A therapeutic role for cyclooxygenase-2 inhibitors in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Faseb J.* 2003, 17(6), 725-7.

Pouly S, Becher B, Blain M, Antel JP. Interferon-gamma modulates human oligodendrocyte susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2000, 4, 280-286.

Prasad NK, Papoff G, Zeuner A, Bonnin E, Kazatchkine MD, Ruberti G, Kaveri SV. Therapeutic preparations of normal polyspecific IgG (IVIg) induce apoptosis in human lymphocytes and monocytes: a novel mechanism of action of IVIg involving the Fas apoptotic pathway. *J Immunol.* 1998, 161(7), 3781-90.

Pullen AH, Humphreys P. Ultrastructural analysis of spinal motoneurons from mice treated with IgG from ALS patients, healthy individuals, or disease controls. *J. Neurol. Sci.* 2000, 180(1-2), 35-45.

Rajcan-Separovic E, Liston P, Lefebvre C, Korneluk RG. Assignment of human inhibitor of apoptosis protein (IAP) genes xiap, hiap-1, and hiap-2 to chromosomes Xq25 and 11q22-q23 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics.* 1996, 37(3), 404-6.

Rakowicz WP, Staples CS, Milbrandt J, Brunstrom JE, Johnson EM Jr. Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes the survival of early postnatal spinal motor neurons in the lateral and medial motor columns in slice culture. *J Neurosci.* 2002, May 15, 22, (10), 3953-62.

Rakowicz WP, Staples CS, Milbrandt J, Brunstrom JE, Johnson EM Jr. Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes the survival of early postnatal spinal motor neurons in the lateral and medial motor columns in slice culture. *J. Neurosci.* 2002, 22(10), 3953-62.

Ramsdell F, Seaman MS, Miller RE, Tough TW, Alderson MR, Lynch DH. *gld/gld* mice are unable to express a functional ligand for Fas. *Eur. J. Immunol.* 1994, 24, 928-33.

Rao MS, Devi MG, Nalini A, Shahani N, Raju TR. Neurofilament phosphorylation is increased in ventral horn neurons of neonatal rat spinal cord exposed to cerebrospinal fluid from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegeneration.* 1995, 4(4), 397-401.

Rao MS. Multipotent and restricted precursors in the central nervous system. *Anat Rec.* 1999, Aug 15, 257, (4), 137-48.

Raoul C, Estevez AG, Nishimune H, Cleveland DW, deLapeyriere O, Henderson CE, Haase G, Pettmann B. Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas. Potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron.* 2002, 35, 1067-1083.

Raoul C, Henderson CE, Pettmann B. Programmed cell death of embryonic motoneurons triggered through the Fas death receptor. *J. Cell. Biol.* 1999, 147, 1049-1062.

Rasper DM, Vaillancourt JP, Hadano S, Houtzager VM, Seiden I, Keen SL, Tawa P, Xanthoudakis S, Nasir J, Martindale D, Koop BF, Peterson EP, Thornberry NA, Huang J,

MacPherson DP, Black SC, Hornung F, Lenardo MJ, Hayden MR, Roy S, Nicholson DW. Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ.* 1998, 5, 271-88.

Rathmell J, Goodnow C. Effect of the *lpr* mutations on elimination and inactivation of selfreactive B cell. *J. Immunol.* 1994, 153.

Rathmell JC, Townsend SE, Xu JC, Flavell RA, Goodnow CC. Expansion or elimination of B cells in vivo: dual roles for CD40- and Fas (CD95)-ligands modulated by the B cell antigen receptor. *Cell.* 1996, 87(2), 319-29.

Redegeld FA, Smith P, Apasov S, Sitkovsky MV. Phosphorylation of T-lymphocyte plasma membrane-associated proteins by ectoprotein kinases: implications for a possible role for ectophosphorylation in T-cell effector functions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1997, 1328(2), 151-65

Rensing-Ehl A, Frei K, Flury R, Matiba B, Mariani SM, Weller M, Aebischer P, Krammer PH, Fontana A. Local Fas/APO-1 (CD95) ligand-mediated tumor cell killing in vivo. *Eur. J. Immunol.* 1995, 25(8), 2253-8.

Rensing-Ehl A, Malipiero U, Irmeler M, Tschopp J, Constam D, Fontana A. Neurons induced to express major histocompatibility complex class I antigen are killed via the perforin and not the Fas (APO-1/CD95) pathway. *Eur. J. Immunol.* 1996, 26, 2271-2274.

Riethmacher D, Sonnenberg-Riethmacher E, Brinkmann V, Vamaai T, Lewin GR, Birchmeier C. Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature.* 1997, 725-730.

Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, Roberts IA, Debatin KM, Fischer A, de Villartay JP. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science.* 1995, 268(5215),1347-1349.

Robertson J, Kriz J, Nguyen MD, Julien JP. Pathways to motor neuron degeneration in transgenic mouse models. *Biochimie.* 2002, 84(11), 1151-60.

Rochat-Steiner V, Becker K, Micheau O, Schneider P, Burns K, Tschopp J. FIST/HIPK3: a Fas/FADD-interacting serine/threonine kinase that induces FADD phosphorylation and inhibits fas-mediated Jun NH(2)-terminal kinase activation. *J. Exp. Med.* 2000, 192, 1165– 74.

Rodriguez I, Matsuura K, Khatib K, Reed JC, Nagata S, Vassalli P.A bcl-2 transgene expressed in hepatocytes protects mice from fulminant liver destruction but not from rapid death induced by anti-Fas antibody injection. *J. Exp. Med.* 1996, 183(3), 1031-6.

Rosen DR, Sapp P, O'Regan J, McKenna-Yasek D, Schlumpf KS, Haines JL, Gusella JF, Horvitz HR, Brown RH Jr. Genetic linkage analysis of familial amyotrophic lateral sclerosis using human chromosome 21 microsatellite DNA markers. *Am. J. Med. Genet.* 1994, 51(1), 61-9.

Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 1993, 362(6415), 59-62.

Rothe M, Pan M G, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell.* 1995, 83, 1243-52.

Rothstein JD, Bristol LA, Hosler B, Brown RH Jr, Kuncl RW. Chronic inhibition of superoxide dismutase produces apoptotic death of spinal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1994, 91(10), 4155-9.

Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Corson LB, Becker M, Cleveland DW, Price DL, Culotta VC, Wong PC. The copper chaperone CCS is abundant in neurons and astrocytes in human and rodent brain. *J. Neurochem.* 1999, 72(1), 422-9.

Rothstein JD, Jin L, Dykes-Hoberg M, Kuncl RW. Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1993, 90(14), 6591-5.

Rothstein JD, Martin LJ, Kuncl RW. Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 1992, 326(22), 1464-8.

Rothstein JD, Tsai G, Kuncel RW, Clawson L, Cornblath DR, Drachman DB, Pestronk A, Stauch BL, Coyle JT. Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 1990, 28(1), 18-25.

Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncel RW. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 1995, 38(1), 73-84.

Rothstein JD. Therapeutic horizons for amyotrophic lateral sclerosis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1996, 6(5), 679-87.

Rowland LP. Amyotrophic lateral sclerosis. *Curr. Opin. Neurol.* 1994, 7(4), 310-5.

Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *Embo J.* 1997, 16(23), 6914-25.

Rudert F, Wang Y, Lindridge E, Watson J. Apoptosis through CD95 (Fas/APO-1), but not a CD40/CD95 chimeric receptor, is inhibited by phorbol-12-myristate-13-acetate. *DNA Cell Biol.* 1997, 16(2), 197-205.

Ruiz-Ruiz C, Robledo G, Font J, Izquierdo M, Lopez-Rivas A. Protein kinase C inhibits CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis by at least two different mechanisms in Jurkat T cells. *J. Immunol.* 1999, 163(9), 4737-46.

Ruiz-Ruiz MC, Izquierdo M, de Murcia G, Lopez-Rivas A. Activation of protein kinase C attenuates early signals in Fas-mediated apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 1997, 27(6), 1442-50.

Rutishauser U, Landmesser L. Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions. *Trends Neurosci.* 1996, 19, 422-427.

Sabapathy K, Hu Y, Kallunki T, Schreiber M, David JP, Jochum W, Wagner EF, Karin M. JNK2 is required for efficient T-cell activation and apoptosis but not for normal lymphocyte development. *Curr. Biol.* 1999, 9, 116-25.

Saito Y, Takagi K, Teshima R, Ikebuchi H, Yamazaki T, Sawada J. Role of ecto-kinase in phorbol ester-enhanced growth hormone-binding protein release from human IM-9 cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1999, 152(1-2), 65-72.

Sakata K, Sakata A, Kong L, Dang H, Talal N. Role of Fas/FasL interaction in physiology and pathology: the good and the bad. *Clin Immunol Immunopathol.* 1998, 87(1), 1-7.

Sakic B, Szechtman H, Denburg JA, Gorny G, Kolb B, Whishaw IQ. Progressive atrophy of pyramidal neuron dendrites in autoimmune MRL-lpr mice. *J Neuroimmunol.* 1998, 187(1-2), 162-70.

Sakurai M, Hayashi T, Abe K, Sadahiro M, Tabayashi K. Delayed selective motor neuron death and Fas antigen induction after spinal cord ischemia in rabbits. *Brain Res.* 1998, 797, 23-28.

Salvesen GS, Dixit VM. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1999, 96(20), 10964-7.

Sanders KA, Rowland LP, Murphy PL, Younger DS, Latov N, Sherman WH, Pesce M, Lange DJ. Motor neuron diseases and amyotrophic lateral sclerosis: GM1 antibodies and paraproteinemia. *Neurology.* 1993, 43(2), 418-20.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1977, 74(12), 5463-7.

Santana P, Pena LA, Haimovitz-Friedman A, Martin S, Green D, McLoughlin M, Cordon-Cardo C, Schuchman EH, Fuks Z, Kolesnick R. Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell.* 1996, 86, 189-99.

Sartorius U, Schmitz I, Krammer PH. Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem.* 2001, 2(1), 20-9.

Sathasivam S, Ince PG, Shaw PJ. Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis: a review of the evidence. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2001, 27(4), 257-74.

Sato T, Irie S, Kitada S, Reed JC. FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. *Science*. 1995, 268(5209), 411-5.

Savettieri G, Mazzola GA, Rodriguez Sanchez MB, Caruso G, Di Liegro I, Cestelli A. Modulation of synapsin I gene expression in rat cortical neurons by extracellular matrix. *Cell. Mol. Neurobiol.* 1998, 18, 369-78.

Sawai H, Okazaki T, Takeda Y, Tashima M, Sawada H, Okuma M, Kishi S, Umehara H, Domae N. Ceramide-induced translocation of protein kinase C-delta and -epsilon to the cytosol. Implications in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1997, 272(4), 2452-8.

Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J.* 1998, 17, 1675-87.

Schall TJ, Lewis M, Koller KJ, Lee A, Rice GC, Wong GH, Gatanaga T, Granger GA, Lentz R, Raab H. Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell.* 1990, 61, 361-70.

Scheel-Toellner D, Wang K, Singh R, Majeed S, Raza K, Curnow SJ, Salmon M, Lord JM. The death-inducing signalling complex is recruited to lipid rafts in Fas-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, 297(4), 876-9.

Schendel SL, Montal M, Reed JC. Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell. Death. Differ.* 1998, 5, 372-80.

Seino K, Kayagaki N, Takeda K, Fukao K, Okumura K, Yagita H. Contribution of Fas ligand to T cell-mediated hepatic injury in mice. *Gastroenterology.* 1997, 113(4), 1315-22.

Seki T, Arai Y. Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system. *Neurosci. Res.* 1993, 17: 265-290

Seki T. Hippocampal adult neurogenesis occurs in a microenvironment provided by PSA-NCAM-expressing immature neurons. *J. Neurosci. Res.* 2002, 69(6), 772-83.

Seki T. Expression patterns of immature neuronal markers PSA-NCAM, CRMP-4 and NeuroD in the hippocampus of young adult and aged rodents. *J. Neurosci. Res.* 2002, 70(3), 327-34.

Senaldi G, Varnum BC, Sarmiento U, Starnes C, Lile J, Scully S, Guo J, Elliott G, McNinch J, Shaklee CL, Freeman D, Manu F, Simonet WS, Boone T, Chang MS () Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL-6 family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999, 96, 11458-11463.

Sendtner M, Holtmann B, Kolbeck R, Thoenen H, Barde Y-A. Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. *Nature.* 1992, 360, 757-758.

Sendtner M, Pei G, Beck M, Schweizer U, Wiese S. Developmental motoneuron cell death and neurotrophic factors. *Cell Tissue Res.* 2000, 301(1), 71-84.

Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell. Biol.* 2002, 4, 131-6.

Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishnan L, Gray CL, Baker K, Wood WI, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science.* 1997, 277(5327), 818-21.

Shi Y, Wang W, Yourey PA, Gohari S, Zukauskas D, Zhang J, Ruben S, Alderson RF. Computational EST database analysis identifies a novel member of the neuropoietic cytokine family. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999, 262, 132-138.

Shin SW, Park JW, Suh MH, Choe BK. Persistent expression of Fas/FasL mRNA in the mouse hippocampus after a single NMDA injection. *J. Neurochem.* 1998, 71, 1773-1776

Shu HB, Halpin DR, Goeddel DV. Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity.* 1997, 6, 751-63.

Siddique T, Nijhawan D, Hentati A. Molecular genetic basis of familial ALS. *Neurology.* 1996, 47(4 Suppl 2), 27-34.



Siddique T, Pericak-Vance MA, Brooks BR, Roos RP, Hung WY, Antel JP, Munsat TL, Phillips K, Warner K, Speer M . Linkage analysis in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 1989, 39(7), 919-25.

Siegel RM, Chan FK, Chun HJ, Lenardo MJ. The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat. Immunol.* 2000, 1, 469-74.

Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, Tsien RY, Lenardo MJ. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science*. 2000, 288(5475), 2354-7.

Silverman N, Maniatis T. NF $\kappa$ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes. Dev.* 2001, 15, 2321-42.

Silvestris F, Nagata S, Cafforio P, Silvestris N, Dammacco F. Cross-linking of Fas by antibodies to a peculiar domain of gp120 V3 loop can enhance T cell apoptosis in HIV-1-infected patients. *J. Exp. Med.* 1996, 184, 2287-2300.

Singleton DW, Lu CL, Colella R, Roisen FJ. Promotion of neurite outgrowth by protein kinase inhibitors and ganglioside GM1 in neuroblastoma cells involves MAP kinase ERK1/2. *Int J Dev Neurosci.* 2000, (8), 797-805.

Skubitz KM, Ehresmann DD, Ducker TP. Characterization of human neutrophil ecto-protein kinase activity released by kinase substrates. *J. Immunol.* 1991, 147(2), 638-50.

Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999, 6(11), 1067-74.

Smith CA, Davis T, Anderson D, Solam L, Beckmann MP, Jerzy R, Dower SK, Cosman D, and Goodwin RG. A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science*. 1990, 248, 1019-23.

Smith RG, Alexianu ME, Crawford G, Nyormoi O, Stefani E, Appel SH. Cytotoxicity of immunoglobulins from amyotrophic lateral sclerosis patients on a hybrid motoneuron cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1994, 91(8), 3393-7.

Smith RG, Appel SH. Molecular approaches to amyotrophic lateral sclerosis. *Annu. Rev. Med.* 1995, 46, 133-45.

Smith RG, Hamilton S, Hofmann F, Schneider T, Nastainczyk W, Birnbaumer L, Stefani E, Appel SH. Serum antibodies to L-type calcium channels in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 1992, 327(24), 1721-8.

Smith SA, Miller RG, Murphy JR, Ringel SP. Treatment of ALS with high dose pulse cyclophosphamide. *J. Neurol. Sci.* 1994, 124, 84-7.

Sola P, Bedin R, Casoni F, Barozzi P, Mandrioli J, Merelli E. New insights into the viral theory of amyotrophic lateral sclerosis: study on the possible role of Kaposi's sarcoma-associated virus/human herpesvirus 8. *Eur Neurol.* 2002, 47, (2), 108-12.

Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat. Med.* 2003, 9(3), 347-51.

Srinivasula SM, Ahmad M, Otilie S, Bullrich F, Banks S, Wang Y, Fernandes-Alnemri T, Croce CM, Litwack G, Tomaselli KJ, Armstrong RC, Alnemri ES. FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 18542-5.

Stamenkovic I, Clark EA, Seed BA B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. *Embo J.* 1989, 8, 1403-10.

Sternberger LA, Sternberger NH. Monoclonal antibodies distinguish phosphorylated and nonphosphorylated forms of neurofilaments in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1983, 80(19), 6126-30.

Strater J, Moller P. Expression and function of death receptors and their natural ligands in the intestine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2000, 915, 162-70.

Straus SE, Sneller M, Lenardo MJ, Puck JM, Strober W. An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Ann Intern Med.* 1999, 130(7), 591-601.

Strong MJ, Strong WL, Jaffe H, Traggert B, Sopper MM, Pant HC. Phosphorylation state of the native high-molecular-weight neurofilament subunit protein from cervical spinal cord in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 2001, 76(5), 1315-25.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, *et al.* Molecular characterization of mitochondrial apoptosis inducing factor. *Nature.* 1999, 397, 441-6.

Suzuki N, Ichino M, Mihara S, Kaneko S, Sakane T. Inhibition of Fas/Fas ligand-mediated apoptotic cell death of lymphocytes *in vitro* by circulating anti-Fas ligand autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis. Rheum.* 1998, 41, 344-353.

Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salvesen GS, Reed JC. A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 7787-90.

Tanaka T, Mizuno K, Miyama M, Chang L, Chen H, Ohtaki S, Umesaki N, Ogita S. Enhanced Fas/CD95-mediated apoptosis by epidermal growth factor in human endometrial epithelial cells. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 1999, 86(2), 189-94.

Tang J, Landmesser L, Rutishauser U. Polysialic acid influences specific pathfinding by avian motoneurons. *Neuron.* 1992, 8, 1031-1044.

Tang, J, Rutishauser U, Landmesser L. Polysialic acid regulates growth cone behavior during sorting of motor axons in the plexus region. *Neuron.* 1994, 13, 405-414.

Tardieu M, Boespflug O, Barbe T. Selective tropism of a neurotropic coronavirus for ependymal cells, neurons, and meningeal cells. *J. Virol.* 1986, 60, 574-582.

Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell.* 1993, 74(5), 845-53.

Thatte U, Bagadey S, Dahanukar S. Modulation of programmed cell death by medicinal plants. *Cell. Mol. Biol.* 2000, 46, 199-214.

Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinel E, Neipel F, Mattmann C, Burns K, Bodmer JL, Schroter M, Scaffidi C, Krammer PH, Peter ME, Tschopp J. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature.* 1997, 386, 517-21.

Thome M, Tschopp J. Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat. Rev. Immunol.* 2001, 1(1), 50-8.

Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases : enemies within. *Science.* 1998, 281, 1312-6.

Tiegs G, Hentschel J, Wendel A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J. Clin. Invest.* 1992, 90(1), 196-203.

Tomkins J, Usher P, Slade JY, Ince PG, Curtis A, Bushby K, Shaw PJ. Novel insertion in the KSP region of the neurofilament heavy gene in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Neuroreport.* 1998, 9(17), 3967-70.

Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science.* 1989, 245, 301-5.

Troost D, Aten J, Morsink F, de Jong JMBV. Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis is not restricted to motor neurons. Bcl-2 expression is increased in unaffected post-central gyrus. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1995, 21, 498-504.

Trotti D, Rossi D, Gjesdal O, Levy LM, Racagni G, Danbolt NC, Volterra A. Peroxynitrite inhibits glutamate transporter subtypes. *J. Biol. Chem.* 1996, 271(11), 5976-9.

Troy CM, Muma NA, Greene LA, Price DL, Shelanski ML. Regulation of peripherin and neurofilament expression in regenerating rat motor neurons. *Brain Res.* 1990, 529(1-2), 232-8.

Tsang YM, Chiong F, Kuznetsov D, Kasarskis E, Geula C. Motor neurons are rich in non-phosphorylated neurofilaments: cross-species comparison and alterations in ALS. *Brain Res.* 2000, 861(1), 45-58.

Tsuchida T, Ensini M, Morton SB, Baldassare M, Edlund T, Jessell TM, Pfaff SL. Topographic organization of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes. *Cell.* 1994, 79(6), 957-70.

Van Den Bosch L, Vandenberghe W, Klaassen H, Van Houtte E, Robberecht W. Ca(2+)-permeable AMPA receptors and selective vulnerability of motor neurons. *J. Neurol. Sci.* 2000, 180(1-2), 29-34.

Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, and Thompson CB. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria [see comments]. *Cell.* 1997, 91, 627-37

Varela-Echavarría A, Pfaff SL, Guthrie S. Differential expression of LIM homeobox genes among motor neuron subpopulations in the developing chick brain stem. *Mol. Cell. Neurosci.* 1996, 8(4), 242-57.

Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, Chiannikulchai N, Beckmann JS, Mett IL, Rebrikov D, Brodianski VM, Kemper OC, Kollet O, Lapidot T, Soffer D, Sobe T, Avraham KB, Goncharov T, Holtmann H, Lonai P, Wallach D. Targeted disruption of the mouse Caspase-8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity.* 1998, 2, 267-276.

Vechio JD, Bruijn LI, Xu Z, Brown RH Jr, Cleveland DW. Sequence variants in human neurofilament proteins: absence of linkage to familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 1996, 40(4), 603-10.

Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell.* 2000, 102, 43-53

Volterra A, Trotti D, Floridi S, Racagni G. Reactive oxygen species inhibit high-affinity glutamate uptake: molecular mechanism and neuropathological implications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1994, 738, 153-62.

Voyvodic JT. Target size regulates calibre and myelination of sympathetic axons. *Nature.* 1989, 342(6248), 430-3.

Vucic D, Kaiser WJ, Miller LK. Inhibitor of apoptosis proteins physically interact with and block apoptosis induced by Drosophila proteins HID and GRIM. *Mol. Cell. Biol.* 1998, 18, 3300-9.

Wajant H, Haas E, Schwenzer R, Muhlenbeck F, Kreuz S, Schubert G, et al. Inhibition of death receptor-mediated gene induction by a cycloheximide-sensitive factor occurs at the level of or upstream of Fas-associated death domain protein (FADD). *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 24357-66.

Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Non-apoptotic Fas signaling. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 2003, 14, 53-66.

Wakayama I. Morphometry of spinal motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis with special reference to chromatolysis and intracytoplasmic inclusion bodies. *Brain Res.* 1992, 586(1), 12-8.

Wang C, Pralong WF, Schulz MF, Rougon G, Aubry JM, Pagliusi S, Robert A, Kiss JZ. Functional N-methyl-D-aspartate receptors in O-2A glial precursor cells: a critical role in regulating polysialic acid-neural cell adhesion molecule expression and cell migration. *J. Cell Biol.* 1996, 135, 1565-1581

Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science.* 1998, 281, 1680-3.

Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature.* 1992, 356, 314-7.

Whiteside TL. Tumor-induced death of immune cells: its mechanisms and consequences. *Semin. Cancer Biol.* 2002, 12(1), 43-50.

Widmann C, Gerwins P, Johnson NL, Jarpe MB, Johnson GL. MEK kinase 1, a substrate for DEVD-directed caspases, is involved in genotoxin-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 1998, 18, 2416–29.

Widmann C, Johnson NL, Gardner AM, Smith RJ, Johnson GL. Potentiation of apoptosis by low dose stress stimuli in cells expressing activated MEK kinase 1. *Oncogene.* 1997, 15, 2439–47.

Wiedau-Pazos M, Goto JJ, Rabizadeh S, Gralla EB, Roe JA, Lee MK, Valentine JS, Bredesen DE. Altered reactivity of superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science.* 1996, 271(5248), 515-8.

Wilhelm S, Wagner H, Hacker G. Activation of caspase-3-like enzymes in non-apoptotic T cells. *Eur. J. Immunol.* 1998, 28, 891–900.

Wilson DJ, Alessandrini A, Budd RC. MEK1 activation rescues Jurkat T cells from Fas-induced apoptosis. *Cell. Immunol.* 1999, 194, 67–77.

Wolfgram F, Myers L. Amyotrophic lateral sclerosis: effect of serum on anterior horn cells in tissue culture. *Science.* 1973, 179(73), 579-80.

Wong V, Glass DJ, Arriga R, Yancopoulos GD, Lindsay RM, Conn G. Hepatocyte growth factor promotes motor neuron survival and synergizes with ciliary neurotrophic factor. *J Biol Chem.* 1997, 272, 5187-5191.

Wujek JR, Akeson RA. Extracellular matrix derived from astrocytes stimulates neuritic outgrowth from PC12 cells in vitro. *Brain Res.* 1987, 431, 87-97.

Wujek JR, Haleem-Smith H, Yamada Y, Lipsky R, Lan YT, Freese E. Evidence that the B2 chain of laminin is responsible for the neurite outgrowth-promoting activity of astrocyte extracellular matrix. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 1990, 55, 237-47.

Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Pathol.* 1984, 142, 67-77.

Wyllie, A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature.* 1980, 284, 555-6.

Xu Z, Cork LC, Griffin JW, Cleveland DW. Increased expression of neurofilament subunit NF-L produces morphological alterations that resemble the pathology of human motor neuron disease. *Cell.* 1993, 73(1), 23-33.

Yamamoto Y, Livet J, Pollock R, Garces A, Arce V, deLapeyrière O, Henderson C. Hepatocyte growth factor (HGF/SF) is a muscle-derived survival factor for a subpopulation of embryonic motoneurons. *Development.* 1997, 124, 2903-2913.

Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science.* 1997, 275, 1129-32.

Yang X, Khosravi-Far R, Baltimore D. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell.* 1997, 89, 1067-76.

Yi FH, Lautrette C, Vermot-Desroches C, Bordessoule D, Couratier P, Wijdenes J, Preud'homme JL, Jauberteau MO. *In vitro* induction of neuronal apoptosis by anti-Fas antibody-containing sera from amyotrophic lateral sclerosis patients. *J. Neuroimmunol.* 2000, 109, 211-220.

Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 1989, 169, 1747-56.

Yonehara S. Effects of anti-Fas antibodies on lymphocytes and other organs: preparation of original and new monoclonal antibodies and amelioration of systemic autoimmune disease. *Int. Rev. Immunol.* 1999, 18(4), 329-45.



Yoshiyama Y, Yamada T, Asanuma K, Asahi T. Apoptosis related antigen, Le(Y) and nick-end labeling are positive in spinal motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* 1994, 88(3), 207-11.

Younger DS, Rowland LP, Latov N, Hays AP, Lange DJ, Sherman W, Inghirami G, Pesce MA, Knowles DM, Powers J. Lymphoma, motor neuron diseases, and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 1991, 29(1), 78-86.

Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature.* 2000, 407(6805), 802-9.

Yuki N, Sato S, Tsuji S, Ohsawa T, Miyatake T. Frequent presence of anti-GQ1b antibody in Fisher's syndrome. *Neurology.* 1993, 43(2), 414-7.

Yuki N, Taki T, Inagaki F, Kasama T, Takahashi M, Saito K, Handa S, Miyatake T. A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barre syndrome has a GM1 ganglioside-like structure. *J Exp Med.* 1993, 178(5), 1771-5.

Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* 1996, 183, 1533-44.

Zeman S, Lloyd C, Meldrum B, Leigh PN. Excitatory amino acids, free radicals and the pathogenesis of motor neuron disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1994, 20(3), 219-31.

Zhang H, Xu Q, Krajewski S, *et al.* BAR: an apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl-2 family proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000, 97(6), 2597-602.

Zhang ZY, Zhou B, Xie L. Modulation of protein kinase signaling by protein phosphatases and inhibitors. *Pharmacol Ther.* 2002, 93(2-3), 307-17.

Zhang ZY. Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2002, 42, 209-34.

Zou H, Henzel WJ, Liu XS, Lutschg A, Wang XD. Apaf-1, a human protein homologous to C. Elegans Ced-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell.* 1997, 90(3), 405-413.

Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An. APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 11549-56.

Zurn AD, Baetge EE, Hammang JP, Tan SA, Aebischer P. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), a new neurotrophic factor for motoneurons. *Neuroreport.* 1994, 6, 113-118.

# **ANNEXES**