



HAL
open science

Les maladies neurodégénératives : étude de peptides modèles, de tissus cérébraux et de liquides céphalorachidiens par (micro)spectroscopie infrarouge et Raman

Alicia Schirer

► **To cite this version:**

Alicia Schirer. Les maladies neurodégénératives : étude de peptides modèles, de tissus cérébraux et de liquides céphalorachidiens par (micro)spectroscopie infrarouge et Raman. Autre. Université de Strasbourg, 2016. Français. NNT : 2016STRAF055 . tel-01529201

HAL Id: tel-01529201

<https://theses.hal.science/tel-01529201>

Submitted on 30 May 2017

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

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

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

UMR 7140 - Chimie de la matière complexe

THÈSE présentée par :

Alicia SCHIRER

soutenue le : **2 décembre 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie

Les maladies neurodégénératives : Etude de peptides modèles, de tissus cérébraux et de liquides céphalorachidiens par (micro)spectroscopie infrarouge et Raman

THÈSE dirigée par :

Pr. HELLWIG Petra

Professeur, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Pr. GOORMAGHTIGH Erik

Professeur, université libre de Bruxelles

Pr. SOCKALINGUM Ganesh D.

Professeur, université de Reims Champagne-Ardenne

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Pr. FALLER Peter

Professeur, université de Strasbourg

Table des matières

Remerciements.....	VII
Liste des figures	IX
Liste des tableaux.....	XIX
Liste des abréviations.....	XXI
Glossaire de biochimie	XXII
Liste des publications.....	XXIV
Avant-propos.....	- 1 -
Chapitre 1 :.....	- 4 -
Les maladies neurodégénératives.....	- 4 -
1.1 La maladie d'Alzheimer.....	- 5 -
1.1.1 Impacts sociaux économiques.....	- 5 -
1.1.2 Historique.....	- 5 -
1.1.3 Diagnostic.....	- 6 -
1.1.4 Les lésions cérébrales.....	- 7 -
1.1.4.1 Les dégénérescences neurofibrillaires.....	- 7 -
1.1.4.2 Les plaques séniles.....	- 8 -
1.1.5 La cascade amyloïde.....	- 8 -
1.1.6 Du peptide A β aux fibres.....	- 10 -
1.1.6.1 Origine du peptide A β	- 10 -
1.1.6.2 Le peptide A β	- 11 -
1.1.6.3 Chemin d'agrégation du peptide A β	- 11 -
a. Cinétique de formation des fibres.....	- 12 -
b. Caractérisation des fibres.....	- 13 -
c. Caractérisation des oligomères.....	- 14 -
1.1.7 Toxicité du peptide A β	- 15 -
1.1.7.1 Implication des métaux.....	- 16 -
a. Les métaux et le stress oxydatif.....	- 16 -
b. Les métaux dans la maladie d'Alzheimer	- 17 -
1.1.7.2 L'implication des lipides	- 21 -

a. Les lipides, composants principaux des membranes cellulaires	21 -
b. Interaction des peptides A β avec les lipides	23 -
1.1.7.3 Mécanismes de toxicité	26 -
1.1.8 Approches thérapeutiques	28 -
1.1.8.1 Les traitements symptomatiques	28 -
1.1.8.2 Les traitements ciblant les causes de la maladie d'Alzheimer	29 -
1.1.9 Les biomarqueurs : Nouveaux outils pour diagnostiquer la maladie d'Alzheimer ?	31 -
1.2 La maladie à corps de Lewy.....	35 -
1.2.1 Impacts sociaux économiques.....	35 -
1.2.2 Historique.....	35 -
1.2.3. Diagnostic.....	36 -
1.2.4. Les lésions cérébrales.....	36 -
1.2.5 L'agrégation de l' α -synucléine, un facteur clé dans le développement de la maladie ...	37 -
1.2.6 De l' α -synucléine aux corps d'inclusion.....	37 -
1.2.6.1 L' α -synucléine	37 -
1.2.6.2 Chemin d'agrégation de l' α -synucléine	38 -
1.2.7 Toxicité de l' α -synucléine.....	38 -
1.2.8 Approches thérapeutiques	39 -
1.2.9 Les biomarqueurs de la maladie à corps de Lewy, une approche nouvelle dans le diagnostic différentiel.....	39 -
1.3 La sclérose en plaques	43 -
1.3.1 Impacts sociaux économiques.....	43 -
1.3.2 Historique.....	43 -
1.3.3 Diagnostic.....	44 -
1.3.4 Les lésions cérébrales.....	45 -
1.3.5 Formes cliniques évolutives de la maladie.....	45 -
1.3.6 L'origine de la maladie, un dysfonctionnement immunitaire.....	46 -
1.3.7 Approches thérapeutiques	47 -
Chapitre 2 :.....	49 -
La spectroscopie vibrationnelle	49 -

2.1 Introduction.....	- 50 -
2.2 La spectroscopie infrarouge	- 52 -
2.2.1 Principe.....	- 52 -
2.2.2 Instrumentation.....	- 52 -
2.2.2.1 La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	- 52 -
2.2.2.2 La microspectroscopie infrarouge et l'imagerie infrarouge.....	- 55 -
2.2.3 Techniques d'échantillonnage	- 57 -
2.2.3.1 La transmission.....	- 57 -
2.2.3.2 La réflexion.....	- 58 -
2.2.4 La spectroscopie infrarouge des protéines	- 59 -
2.3 La spectroscopie Raman.....	- 61 -
2.3.1 Principe.....	- 61 -
2.3.2 Instrumentation.....	- 63 -
2.3.2.1 La spectroscopie Raman.....	- 63 -
2.3.2.2 La microspectroscopie Raman	- 64 -
2.3.3 La spectroscopie Raman exaltée de surface	- 64 -
2.3.4 La spectroscopie Raman des protéines	- 65 -
2.4 La spectroscopie infrarouge vs la spectroscopie Raman.....	- 66 -
2.5 Application de la spectroscopie vibrationnelle dans l'étude des maladies neurodégénératives.....	- 67 -
2.5.1 Etude des tissus	- 67 -
2.5.2 Etude des biofluides	- 69 -
Chapitre 3 :.....	- 71 -
Matériels et méthodes	- 71 -
3.1 Préparation des échantillons.....	- 72 -
3.1.1 Préparation des peptides synthétiques	- 72 -
3.1.1.1 DAHK et GHK.....	- 72 -
3.1.1.2 Les amyloïdes β	- 72 -
3.1.2 Préparation des composés modèles.....	- 73 -
3.1.3 Préparation des tissus	- 74 -
3.1.3.1 La maladie d'Alzheimer	- 74 -

3.1.3.2 La sclérose en plaques.....	- 75 -
3.1.4 Préparation des liquides céphalorachidiens	- 76 -
3.2 Préparation des solutions colloïdales	- 78 -
3.3 La spectroscopie infrarouge	- 80 -
3.3.1 Etude des peptides et composés modèles	- 80 -
3.3.2 Etude des tissus cérébraux.....	- 80 -
3.3.3 Etude des liquides céphalorachidiens.....	- 81 -
3.4 La spectroscopie Raman	- 81 -
3.4.1 Etude des peptides modèles	- 81 -
3.4.2 Etude des composés modèles	- 82 -
3.4.3 Etude des tissus cérébraux.....	- 82 -
3.4.4 Etude des liquides céphalorachidiens.....	- 82 -
3.5 Prétraitements des données.....	- 83 -
3.5.1 Prétraitements appliqués aux spectres infrarouges.....	- 83 -
3.5.2 Prétraitements appliqués aux spectres Raman	- 86 -
3.6 Analyse des données.....	- 87 -
3.6.1 Classification hiérarchique ascendante.....	- 88 -
3.6.2 Analyse en composantes principales	- 89 -
Chapitre 4.....	- 91 -
Etude de la maladie d'Alzheimer.....	- 91 -
4.1 Etude de peptides modèles.....	- 92 -
4.1.1 Etude des complexes Cu(II)-GHK et Zn(II)-GHK.....	- 93 -
4.1.2 Etude des complexes Cu(II)-DAHK et Zn(II)-DAHK.....	- 99 -
4.1.3 Etude des complexes Cu(II)-A β 16 et Zn(II)-A β 16	- 101 -
4.2 Etude des tissus cérébraux.....	- 104 -
4.2.1 Empreinte moléculaire du tissu cérébral sain.....	- 104 -
4.2.2 Empreinte moléculaire des plaques séniles	- 111 -
4.3 Etude des liquides céphalorachidiens	- 121 -
4.3.1 Etude par spectroscopie infrarouge.....	- 121 -
4.3.1.1 Empreinte moléculaire du liquide céphalorachidien	- 121 -
4.3.1.2 Comparaison des liquides céphalorachidiens	- 125 -

4.3.2 Etude par SERS.....	- 131 -
Chapitre 5.....	- 136 -
Etude de la maladie à corps de Lewy.....	- 136 -
5.1 Etude des liquides céphalorachidiens par spectroscopie infrarouge	- 137 -
5.1.1 Application au diagnostic précoce de la maladie à corps de Lewy	- 137 -
5.1.2 Application au diagnostic différentiel entre la maladie à corps de Lewy et la maladie d'Alzheimer.....	- 144 -
5.2 Etude des liquides céphalorachidiens par SERS	- 147 -
5.2.1 Application au diagnostic précoce de la maladie à corps de Lewy	- 147 -
5.2.2 Application au diagnostic différentiel entre la maladie à corps de Lewy et la maladie d'Alzheimer.....	- 149 -
Chapitre 6.....	- 151 -
Etude de la sclérose en plaques	- 151 -
6.1 Etude par microspectroscopie Raman.....	- 152 -
6.2 Etude par microspectroscopie infrarouge.....	- 155 -
Conclusion et perspectives	- 159 -
Annexes.....	- 162 -
Annexe 1 : Les vingt acides aminés naturels.....	- 163 -
Annexe 2 : Déconvolutions des bandes amide I des spectres des plaques séniles	- 164 -
Annexe 3 : Correspondance entre les attributions des bandes Raman marqueurs des hèmes et les vibrations du cycle porphyrrique	- 166 -
Annexe 4 : Structure des composés modèles étudiés dans le cadre de l'étude des liquides céphalorachidiens	- 167 -
Annexe 5 : Représentation graphique des composantes principales calculées dans le cadre de l'étude des LCR pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer.....	- 169 -
Annexe 6 : Représentation graphique des composantes principales calculées dans le cadre de l'étude des LCR pour le diagnostic de la maladie à corps de Lewy	- 171 -
Annexe 7 : Représentation graphique des composantes principales calculées dans le cadre de l'étude des LCR pour le diagnostic différentiel entre la maladie d'Alzheimer et la maladie à corps de Lewy	- 173 -
Références	- 175 -

Remerciements

Mes premiers remerciements s'adressent à ma directrice de thèse, le Pr. Petra Hellwig. 5 ans déjà ont passé depuis mon arrivée au laboratoire pour mon stage de M1. Merci de m'avoir donné ma chance et merci pour ta gentillesse et tes conseils.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail ; le Pr. Erik Goormaghtigh et le Pr. Ganesh D. Sockalingum d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse ainsi que le Pr. Peter Faller d'avoir accepté de participer au jury en tant qu'examineur.

Je remercie aussi l'ensemble des collaborateurs avec qui j'ai eu la chance de travailler : le Pr. Ayikoe-Guy Mensah-Nyagan (+ ses doctorants/post-doctorants : Monika Rataj-Baniowska, Christian Klein et Géraldine Leva) pour les échantillons de tissus cérébraux, le Dr. Frédéric Blanc et le Dr. Olivier Bousiges pour les échantillons de liquides céphalorachidiens. Merci pour l'enthousiasme que vous avez apporté aux projets et de la confiance que vous m'avez témoignée. Un grand merci également au Dr. Sophie Lecomte pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire pour les mesures de microspectroscopie Raman. Merci pour ta gentillesse et ton aide. Je remercie aussi Etienne Harté pour son aide pour ces mesures.

Merci à l'ensemble de l'équipe de la ligne IR2 du synchrotron ANKA à Karlsruhe pour votre aide ; le Dr. Yves-Laurent Mathis, le Dr. David Moss, le Dr. Biliانا Gasharova et Michael Süpfle.

Merci à l'équipe Raman de Renishaw de m'avoir aussi bien accueillie lors de mes quelques visites dans vos locaux à Paris.

Un grand merci à Mireille ; la thèse sans toi n'aurait pas du tout été la même chose. Merci pour ton aide, ton soutien et tous les bons moments passés ensemble que ce soit aux pauses café, pendant les congrès ou pendant nos vacances au Portugal !

Je remercie également mes collègues de bureau avec qui j'ai passé de bons moments. Merci à Fred de m'avoir initiée à Yahoo news... Je garderai en mémoire des histoires très croustillantes. Merci pour tes nombreux conseils et d'avoir toujours su me remonter le moral avec les « poèmes de Michelle » ou « il avait les mots », ça va me manquer ! Merci aussi à Thomas pour avoir été un bon voisin de bureau durant ma première année de thèse. Les Blind tests de Fred nous auront bien donné du fil à retordre. Enfin merci à Anton pour m'avoir fait découvrir « Om Gam Ganapatayé Namaha » !

Merci également à Zahia et Martine pour votre soutien, votre gentillesse et d'avoir rendu la vie au laboratoire plus agréable. Au même titre je remercie tous mes autres collègues : Natalia, Sinan, Kat et Youssef, ainsi que tous les stagiaires qui sont venus passer quelques semaines ou quelques mois avec nous.

Je remercie aussi notre secrétaire, Soumia. Tu as toujours été au top même quand je venais la veille de partir en mission pour faire les papiers.

Merci à Norbert Clery, mon mentor du « nouveau chapitre de thèse » de m'avoir aidée à prendre conscience que même en tant que doctorant, on a un tas de qualités et de connaissances qu'on ne sait pas toujours identifier et mettre en valeur.

Merci à tous mes amis avec une dédicace spéciale pour Flo, Cécilia et Mimie, mon amie et associée de Baby Flavors. Peut-être qu'un jour tout le monde s'arrachera notre idée dans les rayons !

Bien évidemment, je n'oublie pas ma famille, mon père, mes frères, ma tante et ma cousine sans qui je ne serais pas là, merci d'être toujours là pour moi et d'avoir toujours cru en moi. Merci également à ma belle-sœur Alice pour toutes nos bonnes et futures soirées passées ensemble. Je remercie aussi ma belle-famille, Aurore, Daniel et Martine avec qui je passe toujours de supers moments.

Et le meilleur pour la fin, Steph, merci d'être là et de me supporter au quotidien. Merci pour ta patience depuis ces nombreuses années car il faut l'avouer, sortir avec « une jeune », ce n'est pas marrant tous les jours.

Un grand merci à vous tous et à tous ceux que je n'ai pas nommé mais qui devraient être ici !

Liste des figures

Figure 1.1	Coupes cérébrales de la patiente Auguste, D. montrant les plaques séniles (a et b) et les dégénérescences neurofibrillaires (c).	-5-
Figure 1.2	Progression des symptômes de la maladie d'Alzheimer.	-6-
Figure 1.3	Microphotographie des dégénérescences neurofibrillaires visualisées par immunomarquage avec des anticorps anti-DNF.	-7-
Figure 1.4	Représentation schématique de la formation des dégénérescences neurofibrillaires.	-7-
Figure 1.5	Microphotographie des plaques séniles visualisées par immunomarquage avec des anticorps anti-A β 42.	-8-
Figure 1.6	Hypothèse de la cascade amyloïde.	-9-
Figure 1.7	Catabolisme de la protéine APP. A) La voie non amyloïdogénique. B) La voie amyloïdogénique.	-10-
Figure 1.8	Séquence primaire du peptide A β 42. La partie violette correspond à la partie C-terminale hydrophobe du peptide.	-11-
Figure 1.9	Représentation schématique du paysage énergétique pour le repliement et l'agrégation d'une protéine.	-12-
Figure 1.10	Cinétique de formation des fibres amyloïdes caractérisée par deux phases : une phase de latence et une phase d'élongation.	-13-
Figure 1.11	Modèle structural des feuilletts β croisés parallèles formés par les peptides A β .	-14-
Figure 1.12	Principales réactions conduisant à la production des espèces réactives à l'oxygène.	-16-
Figure 1.13	Sphère de coordination de Cu(I)- et Cu(II)-A β .	-20-

Figure 1.14	Sphère de coordination de Zn(II)-A β .	-20-
Figure 1.15	Sphère de coordination de Fe(II)-A β .	-20-
Figure 1.16	Représentation schématique de l'environnement du site catalytique du complexe hème-A β .	-21-
Figure 1.17	Représentation schématique d'une membrane cellulaire selon le modèle de la mosaïque fluide fait par Singer et Nicolson qui décrivent la membrane comme une bicouche lipidique à laquelle viennent s'associer de différentes façons des protéines et des glucides.	-22-
Figure 1.18	Représentation schématique d'un glycérophospholipide.	-22-
Figure 1.19	Représentation schématique des sphingolipides.	-23-
Figure 1.20	Représentation schématique du cholestérol.	-23-
Figure 1.21	Représentation schématique des différents mécanismes possibles d'interaction entre les peptides A β et la membrane lipidique qui pourraient expliquer la toxicité des peptides A β .	-24-
Figure 1.22	Corps de Lewy : inclusions intracellulaires éosinophiles.	-35-
Figure 1.23	Microphotographie des corps de Lewy et des neurites de Lewy obtenue par immunomarquage de l' α -synucléine.	-36-
Figure 1.24	Illustrations des lésions de la sclérose en plaques faites par Jean Cruveilhier (A) et Robert Carswell (B).	-43-
Figure 1.25	Physiopathologie de la sclérose en plaques.	-45-
Figure 1.26	Evolution des troubles neurologiques au cours du temps pour les différentes formes de la sclérose en plaques.	-46-
Figure 2.1	Spectre électromagnétique.	-50-
Figure 2.2	Modes de vibration du groupement CH ₂ .	-51-

Figure 2.3	A) Principe d'un spectromètre à transformée de Fourier. B) Interférogramme obtenu à partir d'une source monochromatique. Le passage est permis grâce à une transformée de Fourier. C) Interférogramme obtenu à partir d'une source polychromatique.	-53-
Figure 2.4	Représentation schématique des différentes étapes nécessaires à la génération d'un spectre FTIR.	-55-
Figure 2.5	A) Intensité du signal infrarouge enregistré à l'aide d'un microscope infrarouge confocal équipé d'un détecteur MCT et d'une source synchrotron ou Globar à travers différentes ouvertures. B) Spectre infrarouge d'un globule rouge obtenu à partir d'une source synchrotron et d'une source Globar. Une ouverture carrée de $5 \times 5 \mu\text{m}$ a été utilisée pour la mesure.	-57-
Figure 2.6	Principe de la spectroscopie IR en mode transmission.	-57-
Figure 2.7	Principe de la spectroscopie IR en mode de réflexion spéculaire (A) et de réflexion diffuse (B).	-58-
Figure 2.8	Représentation schématique d'un cristal ATR montrant le principe de la réflexion totale atténuée.	-59-
Figure 2.9	Spectre d'absorption infrarouge caractéristique d'une protéine entre 3800 et 800 cm^{-1} .	-59-
Figure 2.10	Représentation schématique des processus de diffusions Rayleigh, Raman Stokes et anti-Stokes avec pour comparaison celui de l'absorption infrarouge.	-61-
Figure 2.11	Spectre Raman montrant les raies anti-Stokes, Rayleigh et Stokes. Les déplacements Raman sont exprimés en fonction de la fréquence de la source d'excitation et sont reliés aux énergies de vibration d'une molécule.	-62-
Figure 2.12	Représentation schématique des processus de diffusion Raman et Raman de résonance.	-62-
Figure 2.13	Principe d'un spectromètre Raman.	-63-

Figure 2.14	Spectre Raman caractéristique d'une protéine entre 3800 et 400 cm^{-1} .	-65-
Figure 3.1	A) Spectres d'absorption UV-visible de différentes solutions colloïdales. B) Image TEM des nanoparticules d'argent synthétisées selon la méthode de Leopold-Lendl.	-79-
Figure 3.2	Exemple montrant le procédé de correction de ligne de base.	-84-
Figure 3.3	Représentation schématique du calcul du niveau de bruit d'un spectre.	-85-
Figure 4.1	Structure des complexes Cu(II)-DAHK (A) et Cu(II)-GHK (B) obtenues par rayons X.	-93-
Figure 4.2	Spectres Raman du peptide GHK seul et en présence de Cu(II) ou Zn(II) à pH6.8 et 8.9 dans la région 1750-950 cm^{-1} .	-94-
Figure 4.3	Spectres IR du peptide GHK seul et en présence de Cu(II) ou Zn(II) à pH6.8 et 8.9 dans la région 1760-1460 cm^{-1} .	-96-
Figure 4.4	Spectres Raman du peptide DAHK seul et en présence de Cu(II) ou Zn(II) à pH6.8 et 8.9 dans la région 1750-950 cm^{-1} .	-99-
Figure 4.5	Spectres IR du peptide DAHK seul et en présence de Cu(II) ou Zn(II) à pH6.8 et 8.9 dans la région 1760-1460 cm^{-1} .	-100-
Figure 4.6	Sphères de coordination supposées pour les peptides GHK et DAHK en présence de Cu(II) et Zn(II) à pH 6.8 et 8.9.	-101-
Figure 4.7	Spectres Raman du peptide A β 16 seul et en présence de Cu(II) ou Zn(II) à pH6.8 et 8.9 dans la région 1750-950 cm^{-1} .	-102-
Figure 4.8	Spectres IR du peptide A β 16 seul et en présence de Cu(II) ou Zn(II) à pH6.8 et 8.9 dans la région 1760-1460 cm^{-1} .	-103-
Figure 4.9	A gauche : Image d'une coupe coronale d'un hémisphère cérébral de souris (la zone en pointillée délimite l'hippocampe) obtenue à l'aide du microscope qui équipe le spectromètre Raman. A droite : image d'une plaque sénile localisée dans l'hippocampe d'une souris transgénique atteinte de la maladie d'Alzheimer obtenue à l'aide d'un microscope	-104-

	Leica DMR-X équipé d'une caméra Nikon coolpix 995 en contraste de phase.	
Figure 4.10	Spectre IR de 3700 à 2700 et de 1800 à 1000 cm^{-1} (A) et spectre Raman de 3800 à 2700 et de 1800 à 400 cm^{-1} (B) typique du tissu cérébral sain. La longueur excitatrice pour le Raman est de 532 nm.	-104-
Figure 4.11	Spectres IR de 3800 à 2800 et de 1800 à 800 cm^{-1} (A-E) et spectres Raman de 3200 à 2800 et de 1800 à 400 cm^{-1} (F-J) de la protéine HSA (A,F), du glucose (B, G), de l'ADN (C,H), de l'asolectine, un mélange de phospholipides (D, I) et du cholestérol (E, J). La longueur excitatrice pour le Raman est de 514 nm.	-105-
Figure 4.12	Structure interne de l'hippocampe.	-106-
Figure 4.13	Cartes IR (1-3) et Raman (4-6) issues de différentes régions du cerveau de souris saines. Ces cartes représentent la répartition des protéines et des lipides obtenues à partir de l'aire entre 1722-1489, 3002-2829 cm^{-1} respectivement pour la spectroscopie IR et entre 3000-2930, 2936-2834 cm^{-1} respectivement pour la spectroscopie Raman. Les bandes marqueurs d'une conformation en feuillets β des protéines ainsi que celles correspondant au groupement carbonyle et aux insaturations des lipides ont également été analysées à partir de l'intensité de la bande à 1630 cm^{-1} et de l'aire entre 1767-1724 et 3028-3002 respectivement pour la spectroscopie IR et à partir de l'intensité de la bande à 1670 cm^{-1} et de l'aire entre 1760-1710 et 3031-3005 cm^{-1} respectivement pour la spectroscopie Raman.	-108-
Figure 4.14	Comparaison des spectres IR et Raman typiques des plaques séniles (rouge) et du tissu sain (noir) dans les régions spectrales caractéristiques des protéines et des lipides.	-111-
Figure 4.15	Spectres IR dans la gamme spectrale 1720-1480 cm^{-1} de différentes plaques séniles.	-112-
Figure 4.16	Cartes IR (1-3) et Raman (4-6) de différentes plaques séniles. Ces cartes représentent la répartition des protéines sous forme de feuillets β et des lipides obtenues à partir de l'intensité de la bande à 1630 cm^{-1} (feuillets β) et de l'aire entre 3002-2829 (lipides totaux), 1767-1724 (groupement	-113-

- carbonyle des lipides) et 3028-3002 cm^{-1} (lipides insaturés) pour la spectroscopie IR et à partir de l'intensité de la bande à 1670 cm^{-1} (feuillet β) et de l'aire entre 2936-2834 (lipides totaux), 1760-1710 (groupement carbonyle des lipides) et 3031-3005 cm^{-1} (lipides insaturés) pour la spectroscopie Raman.
- Figure 4.17** A) Spectres Raman de 1800 à 400 cm^{-1} représentatifs du tissu cérébral d'une souris saine (noir) et d'une plaque sénile (rouge). B) Cartes Raman obtenues à partir de la bande à 754 cm^{-1} pour différentes plaques séniles. La longueur d'onde excitatrice est 532 nm. -114-
- Figure 4.18** Spectres Raman d'une plaque sénile à 514 nm (a), 532 nm (c) et 633 nm (e) et spectres Raman du cytochrome c à 514 nm (b) et 532 nm (d). -114-
- Figure 4.19** Spectres Raman du cytochrome c (a), du complexe A β 40-cytochrome c (b) et du complexe A β 40-hémine (c) à 514 nm. -116-
- Figure 4.20** Spectres IR correspondant à différentes plaques séniles dans la gamme spectrale 670-170 cm^{-1} (a, b et c). Le spectre présenté en d est représentatif du milieu environnant. L'ouverture du microscope utilisée pour ces mesures est 100 μm . -117-
- Figure 4.21** A) Image représentant les scores des spectres IR par rapport aux CP 1 à 4. Les pourcentages entre parenthèses indiquent la variance du set de données représentée par la CP en question. B) Représentation graphique des CP calculées entre 3620-2700 et 1800-1390 cm^{-1} . -118-
- Figure 4.22** A) Image représentant les scores des spectres Raman par rapport aux CP 1 à 5. Les pourcentages entre parenthèses indiquent la variance du set de données représentée par la CP en question. B) Représentation graphique des CP calculées entre 3400-2700 et 1800-400 cm^{-1} . -119-
- Figure 4.23** Spectre IR classique moyen du LCR du groupe Contrôle de 3800 à 2765 et de 1800 à 735 cm^{-1} . -121-
- Figure 4.24** Spectres IR de 3800 à 2450 et de 1800 à 750 cm^{-1} de l'HSA, urée, histamine, acide urique, créatine, bilirubine, créatinine, acétylcholine et hypoxanthine (a à i respectivement) pour les substances azotées (A) ; de l'asolectine et du cholestérol (j et k respectivement) pour les lipides (B) ; -122-

	de l'acide lactique et du glucose (l et m respectivement) pour les glucides et métabolites non azotés (C) ; de la thiamine, pyridoxine, acide folique, acide ascorbique et cobalamine (n à r respectivement) pour les vitamines (D).	
Figure 4.25	Spectre IR de 3800 à 2450 et de 1800 à 750 cm^{-1} des peptides A β 40 (rouge) et A β 42 (noir).	-123-
Figure 4.26	Spectres IR moyens (lignes continues) +/- écart type (lignes pointillées) des LCR pour les groupes contrôle, MA MCI et MA démence.	-125-
Figure 4.27	Spectres différentiels calculés à partir des spectres IR moyens du LCR provenant des trois groupes : contrôle, MA MCI et MA démence.	-125-
Figure 4.28	Spectres IR moyens représentant la dérivée seconde (lignes continues) +/- écart type (lignes pointillées) des LCR pour les groupes contrôle, MA MCI et MA démence.	-127-
Figure 4.29	Spectres différentiels calculés à partir des dérivées secondes des spectres IR moyens du LCR provenant des trois groupes : contrôle, MA MCI et MA démence.	-127-
Figure 4.30	Spectres IR moyens représentant la dérivée première (lignes continues) +/- écart type (lignes pointillées) des LCR pour les groupes contrôle, MA MCI et MA démence.	-128-
Figure 4.31	Spectres différentiels calculés à partir des dérivées premières des spectres IR moyens du LCR provenant des trois groupes : contrôle, MA MCI et MA démence.	-128-
Figure 4.32	Projection 2D ou 3D de l'ensemble des spectres IR des échantillons LCR provenant des patients contrôle (violet), MA MCI (turquoise) et MA démence (noir) dans l'espace des composantes principales.	-129-
Figure 4.33	Image microscopique d'une goutte d'échantillon LCR séchée (A). Les régions marquées d'une croix correspondent aux zones où les spectres Raman présentés en B ont été enregistrés.	-131-

Figure 4.34	a et b) Spectres SERS du LCR en présence de nanoparticules d'argent synthétisées à partir d'hydroxylamine (a) ou de citrates (b), c) spectre Raman du LCR, d) spectre SERS des nanoparticules d'argent.	-132-
Figure 4.35	Spectres SERS de l'hyposanthine (a), de l'acide folique (b), de l'acide urique (c), de la pyridoxine (d), de la créatinine (e), du glucose (f) et de l'acide lactique (g) en présence de nanoparticules d'argent synthétisées à partir d'hydroxylamine.	-132-
Figure 4.36	Spectres SERS moyens (lignes continues) +/- écart type (lignes pointillées) des échantillons LCR pour les groupes contrôle, MA MCI et MA démence.	-133-
Figure 4.37	Spectres différentiels calculés à partir des spectres SERS moyens du LCR provenant des trois groupes : contrôle, MA MCI et MA démence.	-133-
Figure 4.38	Projection 2D de l'ensemble des spectres SERS des LCR provenant des patients contrôle (violet), MA MCI (turquoise) et MA démence (noir) dans l'espace des composantes principales. La gamme spectrale utilisée est 3013-2834 et 1800-590 cm^{-1} .	-134-
Figure 5.1	Spectres IR moyens (lignes continues) +/- écart type (lignes pointillées) des LCR pour les groupes contrôle, MCL MCI et MCL démence.	-138-
Figure 5.2	Spectres différentiels calculés à partir des spectres IR moyens du LCR provenant des trois groupes : contrôle, MCL MCI et MCL démence.	-138-
Figure 5.3	Spectres IR moyens représentant la dérivée seconde (lignes continues) +/- écart type (lignes pointillées) des LCR pour les groupes contrôle, MCL MCI et MCL démence.	-139-
Figure 5.4	Spectres différentiels calculés à partir des dérivées secondes des spectres IR moyens du LCR provenant des trois groupes : contrôle, MCL MCI et MCL démence.	-140-
Figure 5.5	Spectres IR moyens représentant la dérivée première (lignes continues) +/- écart type (lignes pointillées) des LCR pour les groupes contrôle, MCL MCI et MCL démence.	-141-

Figure 5.6	Spectres différentiels calculés à partir des dérivées premières des spectres IR moyens du LCR provenant des trois groupes : contrôle, MCL MCI et MCL démence.	-141-
Figure 5.7	Projection 2D ou 3D de l'ensemble des spectres IR des échantillons LCR provenant des patients contrôle (violet), MCL MCI (turquoise) et MCL démence (noir) dans l'espace des composantes principales.	-142-
Figure 5.8	Projection 2D de l'ensemble des spectres IR des échantillons LCR provenant des patients contrôle (violet), MCL MCI (turquoise) et MCL démence (noir) dans l'espace des composantes principales.	-143-
Figure 5.9	Spectres différentiels calculés à partir des spectres IR moyens du LCR (A), des dérivées secondes (B) ou des dérivées premières (C) des spectres IR moyens du LCR provenant des groupes MA MCI, MA démence, MCL MCI et MCL démence.	-145-
Figure 5.10	Projection 3D de l'ensemble des spectres IR des échantillons LCR provenant des patients MA MCI (bleu), MA démence (vert), MCL MCI (brun) et MCL démence (rose) dans l'espace des composantes principales.	-146-
Figure 5.11	Spectres SERS moyens (lignes continues) +/- écart type (lignes pointillées) des échantillons LCR pour les groupes contrôle, MCL MCI et MCL démence.	-147-
Figure 5.12	Spectres différentiels calculés à partir des spectres SERS moyens du LCR provenant des trois groupes : contrôle, MCL MCI et MCL démence.	-148-
Figure 5.13	Projection 2D de l'ensemble des spectres SERS des LCR provenant des patients contrôle (violet), MCL MCI (turquoise) et MCL démence (noir) dans l'espace des composantes principales.	-148-
Figure 5.14	Spectres différentiels calculés à partir des spectres SERS moyens du LCR provenant des groupes MA MCI, MA démence, MCL MCI et MCL démence.	-149-

-
- Figure 5.15** Projection 2D de l'ensemble des spectres SERS des LCR provenant des patients MA MCI (bleu), MA démence (vert), MCL MCI (brun) et MCL démence (rose) dans l'espace des composantes principales. -150-
- Figure 6.1** A) Image d'une coupe sagittale de cerveau de souris (la zone en pointillée délimite le cervelet) obtenue à l'aide d'un microscope Raman. B) Zoom sur le cervelet. 1 : substance blanche ; 2 : couche granulaire ; 3 : couche moléculaire (2+3 : substance grise). -152-
- Figure 6.2** Cartes Raman de différentes régions du cervelet d'une souris saine et malade avec un score clinique de 4, 7 ou 0 représentant la répartition des lipides et des protéines à partir de l'aire entre 2914-2817 et 3000-2917 cm^{-1} respectivement. -153-
- Figure 6.3** Spectre Raman typique de la substance blanche (bleu) et de la substance grise avec la couche moléculaire (rouge) et granulaire (noir) dans la région 3200-2700 et 1800-400 cm^{-1} . -154-
- Figure 6.4** Cartes IR de différentes régions du cervelet d'une souris saine et malade avec un score clinique de 7 représentant l'aire entre 2993-2817 (lipides totaux), 1761-1719 (groupement carbonyle des lipides), 1711-1482 (protéines) et 1131-1000 cm^{-1} (groupement phosphate). -156-
- Figure 6.5** Spectre IR typique de la substance blanche (rouge) et de la substance grise (noir) dans la région 3800-2700 et 1800-1000 cm^{-1} . -156-

Liste des tableaux

Tableau 1.1	Différentes structures adoptées par les oligomères A β .	-15-
Tableau 1.2	Principaux glycérophospholipides avec leur groupement polaire associé.	-23-
Tableau 1.3	Comparaison des principaux biomarqueurs présents au sein du liquide céphalorachidien entre la maladie à corps de Lewy, la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson.	-41-
Tableau 1.4	Critères diagnostics de la sclérose en plaques.	-44-
Tableau 2.1	Bandes amides caractéristiques du squelette peptidique.	-60-
Tableau 2.2	Position de la bande amide I en fonction de la structure secondaire.	-60-
Tableau 2.3	Position des bandes amide I et amide III en fonction de la structure secondaire.	-66-
Tableau 3.1	Liste des composés modèles étudiés présents dans le liquide céphalorachidien.	-74-
Tableau 3.2	Echelle des scores cliniques.	-76-
Tableau 3.3	Nombre de patients et moyenne d'âge (\pm écart type) appartenant aux différents groupes étudiés : Contrôle, MA stade prodromal et démence, MCL stade prodromal et démence.	-77-
Tableau 3.4	Taille des nanoparticules d'or (A) ou d'argent (B) en fonction de leur maximum d'absorption.	-80-
Tableau 4.1	Résumé des différentes bandes retrouvées au sein des spectres Raman de DAHK, GHK et A β 16 sous forme libre ou coordonné au Cu(II) ou Zn(II) (pH6.8/pH8.9).	-98-
Tableau 4.2	Position et tentatives d'attribution des bandes provenant d'un spectre IR typique du tissu cérébral.	-109-

Tableau 4.3	Position et tentatives d'attribution des bandes provenant d'un spectre Raman typique du tissu cérébral.	-110-
Tableau 4.4	Position (en cm^{-1}) et attributions correspondantes des bandes Raman provenant des spectres d'une plaque sénile, du cytochrome c , de l'hémine en présence ou non d'A β 40 à 514 et 532 nm.	-115-
Tableau 4.5	Position et tentatives d'attribution des différentes bandes retrouvées au sein du spectre IR moyen du LCR représentant le groupe contrôle.	-124-
Tableau 6.1	Position et tentatives d'attribution des bandes provenant d'un spectre Raman typique du cervelet.	-155-
Tableau 6.2	Position et tentatives d'attribution des bandes provenant d'un spectre IR typique du cervelet.	-157-

Liste des abréviations

δ : Vibration de déformation	HSA : Sérum albumine humaine
ν : Vibration d'élongation	IR : Infrarouge
ν_{as} : Vibration d'élongation antisymétrique	LCR : Liquide céphalorachidien
ν_s : Vibration d'élongation symétrique	LDA : Analyse discriminante linéaire
γ_t : Torsion	MA : Maladie d'Alzheimer
γ_w : Balancement	MCI : Mild cognitive impairment
γ_r : Rotation pure	MCL : Maladie à corps de Lewy
$A\beta$: Amyloïde β	NMDA : N-Méthyl-D-Aspartate
ADN : Acide désoxyribonucléique	NP : Nanoparticules
APP : Amyloid Precursor Protein	OCT : Optimal cutting temperature compound
ATR : Réflexion totale atténuée	PCA : Analyse en composantes principales
CCD : Charge coupled device	PHF : Paires de filaments hélicoïdaux
CP : Composante principale	PLS : Régression aux moindres carrés partiels
DNF : Dégénérescences Neurofibrillaires	ROS : Espèces réactives à l'oxygène
EAE : Encéphalomyélite auto-immune expérimentale	SC : Score clinique
FPA : Focal plane array	SERS : Spectroscopie Raman exaltée de surface
FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	SVM : Support Vector Machine
HCA : Classification hiérarchique ascendante	TFA : Acide trifluoroacétique

Glossaire de biochimie

A β : Amyloïde β ; peptide impliqué dans la maladie d'Alzheimer.

Acétylcholine : Neurotransmetteur impliqué dans la mémorisation et dans l'attention.

AMPA : Récepteur ionotropique du glutamate activé par l' α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate (AMPA).

APO-E : Apolipoprotéine-E ; protéine impliquée dans la dégradation du peptide amyloïde β .

APP : Amyloid precursor protein ; protéine transmembranaire responsable de la formation des peptides amyloïdes β .

Bcl-2 : Prototypique d'une famille de gènes qui peuvent être pro-apoptiques ou anti-apoptiques. Bcl-2 tient son nom de B-Cell Lymphoma 2.

Caspase : Classe de protéases impliquées dans le phénomène d'apoptose suite à l'activation d'une cascade de réaction.

Catalase : Enzyme impliquée dans la lutte contre le stress oxydant en catalysant la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène.

Ceruloplasmine : Protéine impliquée dans le stockage du cuivre et dans le transport du fer.

Chaperonne du cuivre : Protéine impliquée dans le transport du cuivre.

Ferritine : Protéine permettant le stockage du fer.

Glutathion peroxydase : Enzyme impliquée dans la lutte contre le stress oxydant en catalysant la réduction des hydroperoxydes par le glutathion

GSK-3 : La glycogène synthase kinase 3 est une kinase responsable du transfert d'un groupement phosphorylé sur les résidus serine et thréonine des protéines impliquées dans de nombreux phénomènes dont l'apoptose. Egalement, elle est responsable de la phosphorylation de la protéine tau.

Hémizygote : Ce terme qualifie un organisme diploïde ne possédant qu'un allèle à un locus donné, pour cause d'absence de région homologue.

Kinase : Enzyme de la famille des transférases catalysant le transfert d'un groupe phosphorylé d'un substrat à un autre.

Lymphocyte : Leucocyte jouant un rôle majeur dans le système immunitaire. Deux lignées lymphocytaires différentes peuvent être caractérisées selon leur structure et leur fonction : les lymphocytes B et T.

MAP kinases : Les mitogen-activated protein kinases sont un ensemble de protéines kinases impliquées dans la mitose ou l'apoptose par exemple ; Elles sont également responsables de la phosphorylation de la protéine tau.

Métallothionéine : Protéine avec une haute affinité pour les ions métalliques.

NMDA : Récepteur ionotropique du glutamate activé par N-méthyl-D-aspartate (NMDA).

p53 : Facteur de transcription impliqué dans le processus d'apoptose.

Peroxydase : Enzyme qui dégrade les peroxydes.

PS1 ou 2 : Préséniline 1 ou 2 ; protéine impliquée dans le clivage de la protéine APP en intervenant dans l'activité de la γ -sécrétase.

Récepteur Fas : Protéine transmembranaire appartenant à la famille des protéines Bcl-2, impliquée dans l'apoptose via l'activation de caspases.

Récepteur TNF : Récepteur du facteur nécrosant des tumeurs appartenant à la famille des protéines Bcl-2, impliqué dans l'apoptose via l'activation de caspases.

Récepteur DR : Récepteur de la mort appartenant à la famille des protéines Bcl-2, impliqué dans l'apoptose via l'activation de caspases.

SNCA : Gène codant pour la protéine α -synucléine.

SOD : Superoxyde dismutase ; enzyme impliquée dans la lutte contre le stress oxydant en catalysant la dismutation du superoxyde en dioxygène et peroxyde d'hydrogène.

Tau : Protéine appartenant à la famille des microtubules associated proteins (MAP), responsable de l'assemblage et de la stabilisation des microtubules.

Transferrine : Protéine responsable du transport du fer au sein de l'organisme.

ZIP : Transporteur membranaire du zinc

ZnT : Transporteur membranaire du zinc.

α/γ sécrétase : Enzyme mise en jeu dans le clivage de la protéine APP.

α -synucléine : Protéine impliquée dans la maladie à corps de Lewy.

Liste des publications

Articles publiés

1. Chiral recognition in amyloid fiber growth, *J Pept Sci*, 22, 2016, 290-304.
Torbeev, V., Grogg, M., Ruiz, J., Boehringer, R., Schirer, A., Hellwig, P., Jeschke, G., Hilvert, D.
2. Covalent tethering and residues with bulky hydrophobic side chains enable to direct self-assembly of the distinct amyloid structures, *ChemBioChem*, 2016.
Ruiz, J., Boehringer, R., Grogg, M., Raya, J., Schirer, A., Crucifix, C., Hellwig, P., Schultz, P., Torbeev, V.

Articles en préparation

1. Cytochrome c accumulation in plaques from Alzheimer diseased tissues.
Schirer, A., Patte-Mensah, C., Klein, C., Meyer, L., Rataj-Baniowska, M., Moss, D., Lecomte, S., Mensah-Nyagan, A.G., Hellwig, P.
2. Vibrational similarities and dissimilarities of copper and zinc cations binding to biological peptides.
Schirer, A., El Khoury, Y., Faller, P., Hellwig, P.
3. The Transduction Enhancing Peptide Vectofusin-1 forms pH-dependent α -Helical Coiled-coil Nanofibrils, Trapping Viral Particles.
Vermeer, L.S., Hamon, L., Schirer, A., Schoup, M., Cosette, J., Majdoul, S., Pastré, D., Stockholm, D., Holic, N., Hellwig, P., Galy, A., Fenard, D., Bechinger, B.

Avant-propos

Depuis plusieurs années, les maladies neurodégénératives représentent un défi sociétal et économique majeur. En effet, plus de 7 millions de personnes sont touchées en Europe et ce nombre ne va tendre qu'à augmenter au cours des prochaines années en raison de la hausse de l'espérance de vie. Il s'agit de pathologies progressives liées à un dysfonctionnement du système nerveux. Selon les régions cérébrales touchées, une altération des fonctions cognitives et/ou motrices peut être observée.

La maladie d'Alzheimer est la maladie neurodégénérative la plus répandue dans le monde et est la première cause de démence. Elle se caractérise principalement par la formation de plaques séniles et d'enchevêtrements neurofibrillaires qui correspondent à des agrégats de peptides amyloïdes β et de protéines tau respectivement. Depuis sa découverte en 1907 par Alois Alzheimer, de nombreuses études tendent à comprendre l'origine et les mécanismes de cette maladie afin de pouvoir développer des traitements efficaces contre cette dernière. L'hypothèse retenue à l'heure actuelle est celle de la cascade amyloïde. Cette hypothèse place en avant l'agrégation des peptides amyloïdes β dans le développement de la maladie et dans les processus neurotoxiques qui conduisent à la mort des neurones. Les formes responsables de la toxicité seraient les oligomères solubles d'amyloïdes β (formes intermédiaires dans le processus d'agrégation). En effet, leur capacité à interagir avec certains métaux et /ou les membranes cellulaires serait déterminante dans les processus neurotoxiques. Toutefois, étudier les mécanismes de la maladie d'Alzheimer peut s'avérer compliqué de par la complexité des acteurs mis en jeu mais également par la difficulté pour les chercheurs à accéder au cerveau humain. Ainsi, de nombreuses alternatives ont été développées avec par exemple les modèles des peptides amyloïdes β et les modèles animaux. L'expansion de l'utilisation des biofluides a également contribué aux progrès réalisés dans la compréhension de la maladie d'Alzheimer avec la mise en évidence de marqueurs biologiques qui ouvre de nouvelles perspectives pour le diagnostic de cette maladie et dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques.

La spectroscopie infrarouge et Raman sont deux techniques très sensibles à la composition chimique et à la structure des protéines. Elles peuvent ainsi permettre de suivre les changements biochimiques induits par la maladie d'Alzheimer dont le processus d'agrégation des protéines.

Le but de cette thèse a donc été de développer et optimiser des méthodes spectroscopiques infrarouge et Raman afin de mieux comprendre et diagnostiquer la maladie.

Dans un premier temps, la coordination des métaux avec les peptides amyloïdes β a été étudiée à l'aide de peptides modèles. En effet, comme il l'a été mentionné précédemment, les métaux jouent un rôle important dans le développement de la maladie d'Alzheimer. Cependant, les mécanismes d'interaction restent encore débattus dans la littérature.

Les études ont ensuite été étendues dans un second temps, aux plaques séniles afin de mieux comprendre leur formation et/ou leur rôle. Pour ce faire, des tissus cérébraux provenant de souris mutées atteintes de la maladie d'Alzheimer ont été étudiés.

Finalement, une étude pilote a été réalisée afin d'évaluer le potentiel de la spectroscopie infrarouge et Raman appliquée aux liquides céphalorachidiens dans le diagnostic précoce de la maladie d'Alzheimer.

En vue des résultats obtenus, il a été décidé d'étendre ces études à d'autres maladies neurodégénératives, et plus particulièrement à la maladie à corps de Lewy et à la sclérose en plaques. La maladie à corps de Lewy représente la seconde cause de démence et partage des symptômes communs avec la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer, et ce notamment dans les premiers stades. Ainsi, identifier de nouveaux outils pour permettre un diagnostic différentiel est nécessaire.

Comme dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, une étude pilote infrarouge et Raman a donc été réalisée sur des échantillons de liquides céphalorachidiens afin d'évaluer le potentiel de ces spectroscopies dans le diagnostic précoce de la maladie à corps de Lewy dans un premier temps, puis dans un deuxième temps, dans le diagnostic différentiel avec la maladie d'Alzheimer.

La sclérose en plaques quant à elle, représente la maladie neurodégénérative la plus fréquente chez les jeunes entre 20 et 40 ans. Elle se caractérise par la destruction des gaines de myéline suite à des processus inflammatoires. Aucun traitement curatif n'existe à l'heure actuelle. Ainsi, de nombreuses recherches portent sur l'identification de nouveaux traitements thérapeutiques.

Le but ici a été d'utiliser le potentiel de la spectroscopie Raman et infrarouge pour identifier des lésions cérébrales à partir de souris modèles de la sclérose en plaques afin d'étudier par la suite, l'effet de différents traitements.

Pour illustrer l'ensemble de ces études, cette thèse est divisée en six chapitres. Le premier chapitre rapporte des informations générales sur les différentes maladies étudiées. Le second a pour but de mieux comprendre le choix d'utiliser la spectroscopie infrarouge et Raman dans l'étude des maladies neurodégénératives. Le troisième décrit les matériels et les protocoles utilisés. Le quatrième présente les résultats obtenus dans le cadre de la maladie d'Alzheimer. Il comprend l'étude portant sur la coordination des métaux avec les peptides amyloïdes β , ainsi que les études portant sur les tissus cérébraux et les liquides céphalorachidiens. Le cinquième chapitre quant à lui, porte sur la maladie à corps de Lewy et décrit les résultats obtenus dans le cadre de l'étude des liquides céphalorachidiens. Enfin, le dernier chapitre présente les résultats préliminaires obtenus pour la sclérose en plaques, avec l'étude des tissus cérébraux.

Chapitre 1 :

Les maladies neurodégénératives

1.1 La maladie d'Alzheimer

1.1.1 Impacts sociaux économiques

La maladie d'Alzheimer est une des maladies neurodégénératives les plus répandues dans le monde et est la cause principale de démence. En effet, 60 à 70% des cas seraient dus à cette maladie, ce qui représente 46,8 millions de personnes environ en 2015 (World Alzheimer Report World 2015). Moins de 2% des personnes âgées de moins de 65 ans sont touchées contre 15% pour celles âgées de 80 ans et plus (Inserm). Ainsi, avec l'augmentation et le vieillissement de la population, ce fléau ne va tendre qu'à augmenter au cours des prochaines années. Le nombre de personnes touchées en 2050 pourrait atteindre 131,5 millions (World Alzheimer Report World 2015).

De plus, la prise en charge des patients est extrêmement coûteuse ; le coût mondial de la maladie a été estimé en 2015 à environ 726 milliards d'euros (Prince *et al.*, 2015). La maladie d'Alzheimer apparaît donc véritablement comme une priorité de santé publique.

1.1.2 Historique

Pendant des années, les cas de démence observés chez certaines personnes étaient considérés comme « l'usure normale du temps ». Cependant, en 1901, une patiente Auguste, D., alors âgée de 51 ans est admise à l'hôpital pour cause de troubles de la mémoire, de troubles de l'orientation et d'hallucinations. Après son décès en 1906, son médecin, Aloïs Alzheimer réalise une autopsie de son cerveau. Il découvre un cerveau atrophique ainsi que la présence de dégénérescences neurofibrillaires et de dépôts extracellulaires dénommés plaques séniles (Figure 1.1) (Graeber et Mehraein, 1999 ; Rainulf *et al.*, 1995 ; Small et Cappai, 2006). Il conclut alors à « une maladie particulière du cortex cérébral ». En 1910, le nom d'Alzheimer est proposé pour décrire cette maladie. Cependant, il faudra attendre les années 1960, pour que cette maladie soit reconnue à part entière après la découverte d'un lien entre la détérioration des fonctions cognitives et le nombre de lésions présentes dans le cerveau. Ensuite, grâce à l'arrivée de nouveaux outils et de nouvelles techniques qui permettent d'étudier des échantillons biologiques, la maladie d'Alzheimer est devenue un véritable centre d'intérêt pour les chercheurs. Cela a abouti à la découverte dans les années 80, des principaux constituants des plaques

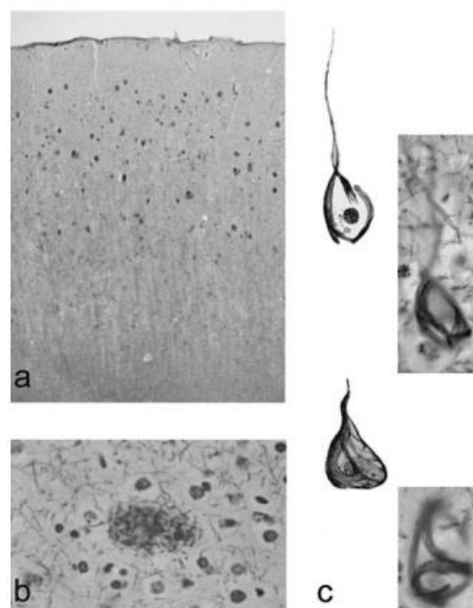


Figure 1.1 : Coupes cérébrales de la patiente Auguste, D. montrant les plaques séniles (a et b) et les dégénérescences neurofibrillaires (c). Les coupes ont été colorées à l'aide de la technique d'imprégnation argentique de Bielschowsky-Gros. Les schémas en c) sont extraits directement des travaux du Dr. Alzheimer, A. (Graeber et Mehraein, 1999).

séniles et des dégénérescences neurofibrillaires ; les amyloïdes β et la protéine tau hyperphosphorylée respectivement, et dans les années 90, à la mise en évidence de plusieurs gènes responsables de la transmission de la maladie au sein de certaines familles. Depuis, de nombreuses avancées sur cette maladie ne cessent d'être faites (Hardy, 2006).

1.1.3 Diagnostic

La maladie d'Alzheimer est une pathologie dégénérative qui entraîne le déclin progressif des fonctions cognitives. Elle se caractérise par trois grandes phases : la phase prodromale ou MCI (de l'anglais, Mild Cognitive Impairment) qui correspond au début de la phase symptomatique, la phase de démence (légère à modérée) et la phase de démence très sévère. Selon le stade de la maladie, différents symptômes apparaissent tels que des troubles de la mémoire, des problèmes de langage, d'orientation, de motricité, d'agressivité et de personnalité (Figure 1.2).

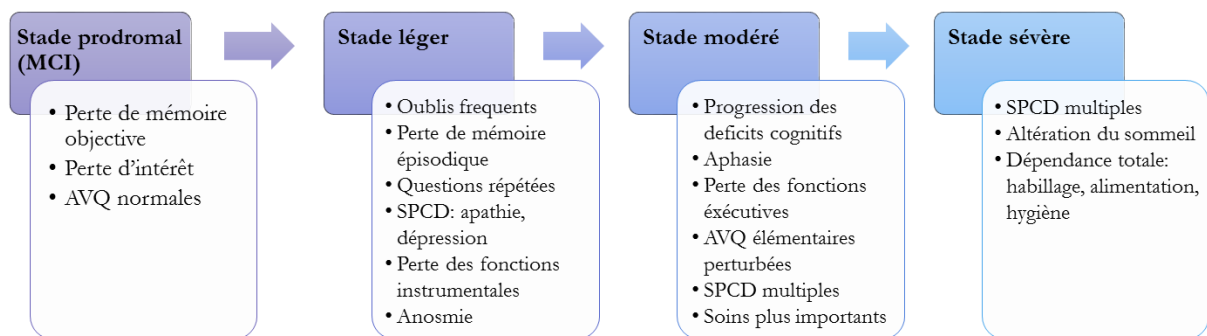


Figure 1.2 : Progression des symptômes de la maladie d'Alzheimer (AVQ : Activités de la vie quotidienne ; SPCD : Symptômes psychologiques et comportementaux des démences). Figure adaptée de Feldman et Woodward, 2005.

A l'heure actuelle, la plupart des diagnostics se basent sur l'évaluation de ces signes cliniques et sur des tests neuropsychologiques rendant difficile un diagnostic précoce précis (McKhann *et al.*, 2011 ; Castellani *et al.*, 2010). Habituellement, il se passe en moyenne un à deux ans entre l'apparition des premiers troubles et l'annonce du diagnostic.

Des techniques d'imagerie médicale peuvent être également utilisées afin de déceler des atrophies de certaines zones du cerveau (Mattson, 2004). Cependant, la mise en évidence des lésions cérébrales (dégénérescences neurofibrillaires et plaques séniles) qui permettrait d'établir un diagnostic certain, ne peut être faite que post-mortem.

1.1.4 Les lésions cérébrales

1.1.4.1 Les dégénérescences neurofibrillaires

Les dégénérescences neurofibrillaires (DNF), également appelées enchevêtrements neurofibrillaires sont des agrégats de protéines tau hyperphosphorylées, retrouvés au sein des neurones (Figure 1.3) (Weingarten *et al.*, 1975). Ces lésions ne sont pas spécifiques à la maladie d'Alzheimer. En effet, elles peuvent être observées dans d'autres maladies neurodégénératives telles que la maladie de Pick, la démence fronto-temporale avec Parkinsonisme liée au chromosome 17 ou encore le syndrome de Down. Ces maladies sont regroupées sous le terme de « tauopathies » (Sergeant *et al.*, 2005).

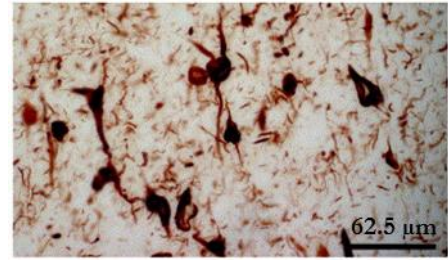


Figure 1.3 : Microphotographie des dégénérescences neurofibrillaires visualisées par immunomarquage avec des anticorps anti-DNF (LaFerla *et al.*, 2005).

La protéine tau appartient à la famille des MAP (Microtubule-Associated Proteins). Elle est responsable de l'assemblage et de la stabilisation des microtubules ; composants essentiels du cytosquelette des neurones. Elle se compose de 352 à 441 acides aminés et possède plus de 80 sites potentiels de phosphorylation au travers de ses résidus sérine, thréonine et tyrosine. La phosphorylation de ces derniers régule l'interaction de la protéine tau avec les microtubules.

A l'état pathologique, une hyperphosphorylation de la protéine est observée entraînant sa dissociation des microtubules (Buée *et al.*, 2000).

Cela a pour conséquence de compromettre la stabilisation et le fonctionnement de ces derniers. L'hyperphosphorylation de la protéine tau conduit également à un changement conformationnel de la protéine, favorisant son agrégation sous forme de paires de filaments hélicoïdaux (PHFs) (Figure 1.4). L'accumulation de ces PHFs entraîne une perturbation de la stabilité des neurones, ce qui mène à l'altération du système de transport des neurones et donc à la mort des cellules neuronales (Brion, 1998).

Le nombre et la localisation de ces agrégats peuvent être utilisés pour déterminer l'avancement de la maladie d'Alzheimer (Arriagada *et al.*, 1992 ; Nelson *et al.*, 2009).

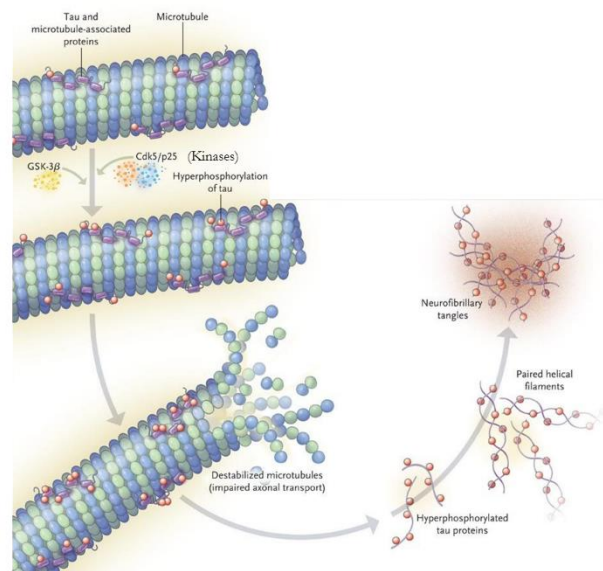


Figure 1.4 : Représentation schématique de la formation des dégénérescences neurofibrillaires. Figure adaptée de Querfurth et LaFerla, 2010.

1.1.4.2 Les plaques séniles

Les plaques séniles, également appelées plaques amyloïdes correspondent à des agrégats extracellulaires de protéines organisées en fibrilles. Le constituant majoritaire de ces plaques est le peptide amyloïde β ($A\beta$) (Figure 1.5) (Glennner et Wong, 1984). Elles sont retrouvées majoritairement dans l'hippocampe ; point de départ de la maladie d'Alzheimer et dans le cortex cérébral.

Ces lésions ne sont pas spécifiques à la maladie d'Alzheimer. En effet, des plaques amyloïdes peuvent être également observées pour la maladie à corps de Lewy, la maladie de Huntington ou encore les maladies à Prion. Cependant, les protéines impliquées dans la formation des fibres amyloïdes sont différentes dans les deux derniers cas notamment.

L'implication des peptides amyloïdes β dans le développement de la maladie d'Alzheimer a longtemps été débattue dans la littérature. En effet, pendant de nombreuses années, le premier responsable de la cascade dégénérative a longtemps été sujet à controverse : dégénérescences neurofibrillaires ou plaques séniles (Mudher et Lovestone, 2002) ? A l'heure actuelle, la question n'est pas totalement élucidée. Cependant, l'hypothèse retenue est celle de la cascade amyloïde qui place l'accumulation des plaques séniles au premier rang (Hardy et Allsop, 1991).

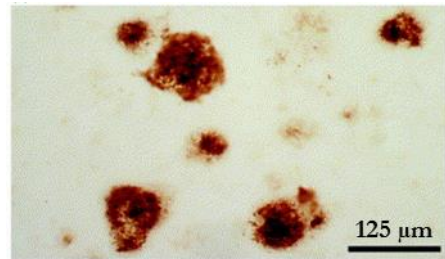


Figure 1.5 : Microphotographie des plaques séniles visualisées par immunomarquage avec des anticorps anti- $A\beta_{42}$ (LaFerla et Oddo, 2005).

1.1.5 La cascade amyloïde

L'hypothèse de la cascade amyloïde propose que les dépôts amyloïdes observés chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer soient à l'origine de la formation des dégénérescences neurofibrillaires et de la mort des cellules neuronales, suite à une dérégulation dans le métabolisme des peptides $A\beta$ (Figure 1.6) (Hardy et Selkoe, 2002).

En fonction de l'origine de la maladie d'Alzheimer, deux formes peuvent être identifiées : la forme sporadique dite non héréditaire et la forme familiale dite héréditaire.

Les formes sporadiques sont les plus courantes. En effet, elles représentent 95% des cas et apparaissent généralement chez les personnes âgées de plus de 65 ans contrairement aux formes familiales qui apparaissent généralement avant l'âge de 60 ans.

Les peptides $A\beta$ proviennent du clivage d'une protéine membranaire appelée APP (Amyloid Precursor Protein). La mise en évidence de mutations au niveau du gène codant cette dernière et au niveau de deux autres gènes codant pour deux protéines dénommées présénilines 1 et 2 (PS1 et 2); protéines impliquées dans le clivage de la protéine APP confirme cette hypothèse et notamment pour les formes familiales de la maladie d'Alzheimer (cf. encadré) (Hardy, 1997). Pour les formes sporadiques de la maladie, la

production anormale du peptide A β serait due à des modifications au niveau de certains gènes qui interviennent dans la dégradation du peptide A β ; un des plus mentionnés étant celui codant pour l'apolipoprotéine-E (APO-E). Les responsables de ces modifications seraient des facteurs génétiques et/ou environnementaux tels que l'âge, les traumatismes crâniens, les maladies cardiovasculaires, l'obésité ou le diabète (Aleshkov *et al.*, 1997 ; Dong *et al.*, 2012 ; Reitz, 2012, Russo *et al.*, 1998).

Des essais de vaccination réalisés sur des souris puis sur des hommes tendent également à confirmer cette hypothèse. En effet, des souris modèles de la maladie d'Alzheimer produisant une grande quantité de peptides A β et présentant de nombreuses plaques amyloïdes ont montré une baisse de ces dernières et une amélioration de leurs fonctions cognitives après avoir été immunisées contre le peptide A β dans le but de produire des anticorps dirigés contre ce dernier (Morgan *et al.*, 2000, Schenk *et al.*, 1999). Les mêmes résultats ont pu être observés chez l'homme (Hock *et al.*, 2003 ; Nicoll *et al.*, 2003).

Cependant, malgré de nombreuses études plaçant en la faveur de cette hypothèse, des limites peuvent y être observées. En effet, des plaques amyloïdes ont été retrouvées chez des patients ne présentant aucune démence par exemple (Davis *et al.*, 2000). Egalement, la cascade amyloïde présente un lien direct entre les dépôts d'amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires mais aucune des études tentant de former des dégénérescences neurofibrillaires à partir d'une surexpression d'A β n'ont abouti. De plus, aucune corrélation ne peut être faite entre l'avancement de la maladie, la position et le nombre de plaques séniles contrairement aux dégénérescences neurofibrillaires, et aucun des traitements basés sur cette hypothèse n'ont montré une véritable efficacité (Armstrong, 2014 ; Herrup, 2015).

Néanmoins, au cours des années, le schéma de la cascade amyloïde est mis à jour afin d'expliquer au mieux le déroulement de la maladie d'Alzheimer. Par exemple, contrairement à ce qu'il a été formulé au départ, la toxicité des amyloïdes β ne viendrait pas des fibrilles mais des oligomères (Bucciantini *et al.*, 2002 ; Cleary *et al.*, 2004 ; Klein *et al.*, 2001 ; Walsh *et al.*, 2002).

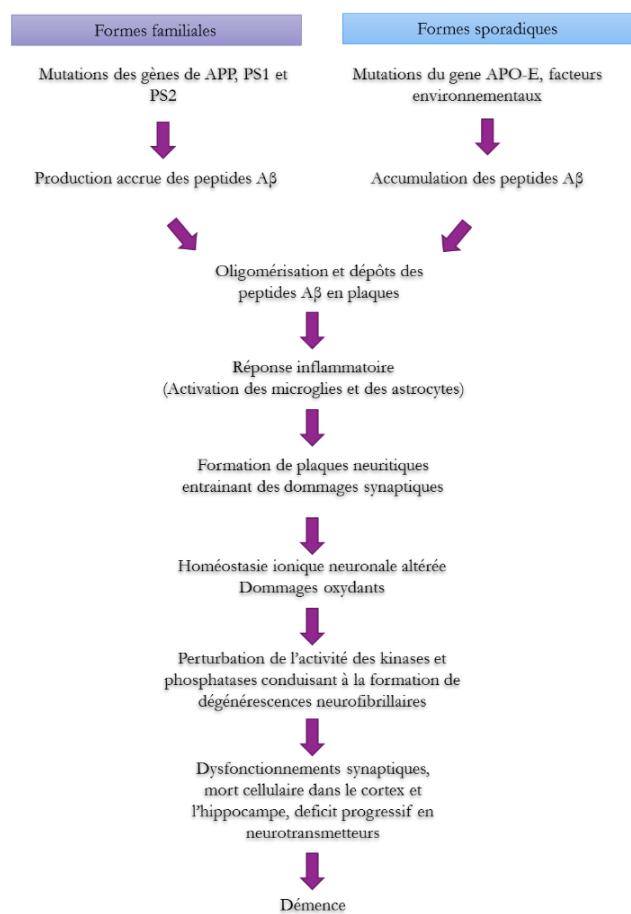


Figure 1.6 : Hypothèse de la cascade amyloïde. Figure adaptée de Hardy et Selkoe, 2002.

1.1.6 Du peptide A β aux fibres

1.1.6.1 Origine du peptide A β

Le peptide A β provient du clivage d'une protéine membranaire appelée APP (Amyloid Precursor Protein). APP est une protéine transmembranaire ubiquitaire codée par un gène situé sur le chromosome 21. Elle est constituée de 695 à 770 acides aminés. Cependant, l'isoforme majoritaire retrouvée au sein des neurones est l'APP695 (Tanaka *et al.*, 1989).

Le rôle de la protéine APP n'est pas encore bien connu. Toutefois, de précédentes études ont montré qu'elle jouerait un rôle dans la régulation de l'homéostasie du cuivre, dans la croissance cellulaire et dans la communication intracellulaire (White *et al.*, 1999 ; Turner *et al.*, 2003 ; O'Brien et Wong, 2011).

Deux voies cataboliques existent pour la protéine APP : la voie non amyloïdogénique qui est majoritaire et la voie amyloïdogénique. Ces deux voies mettent en jeu des enzymes de clivage différentes, conduisant dans le premier cas à la production de peptides non amyloïdes et dans le deuxième cas à la production du peptide A β (Figure 1.7).

Dans la voie non amyloïdogénique, la première enzyme mise en jeu est l' α -sécrétase. Elle coupe au sein même du peptide A β et libère dans le milieu extracellulaire, un fragment soluble appelé APPs α . Le fragment restant, constitué de 83 acides aminés (appelé C83 ou α -CTF) est ensuite clivé par une deuxième enzyme, la γ -sécrétase qui entraîne la libération dans le milieu extracellulaire du peptide P3 et dans le milieu intracellulaire, du peptide AICD (APP IntraCellular Domain).

Dans la voie amyloïdogénique, la première enzyme mise en jeu est la β -sécrétase. Elle clive plus loin de la membrane comparée à l' α -sécrétase, produisant ainsi un fragment soluble plus court appelé APPs β et un fragment membranaire plus long, composé de 99 acides aminés appelé C99 ou β -CTF et qui comprend le peptide A β . L'intervention de la γ -sécrétase permet ensuite la libération dans le milieu extracellulaire de ce dernier et dans le milieu intracellulaire, du peptide AICD comme précédemment (Chow *et al.*, 2010).

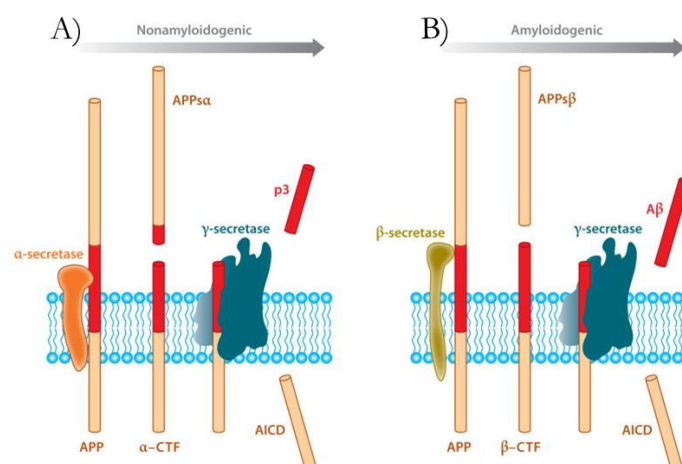


Figure 1.7 : Catabolisme de la protéine APP. A) La voie non amyloïdogénique. B) La voie amyloïdogénique (O'Brien et Wong, 2011).

1.1.6.2 Le peptide A β

Selon le site de clivage de la γ -sécrétase, A β peut être constitué de 38 à 43 acides aminés. Cependant, A β 40 et A β 42 sont les majoritaires (Figure 1.8).



Figure 1.8 : Séquence primaire du peptide A β 42. La partie violette correspond à la partie C-terminale hydrophobe du peptide.

A l'état physiologique, A β 40 représente 90% environ de la population des amyloïdes contre 10% pour A β 42. A l'état pathologique, une augmentation de la quantité d'A β 42 est observée (Cardenas-Aguayo *et al.*, 2014 ; Iwatsubo *et al.*, 1994 ; McGowan *et al.*, 2005).

A β est un peptide amphiphile avec une partie N-terminale (1-28) hydrophile et une partie C-terminale (29-38/43) hydrophobe qui correspond à la partie transmembranaire de la protéine APP. Selon la longueur de la chaîne peptidique, les caractéristiques de solubilité et de fibrillation de chaque peptide seront différentes. En effet, à l'état physiologique, A β 40 adopte une forme relativement soluble en milieux aqueux comparée à A β 42 qui forme rapidement des fibrilles insolubles (Naslund *et al.*, 1994). Toutefois, la concentration en peptides, le pH, le solvant ou la présence d'ions métalliques par exemple, sont autant de paramètres qui peuvent influencer le phénomène d'agrégation (Barrow *et al.*, 1992 ; Etienne *et al.*, 2007 ; Hane *et al.*, 2013 ; Kobayashi *et al.*, 2015).

1.1.6.3 Chemin d'agrégation du peptide A β

Comme il l'a été mentionné précédemment, les peptides A β possèdent la capacité de s'auto-agrégéer. Ils peuvent ainsi très facilement former des dimères puis des oligomères qui peuvent ensuite à leur tour s'associer et former des fibrilles puis des fibres ; principaux composants des plaques amyloïdes. L'agrégation est permise suite à un changement conformationnel des peptides qui adoptent une structure en feuillets β à la place d'une structure désordonnée ou hélicoïdale (Serpell, 2000). Ce changement conformationnel peut être expliqué à l'aide du concept développé par Bryngelson, J. (1995) et Wolynes, P.G. (1995) dans les années 90 qui décrit le repliement d'une protéine selon un paysage énergétique. En effet, ce dernier présente selon un schéma simplifié toutes les configurations géométriques qu'une protéine peut adopter en fonction de leur énergie (Figure 1.9). Le paysage énergétique des peptides amyloïdes se présente sous la forme d'un entonnoir. Le haut correspond à toutes les conformations désorganisées du peptide. Ces conformations sont nombreuses et de haute énergie puisqu'aucune structure susceptible de stabiliser le peptide n'est présente. Le fond de l'entonnoir quant à lui, correspond à la forme native du peptide qui possède

une plus faible énergie. Ainsi, à l'aide de liaisons intramoléculaires puis intermoléculaires, le peptide va pouvoir passer de sa structure désorganisée vers sa structure native qui est de plus basse énergie.

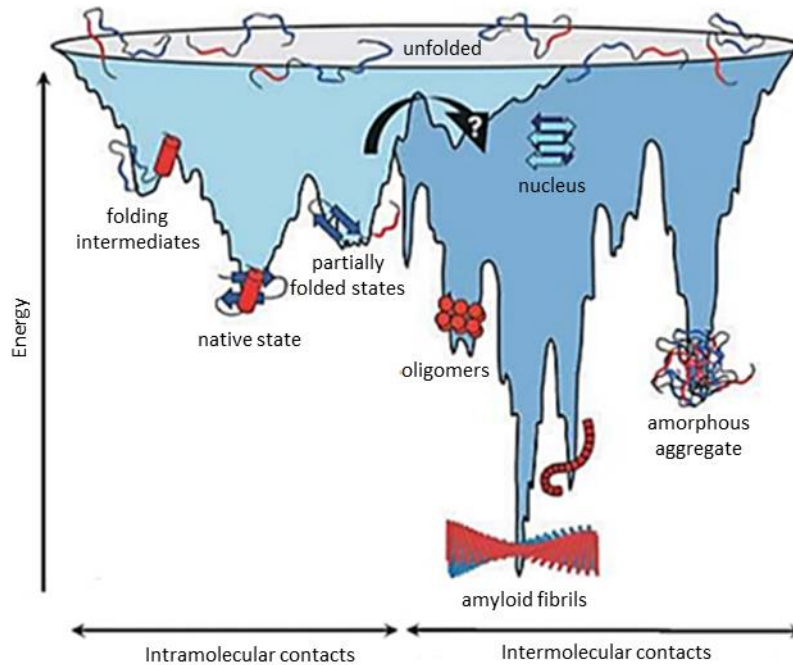


Figure 1.9 : Représentation schématique du paysage énergétique pour le repliement et l'agrégation d'une protéine (Jahn et Radford, 2005).

a. Cinétique de formation des fibres

La formation des fibres se fait selon un mécanisme de croissance par nucléation qui sépare la fibrillation en une étape de nucléation dite de latence et en une étape d'élongation (Jarrett et Lansbury, 1993). L'étape de latence correspond au temps nécessaire pour qu'un noyau se forme, c'est-à-dire au temps nécessaire pour que des monomères s'auto-associent. Une fois le noyau formé, la formation de la fibre s'effectue très rapidement par addition de monomères ou d'oligomères à ce dernier (Figure 1.10).

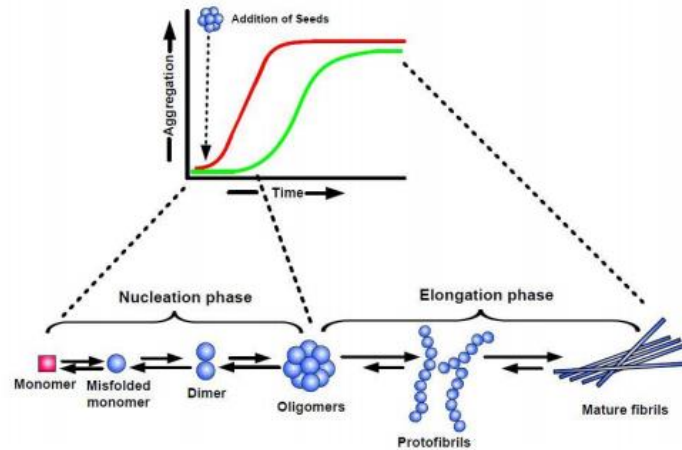


Figure 1.10 : Cinétique de formation des fibres amyloïdes caractérisée par deux phases : une phase de latence et une phase d'élongation. La première phase correspond à l'étape limitante. Cependant, l'ajout de noyaux préformés peut sensiblement réduire sa durée (courbe rouge) (Kumar et Walter, 2011).

b. Caractérisation des fibres

Les avancées dans la spectroscopie RMN du solide et dans l'analyse de diffraction des rayons X a permis de mettre en évidence une structure en feuillets β croisés commune à toutes les fibres amyloïdes (Fändrich, 2007 ; Fitzpatrick *et al.*, 2013 ; Tycko, 2004). Cette structure se caractérise par un empilement de brins β orientés perpendiculairement à l'axe principal de la fibre (Figure 1.11A). Les clichés de diffraction des rayons X révèlent une première raie perpendiculaire à l'axe de la fibre à 4,8 Å correspondant à la distance entre deux brins β au sein des feuillets, et une seconde parallèle à l'axe à 10 Å correspondant à la distance entre deux feuillets β (Figure 1.11B) (Rambaran et Serpell, 2003 ; Serpell, 2000). Cependant, cette valeur peut varier en fonction de la chaîne peptidique impliquée. Les fibres amyloïdes se composent de plusieurs fibrilles, chacune composée par 2 à 6 protofilaments qui s'enroulent entre eux (Jiménez *et al.*, 2002) (Figure 1.11C). Dans le cas des fibres formées par les peptides A β 40 et A β 42, il a été montré que chaque protofilament se compose de quatre feuillets β qui s'organisent de manière parallèle (Figure 1.11D) (Blake et Serpell, 1996 ; Lührs *et al.*, 2005 ; Petkova *et al.*, 2002).

D'autres méthodes ont permis de confirmer l'organisation des fibres en feuillets β telles que la spectroscopie infrarouge ou le dichroïsme circulaire (Bouchard *et al.*, 2000 ; Sarroukh *et al.*, 2013).

Egalement, due à leur structure organisée en feuillets β , les fibres amyloïdes peuvent être mises en évidence à l'aide du rouge Congo ou de la thioflavine T (Biancalana et Koide, 2010 ; Klunk et Jaco, 1999 ; LeVine, 1993 ; Sajid *et al.*, 1997).

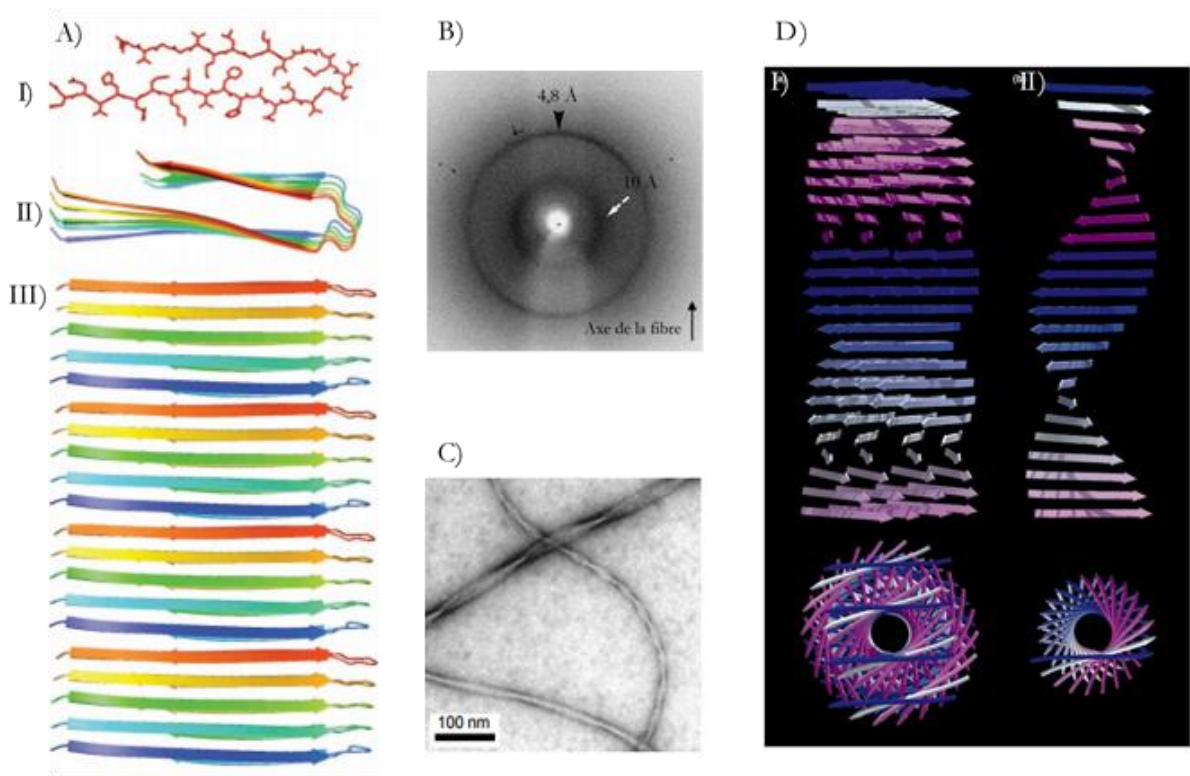


Figure 1.11 : Modèle structural des feuillets β croisés parallèles formés par les peptides $A\beta$. A) Modèle montrant le repliement des peptides $A\beta$ en feuillets β parallèles : I) Modèle présentant les chaînes latérales. II) Vue du dessus. III) Vue de face montrant que les feuillets β sont perpendiculaires à l'axe de la fibre. B) Profil de diffraction des rayons X des fibres formées par le peptide $A\beta_{40}$. C) Image de microscopie électronique des fibres formées *in vitro* à partir du peptide $A\beta_{40}$. D) Modèle structural d'un protofilament. I) Schéma montrant le cœur de la structure d'un protofilament vue de face (selon l'axe de la fibre) et vue du dessus. II) Feuillet β isolé montrant avec plus de lisibilité l'organisation de la fibre en feuillets β croisés. Figure adaptée de Blake et Serpell, 1996 ; Rambaran et Serpell, 2008 ; Serpell, 2000 ; Tycko, 2004.

c. Caractérisation des oligomères

Comme il l'a été mentionné précédemment, une des étapes du processus de fibrillation est la formation d'intermédiaires oligomériques solubles. De récentes études ont montré que ces derniers adopteraient une structure commune en feuillets β antiparallèles (Cerf *et al.*, 2009 ; Kaye *et al.*, 2003 ; Sarroukh *et al.*, 2011 ; Stroud *et al.*, 2012). Le passage de la forme oligomérique à la forme fibrillaire se ferait donc grâce à une réorientation des brins β de 90° (Sarroukh *et al.*, 2011). Cependant, différents types d'oligomères ont été répertoriés dans la littérature dont certains ne conduiraient pas à la formation de fibres (Tableau 1.1) ; les globulomères en sont un exemple (Haass et Selkoe, 2007 ; Roychaudhuri *et al.*, 2009). Une deuxième voie d'agrégation appelée « off-pathway » (en opposition à celle dite « on-pathway » qui correspond à la formation des fibres

organisées en feuillets β parallèles) a donc été suggérée (Kumar *et al.*, 2012 ; Roychaudhuri *et al.*, 2009).

Oligomer	Physical properties	Detection in Tg2576 mice	Detection in humans	Biological effects
Paranucleus	5 nm diameter, spheroidal, A β 42 only	ND	ND	Neuronal death, redox effects
ADDL	~53 kDa, 5-6 nm height (AFM), A β 42 only	~20-250 fmol/ μ g at 13 and 17 mos.	$\leq 12\times$ \uparrow in AD	Neuronal death, NMDAR-dependent toxicity, LTP inhibition, channel formation, memory loss
A β *56	~56 kDa (12-mer), prolate ellipsoid, 1 nm height (AFM)	Observed by 6 mo. and stable between 6-13 mos.	3.8 \times \uparrow in MCI ^a , 3.2 \times \uparrow in AD ^a	Synaptic dysfunction, memory disruption, cognitive deficits
Globulomer	~60 kDa (12-mer), formed by A β 42 in SDS	0.5 \rightarrow 2.5 ng/g increase from 5-12 mos.	~1 ng/g in AD, undetectable in normals	LTP inhibition, binding to dendritic processes
A β O	~90 kDa (15-20 monomers), spherical vesicle with diameter of 2-5 nm,	ND	A11 ⁺ staining observed	\uparrow membrane conductance, calcium influx, apoptosis
Protofibril	~5 nm diameter, beaded, curvilinear structure, <150 nm long, formed by A β 40 or A β 42 (24-700 monomers)	ND	ND	Neuronal death, \uparrow EPSC, NMDAR-dependent toxicity, ROS production, ion channel formation, calcium homeostasis disruption
Annulus	Annular structure with 7-10 nm outer diameter, 1.5-2.0 nm inner diameter, 150-250 kDa	ND	ND	Pore formation
ASPD	~150-700 kDa, ~10-15 nm diameter, formed by A β 40 or A β 42	ND ^b	ND ^b	Neuronal death
β amyball	50-100 μ m diameter spheroids, A β 42 only	ND	ND	ND

Tableau 1.1 : Différentes structures adoptées par les oligomères A β (Abréviations : A β O, A β oligomer ; ADDL, A β -derived diffusible ligand ; ASPD, amylospheroid ; β -amyball, β -amyloid ball ; EPSC, excitatory post-synaptic currents ; NMDAR, N-méthyl-D-aspartate receptor ; LTP, long-term potentiation). Extrait de Roychaudhuri *et al.*, 2009.

1.1.7 Toxicité du peptide A β

Pendant de nombreuses années, les fibres amyloïdes ont été considérées comme les responsables de la toxicité (Howlett *et al.*, 1995 ; Pike *et al.*, 1991 ; Roher *et al.*, 1991). Cependant, de récentes études ont montré que ce serait les oligomères qui seraient responsables des dommages observés au cours de la maladie d'Alzheimer (Tableau 1.1) (Bucciantini *et al.*, 2002 ; Cleary *et al.*, 2004 ; Klein *et al.*, 2001 ; Walsh *et al.*, 2002). En effet, contrairement aux plaques amyloïdes, la concentration en oligomères peut être corrélée à l'avancement de la maladie (Lue *et al.*, 1999 ; McLean, 1999). De plus, les altérations pathologiques sont généralement observées avant l'apparition des plaques amyloïdes (Hermann *et al.*, 2009 ; Kawarabayashi *et al.*, 2004 ; Moechars *et al.*, 1999 ; Palop *et al.*, 2003). Néanmoins, en dépit de recherches intensives, les mécanismes de toxicité ne sont pas encore bien connus. Il semblerait toutefois que leur capacité à interagir avec certains métaux et/ou les membranes lipidiques soit déterminante.

1.1.7.1 Implication des métaux

a. Les métaux et le stress oxydatif

Les métaux tels que le cuivre, le zinc ou le fer sont essentiels pour les organismes vivants. En effet, il a été montré que ces derniers sont impliqués dans un très grand nombre de processus biologiques. Par exemple, le cuivre est nécessaire pour l'activité d'un certain nombre d'enzymes catalysant des réactions redox. Le zinc quant à lui est impliqué dans la régulation de la transcription des gènes, la réponse au stress oxydant ou la vision et le fer, dans la respiration ou la régulation de l'expression des gènes. Cependant, ces métaux peuvent très vite devenir dangereux s'ils s'accumulent dans l'environnement. Par exemple, le fer et le cuivre peuvent générer en présence d'oxygène la formation d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) au travers des réactions de Fenton (Figure 1.12, Equation 4) ou d'Haber-Weiss (Figure 1.12, Equation 6).

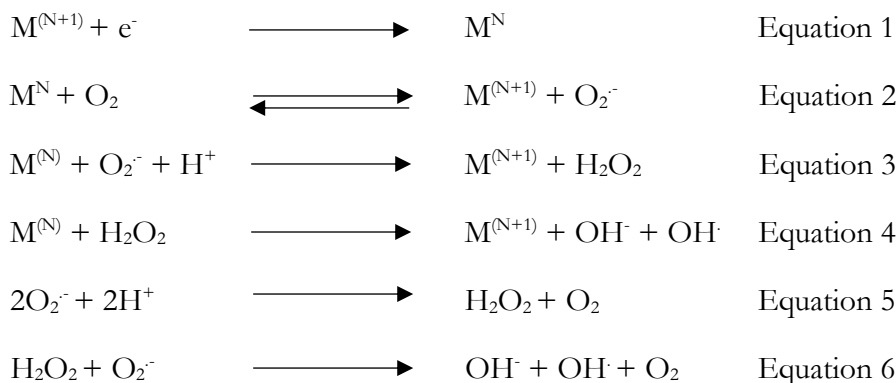


Figure 1.12 : Principales réactions conduisant à la production des espèces réactives à l'oxygène ($M^N = Cu^I, Fe^{II}$).

La présence de ROS au sein d'une cellule entraîne de nombreux dommages à travers l'oxydation des protéines et de l'ADN et/ou de la peroxydation des lipides.

Cependant, dans des conditions physiologiques normales, l'organisme met en place des processus de protection vis-à-vis de ces dommages oxydants. En premier lieu, l'homéostasie des métaux est contrôlée afin d'éviter un excès ou à l'inverse une déficience de ces derniers qui pourrait être tout autant néfaste pour l'organisme. Pour ce faire, les métaux sont séquestrés et libérés uniquement à des endroits spécifiques. En effet, des études ont montré que la répartition du cuivre et du zinc n'est pas uniforme dans l'ensemble du cerveau par exemple (Becker *et al.*, 2005).

Les protéines responsables du stockage et du transport sont respectivement dans le cas du cuivre, les métallothionéines et les « chaperonnes du cuivre » ; dans le cas du zinc, les métallothionéines et les protéines ZnT et Zip ; et dans le cas du fer, les ferritines et les transferrines.

En second lieu, la présence d'un grand nombre d'antioxydants permet également de lutter contre le stress oxydant. Par exemple, les superoxydes dismutases (SOD) entraînent la conversion des

anions superoxydes O_2^- en H_2O_2 et O_2 . La catalase et la glutathion peroxydase convertissent ensuite H_2O_2 en O_2 et/ou H_2O .

b. Les métaux dans la maladie d'Alzheimer

o Implication dans le processus de fibrillation

Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, des quantités anormales de cuivre, de zinc et de fer ont été retrouvées au sein des plaques amyloïdes et à proximité de celles-ci suite à un dérèglement de l'homéostasie des métaux (Dong *et al.*, 2003 ; Lovell *et al.*, 1998 ; Miller *et al.*, 2006 ; Smith *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 2012). Le rôle exact des ions métalliques dans le processus de fibrillation n'est toutefois pas encore très bien établi. De précédentes études ont suggéré que le zinc aurait une plus forte capacité à induire l'agrégation des peptides $A\beta$ comparé au cuivre et aux autres métaux. En effet, à pH neutre, la coordination de Zn^{2+} avec le peptide $A\beta$ conduit à la formation d'agrégats insolubles contrairement à Cu^{2+} qui entraîne la formation d'espèces solubles (Miura *et al.*, 2000). Cependant, à pH un peu plus acide (pH6.6), Cu^{2+} induit également la formation d'agrégats insolubles (Atwood *et al.*, 1998). Or, il a été observé une diminution du pH au sein du cerveau avec l'âge suite à une augmentation des processus inflammatoires.

De récentes études ont montré que la quantité anormale de zinc retrouvée au sein des plaques proviendrait essentiellement des neurones glutamergiques. En effet, au sein du système nerveux central, une grande partie du zinc est contenue à l'intérieur de vésicules synaptiques. Les transporteurs ZnT et ZIP sont responsables de la régulation de la concentration en zinc intracellulaire : les transporteurs ZnT permettent de transférer le zinc cytoplasmique vers les organites (vésicules synaptiques, mitochondries) ou vers le milieu extérieur si la concentration intracellulaire est trop importante à l'inverse des protéines ZIP. Ainsi, durant l'activité synaptique ou suite à la dépolarisation des terminaisons nerveuses des neurones contenant du zinc, ce dernier est libéré dans la fente synaptique augmentant sa concentration d'un facteur 600 environ (Frederickson *et al.*, 2005).

Chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, une augmentation de la concentration en zinc synaptique a été observée. Cela serait la conséquence d'une surexpression du nombre de transporteurs ZnT (Lovell *et al.*, 2005 ; Smith *et al.*, 2006). A l'inverse, la diminution de la concentration en zinc synaptique due à la suppression du gène codant pour la protéine ZnT entraîne une réduction des plaques de 50% environ chez des souris transgéniques Tg2576 (souris surexprimant la protéine APP) par rapport à des souris Tg2576 contrôles (Lee *et al.*, 2002). Ces résultats suggèrent donc qu'une colocalisation inhabituelle entre le zinc et les peptides $A\beta$ au niveau des fentes synaptiques pourrait favoriser la formation des plaques.

Dans le cas du cuivre et du fer, les responsables de la dérégulation de l'homéostasie de ces derniers sont moins connus. Toutefois, des variations au niveau de la quantité de certaines protéines de

transport et/ou de stockage de ces métaux ont été observées telles que la ceruloplasmine qui est une protéine impliquée dans le stockage du cuivre et dans le transport du fer (Shim et Harris, 2003).

L'âge pourrait être également un facteur et plus particulièrement pour le cuivre et le fer où une augmentation de leur concentration a été reportée selon l'âge de la personne (Maynard *et al.*, 2002).

○ Implication des métaux dans la toxicité des peptides A β

Une autre caractéristique rencontrée chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer est une augmentation des dommages oxydatifs au niveau des protéines, lipides et acides nucléiques, témoignant d'un stress oxydatif important (Gella et Durany, 2009 ; Pappola *et al.*, 1992 ; Smith *et al.*, 2000). Cette augmentation serait la conséquence du dérèglement de l'homéostasie des métaux et de la capacité du cuivre et du fer à former des ROS. En effet, en présence d'agents réducteurs tels que le cholestérol ou la vitamine C, A β est capable de catalyser la réduction de Cu²⁺ et Fe³⁺ en Cu⁺ et Fe²⁺ respectivement, générant ainsi la production de peroxyde d'hydrogène (Huang *et al.*, 1999 ; Opazo *et al.*, 2002 ; Smith *et al.*, 1997). En absence d'un nombre suffisant d'antioxydants tels que la catalase et la glutathion peroxydase, le peroxyde d'hydrogène réagit avec les ions métalliques Cu⁺ et Fe²⁺ pour former des espèces réactives à l'oxygène selon la réaction de Fenton par exemple.

Des modifications au niveau de certains acides aminés du peptide A β tels que la tyrosine en position 10 et la méthionine en position 35 peuvent être observées suite à la production de ROS. En effet, il a été reporté la formation de liens covalents entre deux peptides A β au niveau des tyrosines suite à l'oxydation de ces dernières (Atwood, 2004 ; Smith *et al.*, 2007). Cela a pour conséquence la formation d'oligomères toxiques très stables. Il a été reporté également que la modification oxydative de la méthionine défavorise la formation des fibres au profit d'oligomères solubles toxiques (Barnham *et al.*, 2003 ; Hou *et al.*, 2002, 2004, 2013 ; Schöneich, 2005).

De récentes études ont ouvert la voie sur l'implication des hèmes dans le stress oxydant observé au cours de la maladie d'Alzheimer. En effet, une augmentation remarquable de 250% d'hèmes *b* a été mise en évidence dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Atamna et Frey II, 2004). Cette augmentation serait due à la formation de complexes hème-A β . La formation de ces complexes aurait pour conséquence une diminution de la quantité d'hèmes présents au sein des cellules ; hèmes nécessaires aux processus biologiques. Cela pourrait expliquer la dérégulation de l'homéostasie du fer, l'altération des protéines régulatrices du fer, le dysfonctionnement du complexe IV de la chaîne respiratoire et l'augmentation du stress oxydatif observés chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Atamna, 2006 ; Hernandez-Zimbron *et al.*, 2012). De plus, il a été montré que le complexe hème-A β 42 posséderait une activité peroxydase permettant de catalyser l'oxydation de neurotransmetteurs, ce qui entrainerait une altération du système de neurotransmission (Atamna *et al.*, 2006).

En présence d'ions Cu^{2+} , le peptide $\text{A}\beta$ serait capable de former un complexe hème-Cu- $\text{A}\beta$. Cela aurait pour conséquence d'augmenter considérablement la production de ROS (Pramanik *et al.*, 2011a).

○ Interactions des métaux avec le peptide $\text{A}\beta$

La mise en évidence de l'implication des métaux dans le stress oxydatif et dans l'agrégation des peptides $\text{A}\beta$ a initié de nombreuses recherches sur les interactions entre ces derniers et les peptides $\text{A}\beta$. Les principales méthodes utilisées sont la spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE), de résonance magnétique nucléaire (RMN) et infrarouge (IR). Il a été montré que les sites d'interaction se situeraient au niveau des seize premiers acides aminés. De nombreuses études ont ainsi été portées sur des peptides $\text{A}\beta$ tronqués tels que le peptide $\text{A}\beta_{16}$. Cependant, l'utilisation de peptides tronqués ne permet pas de conclure sur l'influence du métal par rapport à l'agrégation du peptide.

➤ Structure du complexe $\text{Cu(II)-A}\beta$ et $\text{Cu(I)-A}\beta$

A pH physiologique, $\text{A}\beta$ forme majoritairement avec le Cu(II) , un complexe de stœchiométrie 1:1 mais la coordination est dépendante du pH. En effet, à pH 7,4, deux complexes appelés composante I et II sont en équilibre alors qu'à pH 6,5 et pH 9, un seul est prédominant.

Pour la composante I, le Cu(II) est coordonné par deux histidines (His6 et His13/His14), par la fonction carbonyle d'Asp1 et par les groupements NH_2 terminal et carboxylate du résidu Asp1. Pour la composante II, les groupements impliqués dans la sphère de coordination sont le groupement NH_2 terminal, le groupement amide déprotoné entre Asp1 et Ala2, la fonction carbonyle d'Ala2 et le noyau imidazole d'une histidine (Figure 1.13) (Dorlet *et al.*, 2009 ; El Khoury *et al.*, 2011 ; Trujano-Ortiz *et al.*, 2015). Cependant, la structure de la composante II est très discutée dans la littérature. Certaines études proposent une coordination avec le groupement carboxylique de Asp1 et les histidines en position 6, 13 et 14 (Curtain *et al.*, 2001 ; Drew *et al.*, 2009 ; Syme *et al.*, 2004).

En ce qui concerne le Cu(I) , les groupements impliqués dans la sphère de coordination seraient les histidines en position 13 et 14 bien qu'une combinaison entre His6 et His13 ou His14 peut être également observée (Figure 1.13) (Faller *et al.*, 2014 ; Trujano-Ortiz *et al.*, 2015). Toutefois, une récente étude suggère que lorsque la composante II est majoritaire, le Cu(I) forme un complexe linéaire avec une des trois histidines et le groupement amide entre Asp1 et Ala2 (Trujano-Ortiz *et al.*, 2015).

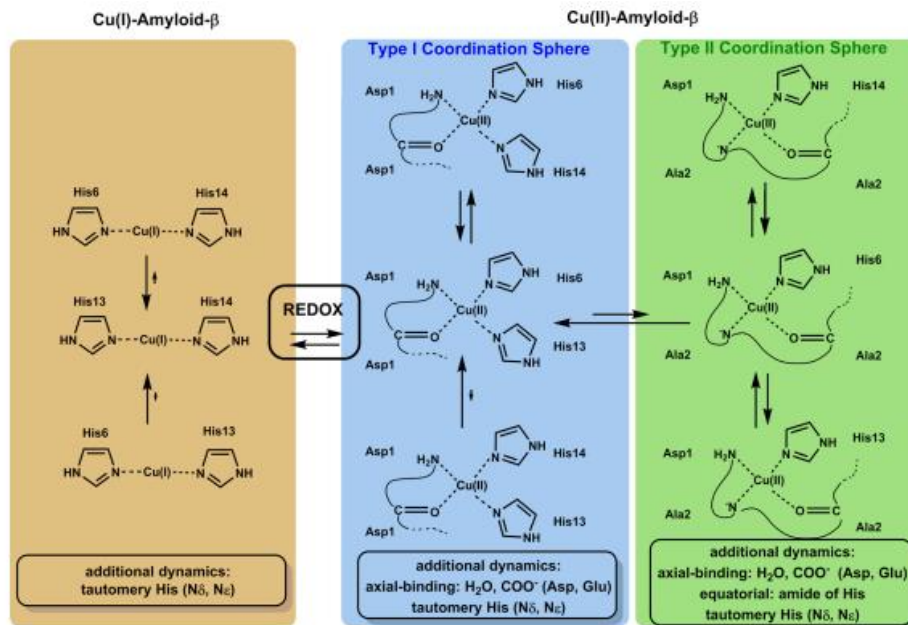


Figure 1.13 : Sphère de coordination de Cu(I)- et Cu(II)-Aβ (Faller *et al.*, 2014).

➤ Structure du complexe Zn(II)-Aβ

Comme dans le cas du Cu(II), Aβ forme majoritairement un complexe de stœchiométrie 1 : 1 avec les ions Zn(II). Les résidus impliqués dans la sphère de coordination seraient His6, His13 ou 14, Glu11, Asp1 ou Glu3 ou Asp7 (Figure 1.14) (Alies *et al.*, 2016 ; Faller et Hureau, 2009 ; Zirah *et al.*, 2006). Cependant, dans le dernier cas, il semblerait que Asp1 soit privilégié bien qu'un équilibre entre ligands équivalents pour une position donnée ait été observé (Alies *et al.*, 2016).

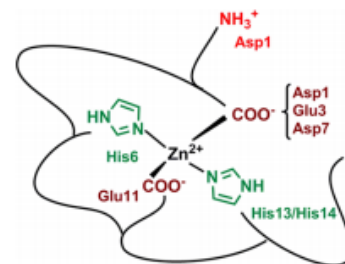


Figure 1.14 : Sphère de coordination de Zn(II)-Aβ.

➤ Structure du complexe Fe(II)-Aβ

Très peu d'études ont été rapportées sur la coordination du Fe avec le peptide Aβ. Toutefois, selon une étude RMN, les résidus impliqués dans la sphère de coordination du Fe(II) seraient les trois histidines en position 6, 13 et/ou 14, ainsi que l'aspartate en position 1 et le glutamate en position 3 (Figure 1.15) (Bousejra-ElGarah *et al.*, 2011).

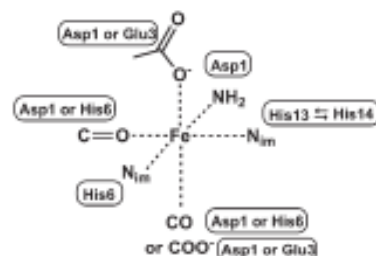


Figure 1.15 : Sphère de coordination de Fe(II)-Aβ (Bousejra-ElGarah *et al.*, 2011).

Concernant le Fe(III), il semblerait que son affinité envers le peptide Aβ soit moins forte que celle pour les ions hydroxydes rendant ainsi difficile son analyse.

➤ Structure du complexe hème-A β

Selon une étude menée par Pramanik *et al.*, les résidus impliqués dans la sphère de coordination seraient l'His13 et l'Arg5 (2011). L'implication du résidu Arg5 expliquerait l'activité peroxydase du complexe hème-A β (Figure 1.16) (Ghosh *et al.*, 2015, Pramanik *et al.*, 2011b).

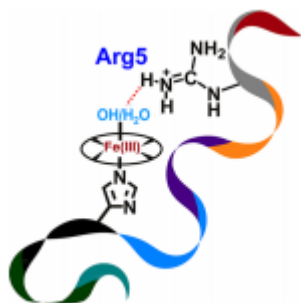


Figure 1.16 : Représentation schématique de l'environnement du site catalytique du complexe hème-A β (Ghosh *et al.*, 2015).

1.1.7.2 L'implication des lipides

a. Les lipides, composants principaux des membranes cellulaires

Les membranes cellulaires sont essentielles à la vie. Elles constituent une barrière entre le milieu extracellulaire et le milieu intracellulaire d'une cellule, permettant de maintenir une composition différente entre ces deux. Les principaux responsables de la fonction de compartimentation sont les lipides qui représentent le constituant majoritaire des membranes. Les lipides sont des molécules amphiphiles dotées d'une partie polaire hydrophile et d'une partie apolaire hydrophobe. Au sein des membranes, les lipides forment une bicouche lipidique avec les parties hydrophobes au centre afin de limiter les interactions entre ces dernières et les molécules d'eau (Figure 1.17). Cela a pour conséquence d'empêcher le libre passage de macromolécules d'un compartiment à un autre et de limiter toute diffusion d'ions et/ou de molécules solubles. En effet, seules quelques molécules très hydrophobes sont capables de traverser la bicouche.

Néanmoins, bien que la compartimentation soit la condition *sine qua non* de l'existence d'une cellule, la survie et le fonctionnement de cette dernière nécessitent des échanges continuels de matière et d'information entre le milieu extracellulaire et intracellulaire. Ces échanges sont permis grâce à la présence de protéines qui représentent le second constituant majeur des membranes. Deux types de protéines membranaires peuvent être retrouvés : les protéines extrinsèques et les protéines intrinsèques (Figure 1.17). La proportion lipide/protéine dépend fortement de la fonction de la cellule. Par exemple, la gaine de myéline des axones contient 70% de lipides et 30% de protéines environ alors que la membrane des organites contient environ 30% de lipides et 70% de protéines.

Egalement, des glucides sont présents au niveau des membranes et plus particulièrement au niveau de la face extracellulaire. Ils ne se retrouvent jamais libres mais liés à des protéines ou des lipides sous forme de glycoprotéines ou glycolipides respectivement. L'ensemble de ces résidus glucidiques

forme le « cell coat » et a pour rôle de protéger les membranes, de faciliter la reconnaissance entre cellules et l'adhésivité entre elles (Reitsma *et al.*, 2007).

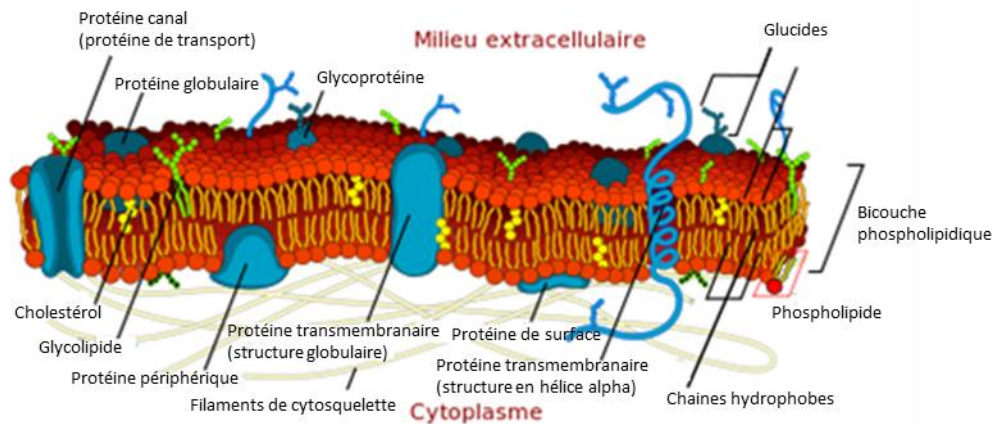


Figure 1.17 : Représentation schématique d'une membrane cellulaire selon le modèle de la mosaïque fluide fait par Singer et Nicolson qui décrivent la membrane comme une bicouche lipidique à laquelle viennent s'associer de différentes façons des protéines et des glucides (1972).

Trois familles de lipides peuvent être retrouvées au sein d'une membrane cellulaire : les glycérophospholipides plus communément appelés phospholipides, les sphingolipides et les stérols (Berg *et al.*, 2002).

Les glycérophospholipides sont les plus répandus dans les membranes cellulaires. Ils dérivent du glycérol par estérification en position 3 par un dérivé de l'acide phosphorique et en position 1 et 2 par des acides gras. De nombreux acides gras peuvent entrer dans la constitution des membranes. Ils diffèrent par la longueur de leur chaîne carbonée, ainsi que par le nombre et la position de leurs insaturations. De même, la nature du substituant fixé sur l'acide phosphorique définit la nature du phospholipide. Parmi les plus courants, peuvent être cités la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylsérine, le phosphatidylglycerol et le phosphatidylinositol (Figure 1.18 et Tableau 1.2).

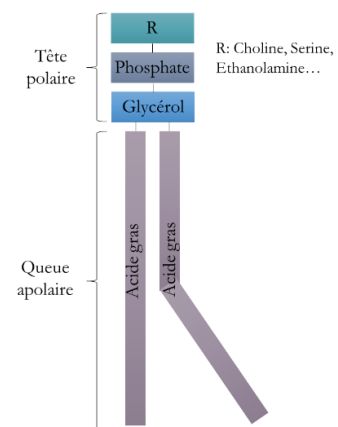


Figure 1.18 : Représentation schématique d'un glycérophospholipide.

Groupement polaire	Nom du lipide	Charge
-H	Acide phosphatidique	Négative
$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Phosphatidylcholine	Zwittérionique
$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$	Phosphatidyléthanolamine	Zwittérionique
$-\text{CH}_2\text{CHNH}_3^+\text{COO}^-$	Phosphatidylsérine	Négative
$-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$	Phosphatidylglycérol	Négative
$-\text{HC}_6\text{H}_5(\text{OH})_5$	Phosphatidylinositol	Négative
$-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2^-$	Cardiolipine	Négative

Tableau 1.2 : Principaux glycérophospholipides avec leur groupement polaire associé (Berg *et al.*, 2002).

Les sphingolipides dérivent de la sphingosine. En effet, ils contiennent des céramides qui sont formés à partir d'une sphingosine liée par une liaison amide à un acide gras de longueur et de degré d'insaturation variables. La nature du substituant estérifié à l'alcool terminal de la sphingosine détermine la nature du sphingolipide. Par exemple, s'il s'agit d'un dérivé phosphorylé, le sphingolipide est un sphingophospholipide et s'il s'agit d'un glucide, le sphingolipide est un sphingoglycolipide (Figure 1.19). Le sphingophospholipide le plus abondant est la sphingomyéline formée à partir de la phosphocholine.

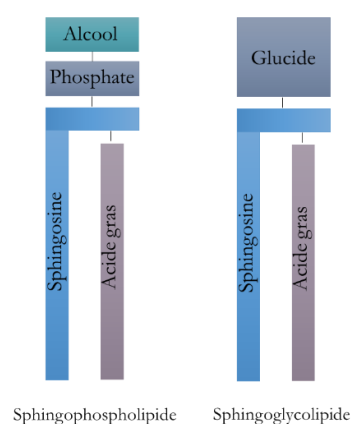


Figure 1.19 : Représentation schématique des sphingolipides.

Les stérols sont des molécules beaucoup plus compactes et beaucoup plus apolaires que les phospholipides et les sphingolipides. Ils dérivent du perhydropentanophénantrène, un hydrocarbure tétracyclique. Le cholestérol est le stérol le plus abondant dans les membranes cellulaires. Il présente un groupement OH sur l'un des cycles, ce qui lui confère une partie polaire lui permettant de s'insérer dans les bicouches (Figure 1.20). Cependant, du fait de sa taille, il n'occupe qu'une monocouche de la bicouche. Le cholestérol a pour rôle de contribuer à la stabilité et au maintien de l'organisation structurale de la membrane en régulant la fluidité de cette dernière.

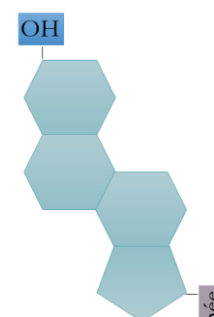


Figure 1.20 : Représentation schématique du cholestérol.

b. Interaction des peptides A β avec les lipides

Il est désormais admis que la toxicité des peptides A β proviendrait de leur capacité à interagir avec les membranes biologiques. En effet, de récentes études ont montré que les oligomères A β sont capables de former des pores dans les membranes cellulaires grâce à leur caractère amphiphile (Arce

et al., 2014 ; Cerf *et al.*, 2009 ; Kagan et Thundimadathil, 2010). Cela aurait pour conséquence un afflux rapide et incontrôlé d'ions tels que les ions Ca^{2+} qui entrainerait la mort des cellules neuronales ou qui déclencherait l'apoptose (pour plus de détails se référer au paragraphe 1.1.7.3).

Cependant, d'autres mécanismes d'interactions ont également été proposés tels que l'effet « tapis » qui correspond à un recouvrement de la membrane ou l'effet détergent qui correspond à la dissolution de la membrane (Figure 1.21) (Williams et Serpell, 2011).

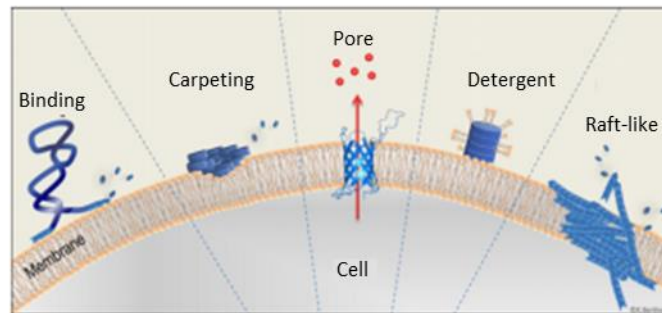


Figure 1.21 : Représentation schématique des différents mécanismes possibles d'interaction entre les peptides $\text{A}\beta$ et la membrane lipidique qui pourraient expliquer la toxicité des peptides $\text{A}\beta$ (Berthelot *et al.*, 2013).

L'effet « tapis » suggère que les peptides $\text{A}\beta$ interagissent avec un seul côté de la membrane entraînant une pression asymétrique sur cette dernière. La relaxation provoque le relargage de petites molécules.

Dans le cas de l'effet détergent, il est suggéré que les peptides interagissent avec la partie hydrophobe de la membrane entraînant la déstabilisation de cette dernière et la formation de micelles. L'arrachement de lipides conduit à la formation de trou ou à l'amincissement de la membrane facilitant ainsi le passage d'ions ou de petites molécules.

Egalement, il semblerait que la présence de certains domaines lipidiques dénommés « radeaux lipidiques » favoriseraient l'interaction des oligomères $\text{A}\beta$ avec la membrane (Kawarabayashi *et al.*, 2004 ; Kim *et al.*, 2006 ; Yu *et al.*, 2005). Les radeaux lipidiques sont des microdomaines enrichis en sphingolipides et en cholestérol, ce qui leur confèrent une certaine rigidité et qui leur permettent de « flotter » sur la membrane. Leur rôle est de concentrer des protéines et des lipides dans le même environnement. En effet, les radeaux lipidiques servent de navette de transport à la surface cellulaire permettant de coordonner par exemple l'organisation spatio-temporelle des voies de signalisation dans des zones sélectionnées de la membrane plasmique (Fantini *et al.*, 2002 ; Rushworth et Hooper, 2011).

De précédentes études ont montré que le cholestérol jouerait un rôle important dans la production des peptides $\text{A}\beta$. En fonction de sa concentration, la fluidité de la membrane est fortement affectée. Par conséquent, s'il est présent en grande quantité, la fluidité de la membrane est diminuée, ce qui

favorise le clivage de la protéine APP par la β -sécrétase (Askarova *et al.*, 2011 ; Beel *et al.*, 2008, Eehalt *et al.*, 2003 ; Rushworth et Hooper, 2011).

Il a également été suggéré que le cholestérol jouerait un rôle dans l'oligomérisation des peptides A β . Cependant, les avis sont très controversés dans la littérature ; la difficulté étant de dissocier l'influence du cholestérol sur la production des peptides A β de celle d'un effet direct sur l'oligomérisation (Cecchi *et al.*, 2008, 2009 ; Fantini *et al.*, 2013 ; Qiu *et al.*, 2009 ; Yahli *et al.*, 2010).

Des changements dans la composition et la concentration des gangliosides au niveau de certaines régions du cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer ont également été mis en évidence. L'interaction des peptides A β avec les gangliosides présents au sein des radeaux lipidiques semblent être une étape importante dans le mécanisme de toxicité des peptides A β . Le ganglioside GM1 a été identifié comme étant un acteur potentiel dans le changement de structure secondaire des amyloïdes β . Cependant, le mécanisme induisant ce changement n'a pas encore été trouvé (Bucciantini *et al.*, 2014 ; Choo-Smith *et al.*, 1997 ; Kakio, 2002 ; Mason *et al.*, 1992 ; Matsuzaki *et al.*, 2010 ; Mori *et al.*, 2012).

L'ensemble de ces données tendent donc à suggérer que la composition de la membrane joue un rôle important dans le processus de fibrillation et dans la cytotoxicité des peptides A β . Par exemple, les membranes présentant un nombre important de radeaux lipidiques sont plus sensibles à la toxicité des amyloïdes β (Malchiodi-Albedi *et al.*, 2010). De plus, il semblerait que la charge des membranes joue un rôle important dans l'interaction des peptides avec la membrane et dans la fibrillation (Bokvist *et al.*, 2004 ; Ege *et al.*, 2005 ; Hane *et al.*, 2011 ; Lin *et al.*, 2009 ; Tofoleanu et Buchete, 2012 ; Yip et McLaurin, 2001). En effet, les forces électrostatiques sont les principales forces mises en jeu lors de l'interaction des monomères à la membrane. De précédentes études ont suggéré que la présence de lipides anioniques accélérerait la formation des fibres contrairement aux lipides zwitterioniques qui la ralentirait (Sabaté *et al.*, 2005 ; Zhao *et al.*, 2004). Toutefois, les liaisons hydrogènes semblent aussi jouer un rôle important lors de l'interaction (Henry *et al.*, 2015).

La présence de métaux peut également influencer l'interaction des amyloïdes β avec les membranes cellulaires. En effet, des études ont montré que l'absence d'ions Zn²⁺ ou Cu²⁺ inhiberait l'insertion des amyloïdes β au sein de la membrane pour un pH compris entre 5,5 et 7,5 (Curtain *et al.*, 2003). De plus, la présence de métaux entrainerait un changement conformationnel du peptide en hélices α , ce qui favoriserait l'insertion de ce dernier dans la membrane.

D'autres études ont montré également que le changement conformationnel induit par la présence de métaux, diminuerait les perturbations au niveau de la membrane (Lau *et al.*, 2006).

1.1.7.3 Mécanismes de toxicité

L'ensemble de ces résultats démontrent donc l'implication des lipides et des métaux dans la toxicité des peptides A β . Dans la maladie d'Alzheimer, il semble maintenant admis que la mort des cellules neuronales est principalement apoptotique (voir encadré) (LaFerla *et al.*, 1995). En effet, des études *post mortem* faites sur des coupes de cerveaux provenant de patients atteints de la maladie, ont montré une sur-activation des caspases et la présence de produits de dégradation de ces dernières (Colurso *et al.*, 2003 ; Rohn *et al.*, 2001 ; Su *et al.*, 2001 ; Yang *et al.*, 1998). L'implication des peptides A β dans l'apoptose proviendrait de différents mécanismes suite à leur interaction avec les métaux et les membranes lipidiques. En effet, comme il l'a été montré précédemment, la coordination de ces derniers avec des métaux tels que le cuivre ou le fer favorise la production de ROS. Ces ROS peuvent entraîner l'oxydation de lipides et donc une perte de l'intégrité des membranes. Cela peut avoir pour conséquence un dysfonctionnement de certaines protéines telles que l'ATPase, mais également la création de pores conduisant à une perte de l'homéostasie de certains métaux tels que le calcium par exemple (Gella et Durany, 2009). L'augmentation du stress oxydatif suite à la production de ROS peut aussi entraîner un dérèglement au niveau des pompes à calcium membranaires conduisant à un afflux d'ions Ca²⁺ via les récepteurs ionotropiques du glutamate (NMDA et AMPA) par exemple (Mattson, 2001 ; Mattson et Chan, 2004).

De plus, la formation de pores dans la membrane par les oligomères A β peut également conduire à une dérégulation de l'homéostasie du calcium (Demuro *et al.*, 2011).

L'ion Ca²⁺ est un des messagers intracellulaires les plus importants dans le cerveau. Il intervient dans de nombreux mécanismes dont celui de l'apoptose. En effet, il a été montré que l'augmentation de la concentration en ions Ca²⁺ cytosolique peut conduire à l'activation de caspases ou d'autres facteurs d'induction apoptotiques, ainsi qu'à la libération du

Brièvement, l'apoptose est un mécanisme intracellulaire de destruction de la cellule, sans réaction inflammatoire contrairement à la nécrose. Elle se caractérise par une réorganisation nucléaire, des altérations de la membrane plasmique et d'une fragmentation de la cellule en corps apoptotiques. Le mécanisme apoptotique est déclenché suite à la réception de signaux extracellulaires (voie extrinsèque) ou intracellulaires (voie intrinsèque). Dans les deux cas, les caspases, localisées dans le cytosol et dans l'espace intermembranaire des mitochondries sous forme de procaspases, sont les principaux médiateurs de l'apoptose.

Au cours de la voie extrinsèque, l'activation des caspases se fait en réponse de la fixation de ligands spécifiques de type cytokines sur des récepteurs de mort (Fas, TNF, DR). Au cours de la voie intrinsèque, des pores se forment au niveau de la membrane mitochondriale suite à des interactions complexes entre des protéines de la famille Bcl-2 qui sont situées sur la face externe de la membrane. Cela a pour conséquence un gonflement de la matrice qui s'accompagne d'une augmentation du calcium cytosolique par fuite du calcium, d'une chute du potentiel transmembranaire de la mitochondrie, de l'arrêt de la phosphorylation oxydative et de la libération de molécules apoptogènes telles que le cytochrome *c* présent initialement dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Le relargage du cytochrome *c* au sein du cytoplasme conduit à l'activation d'une cascade de caspases.

cytochrome *c* présent dans les membranes mitochondriales (Berridge, 2010 ; Dickson, 2004 ; Magi *et al.*, 2016 ; Nakagawa et Yuan, 2000).

Egalement, il a été montré qu'une augmentation de la concentration en ions Ca^{2+} dans le cytosol peut entraîner l'activation de kinases telles que GSK3 (Glycogen synthase kinase 3) ou les MAP-kinases (Mitogen-activated protein kinases) (LaFerla, 2002 ; Takashima, 2006). Ces kinases sont des protéines responsables de la phosphorylation de la protéine tau. Ainsi, une sur-activation entraîne l'hyperphosphorylation de la protéine et donc, entraîne la mort des cellules neuronales. L'activation de kinases peut aussi conduire à l'activation de facteurs de transcription impliqués dans le processus d'apoptose tels que le p53 (Ohyagi *et al.*, 2005).

L'activation de l'oxyde nitrique synthase neuronale (nNOS) a également été observée suite à un excès d'ions Ca^{2+} au sein des mitochondries (Querfurth et LaFerla, 2010 ; Paul et Ekambaram, 2011). Cette enzyme est responsable de la production de radicaux NO^{\cdot} qui après réaction avec $\text{O}_2^{\cdot-}$ forment l'anion peroxydite ONOO^{\cdot} , anion impliqué dans la cascade réactionnelle conduisant à la mort neuronale par apoptose ou nécrose.

Il a aussi été remarqué chez les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer, une augmentation des phénomènes inflammatoires qui accentue le stress oxydant et donc la toxicité générale (McAlpine et Tansey, 2008 ; Meraz-Rios *et al.*, 2013 ; Rubio-Perz et Morillas-Ruiz, 2012 ; Wang *et al.*, 2015). En effet, une augmentation des protéines pro-inflammatoires telles que les protéines appartenant au complément, les cytokines, les chemokines ou les cyclooxygénases ont été observées au niveau du cerveau de patients atteints de la maladie. L'augmentation de ces dernières serait due à l'activation des microglies et des astrocytes par les peptides $\text{A}\beta$. L'augmentation des processus inflammatoires est liée à la sécrétion de ROS (Querfurth et LaFerla, 2010 ; Wang *et al.*, 2004).

Néanmoins, malgré de nombreuses évidences témoignant du rôle que joue le peptide $\text{A}\beta$ dans les processus oxydatifs, de récentes études ont montré que ce dernier aurait à l'origine un rôle protecteur. En effet, $\text{A}\beta$ est une métalloenzyme. Il serait donc synthétisé en réponse à la présence de métaux libres afin de réduire le stress oxydant en catalysant la transformation des ions superoxydes $\text{O}_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 , pris en charge à son tour par d'autres systèmes de dégradation (Baruch-Suchodolsky et Fischer, 2009 ; Smith *et al.*, 2007).

Par exemple, des études ont montré qu'une suppression excessive d' $\text{A}\beta$ est nocive pour les cellules. De même, Kontush a montré qu'à des concentrations physiologiques, $\text{A}\beta_{40}$ et $\text{A}\beta_{42}$ protègent les lipoprotéines présentes dans le liquide céphalorachidien et dans le plasma de l'oxydation (2001). Zou *et al.* ont également montré que le peptide $\text{A}\beta_{40}$ sous forme monomérique inhibe la réduction de Fe(III) et donc la production d'ions superoxydes $\text{O}_2^{\cdot-}$ (2002).

Cependant, l'augmentation du stress oxydant avec l'âge, l'augmentation de la production des peptides $\text{A}\beta$ et la dérégulation de l'homéostasie des métaux viendraient compromettre sa fonction protectrice.

1.1.8 Approches thérapeutiques

A l'heure actuelle, il n'existe malheureusement aucun traitement curatif contre la maladie d'Alzheimer. En effet, les traitements couramment utilisés ne traitent seulement que les symptômes de la maladie. Parmi ceux-ci, sont retrouvés des inhibiteurs des cholinestérases et des antagonistes des récepteurs NMDA (N-Méthyl-D-Aspartate) en supplément de l'utilisation de neuroleptiques et d'antidépresseurs. Ces derniers ont pour but de lutter contre les troubles comportementaux. Des anti-inflammatoires non stéroïdiens ou des antioxydants peuvent être également prescrits (Feng et Wang, 2012 ; Wang *et al.*, 2015)

Néanmoins, depuis quelques années, suite aux avancées faites sur les mécanismes biologiques de la maladie d'Alzheimer, les recherches se portent sur des traitements qui cibleraient les responsables de la neurodégénération tels que le peptide A β ou la protéine tau (Wolfe, 2002 ; Godyn *et al.*, 2016).

1.1.8.1 Les traitements symptomatiques

○ Les inhibiteurs des cholinestérases

La maladie d'Alzheimer se caractérise par un important déficit d'acétylcholine ; neurotransmetteur impliqué dans la mémorisation et dans l'attention. Le but de la stratégie ici est donc d'éviter la dégradation de ce dernier. Pour ce faire, un des moyens est de réduire l'activité de l'enzyme responsable de sa dégradation qui est la cholinestérase.

Sur ce principe, la tacrine (Cognex®) a été une des premières molécules mises sur le marché. Cependant, en raison de ses nombreux effets secondaires, elle a été très rapidement remplacée en faveur d'inhibiteurs de seconde génération tels que le donepzil (Aricept®), la galantamine (Reminyl®) et la rivastigmine (Exelon®) (Birks, 2006 ; Lanctôt *et al.*, 2009 ; Tumiatti *et al.*, 2010).

○ Les antagonistes des récepteurs NMDA

Les récepteurs NMDA sont des récepteurs ionotropiques du glutamate. Ils permettent l'entrée des ions Ca²⁺ dans la cellule via des canaux ioniques qui leur sont associés. Au cours de la maladie d'Alzheimer, une hyper-activation de ces derniers a pu être observée, accompagnée d'une augmentation de la concentration intracellulaire en ions Ca²⁺. Un taux élevé de Ca²⁺ intracellulaire a de nombreuses conséquences telles que l'augmentation du stress oxydatif, l'activation de kinases impliquées dans la phosphorylation de la protéine tau ou l'activation de kinases et caspases impliquées dans le processus d'apoptose de la cellule conduisant alors à la perte de neurones.

Le but de la stratégie ici a donc été de développer des antagonistes des récepteurs NMDA afin de bloquer l'influx de Ca²⁺ dans la cellule induit par le glutamate. Un exemple est la mémantine (Namenda®). Il s'agit d'un antagoniste non compétitif du récepteur NMDA permettant d'inhiber

l'influx prolongé d'ions Ca^{2+} dans la cellule. Cependant, sa faible affinité envers ces récepteurs permet de ne pas altérer la fonction physiologique de ces derniers (Lanctôt *et al.*, 2009 ; Robinson et Keating, 2006 ; Tariot *et al.*, 2004).

1.1.8.2 Les traitements ciblant les causes de la maladie d'Alzheimer

○ Traitements dirigés contre $\text{A}\beta$

Les recherches menées dans le cadre du développement d'un traitement dirigé contre $\text{A}\beta$ portent sur différents axes. En effet, certains ont pour but de diminuer la production et/ou l'agrégation des peptides $\text{A}\beta$, alors que d'autres ont pour but d'augmenter leur dégradation ou de diminuer les effets toxiques.

➤ Les inhibiteurs des sécrétases

Les peptides $\text{A}\beta$ sont issus du clivage de la protéine APP par les enzymes β - et γ -sécrétases. Ainsi, trouver des inhibiteurs de ces dernières a été un des premiers axes dans la recherche d'un nouveau traitement contre la maladie d'Alzheimer (De Strooper *et al.*, 2010 ; Golde *et al.*, 2013 ; Vassar, 2014 ; Yan et Vassar, 2014).

Cependant, de nombreux obstacles ont été très rapidement rencontrés. Dans le cas de la γ -sécrétase par exemple qui est composée de plusieurs sous unités protéiques, développer une molécule qui agit uniquement sur sa fonction de clivage de la protéine APP et pas sur ses autres fonctions physiologiques s'est rapidement avérée problématique (De Strooper, 2003 ; De Strooper *et al.*, 1999).

Dans le cas de la β -sécrétase, les recherches se montrent plus prometteuses puisque même si cette enzyme est impliquée dans le métabolisme d'autres protéines, de précédentes études menées sur des souris ont montré qu'en absence d'activité de la β -sécrétase, les souris conservaient tout de même un phénotype normal (Luo *et al.*, 2001). Néanmoins, le développement de nouveaux traitements basés sur ce principe est limité. En effet, la plupart des inhibiteurs de la β -sécrétase sont des composés peptidomimétiques facilement hydrolysables et qui ne peuvent pas passer la barrière hémato-encéphalique en raison de leur taille (Citron, 2004).

Des études se sont alors également portées sur l'augmentation de l'activité de l' α -sécrétase ; enzyme impliquée dans la voie non amyloïdogénique. Des résultats prometteurs ont été obtenus avec la bryostamine (Etcheberrigaray *et al.*, 2004).

Toutefois, bien que les inhibiteurs de sécrétases soient des stratégies thérapeutiques intéressantes, ils ne permettent pas de réduire le nombre de plaques mais seulement de le stabiliser puisque la production des peptides $\text{A}\beta$ est bien antérieure à la détection de la maladie (Jankowsky *et al.*, 2005).

➤ Activateurs des enzymes de dégradation du peptide A β

Une autre approche visant à diminuer la quantité de peptides A β est d'activer les enzymes responsables de sa dégradation. Les principales impliquées dans le catabolisme du peptide A β sont la néprilysine (NEP), l'enzyme de dégradation de l'insuline (IDE) et l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) (Carson et Turner, 2002). Cependant, à l'heure actuelle, peu de molécules ont été développées car il est très difficile de trouver un activateur qui est métaboliquement stable, spécifique de l'enzyme visée et qui n'interfère pas avec ses autres fonctions (Checler, 1993 ; Song *et al.*, 2003 ; Pardossi-Piquard *et al.*, 2005).

➤ Immunothérapie

L'immunothérapie est une méthode visant également à diminuer la quantité de peptides A β . Son principe repose soit sur la stimulation du système immunitaire par administration du peptide A β (immunothérapie active), soit sur l'administration d'anticorps anti-A β visant à activer la dégradation de ces derniers (immunothérapie passive) (Lannfelt *et al.*, 2014 ; Wisniewski et Goni, 2014).

Depuis l'observation faite par Schenk, D. témoignant que l'injection du peptide A β 42 était capable d'induire une réponse immunitaire et d'avoir une action préventive et curative (Schenk *et al.*, 1999, 2004), de nombreux essais cliniques ont été menés (Panza *et al.*, 2014a, 2014b). De récents travaux évoquent une nouvelle piste d'immunothérapie consistant à amplifier une population particulière de lymphocytes T qui régulent les mécanismes immunitaires et neuroinflammatoires se développant au cours de la maladie d'Alzheimer (Dansokho *et al.*, 2016). D'autres études se portent également sur le développement d'anticorps ciblant particulièrement les oligomères en raison de leur toxicité (Hefti *et al.*, 2013).

➤ Inhibiteurs de l'agrégation fibrillaire des peptides A β

Différentes stratégies existent afin de lutter contre l'agrégation fibrillaire des peptides A β . La première porte sur l'utilisation d'antiagrégants. Un candidat potentiel est le tamiprosate (Alzhemed®). Il a pour rôle d'entrer en compétition avec des éléments moléculaires environnementaux qui favorisent l'agrégation. Dans ce cas précis, il s'agit des glycosaminoglycanes (Aisen *et al.*, 2007 ; Gervais *et al.*, 2006).

L'autre stratégie porte sur l'utilisation de chélateurs de métaux puisque de précédentes études ont montré que la présence de certains métaux tels que le zinc ou le cuivre pouvait favoriser l'agrégation des peptides A β (Hane *et al.*, 2014). Un candidat potentiel est le PTB-2 (Bush et Tanzi, 2008 ; Adlard *et al.*, 2008 ; Kenche et Barnham, 2011). Il est le successeur du chélateur clioquinol qui a dû être interrompu suite à la présence d'un groupement iode (Regland *et al.*, 2001).

○ Traitements dirigés contre tau

Les recherches menées dans le cadre du développement d'un traitement dirigé contre tau portent principalement sur l'état de phosphorylation de la protéine et sur son agrégation.

➤ Inhibiteurs de kinases

Les kinases sont des enzymes impliquées dans la phosphorylation des protéines. Ainsi, de nombreuses recherches tentent de découvrir des inhibiteurs de ces dernières afin de réduire la phosphorylation de la protéine tau (Bhat *et al.*, 2004 ; Le Corre *et al.*, 2006 ; Tsai *et al.*, 2004).

➤ Activateurs de phosphatases

Une autre approche pour réguler la phosphorylation de la protéine tau est de suractiver les phosphatases ; enzymes impliquées dans la déphosphorylation de la protéine tau (Iqbal et Grundke-Iqbal, 2004).

➤ Inhibiteurs de l'agrégation de la protéine tau

Afin de lutter contre l'agrégation de la protéine tau, des recherches se portent sur la découverte d'antiagrégants (Necula *et al.*, 2005 ; Pickhardt *et al.*, 2005).

➤ Immunothérapie

Des chercheurs essayent de mettre au point un vaccin contre la protéine tau pathologique (Gu et Sigurdsson, 2011 ; Novak, 2009).

En conclusion, de grands efforts sont faits afin d'identifier un traitement capable de guérir la maladie d'Alzheimer. En effet, même si aucun traitement n'a encore réussi à passer toutes les phases cliniques, de nombreuses approches sont prometteuses donnant ainsi l'espoir que la guérison de cette maladie n'est pas hors de portée des progrès de la médecine (<https://clinicaltrials.gov/>).

1.1.9 Les biomarqueurs : Nouveaux outils pour diagnostiquer la maladie d'Alzheimer ?

Les progrès réalisés dans la compréhension des mécanismes se déroulant au cours de la maladie d'Alzheimer ont permis d'identifier des marqueurs biologiques de la pathologie. Un marqueur biologique ou biomarqueur est par définition « une caractéristique qui est objectivement mesurée et évaluée comme un indicateur des processus biologiques normaux ou pathologiques ou de réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique ».

Comme il l'a déjà été mentionné précédemment, à l'heure actuelle, le diagnostic de la maladie d'Alzheimer ne se fait que sur des critères cliniques ; la mise en évidence des lésions cérébrales ne pouvant être faite que post-mortem. Ainsi, l'utilisation de biomarqueurs apparaît comme une nouvelle avancée dans le diagnostic de la maladie.

Pour pouvoir être appliqué à la pratique clinique, un biomarqueur doit être fiable, sensible et spécifique (au-delà de 80%), reproductible et provenant d'un geste facile, peu invasif et peu coûteux (Consensus report of the working group on « molecular and biochemical markers of Alzheimer's disease », 1998 ; Humpel, 2011).

Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, il existe deux types de biomarqueurs : les marqueurs d'imagerie qui ne seront pas détaillés ici, et les marqueurs des biofluides avec notamment le liquide céphalorachidien (LCR) (Koric *et al.*, 2011). Le liquide céphalorachidien est le fluide biologique le plus utilisé dans le diagnostic des maladies neurodégénératives en raison de son contact direct avec le cerveau. Ainsi, les modifications s'opérant au sein de ce dernier, se répercutent directement au sein du LCR. Cependant, la méthode de collecte du LCR est un tant soit peu invasive puisqu'elle nécessite de réaliser une ponction lombaire. Depuis quelques années, de nombreuses recherches se portent donc sur l'identification de biomarqueurs au sein du sang ou du plasma, sachant qu'une altération de la barrière hémato-encéphalique est observée chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer et que 500 ml de LCR passent chaque jour dans la circulation sanguine d'une personne adulte (Thambisetty et Lovestone, 2010 ; Henriksen *et al.*, 2013 ; Hye *et al.*, 2006 ; Song *et al.*, 2009 ; Soares *et al.*, 2012 ; van Oijen *et al.*, 2006). Toutefois, la concentration des différents composants est plus faible dans le sang et la corrélation entre les changements observés et la maladie d'Alzheimer est plus incertaine.

Les biomarqueurs les plus étudiés dans le cas de la maladie d'Alzheimer sont le peptide A β 42, la protéine tau et sa forme hyperphosphorylée (Zetterberg et Blennow, 2013). L'évaluation de ces biomarqueurs est couramment faite par dosage biochimique de type ELISA (de l'anglais enzyme-linked immunosorbent assay) (Bull World Health Organ, 1976). Cependant, avec les avancées dans la génomique et la protéomique, de nouveaux biomarqueurs ont été identifiés tels que les micro-ARN et des marqueurs du stress oxydant (Sharma et Singh, 2016).

○ Le peptide A β 42

Comparativement à la concentration retrouvée chez une personne saine, une diminution significative de la concentration du peptide A β 42 peut être observée au sein du LCR d'une personne atteinte de la maladie d'Alzheimer. L'hypothèse la plus couramment avancée pour expliquer cette baisse est la séquestration du peptide au sein des plaques, empêchant son passage dans le LCR. La sensibilité moyenne de ce marqueur pour la maladie d'Alzheimer a été estimée à 86% et la spécificité à 89% (Blennow, 2004).

○ **La protéine Tau**

Comparativement à la concentration retrouvée chez une personne saine, une augmentation significative de la concentration de la protéine tau peut être observée au sein du LCR d'une personne atteinte de la maladie d'Alzheimer. Cette augmentation témoigne de la dégénérescence des cellules neuronales. En effet, tau est une protéine impliquée dans la polymérisation et la stabilisation des microtubules. Ainsi, la destruction des cellules neuronales entraîne la libération de cette dernière dans l'espace extracellulaire. De récentes études ont montré que la concentration de la protéine tau dans le LCR peut être corrélée à l'évolutivité du déclin cognitif (Blennow et Hampel, 2003). La sensibilité moyenne de ce marqueur pour la maladie d'Alzheimer a été estimée à 86% et la spécificité à 91% (Blennow, 2004). Cependant, il est important de noter que pour utiliser ce biomarqueur à des fins diagnostiques, l'âge du patient doit être considéré (Bürger née Buch *et al.*, 1999 ; Sjögren *et al.*, 2001).

○ **La protéine tau phosphorylée (phospho-tau)**

La fraction phosphorylée de la protéine tau se retrouve également augmentée dans le LCR d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer comparé à une personne saine. De nombreux sites de phosphorylation sont présents sur la protéine tau. Ainsi, différents tests ELISA ont été développés pour détecter les différentes positions phosphorylées. Les plus étudiées sont les protéines phospho-tau-181, -199, -231, -235, -396 et -404. Quelles que soient celles qui sont étudiées, toutes présentent une augmentation dans le LCR des patients atteints de la maladie d'Alzheimer. La sensibilité moyenne de ce marqueur pour la maladie d'Alzheimer a été estimée à 81% et la spécificité à 91% (Blennow, 2004).

En conclusion, chaque biomarqueur pris séparément est capable d'apporter son aide dans le diagnostic de la maladie d'Alzheimer. Cependant, la combinaison de deux ou trois biomarqueurs permet d'augmenter la sensibilité et la spécificité à des valeurs supérieures à 90% (Blennow, 2004). Également, de récentes études ont montré que la combinaison de ces biomarqueurs pourrait différencier le stade précoce de la maladie d'Alzheimer du stade avancé avec une sensibilité allant de 83 à 87% et une spécificité allant de 72 à 96% (Andreasen et Blennow, 2005 ; Hansson *et al.*, 2006, Mattsson *et al.*, 2009). La découverte d'autres biomarqueurs tels que le peptide A β 40 pourrait améliorer la précision du diagnostic entre les différents stades de la maladie (Hansson *et al.*, 2007 ; Shoji, 2002). Toutefois, il semblerait que l'utilisation de ces biomarqueurs à des fins diagnostiques ait un plus grand intérêt pour la forme précoce de la maladie d'Alzheimer, c'est-à-dire pour les patients dont la maladie a commencé avant l'âge de 65 ans. En effet, des études ont montré que les valeurs seuils pour les différents biomarqueurs seraient mieux définies chez les patients plus jeunes par rapport à ceux plus âgés, où les valeurs semblent se recouper (Bouwman *et al.*, 2009). Les hypothèses avancées sont l'aspect multifactoriel des démences du patient âgé et la présence

fréquente de lésions de la maladie d'Alzheimer chez des patients qui à leur décès, étaient encore cognitivement intacts. Ces données contribuent donc à poursuivre les recherches afin d'identifier de nouveaux biomarqueurs.

Conclusion :

La maladie d'Alzheimer est une des maladies neurodégénératives les plus répandues dans le monde et est la cause principale de démence. Elle se caractérise par la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires et de plaques séniles. Les enchevêtrements neurofibrillaires sont dus à l'agrégation de la protéine tau alors que les plaques séniles sont dues à l'agrégation de peptides A β .

Une des hypothèses permettant d'expliquer la maladie est la cascade amyloïde qui fait intervenir l'accumulation des peptides A β en premier lieu. De nombreux mécanismes y sont mis en jeu impliquant les métaux ou les lipides par exemple qui influenceraient l'augmentation du stress oxydant. Les phénomènes inflammatoires semblent également jouer un rôle important. Toutefois, de nombreuses zones d'ombre sont encore présentes.

A l'heure actuelle, aucun traitement curatif n'existe. Cependant, la compréhension des mécanismes mis en jeu dans la maladie d'Alzheimer ouvre de nouvelles perspectives dans le développement de nouveaux traitements.

1.2 La maladie à corps de Lewy

1.2.1 Impacts sociaux économiques

La maladie à corps de Lewy (MCL) ou démence à corps de Lewy est la seconde cause de démence après la maladie d'Alzheimer. Elle représente 15 à 25% des cas de démence et touche principalement les personnes âgées de plus de 70 ans. Pourtant, cette maladie est encore souvent inconnue du grand public.

1.2.2 Historique

Durant plusieurs années, les signes histopathologiques de la maladie à corps de Lewy ont été assimilés à ceux de la maladie de Parkinson. En effet, en 1912, Friedrich Lewy ; un collègue d'Alois Alzheimer met pour la première fois en évidence la présence d'inclusions cellulaires intra cytoplasmiques au niveau de la substance noire du cerveau de patients atteints de la maladie de Parkinson (région participant au contrôle moteur) (Figure 1.22). Le nom de « corps de Lewy » est donné à ces inclusions en 1919 par Konstantin Tretiakoff (Holdorff *et al.*, 2013). En 1923, Friedrich Lewy rédige un rapport mentionnant que 54/70 cas étudiés atteints de la maladie de Parkinson présentent des aliénations mentales mais sans mentionner un lien avec les inclusions cellulaires. En 1933, un rapport rédigé par Brain mentionne que la maladie de Parkinson ne s'associe pas nécessairement avec un déclin cognitif. En 1961, Okasaki et ses collègues décrivent la présence de corps de Lewy au sein du cortex cérébral de deux patients qui ne peuvent être dissociés de l'état de démence des patients contrairement à la maladie de Parkinson. Il s'agit de la première description de la maladie à corps de Lewy. Cependant, il faudra attendre les années 80 pour que les rapports portant sur les corps de Lewy avec atteinte corticale n'augmentent suite au développement de nouvelles méthodes de coloration permettant de mieux mettre en évidence ces derniers (Holdorff, 2002). De nombreux termes sont alors utilisés pour décrire le déclin cognitif engendré par les corps de Lewy mais en 1995 au cours d'un consortium, le terme de « démence à corps de Lewy » est choisi et les critères diagnostiques y sont précisés.

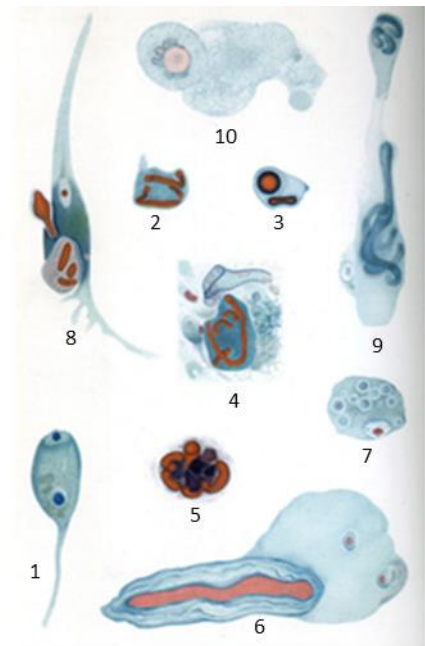


Figure 1.22 : Corps de Lewy : inclusions intracellulaires éosinophiles. 1-6 : cellules du noyau dorsal du nerf vague. 7-10 : cellules du noyau paraventriculaire et de la substantia innomiata. Coloration de Mann (1-6+8) et coloration de mallory (7+9-10). Image extraite de Lewy, 1912. (Holdorff *et al.*, 2013).

1.2.3. Diagnostic

La maladie à corps de Lewy est une pathologie dégénérative qui entraîne le déclin progressif des fonctions cognitives. Elle se caractérise principalement par des troubles de la mémoire, du comportement, de l'orientation et des hallucinations visuelles récidivantes. S'y ajoute également un syndrome parkinsonien avec des troubles moteurs. Cependant, ces symptômes fluctuent énormément d'un jour à l'autre. Comme pour la maladie d'Alzheimer, une phase prodromale correspondant à un stade intermédiaire entre les fonctions cognitives normales et la démence peut être définie.

A l'heure actuelle, la plupart des diagnostics se basent sur l'évaluation de ces signes cliniques et sur des tests neuropsychologiques (McKeith *et al.*, 2005). Des techniques d'imagerie peuvent être également utilisées (Kondo *et al.*, 2016 ; Tateno *et al.*, 2009). Cependant, la fluctuation des symptômes ainsi que leur variété (troubles cognitifs, psychiatriques et neurologiques) rendent difficile le diagnostic. De plus, le recoupement des symptômes avec la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson ne facilite pas sa distinction clinique.

Seule la mise en évidence post mortem des corps de Lewy permet d'établir un diagnostic certain.

1.2.4. Les lésions cérébrales

La maladie à corps de Lewy se caractérise principalement par la présence de corps d'inclusion qui correspondent à des agrégats intracellulaires de protéines organisées en fibres amyloïdes. Le constituant majoritaire de ces derniers est l' α -synucléine. Selon la forme et la localisation des corps d'inclusions, deux types peuvent être identifiés : les corps de Lewy et les neurites de Lewy (Gómez-Tortosa *et al.*, 2000).

Les corps de Lewy correspondent à des agrégats d'apparence sphérique principalement localisés dans le péricaryon des neurones. Deux types peuvent être différenciés : les corps de Lewy classiques situés dans le tronc cérébral et les corps de Lewy corticaux situés dans le néocortex. Les premiers se composent d'un cœur dense très éosinophile entouré d'un halo alors que les seconds ne présentent pas d'halo et leur contour est moins bien défini.

Les neurites de Lewy quant à eux sont d'apparence filiforme et se retrouvent principalement au niveau des axones (Figure 1.23).

Ces lésions ne sont pas spécifiques à la maladie à corps de Lewy. Elles peuvent être observées dans d'autres maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson, l'atrophie multi-

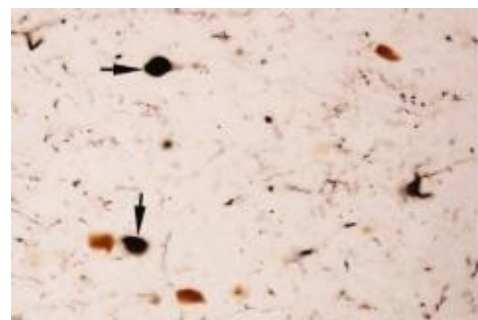


Figure 1.23 : Microphotographie des corps de Lewy et des neurites de Lewy obtenue par immunomarquage de l' α -synucléine (Olanow et Brundin, 2013).

systématisée et la dysautonomie pure. Ces maladies sont regroupées sous le terme de « synucléinopathies ».

Egalement, outre la présence de corps d'inclusions, des plaques amyloïdes similaires à celles de la maladie d'Alzheimer peuvent être retrouvées au sein du cerveau, ainsi que parfois, des enchevêtrements neurofibrillaires.

1.2.5 L'agrégation de l' α -synucléine, un facteur clé dans le développement de la maladie

Bien que la cause exacte de la maladie à corps de Lewy est encore inconnue, plusieurs études tendent à montrer que l'agrégation de l' α -synucléine joue un rôle clé dans le développement de la maladie ainsi que dans les troubles qui lui sont associés. En effet, des mutations au niveau du gène *SNCA* ont été identifiées comme étant la cause des formes héréditaires de la maladie à corps de Lewy ou de la maladie de Parkinson (Kim *et al.*, 2014). Ces mutations entraîneraient une augmentation de l'expression de la protéine ou favoriseraient son agrégation. Cependant, quelle est la place des plaques amyloïdes dans le développement de la maladie ? Le lien entre les corps de Lewy et les plaques amyloïdes n'a pas encore été identifié. Toutefois de récentes études suggèrent que les peptides A β favoriseraient l'agrégation de l' α -synucléine (Deramecourt *et al.*, 2006 ; Obi *et al.*, 2008 ; Pletnikova *et al.*, 2005).

1.2.6 De l' α -synucléine aux corps d'inclusion

1.2.6.1 L' α -synucléine

L' α -synucléine est une protéine ubiquitaire codée par le gène *SNCA* situé sur le chromosome 4. Elle se compose de 140 acides aminés et peut être divisée en trois régions :

- Une partie N-terminale amphiphile (1-60) qui comporte des répétitions imparfaites d'une séquence de 11 acides aminés ; chacune de ces régions contenant un motif Lys-Thr-Lys-Glu-Gly-Val propice à la formation d'hélice α (Davidson *et al.*, 1998).
- Une partie centrale hydrophobe (61-95) qui contient également des répétitions de 11 acides aminés contenant le même motif que précédemment. Cette région est importante dans le phénomène d'agrégation et est souvent dénommée NAC (de l'anglais Non Amyloid Component).
- Une partie C-terminale (96-140) riche en résidus acides et en prolines.

A l'état physiologique, l' α -synucléine adopte une structure désordonnée soluble lui permettant d'interagir avec de nombreuses molécules suite à sa flexibilité conformationnelle. En effet, il a été trouvé que cette dernière serait impliquée dans le trafic vésiculaire des synapses, de l'appareil de Golgi ou du réticulum endoplasmique, dans le métabolisme de la dopamine et dans les mécanismes de protection des cellules (Bendor *et al.*, 2013). Cependant, l'ensemble de ses fonctions physiologiques reste encore peu connu.

En fonction de l'environnement dans laquelle elle se trouve, l' α -synucléine est capable de former des hélices α ou des feuillets β (Davidson *et al.*, 1998 ; Uversky, 2007).

1.2.6.2 Chemin d'agrégation de l' α -synucléine

Le processus d'agrégation de l' α -synucléine est similaire à celui des amyloïdes. En effet, suite à un changement conformationnel passant d'une structure désordonnée ou hélicoïdale à une structure en feuillets β , les protéines α -synucléine s'associent entre elles pour former des dimères, puis des oligomères et des fibres. La région impliquée dans les feuillets β est la région NAC (Chen *et al.*, 2007 ; Giasson *et al.*, 2001 ; Miake *et al.*, 2002 ; Rodriguez *et al.*, 2015, Serpell *et al.*, 2000). La formation des fibres amyloïdes se fait selon un mécanisme de croissance par nucléation (pour plus de détails, se référer au paragraphe 1.1.6.3) (Wood *et al.*, 1999).

Des modifications post-traductionnelles influençant l'oligomérisation ont été remarquées sur les protéines α -synucléine telles qu'une troncature de la partie C-terminale ou la phosphorylation des serines en position 129 et 87. La concentration en protéines, le pH, la nitration ou la présence d'ions métalliques par exemple peuvent également jouer sur l'oligomérisation. (Uversky, 2007).

1.2.7 Toxicité de l' α -synucléine

Comme dans le cas de la maladie d'Alzheimer, les fibres ne seraient pas les formes les plus toxiques mais ce seraient les oligomères malgré que les mécanismes de toxicité ne soient pas encore très bien connus. Comme pour les autres oligomères amyloïdes, ils adoptent une structure en feuillets β antiparallèles (Celej *et al.*, 2012). Différentes pistes pour expliquer la cytotoxicité sont suggérées dont la plupart semblent montrer une altération des mécanismes dans lesquels la protéine est impliquée suite à son changement conformationnel. Par exemple, les oligomères forment des pores au sein des membranes plasmiques, entraînant un afflux de calcium au sein des cellules et donc leur mort via le déclenchement du processus apoptotique (Danzer *et al.*, 2007 ; Hashimoto *et al.*, 2003). La présence de radeaux lipidiques favoriserait l'interaction des oligomères d' α -synucléine avec la membrane (Fortin *et al.*, 2004). Egalement, les oligomères interfèrent dans la transmission synaptique en altérant l'exocytose et la libération des neurotransmetteurs (Nemani *et al.*, 2010 ; Scott *et al.*, 2010). De la même manière, ils bloquent le trafic vésiculaire de l'appareil de Golgi et du

réticulum endoplasmique (Thayanidhi *et al.*, 2010). Une diminution de l'activité du complexe I, protéine de la chaîne respiratoire est également observée conduisant à une augmentation du stress oxydant (Hsu *et al.*, 2000). De plus, l'oligomérisation de l' α -synucléine altérerait le protéasome et le lysosome ; systèmes de dégradation. En effet, dans des conditions pathologiques, l' α -synucléine est poly-ubiquitinée. L'ubiquitination d'une protéine dans des conditions physiologiques, a pour rôle de marquer les protéines qui doivent être dégradées par le protéasome. Cependant ici, l' α -synucléine se lie avec le protéasome, ce qui conduit à la formation de fragments tronqués propices à l'agrégation suite à une dégradation incomplète (Lee *et al.*, 2008 ; Nonaka *et al.*, 2005). Dans le cas des lysosomes, les oligomères altéreraient leur membrane, affectant ainsi leurs fonctions (Cuervo *et al.*, 2004).

De récentes études ont montré que l' α -synucléine extracellulaire jouerait également un rôle dans les processus de toxicité. En effet, il a été montré que les oligomères toxiques peuvent être éliminés de la cellule par exocytose entraînant une augmentation des processus inflammatoires mais ils peuvent être également transférés à d'autres cellules par endocytose (Lee *et al.*, 2014 ; Marques et Outeiro, 2012).

1.2.8 Approches thérapeutiques

A l'heure actuelle, il n'existe malheureusement aucun traitement curatif contre la maladie à corps de Lewy mais seulement des traitements symptomatiques. Effectivement, les principaux traitements administrés aux patients sont des inhibiteurs des cholinestérasés pour réduire les troubles cognitifs, des antidépresseurs pour lutter contre les troubles psychiatriques et des agents dopaminergiques pour lutter contre les troubles moteurs (Zupancic *et al.*, 2011). Cependant, ces traitements peuvent avoir des effets secondaires importants puisque les inhibiteurs des cholinestérasés peuvent par exemple aggraver les troubles parkinsoniens et les agents dopaminergiques peuvent aggraver les symptômes psychiatriques à forte dose.

Néanmoins, depuis plusieurs années, les recherches se portent sur des molécules permettant de diminuer la production ou l'agrégation de l' α -synucléine (Crews *et al.*, 2009 ; Lindström *et al.*, 2013 ; Zang *et al.*, 2015).

1.2.9 Les biomarqueurs de la maladie à corps de Lewy, une approche nouvelle dans le diagnostic différentiel

La maladie à corps de Lewy est une maladie neurodégénérative qui présente des symptômes communs à la maladie d'Alzheimer et à la maladie de Parkinson. Un diagnostic différentiel entre ces maladies est donc difficile et notamment au stade prodromal où le recoupement des symptômes

est accentué. L'identification de biomarqueurs de ces maladies apparaît donc comme une nouvelle perspective dans l'aide au diagnostic.

Les principaux biomarqueurs étudiés sont les peptides A β 40 et 42, la protéine tau, la protéine tau hyperphosphorylée et l' α -synucléine.

○ Les peptides A β 40 et 42

Comparativement à la concentration retrouvée chez une personne saine, une diminution significative de la concentration du peptide A β 42 peut être observée au sein du LCR d'une personne atteinte de la maladie à corps de Lewy (MCL), comme c'était le cas pour la maladie d'Alzheimer (MA). Cependant, au stade prodromal, les patients MCL ne présentent pas de diminution d'A β 42 contrairement aux patients MA (Bousiges *et al.*, 2016 ; Kanemaru *et al.*, 2000). Concernant les patients atteints de la maladie de Parkinson, ils présentent une concentration du peptide plus élevée que les patients MCL et MA (Andersson *et al.*, 2011).

Egalement, par rapport à des patients contrôles, une diminution de la concentration en A β 40 est observée chez les patients MCL contrairement aux patients MA où la valeur reste stable. Par contre, au stade prodromal, les patients MCL ne présentent pas de diminution d'A β 40 contrairement aux patients MA où la quantité est augmentée.

Le ratio A β 42/A β 40 reste donc inchangé au cours de la maladie à corps de Lewy contrairement à la maladie d'Alzheimer où il est diminué (Bousiges *et al.*, 2016).

○ La protéine tau

Comparativement à la concentration retrouvée chez une personne saine, aucune variation significative ne peut être observée pour la protéine tau contrairement à la maladie d'Alzheimer où une augmentation est observée (Bousiges *et al.*, 2016 ; Kanemaru *et al.*, 2000). Concernant les patients atteints de la maladie de Parkinson, il semblerait qu'ils présentent une concentration de la protéine encore plus faible que les patients MCL (Mollenhauer *et al.*, 2005 ; Parnetti *et al.*, 2008)

○ La protéine tau phosphorylée

De la même manière que la protéine tau, aucune variation n'est observée chez les patients MCL contrairement aux patients MA où une augmentation est observée (Bousiges *et al.*, 2016 ; Parnetti *et al.*, 2008). Concernant les patients atteints de la maladie de Parkinson, il semblerait qu'ils présentent une concentration de la protéine encore plus faible que les patients MCL (Andersson *et al.*, 2011).

○ L' α -synucléine

Les résultats pour l' α -synucléine sont très controversés dans la littérature. En effet, certaines études montrent une diminution de sa concentration au sein du LCR des patients MCL alors que d'autres suggèrent une augmentation (Kapaki *et al.*, 2013, Kasuga *et al.*, 2010). De même, concernant l'utilisation de ce biomarqueur dans le diagnostic différentiel entre la maladie à corps de Lewy et la maladie d'Alzheimer (Kasuga *et al.*, 2010 ; Noguchi-Shinohara *et al.*, 2009 ; Reesink *et al.*, 2010 ; Tateno *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2015). Par contre, il semble établi que ce biomarqueur ne peut pas être utilisé dans le diagnostic différentiel avec la maladie de Parkinson (Mollenhauer *et al.*, 2008 ; Tateno *et al.*, 2012).

En résumé, les patients atteints de la maladie à corps de Lewy présentent un profil différent par rapport à la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson puisqu'au stade prodromal, aucun profil pathologique ne peut être observé et au stade démence, seule une diminution de la quantité d'A β 42 apparaît (Tableau 1.3). L'utilisation des biomarqueurs apparaît donc comme un nouvel outil d'aide au diagnostic différentiel. Néanmoins, selon les études, des variations peuvent être observées. Les raisons envisagées pour expliquer ces variations sont des contaminations par le sang des échantillons, la sélection des sujets ou des modifications au niveau de la méthode et en particulier sur le choix des anticorps (test ELISA).

Pathologie Biomarqueur	Maladie à corps de Lewy		Maladie d'Alzheimer		Maladie de Parkinson
	MCI	Démence	MCI	Démence	
A β 42	↔	↘	↘	↘	↘ ↔
A β 40	↔	↘	↗	↔	-
Tau	↔	↔	↗	↗	↘ ↔
Phospho-tau	↔	↔	↗	↗	↘ ↔
α -synucléine	-	↘	-	↘ ↔	↘

Tableau 1.3 : Comparaison des principaux biomarqueurs présents au sein du liquide céphalorachidien entre la maladie à corps de Lewy, la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson.

↔ Niveau normal par rapport à des patients contrôles ; ↗ Augmentation ; ↘ Diminution ;
↘↔ Faible diminution

Conclusion :

La maladie à corps de Lewy est la deuxième cause de démence dans le monde. Elle se caractérise principalement par la formation de corps de Lewy. Le constituant majoritaire de ces derniers est l' α -synucléine.

Il s'agit d'une maladie très difficile à diagnostiquer, notamment dans les premiers stades en raison du recoupement de ses symptômes avec la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson. Cependant, l'identification d'un profil différent entre ces maladies au niveau des biomarqueurs du LCR ouvrent de nouvelles possibilités dans le diagnostic différentiel et dans l'établissement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

1.3 La sclérose en plaques

1.3.1 Impacts sociaux économiques

La sclérose en plaques touche environ 2 millions de personnes dans le monde. Elle représente la maladie neurodégénérative la plus fréquente chez les jeunes : 70% des cas présentent des symptômes dès l'âge de 20 ans, très peu avant 16 ans (5%) ou après 40 ans (10%). Selon les zones géographiques, la prévalence n'est pas la même (Fromont *et al.*, 2010 ; Milo et Kahana, 2010). En effet, les pays d'Europe du Nord et d'Amérique du Nord sont plus touchés contrairement aux pays d'Asie, d'Amérique du Sud et d'Afrique. Ainsi, bien que les causes de la maladie ne soient pas encore élucidées, ces résultats suggèrent que les facteurs environnementaux et génétiques jouent un rôle important (Milo et Kahana, 2010).

1.3.2 Historique

Les premières descriptions de la sclérose en plaques datent du XIX^{ème} siècle bien qu'au XIV^{ème} siècle, un cas probable de sclérose en plaques ait été décrit chez une femme viking. Jean Cruveilhier et Robert Carswell sont les premiers à représenter les lésions caractéristiques de la maladie (Figure 1.24). En 1863, Eduard Rindfleisch met en évidence une inflammation de la substance blanche et évoque la possibilité que cette inflammation soit responsable de la démyélinisation. En 1866, le terme « sclérose en plaques » est utilisé pour la première fois par Alfred Vulpian, en remplacement du terme « sclérose en îles ou en tâches » utilisé par Jean Cruveilhier. Et ce n'est qu'en 1868, qu'une description claire et précise des lésions est faite par Martin Charcot. En effet, suite à son observation de coupes de cerveau et de moelle épinière, il mentionne la présence de lésions réparties sous forme de plaques. Ces lésions se caractérisent par un durcissement des tissus d'où l'adoption du terme « sclérose en plaques » pour décrire cette maladie. Egalement suite à l'autopsie qu'il a faite sur une de ses servantes qui présentait des tremblements différents de ceux observés par James Parkinson, il a établi pour la première fois une corrélation anatomo-clinique.



Figure 1.24 : Illustrations des lésions de la sclérose en plaques faites par Jean Cruveilhier (A) et Robert Carswell (B) (Compston, 2006).

1.3.3 Diagnostic

La sclérose en plaques est une maladie inflammatoire du système nerveux central. Selon les régions touchées par l'inflammation, des troubles moteurs, visuels, génito-urinaires, cognitifs et/ou de l'équilibre peuvent être observés.

A l'heure actuelle, aucun biomarqueur biologique de la maladie n'existe. Le diagnostic de la maladie repose donc uniquement sur des critères cliniques et paracliniques, ainsi que sur l'élimination de toutes autres causes pouvant expliquer les symptômes (Tableau 1.4) (Polman, 2005, 2010).

	Critères	Oui/ Non	Commentaires
1	Signes ou symptômes neurologiques compatibles avec une atteinte du système nerveux central		Si « non », il ne s'agit pas d'une sclérose en plaques.
2	Age de début entre 20 et 40 ans		Si le début est en dehors de cette tranche d'âge, le diagnostic reste possible, mais est moins probable.
3	Existence d'au moins deux lésions (l'une s'exprimant cliniquement)		L'une des 2 lésions peut n'être mise en évidence que par l'IRM et/ou les PE. S'il n'existe qu'une seule lésion cliniquement (sans autres lésions infracliniques après IRM et PE), le diagnostic n'est « défini » qu'avec les critères 4+7+9.
4	Existence d'au moins deux poussées		S'il n'y a qu'une poussée clinique, ou s'il s'agit d'une forme d'emblée progressive, le diagnostic n'est « défini » qu'avec les critères 3 (+6 et éventuellement 8) +7+9.
5	Nature évocatrice de certains symptômes ou signes cliniques		Certains éléments cliniques, tels que NORB unilatérale, OIN ou paresthésies élaborées du tronc, quoique non spécifiques, peuvent par leur nature même renforcer le diagnostic clinique.
6	IRM anormale		L'IRM est anormale en montrant un ou plusieurs hypersignaux en T2 : a) ce qui contribue au critère 3 ; b) ce qui apporte des arguments propres, quoique non formels, si les hypersignaux sont typiques (périvericulaires, avec certains prenant le gadolinium) ; c) ce qui élimine certains autres diagnostics.
7	LCR inflammatoire		Un LCR inflammatoire contribue au diagnostic, surtout si l'un des 2 critères 3 ou 4 manque. Un LCR normal n'élimine pas le diagnostic. La ponction lombaire n'est pas indispensable si les critères 1 à 6 et 9 sont présents.
8	Potentiels évoqués (PE) anormaux		Surtout utiles pour étayer le critère 3, s'il y a absence de plusieurs lésions cliniques et/ou radiologiques.
9	Elimination d'autres diagnostics		Par la clinique, l'IRM et un bilan biologique (en particulier immunologique et, éventuellement, vasculaire et infectieux).

Tableau 1.4 : Critères diagnostiques de la sclérose en plaques.

Tableau repris d'un cours de médecine donné à l'université Pierre et Marie Curie (www.chups.jussieu.fr/polys/neuro/pathoneuro/POLY.TDM.html)

1.3.4 Les lésions cérébrales

La sclérose en plaques se caractérise par la présence de plaques de démyélinisation. Ces plaques sont le résultat de la destruction de la myéline des axones suite à des réactions d'inflammation. La myéline est une membrane biologique qui a pour rôle de protéger les axones et d'accélérer la vitesse de propagation de l'influx nerveux. Elle se compose majoritairement de lipides (70%) et de protéines (30%). Les axones entourés de myéline constituent la substance blanche.

Ainsi, une destruction de la myéline entraîne une altération de la conduction nerveuse et donc l'apparition de différents symptômes selon les régions du cerveau touchées.

Au début de la maladie, une régénération complète de la myéline peut être observée. Cependant, au cours du temps, la cicatrisation se fait moins bien et une détérioration voire une destruction des axones est observée (Figure 1.25).

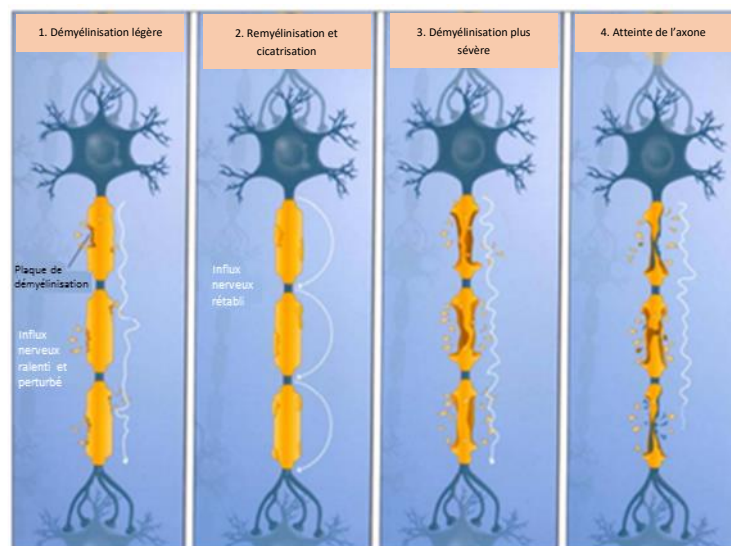


Figure 1.25 : Physiopathologie de la sclérose en plaques (Blin, 2011).

1.3.5 Formes cliniques évolutives de la maladie

Selon les patients, la sclérose en plaques peut évoluer de manière différente. Quatre formes évolutives ont été caractérisées : la forme récurrente-rémittente, la forme secondairement progressive, la forme progressive primaire et la forme progressive avec poussées (Lublin *et al.*, 2014).

La forme récurrente-rémittente correspond à l'évolution la plus courante chez les patients atteints de sclérose en plaques. Elle se caractérise par l'alternance de poussées et de phases de rémission (Figure 1.26). Les poussées se définissent par l'apparition, la réapparition ou l'aggravation en quelques heures ou quelques jours de troubles neurologiques suite à la destruction de la gaine de myéline. Le temps entre deux poussées est de minimum 30 jours. Au cours des phases de rémission, les symptômes peuvent complètement disparaître ou au contraire laisser des séquelles selon si la

gaine de myéline est complètement restaurée ou non. Cependant, lorsque la perte axonale devient trop importante, la maladie évolue vers une forme secondairement progressive (dans 50% des cas environ).

La forme secondairement progressive apparaît généralement après 15 années d'une forme récurrente-rémittente. Au cours de cette forme, les phases de rémission se font de plus en plus rares entraînant une progression continue des troubles neurologiques, sans retour donc à l'état neurologique antérieur (Figure 1.26).

Parfois, il peut arriver que la maladie soit d'emblée progressive, sans poussées et sans phases de rémission donc. Des phases plateau peuvent être toutefois observées mais elles ne permettent que des améliorations mineures des symptômes. Il s'agit de la forme progressive primaire (Figure 1.26). Elle se retrouve principalement chez les patients qui déclarent la maladie après l'âge de 40 ans.

Une dernière forme peut être identifiée. Il s'agit de la forme progressive avec poussées qui est une variante de la forme progressive primaire. En effet, cette forme se caractérise de la même manière par une progression de la maladie dès le début mais auxquelles des poussées avec ou sans récupération peuvent s'ajouter. Ainsi, entre deux poussées, la progression des symptômes se poursuit contrairement à la forme récurrente-rémittente (Figure 1.26).

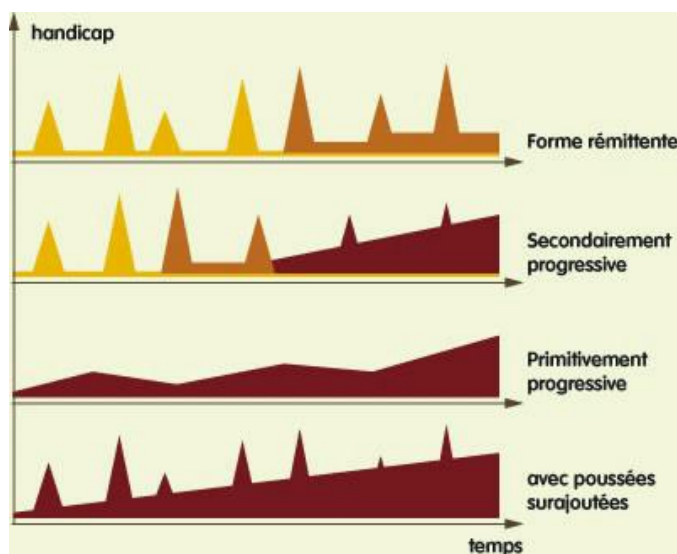


Figure 1.26 : Evolution des troubles neurologiques au cours du temps pour les différentes formes de la sclérose en plaques (figure extraite du site www.mipsep.org).

1.3.6 L'origine de la maladie, un dysfonctionnement immunitaire

Les mécanismes précis de la formation des plaques ne sont pas encore totalement compris. Cependant, le système immunitaire joue un rôle certain dans le développement de la maladie puisque des études ont montré la présence de lymphocytes T et de lymphocytes B au sein des lésions de la sclérose en plaques (Frohman *et al.*, 2006 ; Lassmann *et al.*, 1994).

L'hypothèse soutenue à l'heure actuelle est une activation anormale des cellules immunitaires (lymphocytes T et B plus particulièrement) par des virus, des facteurs environnementaux et/ou des facteurs génétiques (Lipton *et al.*, 2007 ; Milo et Kahana, 2010). La sur-activation de ces cellules entraîne leur passage au niveau du système nerveux central via une altération de la barrière hémato-encéphalique, ce qui déclencherait l'activation d'autres éléments du système immunitaire dirigés contre la myéline. En effet, les lymphocytes T produisent des cytokines qui activent les macrophages et les cellules microgliales, responsables de la dégradation de la myéline et les lymphocytes B produisent des anticorps spécifiques dirigés contre la myéline également (Frohman *et al.*, 2006).

Au cours des phases de rémission, la remyélinisation s'effectue grâce aux oligodendrocytes. Cependant, au cours du temps, ces derniers sont détruits par les lymphocytes T et les cytokines. Une gliose astrocytaire qui correspond à une prolifération d'astrocytes est alors mise en place. Les astrocytes sont responsables des dépôts cicatriciels retrouvés au niveau des lésions. Toutefois, de la même manière, ces derniers peuvent être attaqués par les lymphocytes.

1.3.7 Approches thérapeutiques

A l'heure actuelle, il n'existe malheureusement aucun traitement curatif. En effet, les seuls traitements utilisés permettent de réduire les symptômes et le développement de la maladie. Selon la forme évolutive de la maladie, trois types de traitements peuvent être donnés aux patients : des traitements contre les poussées, des traitements de fond et des traitements symptomatiques (Inglese et Petracca, 2015 ; Tullman, 2013).

○ **Traitements contre les poussées**

Les traitements contre les poussées représentent les premières stratégies thérapeutiques développées contre la sclérose en plaques. Ils mettent en jeu principalement des corticoïdes qui permettent de réduire la durée des poussées. Cependant, ils n'ont aucun effet sur les séquelles éventuellement laissées et sur la prévention de nouvelles poussées.

○ **Traitements de fonds**

Les traitements de fonds regroupent les immunomodulateurs, les immunosuppresseurs et les anticorps monoclonaux. Ils ont pour but de réduire la fréquence des poussées ainsi que le nombre de lésions cérébrales.

Parmi les immunomodulateurs sont retrouvés les interférons β (Weinstock-Guttman *et al.*, 2008). Ils permettent de diminuer l'activation des lymphocytes T. Ils sont généralement administrés aux patients qui présentent une forme rémittente-récurrente de la maladie.

Parmi les immunosuppresseurs est retrouvé la mitoxantrone (Scott et Figgitt, 2004). Elle permet de réduire la prolifération des lymphocytes et est administrée aux patients qui présentent une forme rémittente-récurrente très active de la maladie.

Et parmi les anticorps monoclonaux, le Natalizumab est retrouvé (Gunnarsson *et al.*, 2011). Il permet le blocage de l'entrée des lymphocytes dans le système nerveux central. Il s'agit des traitements les plus récents. Ils sont administrés dans les formes récurrente-rémittente très actives de la maladie.

○ Traitements symptomatiques

Les traitements symptomatiques ont pour but d'améliorer le quotidien des patients en soulageant les différents symptômes observés tels que la spasticité, les paresthésies ou les douleurs.

Conclusion :

La sclérose en plaque représente la maladie neurodégénérative la plus fréquente chez les jeunes entre 20 et 40 ans. Elle se caractérise par la destruction des gaines de myéline suite à des processus inflammatoires. Les processus de démyélinisation conduit à une altération axonale qui entraîne de nombreux troubles moteurs, visuels, cognitifs...

L'origine et les mécanismes de cette maladie sont encore très flous. Ainsi de nombreuses recherches tentent d'en percer les secrets afin de pouvoir développer des traitements efficaces puisqu'à l'heure actuelle, aucun traitement curatif n'existe.

Chapitre 2 :

La spectroscopie vibrationnelle

2.1 Introduction

La spectroscopie vibrationnelle a longtemps été destinée à l'étude de composés organiques. Envisager de l'appliquer au domaine de la biologie était donc presque impensable. Néanmoins, les méthodes de spectroscopie vibrationnelle d'absorption infrarouge et de diffusion Raman sont devenues des outils incontournables aujourd'hui dans ce domaine. Elles doivent principalement leur succès aux avancées techniques qu'il y a eu dans les années 70 avec par exemple le développement des interféromètres pour la spectroscopie infrarouge ou la commercialisation des lasers pour la spectroscopie Raman qui permettent d'améliorer la sensibilité de ces dernières.

La spectroscopie est une méthode basée sur l'interaction de la matière avec une onde électromagnétique. Cette interaction peut engendrer différents phénomènes tels que l'absorption, l'émission ou la diffusion de la lumière. Les ondes électromagnétiques peuvent être représentées sous la forme d'un spectre en fonction de leur longueur d'onde, de leur fréquence ou de leur énergie (Figure 2.1). Ces différents paramètres peuvent être reliés selon l'équation 2.1.

$$E = h\nu = hc/\lambda \quad \text{Equation 2.1}$$

E représente l'énergie du rayonnement électromagnétique en Joule (J), h la constante de Planck (6.626×10^{-34} J.s), ν la fréquence en Hz, c la vitesse de la lumière (3×10^8 m.s⁻¹) et λ la longueur d'onde en m.

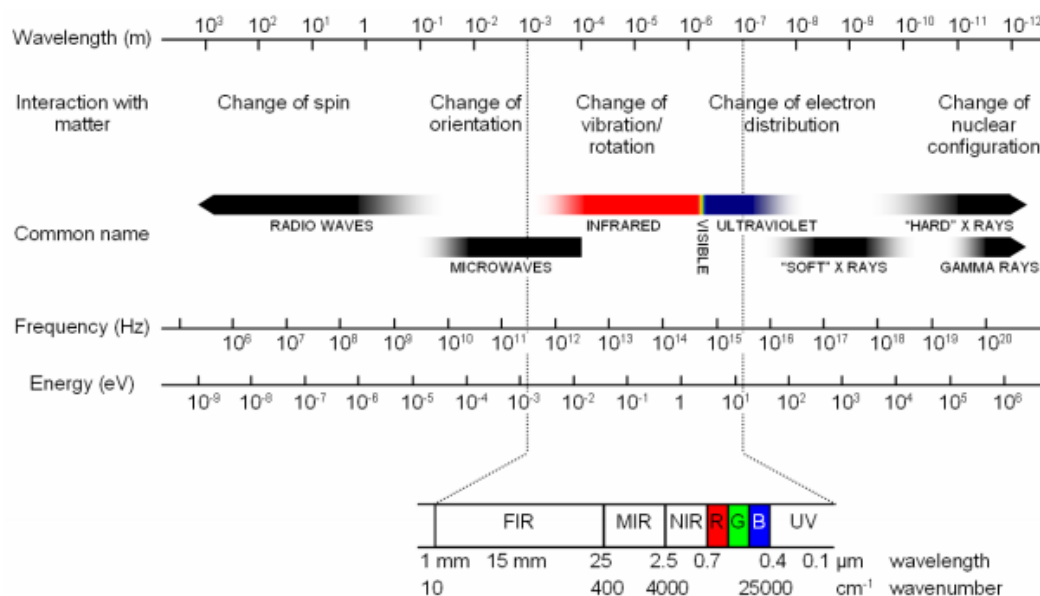


Figure 2.1 : Spectre électromagnétique.

En fonction de l'énergie des ondes électromagnétiques mises en jeu, différents phénomènes peuvent être observés. Au cours de ce travail, les spectroscopies IR, Raman et UV-visible ont été

les principales méthodes utilisées. Les spectroscopies IR et Raman permettent d'étudier la matière au travers des vibrations moléculaires (Larkin, 2011 ; Schrader, 1995).

Une molécule peut se modéliser comme un ensemble d'oscillateurs liés les uns aux autres. Ainsi, l'excitation d'un des oscillateurs entraîne l'excitation de tous les oscillateurs. Cependant, les oscillations se produisent d'une manière bien précise. En effet, une molécule à n atomes ne possède que $3n$ degrés de liberté dont trois se réfèrent aux mouvements de translation et 3 (ou 2) aux mouvements de rotation dans le cas d'une molécule non linéaire (ou linéaire). Les degrés de liberté restants dits modes normaux se comptent donc au nombre de $3n-6$ pour une molécule non linéaire et $3n-5$ pour une molécule linéaire. Deux types de modes normaux peuvent être retrouvés : les vibrations d'élongation (stretching, ν) et les vibrations de déformation (bending, δ). Les vibrations d'élongation impliquent des modifications au niveau de la longueur des liaisons. Elles peuvent être symétriques (ν_s) si la symétrie moléculaire est conservée ou antisymétriques (ν_{as}), si elle ne l'est pas. Les vibrations de déformation quant à elles impliquent des variations au niveau de l'angle de liaison qui peuvent avoir lieu dans le plan ou en dehors du plan. La figure 2.2 présente les modes de vibration fréquemment rencontrés en spectroscopie vibrationnelle.

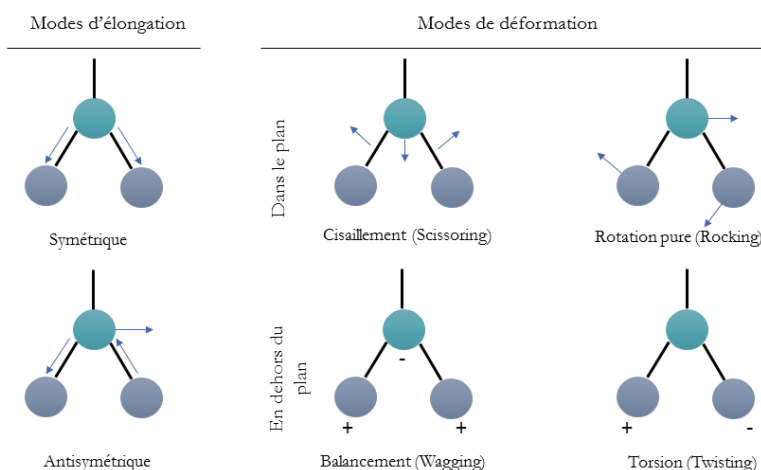


Figure 2.2 : Modes de vibration du groupement CH₂. Les flèches indiquent les mouvements respectifs des atomes. + et - indiquent des mouvements opposés perpendiculaires au plan moléculaire. Figure adaptée de Chalmers, 2011.

Dans chaque mode normal, chaque atome vibre en phase avec la même fréquence mais avec une amplitude qui lui est propre. Cependant, les fréquences de vibration dépendent fortement des forces agissant sur les atomes individuels, prenant donc en considération l'influence de l'environnement avec par exemple les liaisons non covalentes. Cela permet d'obtenir une signature caractéristique pour chaque molécule et donc d'obtenir des informations sur la composition moléculaire, la structure et/ou les interactions au sein d'un échantillon.

2.2 La spectroscopie infrarouge

2.2.1 Principe

La spectroscopie infrarouge permet d'étudier la composition moléculaire d'un échantillon au travers de ses liaisons chimiques. Cette méthode consiste à envoyer sur l'échantillon un rayonnement électromagnétique dans la gamme de longueur d'onde de l'infrarouge allant de 0.8 à 1000 μm , soit de 12500 à 10 cm^{-1} dont trois zones peuvent y être distinguées : l'infrarouge proche (0.8-2.5 μm , soit 12500-4000 cm^{-1}), l'infrarouge moyen (2.5-25 μm , soit 4000-400 cm^{-1}) et l'infrarouge lointain (25-1000 μm , soit 400-10 cm^{-1}). Le champ électrique induit par l'onde électromagnétique peut interagir avec le moment dipolaire d'un constituant moléculaire présent au sein de l'échantillon. Lorsque la fréquence de champ est en accord avec la fréquence de vibration d'un mode normal de la molécule, l'interaction créée entraîne la vibration de certaines liaisons et l'absorption de l'énergie de l'onde excitatrice correspondante.

Ainsi, un spectre infrarouge représente l'absorbance « A » en fonction de la longueur d'onde « λ », exprimée généralement en nombre d'onde « ν ». λ et ν peuvent être reliés selon l'équation 2.2 :

$$\nu = 10^4 / \lambda \text{ avec } \nu \text{ en } \text{cm}^{-1} \text{ et } \lambda \text{ en } \mu\text{m} \quad \text{Equation 2.2}$$

Selon la loi de Beer-Lambert, l'absorbance est directement liée à la composition de l'échantillon par l'équation 2.3 :

$$A = \sum \varepsilon_i \cdot l \cdot c_i \quad \text{Equation 2.3}$$

Avec c_i la concentration de l'espèce i exprimée en mol.L^{-1} , ε_i le coefficient d'absorption molaire exprimée en $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ et l , la longueur du trajet optique exprimée en cm .

2.2.2 Instrumentation

2.2.2.1 La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Depuis les années 70, il n'est plus question de parler de spectroscopie infrarouge mais de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) puisque les spectromètres actuels sont équipés d'interféromètres. Cela a pour but d'améliorer la sensibilité de la méthode et de réduire le temps de mesure de quelques heures à quelques secondes. En effet, grâce aux interféromètres, il est possible d'observer simultanément l'ensemble des fréquences d'une zone spectrale définie contrairement aux anciens spectromètres qui utilisaient un monochromateur et où il n'était possible que d'enregistrer l'absorbance nombre d'onde par nombre d'onde et ce, jusqu'à avoir balayé complètement la zone spectrale voulue. La réduction du temps de mesure permet ainsi d'augmenter la qualité des spectres grâce à l'acquisition et à la moyenne de plusieurs scans.

L'interféromètre le plus utilisé est l'interféromètre de Michelson (Chalmers et Dent, 2006). Il se compose d'une lame séparatrice et de deux miroirs ; l'un étant fixe et l'autre mobile. La lame

séparatrice a pour rôle de diviser le rayonnement infrarouge émis par la source en deux faisceaux. Idéalement, 50% du rayonnement est transmis au miroir mobile et 50% est réfléchi vers le miroir fixe (Figure 2.3.A). Chacun de ces deux faisceaux est ensuite réfléchi par le miroir correspondant vers la lame séparatrice où ils sont à nouveau divisés ; une partie traverse l'échantillon et atteint le détecteur et une autre est réfléchi en direction de la source.

Si les deux miroirs sont à égale distance de la lame séparatrice, aucune différence de chemin optique n'est observée. L'énergie lumineuse atteignant le détecteur est donc maximale. Par contre, lorsque le miroir mobile se déplace, les chemins optiques deviennent inégaux. Une différence de chemin optique δ est alors observée par un déplacement $x = \delta/2$ du miroir.

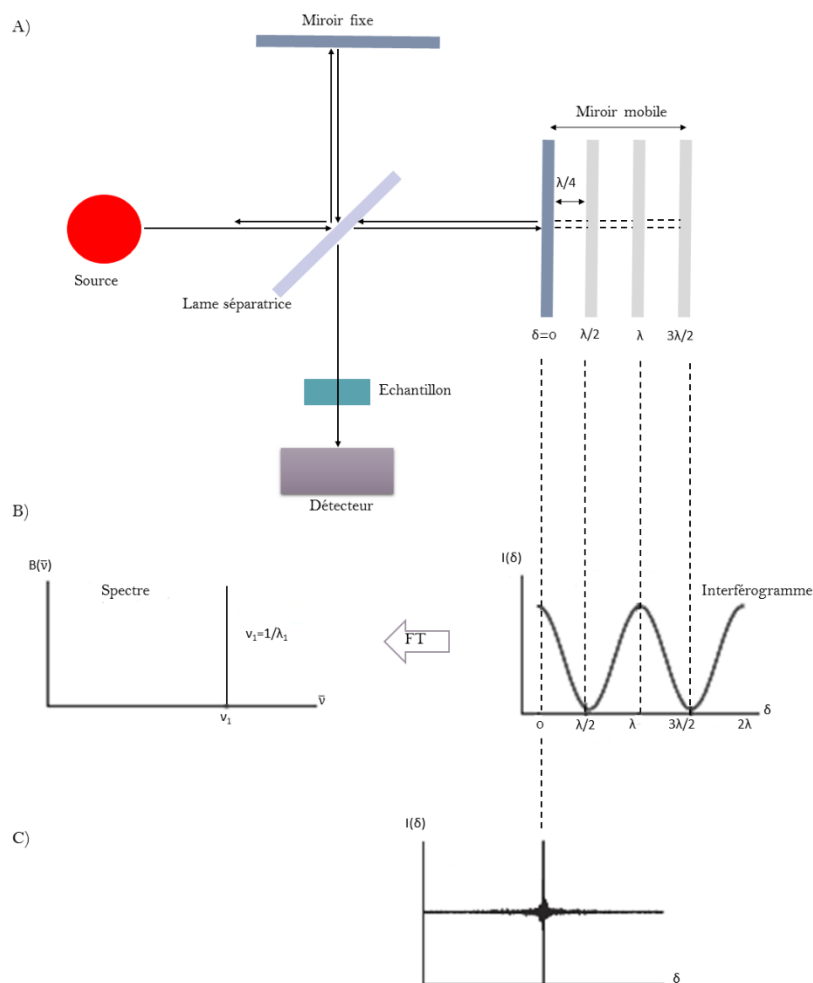


Figure 2.3 : A) Principe d'un spectromètre à transformée de Fourier. B) Interférogramme obtenu à partir d'une source monochromatique. Le passage au spectre est permis grâce à une transformée de Fourier. C) Interférogramme obtenu à partir d'une source polychromatique. Figure adaptée de Chalmers et Dent, 2006.

Dans le cas où la source émettrait un rayonnement monochromatique d'une longueur d'onde λ , l'intensité $I(\delta)$ du signal arrivant au détecteur est maximale lorsque la différence de chemin optique

δ entre les deux faisceaux est un multiple entier $\delta = n\lambda$ (avec $n = 0, \pm 1, \pm 2, \dots$) de la longueur d'onde. L'interférence entre les deux faisceaux est constructive. Par contre lorsque $\delta = (2n+1)\lambda/2$, l'interférence entre les deux faisceaux est destructive ; l'intensité passe alors par 0. Le signal enregistré par le détecteur est donc une variation sinusoïdale de l'intensité en fonction de la position du miroir (ou du temps) puisque ce dernier se déplace à vitesse constante le long de son axe. Cela correspond à l'interférogramme (Figure 2.3.B). Cependant, un spectre infrarouge est présenté sous la forme d'une intensité en fonction d'une fréquence. Afin d'effectuer le changement d'espace, un calcul mathématique appelé transformée de Fourier est appliqué.

Dans le cadre d'un rayonnement monochromatique, l'application d'une transformée de Fourier donne lieu à une simple raie à une longueur d'onde λ (ou nombre d'onde ν) (Figure 2.3.B). Mais en spectroscopie infrarouge, la source utilisée est une source polychromatique continue. L'interférogramme enregistré correspond donc à la somme de toutes les variations sinusoïdales observées pour chaque fréquence (Figure 2.3.C). Le point d'intensité maximale de l'interférogramme correspond au point où toutes les ondes sont en phase ; c'est-à-dire où la différence de chemin optique est nulle. La transformée de Fourier de l'interférogramme donne lieu à un spectre simple faisceau. Afin d'obtenir un spectre infrarouge, deux interférogrammes sont enregistrés ; un qui est pris sans échantillon et un qui est pris avec l'échantillon. Le but d'enregistrer un spectre sans échantillon est de minimiser les contributions externes provenant du milieu environnant. Chacun des interférogrammes est ensuite transformé en spectre simple faisceau à l'aide de la transformée de Fourier. Le spectre infrarouge de l'échantillon est obtenu suite au ratio des deux spectres (Figure 2.4).

Pour une source polychromatique, l'interférogramme peut être exprimé comme suit :

$$I(\delta) = \int_{-\infty}^{+\infty} B(\bar{\nu}) \cos(2\pi\delta\bar{\nu}) d\bar{\nu} \quad \text{Equation 2.4}$$

Et le spectre comme suit :

$$B(\bar{\nu}) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(\delta) \cos(2\pi\delta\bar{\nu}) d\delta \quad \text{Equation 2.5}$$

Avec $I(\delta)$ représentant l'intensité du rayonnement arrivant au détecteur, δ la différence de chemin optique et $B(\bar{\nu})$ une fonction représentant le spectre.

Mathématiquement, la transformée de Fourier n'est exacte que si l'intégration est effectuée sur la totalité de l'intervalle de variation de δ , soit de $-\infty$ à $+\infty$. Cependant, les enregistrements ne sont faits que sur un intervalle limité de δ , et donc sur une durée limitée. Cela a pour conséquence de transformer des raies infiniment étroites (Figure 2.3.B) en des bandes de largeur à mi-hauteur $0.6/x$. Ainsi, afin de pouvoir différencier correctement deux bandes, il faut au minimum mesurer l'interférogramme sur une distance $x=1/d$ avec d , la distance entre les deux bandes à différencier. C'est ce qui détermine la résolution spectrale. Par conséquent, plus le parcours du miroir mobile est grand, plus la résolution est augmentée.

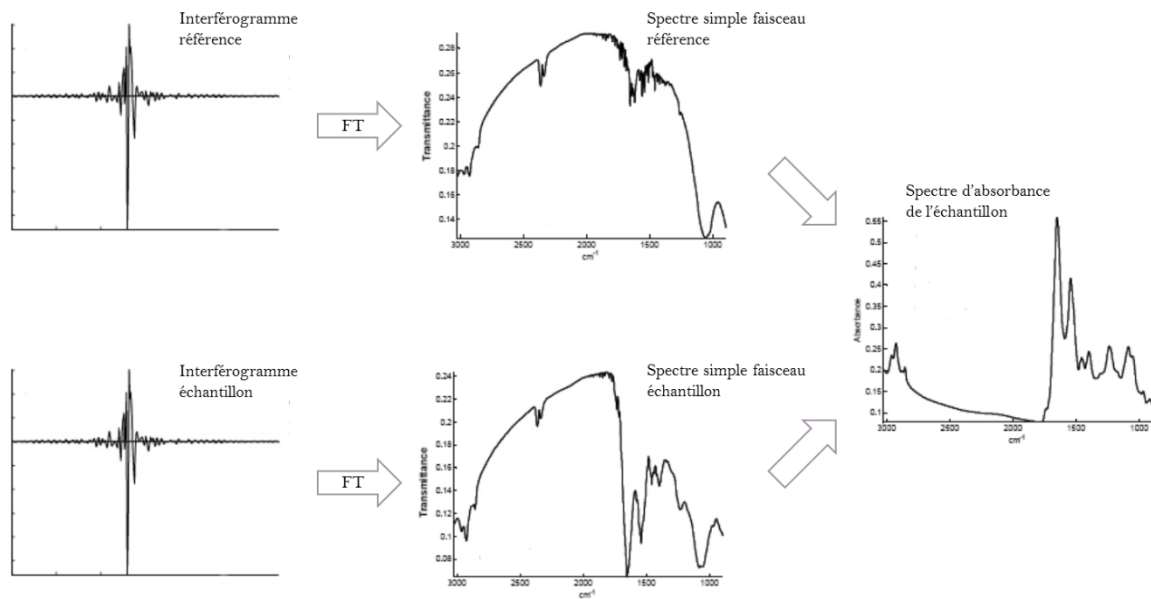


Figure 2.4 : Représentation schématique des différentes étapes nécessaires à la génération d'un spectre FTIR. Figure adaptée de Gaigneaux, 2004.

2.2.2.2 La microspectroscopie infrarouge et l'imagerie infrarouge

La haute sensibilité et la haute précision des spectromètres FTIR a permis d'étendre le champ d'application de la spectroscopie infrarouge à l'échelle microscopique via le couplage des spectromètres FTIR aux microscopes (Chalmers, 2011). Le montage de ces systèmes dans lesquels les chemins optiques du rayonnement visible et du rayonnement infrarouge sont colinéaires lorsqu'ils arrivent au niveau de l'échantillon permet de visualiser, délimiter et mesurer des zones bien précises d'un échantillon. En effet, les objectifs de microscope infrarouge sont dotés d'ouverture donnant des résolutions spatiales de l'ordre de quelques microns à plusieurs dizaines de microns suivant l'ouverture utilisée ; la résolution spatiale pouvant être définie comme la capacité à mesurer le spectre d'un objet sans que des objets placés hors du champ de l'ouverture viennent contaminer le spectre. De plus, les microscopes sont généralement connectés à des plateformes motorisées permettant de se placer de manière très précise à un endroit de l'échantillon donné.

Deux modes d'enregistrements sont utilisés. Le premier qui correspond à la microspectroscopie infrarouge, consiste à diviser en pixels une zone à analyser et d'enregistrer un par un les spectres infrarouges au niveau de ces derniers. A partir de ces données, des cartes en fausses couleurs pourront être créées montrant la différence d'intensité d'une bande spectrale par exemple. Les détecteurs généralement utilisés pour cette méthode sont de type photoélectrique comme les détecteurs MCT (Mercure Cadmium Tellure) ; c'est-à-dire qu'ils génèrent une différence de potentiel par l'absorption de photons. L'utilisation de ce type de détecteur nécessite de réduire

L'ouverture du microscope afin de ne pas saturer ce dernier. Cependant, afin d'obtenir une bonne résolution spatiale, il est nécessaire de réduire au maximum l'ouverture, ce qui sous-entend donc également une diminution du rapport Signal/Bruit (S/B) du spectre. De plus, lorsque l'ouverture utilisée est proche de la radiation infrarouge (2.5 à 25 μm pour l'infrarouge moyen compris entre 4000 et 400 cm^{-1}), le spectre est distordu en raison des effets de diffraction (Lasch et Naumann, 2006). Ainsi, la résolution spatiale avec ce type de détecteur est généralement de l'ordre de 30 à 40 μm .

L'arrivée sur le marché d'un nouveau type de détecteur, le FPA (Focal Plane Array), constitué de plusieurs milliers de petits capteurs indépendants disposés en réseau a permis d'améliorer la résolution spatiale en mettant en place un nouveau système de mesure appelé imagerie. En effet, chaque capteur de taille plus petite que la limite de diffraction est capable de collecter les données sur une région spécifique de l'échantillon. Ainsi, la résolution spatiale est seulement limitée à la limite de diffraction, c'est-à-dire aux alentours de 10 μm . De plus, un des autres avantages de cette méthode est le temps de mesure qui est considérablement réduit puisque des milliers de spectres peuvent être collectés en même temps.

Cependant, au cours de ces dernières années, l'exploitation des photons infrarouges dans les centres de rayonnement synchrotron a suscité un grand intérêt dans le développement notamment de la microspectroscopie infrarouge. En effet, comme il l'a déjà été mentionné précédemment, un des désavantages de la microspectroscopie infrarouge est sa faible résolution suite principalement au fait que si l'ouverture du microscope est trop faible, peu de lumière passe et donc la qualité du spectre est faible. C'est à ce niveau que la lumière synchrotron porte son avantage. En effet, bien que le flux total de photons émis par une source synchrotron soit plus faible que celui émis par un corps noir (type Globar ; source la plus couramment utilisée dans l'infrarouge moyen), la brillance de la source est quant à elle deux à trois ordres de grandeur supérieur à celle d'une source classique en raison de la faible divergence angulaire du faisceau (Williams, 2002). Ainsi, pour toute ouverture utilisée en dessous de 40 μm , l'utilisation de la lumière synchrotron présente un réel avantage (Figure 2.5).

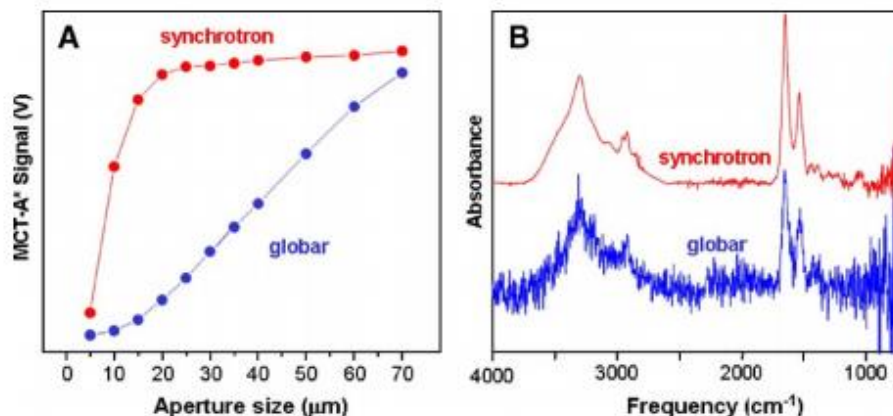


Figure 2.5 : A) Intensité du signal infrarouge enregistré à l'aide d'un microscope infrarouge confocal équipé d'un détecteur MCT et d'une source synchrotron ou Globar à travers différentes ouvertures. B) Spectre infrarouge d'un globule rouge obtenu à partir d'une source synchrotron et d'une source Globar. Une ouverture carrée de $5 \times 5 \mu\text{m}$ a été utilisée pour la mesure (Miller, 2006).

2.2.3 Techniques d'échantillonnage

Selon la nature de l'échantillon à analyser, différentes techniques d'échantillonnage peuvent être utilisées (Stuart, 2006). Dans le cadre de cette thèse, uniquement la transmission et la réflexion totale atténuée ont été utilisées.

2.2.3.1 La transmission

Le mode de transmission est la manière la plus simple d'enregistrer le spectre infrarouge d'un échantillon lorsque ce dernier n'absorbe pas totalement le rayonnement infrarouge. En effet, son principe consiste à mesurer l'énergie du faisceau infrarouge après sa traversée de l'échantillon (Figure 2.6). Avant l'échantillon, l'intensité de la lumière est égale à I_0 . Après l'échantillon, l'intensité est égale à I . La transmission est donc égale à $T = I/I_0$. Le pourcentage de transmission (Transmittance) est défini par : $\%T = 100(I/I_0)$; donc l'absorbance $A = -\log T = \log(I_0/I)$. Ce mode de mesure nécessite néanmoins l'utilisation de supports transparents au rayonnement infrarouge.

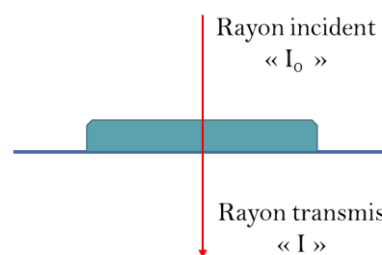


Figure 2.6 : Principe de la spectroscopie IR en mode transmission.

2.2.3.2 La réflexion

Il peut arriver parfois que l'échantillon soit trop absorbant ou qu'il ne puisse pas être broyé dans le cas d'une poudre par exemple. Il est alors nécessaire de recourir à des techniques de réflexion. Lorsqu'un faisceau lumineux arrive à l'interface d'un second milieu dont l'indice de réfraction est plus grand, il subit suivant l'angle d'incidence, soit une réflexion totale comme un miroir, soit une réflexion atténuée après avoir, en partie, pénétré dans le milieu. En fonction de l'échantillon à étudier, la réflexion spéculaire, la réflexion totale atténuée (ATR) et la réflexion diffuse peuvent être distinguées.

L'accessoire de réflexion spéculaire permet la mesure de la lumière réfléchiée dans une direction d'observation symétrique à celle de l'incidence (Figure 2.7.A). Il est utilisé pour des échantillons transparents au rayonnement infrarouge mais réfléchissants à leur surface (vernis, films de polymères par exemple).

Dans le cadre d'échantillons constitués de fines particules tels que les poudres, le rayonnement peut pénétrer dans une ou plusieurs couches. L'énergie du faisceau réfléchi n'est plus alors concentrée dans une seule direction, mais au contraire dispersée dans toutes les directions de l'espace. On parle de réflexion diffuse (Figure 2.7.B).

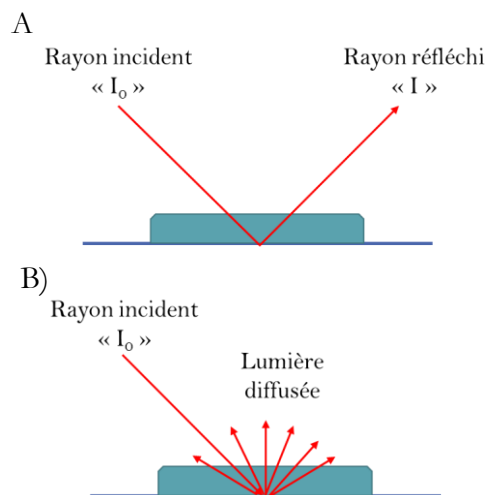


Figure 2.7 : Principe de la spectroscopie IR en mode de réflexion spéculaire (A) et de réflexion diffuse (B).

Une autre méthode d'enregistrement des spectres infrarouges est la réflexion totale atténuée (ATR). Elle est très utilisée pour des échantillons très absorbants comme des liquides contenant de l'eau par exemple, pour des échantillons épais ou pour des études de surface dans le cadre de films minces. Le principe des dispositifs ATR est de faire subir au faisceau infrarouge, plusieurs réflexions à l'interface entre l'échantillon et un cristal parallélépipédique, transparent en infrarouge mais d'indice de réfraction n_1 élevé et dans la plupart des cas, supérieur à celui de l'échantillon n_2 . En théorie, puisque n_1 est supérieur à n_2 , le rayon lumineux devrait subir une réflexion totale à l'interface cristal-échantillon pour une valeur de l'angle d'incidence θ_i supérieur à un angle critique θ_c telle que $\sin\theta_c = n_2/n_1$. Néanmoins, le phénomène est perturbé en réalité par l'existence d'une onde évanescente qui pénètre dans l'échantillon sur quelques micromètres et qui peut être adsorbée (la profondeur de pénétration d_p est donnée par l'équation 2.6 avec λ , la longueur d'onde). Dans ce cas-là, une partie de l'énergie est retenue et la réflexion totale est atténuée (Figure 2.8).

$$d_p = \frac{\lambda/n_1}{\sqrt{2\pi(\sin^2\theta - (n_2/n_1)^2)}} \quad \text{Equation 2.6}$$

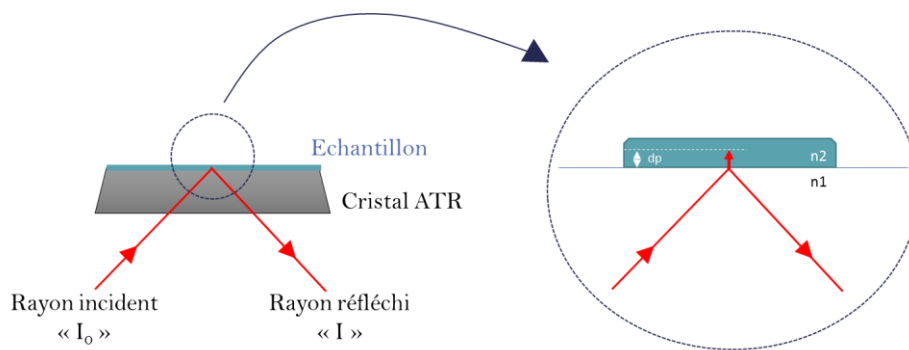


Figure 2.8 : Représentation schématique d'un cristal ATR montrant le principe de la réflexion totale atténuée.

2.2.4 La spectroscopie infrarouge des protéines

Les protéines sont des molécules biologiques remplissant différents rôles au sein d'un organisme. Elles se composent d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques dont chacune d'entre elles est composée de plusieurs résidus d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques. Un des principaux paramètres qui régit leur activité et leur fonctionnalité est la structure tridimensionnelle qu'elles adoptent.

Le spectre infrarouge d'une protéine présente 9 bandes dénommées bande amides (Figure 2.9). Elles représentent les vibrations du squelette peptidique (Tableau 2.1). Il a été montré que les bandes amide I et II sont sensibles à la structure secondaire des protéines (Dousseau et Pezolet, 1990). Cependant, amide I est généralement la bande la plus utilisée (Dong *et al.*, 1990 ; Yang *et al.*, 2015). Elle est retrouvée dans la région 1700-1610 cm^{-1} et correspond principalement aux vibrations d'élongation C=O. En fonction de la structure secondaire dans laquelle les groupements C=O sont impliqués, les propriétés spectrales de la bande amide I sont différentes (position, largeur) ; chaque structure secondaire donnant lieu à une position de bande différente (Tableau 2.2) (Arrondo, 1993 ; Barth, 2007). Une déconvolution de la bande amide I est souvent nécessaire puisqu'une protéine est rarement constituée d'une seule structure secondaire ; ce qui conduit donc à une superposition des différentes bandes (Baldassarre *et al.*, 2015). Cette méthode sera détaillée plus en détails dans la partie 3.5.

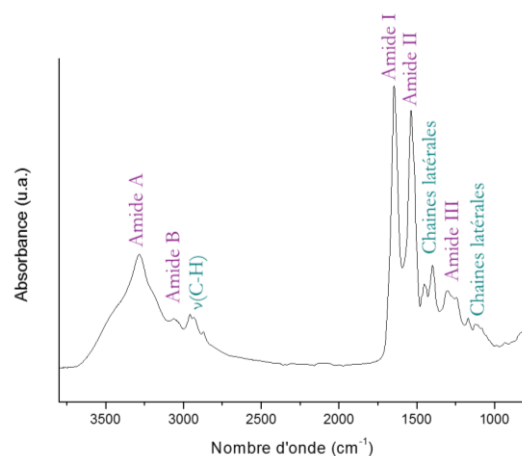


Figure 2.9 : Spectre d'absorption infrarouge caractéristique d'une protéine entre 3800 et 800 cm^{-1} .

Nomenclature (amide)	Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Modes vibrationnels
A	≈ 3300	ν(N-H)
B	≈ 3100	ν(N-H)
I	1700-1610	80% ν(C=O), ν(C-N), δ(N-H)
II	1575-1480	60% δ(N-H), ν(C-N)
III	1320-1220	ν(C-N), δ(N-H), ν(C=O), δ(N-C=O)
IV	765-625	δ(N-C=O) + autres modes
V	800-640	δ(N-H) en dehors du plan
VI	605-535	δ(C=O) en dehors du plan
VII	≈ 200	δ(N-H) en dehors du plan

Tableau 2.1 : Bandes amides caractéristiques du squelette peptidique (Fabian et Mantele, 2006).

Structure secondaire	Position de la bande dans H ₂ O (cm ⁻¹)	Position de la bande dans D ₂ O (cm ⁻¹)
Hélices α	1657-1648	1660-1642
Feuillets β	1641-1623	1638-1615
	1695-1674	1694-1672
Coudes	1686-1662	1691-1653
Structures désorganisées	1657-1642	1654-1639

Tableau 2.2 : Position de la bande amide I en fonction de la structure secondaire (Barth, 2007). La composante à haut nombre d'onde pour les feuillets β serait plutôt retrouvée pour les feuillets β antiparallèles (Sarroukh *et al.*, 2010).

L'utilisation de l'eau deutérée n'est pas rare en spectroscopie infrarouge car cela permet de s'affranchir des vibrations de l'eau qui sont pour certaines situées dans la région amide I (≈1645 cm⁻¹) et cela permet aussi de mieux séparer dans certains cas les hélices α, des structures désorganisées.

La bande amide II correspond aux vibrations de déformations N-H et aux vibrations d'élongations C-N. Elle est retrouvée dans la région 1575-1480 cm⁻¹. Il a été reporté précédemment dans la littérature que les protéines ayant une structure en feuillets β antiparallèles présentent une forte bande amide II entre 1530 et 1510 cm⁻¹ alors que celles avec une structure en feuillets β parallèles présentent une forte bande entre 1550 et 1530 cm⁻¹ (Kong et Yu, 2007). L'utilisation d'un solvant deutéré entraîne un déplacement de la bande vers de plus faibles nombres d'onde.

D'autres vibrations provenant des chaînes latérales des résidus d'acides aminés pourront être également retrouvées au sein d'un spectre infrarouge (Figure 2.9) (Barth, 2000 ; Trivella *et al.*, 2010 ; Wolpert et Hellwig, 2006) pouvant donner ainsi des informations sur l'état de protonation des acides aminés ou la coordination avec des métaux par exemple (Hellwig *et al.*, 1998, 2002 ; Torreggiani *et al.*, 2003).

2.3 La spectroscopie Raman

2.3.1 Principe

La spectroscopie Raman, découverte en 1928 par le physicien indien Chandrasekhara Venkata Raman repose sur le principe de la diffusion de la lumière. En effet, lorsqu'un faisceau lumineux monochromatique est envoyé sur un échantillon, il peut soit être absorbé s'il possède la même énergie qu'un niveau de vibration, soit transmis ou diffusé. Le phénomène de diffusion correspond à la dispersion du faisceau lumineux dans de multiples directions de l'espace. Généralement, la majorité de la lumière diffusée est de même énergie (de même fréquence) que la lumière incidente. Ce phénomène de diffusion élastique est appelé diffusion Rayleigh. Cependant, parfois, la lumière diffusée (environ un photon sur 100 millions) est d'énergie (fréquence) différente que celle de la lumière incidente suite à un échange d'énergie entre le rayonnement et la matière. Ce phénomène de diffusion inélastique est appelé diffusion Raman. Deux processus peuvent être identifiés pour la diffusion Raman : la diffusion Stokes et la diffusion anti-Stokes (Figure 2.10). Dans le cadre de la diffusion Stokes, le photon incident est de plus haute énergie que le photon diffusé car il cède à la molécule qui est dans son état initial, une quantité d'énergie correspondant à l'énergie de vibration nécessaire à la transition de l'état fondamental à l'état excité. Dans le cadre de la diffusion anti-Stokes, c'est le photon diffusé qui possède une plus grande énergie. En effet, la molécule qui se trouve au départ dans un état excité cède au photon incident une quantité d'énergie correspondant à l'énergie de vibration nécessaire à la transition de l'état excité à l'état fondamental. Par conséquent, la diffusion Stokes permet la création d'une excitation alors que la diffusion anti-Stokes entraîne une destruction d'excitation. Il est important de noter que pour qu'il y ait diffusion Raman, la lumière excitatrice doit induire un changement de polarisabilité des molécules (Larkin, 2011).

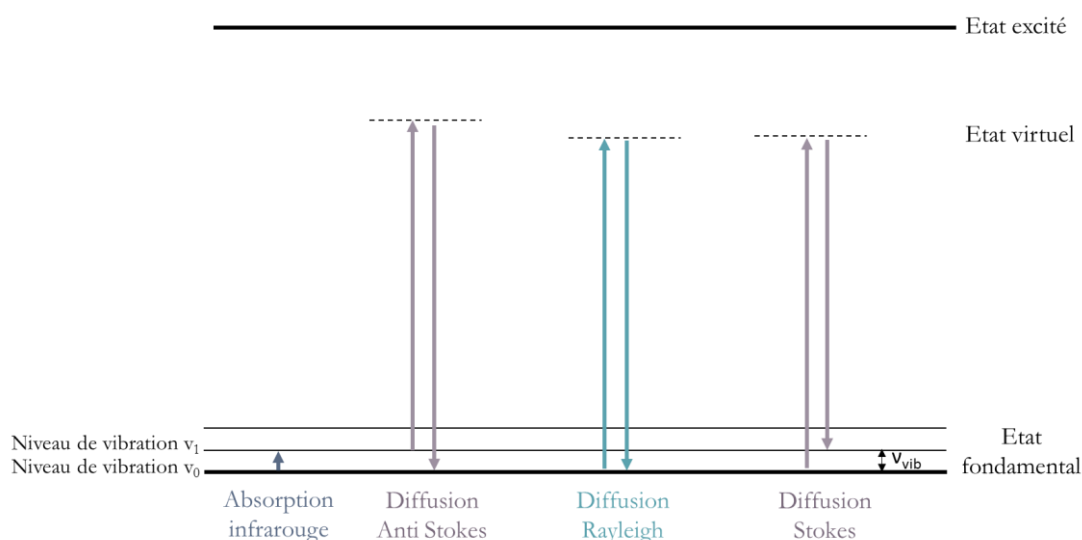


Figure 2.10 : Représentation schématique des processus de diffusions Rayleigh, Raman Stokes et anti-Stokes avec pour comparaison celui de l'absorption infrarouge.

Ainsi, l'étude de l'ensemble des radiations diffusées permet d'obtenir un spectre Raman représentant l'intensité diffusée relative en fonction de la différence de fréquence par rapport à la source d'excitation qui est prise comme référence (Figure 2.11). En pratique, la différence de fréquence est exprimée en nombre d'onde (cm^{-1}) pour comparaison avec l'infrarouge. Egalement, à température ambiante, seules les raies Stokes sont généralement étudiées car elles sont plus intenses. En effet, l'intensité est directement liée à la population de l'état initial de la molécule. La probabilité donc pour qu'une molécule soit initialement dans un état vibrationnel excité est plus faible que celle où elle se trouve à l'état fondamental selon la distribution de Boltzmann (Smith et Dent, 2005).

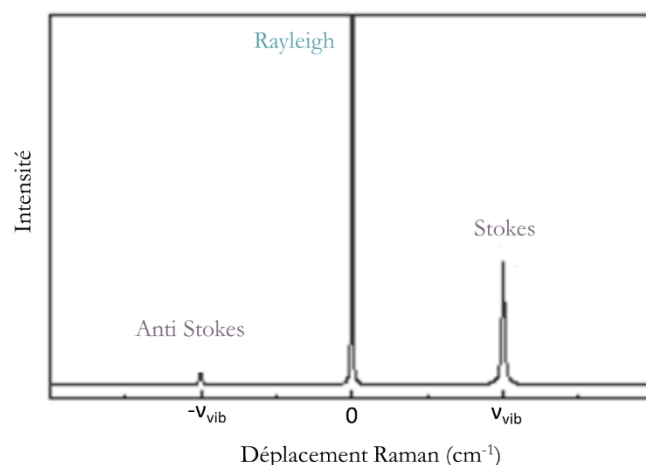


Figure 2.11 : Spectre Raman montrant les raies anti-Stokes, Rayleigh et Stokes. Les déplacements Raman sont exprimés en fonction de la fréquence de la source d'excitation et sont liés aux énergies de vibration d'une molécule.

Parfois, une exaltation de l'intensité de certaines bandes du spectre Raman peut être observée (pouvant aller jusqu'à un facteur 10^6). Ce phénomène appelé diffusion Raman de résonance se produit lorsque l'énergie de l'onde excitatrice est proche d'une véritable transition électronique d'une molécule (Figure 2.12). Les bandes exaltées correspondent à la structure vibrationnelle de la bande d'absorption électronique mise en jeu. En pratique, les effets de résonance sont mis à profit pour une étude sélective de certaines molécules grâce à un choix adéquat de la longueur d'onde excitatrice (Schrader, 1995).

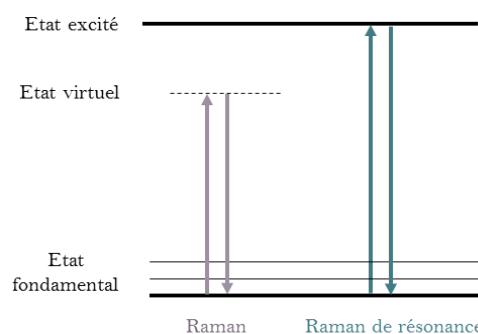


Figure 2.12 : Représentation schématique des processus de diffusion Raman et Raman de résonance.

2.3.2 Instrumentation

2.3.2.1 La spectroscopie Raman

L'arrivée des lasers sur le marché dans les années 70 a sans aucun doute participé au succès actuel de la spectroscopie Raman. En effet, de par le fait que la diffusion Raman est un phénomène intrinsèquement très faible, des sources de lumière intense telles que les lasers sont nécessaires. Les longueurs d'onde généralement utilisées se situent entre l'ultraviolet et le proche infrarouge.

En fonction du laser utilisé, il existe deux types de spectromètres : les spectromètres Raman dispersifs (excitation dans l'UV et le visible) et à transformée de Fourier (excitation dans le proche infrarouge). Seul le principe des spectromètres Raman dispersifs sera décrit ici.

Les spectromètres Raman sont généralement couplés à un microscope. Leur but est de focaliser le faisceau sur l'échantillon et de diriger ensuite les photons diffusés vers le spectromètre. Afin de séparer le signal d'intérêt du signal Rayleigh qui est beaucoup plus intense, un filtre holographique de type « notch » par exemple est utilisé. Les photons diffusés sont envoyés vers un réseau de diffraction par un trou confocal afin qu'ils soient séparés en fonction de leur longueur d'onde. Le trou confocal permet de localiser spatialement la lumière. Une caméra CCD est ensuite généralement utilisée comme détecteur car elle permet une mesure simultanée de l'intensité des différentes longueurs d'onde (Figure 2.13). Le nombre de traits constituant le réseau dispersif et la distance focale du spectromètre font partis des principaux paramètres influençant la résolution spectrale. En effet, plus ces derniers seront grands, plus la résolution sera meilleure.

Toutefois, il est important de noter qu'il est nécessaire de calibrer le système avant toute mesure étant donné que les mesures Raman sont des mesures de longueur d'onde relatives.

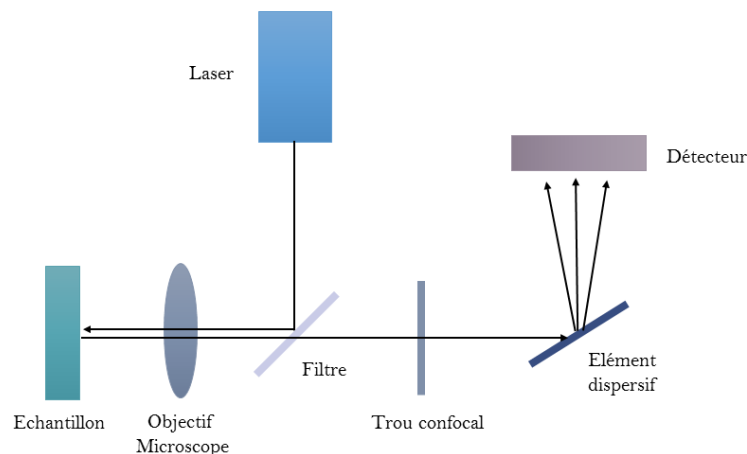


Figure 2.13 : Principe d'un spectromètre Raman.

2.3.2.2 La microspectroscopie Raman

Dans ce manuscrit, malgré que les spectromètres Raman soient généralement toujours équipés d'un microscope, le terme de microspectroscopie Raman fera référence comme dans le cas de la microspectroscopie infrarouge à diviser une zone à analyser en pixels et à mesurer ensuite les spectres Raman un à un au niveau de ces derniers. Des cartes en fausses couleurs pourront être ensuite créées montrant la différence d'intensité d'une bande par exemple. En microspectroscopie Raman, la résolution spatiale est généralement définie par la limite de diffraction en raison de la longueur d'onde utilisée. Elle est donc de l'ordre du μm .

Au cours de ces dernières années, de nouveaux systèmes d'acquisition plus rapides ont été développés dont un appelé le mode ligne (Schlücker *et al.*, 2003). Le principe consiste à illuminer l'échantillon selon une ligne et non plus selon un point, ce qui permet d'acquérir en simultané un ensemble de spectres sur une dimension tout en gardant une très haute résolution spatiale. Cette méthode répartie donc la densité de puissance du laser sur une ligne plutôt que sur un point, ce qui peut être un avantage ou un inconvénient selon l'échantillon étudié.

2.3.3 La spectroscopie Raman exaltée de surface

Dans le cadre de très faibles concentrations d'espèces diffusantes et/ou de très faibles sections efficaces de diffusion, la faible intensité des signaux Raman peut vite devenir un problème majeur. Un moyen de surmonter ce problème est l'effet Raman exalté de surface (SERS en anglais). L'effet SERS permet d'observer une amplification du signal Raman de molécules qui sont adsorbées à la surface d'un substrat nanostructuré d'un métal noble de type argent ou or le plus souvent. Deux mécanismes sont en jeu pour expliquer l'exaltation du signal Raman : un mécanisme d'origine électromagnétique qui génère une exaltation de l'ordre de 10^{10} à 10^{12} et un d'origine chimique qui génère une amplification de l'ordre de 10^2 à 10^3 (Le Ru et Etchegoin, 2009).

Dans le premier cas, deux facteurs contribuent à l'exaltation locale du champ électromagnétique : l'effet de pointe et la résonance du plasmon de surface. Le premier est lié aux propriétés géométriques de la surface métallique. En effet, lorsqu'un métal est illuminé par un faisceau lumineux monochromatique, le champ électromagnétique exciteur entraîne un déplacement des charges électriques à la surface de celui-ci vers des zones de fortes courbures. Cela a pour conséquence une exaltation du champ électrique local. Cependant, l'effet d'exaltation diminue très rapidement avec la distance. C'est pourquoi l'effet SERS est un phénomène de surface.

Le deuxième facteur mis en jeu dans le mécanisme d'exaltation d'origine électromagnétique est la résonance du plasmon de surface. Il dépend fortement de la réponse optique de la surface métallique. De manière simple, un métal peut être considéré comme un réseau de cations entourés d'un nuage d'électrons libres. L'application d'une onde électromagnétique entraîne une polarisation des électrons à la surface en produisant un moment électrique oscillant de même fréquence.

Lorsque cette fréquence atteint une certaine valeur propre au plasma, un régime de résonance s'installe correspondant à l'oscillation de l'ensemble des électrons libres. Cependant, l'excitation des électrons du plasmon de surface par les photons du faisceau incident n'est possible que si la surface métallique est suffisamment rugueuse. Les facteurs d'exaltation dépendent donc de la forme des irrégularités de la surface.

Dans le cas des solutions colloïdales, les spectres d'absorption dans le visible des colloïdes résultent de la résonance des plasmons de surface. L'expérience montre que le maximum d'exaltation est observé lorsque la longueur d'onde excitatrice se trouve centrée au maximum de la bande d'absorption UV-Visible du colloïde. Pour les colloïdes d'argent, cette bande se retrouve entre 380 et 470 nm selon leur taille et entre 490 et 600 nm pour l'or. C'est pour cette raison que ces métaux sont les principaux utilisés pour la spectroscopie Raman exaltée de surface.

Dans le cas du mécanisme chimique, le changement de la polarisabilité de la molécule suite à sa fixation sur la surface métallique est la cause principale de l'exaltation. Ce mécanisme peut être envisagé même dans le cas où la surface métallique est lisse contrairement aux mécanismes électromagnétiques. L'explication la plus souvent mise en avant pour expliquer ce changement de polarisabilité est un transfert de charge entre le métal et la molécule adsorbée.

2.3.4 La spectroscopie Raman des protéines

Comme pour la spectroscopie infrarouge, des vibrations provenant du squelette peptidique vont pouvoir être observées sur le spectre Raman d'une protéine (Figure 2.14). Cependant, contrairement à la spectroscopie infrarouge, ce sont les bandes amide I et amide III qui sont le plus couramment utilisées pour étudier la structure secondaire des protéines (Pelton et McLean, 2000). En effet, il existerait une corrélation entre amide III et les angles de Ramachandran due au couplage des vibrations $\nu(\text{C-N})$ avec les vibrations de déformation C_αH qui dépendent de l'orientation de la liaison $\text{NH-C}_\alpha\text{H}$ (Mikhonin *et al.*, 2006). Le tableau 2.3 présente la position des bandes amide I et III en fonction de la structure secondaire des protéines.

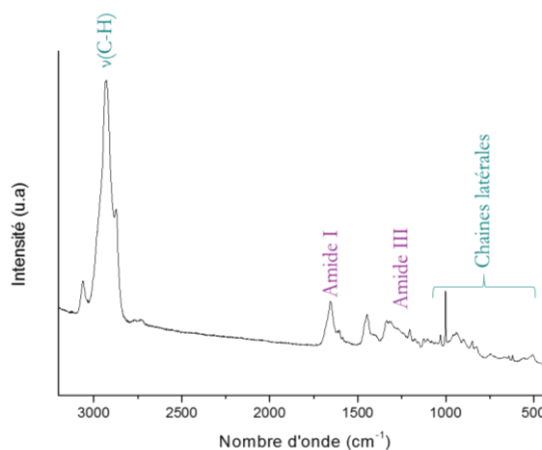


Figure 2.14 : Spectre Raman caractéristique d'une protéine entre 3800 et 400 cm^{-1} .

Structure secondaire	Position de la bande amide I (cm ⁻¹)	Position de la bande amide III (cm ⁻¹)
Hélices α	1660-1650	1300-1270
Feuillets β	1672-1663	1240-1230
Coudes	1656-1652	1280-1270
	1685-1674	
Structures désorganisées	1670-1660	1245-1240

Tableau 2.3 : Position des bandes amide I et amide III en fonction de la structure secondaire (Maiti *et al.*, 2004 ; Sane *et al.*, 1999).

Les vibrations provenant des chaînes latérales des résidus d'acides aminés pourront être également observés sur les spectres Raman, permettant d'obtenir des informations sur l'état de protonation des acides aminés ou la coordination avec des métaux par exemple (Torreggiani *et al.*, 2003 ; Zhu *et al.*, 2011).

2.4 La spectroscopie infrarouge vs la spectroscopie Raman

La spectroscopie infrarouge et Raman sont deux méthodes qui permettent d'accéder à des informations vibrationnelles. Mais la nature des règles de sélection pour autoriser l'observation d'une transition vibrationnelle est différente. Effectivement, pour qu'une transition ait lieu en infrarouge, la vibration doit entraîner une variation du moment dipolaire permanent de la molécule alors qu'en Raman, elle doit engendrer une modification de la polarisabilité de la molécule. Cela a pour conséquence que certaines vibrations sont actives en infrarouge mais pas en Raman et inversement. Les spectroscopies infrarouges et Raman apparaissent donc comme des méthodes complémentaires. Ainsi, afin d'obtenir une étude vibrationnelle complète, il est nécessaire d'avoir recours à la fois à la spectroscopie infrarouge et à la spectroscopie Raman.

Cependant, certains paramètres peuvent parfois orienter l'étude d'un échantillon sur une méthode en particulier. Par exemple, en raison des règles de sélection, le solvant utilisé tel que l'eau peut être un facteur de choix. En effet, l'eau étant une molécule très polaire donne lieu à de nombreuses bandes intenses en infrarouge par rapport au Raman où sa contribution est très faible.

La taille des objets à analyser peut également être un critère de choix supplémentaire puisque la spectroscopie Raman permet d'étudier de plus petits éléments en raison de sa résolution spatiale qui est de l'ordre du μm comparée à celle de la spectroscopie infrarouge qui est de l'ordre de quelques μm (pour plus de détails, se référer aux paragraphes 2.2.2.2 et 2.3.2.2).

Toutefois, la spectroscopie Raman présente également quelques désavantages. En effet, malgré l'utilisation de sources excitatrices à forte énergie, les spectres de vibration résultant de l'effet Raman sont peu intenses. Ainsi, le rapport signal/bruit est généralement plus faible que pour la spectroscopie infrarouge et le signal Raman peut facilement être masqué par le phénomène de fluorescence. Ce processus est courant notamment lorsque l'onde excitatrice à une énergie voisine

de celle d'une transition électronique. Néanmoins, la fluorescence d'impuretés contenues même en très faible concentration dans l'échantillon peut également empêcher l'observation des bandes Raman de ce dernier.

2.5 Application de la spectroscopie vibrationnelle dans l'étude des maladies neurodégénératives

Depuis plusieurs années, l'utilisation de la spectroscopie vibrationnelle pour des applications biomédicales n'a cessé d'augmenter. Les principales raisons de cette augmentation sont : la capacité des spectroscopies infrarouge et Raman à fournir des informations sur la composition et la structure moléculaire d'un échantillon ainsi que les progrès réalisés sur l'instrumentation et les méthodes bio-informatiques pour l'analyse des données qui permettent d'étudier de nombreux échantillons sains et malades incluant les cellules isolées, les tissus et les biofluides.

Un des domaines de recherche les plus actifs est celui du cancer. En effet, des milliers d'études ont été reportées pour montrer le potentiel de ces méthodes à discriminer des cellules saines, des cellules cancéreuses et ce, que ce soit pour le cancer du cerveau (Zhou *et al.*, 2012), du sein (Benard *et al.*, 2014), des ovaires (Krishna *et al.*, 2007), de l'estomac (Colagar *et al.*, 2011), de la prostate (Pezzei *et al.*, 2010), du poumon (Lee *et al.*, 2009), de l'œsophage (Maziak *et al.*, 2007) ou du colon (Nallala *et al.*, 2014) par exemple.

De nombreuses études ont également été menées dans le cadre des maladies des os (Isaksson *et al.*, 2010) ou dans la caractérisation et l'identification microbienne (Xu *et al.*, 2011).

Les maladies neurodégénératives telles que la maladie à Prion (Kretlow *et al.*, 2006), la maladie de Huntington (André *et al.*, 2013), la maladie de Parkinson (Szczerbowska-Boruchowska *et al.*, 2007), la sclérose en plaques (Heraud *et al.*, 2010) ou la maladie d'Alzheimer (Choo *et al.*, 1996) ont également fait l'objet de plusieurs études. Cependant dans cette partie, seules les études concernant la maladie d'Alzheimer, la maladie à corps de Lewy et la sclérose en plaques seront listées. Il est toutefois important de noter que cette partie ne prétend pas être exhaustive.

2.5.1 Etude des tissus

Dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, la plupart des études ont été menées dans le but d'identifier les plaques séniles. Ainsi, en 1996, Choo *et al.* observent à l'aide de la microspectroscopie infrarouge une diminution de la bande à 1653 cm^{-1} et une augmentation de celle à 1631 cm^{-1} au niveau des plaques séniles par rapport au tissu environnant. Cela montre que les protéines situées au sein des plaques possèdent une structure en feuillets β alors que celles du tissu environnant présentent une structure hélicoïdale. Ces données sont en accord avec celles

obtenues par Liao *et al.* qui ont étudiés les plaques séniles d'un patient de 91 ans atteint de la maladie d'Alzheimer (2013), ainsi qu'avec celles de Miller *et al.* qui ont démontré en plus, la présence d'ions Cu^{2+} et Zn^{2+} au sein des plaques séniles par combinaison de la microspectroscopie infrarouge avec la fluorescence X (2006).

Des études ont également été menées sur des souris transgéniques présentant la maladie d'Alzheimer (Kuzyk *et al.*, 2010 ; Liao *et al.*, 2013. ; Leskovjan *et al.*, 2010 ; Rak *et al.*, 2007). Comme précédemment, la présence de protéines sous forme de feuillettes β a été observée au niveau des plaques séniles.

Des dépôts de créatine ont aussi été mis en évidence par microspectroscopie infrarouge au sein de l'hippocampe de souris transgéniques mais aucune corrélation spatiale n'a pu être établie entre ces derniers et les plaques séniles (Kuzyk *et al.*, 2010).

Liao *et al.* se sont également intéressés à la signature spectrale bien définie des lipides en infrarouge. Ils ont ainsi mis en évidence à l'aide de la bande à 2850 cm^{-1} ($\nu_s\text{CH}_2$), la présence de lipides autour des plaques et à l'intérieur de ces dernières (2013).

De même, Benseny-Cases *et al.* ont montré à partir de la bande à 3012 cm^{-1} ($\nu=\text{CH}$), une quantité plus importante de lipides insaturés au sein des plaques de patients atteints de la maladie d'Alzheimer par rapport à un patient contrôle qui présentait des plaques mais pas la pathologie (2014).

Leskovjan *et al.* ont montré quant à eux des différences dans la quantité de lipides insaturés présents dans les régions de la substance blanche de l'hippocampe de souris modèles transgéniques par rapport à des souris contrôles (2010). En effet, ils ont observé que la quantité de lipides insaturés augmente de façon significative avec l'âge pour les souris contrôles alors qu'elle reste faible pour les souris transgéniques. Ils attribuent cette diminution soit à une altération de la gaine de myéline, soit à une diminution de la quantité d'oligodendrocytes ou à une déficience dans l'absorption des acides gras essentiels nécessaires à la biosynthèse des acides gras poly-insaturés. Ils évoquent aussi la possibilité que les peptides $\text{A}\beta$ contribuent à la diminution des lipides insaturés via la réduction de métaux qui entraînent la production d'espèces réactives à l'oxygène et donc à la peroxydation des lipides.

D'autres chercheurs ont montré le potentiel de coupler les mesures infrarouges à des méthodes de classification automatiques telles que des réseaux de neurones artificiels pour diagnostiquer la maladie d'Alzheimer (Choo *et al.*, 1995 ; Pizzi *et al.*, 1995).

Très peu d'études ont été réalisées par microspectroscopie Raman. La première reportée date de 2009 où Chen *et al.* montrent que l'hippocampe est un candidat important pour l'étude de la pathologie de la maladie d'Alzheimer. En 2015, Kiskis *et al.* montrent une colocalisation entre les

lipides et les plaques séniles grâce au couplage de la spectroscopie CARS (Coherent Anti Stokes Raman Spectroscopy) à la microscopie biphotonique de la thioflavine.

Dans le cadre de la sclérose en plaques, Choo *et al.* mettent en évidence par spectroscopie infrarouge une diminution de la quantité des lipides au niveau des lésions cérébrales observées chez les patients atteints de cette maladie, ce qui confirme la destruction de la gaine de myéline au cours de la maladie (1993). En 2010, Heraud *et al.* confirment par leurs études menées sur des modèles animaux par microspectroscopie infrarouge, la diminution des lipides au sein des lésions via la diminution de la bande à 1735 cm^{-1} ($\nu\text{C=O}$) et mettent également en évidence une augmentation de la quantité d'acides nucléiques au sein de ces dernières au travers de la bande à 965 cm^{-1} ($\nu\text{P-O-C}$). Ils attribuent cette augmentation à la présence de cellules nucléées telles que les macrophages ou les lymphocytes. Ils montrent aussi que l'utilisation de réseaux de neurones artificiels permet de discriminer avec une excellente sensibilité et spécificité les lésions.

L'implication des radicaux libres dans la pathologie de la sclérose en plaques a également été étudiée par microspectroscopie infrarouge par la mise en évidence de produits d'oxydation des protéines et des lipides au sein des lésions à partir de l'augmentation de la bande à 1740 cm^{-1} ($\nu\text{C=O}$), de la diminution de celle à 1468 cm^{-1} (δCH_2) et de l'élargissement de la bande amide I (Levine et Wetzel, 1998).

Concernant la maladie à corps de Lewy, aucune étude n'a été répertoriée dans la littérature à notre connaissance. Toutefois, Araki *et al.* ont étudié par microspectroscopie infrarouge, les corps de Lewy présents au sein de cerveaux de patients atteints de la maladie de Parkinson (2015). Ils observent une augmentation de la quantité de lipides et un déplacement de la bande amide I vers de plus faibles nombres d'onde au niveau des corps de Lewy, ce qui suggère une augmentation des structures en feuillets β . Le contour des corps de Lewy présenterait néanmoins, plus de protéines sous forme de feuillets β que le centre.

2.5.2 Etude des biofluides

Etudier les biofluides apporte un avantage majeur dans la compréhension et dans le diagnostic des maladies puisqu'ils peuvent être prélevés facilement chez les patients contrairement aux tissus où très peu de biopsies cérébrales sont réalisées.

Dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, différentes études ont été menées sur le plasma, le sang, le sérum ou le liquide céphalorachidien afin de démontrer le potentiel de la spectroscopie infrarouge et Raman dans le diagnostic de cette maladie (Burns *et al.*, 2009 ; Carmona *et al.*, 2015 ; Griebe *et al.*, 2007 ; Peuchant *et al.*, 2008 ; Ryzhikova *et al.*, 2015 ; Sevinc *et al.*, 2015). Par exemple, Carmona *et al.* ont réussi à l'aide de la spectroscopie infrarouge à discriminer des échantillons de sang provenant de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et de patients contrôles avec une sensibilité

de 89% et une spécificité de 92% ; spécificité qui peut atteindre 100% dans le cas de patients atteints de la maladie au stade prodromal (2013).

De même, Ryzhikova *et al.* ont réussi à différencier par spectroscopie Raman, des échantillons de sérum provenant de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, de patients atteints d'autres démences et de patients sains avec une sensibilité et une spécificité de plus de 95% (2015). Ils démontrent également le potentiel d'utiliser des réseaux de neurones artificiels sur les données Raman comme l'avait fait Griebel *et al.* pour la spectroscopie infrarouge (2007).

D'autres études infrarouge et Raman se sont portées sur le développement de biosenseurs afin de détecter l'ensemble des peptides A β quelle que soit leur conformation (Chou *et al.*, 2008 ; Nabers *et al.*, 2016). Nabers *et al.* observent par exemple un déplacement de la bande amide I vers de plus faibles nombres d'onde pour les échantillons (liquide céphalorachidien ou plasma) provenant de patients atteints de la maladie d'Alzheimer par rapport à ceux obtenus de patients contrôles, suggérant l'augmentation de peptides A β organisés sous forme de feuillet β . La précision dans la séparation des deux groupes est de 90% dans le cas des échantillons de liquides céphalorachidien et de 84% dans le cas des échantillons de plasma.

Dans le cadre de la sclérose en plaques, seule une étude a été répertoriée à notre connaissance dans la littérature. Elle porte sur l'étude de liquides céphalorachidiens par spectroscopie infrarouge et montre notamment une diminution de la quantité de lipides au sein de ce dernier pour les patients atteints de la maladie (Sevinc *et al.*, 2015).

Concernant la maladie à corps de Lewy, aucune étude n'a été reportée à notre connaissance.

Conclusion :

La spectroscopie infrarouge et Raman sont deux méthodes non destructives, qui ne nécessitent peu ou pas de préparation d'échantillons et qui permettent d'accéder à la composition moléculaire d'un échantillon au travers des vibrations de ses liaisons.

Au cours des années, beaucoup d'efforts ont été faits pour essayer notamment d'améliorer les points forts et les points faibles de chaque technique avec par exemple l'utilisation de la lumière synchrotron pour augmenter la résolution spatiale de la microspectroscopie infrarouge ou le développement du SERS pour augmenter la sensibilité de la spectroscopie Raman.

A l'heure d'aujourd'hui, ces techniques offrent donc la possibilité de travailler sur des échantillons biologiques à très petite échelle. L'enjeu de ce travail de recherche est donc d'appliquer ces méthodes à l'étude des maladies neurodégénératives afin de mieux comprendre et diagnostiquer ces maladies.

Chapitre 3 :

Matériels et méthodes

3.1 Préparation des échantillons

3.1.1 Préparation des peptides synthétiques

3.1.1.1 DAHK et GHK

Le peptide GHK a été acheté à la société Bachem (Suisse) et le peptide DAHK à la société Bachem (Suisse) ou GeneCust (Dudelange, Luxembourg).

L'acide trifluoroacétique (TFA) a été au préalable supprimé des échantillons par lyophilisation et traitement à l'HCl en raison de sa forte contribution en spectroscopie infrarouge (IR) et Raman. Pour ce faire, les peptides ont été dissouts à une concentration de 1 mg/mL dans une solution aqueuse d'HCl 10 mM. Puis, les solutions ont été congelées avec de l'azote liquide avant d'être lyophilisées (Andrushchenko *et al.*, 2007). L'opération a été répétée deux fois. Les peptides ont ensuite été dissouts dans de l'eau distillée et le pH a été ajusté par ajout de NaOH ou HCl à 6.8 ou 8.9. La concentration finale de chacun des peptides a été déterminée par titration à l'aide d'un spectromètre UV/Visible Cary 300. Pour ce faire, les solutions stocks ont été diluées 50 fois et des quantités de Cu(II) de concentration connue ont été ajoutées jusqu'à ce que la bande d-d n'augmente plus. Elle se situe vers 520 nm dans le cas de DAHK et vers 607 nm dans celui de GHK. Cette bande caractérise la formation du complexe entre le cuivre et le peptide.

Pour former les complexes [peptide-métal], des solutions stocks aqueuses de concentration 10 mM ont été préparées à partir de ZnCl₂ (Sigma-Aldrich) et CuCl₂.H₂O (Riedel-de-Haen). Elles ont ensuite été ajoutées aux solutions de DAHK et GHK dans un rapport 0.9 :1 et le pH a été vérifié. Toutes les solutions stocks ont été conservées à -20°C.

3.1.1.2 Les amyloïdes β

Dans le cadre de ce projet de recherche, trois peptides amyloïdes ont été étudiés : A β 16, A β 40 et A β 42. Le peptide A β 16 a été acheté à la société Genecust (Dudelange, Belgique). Les peptides A β 40 et A β 42 proviennent de la société rPeptide (Leipzig, Allemagne).

L'acide trifluoroacétique a été au préalable supprimé des échantillons A β 16, A β 40 et A β 42 par lyophilisation et traitement à l'HCl selon le même protocole que pour les peptides DAHK et GHK. Les peptides ont ensuite été resuspendus dans de l'eau distillée avec du NaOH à une concentration de 1 mg/mL afin de limiter l'agrégation des peptides puis soniqués durant 30 s environ afin de faciliter leur remise en solution (notamment pour les peptides A β 40 et A β 42) (Fezoui *et al.*, 2000 ; Teplow, 2006, Ryan *et al.*, 2013). Le pH a ensuite été ajusté à 6.8 ou 8.9 par ajout d'HCl. La concentration finale des peptides a été vérifiée en mesurant l'absorption de la tyrosine à 275 nm ($\epsilon=1410 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$).

Des complexes [peptide-métal] ont également été formés à partir des peptides A β 16 et A β 40. Pour ce faire, des solutions stocks aqueuses de concentration 10 mM ont été préparées à partir de ZnCl₂ (Sigma-Aldrich) et CuCl₂.H₂O (Riedel-de-Haen), ainsi qu'une solution aqueuse (pH 7.5) de

concentration 2 mM à partir du cytochrome *c* (Sigma-Aldrich) et une solution aqueuse basique de concentration 4 mM à partir d'hémine (Sigma-Aldrich). Les solutions d'ions métalliques, de cytochrome *c* et d'hémine ont ensuite été ajoutées aux solutions d'Aβ16 et/ou Aβ40 dans un rapport 0.9 : 1, 1 : 1 et 1 : 2,5 respectivement et le pH a été vérifié. Les solutions d'Aβ16 et Aβ40 possèdent un pH de 8 environ avant l'ajout des ions métalliques afin d'éviter de passer par le point isoélectrique des peptides lors de l'ajout de ce dernier, et donc d'éviter l'agrégation des peptides. Les solutions d'Aβ16 ont été stockées à -20°C et celles d'Aβ40 et 42 à température ambiante.

3.1.2 Préparation des composés modèles

Les différents composés modèles présents au sein du cerveau ou dans le liquide céphalorachidien étudiés dans le cadre de ces travaux de recherche ont été achetés chez Sigma-Aldrich. Les solutions ont été préparées en utilisant de l'eau milli-Q.

Dans le cadre de l'étude des tissus cérébraux, la sérum albumine humaine, le glucose, l'ADN et l'asolectine (extrait de soja) ont été analysés. L'asolectine est un mélange de phospholipides. Il se compose approximativement de 29% de phosphatidylcholine (PC), 30% de phosphatidylethanolamine (PE), 26% de phosphatidylinositol (PI), 14% d'acide phosphatidique (PA), et de 1% de phosphatidylserine (PS) (Meidleman, 1993). Aucune des concentrations n'a été mesurée.

Par contre, dans le cadre de l'étude des liquides céphalorachidiens, la concentration de chaque composé a été choisie de manière à être en accord avec la valeur moyenne mesurée chez un adulte au sein du liquide céphalorachidien lorsque la pesée des échantillons n'était pas une limite. Le tableau 3.1 résume les différents composés étudiés, ainsi que les valeurs utilisées et les valeurs moyennes (Diem et Lentner, 1973).

Composés	Valeur utilisée	Valeur moyenne
Substances azotées		
Sérum albumin humaine (mg/L)	200	244 (protéines)
Urée (mg/L)	250	250
Histamine (µg/L)	1.30E+03	9.7
Acide urique (mg/L)	2.9	2.9
Créatine (mg/L)	11.9	11
Bilirubine (mg/L)	0.17	<0.1
Créatinine (mg/L)	5.9	10
Acétylcholine (µg/L)	6.20E+03	<20
Hypoxanthine (mg/L)	1.6	1.3
Lipides		
Asolectine (mg/L)	5.4	5.49 (phospholipides)
Cholestérol (mg/L)	7.2	4

Glucides et métabolites non azotés		
Acide lactique (mol/L)	0.3	-
Glucose (mg/L)	600	635
Vitamines		
Thiamine = Vitamine B1 (µg/L)	2.50E+03	15
Pyridoxine = Vitamine B6 (µg/L)	4.70E+03	0.38
Acide folique = Vitamine B9 (µg/L)	1.40E+03	10
Acide ascorbique = Vitamine C (mg/L)	3.6	12
Cobalamine = Vitamine B12 (ng/L)	3.90E+06	15

Tableau 3.1: Liste des composés modèles étudiés présents dans le liquide céphalorachidien. Les concentrations massiques ou molaires utilisées pour chacun d'entre eux ainsi que leur valeur moyenne mesurée chez un adulte sont également mentionnées.

3.1.3 Préparation des tissus

Tous les tissus étudiés ont été fournis et préparés par le laboratoire de la Myéline, Neuroprotection et Stratégies Thérapeutiques du Pr. A.G Mensah-Nyagan, Inserm U1119, Strasbourg. Les procédures impliquant des animaux et leur prise en charge ont été menées dans le respect d'une directive du Conseil des Communautés européennes (86/609 / CEE) et sous la supervision des enquêteurs autorisés. Les protocoles ont été examinés et approuvés par le siège social de l'Alsace du Département des vétérinaires français et Guide de la santé publique pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire.

3.1.3.1 La maladie d'Alzheimer

Dans le cadre de ce projet de recherche, des souris hémizygotés femelles APPSWE (B6, SJL-Tg (APPSWE) 2576 Kha, hétérozygotie vérifiée pour le gène RD1 qui est un gène responsable de la vision, Taconic Europe, Denmark) ont été utilisées. Les souris Tg2576 portent un transgène codant pour une isoforme mutante de 695 acides aminés de la protéine amyloïde précurseur humaine (APP) entraînant une surexpression des peptides A β . Ces derniers s'agrègent de manière accrue avec l'âge de l'animal formant ainsi des plaques amyloïdes. De nombreuses études ont décrit également des déficits cognitifs et de mémoire spatiale chez ces animaux, s'aggravant avec l'âge mais pouvant être mis en évidence dès l'âge de 3 mois (Hsiao *et al.*, 1996 ; Westerman *et al.*, 2002 ; Mawuenyega *et al.*, 2010).

Les souris Tg2576 et leurs homologues de type sauvage (WT) ont été obtenus à l'âge de 6 mois et après 4 semaines d'adaptation au sein de l'animalerie, ils ont été tous les mois soumis à des analyses comportementales (de 7 mois à 18 mois) en utilisant la tâche de la nouveauté spatiale qui permet d'évaluer leurs performances cognitives. Cette tâche est basée sur la tendance spontanée des souris

à explorer de manière préférentielle des objets qui ont été déplacés à l'intérieur d'un agencement d'objets familiers. Les souris Tg2576 sont profondément altérées dans cette tâche indépendamment de la mutation rd (Ognibene *et al.*, 2005 ; Yassine *et al.*, 2013). Les souris Tg2576 montrant un fort déficit cognitif et les souris WT ont ensuite été tuées et décapitées afin de récupérer leur cerveau. Afin d'éviter toutes contributions supplémentaires à celles de l'échantillon, la congélation des tissus frais directement après sacrifice a été préférée à l'inclusion des tissus dans la paraffine (Gazi et Gardner, 2010). Ainsi, les cerveaux ont été immergés rapidement dans un gel d'OCT (de l'anglais optimal cutting temperature compound) puis congelés par immersion dans de l'isopentane (refroidi à -40°C). L'OCT est un cryoconservateur liquide, transparent à température ambiante et blanc et dur à partir de -20°C (Shim et Wilson, 1996). Il préserve le tissu des congélations/décongélations en évitant la formation de cristaux au sein de ce dernier et le protège de tout contact. Des coupes coronales successives d'une épaisseur de 10 µm ont ensuite été réalisées à l'aide d'un cryostat Reichert-Jung, LEICA puis déposées sur des fenêtres en BaF₂ ou CaF₂ alternativement selon si les échantillons étaient destinés pour les mesures IR ou Raman respectivement. Le BaF₂ et CaF₂ sont tous deux des matériaux transparents à la lumière visible et infrarouge. Cependant le BaF₂ a été préféré pour les mesures IR car il permet de mesurer jusqu'à 800 cm⁻¹ contrairement au CaF₂ qui permet de mesurer jusqu'à 1000 cm⁻¹ environ. Quelques coupes ont également été déposées sur une fenêtre en silicium afin de pouvoir réaliser des mesures en lointain IR. Chacune des coupes a été conservée à -80°C jusqu'à leur utilisation.

3.1.3.2 La sclérose en plaques

Des souris femelles SJL/L âgées de 9 semaines (Janvier, France) ont été utilisées dans le cadre de ce projet. Après 5 jours d'adaptation au sein de l'animalerie, les souris ont été immunisées par voie sous cutanée avec un fragment de la protéine protéolipide de la myéline (PLP : 139-151) en présence d'adjuvant complet de Freund, afin d'induire le développement d'une encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE). L'EAE est un modèle très couramment utilisé pour l'étude de la sclérose en plaques et l'injection de PLP : 139-151 permet de favoriser la forme récurrente-rémittente de la maladie ; forme majoritaire de la sclérose en plaques (Soellner *et al.*, 2013). Néanmoins, l'injection seule de cette dernière ne permet pas d'induire la maladie. L'utilisation d'adjuvant est donc nécessaire puisqu'il permet d'accroître la réponse immunitaire envers un antigène lorsque celui-ci est administré en même temps. L'adjuvant complet de Freund est composé d'huile minérale (huile de paraffine), d'agents émulsifiants (monooléate de mannide) et de mycobactéries (*Mycobacterium tuberculosis*). Dans le cas des souris contrôles, seul l'adjuvant complet de Freund leur a été injecté.

Après l'immunisation, le poids et le score clinique de chaque souris ont été reportés tous les jours jusqu'à ce qu'elles soient sacrifiées. Le score clinique d'une souris est défini selon une échelle de 0 à 10 où la valeur attribuée dépend des signes cliniques observés (Tableau 3.2). La moitié des souris ont été sacrifiées au pic de la maladie, c'est-à-dire 17 jours après immunisation et l'autre moitié, 24

jours après immunisation ; c'est-à-dire juste avant la rechute. Chacun des cerveaux a ensuite été récupéré, congelé avec de l'azote liquide puis immergé dans un gel d'OCT. Des coupes sagittales d'une épaisseur de 10 µm ont été réalisées à l'aide d'un cryostat Reichert-Jung, LEICA puis déposées sur des fenêtres en BaF₂ ou CaF₂ selon si les échantillons étaient destinés pour les mesures IR ou Raman respectivement. Les coupes ont été placées à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Score clinique	Signes cliniques	Commentaires
0	Aucun signe clinique	Démarche normale, queue en mouvement, droite
1	Queue partiellement molle	Démarche normale, bout de la queue affaissée
2	Paralysie de la queue	Démarche normale, queue affaissée
3	Parésie des membres postérieurs, mouvements non coordonnés	Démarche non coordonnée, réponse des membres postérieurs lorsqu'ils sont pincés, queue molle
4	Paralysie d'un membre postérieur	Démarche non coordonnée avec l'un des membres postérieurs traînant, pas de réponse pour l'un des membres postérieurs lorsqu'il est pincé
5	Paralysie des deux membres postérieurs	Démarche non coordonnée avec les deux membres postérieurs traînants, pas de réponse pour les deux membres postérieurs lorsqu'ils sont pincés, queue molle
6	Paralysie des membres postérieurs, faiblesse des membres antérieurs	Démarche non coordonnée avec difficulté des membres antérieurs à tirer le corps, réflexe des membres antérieurs aux pincements
7	Paralysie des membres postérieurs et d'un membre antérieur	Souris ne peut pas se déplacer, réponse des membres antérieurs aux pincements des orteils, queue molle
8	Paralysie des membres postérieurs et antérieurs	Souris ne peut pas se déplacer, aucune réponse des membres antérieurs aux pincements des orteils, queue molle
9	Moribond	Aucun mouvement, respiration difficile
10	Mort	-

Tableau 3.2 : Echelle des scores cliniques (Bittner *et al.*, 2014).

3.1.4 Préparation des liquides céphalorachidiens

Les différents échantillons de liquides céphalorachidiens (LCR) étudiés ont été fournis par le Dr. Frédéric Blanc (Laboratoire Icube, Strasbourg) et le Dr. Olivier Bousiges (HUS, Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Strasbourg). Ils ont été prélevés par ponction lombaire chez 5 groupes de patients : des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (MA) au stade prodromal ou

démence, des patients atteints de la maladie à corps de Lewy (MCL) au stade prodromal ou démence et des patients contrôles. Le tableau 3.3 résume le nombre de patients appartenant à chaque groupe avec la moyenne d'âge correspondante.

Pathologie et stade de démence	Nombre de patients	Moyenne d'âge
Contrôle	9	62,3 (\pm 9,5)
MA stade prodromal (MCI)	14	69,6 (\pm 9,5)
MA stade démence	17	66,2 (\pm 9,5)
MCL stade prodromal (MCI)	23	64,5 (\pm 8,8)
MCL stade démence	12	68,5 (\pm 9,3)

Tableau 3.3 : Nombre de patients et moyenne d'âge (\pm écart type) appartenant aux différents groupes étudiés : Contrôle, MA stade prodromal et démence, MCL stade prodromal et démence.

Les patients MA ont été sélectionnés selon les critères d'Albert et de Dubois pour les patients MA-prodromal (Albert *et al.*, 2011 ; Dubois *et al.*, 2007) et selon les critères de McKhann et de Dubois pour les patients MA-démence (McKhann *et al.*, 2011 ; Dubois *et al.*, 2007). Les patients MCL quant à eux, ont été sélectionnés selon les critères Petersen et DSM-V pour les patients MCL-prodromal (Petersen, 2004), et selon les critères de McKeith et DSM-V pour les patients MCL-démence (McKeith *et al.*, 2005). En ce qui concerne les patients contrôles, ils présentent des troubles cognitifs mais ne montrent aucun signe clinique de la maladie d'Alzheimer ou de la maladie à corps de Lewy. Le groupe inclut des patients souffrant de maladie psychiatrique (dépression par exemple) (n=2), de traumatisme crânien plus dépression (n=1), du syndrome de l'apnée du sommeil plus traumatisme crânien plus alcoolisme (n=1), de neuroborréliose (n=1), de traumatisme crânien plus angiome caverneux plus gyrus Heschel (n=1) ou d'une prémutation de l'X fragile (n=1).

Des dosages biochimiques des biomarqueurs A β 42, tau et phospho-tau ont également été réalisés sur ces échantillons mais n'ont pas été pris en compte pour la classification.

Après prélèvement, les différents échantillons ont été centrifugés afin d'éliminer tout élément figuré puis stockés à -80°C. Ensuite, un aliquot de 50 μ L de chaque LCR a été lyophilisé pendant 24h puis redissout dans 10 μ L d'eau milliQ.

3.2 Préparation des solutions colloïdales

Depuis quelques années, de nombreuses stratégies ont été développées afin de préparer des solutions colloïdales contenant différents types de nanoparticules de taille différente (Aiken et Finke, 1999 ; Cushing *et al.*, 2004 ; Allmond *et al.*, 2007 ; Song *et al.*, 2007). Celle utilisée ici est la réduction chimique ; elle correspond à la méthode la plus souvent utilisée. Sur la base de cette dernière, quatre synthèses ont été testées conduisant à quatre types de nanoparticules (NP) : des nanoparticules d'or (AuNP) et d'argent (AgNP) synthétisées à partir de citrates et des nanoparticules d'argent synthétisées à partir de NaBH₄ ou d'hydroxylamine.

- Les nanoparticules d'or ont été synthétisées selon la méthode de Turkevich (Turkevich *et al.*, 1951.) Brièvement, 10,6 mg d'HAuCl₄ ont été dissouts dans 25 mL d'eau milliQ et chauffés jusqu'à ébullition. 750 µL d'une solution de citrate de sodium 1% ont ensuite été ajoutés rapidement sous forte agitation magnétique. La solution a été gardée à ébullition et sous agitation magnétique durant 20 min encore. Les nanoparticules ont été conservées dans le noir à 4°C afin qu'elles soient stables pendant plusieurs mois.
- Les nanoparticules d'argent préparées à partir de citrates ont été synthétisées selon la méthode de Lee-Meisel (Lee et Meisel, 1982). Ainsi, 22,5 mg d'AgNO₃ ont été dissouts dans 125 mL d'eau milliQ et chauffés jusqu'à ébullition. 2,5 mL d'une solution de citrate de sodium 1% ont ensuite été ajoutés rapidement sous forte agitation magnétique. La solution a été gardée sous ébullition jusqu'à ce qu'une couleur jaune apparaisse. Les nanoparticules ont été conservées dans le noir à 4°C afin qu'elles soient stables pendant plusieurs mois.
- Les nanoparticules d'argent préparées à partir de NaBH₄ ont été synthétisées selon la méthode de Creighton (Creighton *et al.*, 1979). Brièvement, 10 mL environ d'une solution glacée d'AgNO₃ (10⁻³ M) ont été ajoutés goutte à goutte sous forte agitation magnétique à 30 mL d'une solution glacée de NaBH₄ (10⁻³ M) jusqu'à l'apparition d'une couleur jaune. L'agitation magnétique a été maintenue 1h après l'apparition de la couleur. Les nanoparticules ont été conservées dans le noir à 4°C afin qu'elles soient stables pendant plusieurs mois.
- Les nanoparticules d'argent préparées à partir d'hydroxylamine ont été synthétisées selon la méthode de Leopold-Lendl (Leopold et Lendl, 2003). Ainsi, 10 mL d'une solution d'AgNO₃ (10⁻² M) ont été rapidement ajoutés à 90 mL d'une solution de chlorhydrate d'hydroxylamine /hydroxyde de soude (1.67 x 10⁻³ M/3.33 x 10⁻³ M) sous forte agitation magnétique. Les nanoparticules ont été conservées dans le noir à 4°C afin qu'elles soient stables pendant plusieurs mois.

Afin de vérifier la taille des nanoparticules et leur homogénéité, chaque solution colloïdale a été caractérisée par UV-visible (Figure 3.1.A). La solution de colloïdes d'or préparée selon la méthode de Turkevich présente un maximum d'absorption à 556 nm ; ce qui équivaut à une taille de nanoparticules supérieure à 73 nm (Tableau 3.4.A). Les solutions de colloïdes d'argent préparées selon la méthode de Lee-Meisel, de Creighton ou de Leopold-Lendl présentent quant à elles, des maximums d'absorption à 420, 397 et 427 nm respectivement. Ces valeurs correspondent respectivement à des tailles de nanoparticules de 10, 35 et 40 nm environ (Tableau 3.4.B).

Il peut être intéressant de noter que la bande d'absorption pour les nanoparticules d'or est plus large que celle des nanoparticules d'argent. Cela signifie que la solution de colloïdes d'or est moins homogène au niveau de la taille des nanoparticules que les solutions de colloïdes d'argent.

La figure 3.1.B montre une image de microscopie électronique à transmission (TEM) des nanoparticules d'argent synthétisées à partir de la méthode de Leopold-Lendl.

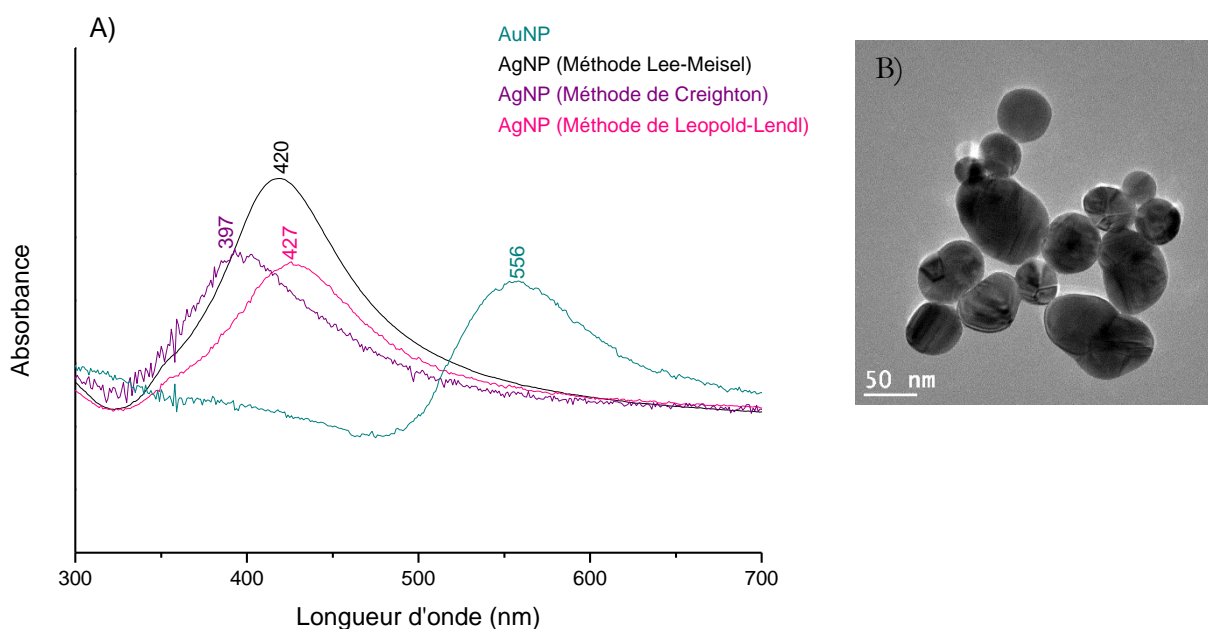


Figure 3.1 : A) Spectres d'absorption UV-visible de différentes solutions colloïdales. B) Image TEM des nanoparticules d'argent synthétisées selon la méthode de Leopold-Lendl.

A)

Taille des nanoparticules d'or (nm)	Maximum d'absorption (nm)
8-10	518
15	520
20	526
41	532
55	534
73	545

B)

Taille des nanoparticules d'argent (nm)	Maximum d'absorption (nm)
10	395
15	405
20	410
30	415
40	425
50	435
60	445
70	455
80	465

Tableau 3.4 : Taille des nanoparticules d'or (A) ou d'argent (B) en fonction de leur maximum d'absorption (Ghosh *et al.*, 2004, Kandimalla, 2010).

3.3 La spectroscopie infrarouge

3.3.1 Etude des peptides et composés modèles

Les spectres IR ont été enregistrés au sein du laboratoire à l'aide d'un spectromètre FTIR Vertex 70 (Bruker Optics, Allemagne), équipé d'une source Globar, d'un détecteur MCT (Mercury Cadmium Telluride) refroidi à l'azote liquide et d'une séparatrice en KBr. Le spectromètre est purgé en permanence par de l'air sec afin de maintenir un environnement stable et notamment en vapeur d'eau. En effet, une concentration stable et faible de cette dernière est indispensable puisqu'elle représente un des plus gros inconvénients pour l'étude d'échantillons biologiques ; l'eau absorbant très fortement dans le MIR pouvant ainsi masquer les signaux provenant de biomolécules d'intérêts telles que les protéines (Venyaminov et Prendergast, 1997).

Tous les spectres ont été mesurés en réflexion totale atténuée (ATR) à l'aide d'un cristal en diamant. 3 μ L d'échantillon ont été déposés sur le cristal puis séchés à l'air libre. Les spectres ont été enregistrés dans la région 4000-700 cm^{-1} et représentent la moyenne de 256 scans avec une résolution de 4 cm^{-1} .

3.3.2 Etude des tissus cérébraux

Les mesures de microspectroscopie IR ont été réalisées au synchrotron ANKA de Karlsruhe (ligne IR2) par l'intermédiaire d'un microscope infrarouge IRscope II (Bruker Optics, Allemagne) couplé à la lumière synchrotron et équipé d'un détecteur MCT refroidi à l'azote liquide (pour les mesures

en moyen IR) ou d'un bolomètre refroidi à l'hélium et à l'azote liquide (pour les mesures en lointain IR). Le système est placé au sein d'une boîte hermétique en plexiglas purgée en permanence par de l'azote afin d'avoir un environnement stable et notamment en vapeur d'eau.

Pour les mesures en moyen IR réalisées dans le cadre de l'étude de la maladie d'Alzheimer, les spectres ont été collectés en transmission dans la région comprise entre 4500 et 700 cm^{-1} à l'aide d'un objectif x36 et d'une ouverture de 12.5 μm . Ils résultent d'une moyenne de 128 scans. La résolution utilisée était de 4 cm^{-1} et un background a été enregistré tous les 10 spectres sur la fenêtre de BaF_2 . La distance entre chaque point de mesure est de 4.16 μm .

Les mêmes paramètres ont été utilisés pour les mesures réalisées dans le cadre de l'étude de la sclérose en plaques, à l'exception de la distance entre chaque point de mesure qui est de 6 μm .

Pour les mesures en lointain IR réalisées également dans le cadre de l'étude de la maladie d'Alzheimer, les spectres ont été collectés en transmission dans la région 700-30 cm^{-1} à l'aide d'un objectif x15 et d'une ouverture de 80 μm . Ils résultent d'une moyenne de 128 scans et la résolution utilisée était de 4 cm^{-1} . Au préalable, un background a été enregistré sur la fenêtre de silicium.

3.3.3 Etude des liquides céphalorachidiens

Les mesures IR ont été réalisées au sein du laboratoire à l'aide d'un spectromètre FTIR Vertex 70 (Bruker Optics, Allemagne) équipé d'une source Global, d'un détecteur MCT et d'une séparatrice en KBr. Tous les spectres ont été mesurés en réflexion totale atténuée (ATR) à l'aide d'un cristal en diamant. 3 μL d'échantillon ont été déposés sur le cristal puis séchés à l'air libre. Les spectres ont été enregistrés dans la région 4000-700 cm^{-1} et représentent la moyenne de 364 scans avec une résolution de 2 cm^{-1} .

3.4 La spectroscopie Raman

3.4.1 Etude des peptides modèles

Les spectres Raman ont été enregistrés au sein du laboratoire à l'aide d'un spectromètre Renishaw in Via Raman Microscope équipé d'un laser à 514 nm ou au sein du laboratoire du Dr. Sophie Lecomte (CBMN, Université de Bordeaux) à l'aide d'un spectromètre Witec Alpha300RS équipé d'un laser à 532 et 633 nm. Le détecteur utilisé dans chaque cas est un détecteur CCD (Charge Coupled Device). 1 μL d'échantillon a été déposé sur une fenêtre de CaF_2 puis séché à l'argon. Le laser a été focalisé sur l'échantillon avec un objectif x50. Les spectres ont ensuite été mesurés dans la région spectrale 3800-0 cm^{-1} avec un temps d'exposition de 10 s excepté pour le spectre Raman des plaques séniles où un temps de 5 s a été utilisé (spectres présentés en Figure 4.18).

3.4.2 Etude des composés modèles

Les spectres Raman ont été enregistrés au sein du laboratoire à l'aide d'un spectromètre Renishaw in Via Raman Microscope équipé d'un laser à 514 nm.

Pour les composés modèles étudiés dans le cadre de l'étude des tissus cérébraux, 1 μL d'échantillon a été déposé sur une fenêtre de CaF_2 puis séché à l'argon. Le laser a été focalisé sur l'échantillon avec un objectif x50. Les spectres ont ensuite été mesurés dans la région spectrale $3800\text{-}0\text{ cm}^{-1}$ avec un temps d'exposition de 10 s.

Pour les composés modèles étudiés dans le cadre de l'étude des liquides céphalorachidiens, les échantillons ont été mélangés avec une solution colloïdale de nanoparticules dans une proportion 1 : 1 (V : V). Ils ont ensuite été placés au thermomixer à 4°C pendant 40 min avec une vitesse de rotation de 400 rpm. Une goutte du mélange (14 μL exactement) a ensuite été placée sur une fenêtre de CaF_2 avant d'être mesurée par SERS. Les spectres SERS ont ensuite été enregistrés à l'aide d'un objectif x5 dans la gamme $3200\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ avec un temps d'intégration de 10 s. Pour chaque échantillon, cinq spectres ont été accumulés à différents endroits de l'échantillon.

3.4.3 Etude des tissus cérébraux

Les mesures de microspectroscopie Raman ont été réalisées au sein du laboratoire du Dr. Sophie Lecomte (CBMN, Université de Bordeaux) par l'intermédiaire d'un spectromètre Raman Witec Alpha300RS équipé d'un laser à 532 nm. Les spectres Raman ont été enregistrés à l'aide d'un objectif x20 dans la gamme spectrale $3800\text{-}0\text{ cm}^{-1}$.

Dans le cadre des mesures réalisées pour l'étude de la maladie d'Alzheimer, un temps d'exposition de 0,05 s a été utilisé. Un spectre a été enregistré tous les 0,5 μm selon les directions x et y.

Dans le cadre des mesures réalisées pour la sclérose en plaques, un temps d'exposition de 0.1 s a été utilisé et un spectre a été enregistré tous les 4.5 μm selon les directions x et y.

3.4.4 Etude des liquides céphalorachidiens

Les mêmes échantillons que pour la spectroscopie IR ont été utilisés pour ces mesures. Cependant, les échantillons ont été mélangés avec une solution colloïdale de nanoparticules dans une proportion 1 : 1 (V : V). Ils ont ensuite été placés au thermomixer à 4°C pendant 40 min avec une vitesse de rotation de 400 rpm. Une goutte du mélange (14 μL exactement) a ensuite été placée sur une fenêtre de CaF_2 avant d'être mesurée par SERS.

Les mesures SERS ont été réalisées au sein de notre laboratoire à l'aide d'un spectromètre Renishaw in Via Raman Microscope équipé d'un laser à 514 nm. Les spectres SERS ont été enregistrés à l'aide d'un objectif x5 dans la gamme 3200-400 cm^{-1} avec un temps d'intégration de 10 s. Pour chaque échantillon, cinq spectres ont été accumulés à différents endroits de l'échantillon.

3.5 Prétraitements des données

Après l'acquisition, la première étape à réaliser avant d'analyser les données est de traiter les spectres ; le terme de prétraitement est alors communément utilisé. En effet, différents phénomènes peuvent venir perturber les spectres IR et/ou Raman tels que la fluorescence, le bruit de fond du détecteur, des artefacts spectraux et spatiaux suite à une différence d'épaisseur au niveau d'un échantillon par exemple, ce qui peut rendre l'analyse des spectres et la comparaison de ces derniers difficiles (Bocklitz *et al.*, 2011, Mohlenhoff *et al.*, 2005).

Un spectre contient une multitude d'informations pouvant provenir de divers composés. Ainsi, il peut arriver parfois que des petites différences, difficiles à voir à l'œil nu contiennent des informations critiques. L'application d'analyses multivariées est alors nécessaire. Ces méthodes qui seront détaillées plus en détails dans la partie suivante sont des méthodes de classification. Appliquer donc des prétraitements est indispensable afin d'éliminer les interférences qui altèrent les spectres et qui engendreraient de faux critères de classification (Heraud *et al.*, 2006 ; Kohler *et al.*, 2006).

Il est important de noter que les prétraitements appliqués aux spectres IR et Raman ne sont pas forcément les mêmes puisque la spectroscopie IR et Raman sont deux méthodes basées sur des phénomènes différents.

3.5.1 Prétraitements appliqués aux spectres infrarouges

En fonction des échantillons étudiés, les prétraitements ont été effectués à l'aide du logiciel Origin 8.5 dans le cas de l'étude des peptides et composés modèles, ou à l'aide du logiciel Cytospec v 2.00.01 et/ou du logiciel Kinetics développé par le Pr. Erik Goormaghtigh (Structure et Fonction des Membranes biologiques, Université libre de Bruxelles) et fonctionnant sous Matlab R2012a dans le cas de l'étude des tissus cérébraux et des liquides céphalorachidiens.

- Soustraction de la vapeur d'eau : Bien que les spectromètres IR soient purgés en permanence par de l'air sec, de même que la boîte en plexiglas pour les analyses de microspectroscopie IR, un spectre de vapeur d'eau enregistré au préalable a été soustrait des spectres.

- Correction de la ligne de base : Les variations de ligne de base en spectroscopie IR sont choses courantes suite à des phénomènes de diffusion, des variations au niveau des conditions expérimentales ou aux facteurs instrumentaux par exemple. Corriger la ligne de base est donc une étape très importante notamment pour les analyses quantitatives et/ ou qualitatives où les absorbances sont évaluées. Différentes méthodes de correction de ligne de base existent (Lasch, 2012). Celle choisie ici consiste à définir l'absorbance de certains points qui ne contiennent aucune information spectrale à 0 (Figure 3.2) (Krafft *et al.*, 2007).

15 points ont été choisis dans le cadre des tissus cérébraux : 3800, 3620, 2700, 2500, 2400, 2300, 2125, 2000, 1900, 1800, 1776, 1721, 1357, 1144, et 1001 cm^{-1} .

13 points ont été choisis dans le cadre des liquides céphalorachidiens : 3947, 3727, 2765, 2500, 2370, 2252, 2199, 1917, 1849, 1783, 1183, 891 et 734 cm^{-1} .

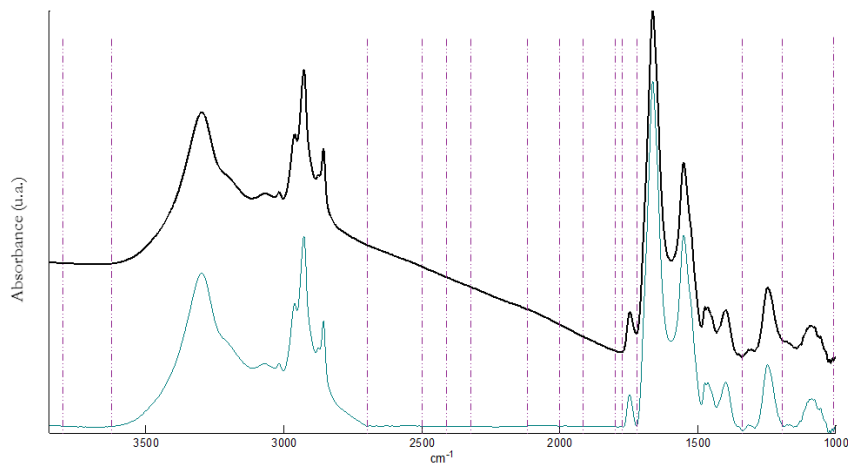


Figure 3.2 : Exemple montrant le procédé de correction de ligne de base. En noir correspond le spectre brut et en bleu turquoise le spectre obtenu après correction de la ligne de base. Les nombres d'onde pour lesquels l'absorbance est portée à 0 sont marqués par les lignes en pointillés. Figure inspirée de Gaigneaux, 2004.

- Normalisation : En spectroscopie IR, l'intensité des spectres est fortement influencée par les variations d'intensité de la source lumineuse, mais également par la quantité d'échantillon à analyser ; ce qui sous-entend pour les tissus, par l'épaisseur de la coupe. Afin de pouvoir comparer quantitativement et/ou qualitativement différents spectres, il est donc indispensable de normaliser l'ensemble des spectres entre eux afin de les ramener tous à la même échelle. Plusieurs méthodes de normalisation existent dans la littérature (Lasch, 2012 ; Oberg *et al.*, 2004). Dans le cadre des tissus cérébraux, les spectres ont été normalisés vectoriellement entre 3800 et 1000 cm^{-1} . Ainsi, la moyenne « y » de toutes les absorbances du spectre est calculée, puis soustraite au spectre. La somme des carrés de toutes les valeurs « y » est ensuite calculée et le spectre est divisé par la racine carrée de cette somme. Le résultat de la normalisation vectorielle est donc un spectre dont la somme du carré de toutes les absorbances est égale à 1 (Peng *et al.*, 2015).

Dans le cadre des liquides céphalorachidiens, les spectres ont été normalisés avec l'aire sous la courbe entre $3727\text{-}2765$ et $1800\text{-}734\text{ cm}^{-1}$ (Hori et Sugiyama, 2003).

- Tests de qualité : Les paramètres ainsi que les conditions d'enregistrement des spectres IR jouent un rôle important dans la détermination de leur qualité. Ainsi, il est important de les choisir de manière à avoir un niveau de bruit faible afin que l'information contenue dans un spectre ne soit pas noyée dans du bruit, ce qui la rendrait inutilisable dans une analyse statistique. Cependant, lors de mesures faites sur des tissus par microspectroscopie IR, il peut arriver parfois que certains spectres soient de mauvaise qualité en raison que la coupe s'est détachée à un endroit de la fenêtre, ou que cette dernière est moins épaisse à certains endroits entraînant ainsi de faibles valeurs d'absorbance. L'application de filtres permet alors d'éliminer ces spectres.

Deux types de filtres ont été appliqués sur les spectres préalablement prétraités : le premier fournit une information directe sur la qualité d'un spectre puisqu'il permet d'éliminer tous les spectres présentant un ratio signal/bruit inférieur à une certaine valeur. Afin d'évaluer le bruit d'un spectre, un segment de 50 cm^{-1} de longueur se déplace par pas de 1 cm^{-1} le long d'une région spectrale ne contenant aucune bande d'absorption provenant de molécules biologiques ($2250\text{-}2100\text{ cm}^{-1}$ par exemple). L'écart-type moyen calculé par rapport à une ligne de base définie à chaque position du segment permet ainsi d'estimer le bruit pour cette position (Figure 3.3). Le bruit total est ensuite évalué en calculant la moyenne des différentes valeurs obtenues pour chaque position.

Le signal quant à lui est généralement donné après soustraction d'une ligne de base, par l'absorbance maximale de la région amide I et amide II, située entre 1720 et 1490 cm^{-1} .

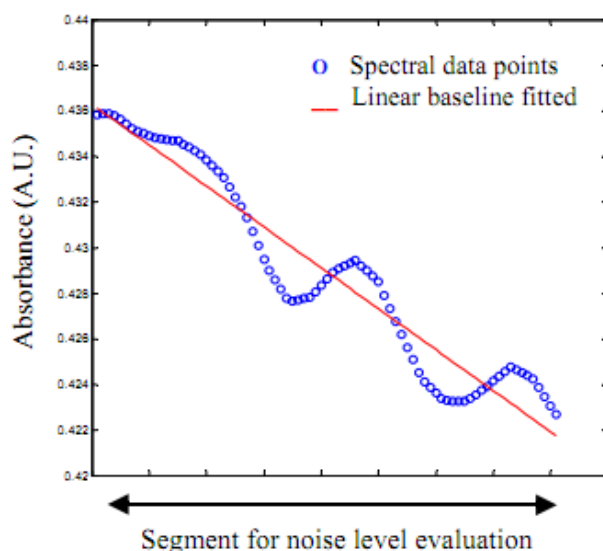


Figure 3.3 : Représentation schématique du calcul du niveau de bruit d'un spectre. Un segment de 50 cm^{-1} est défini. La somme des carrés de distances des points expérimentaux par rapport à une ligne de base définie (en rouge) est calculée. La moyenne de ces valeurs est ensuite calculée et attribuée à la moitié du segment. Le segment se déplace alors d'un cm^{-1} ; une nouvelle ligne de base est définie et l'écart type moyen est de nouveau calculé. La moyenne de l'ensemble des écarts-type moyens obtenus pour chaque position définit le niveau de bruit (Benard *et al.*, 2011).

Le deuxième filtre appliqué permet d'éliminer les spectres qui possèdent des valeurs d'absorbance négatives ou ceux où la loi de Beer-Lambert n'est pas applicable car le détecteur a été saturé par la lumière IR incidente. Pour ce faire, l'absorbance des spectres après normalisation est évaluée et ne doit pas dépasser certaines valeurs.

- Dérivation : En spectroscopie IR, il est courant qu'une bande d'absorption corresponde à la superposition de plusieurs vibrations provenant de groupements différents. Afin de mieux séparer les différentes contributions et ainsi augmenter la résolution d'un spectre, des dérivations peuvent être appliquées. Les dérivées les plus souvent utilisées sont les dérivées premières et secondes. Un des autres avantages de la dérivation est de s'affranchir des problèmes de ligne de base. Cependant, un des désavantages majeurs est l'augmentation du niveau de bruit (Smith, 2011). Ainsi, avant tout calcul de dérivées, les spectres sont lissés à l'aide de l'algorithme de Savitsky-Golay (Savitzky et Golay, 1964). Cette méthode consiste à interpoler localement la courbe par une droite de polynôme selon une procédure des moindres carrés. Le nombre de points de lissage utilisés dans le cadre de ces travaux de recherche est 9.

- Déconvolution : Une autre méthode pour mettre en évidence les différentes contributions présentes au sein d'une ou plusieurs bandes est la déconvolution (Singh *et al.*, 1993 ; Singh, 1999). En effet, cette méthode permet de décomposer une bande en plusieurs composantes grâce à un processus d'ajustement de courbes entre le spectre d'origine et celui qui résulte de l'ensemble des composantes. Deux principaux paramètres définissent la procédure d'ajustement : les bandes individuelles et la ligne de base. Chaque bande peut être définie selon trois paramètres : sa hauteur, sa position et sa largeur à mi-hauteur. Le nombre de bandes qui définit le nombre de composantes présentes au sein du spectre d'origine ainsi que leur position sont entrés dans le programme (Kinetics dans notre cas). Ces dernières sont déterminées à l'aide des dérivées secondes et quatrièmes du spectre, calculées au préalable. Egalement, la position de la ligne de base par rapport au spectre doit être entrée ainsi que les largeurs à mi-hauteur et hauteurs de chaque bande. Le programme recherche ensuite les meilleurs paramètres pour chaque bande de profil Gaussien et Lorentzien afin que le spectre résultant s'ajuste au mieux au spectre d'origine. Dans notre cas, nous avons réalisé une procédure de « co-fitting », c'est-à-dire que le logiciel a recherché également à avoir la meilleure correspondance entre les dérivées secondes des spectres. La contribution relative de chaque bande peut être ensuite déterminée à l'aide de l'aire de chaque bande.

3.5.2 Prétraitements appliqués aux spectres Raman

En fonction des échantillons étudiés, les prétraitements ont été réalisés par Origin 8.5 dans le cas des peptides et composés modèles, par Witec dans le cas des tissus cérébraux ou par Kinetics dans le cas des liquides céphalorachidiens.

Certains prétraitements appliqués aux spectres IR peuvent être également appliqués aux spectres Raman. Ainsi, l'ensemble des détails ne seront pas répétés dans cette partie.

- Correction de la ligne de base : En spectroscopie Raman, un des principaux facteurs liés aux variations de la ligne de base est la fluorescence. Ainsi, dans le cadre de l'étude des liquides céphalorachidiens, 11 points ont été choisis afin que leur intensité soit portée à 0 : 3013, 2834, 1800, 1738, 1492, 1385, 1263, 1162, 1049, 765 et 592 cm^{-1} .

Dans le cadre de l'étude des tissus cérébraux, aucune ligne de base n'a été soustraite des spectres. Cependant, les études ont montré que cela n'entraînait aucune modification sur l'interprétation des résultats.

- Normalisation : En spectroscopie Raman, l'alignement du laser ou sa puissance sont des paramètres qui peuvent venir influencer l'intensité des spectres et tout particulièrement si des spectres mesurés à des jours différents sont comparés par exemple. Ainsi, les spectres des liquides céphalorachidiens ont été normalisés à l'aide de l'aire sous la courbe comprise entre 3013-2834 et 1800-400 cm^{-1} .

- Tests de qualité : Des raies parasites correspondant à des pics très fins sans rapport avec l'échantillon peuvent parfois être observés sur les spectres Raman. Elles sont dues aux rayons cosmiques qui percutent le détecteur. Afin de les éliminer, un filtre a été appliqué.

- Lissage : Le rapport signal/bruit d'un spectre Raman est généralement plus faible que pour celui d'un spectre IR et tout particulièrement lorsque le temps d'exposition est faible comme c'est le cas pour les mesures effectuées sur les tissus cérébraux. Cependant, le logiciel Witec qui a été utilisé pour traiter les données corrige automatiquement le bruit avant d'effectuer toute opération.

3.6 Analyse des données

L'analyse des données peut se diviser en deux catégories : les analyses univariées et les analyses multivariées. Les analyses univariées sont de plus loin les plus anciennement utilisées car elles permettent la quantification d'analytes. Elles reposent sur le principe simple que la hauteur d'une bande peut être corrélée à la concentration d'un analyte.

Cependant, en spectroscopie vibrationnelle, une bande correspond à la vibration d'une liaison moléculaire. Or, une biomolécule est composée de plusieurs liaisons moléculaires différentes donnant ainsi lieu à un nombre important de vibrations et donc de bandes. Par conséquent, il va être important d'utiliser dans le cadre de la spectroscopie vibrationnelle utilisée à des fins biomédicales, des analyses multivariées qui vont permettre d'étudier plusieurs bandes en même temps et non plus une seule (Wold, 1991). De plus, dans le spectre vibrationnel d'un échantillon

biologique, il n'est pas rare que plusieurs vibrations provenant de biomolécules différentes se superposent rendant ainsi l'analyse difficile. Les analyses multivariées reposent sur des analyses statistiques et sont souvent regroupées sous le terme de chimiométrie (Kumar *et al.*, 2014).

Il existe deux classes d'analyses multivariées : les analyses non supervisées et les analyses supervisées. Seules les analyses non supervisées seront détaillées ici car ce sont celles qui ont été utilisées au cours de ces travaux de recherche. Elles n'exigent aucune connaissance a priori sur les spectres impliqués dans l'analyse statistique, et en particulier sur leur appartenance à un groupe de données spécifiques contrairement aux analyses supervisées. La classification hiérarchique ascendante (HCA) et l'analyse en composantes principales (ACP) en sont des exemples.

3.6.1 Classification hiérarchique ascendante

L'HCA est une méthode permettant de classer les spectres dans différents groupes en fonction de leur degré de similarité. En effet, elle a pour but de former des clusters de manière à ce que chaque cluster soit le plus homogène possible, c'est-à-dire que chaque spectre à l'intérieur de ces clusters soit le plus similaire possible mais que les clusters entre eux soient le plus hétérogène possible. Plusieurs critères permettent de regrouper les données mais celui utilisé ici est le critère de Ward.

La première étape consiste à calculer une matrice contenant les distances entre toutes les paires de spectres. Cette matrice de dimension $n \times n$, où n correspond au nombre d'éléments (spectres) est symétrique, ce qui permet sa diagonalisation. La méthode la plus simple pour déterminer la distance entre différents spectres est de calculer la distance Euclidienne. Considérant un espace dimensionnel p et deux spectres E_1 et E_2 , la distance géométrique entre deux spectres peut être décrite comme suit :

$$Distance\ Euclidienne\ (E_1, E_2) = \sqrt{\sum_{i=1}^p |x_i - y_i|^2} \quad \text{Equation 3.1}$$

Où x_i et y_i représentent la valeur d'absorbance au nombre d'onde i pour le spectre E_1 et E_2 respectivement.

La deuxième étape consiste à regrouper les deux spectres les plus proches en termes de distance. Ainsi, la dimension de la matrice de distances est réduite à $(n-1) \times (n-1)$ puisque les deux classes fusionnées sont remplacées par la nouvelle. La distance du nouvel élément formé avec chacune des autres classes est alors calculée afin que les deux autres éléments les plus proches soient regroupés. Ce processus est réitéré jusqu'à ce qu'il ne subsiste plus qu'une seule classe reprenant tous les spectres de la population. Les séquences de fusions peuvent être représentées sous forme de dendrogramme.

Afin de déterminer si deux clusters sont assez proches pour être réunis, la méthode de Ward tente de minimiser la somme des carrés des écarts (SCE) de chaque paire de cluster qui peut être formée

à chaque étape. Les deux qui se verront fusionner sont ceux pour lesquels l'augmentation de la SCE est minimale lors de leur union. Pour un cluster X, la SCE correspondant à ce cluster est la somme des carrés des écarts de chaque membre de ce cluster par rapport à la moyenne. S'il y a n clusters, la SCE peut être définie comme suit :

$$SCE = \sum_{X=1}^n SCE_X = SCE_1 + SCE_2 + \dots + SCE_n \quad \text{Equation 3.2}$$

Au départ de la procédure de classification, chaque spectre forme un cluster. Ainsi, s'il y a N spectres, $SCE_X = 0$; avec $X = 1, 2, \dots, N$ et donc $SCE = 0$. Au cours de la procédure, SCE_X peut être définie comme suit :

$$SCE_X = \sum_{i=1}^{N_X} \left| x_i - \frac{1}{N_X} \sum_{j=1}^{N_X} x_j \right|^2 \quad \text{Equation 3.3}$$

Avec N_X , le nombre de spectres appartenant au cluster X à la $x^{\text{ème}}$ étape de la procédure.

La distance entre un cluster X et Y peut être définie comme suit :

$$\begin{aligned} d(X, Y) &= SCE(XY) - [SCE_X + SCE_Y] \\ &= \frac{N_X N_Y}{N_X + N_Y} d^2(X, Y) \end{aligned} \quad \text{Equation 3.4}$$

Où XY représente le nouveau cluster formé à partir de la combinaison des clusters X et Y et SCE correspond à la somme des carrés des écarts comme décrit ci-dessus (Ward, 1963 ; Johnson *et al.*, 2007 ; Benard, 2012).

3.6.2 Analyse en composantes principales

L'ACP est une méthode statistique très largement utilisée pour trouver des corrélations entre individus, variables et individus-variables à partir d'un très grand nombre de données. Dans le cas présent, les individus correspondent aux spectres et les variables, aux nombres d'onde des régions spectrales biologiquement représentatives. Comme il a déjà été mentionné précédemment, il est très facile d'analyser une ou deux variables séparément dès lors que les individus peuvent être représentés dans un graphique de dimension 2. Cependant, analyser plusieurs variables en même temps est plus difficile car les individus devraient être alors représentés dans un espace multidimensionnel. L'objectif de l'ACP est donc de revenir à un espace de dimension réduite en réduisant le nombre de variables corrélées (de l'ordre de 10^3) à un nombre limité de variables non corrélées entre elles, appelées composantes principales (CP).

Mathématiquement, le profil spectral S_i de tout spectre i peut être représenté sous forme d'une combinaison linéaire de n nombres d'onde σ :

$$S_i = a_{i,1} \sigma_1 + a_{i,2} \sigma_2 + a_{i,3} \sigma_3 + \dots + a_{i,n} \sigma_n, \quad \forall 1 \leq i \leq m, 1 \leq \sigma \leq n \quad \text{Equation 3.5}$$

où $a_{i,\sigma}$ est le vecteur des valeurs d'absorbance ou d'intensité du spectre i à chaque nombre d'onde σ .

Ainsi, tous les spectres incluent dans l'ACP peuvent être représentés sous forme d'une matrice S à m lignes et n colonnes.

$$S = \begin{pmatrix} a_{i,1\sigma,1} & \dots & a_{i,1\sigma,n} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ a_{i,m\sigma,1} & \dots & a_{i,m\sigma,n} \end{pmatrix} \quad \text{Equation 3.6}$$

La diagonalisation de la matrice de covariance ($n \times n$) caractérisant les interactions entre n variables permet d'obtenir les couples de valeurs propres λ /vecteurs propres v . Le couple $(v_{1,\sigma}, \lambda_\sigma)$ décrivant la plus grande variance est associé à la première composante principale PC1, une nouvelle variable du système de coordonnées transformé qui va contenir des informations moléculaires sur les composés chimiques et dont l'expression est une combinaison linéaire du type:

$$PC1 = v_{1,1}\lambda_1 + v_{1,2}\lambda_2 + v_{1,3}\lambda_3 + \dots + v_{1,n}\lambda_n, \forall 1 \leq \sigma \leq n \quad \text{Equation 3.7}$$

où $v_{1,\sigma}$ est le vecteur propre correspondant à la valeur propre λ_σ . La deuxième direction avec le plus de variabilité se retrouve dans la deuxième composante principale PC2, orthogonale à la première et ainsi de suite. D'une manière générale, plus de 99% de la variance est expliquée par les huit premières CP, bien qu'il en existe autant que de variables. L'ACP offre ainsi la possibilité de relier la quasi-totalité de l'information en un nombre restreint de variables en fournissant une représentation graphique des données spectrales dans l'espace des composantes principales (Esbensen, 2004 ; Lasch et Petrich, 2011 ; Massart *et al.*, 1997).

Conclusion :

La spectroscopie infrarouge et Raman sont deux méthodes qui permettent d'obtenir des informations chimiques sur un échantillon. Cependant, en raison de la complexité de la composition d'un échantillon biologique, il est souvent difficile d'identifier ou de quantifier les différents composés présents au sein de ces derniers. De plus, les différences entre deux échantillons de conditions pathologiques différentes sont parfois très faibles et donc difficiles à observer lorsque les différents spectres sont simplement comparés entre eux. Ainsi, prétraiter les spectres est indispensable pour éliminer les interférences qui altèrent les spectres et ainsi, augmenter la précision et la robustesse des résultats. Egalement, l'utilisation d'analyses multivariées est nécessaire pour analyser l'ensemble de l'information contenu dans les spectres.

Chapitre 4

Etude de la maladie d'Alzheimer

L'agrégation des peptides amyloïdes β ($A\beta$) joue un rôle important dans la maladie d'Alzheimer et notamment dans les processus neurotoxiques qui conduisent à la mort des cellules neuronales (Hardy et Selkoe, 2002). Les formes responsables de la toxicité seraient les oligomères solubles d' $A\beta$ qui sont des formes intermédiaires dans le processus d'agrégation (Bucciantini *et al.*, 2002 ; Cleary *et al.*, 2004 ; Klein *et al.*, 2001 ; Walsh *et al.*, 2002). En effet, leur capacité à interagir avec certains métaux et /ou les membranes cellulaires serait déterminante dans les processus neurotoxiques mais les mécanismes ne sont pas encore complètement compris.

Au cours de ce chapitre, la coordination des métaux avec les peptides amyloïdes β a été étudiée à l'aide de peptides modèles. Les études ont ensuite été étendues aux plaques séniles présentes au sein du cerveau de souris transgéniques et aux liquides céphalorachidiens provenant de patients atteints de la maladie d'Alzheimer afin d'identifier des marqueurs vibrationnels de la maladie. Ces marqueurs reflètent la composition d'un échantillon et pourront donc être utiles pour mieux comprendre et diagnostiquer la maladie.

4.1 Etude de peptides modèles

Depuis la mise en évidence de l'implication des métaux, de nombreuses recherches ont été menées afin de déterminer comment les peptides $A\beta$ interagissent avec ces derniers. Il a été montré que les sites d'interaction se situent au niveau des seize premiers acides aminés. Toutefois, les résultats restent encore débattus dans la littérature (pour plus de détails, se référer au chapitre 1).

Au cours de cette étude, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la coordination des peptides $A\beta$ avec le Zn et le Cu à pH 6.8 et 8.9 par spectroscopie Raman et IR. Ces deux valeurs de pH ont été choisies car il a été montré par de précédentes études que les peptides $A\beta$ se lient différemment aux ions Cu^{2+} selon le pH (Dorlet *et al.*, 2009 ; El Khoury *et al.*, 2011 ; Trujano-Ortiz *et al.*, 2015). Cependant, afin d'étudier la coordination des peptides $A\beta$ avec ces métaux, nos études se sont portées dans un premier temps sur deux peptides modèles, DAHK et GHK (tous deux portant leur nom de leur séquence en acides aminés) (pour plus de détails sur les acides aminés, se référer à l'annexe 1).

Le peptide DAHK correspond à la partie N-terminale de la sérum albumine humaine (HSA) ; protéine responsable du transport du cuivre et du zinc dans le sang. Le peptide GHK quant à lui, est retrouvé dans le plasma complexé au Cu et intervient comme facteur de croissance.

Les complexes Cu-DAHK et Cu-GHK sont des systèmes simples de structure connue (Figure 4.1).

Dans le complexe Cu-DAHK, la coordination équatoriale du Cu(II) est assurée selon un motif ATCUN, c'est-à-dire par quatre atomes d'azote provenant du groupement NH_2 terminal, du noyau imidazole de l'His placée en troisième position et de deux groupements amides déprotonés (Figure 4.1A) (Harford et Sarkar, 1997). Une molécule d'eau en position apicale complète la géométrie de type pyramide à base carrée.

Dans le complexe Cu-GHK, le Cu(II) est coordonné dans le plan équatorial par le groupement NH₂ terminal, un groupement amide déprotoné et le noyau imidazole de l'His. La quatrième position équatoriale et la position apicale pour compléter la géométrie de type pyramide à base carrée sont occupées par un atome d'oxygène de groupes carboxylate provenant d'autres peptides GHK. Toutefois, ces deux positions sont labiles en solution (Figure 4.1B).

Concernant la coordination de ce peptide avec le zinc, une étude RMN a été reportée. Elle suggère le même type de coordination qu'avec le cuivre (Daignault *et al.*, 1985).

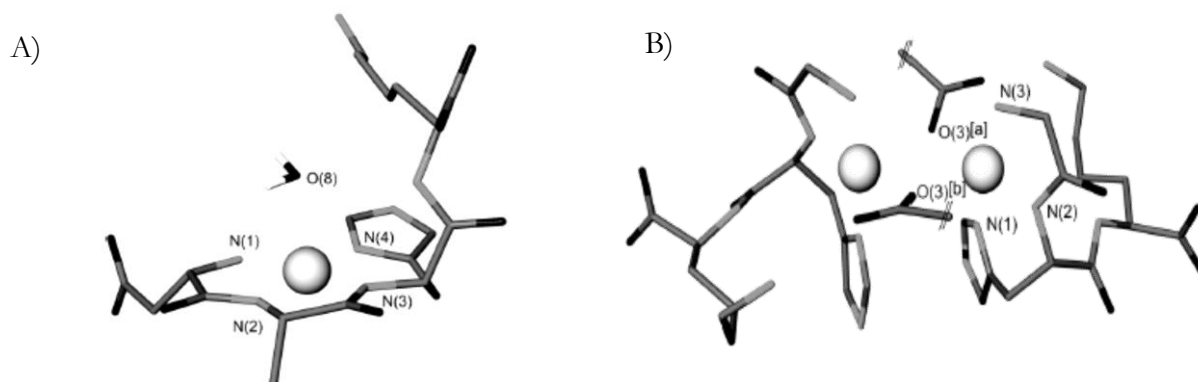


Figure 4.1 : Structure des complexes Cu(II)-DAHK (A) et Cu(II)-GHK (B) obtenues par rayons X (Trapaïdze *et al.*, 2012).

A) Cu(II) est penta-coordiné avec quatre azotes en position équatoriale et une molécule d'eau en position apicale. Les azotes proviennent du groupement NH₂ terminal (N(1)), de deux fonctions amides déprotonées (N(2) et N(3)) et de N^π du noyau imidazole de l'histidine (N(4)).

B) chaque atome de Cu(II) est pentacoordiné avec trois azotes et un oxygène en position équatoriale et par un oxygène en position apicale. Les trois azotes proviennent du groupement NH₂ terminal (N(3)), de la fonction amide déprotonée entre les résidus Gly-His (N(2)) et de N^π du noyau imidazole de l'histidine (N(1)). L'oxygène provient du groupement COO⁻ terminal d'un peptide voisin (O(3)).

4.1.1 Etude des complexes Cu(II)-GHK et Zn(II)-GHK

➤ Raman

La figure 4.2 présente les spectres Raman de GHK seul, en présence de cuivre ou de zinc à pH6.8 et 8.9. L'ensemble des vibrations avec les attributions correspondantes sont reportées dans le tableau 4.1.

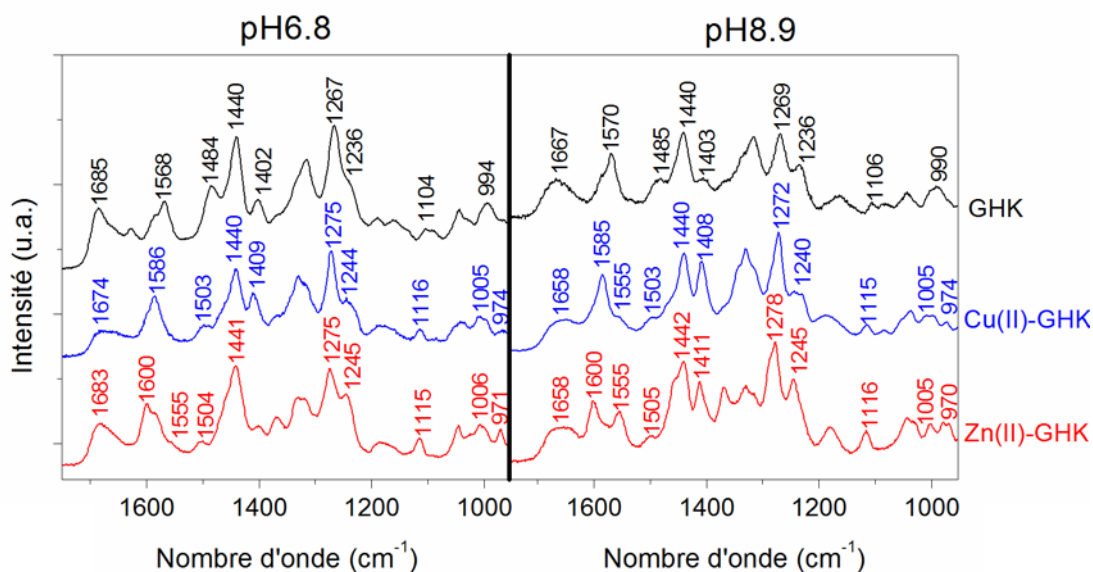
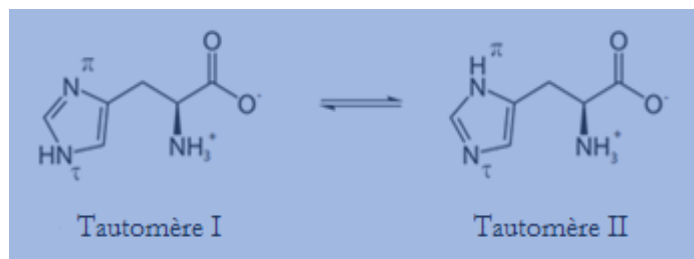


Figure 4.2 : Spectres Raman du peptide GHK seul et en présence de Cu(II) ou Zn(II) à pH6.8 et 8.9 dans la région 1750-950 cm^{-1} .

○ Coordination aux histidines

A pH 6.8 et 8.9, l'histidine peut exister sous deux formes tautomères selon si c'est N^{π} ou N^{τ} qui est protoné (voir encadré). Le spectre Raman du peptide seul à pH 6.8 ou 8.9 montre la coexistence des deux formes. En effet,



la forme tautomère I présente des bandes marqueurs à 1568, 1090 et 994 cm^{-1} pour le pH 6.8 et à 1570, 1085 et 990 cm^{-1} pour le pH 8.9. Ces bandes sont attribuées respectivement aux vibrations $\nu_{\text{C}_4=\text{C}_5}$, ν_{CN} et δ_{ring} . La forme tautomère II quant à elle, présente des bandes marqueurs à 1585 et 1104 cm^{-1} pour le pH 6.8 et à 1585 et 1106 cm^{-1} pour le pH 8.9 (Takeuchi, 2003). Ces bandes correspondent respectivement aux vibrations $\nu_{\text{C}_4=\text{C}_5}$ et ν_{CN} (Tableau 4.1). Le rapport des bandes à 1585 et 1568 cm^{-1} environ montre toutefois que la forme tautomère I (qui correspond à la forme la plus énergétiquement favorable) est prédominante pour les deux pH (Ashikawa et Itoh, 1979). Lors de la coordination d'un métal, cet équilibre est affecté puisque la liaison du métal sur un des deux azotes, limite la protonation à l'autre azote. En général, les vibrations correspondant à la forme libre de l'His se situent à plus faibles nombres d'onde par rapport à celles de la forme complexée.

En présence de Cu(II) et à pH 6.8, la bande présente initialement à 1568 cm^{-1} se déplace à 1586 cm^{-1} , montrant que l'équilibre est déplacé vers la forme où N^{τ} est protoné et N^{π} est lié au métal. Le déplacement à 1275 cm^{-1} de la bande présente initialement à 1267 cm^{-1} , ainsi que l'apparition des

bandes à 1503 (ν_{ring} , δNH) et 974 cm^{-1} (δring), confirment l'implication de N^{π} dans la sphère de coordination (Mesu *et al.*, 2006 ; Takeuchi, 2003 ; Torreggiani *et al.*, 2000b, 2003).

D'autres bandes peuvent servir de marqueur de la coordination d'un métal à l'His comme celles à 1244 ($\nu=\text{CN}$), 1116 ($\nu=\text{CN}$) et 1005 cm^{-1} (δring) (Mesu *et al.*, 2006 ; Takeuchi, 2003 ; Torreggiani *et al.*, 2000b, 2003).

En présence de Zn(II), les mêmes bandes à 1585, 1504, 1275 et 971 cm^{-1} sont retrouvées. Cela montre que comme dans le cas du Cu(II), N^{τ} est protoné et N^{π} est lié au métal. Toutefois, une bande à 1600 cm^{-1} peut être également observée montrant que la forme $\text{N}^{\tau}\text{-M}$, $\text{N}^{\pi}\text{-H}$ existe. L'augmentation de l'intensité de la bande à 1441 cm^{-1} confirme l'implication de N^{τ} dans la sphère de coordination (Torreggiani *et al.*, 2000a).

Lors de la coordination de Zn(II), il peut être également observé l'apparition d'une bande à 1555 cm^{-1} . Cette bande est attribuée aux vibrations $\nu_{\text{s}}\text{COO}^{-}$ et est certainement masquée dans le cas du peptide libre par la bande à 1568 cm^{-1} .

A pH 8.9, les spectres des complexes Cu(II)-, Zn(II)-GHK sont très similaires à ceux observés à pH 6.8 au niveau des vibrations de l'His. En effet, des bandes à 1585, 1503, 1272 et 974 cm^{-1} présentant une coordination du métal avec N^{π} sont observées pour le complexe Cu(II)-GHK, et des bandes à 1600, 1505, 1285, 1278 et 970 cm^{-1} présentant une coordination du métal avec N^{π} et N^{τ} sont visualisées pour le complexe Zn(II)-GHK. Cependant, il a été montré que lorsqu'un métal se coordine avec N^{π} , une des bandes marqueurs de cette coordination se situe vers 1585 cm^{-1} . Cette bande n'est pas visible ici car elle est masquée par l'augmentation de celle à 1555 cm^{-1} (une déconvolution a été réalisée dans cette région pour le confirmer). Le rapport d'intensité entre les bandes à 1600 et 1585 cm^{-1} tend à montrer que Zn(II) se lie préférentiellement à N^{τ} .

Une bande à 982 cm^{-1} peut être également observée dans le cas du complexe Zn(II)-GHK. L'apparition de cette bande peut être corrélée à l'augmentation de celle à 1555 cm^{-1} et peut être attribuée à la forme complètement déprotonée de la chaîne latérale de l'His (Takeuchi, 2003, 2011 ; Torreggiani *et al.*, 2000a). Dans la littérature, ces bandes sont associées à une troisième située à 1290 cm^{-1} environ, qui dans le cas présent peut être confondue avec celle à 1285 cm^{-1} attribuée à la coordination du métal avec N^{τ} .

○ Coordination au squelette peptidique

A pH 6.8, une bande à 1685 cm^{-1} peut être observée pour le peptide seul. Cette bande correspond principalement aux vibrations $\nu\text{C}=\text{O}$ de la chaîne peptidique, et est plus communément appelée amide I.

En présence de Cu(II), cette bande est diminuée et décalée à 1674 cm^{-1} , suggérant la déprotonation de groupement amide appartenant à la liaison peptidique suite à la coordination du métal. Cette hypothèse est confirmée par les modifications observées dans la région 1486-1410 cm^{-1} avec

notamment l'augmentation de la bande à 1409 cm^{-1} où les vibrations $\text{C=O}/\text{CN}^-$ y sont retrouvées. Généralement, la déprotonation de cet azote s'accompagne d'une diminution de la bande amide III (Miura *et al.*, 1998 ; Torreggiani *et al.*, 2000b). Cependant, dans le cas présent, d'autres vibrations viennent se superposer à cette dernière.

A pH 8.9, la bande amide I est retrouvée à 1667 cm^{-1} pour le peptide libre. Lors de la coordination de Cu(II) ou Zn(II) , une diminution et un déplacement de 9 cm^{-1} vers de plus faibles nombres d'onde de la bande amide I est observée. Cela suggère de la même manière que précédemment, l'implication de groupement amide appartenant à la liaison peptidique dans la sphère de coordination. Cette hypothèse est confirmée par les bandes vers 1440 et 1410 cm^{-1} environ qui correspondent aux vibrations $\text{C=O}/\text{CN}^-$.

Cependant, afin de mieux évaluer si le cuivre ou le zinc se coordine avec une liaison peptidique, les spectres IR des mêmes composés ont été étudiés car la spectroscopie IR est très sensible aux changements qui s'opèrent au niveau du squelette peptidique.

➤ IR

La figure 4.3 présente les spectres IR de GHK seul, en présence de cuivre ou de zinc à pH 6.8 et 8.9 dans la région amide I et amide II.

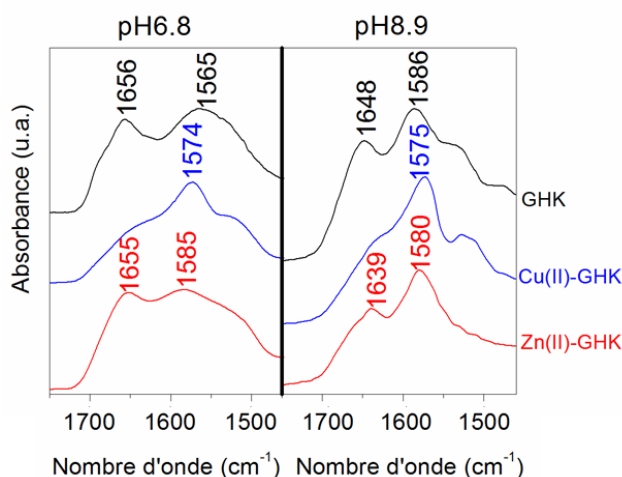


Figure 4.3 : Spectres IR du peptide GHK seul et en présence de Cu(II) ou Zn(II) à pH 6.8 et 8.9 dans la région $1760\text{-}1460\text{ cm}^{-1}$.

A pH 6.8, la bande amide I peut être observée pour GHK à 1656 cm^{-1} . Lors de la coordination du zinc, cette bande n'est pas affectée contrairement dans le cas du cuivre, où une forte diminution peut être observée. La perte de la bande amide I suggère la déprotonation de l'azote du groupement amide suite à la coordination du métal avec la liaison peptidique.

La coordination du cuivre à la liaison peptidique entraîne également des modifications dans la région amide II entre 1600 et 1500 cm^{-1} . Cependant, d'autres vibrations viennent s'ajouter avec

notamment les vibrations $\nu_{as}COO^-$ et $\delta_sNH_3^+$ de la Lys et $\nu C=C$ de l'His rendant une analyse précise difficile sans marquage isotopique.

A pH 8.9, une diminution de la bande amide I peut être observée en présence de Cu(II) et de Zn(II) montrant l'implication de la liaison peptidique dans la sphère de coordination pour les deux complexes. Toutefois, le complexe Zn(II)-GHK montre une bande amide I à 1639 cm^{-1} mieux définie que celle pour le complexe Cu(II)-GHK. L'hypothèse envisagée pour expliquer cela est la formation d'un équilibre entre des complexes 1 : 1 où un mélange entre groupement amide déprotoné et neutre coexiste. En effet, contrairement au Cu(II), Zn(II) n'est pas capable de déprotoner aussi facilement la liaison peptidique puisque par rapport à Cu(II), Zn(II) est un acide modéré de Lewis. De précédentes études ont cependant reporté que pour certains peptides (principalement des très petits constitués de 2 ou 3 résidus), Zn(II) est capable de se lier aux liaisons peptidiques (Arnold *et al.*, 1991 ; Torregiani *et al.*, 2000a).

En résumé, les données Raman et IR présentées ici ont permis de mettre en évidence l'implication des azotes des liaisons amide, ainsi que l'histidine (via N^π) dans la sphère de coordination avec le Cu(II) à pH 6.8 et 8.9, ce qui est en accord avec les données de la littérature (Trapaidze *et al.*, 2012). Ces données ont également permis de démontrer que la coordination avec le zinc est différente et est moins bien définie que celle du cuivre. En effet, il a été montré qu'à pH 6.8, le résidu His prend part à la sphère de coordination via N^π et N^τ , ce qui suggère soit la formation d'un complexe 1 : 2 (Zn : GHK) ou soit un équilibre entre les deux formes (hypothèse privilégiée). A pH 8.9, il a été montré que Zn(II) se lie de manière prépondérante à N^τ bien qu'une coordination avec N^π soit toujours observée. Il a également été montré que l'His peut former un pont entre deux Zn(II) puisque des vibrations correspondant au noyau imidazole de l'His totalement déprotoné ont été visualisées. Il est néanmoins important de mentionner que le pKa du noyau imidazole neutre en solution est aux alentours de 14. Ainsi, même lors de la coordination d'un métal avec un des azotes du noyau imidazole, le pKa de l'autre azote reste très largement supérieur à 8.9. L'hypothèse donc envisagée ici pour expliquer la déprotonation totale de la chaîne latérale de l'His est que les mesures ont été faites sur des échantillons secs. Les résultats ne sont par conséquent, pas les mêmes qu'en solution. Il a également été montré à pH 8,9 que la liaison peptidique peut faire aussi partie de la sphère de coordination.

		Nombre d'onde (cm ⁻¹)							Tentative d'attribution	
		Cu ^{II} -GHK	Zn ^{II} -GHK	DAHK	Cu ^{II} -DAHK	Zn ^{II} -DAHK	Aβ16	Cu ^{II} -Aβ16	Zn ^{II} -Aβ16	
GHK										
-	-	974/974 (I)	971/970 (I)	-	976/970 (I)	970 (I)/-	-	970/970 (I)	970/970 (I)	His (δring)
-	-	-	-982	-	-	-982	-	-	-	His déprotonée
994/990 (I)	1005/1005	1006/1005	1009/1008	994/994 (I)	1009/1008	1007/1007	-	-	-	His (δring)
-	-	-	-	-	-	-	1003/1003	1003/1003	1003/1003	Phe
-	-	-	-	-	-	-	1032/1032	1032/1032	1032/1032	Phe
1044/1042	1044/1042	1044/1043	1048/1048	1048/1048	1048/1036	1048/1047	-	-	-	His, Lys (vCC, vCN)
1090/1085 (I)	-	-	-	-	-	-	1082/1082 (I)	1082/1082	1082/1082	His (vCN + δCH)
1104/1106 (II)	1116/1115	1115/1116	1102/1103 (II)	1114/1108	1115/1112	1115/1112	1105/1105 (II)	1115/1115	1115/1115	His (vCN + δCH)
1161/1163	1161/1161	1161/-	1161/1160	1161/1161	1161/1161	1161/1160	1161/1161	1161/1161	1161/1161	His (vCN + δNH)
-	-	-	-	-	-	-	1180/1180	1180/1180	1180/1180	Phe, Tyr
1189/1189	1189/1189	1189/1189	1187/1182	1187/1182	1187/1187	1187/1182	-	-	-	
-	-	-	-	-	-	-	1207/1207	1207/1207	1207/1207	Phe, Tyr
1236/1236	1244/1240	1245/1245	1232/1232	1240/1238	1245/1246	1245/1246	1236/1236	1242/1242	1242/1242	His (vCN + δCH), Amide III
1267/1269	1275/1272 (I)	1275/1278 (I)	1265/1268	1276/1273 (I)	1276/- (I)	1276/- (I)	1264/1264	1270/1270 (I)	1273/1273 (I)	His (v=CN + vCC), Amide III
-	-	-/1285 (II)	-	-	-	1288 (II)/1290	-	1290/1289 (II)	1293/1293 (II)	His (v=CN + vCC)
1316/1316	1316/1316	1316/1316	1316/1316	1316/1316	1316/1316	1316/1316	1317/1317	1317/1317	1317/1317	His (vCN) + δCH
1336/1336	1336/1330	1336/1336	1336/1336	1336/1336	1336/1336	1336/1336	1336/1336	1336/1336	1336/1336	His (vCN) + δCH
1371/1371	1371/1371	1371/1370	1371/1371	1371/1371	1371/1371	1371/1371	-	-	-	His (vCN) + δCH
1402/1403	-	1402/-	1410/1410	1410/1410	-	1400/1410	1402/1402	1402/1402	1398/1398	v _i (COO)
-	1409/1408	-/1411	-	-	1410/1410	-/-	-	-	-	vCO/CN
1440/1440	1440/1440	1441/1442	1443/1443	1442/1442	1442/1442	1446/1443 (II)	1443/1443	1443/1443	1443/1443	δCH2
1484/1485	-/-	-/-	1486/1486	1486/1486	-	-/1486	1486/1486	-	-	His (δNH ip + δCH)
-	1503/1503 (I)	1504/1505 (I)	-	-	1504/1500 (I)	1508/- (I)	-	1500/1500 (I)	1503/- (I)	His (vring + δNH)
-	-/1555	1555/1555	-	-	1554/1555	1556/1556	-	1555/1555	1555/1555	His déprotonée et/ou v _{as} (COO)
1568/1570 (I)	-	-	1568/1570 (I)	-	-	-	1569/1569 (I)	-	-	His (vC=C + δNH)
1585/1585(II)	1586/1585 (I)	1585/- (I)	1585/1586 (II)	1585/1583 (I)	1582/- (I)	1582/- (I)	1585/1585	1586/1586	1585/1585	His (vC=C + δNH), Phe
-	-	1600/1600 (II)	-	-	1603/1605 (II)	-	1605/1605	1605/1605 (II)	1605/1605 (II)	His (vC=C), Phe (vC=C)
-	-	-	-	-	-	-	1615/1615	1615/1615	1615/1615	Tyr (vC=C)
1685/1667	1674/1658	1683/1658	1668/1668	1658/1665	1668/1663	1668/1663	1672/1672	1672/1672	1672/1672	Amide I

Tableau 4.1 : Résumé des différentes bandes retrouvées au sein des spectres Raman de DAHK, GHK et Aβ16 sous forme libre ou coordonné au Cu(II) ou Zn(II) (pH6.8/pH8.9) (Attributions faites à partir de Mesu *et al.*, 2005 ; Zhu *et al.*, 2011). Les bandes permettant de déterminer quel azote de l'histidine est protoné sont mentionnées par (I) et (II) ; (I) correspondant à la forme où N^ε est protoné et (II), à la forme où N^δ est protoné. Les bandes qui sont modifiées suite à la coordination du métal sont écrites en violet.

4.1.2 Etude des complexes Cu(II)-DAHK et Zn(II)-DAHK

➤ Raman

La figure 4.4 présente les spectres Raman de DAHK seul, en présence de cuivre ou de zinc à pH6.8 et 8.9. L'ensemble des vibrations avec les attributions correspondantes sont reportées dans le tableau 4.1

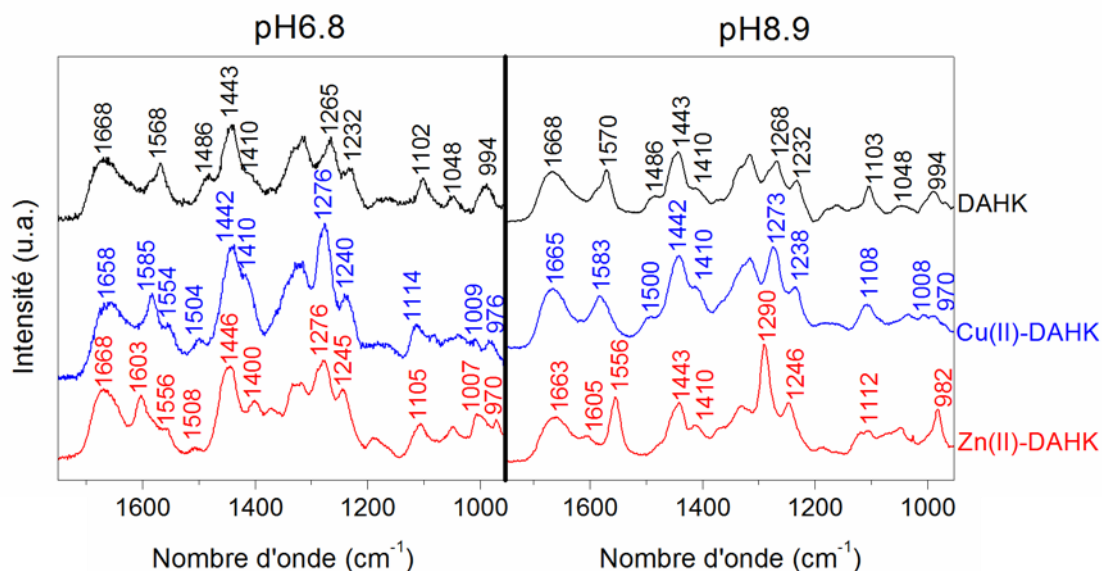


Figure 4.4 : Spectres Raman du peptide DAHK seul et en présence de Cu(II) ou Zn(II) à pH6.8 et 8.9 dans la région 1750-950 cm^{-1} .

○ Coordination aux histidines

A pH 6.8, en présence de Cu(II), des bandes à 1585, 1504, 1276 et 976 cm^{-1} témoignant d'une coordination avec N^π du noyau imidazole de l'His sont observées. Les mêmes bandes (à plus ou moins quelques cm^{-1}) peuvent être retrouvées à pH8.9.

En présence de Zn(II), à pH 6.8, les mêmes bandes témoignant d'une coordination avec N^π sont retrouvées mais également des bandes témoignant d'une coordination avec N^τ comme celles à 1603 et 1288 cm^{-1} . Toutefois, le rapport entre les bandes à 1603 et 1585 cm^{-1} suggère que la forme $\text{N}^\tau\text{-M}$ est prédominante.

A pH 8.9, des bandes intenses peuvent être observées à 1556, 1290 et 982 cm^{-1} . Ces bandes ont été précédemment attribuées au noyau imidazole de l'His complètement déprotoné. Une faible bande à 1605 cm^{-1} peut être néanmoins visualisée, suggérant que tous les noyaux imidazole ne sont pas sous forme déprotonée, mais qu'une faible partie est encore sous forme neutre avec N^π protoné et N^τ lié au métal.

○ Coordination au squelette peptidique

A pH 6.8 et 8.9, la bande amide I est retrouvée pour le peptide libre à 1668 cm^{-1} . Un déplacement de 10 cm^{-1} vers de plus faibles nombres d'onde est observé pour le complexe Cu(II)-DAHK à pH6.8 suggérant une déprotonation de l'azote appartenant à la liaison peptidique suite à la coordination du métal. Les bandes à 1442 et 1410 cm^{-1} correspondant aux vibrations C=O/CN⁻ confirment cette hypothèse. A pH 8.9, la bande amide I est retrouvée pour le complexe Cu(II)-DAHK et Zn(II)-DAHK à 1665 et 1663 cm^{-1} respectivement. Aucune éventuelle coordination de ces métaux avec le squelette peptidique ne peut donc en être déduite. Toutefois, afin de mieux évaluer si le cuivre ou le zinc se coordine avec une liaison peptidique, les spectres IR ont été étudiés comme précédemment.

➤ IR

La figure 4.5 présente les spectres IR de DAHK seul, en présence de cuivre ou de zinc à pH6.8 et 8.9.

Pour les deux valeurs de pH, une diminution de la bande amide I peut être observée en présence de Cu(II) montrant une coordination avec la liaison peptidique.

En présence de Zn(II), aucune variation ne peut être observée excluant ainsi toute coordination du zinc avec la liaison peptidique.

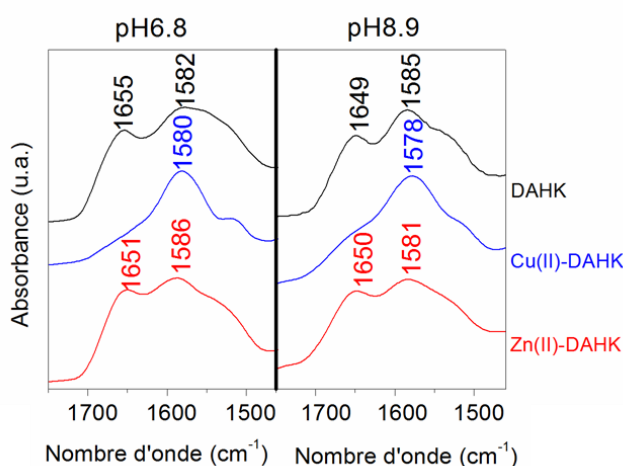


Figure 4.5 : Spectres IR du peptide DAHK seul et en présence de Cu(II) ou Zn(II) à pH6.8 et 8.9 dans la région $1760\text{-}1460\text{ cm}^{-1}$.

En résumé, les données Raman et IR présentées ici ont permis de mettre en évidence l'implication des azotes des liaisons amide, ainsi que l'histidine en position 3 (via N^π) dans la sphère de coordination avec le cuivre à pH6.8 et 8.9, ce qui est en accord avec les données de la littérature (Trapaidze et al., 2012). Egalement, comme pour GHK, ces études ont démontré que la coordination avec le zinc est différente et moins bien définie que celle avec le cuivre. En effet, à pH6.8, le résidu His serait impliqué dans la sphère de coordination via N^π et N^ε suggérant un équilibre entre deux formes. Il semblerait néanmoins, que cet équilibre soit déplacé vers la forme

tautomère II ; c'est-à-dire où N^π est protoné et N^τ est lié au métal. A pH 8.9, un autre type de coordination semble apparaître avec la formation d'un complexe où l'His est pontant.

Les sphères de coordination supposées pour les peptides GHK et DAHK à pH 6.8 et 8.9 sont présentées en figure 4.6.

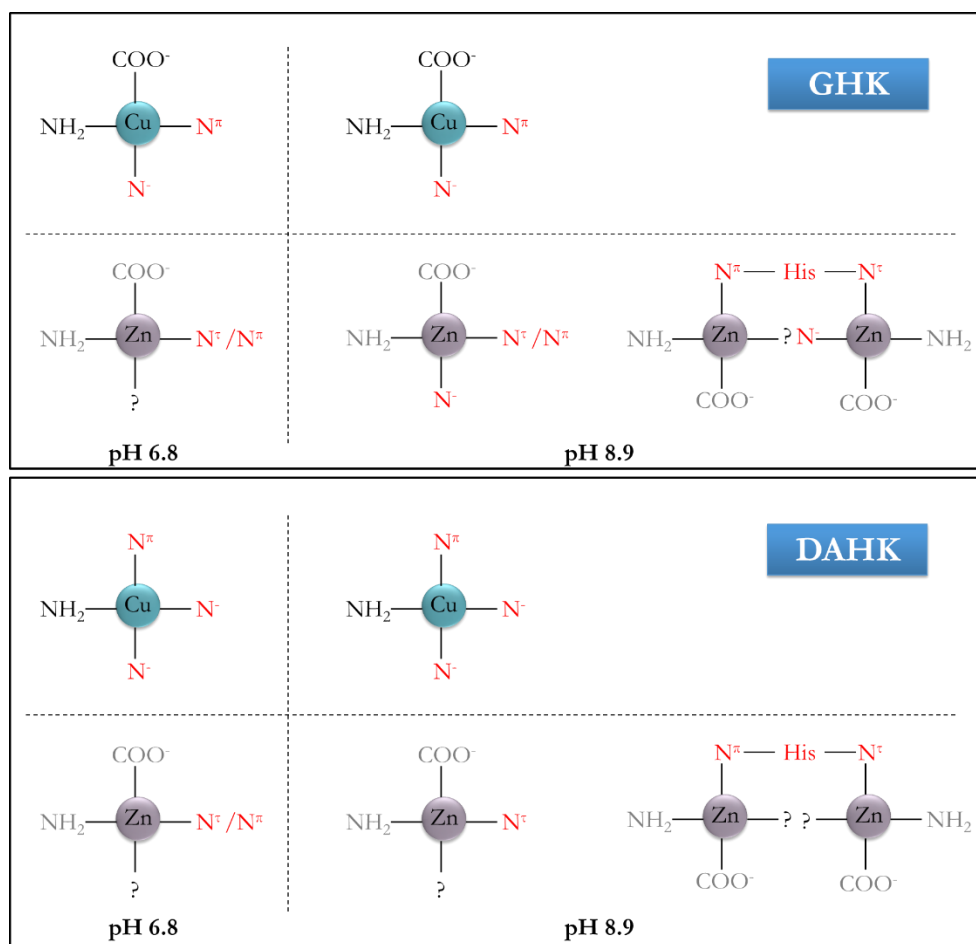


Figure 4.6 : Sphères de coordination supposées pour les peptides GHK et DAHK en présence de Cu(II) et Zn(II) à pH 6.8 et 8.9. Les groupements notés en rouge correspondent à ceux qui ont été mis en évidence au cours de ces études par spectroscopie Raman et IR, ceux notés en noir correspondent aux groupements suggérés à partir de la structure cristallographique des complexes Cu(II)-GHK et Cu(II)-DAHK à pH 6.8 et 8.9 et ceux notés en gris correspondent à des ligands proposés pour Zn(II) à partir des données cristallographiques des complexes Cu(II)-GHK et Cu(II)-DAHK.

4.1.3 Etude des complexes Cu(II)-A β 16 et Zn(II)-A β 16

La figure 4.7 présente les spectres Raman du peptide A β 16 seul, en présence de cuivre ou de zinc à pH 6.8 et 8.9. L'ensemble des vibrations avec les attributions correspondantes sont reportées dans le tableau 4.1.

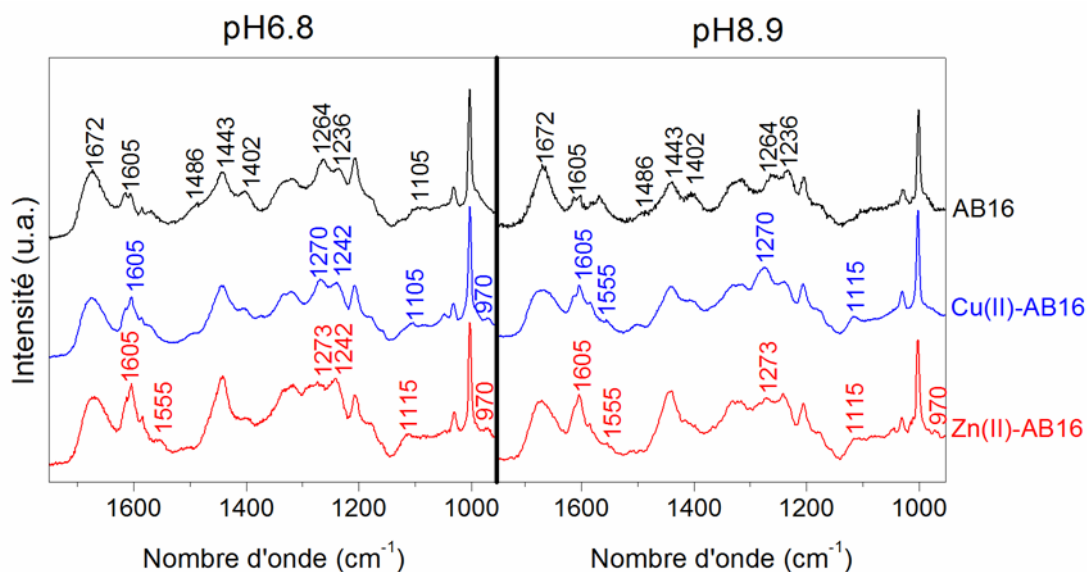


Figure 4.7 : Spectres Raman du peptide A β 16 seul et en présence de Cu(II) ou Zn(II) à pH6.8 et 8.9 dans la région 1750-950 cm^{-1} .

○ Coordination aux histidines

A pH 6.8, en présence de Cu(II), des bandes à 1500, 1270 et 970 cm^{-1} témoignant d'une coordination avec le noyau imidazole des His via N^{π} sont observées. Toutefois, l'augmentation de l'intensité de celle à 1605 cm^{-1} et la présence de celle à 1290 cm^{-1} témoignent également d'une coordination avec N^{τ} . Les mêmes bandes peuvent être retrouvées à pH8.9 et en présence de Zn(II) quel que soit le pH.

○ Coordination au squelette peptidique

A pH 6.8 et 8.9, la bande amide I est retrouvée à 1672 cm^{-1} . En présence de Cu(II) ou Zn(II), aucune variation ne peut être observée suggérant que les liaisons peptidiques n'interviennent pas dans la sphère de coordination de ces métaux.

La figure 4.8 présente les spectres IR du peptide A β 16 seul et en présence de Cu(II) ou Zn(II) à pH 6.8 et 8.9. Pour le peptide libre, la bande amide I est retrouvée à 1643 cm^{-1} pour les deux valeurs de pH. Lors de la coordination du Cu(II) ou Zn(II), cette bande est déplacée vers de plus hauts nombres d'onde. Ces résultats tendent donc à confirmer que les liaisons peptidiques ne sont pas impliquées dans la sphère de coordination. Cependant, certaines études ont suggéré qu'à pH9, le Cu(II) se coordine au groupement amide déprotoné entre Asp1 et Ala2 (Dorlet *et al.*, 2009 ; El Khoury *et al.*, 2011 ; Trujano-Ortiz *et al.*, 2015). Plusieurs possibilités peuvent expliquer l'absence de modifications au niveau de la bande amide I :

- Les groupements amides ne sont pas impliqués dans la sphère de coordination, ce qui favorise la théorie où ce sont le groupement carboxylique d'Asp1 et les histidines en position 6, 13 et 14 qui sont impliqués dans la sphère de coordination du Cu(II) (Curtain *et al.*, 2001 ; Drew *et al.*, 2009 ; Syme *et al.*, 2004).
- La déprotonation du groupement amide entre Asp1 et Ala2 est masquée sur les spectres par la présence des quatorze autres groupements amide protonés.

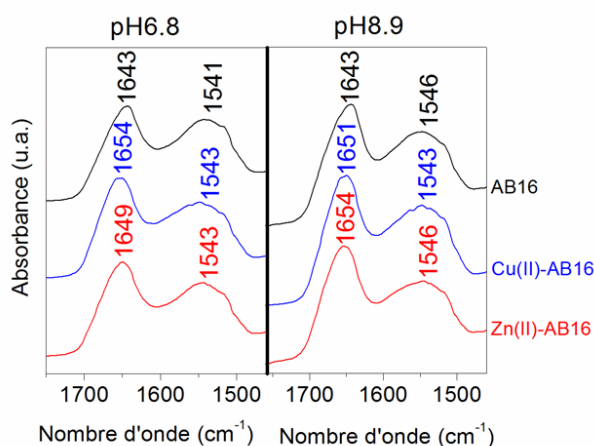


Figure 4.8 : Spectres IR du peptide A β 16 seul et en présence de Cu(II) ou Zn(II) à pH6.8 et 8.9 dans la région 1760-1460 cm^{-1} .

Conclusion :

Les spectres Raman et IR de deux peptides modèles, GHK et DAHK en présence d'ions Cu^{2+} et Zn^{2+} à pH 6.8 et 8.9 ont été analysés. A l'aide de la structure cristallographique des complexes Cu(II)-GHK et -DAHK à pH 7.4, des bandes marqueurs de la coordination ont été identifiées permettant de suggérer une sphère de coordination pour le zinc et d'évaluer l'effet du pH. Il a été montré qu'en présence de Cu(II), le pH n'a pas d'influence sur la sphère de coordination contrairement avec Zn(II). En effet, lorsque le pH augmente, il semblerait que Zn(II) se lie préférentiellement à N^{ϵ} alors qu'à pH 6.8, un équilibre entre N^{ϵ} et N^{δ} coordonné existe. Il a également été montré à pH 8.9, que l'His est capable de former un pont entre deux ions Zn^{2+} . Cette forme a été observée comme majoritaire dans le cas de DAHK. Pour la suite, il serait donc intéressant de refaire les études à un pH encore plus élevé afin de voir si cette structure devient la seule pour les complexes Zn(II)-GHK et -DAHK.

Les données ont ensuite été étendues à la sphère de coordination du peptide A β 16. Les résultats montrent l'implication des résidus His dans la sphère de coordination du cuivre et du zinc. Cependant, afin de déterminer quelles sont les histidines impliquées, d'autres études sont nécessaires et notamment sur des peptides marqués au niveau de chacune d'entre elles. L'étude d'autres peptides marqués peut également être envisagée afin de confirmer par exemple l'implication d'Asp1 ou Glu11 dans les sphères de coordination de ces métaux.

La compréhension du mode de liaison des histidines à un métal dans la gamme de pH physiologique est cruciale car cela peut avoir un effet direct sur l'agrégation des peptides.

4.2 Etude des tissus cérébraux

Dans cette partie, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'étude des plaques séniles présentes au sein de l'hippocampe de souris transgéniques (Tg2576) âgées de 18 mois puisque l'hippocampe est le point de départ de la maladie d'Alzheimer. Plusieurs coupes successives issues de deux souris Tg2576 et de deux souris saines ont été analysées afin de vérifier la reproductibilité des mesures. La figure 4.9 présente une image représentant les coupes de cerveau de souris étudiées, ainsi qu'une plaque sénile prise au microscope optique. Il est important de noter que la couleur verte peut être due à un effet du système optique.

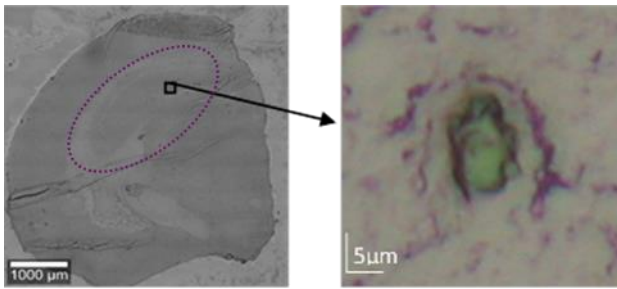


Figure 4.9 : A gauche : Image d'une coupe coronale d'un hémisphère cérébral de souris (la zone en pointillée délimite l'hippocampe) obtenue à l'aide du microscope qui équipe le spectromètre Raman (voir chapitre 2). A droite : image d'une plaque sénile localisée dans l'hippocampe d'une souris transgénique atteinte de la maladie d'Alzheimer obtenue à l'aide d'un microscope Leica DMR-X équipé d'une caméra Nikon coolpix 995 en contraste de phase.

4.2.1 Empreinte moléculaire du tissu cérébral sain

Les spectres IR et Raman typiques du tissu cérébral et plus particulièrement de l'hippocampe sont présentés en figure 4.10.

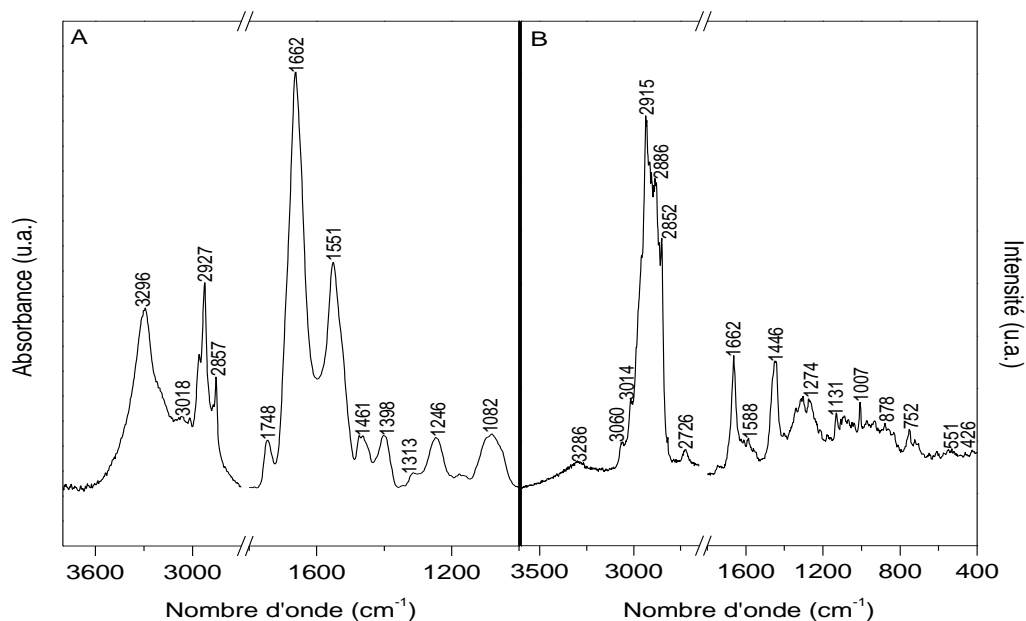


Figure 4.10 : Spectre IR de 3700 à 2700 et de 1800 à 1000 cm^{-1} (A) et spectre Raman de 3800 à 2700 et de 1800 à 400 cm^{-1} (B) typique du tissu cérébral sain. La longueur excitatrice pour le Raman est de 532 nm.

Afin d'identifier les vibrations observées au sein des spectres IR et Raman du tissu cérébral, les quatre grandes classes de biomolécules présentes au sein de ce dernier (protéines, lipides, acides nucléiques et sucres) ont été étudiées au préalable. Les spectres IR et Raman sont présentés en figure 4.11.

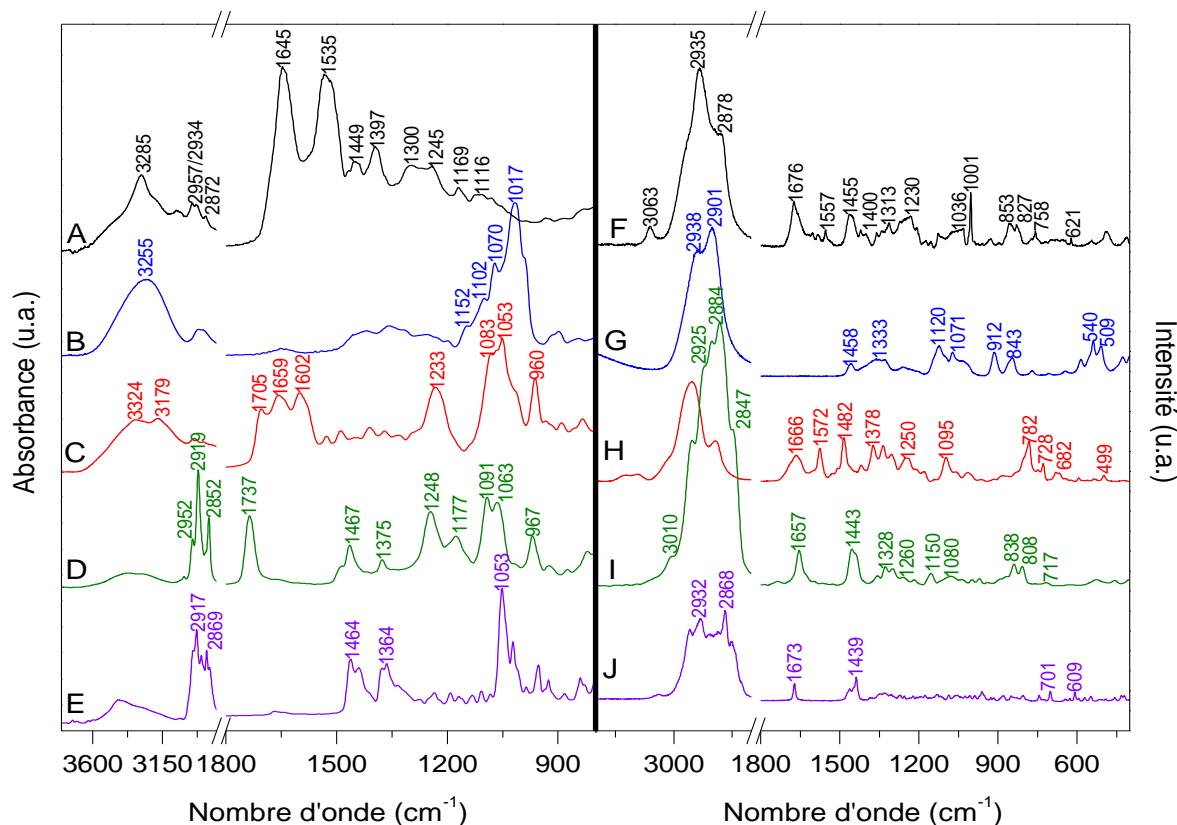


Figure 4.11 : Spectres IR de 3800 à 2800 et de 1800 à 800 cm^{-1} (A-E) et spectres Raman de 3200 à 2800 et de 1800 à 400 cm^{-1} (F-J) de la protéine HSA (A,F), du glucose (B, G), de l'ADN (C,H), de l'asolectine, un mélange de phospholipides (D, I) et du cholestérol (E, J). La longueur excitatrice pour le Raman est de 514 nm.

Des vibrations provenant des protéines, lipides, glucides et acides nucléiques peuvent être retrouvées au sein des spectres IR et Raman représentant le tissu cérébral sain (Tableau 4.2 et 4.3). Les protéines présentent des vibrations en spectroscopie IR à 1662 et 1551 cm^{-1} correspondant à amide I et II respectivement. Les vibrations des chaînes latérales des acides aminés sont retrouvées à 2965, 2927, 2877 (CH_2/CH_3) et 1398 cm^{-1} (COO^-). Ces bandes sont localisées dans le spectre Raman à des positions similaires : 2959, 2934, 2915, 2886 et 1403 cm^{-1} . Les vibrations du squelette peptidique quant à elles se retrouvent à 1662 (amide I) et 1240 cm^{-1} environ (amide III) ; amide II étant très peu visible en Raman. D'autres vibrations peuvent être également identifiées à 1558, 878 et 752 cm^{-1} pour le Trp ; 1588, 1211, 1107, 1038 et 1007 cm^{-1} pour la Phe ; 853, 831 et 646 cm^{-1} pour la Tyr (Barth, 2000 ; Krafft, 2009 ; Rehman *et al.*, 2013 ; Zhu *et al.*, 2011).

La région 1200-950 et 1200-500 cm^{-1} pour la spectroscopie IR et Raman respectivement sont dominées par les vibrations des groupements C-O et C-C des glucides.

Les vibrations des groupements phosphates de l'ADN provenant des liaisons phosphodiester sont retrouvées vers 1230 et 1082 cm^{-1} pour la spectroscopie IR et vers 1091 cm^{-1} pour la spectroscopie Raman (Krafft, 2009 ; Rehman *et al.*, 2013).

Les vibrations des lipides en spectroscopie IR sont retrouvées par exemple à 1748 (groupements C=O), 2965, 2927, 2877, 2857, 1461 (groupements CH_2/CH_3) et 3018 cm^{-1} (groupements C=C provenant des chaînes lipidiques insaturées). Les vibrations correspondantes dans le spectre Raman se retrouvent à 2915, 2886, 2852, 2726, 1446 (CH_2/CH_3) et 1746 cm^{-1} (C=O). Des bandes additionnelles peuvent être également attribuées aux groupements choline des têtes lipidiques (722 cm^{-1}) et aux groupements C=C provenant des chaînes lipidiques insaturées (3014 cm^{-1}) (Krafft, 2005, 2009 ; Rehman *et al.*, 2013).

Toutefois, selon la région étudiée de l'hippocampe, une composition chimique différente peut-y être trouvée puisque ce dernier est formé de deux structures en forme de U inversés, le gyrus denté et la corne d'Ammon. Sur la base de différences morphologiques et de ses connexions synaptiques, la corne d'Ammon est également subdivisée en trois parties : CA1, CA2 et CA3 (Figure 4.12).

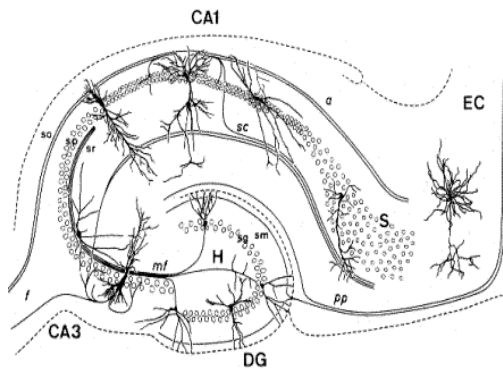


Figure 4.12 : Structure interne de l'hippocampe. **DG** : gyrus denté, **CA** : corne d'Ammon, **EC** : cortex entorhinal, **pp** : voie perforante, **sm** ou **l-m** : stratum moléculaire, **sg** : stratum granulosum, **mf** : fibres moussues, **so** : stratum oriens, **sp** : stratum pyramidale, **sr** : stratum radiatum, **sc** : collatérale de Shaffer, **S** : subiculum, **H** : hile

Ainsi, avant d'étudier les modifications chimiques entraînées par la maladie d'Alzheimer, il est important de déterminer les variations qu'il peut y avoir au sein d'un même tissu. La composition protéique et lipidique a donc été étudiée sur un échantillon provenant d'une souris saine. Différentes régions de l'hippocampe ont été mesurées par microspectroscopie IR et Raman puis comparées entre elles (Figure 4.13).

Les lipides possèdent des vibrations caractéristiques entre 3020 et 2800 cm^{-1} provenant des vibrations d'élongation CH et vers 1750 cm^{-1} provenant des liaisons esters. Cependant, en spectroscopie Raman, les vibrations des protéines participent également fortement à cette région. Toutefois, ces dernières vont avoir une contribution majoritaire entre 3000 et 2930 cm^{-1} et les lipides, plutôt entre 2930 et 2800 cm^{-1} (Figure 4.11).

Ainsi, afin de visualiser les changements dans la composition lipidique, les massifs entre 3002-2829 cm^{-1} et 2936-2834 cm^{-1} ont été étudiés pour la microspectroscopie IR et Raman respectivement, ainsi que les bandes à 3018, 1749 cm^{-1} et 3014, 1740 cm^{-1} . Pour la composition protéique, les bandes entre 1722-1489 et 3000-2930 cm^{-1} ont été étudiées pour la microspectroscopie IR et Raman respectivement. La structure secondaire des protéines a également été analysée au travers de la bande des feuillets β (1630 cm^{-1} pour la spectroscopie IR et 1670 cm^{-1} pour la spectroscopie Raman).

Une répartition inhomogène des protéines et des lipides peut être observée en fonction des régions étudiées pour la microspectroscopie IR et Raman (Figure 4.13). En effet, des zones contenant plus de protéines peuvent être identifiées. Ces dernières sont corrélées à une diminution des lipides et notamment à une baisse des phospholipides et des lipides insaturés suite à une diminution de la bande située entre 1767 et 1710 cm^{-1} environ correspondant aux vibrations des liaisons esters et de celles situées entre 3030 et 3000 cm^{-1} environ respectivement.

Inversement, des zones contenant plus de lipides peuvent être identifiées et corrélées à une diminution de la quantité totale des protéines.

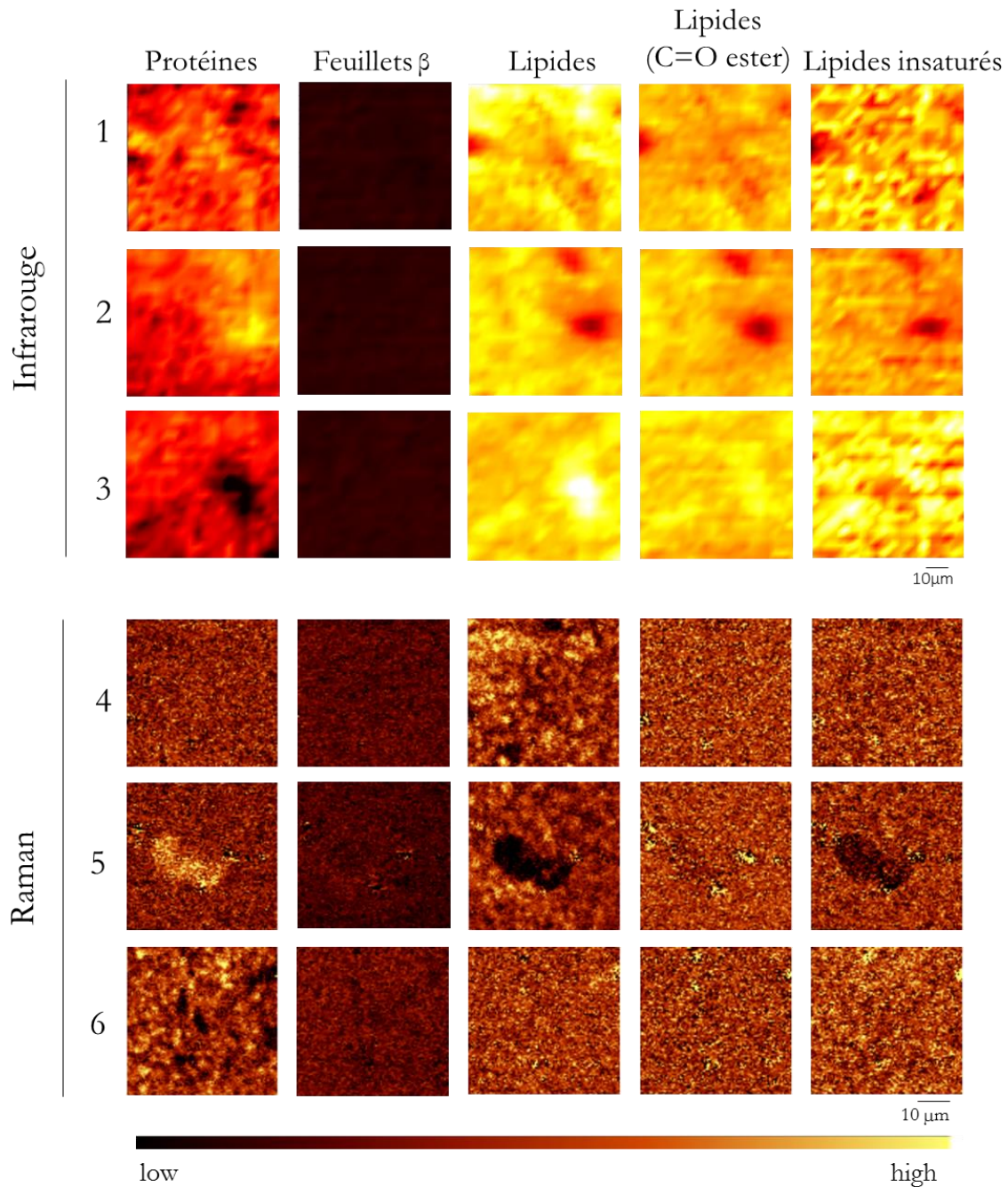


Figure 4.13 : Cartes IR (1-3) et Raman (4-6) issues de différentes régions du cerveau de souris saines. Ces cartes représentent la répartition des protéines et des lipides obtenues à partir de l'aire entre 1722-1489, 3002-2829 cm^{-1} respectivement pour la microspectroscopie IR et entre 3000-2930, 2936-2834 cm^{-1} respectivement pour la microspectroscopie Raman. Les bandes marqueurs d'une conformation en feuillets β des protéines ainsi que celles correspondant au groupement carbonyle et aux insaturations des lipides ont également été analysées à partir de l'intensité de la bande à 1630 cm^{-1} et de l'aire entre 1767-1724 et 3028-3002 respectivement pour la microspectroscopie IR et à partir de l'intensité de la bande à 1670 cm^{-1} et de l'aire entre 1760-1710 et 3031-3005 cm^{-1} respectivement pour la microspectroscopie Raman.

Pour la microspectroscopie IR, l'ouverture utilisée est de 12.5 μm et la distance entre chaque point de mesure est de 4.16 μm . Pour la microspectroscopie Raman, un objectif 20x a été utilisé et la distance entre chaque point de mesure est de 0.5 μm . La longueur excitatrice est 532 nm.

L'échelle de couleur appliquée pour chaque bande étudiée est la même que celle qui a été utilisée pour la suite avec les tissus malades.

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Composé chimique	Tentative d'attribution
1043	Acides nucléiques, glucides	$\nu(\text{PO}_2^-)$, couplage entre $\nu(\text{CO})$ et $\delta(\text{CO})$
1058	Glucides, lipides	Couplage entre $\nu(\text{CO})$ et $\delta(\text{CO})$, cholestérol
1067	Acides nucléiques, glucides	$\nu(\text{CO})$
1082	Acides nucléiques, glucides	$\nu_s(\text{PO}_2^-)$, $\nu(\text{CO})$
1096	Acides nucléiques, lipides	$\nu_s(\text{PO}_2^-)$
1108	Acides nucléiques, lipides	$\nu_s(\text{PO}_2^-)$
1121	Glucides	$\nu(\text{CO})$, $\nu(\text{CC})$
1143	Acides nucléiques, glucides	$\nu(\text{CO})$
1161	Protéines, glucides	$\nu(\text{CO})$
1183	Protéines, glucides	$\nu(\text{CO})$, $\nu(\text{C-OH})$
1214	Acides nucléiques, lipides	$\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$
1230	Acides nucléiques, lipides	$\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$
1246	Acides nucléiques, lipides, protéines	$\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$, Amide III
1263	Acides nucléiques, lipides, protéines	$\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$, Amide III
1282	Acides nucléiques, lipides	$\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$
1308	Protéines	Amide III
1324	Protéines	Amide III
1356	Protéines, lipides	$\nu(\text{CO})$, $\delta(\text{CH})$, $\delta(\text{NH})$, Cholestérol
1375	Protéines, lipides	$\nu(\text{CO})$, $\delta(\text{CH})$, $\delta(\text{NH})$, Cholestérol
1395	Protéines	$\delta(\text{CH}_3)$, $\nu_s(\text{COO}^-)$
1408	Protéines	$\delta(\text{CH}_3)$, $\nu_s(\text{COO}^-)$
1448	Lipides	$\delta(\text{CH}_2)$
1461	Lipides	$\delta(\text{CH}_2)$
1474	Lipides	$\delta(\text{CH}_2)$
1505	Lipides	$\delta(\text{CH}_2)$
1523	Protéines	$\delta(\text{CH})$ des groupements phényles
1553	Protéines, acides nucléiques	Amide II, $\nu(\text{C}=\text{C})$, $\nu(\text{C}=\text{N})$
1583	Protéines	Amide II
1600	Protéines, acides nucléiques	$\nu(\text{CC})$ des groupements phényles
1617	Acides nucléiques	Bases azotées
1646	Protéines, acides nucléiques	Amide I, bases azotées
1665	Protéines, acides nucléiques	Amide I, bases azotées
1694	Protéines, acides nucléiques	Amide I, bases azotées
1748	Lipides	$\nu(\text{C}=\text{O})$
2857	Lipides	$\nu_s(\text{CH}_2)$
2877	Lipides, protéines	$\nu_s(\text{CH}_3)$
2927	Lipides, protéines	$\nu_{as}(\text{CH}_2)$
2965	Lipides, protéines	$\nu_{as}(\text{CH}_3)$
3018	Lipides	$\nu(\text{=CH})$
3296	Protéines	Amide A

Tableau 4.2 : Position et tentatives d'attribution des bandes provenant d'un spectre IR typique du tissu cérébral (Attributions faites à partir de Barth, 2000 ; Krafft, 2009 ; Rehman *et al.*, 2013). Les positions ont été déterminées à partir de la dérivée seconde du spectre IR.

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Composé chimique	Tentative d'attribution
426	Lipides	Cholestérol
551	Lipides, saccharides	Cholestérol
610	Lipides, protéines	Cholestérol, $\delta(\text{O-C=O})$ Phe
646	Protéines	$\gamma_t(\text{CC})$ Tyr
706	Lipides, protéines	Cholestérol, Trp
722	Acides nucléiques, phospholipides	$\nu(\text{CN})$ nucléotides, tête des phospholipides
752	Protéines	Symmetric breathing Trp
831	Protéines	Ring breathing Tyr
853	Protéines	Ring breathing Tyr
878	Protéines	$\delta(\text{ring})$ Trp
932	Protéines	$\nu(\text{C-C})$, Pro
1007	Protéines	$\delta(\text{ring})$ Phe
1038	Protéines	$\delta(\text{C-H})$ Phe
1047	Glucides	$\nu(\text{CO})$
1068	Acides nucléiques, lipides	$\nu(\text{C-C})$, $\nu(\text{C-O})$ phospholipides, $\nu_s(\text{CC})$, $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ acides nucléiques
1091	Acides nucléiques, lipides	$\nu(\text{C-C})$, $\nu(\text{C-O})$ phospholipides, $\nu_s(\text{CC})$, $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ acides nucléiques
1107	Protéines	Phe
1168	Lipides	$\nu(\text{C=C})$, $\delta(\text{COH})$
1175	Protéines	$\delta(\text{C-H})$ Tyr
1211	Protéines	$\nu(\text{C-C}_6\text{H}_5)$ Trp, Phe
1240	Protéines, acides nucléiques	$\nu(\text{CN})$, $\delta(\text{NH})$ Amide III, $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ acides nucléiques
1274	Protéines, lipides, acides nucléiques	$\nu(\text{CN})$, $\delta(\text{NH})$ Amide III, $\delta(\text{=CH})$ Lipides, Ring breathing acides nucléiques
1308	Protéines, acides nucléiques, lipides	$\delta(\text{CH}_2)$, $\gamma_w(\text{CH}_3/\text{CH}_2)$, $\gamma_t(\text{CH}_3/\text{CH}_2)$
1341	Protéines, acides nucléiques	$\delta(\text{CH}_3)$, $\delta(\text{CH}_2)$, $\gamma_w(\text{CH}_3/\text{CH}_2)$, $\gamma_t(\text{CH}_3/\text{CH}_2)$
1403	Protéines	$\nu_s(\text{COO-})$
1446	Protéines, lipides	$\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH}_3)$
1558	Protéines	$\nu(\text{CN})$, $\nu(\text{C=C})$ Trp, Tyr
1588	Protéines	$\nu(\text{C=C})$ Phe
1610	Protéines	$\nu(\text{C=C})$ Phe, Tyr
1662	Protéines	$\nu(\text{C=O})$ Amide I
1746	Lipides	$\nu(\text{C=O})$
2726	Lipides	$\nu(\text{CH})$
2852	Lipides, protéines	$\nu_s(\text{CH}_2)$
2886	Lipides, protéines	$\nu(\text{CH}_2)$ résonance de Fermi
2915	Lipides, protéines	$\nu_{as}(\text{CH}_2)$
2934	Protéines, lipides	$\nu_s(\text{CH}_3)$
2959	Protéines, lipides	$\nu_{as}(\text{CH}_3)$
3014	Lipides	$\nu_{as}(\text{=CH})$
3063	Protéines	$\nu(\text{=CH})$
3286	Lipides, eau	$\nu(\text{OH})$

Tableau 4.3 : Position et tentatives d'attribution des bandes provenant d'un spectre Raman typique du tissu cérébral (Attributions faites à partir de Howell *et al.*, 1999 ; Krafft, 2005 ; Rehman *et al.*, 2013).

4.2.2 Empreinte moléculaire des plaques séniles

○ Analyses univariées

Plusieurs plaques séniles localisées au niveau de l'hippocampe de souris transgéniques atteintes de la maladie d'Alzheimer et âgées de 18 mois ont été étudiées par spectroscopie IR et Raman. Afin d'identifier les variations dans la composition protéique et lipidique des plaques séniles, les régions contenant les bandes amides ainsi que celles contenant les vibrations d'élongation CH et C=O des lipides ont été comparées à celles de l'hippocampe sain (Figure 4.14).

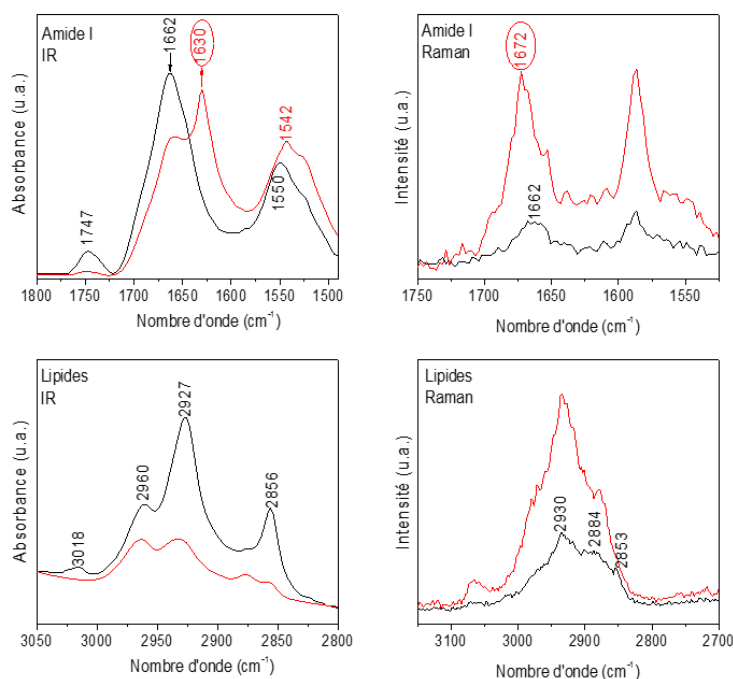


Figure 4.14 : Comparaison des spectres IR et Raman typiques des plaques séniles (rouge) et du tissu sain (noir) dans les régions spectrales caractéristiques des protéines et des lipides.

Le spectre IR représentant le centre des plaques séniles montre une augmentation de la bande à 1630 cm^{-1} et une diminution de celle à 1662 cm^{-1} par rapport au spectre IR du tissu cérébral sain. Ces modifications au niveau de la bande amide I témoignent d'un changement conformationnel des protéines présentes au sein des plaques séniles, passant d'une structure hélicoïdale à une structure en feuillets β parallèles, ce qui est en accord avec l'agrégation des peptides $A\beta$. Un déplacement du maximum de la bande amide II peut être également observé. La position initiale à 1550 cm^{-1} pour le tissu sain est généralement observée pour les protéines majoritairement structurées en hélices α alors que la bande à 1542 cm^{-1} est plutôt souvent visualisée pour les protéines organisées en feuillets β .

Toutefois, selon les plaques séniles étudiées, le profil des bandes amide I et II diffèrent légèrement (Figure 4.15). En effet, la bande correspondant aux feuillets β varie entre 1630 et 1636 cm^{-1} . La position de cette bande dépend fortement du nombre de brins β impliqués dans le feuillet β et de la force des liaisons hydrogènes. Ainsi, le décalage vers de plus faibles nombres d'onde indique une

augmentation du nombre de brins β impliqués au sein du feuillet et/ou la formation de plus fortes liaisons hydrogènes (liaisons hydrogènes plus courtes par exemple) comme c'est le cas pour les fibres. Ces résultats mettent donc en évidence le processus d'agrégation des peptides $A\beta$ au cours du temps ; la plaque numérotée en 1 sur la figure 4.15 et 4.16 correspondant certainement à une plaque plus ancienne.

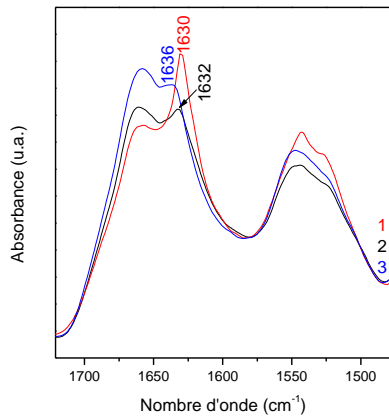


Figure 4.15 : Spectres IR dans la gamme spectrale 1720-1480 cm^{-1} de trois différentes plaques séniles. Les numéros attribués aux plaques correspondent à ceux attribués en figure 4.16.

L'analyse quantitative de la région amide I réalisée par déconvolution confirme un état d'agrégation différent entre les plaques. En effet, le pourcentage de feuillets β varie entre 33 et 39% et celui des hélices α /structures désordonnées entre 28 et 34%. Le spectre représentant le tissu sain a également été déconvolué. Une structure majoritaire en hélices α /structures désordonnées a été trouvée avec un pourcentage de 50% contre 12% de feuillets β . Pour chaque cas, le pourcentage de coudes varie entre 25 et 30% (Annexe 2).

Les cartes IR présentées en figure 4.16 représentent l'intensité et la distribution de la bande à 1630 cm^{-1} . Elles soulignent une forte concentration de protéines organisées sous forme de feuillets β parallèles au sein des plaques séniles mais une absence au niveau du tissu environnant. Ces données sont en accord avec de précédentes études réalisées par microspectroscopie IR (Choo, *et al.*, 1996 ; Liao *et al.*, 2013 ; Miller *et al.*, 2006).

La microspectroscopie Raman confirme la forte concentration de protéines organisées sous forme de feuillets β au sein des plaques séniles avec un décalage de la bande amide I vers de plus hauts nombres d'onde (Figure 4.14 et 4.16).

Concernant les lipides, il peut être observé sur la figure 4.14, une diminution des vibrations d'élongation CH dans la région 3002-2829 et 2936-2834 cm^{-1} pour la spectroscopie IR et Raman respectivement, ainsi que des vibrations d'élongation C=O des fonctions esters (1747 cm^{-1}) et des vibrations d'élongation C=C des lipides insaturés (3018 cm^{-1}), témoignant d'une diminution de la quantité de lipides au sein des plaques séniles et plus particulièrement des glycérophospholipides.

Les cartes IR et Raman sur la figure 4.16 représentent l'intensité et la distribution des vibrations d'élongation CH, de la vibration d'élongation C=O des fonctions esters des lipides et des vibrations

d'élongation C=C des lipides insaturés. Elles soulignent une plus faible concentration de lipides au centre des plaques par rapport au tissu environnant. Egalement, elles permettent de mettre en évidence la présence d'un halo lipidique constitué majoritairement de glycérophospholipides autour des plaques séniles.

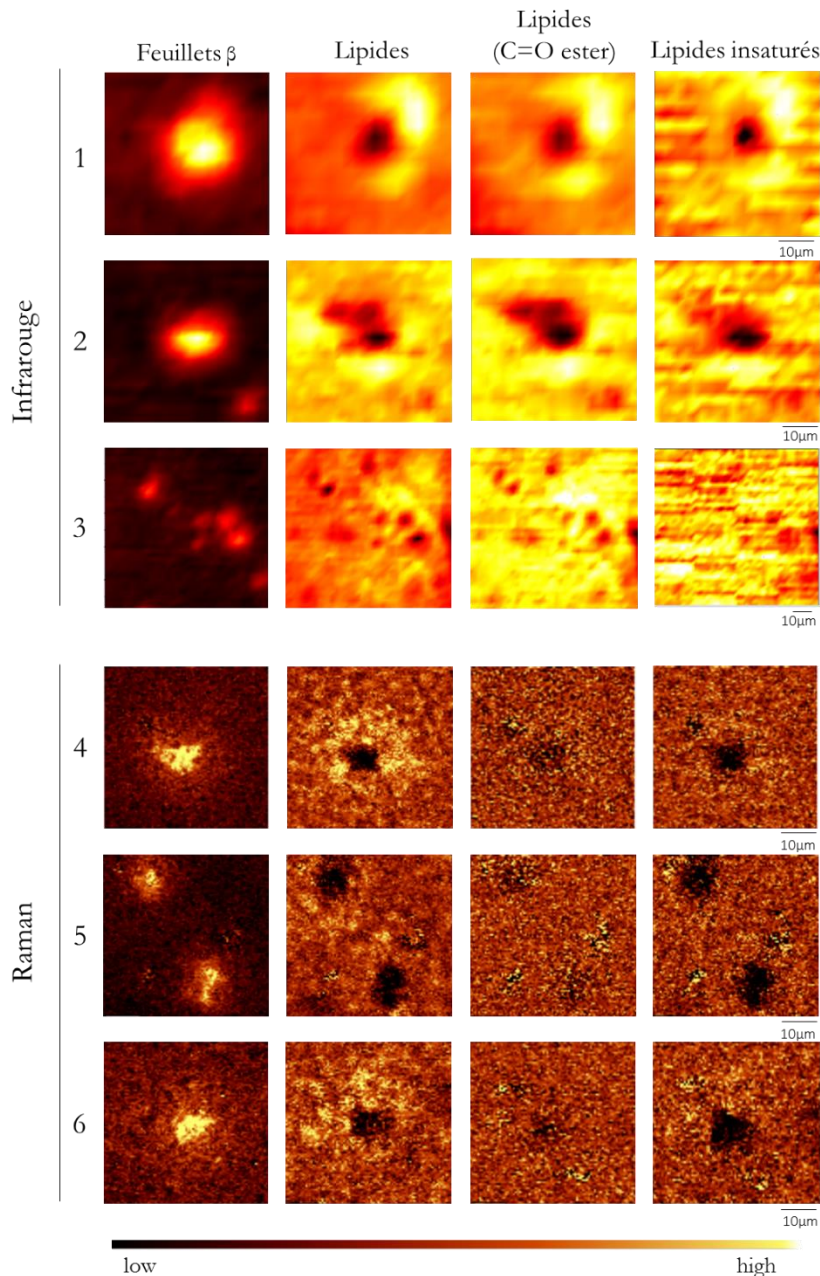


Figure 4.16 : Cartes IR (1-3) et Raman (4-6) de différentes plaques séniles. Ces cartes représentent la répartition des protéines sous forme de feuillets β et des lipides obtenues à partir de l'intensité de la bande à 1630 cm^{-1} (feuillets β) et de l'aire entre $3002\text{-}2829$ (lipides totaux), $1767\text{-}1724$ (groupement carbonyle des lipides) et $3028\text{-}3002\text{ cm}^{-1}$ (lipides insaturés) pour la microspectroscopie IR et à partir de l'intensité de la bande à 1670 cm^{-1} (feuillets β) et de l'aire entre $2936\text{-}2834$ (lipides totaux), $1760\text{-}1710$ (groupement carbonyle des lipides) et $3031\text{-}3005\text{ cm}^{-1}$ (lipides insaturés) pour la microspectroscopie Raman.

Pour la microspectroscopie IR, l'ouverture utilisée est de $12.5\text{ }\mu\text{m}$ et la distance entre chaque point de mesure est de $4.16\text{ }\mu\text{m}$. Pour la microspectroscopie Raman, un objectif 20x a été utilisé et la distance entre chaque point de mesure est de $0.5\text{ }\mu\text{m}$. La longueur d'onde excitatrice est 532 nm .

L'échelle de couleur appliquée pour chaque bande étudiée est la même que celle qui a été utilisée précédemment dans la figure 4.13.

La comparaison des spectres Raman représentant le centre des plaques séniles et le tissu cérébral sain a également permis de mettre en évidence une exaltation des bandes à 1588, 1400, 1316, 1132 et 754 cm^{-1} (Figure 4.17 A). Ce profil spectral est obtenu selon la même distribution et localisation que celui de la bande amide I (Figure 4.17 B).

Généralement, l'exaltation de signaux en spectroscopie Raman est induite lorsqu'un chromophore présente une transition électronique proche de la longueur d'onde excitatrice ; il s'agit de l'effet de résonance. Afin d'établir un profil d'excitation, les plaques séniles ont été mesurées à l'aide d'un laser à 514 et 633 nm. La figure 4.18 a, c, e compare les différents spectres Raman obtenus avec les lasers à 514, 532 et 633 nm respectivement. Avec une longueur d'onde excitatrice à 514 et 532 nm, de forts signaux présentant des intensités différentes et des décalages de quelques cm^{-1} peuvent être observés dans la région 1800-400 cm^{-1} . Cependant, avec une longueur d'onde excitatrice à 633 nm, ces derniers sont absents suggérant que le chromophore impliqué absorbe à des longueurs d'onde plus faibles que 633 nm.

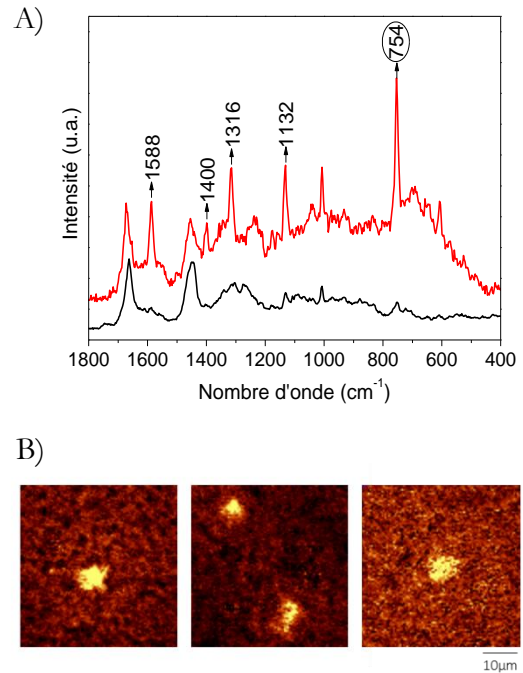


Figure 4.17 : A) Spectres Raman de 1800 à 400 cm^{-1} représentatifs du tissu cérébral d'une souris saine (noir) et d'une plaque sénile (rouge). B) Cartes Raman obtenues à partir de la bande à 754 cm^{-1} pour différentes plaques séniles. La longueur d'onde excitatrice est 532 nm.

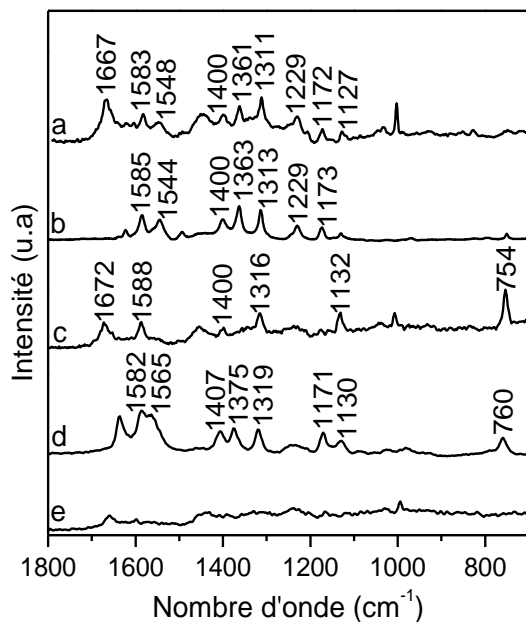


Figure 4.18: Spectres Raman d'une plaque sénile à 514 nm (a), 532 nm (c) et 633 nm (e) et spectres Raman du cytochrome c à 514 nm (b) et 532 nm (d).

Un chromophore qui a été suggéré impliqué dans la maladie d'Alzheimer est l'hème. En effet, comme il l'a été mentionné plus en détails dans l'introduction, les hèmes joueraient un rôle dans la production d'espèces réactives à l'oxygène en se coordonnant aux peptides A β (Atamna, 2006 ; Hernandez-Zimbron *et al.*, 2012 ; Pramanik *et al.*, 2011a). Les hèmes sont constitués d'un noyau porphyrine et d'un atome de fer qui peut être sous forme réduite ou oxydée. Ils sont capables de se coordonner à différents acides aminés pour former des complexes penta- ou hexa-coordinés dans une configuration bas spin ou haut spin. Différents types d'hèmes existent dont les plus biologiquement importants sont les hèmes *a*, *b* et *c*.

La spectroscopie Raman de résonance est une méthode spécifique pour déterminer l'état redox du fer, son état de spin ou le nombre de ligands coordonnés. Selon l'environnement du noyau porphyrine, la spectroscopie Raman de résonance permet également d'identifier le type d'hème mis en jeu (Adar et Erecinska, 1977 ; Loehr et Loehr, 1973 ; Spiro, 1975 ; Spiro et Streckas, 1973).

Le spectre Raman du centre des plaques séniles a été comparé à celui d'un composé modèle, le cytochrome *c* qui contient un hème *c* pour les longueurs d'onde excitatrices 514 et 532 nm (Figure 4.18 b et d). Plusieurs bandes sont similaires entre les deux témoignant de la présence du cytochrome *c* au sein des plaques séniles. En effet, les bandes marqueurs des hèmes provenant des vibrations du noyau porphyrine telles que ν_{10} , ν_{11} , ν_{20} ou ν_4 peuvent être observées au sein du spectre des plaques séniles (Tableau 4.4). Ces bandes sont sensibles à l'état d'oxydation, de spin et de coordination du fer présent au sein de l'hème. Au sein des plaques séniles, ces bandes se retrouvent à 1620, 1548, 1400 et 1361 cm^{-1} témoignant que l'hème est sous forme réduite, hexacoordinée et dans une configuration bas spin (6cLS) (Loehr et Loehr, 1973 ; Spiro et Streckas, 1973). Cependant, il est important de noter que le laser peut être la cause de l'état réduit de l'hème.

Plaque sénile	514 nm				532 nm		Tentative d'attribution
	Cytochrome <i>c</i>		Hémine	Hémine + A β 40	Plaque sénile	Cytochrome <i>c</i>	
	Forme oxydée	Forme réduite					
-	752	750	753	748	754	760	ν_{15}
1002	-	-	-	-	1006	-	Phe (δ ring)
1127	1128	1129	1129	1125	1132	1130	ν_{22}
1172	1171	1173	-	1170	-	1171	ν_{30}
1229	1229	1229	1230	1230	-	-	ν_{13}
1311	1313	1313	1307	1308	1316	1319	ν_{21}
-	-	-	1339	1339	-	-	ν_{41}
1361	1371	1363	1369	1357	-	1375	ν_4
1400	1405	1400	1394	1394	1400	1407	ν_{20}
-	1501	1494	1491	1491	-	-	ν_3
1548	1561	1544	1562	1536	1550	1565	ν_{11}
1583	1583	1585	-	1585	1588	1582	ν_2
1620	1635	1622	1619	1638	-	1636	ν_{10}
1667	-	-	-	-	1672	-	Amide I ($\nu_{\text{C=O}}$)

Tableau 4.4: Position (en cm^{-1}) et attributions correspondantes des bandes Raman provenant des spectres d'une plaque sénile, du cytochrome *c*, de l'hémine en présence ou non d'A β 40 à 514 et 532 nm (Attributions faites à partir de Hu *et al.*, 1993 ; Lecomte *et al.*, 1998 ; Parthasarathi *et al.*, 1987). Pour plus de détails sur les vibrations du noyau porphyrine mises en jeu, se référer à l'annexe 3.

Le cytochrome c présente trois bandes d'absorption dans la gamme spectrale du visible : une vers 405 nm appelée bande de Soret et deux autres à 520 et 550 nm appelées bande α et β respectivement qui pourraient expliquer l'exaltation des signaux suite à l'interaction avec le laser à 514 et 532 nm mais pas à 633 nm.

La figure 4.19 a, b présente le spectre Raman du cytochrome c et du complexe A β 40-cytochrome c . La comparaison des deux spectres montre que la signature spectrale du cytochrome c n'est pas affectée par la présence du peptide. Ainsi, il est impossible de dire si le cytochrome c présent au sein des plaques séniles est sous forme libre ou lié aux peptides A β .

Le complexe A β 40-hémine a également été étudié (Figure 4.19 c). Aucune similitude ne peut être observée entre le spectre Raman des plaques séniles et celui du complexe, excluant ou limitant ainsi, la présence d'hèmes b au sein des plaques séniles. En effet, il n'est pas exclu que des vibrations provenant d'autres types d'hèmes soient masquées par les vibrations de l'hème c présent en plus grande quantité.

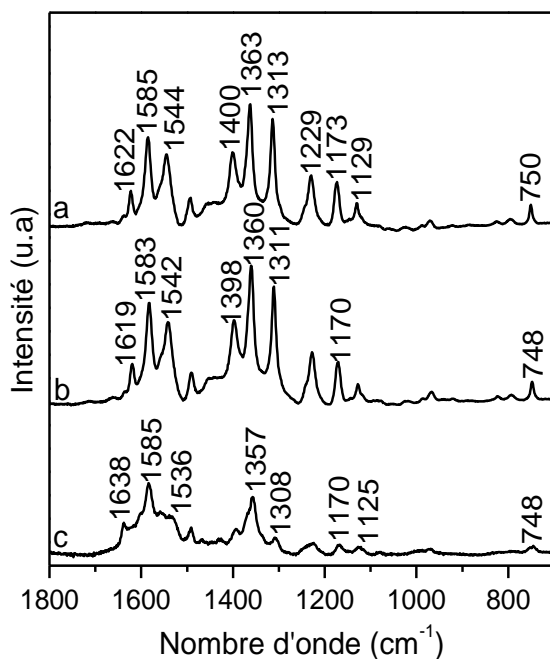


Figure 4.19: Spectres Raman du cytochrome c (a), du complexe A β 40-cytochrome c (b) et du complexe A β 40-hémine (c) à 514 nm.

Afin de confirmer la présence d'hèmes au sein des plaques séniles, ces dernières ont également été étudiées en lointain IR puisque les vibrations métal-ligand peuvent être observées dans cette gamme spectrale ; par exemple les vibrations d'élongation Fe-N (N provenant de His) sont attendues vers 388/378 cm⁻¹ (Dörr, *et al.*, 2008).

Selon les plaques séniles étudiées, différents spectres IR ont été obtenus et sont présentés en figure 4.20 (a, b et c). Dans la majorité des cas, aucune variation n'est observée entre le spectre des plaques séniles et celui du milieu environnant (Figure 4.20 c et d). Cependant, des variations spectrales ont été observées pour deux des huit plaques étudiées (Figure 4.20 a et b). Les bandes à 540 et 600

cm^{-1} retrouvées pour une des plaques (Figure 4.20 a) peuvent être attribuées aux vibrations amide IV/VI. Ces bandes sont retrouvées dans le spectre du cytochrome *c* mais ne sont pas spécifiques à celui-ci (Dörr, *et al.*, 2008).

D'autres bandes à 523, 455 et 361 cm^{-1} peuvent être clairement visualisées sur le spectre b (Figure 4.20). Toutefois, la présence de ces bandes dans le spectre présenté en a n'est pas exclue en raison des larges bandes qui peuvent y être observées.

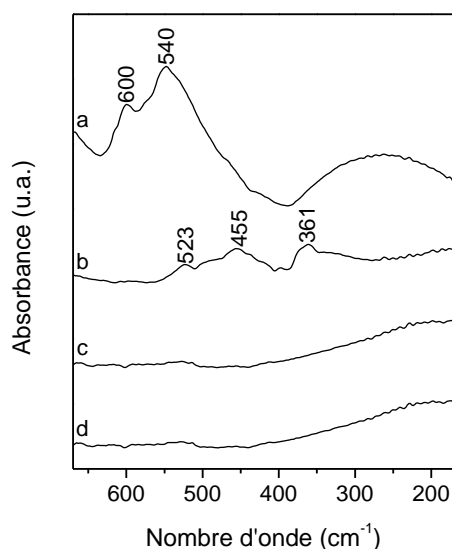


Figure 4.20: Spectres IR correspondant à différentes plaques séniles dans la gamme spectrale 670-170 cm^{-1} (a, b et c). Le spectre présenté en d est représentatif du milieu environnant. L'ouverture du microscope utilisée pour ces mesures est 80 μm .

Plusieurs possibilités peuvent être considérées pour expliquer la variabilité spectrale entre les différentes plaques séniles :

- La limite de détection en IR des différents composés. En effet, il peut être envisagé que la quantité des différents composés présents au sein des plaques séniles n'est pas la même pour toutes ; ce qui peut être un problème lorsque le signal n'est pas exalté.
- L'ouverture de l'objectif du microscope utilisée qui est de 80 μm alors que les plaques séniles ne mesurent que 10 μm environ. Cela a pour conséquence que l'information spectrale contenue dans les plaques séniles est moyennée avec celle d'une partie du milieu environnant. Toutefois, l'utilisation d'une plus petite ouverture n'est pas possible à cause de la limite de diffraction et de la trop faible quantité de lumière qui arrive au détecteur.

Ainsi, afin d'approfondir les résultats obtenus ici, des études supplémentaires sur d'autres plaques ou des composés modèles par exemple sont nécessaires.

○ **Analyses multivariées**

Afin d'approfondir les changements biochimiques liés au développement de la maladie d'Alzheimer, une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée sur un set de mesures IR et Raman effectué sur le tissu cérébral sain et malade.

Pour les mesures IR, les quatre premières composantes principales (CP) ont été sélectionnées. Elles représentent 93,5% de la variance. La projection des spectres dans l'espace de chaque CP ainsi que les représentations graphiques de ces dernières sont présentées en figure 4.21.

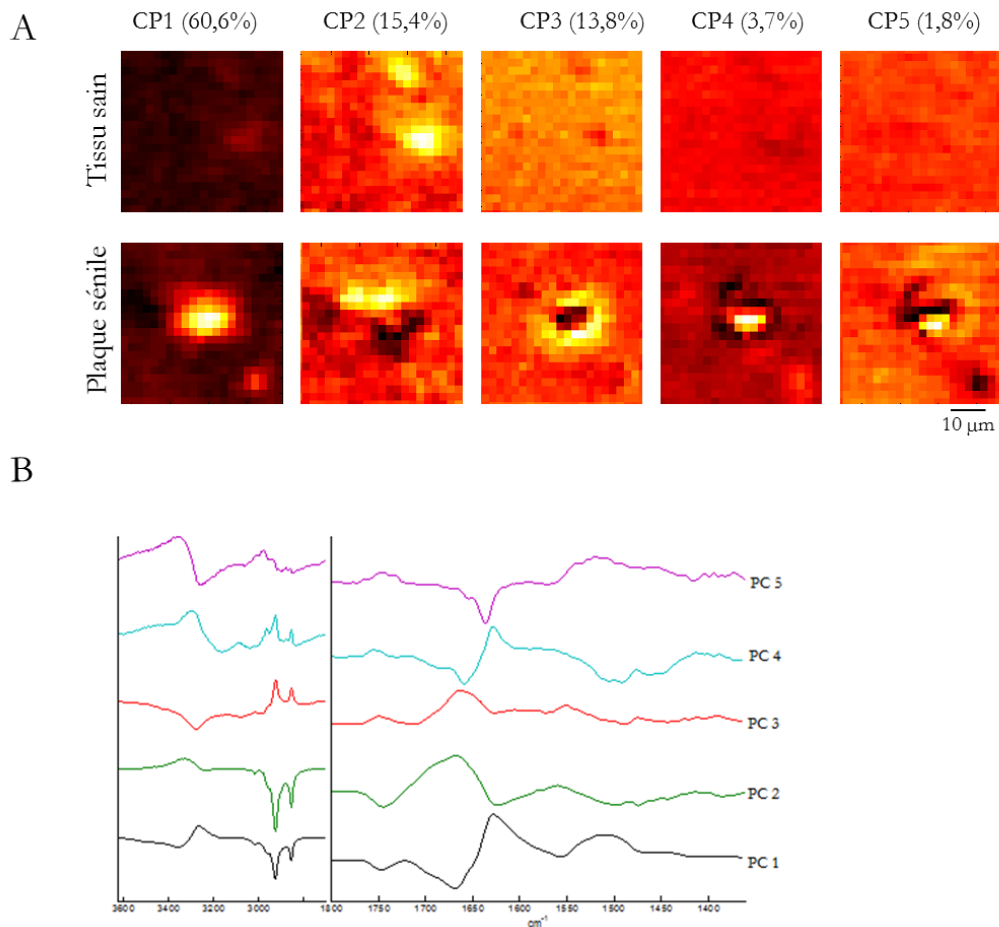


Figure 4.21 : A) Images représentant les scores des spectres IR par rapport aux CP 1 à 4 (réalisées à l'aide du logiciel Kinetics). Les pourcentages entre parenthèses indiquent la variance du set de données représentée par la CP en question. B) Représentation graphique des CP calculées entre 3620-2700 et 1800-1390 cm^{-1} .

Des bandes négatives et positives peuvent être observées sur chaque CP. Elles sont responsables respectivement des couleurs foncées et claires des images représentant les scores par rapport à chacune des CP (Figure 4.21 A).

Sur la CP1, des bandes négatives peuvent être observées à 3016, 2963, 2927, 2856, 1746 (marqueurs des lipides) et 1668 cm^{-1} (marqueur des protéines). De même, une bande positive peut être visualisée à 1628 cm^{-1} montrant que la structure des protéines au niveau de la plaque sénile est différente de celle du tissu environnant et du tissu sain.

La CP2 présente des bandes négatives caractéristiques des lipides à 3016, 2963, 2927, 2856 et 1746 cm^{-1} et des bandes positives caractéristiques des protéines à 1668 et 1561 cm^{-1} . Cette CP reflète l'hétérogénéité au sein d'un même tissu.

La CP3 montre des bandes positives caractéristiques des lipides et des protéines. Elle met en évidence une distribution particulière des lipides autour des plaques.

La CP4 met en évidence le changement de structure secondaire des protéines au niveau de la plaque sénile avec une bande positive à 1629 cm^{-1} et une bande négative à 1658 cm^{-1} , caractéristique des feuillets β et des hélices α respectivement.

Ces résultats montrent donc que l'ACP permet de caractériser les plaques séniles sur la base de différences lipidiques et protéiques tout en tenant compte de l'hétérogénéité du tissu cérébral. Toutefois, elle ne permet pas d'apporter des informations supplémentaires par rapport aux analyses univariées.

Pour les mesures Raman, les cinq premières CP ont été sélectionnées. Elles représentent 92,9% de la variance. La projection des spectres dans l'espace de chaque CP ainsi que les représentations graphiques de ces dernières sont présentées en figure 4.22.

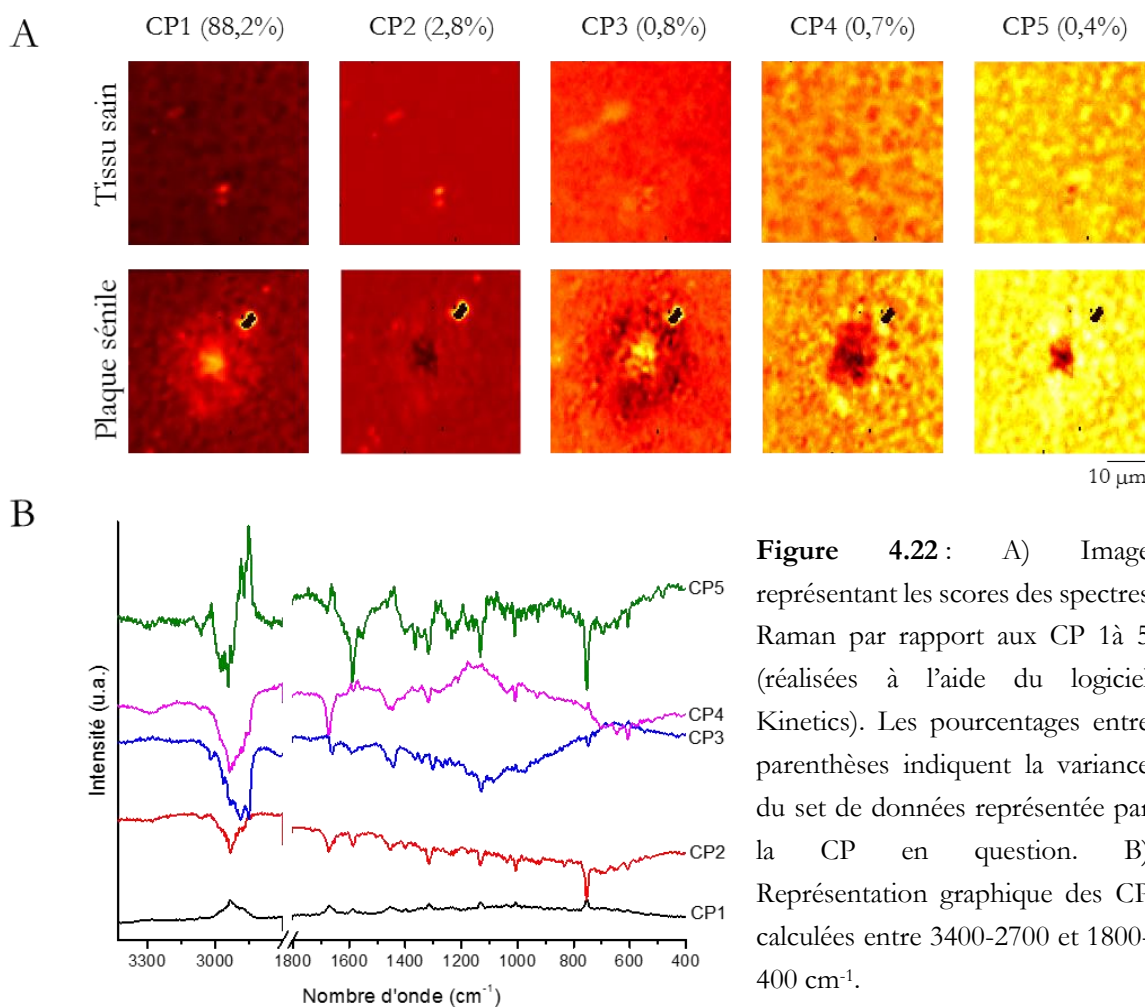


Figure 4.22 : A) Image représentant les scores des spectres Raman par rapport aux CP 1 à 5 (réalisées à l'aide du logiciel Kinetics). Les pourcentages entre parenthèses indiquent la variance du set de données représentée par la CP en question. B) Représentation graphique des CP calculées entre 3400-2700 et 1800-400 cm^{-1} .

Comme précédemment, des bandes négatives et positives peuvent être observées sur les CP. Elles sont responsables respectivement des couleurs foncées et claires des images représentant les scores par rapport à chacune des CP (Figure 4.22 A). Certains spectres Raman n'ont pas été pris en compte dans l'analyse car ils n'ont pas passé les tests de qualité. Ils sont en noir.

La CP1 représente le spectre classique d'une plaque sénile.

Sur la CP2, des bandes négatives peuvent être observées 2935, 1674, 1453, 1131, 1005 et 755 cm^{-1} représentatives des protéines. Cette CP montre que les protéines au centre de la plaque sénile sous forme de feuillet β .

La CP3 reflète une réorganisation de la composition lipidique autour des plaques (et plus particulièrement des glycérophospholipides) avec des bandes négatives à 3010, 2960, 2933, 2886, 2852, 1735, 1660, 1443 et 1301 cm^{-1} .

Sur la CP4, des bandes négatives à 2936, 2886, 2852, 1673, 1443, 1318, 1009, 646 et 707 cm^{-1} peuvent être visualisées, ainsi que des bandes positives à 1594, 1570 et 753 cm^{-1} .

La CP5 présente des bandes à 1588, 1402, 1367, 1317, 1133 et 754 cm^{-1} caractéristiques des protéines hémiques.

Ainsi, l'ACP permet de confirmer la colocalisation entre des protéines sous forme de feuillet β et des protéines hémiques au centre des plaques séniles. Elle permet de confirmer également, une réorganisation des lipides autour des plaques. Cependant, elle ne permet pas de mettre en évidence la variation d'autres composés.

Conclusion :

L'utilisation en parallèle de la microspectroscopie IR et Raman a permis de mettre en évidence pour la première fois, une colocalisation entre les peptides $A\beta$ agrégés sous forme de feuillet β parallèles et le cytochrome c . Néanmoins, aucune preuve ne peut être apportée concernant l'interaction entre les deux.

L'accumulation du cytochrome c au sein des plaques séniles suggère un dysfonctionnement mitochondrial entraînant une augmentation accrue des mécanismes apoptotiques qui déclenchent la mort des cellules neuronales. Sa présence serait due à une perméabilisation de la membrane suite à l'interaction des peptides $A\beta$ avec cette dernière. En effet, les résultats ont montré que les plaques séniles sont entourées d'un halo lipidique composé majoritairement de glycérophospholipides, principaux composés des membranes cellulaires.

Ces études ont donc permis de clarifier le rôle des hèmes au sein de la maladie d'Alzheimer et d'ouvrir la voie à de futures recherches pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à moduler ou inhiber l'accumulation de cytochrome c au sein des plaques séniles.

4.3 Etude des liquides céphalorachidiens

Cette partie présente les résultats obtenus dans le cadre des études pilotes menées par spectroscopie IR et SERS sur 40 échantillons de liquides céphalorachidiens (LCR) provenant de patients contrôle (n=9) ou atteints de la maladie d'Alzheimer au stade prodromal (MCI) (n=14) ou démence (n=17).

4.3.1 Etude par spectroscopie infrarouge

4.3.1.1 Empreinte moléculaire du liquide céphalorachidien

Le spectre IR typique du LCR représentant la moyenne du groupe contrôle est présenté en figure 4.23.

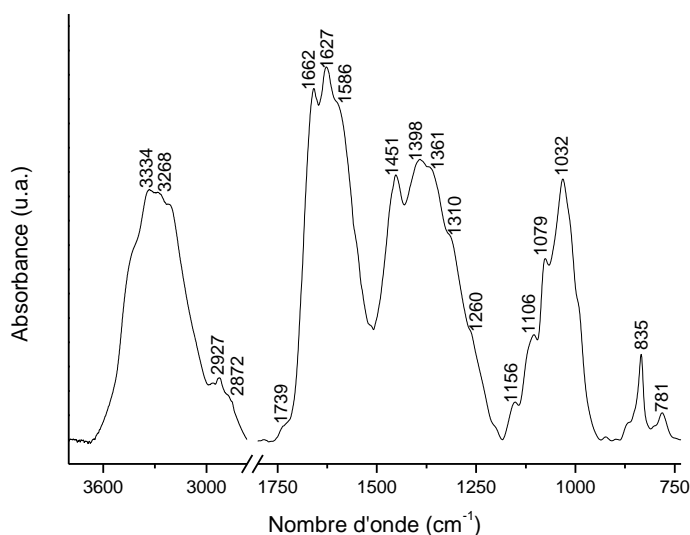


Figure 4.23 : Spectre IR typique moyen du LCR du groupe contrôle de 3800 à 2765 et de 1800 à 735 cm⁻¹.

Afin d'identifier les vibrations présentes au sein du spectre du LCR, des composés modèles ont été étudiés. Les composés présents dans le LCR peuvent être classifiés en cinq catégories : les substances inorganiques, les substances azotées, les lipides, les glucides et métabolites non azotés, et les vitamines (Diem et Lentner, 1973). La figure 4.24 présente les spectres vibrationnels de divers composés appartenant à quatre de ces catégories. Pour les substances azotées, l'HSA, la créatine, la créatinine, l'acide urique, l'urée, l'acétylcholine, l'histamine, l'hypoxanthine et la bilirubine ont été analysés; pour les lipides, le cholestérol et l'asolectine qui correspond à un mélange de phospholipides; pour les glucides et métabolites non azotés, le glucose, l'acide lactique et l'acide pyruvique; et pour les vitamines, la thiamine (vitamine B1), la pyridoxine (vitamine B6), l'acide folique (vitamine B9), la cobalamine (vitamine B12) et l'acide ascorbique (vitamine C) ont été étudiés (la structure de chacun de ces composés est présenté en annexe 4).

Les spectres des peptides A β 40 et A β 42, deux des biomarqueurs les plus utilisés dans le diagnostic de la maladie d'Alzheimer ont également été étudiés (Figure 4.25). Plusieurs variations peuvent être observées entre les deux spectres, notamment dans la région 1700-1600 cm⁻¹ où sont retrouvées les vibrations $\nu(\text{C}=\text{O})$ provenant du squelette peptidique. En effet, deux bandes majoritaires à 1651

et 1631 cm^{-1} peuvent être observées pour A β 40 contre une majoritaire à 1628 cm^{-1} pour A β 42. Cela montre qu'une proportion d'A β 40 est organisée sous forme d'hélices α et une autre sous forme de feuillets β alors qu'A β 42 s'organise majoritairement en feuillets β . Cela peut s'expliquer par le fait qu'A β 42 s'agrège plus facilement en solution. Egalement, des différences peuvent être observées dans la région $3600\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ où sont retrouvées les vibrations $\nu(\text{NH})$ du squelette peptidique. Ce mode de vibration dépend de la force des liaisons hydrogènes (Barth, 2000). Il est donc influencé par la structure secondaire des peptides. Il n'est pas exclu que la quantité d'eau restante au sein de l'échantillon n'est pas la même, ce qui pourrait également expliquer les différences dans cette région puisque les vibrations $\nu(\text{OH})$ de l'eau y sont retrouvées. De plus, des bandes plus intenses peuvent être observées pour A β 40 à 1260 , 1097 , 1045 et 802 cm^{-1} . Cependant, l'attribution de ces dernières reste encore pour le moment inconnue.

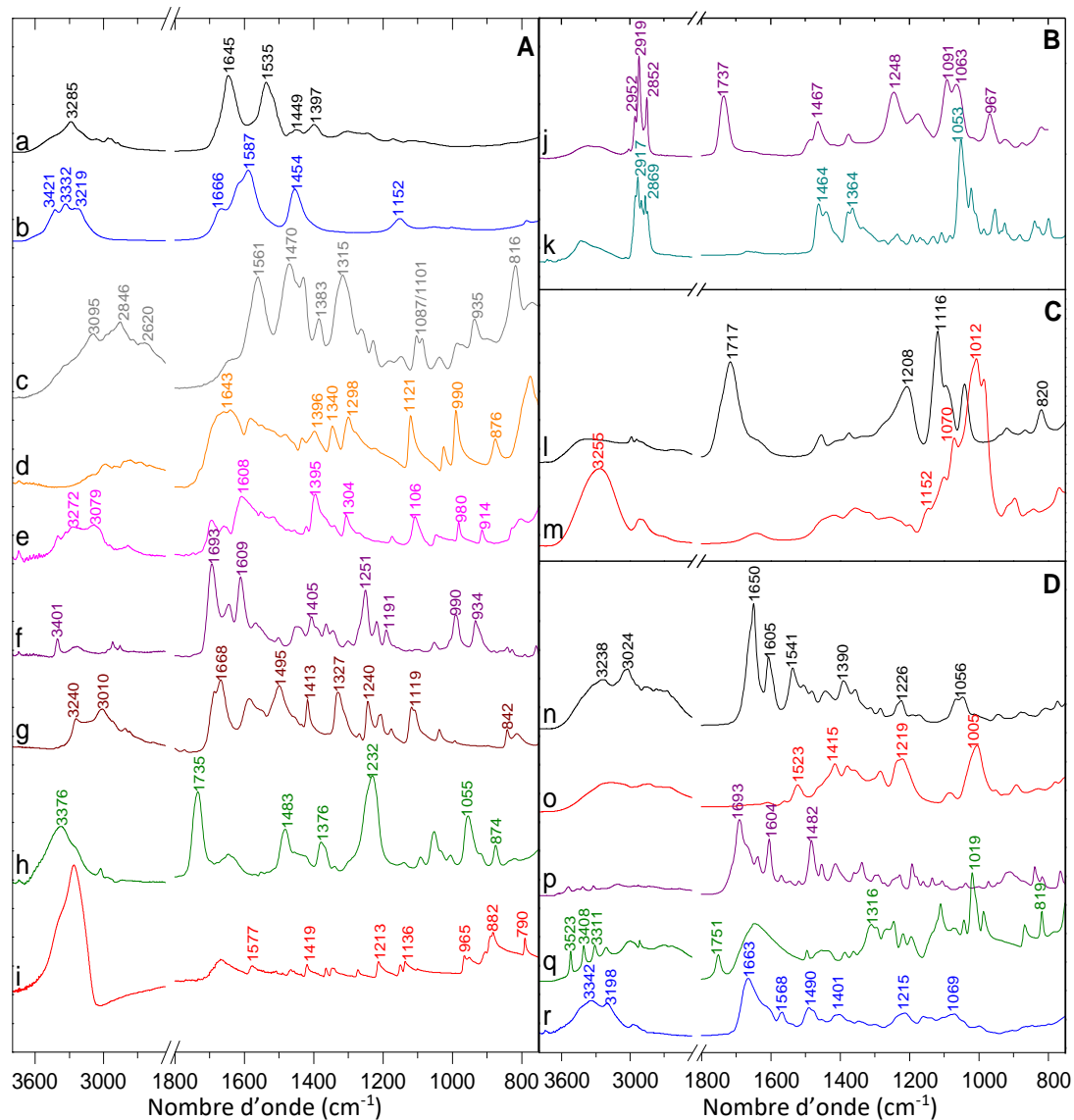


Figure 4.24 : Spectres IR de 3800 à 2450 et de 1800 à 750 cm^{-1} de l'HSA, urée, histamine, acide urique, créatine, bilirubine, créatinine, acétylcholine et hypoxanthine (a à i respectivement) pour les substances azotées (A) ; de l'asolectine et du cholestérol (j et k respectivement) pour les lipides (B) ; de l'acide lactique et du glucose (l et m respectivement) pour les glucides et métabolites non azotés (C) ; de la thiamine, pyridoxine, acide folique, acide ascorbique et cobalamine (n à r respectivement) pour les vitamines (D).

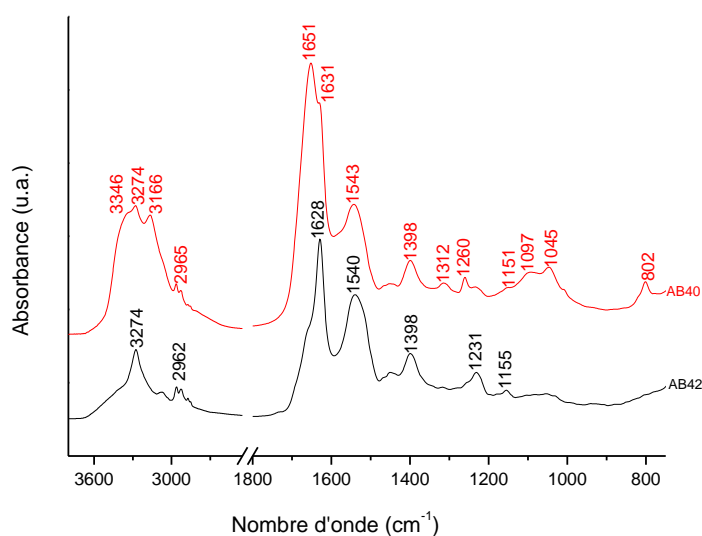


Figure 4.25 : Spectre IR de 3800 à 2450 et de 1800 à 750 cm^{-1} des peptides $\text{A}\beta_{40}$ (rouge) et $\text{A}\beta_{42}$ (noir).

A partir de ces données, quatre régions peuvent être identifiées au sein du spectre du LCR présenté en figure 4.23 (il est important de noter que toutes les bandes n'ont pas été annotées sur la figure, pour plus de détails se référer au tableau 4.5 qui résume l'ensemble des vibrations) :

- La région $3800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ dominée par les vibrations $\nu(\text{NH})$ retrouvées principalement au sein des protéines ou de l'urée (Barth, 2000 ; Rehman *et al.*, 2013).
- La région $3000\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$ due aux vibrations $\nu(\text{CH}_2/\text{CH}_3)$ provenant des chaînes aliphatiques des lipides et des chaînes latérales des acides aminés. La bande à 2965 cm^{-1} peut être attribuée aux vibrations d'élongation antisymétrique du groupement CH_3 et celle à 2872 cm^{-1} , aux vibrations symétriques. Les bandes à 2927 et 2851 cm^{-1} correspondent aux vibrations d'élongation antisymétrique et symétrique du groupement CH_2 respectivement (Rehman *et al.*, 2013).
- La région $1750\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ où sont retrouvées principalement les contributions des protéines et de l'urée. Dans le cas des protéines, la bande amide I correspondant majoritairement aux vibrations $\nu(\text{C}=\text{O})$ et les bandes amide II et amide III correspondant aux vibrations $\nu(\text{CN})$ et $\delta(\text{NH})$ y sont observées (Barth, 2000). Une bande correspondant aux vibrations $\nu(\text{COO}^-)$ est également retrouvée à 1398 cm^{-1} . Dans le cas de l'urée, les vibrations $\nu(\text{C}=\text{O})$ sont observées à 1678 et 1662 cm^{-1} , $\delta(\text{NH}_2)$ à 1627 cm^{-1} , $\delta(\text{NH})$ à 1586 cm^{-1} et $\nu(\text{CN})$ à 1451 cm^{-1} (Fischer et McDowell, 1960). A 1739 cm^{-1} , il peut être également visualisée une bande provenant des groupements ester des lipides (Rehman *et al.*, 2013).
- La région en dessous de 1300 cm^{-1} est dominée principalement par les vibrations des groupements C-O et C-C des glucides avec les bandes à 1156 , 1106 , 1079 , 1032 , 1012 , 988 , 924 , 899 et 805 cm^{-1} (Rehman *et al.*, 2013). Les vibrations $\gamma_r(\text{NH})$ et $\gamma_w(\text{CO})$ (Piasek et Urbanski, 1962) de l'urée viennent également s'ajouter à 1156 et 781 cm^{-1} respectivement. De plus, les vibrations des groupements phosphates provenant des lipides peuvent être retrouvées vers $1100\text{-}1060\text{ cm}^{-1}$.

4.3 Etude des liquides céphalorachidiens

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Composé chimique	Attribution
781	Urée	$\gamma_w(\text{CO})$
835	Glucides	-
899	Glucides	C-O-C skeletal mode, $\delta(\text{CH})$
924	Glucides	$\nu(\text{CC})$
988	Glucides	$\nu(\text{CO}), \nu(\text{CC})$
1012	Glucides	$\nu(\text{CO}), \nu(\text{CC}), \delta(\text{OCH})$
1032	Glucides	Couplage entre $\nu(\text{CO})$ et $\delta(\text{CO}), \nu(\text{CH}_2\text{OH})$
1055	Glucides, lipides	Couplage entre $\nu(\text{CO})$ et $\delta(\text{CO}), \nu(\text{CH}_2\text{OH}), \nu(\text{PO}_2^-)$
1079	Glucides, lipides	$\nu(\text{C-O}), \nu(\text{PO}_2^-)$
1106	Glucides	$\nu(\text{CO}), \nu(\text{CC})$
1122	Glucides	$\nu(\text{CO})$
1156	Glucides, urée	$\nu(\text{CO}), \nu(\text{CC}), \gamma_r(\text{NH})$
1230	Protéines (Amide III)	$\nu(\text{CN}), \delta(\text{NH}), \nu_{as}(\text{PO}_2^-)$
1260	Protéines (Amide III)	$\nu(\text{CN}), \delta(\text{NH}), \nu_{as}(\text{PO}_2^-)$
1310	Protéines (Amide III)	$\nu(\text{CN}), \delta(\text{NH})$
1345	Lipides	$\gamma_w(\text{CH}_2/\text{CH}_3)$
1361	Lipides, protéines	$\nu(\text{CO}), \delta(\text{CH}), \delta(\text{NH})$
1398	Protéines	$\nu_s(\text{COO}^-)$
1451	Urée, lipides, protéines	$\nu(\text{CN}), \delta(\text{CH}_3)$
1467	Lipides	$\delta(\text{CH}_2)$
1516	Protéines	$\delta(\text{CH})$ des groupes phényles
1532	Protéines (Amide II)	$\nu(\text{CN}), \delta(\text{NH})$
1549	Protéines (Amide II)	$\nu(\text{CN}), \delta(\text{NH})$
1586	Urée	$\delta(\text{NH})$
1627	Protéines (Amide I), urée	$\nu(\text{C=O}), \delta(\text{NH}_2)$
1662	Protéines (Amide I), urée	$\nu(\text{C=O})$
1678	Protéines (Amide I), urée	$\nu(\text{C=O})$
1739	Lipides	$\nu(\text{C=O})$
2851	Protéines, lipides	$\nu_s(\text{CH}_2)$
2872	Protéines, lipides	$\nu_s(\text{CH}_3)$
2927	Protéines, lipides	$\nu_{as}(\text{CH}_2)$
2965	Protéines, lipides	$\nu_{as}(\text{CH}_3)$
3200	Urée	$\nu(\text{NH})$
3263	Protéines	$\nu(\text{NH})$
3282	Protéines	$\nu(\text{NH})$
3346	Urée	$\nu(\text{NH})$
3436	Urée, protéines	$\nu(\text{NH})$

Tableau 4.5 : Position et tentatives d'attribution des différentes bandes retrouvées au sein du spectre IR moyen du LCR représentant le groupe contrôle (Attributions faites à partir de Barth, 2000 ; Fischer et McDowell, 1960 ; Piasek et Urbanski, 1962 ; Rehman *et al.*, 2013). L'ensemble des contributions a été déterminé à partir de la dérivée seconde du spectre.

4.3.1.2 Comparaison des liquides céphalorachidiens

○ Spectres d'absorption

Les spectres IR moyens des différents échantillons LCR provenant des groupes contrôle, MA MCI et MA démente sont présentés en figure 4.26.

Afin de mieux visualiser les modifications spectrales engendrées par la maladie, le spectre moyen du LCR représentant le groupe contrôle a été soustrait de celui représentant le groupe MA MCI et MA démente. De même, celui représentant le groupe MA MCI a été soustrait de celui représentant le groupe MA démente. A chaque nombre d'onde, un test de Student ($\alpha=1\%$) a été réalisé afin de vérifier la significativité du changement. Les résultats sont présentés en figure 4.27.

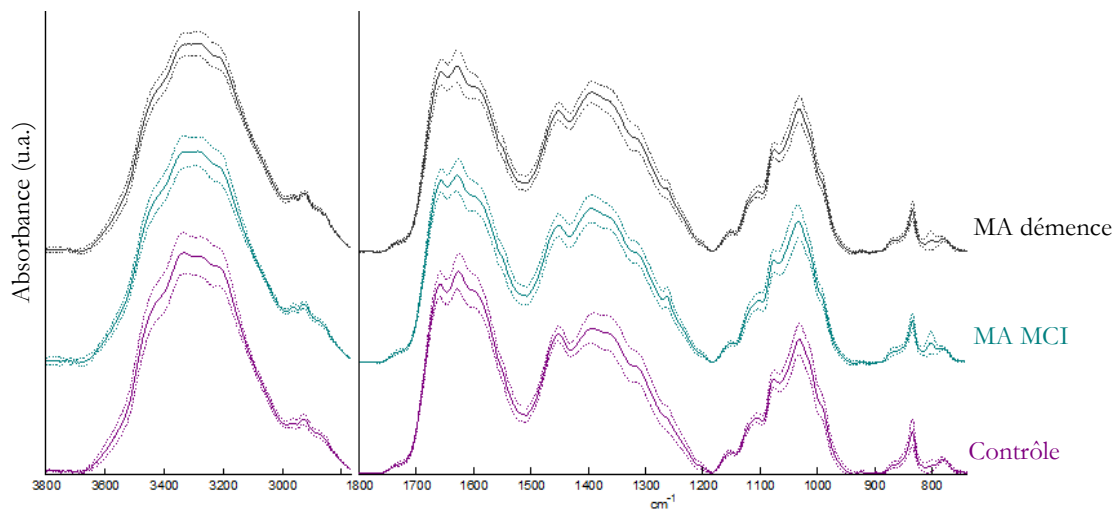


Figure 4.26 : Spectres IR moyens (lignes continues) +/- écart type (lignes pointillées) des LCR pour les groupes contrôle, MA MCI et MA démente.

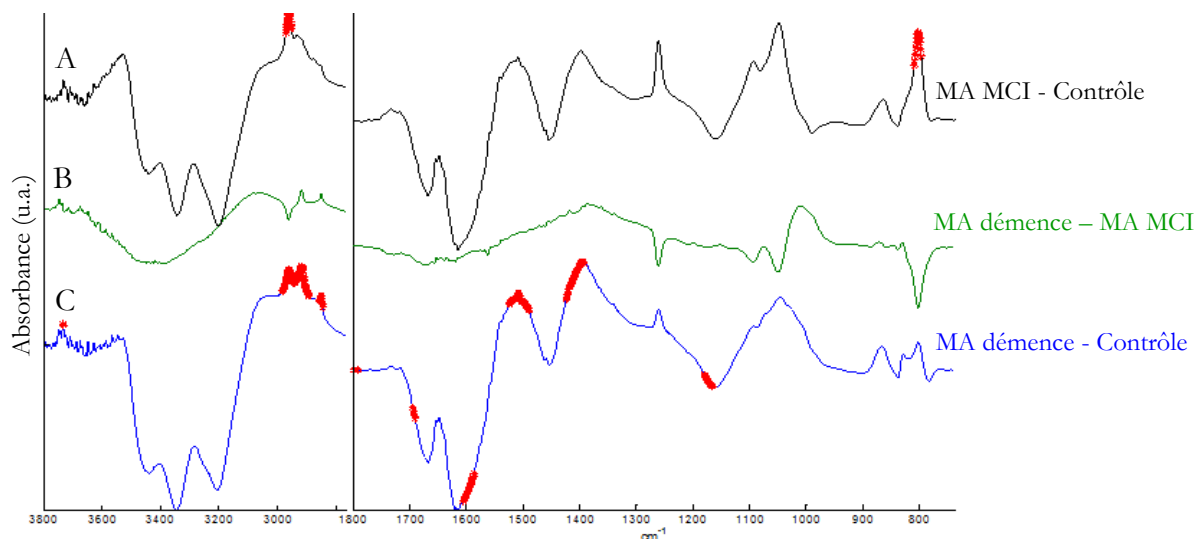


Figure 4.27 : Spectres différentiels calculés à partir des spectres IR moyens du LCR provenant des trois groupes : contrôle, MA MCI et MA démente. A) Le spectre représentant le groupe contrôle soustrait de celui représentant le groupe MA MCI ; B) Le spectre représentant le groupe MA MCI soustrait de celui représentant le groupe MA démente ; C) Le spectre représentant le groupe contrôle soustrait de celui représentant le groupe MA démente. Les nombres d'ondes significativement différents sont représentés par des points rouges selon le test de Student ($\alpha=1\%$).

Les bandes positives et négatives reflètent les groupements chimiques plus ou moins abondants au sein des LCR du groupe contrôle, MA MCI ou MA démence. Les points rouges représentent les nombres d'ondes significativement différents entre les deux groupes impliqués (selon le test de Student, $\alpha=1\%$). D'après les résultats, peu de variations significatives peuvent être observées entre les différents groupes.

L'un des avantages du test de Student est qu'il est réalisé sur l'ensemble de la gamme spectrale. Cependant, des faux points positifs peuvent apparaître (Figure 4.27 C par exemple). Ces points indiquent des zones non différentes, significativement différentes. Ils sont la conséquence du bruit présent au sein des spectres et se retrouvent par exemple dans les régions de très faible absorbance ou proche des points qui ont été définis à 0 lors de la correction de la ligne de base des spectres. A l'inverse, des zones qui présentent des différences peuvent apparaître comme non significatives en fonction de la correction de la ligne de base qui a été appliquée pour corriger les problèmes de pente. Calculer la dérivée d'un spectre permet de s'affranchir des problèmes de ligne de base qui peuvent être observés entre différents spectres. Cela permet également de mieux identifier les différentes contributions présentes au sein d'un spectre. Néanmoins, un des inconvénients peut être l'amplification du bruit et principalement dans le cas de la dérivée seconde.

Les dérivées secondes et premières de chaque spectre ont été calculées et sont présentées dans les parties suivantes.

○ **Dérivées secondes**

La figure 4.28 présente les spectres IR moyens des LCR représentant les groupes contrôle, MA MCI et MA démence, obtenus après calcul de la dérivée seconde. Afin de mieux visualiser les modifications spectrales entre les différents groupes, les spectres IR moyens du LCR représentant les différents groupes ont été soustraits comme précédemment les uns aux autres et à chaque nombre d'onde, un test de Student ($\alpha=1\%$) a été réalisé afin de vérifier la significativité du changement. Les résultats sont présentés en figure 4.29.

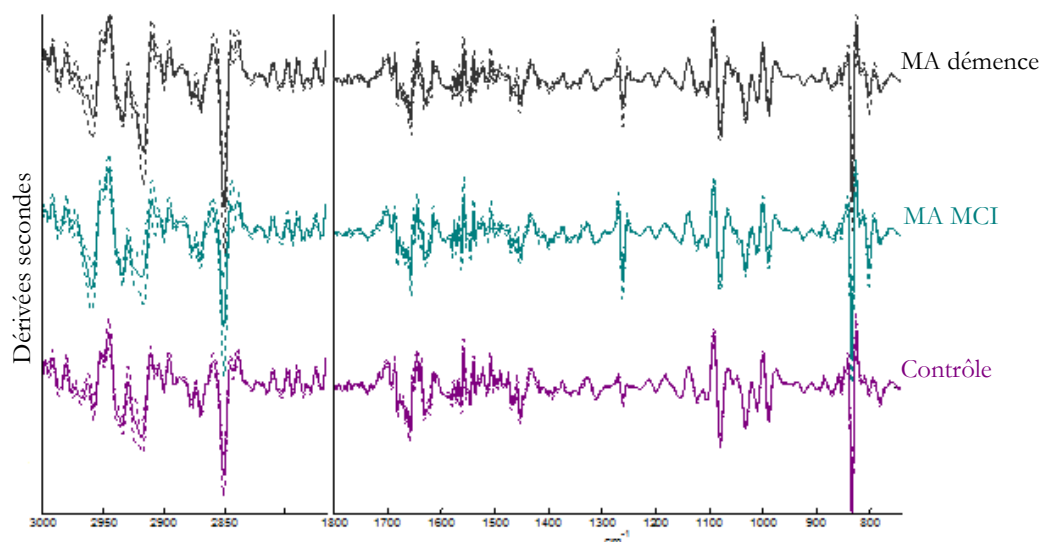


Figure 4.28 : Spectres IR moyens représentant la dérivée seconde (lignes continues) +/- écart type (lignes pointillées) des LCR pour les groupes contrôle, MA MCI et MA démence.

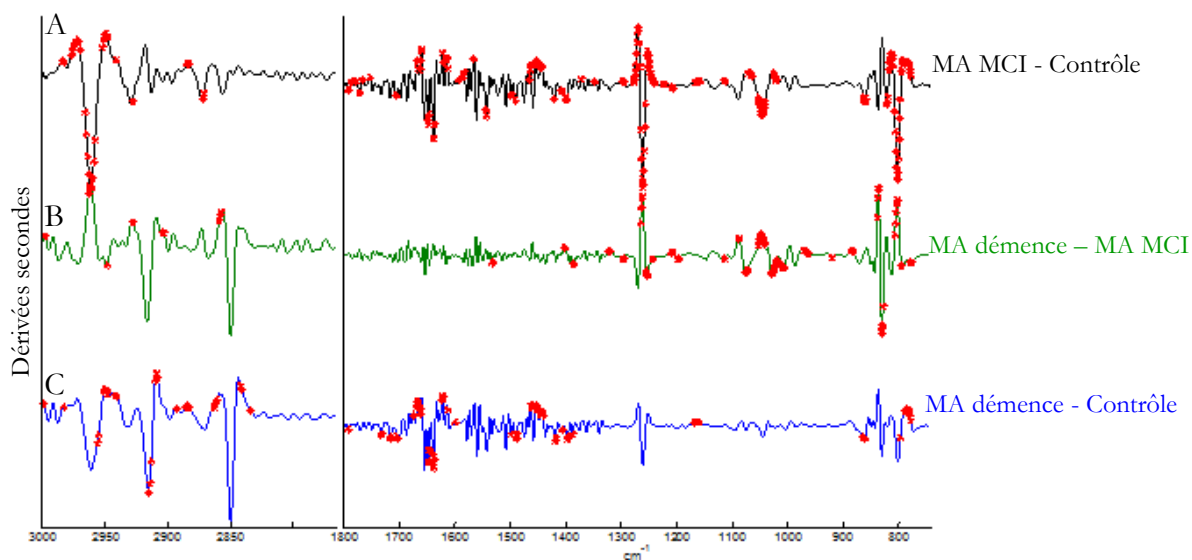


Figure 4.29 : Spectres différentiels calculés à partir des dérivées secondes des spectres IR moyens du LCR provenant des trois groupes : contrôle, MA MCI et MA démence. A) Le spectre représentant le groupe contrôle soustrait de celui représentant le groupe MA MCI ; B) Le spectre représentant le groupe MA MCI soustrait de celui représentant le groupe MA démence ; C) Le spectre représentant le groupe contrôle soustrait de celui représentant le groupe MA démence. Les nombres d'ondes significativement différents sont représentés par des points rouges selon le test de Student ($\alpha=1\%$).

Comme précédemment, de faux points positifs peuvent être observés en raison de l'amplification du bruit. Néanmoins, l'utilisation de la dérivée seconde permet de révéler des informations spectrales supplémentaires par rapport à l'utilisation des spectres d'absorption. En effet, des différences significatives peuvent être observées par exemple entre le groupe MA MCI et le groupe contrôle ou MA démence pour les bandes à 2961, 1260, 1047 et 802 cm^{-1} par exemple.

○ **Dérivées premières**

La figure 4.30 présente les spectres IR moyens des LCR représentant les groupes contrôle, MA MCI et MA démente, obtenus après calcul de la dérivée première et la figure 4.31 montre les spectres IR différentiels entre chaque groupe.

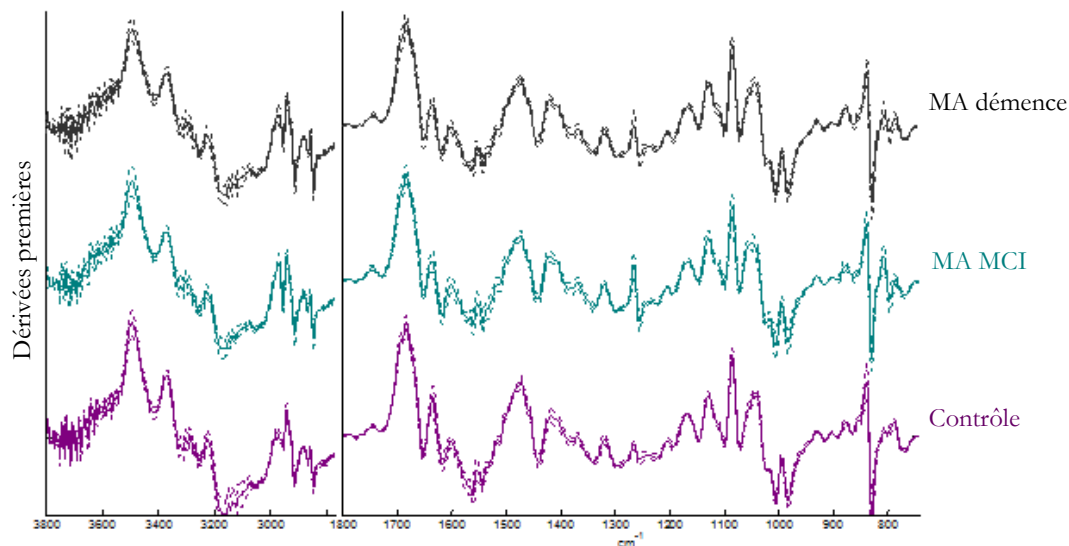


Figure 4.30 : Spectres IR moyens représentant la dérivée première (lignes continues) +/- écart type (lignes pointillées) des LCR pour les groupes contrôle, MA MCI et MA démente.

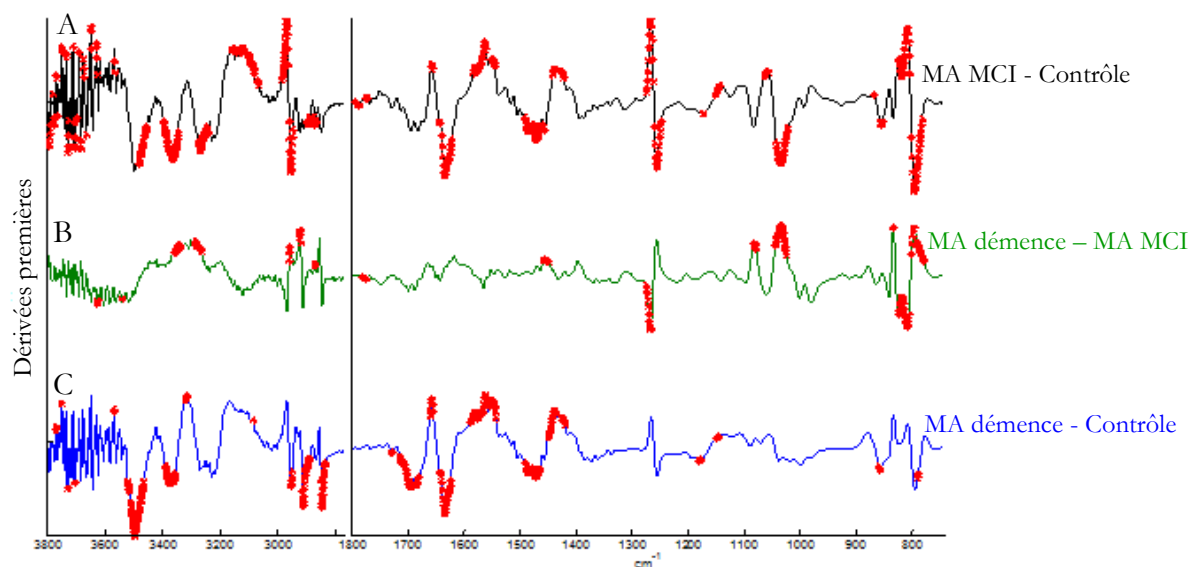


Figure 4.31 : Spectres différentiels calculés à partir des dérivées premières des spectres IR moyens du LCR provenant des trois groupes : contrôle, MA MCI et MA démente. A) Le spectre représentant le groupe contrôle soustrait de celui représentant le groupe MA MCI ; B) Le spectre représentant le groupe MA MCI soustrait de celui représentant le groupe MA démente ; C) Le spectre représentant le groupe contrôle soustrait de celui représentant le groupe MA démente. Les nombres d'ondes significativement différents sont représentés par des points rouges selon le test de Student ($\alpha=1\%$).

De faux points positifs peuvent être observés en raison de l'amplification du bruit. Néanmoins, l'utilisation de la dérivée première permet de révéler des informations spectrales supplémentaires par rapport à l'utilisation des spectres d'absorption puisque de nombreuses régions sont significativement différentes entre les différents groupes.

A partir de ces données, une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée sur les spectres d'absorption, les dérivées secondes et premières dans les régions où des différences significatives ont été observées. Pour rappel, l'ACP est une méthode d'analyse non supervisée qui permet d'étudier la similarité entre différents spectres et qui peut être utilisée malgré un faible nombre d'échantillons.

Les huit premières CP représentant 99% de la variance ont été sélectionnées (leur représentation graphique sont montrées en annexe 5). La figure 4.32 présente les projections 2D ou 3D de l'ensemble des spectres dans l'espace des CP qui permet une meilleure séparation des groupes (CP discriminantes déterminées à l'aide du test de Wilcoxon, $\alpha=1\%$).

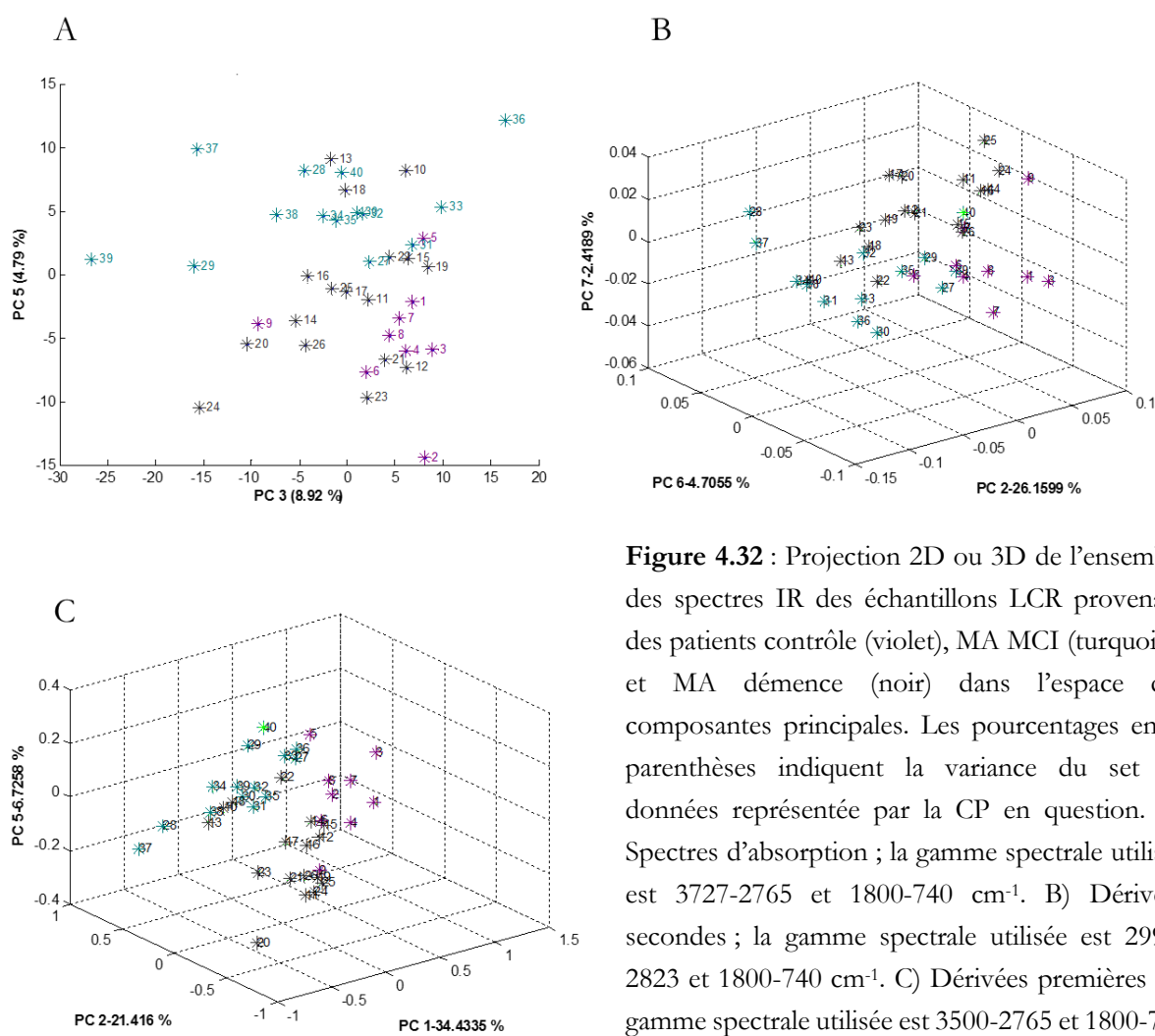


Figure 4.32 : Projection 2D ou 3D de l'ensemble des spectres IR des échantillons LCR provenant des patients contrôle (violet), MA MCI (turquoise) et MA démente (noir) dans l'espace des composantes principales. Les pourcentages entre parenthèses indiquent la variance du set de données représentée par la CP en question. A) Spectres d'absorption ; la gamme spectrale utilisée est 3727-2765 et 1800-740 cm^{-1} . B) Dérivées secondes ; la gamme spectrale utilisée est 2996-2823 et 1800-740 cm^{-1} . C) Dérivées premières ; la gamme spectrale utilisée est 3500-2765 et 1800-740 cm^{-1} .

Les représentations graphiques de l'ACP montrent que dans le cas des spectres d'absorption, les différents groupes ne sont pas très bien séparés. Par contre, lorsque les dérivées des spectres sont utilisées, une meilleure séparation apparaît et notamment pour les dérivées premières, malgré quelques recouvrements. D'après les représentations graphiques des CP (Annexe 5), les variations significatives observées avec les spectres différentiels sont retrouvées au niveau des CP utilisées pour discriminer les différents groupes.

Une analyse hiérarchique ascendante (HCA) a également été réalisée sur les différents spectres mais aucune séparation n'a été possible entre les différents groupes (données non montrées).

En résumé, l'ensemble de ces résultats met en évidence des différences entre les spectres des LCR provenant des patients atteints de la maladie d'Alzheimer au stade prodromal ou de démence et des patients contrôles. Le calcul préalable des dérivées est toutefois nécessaire.

Les modifications au sein d'un spectre, que ce soit par l'apparition, la disparition ou la variation de l'intensité des bandes, reflètent les changements moléculaires qui s'opèrent dans le LCR au cours de la maladie. Ces changements peuvent être liés à une composition différente ou à une variation de la concentration de certains composés. Par exemple, à l'aide des dérivées secondes, une augmentation de l'intensité des bandes à 2961, 1260, 1047 et 802 cm^{-1} a été observée pour le groupe MA MCI. Identifier l'origine précise de ces bandes peut s'avérer très compliqué voire impossible puisque de nombreuses molécules sont présentes dans le LCR. Néanmoins, au cours de l'analyse de quelques composés modèles, ces bandes ont été observées dans le spectre du peptide $A\beta_{40}$. Cela tend donc à suggérer une augmentation de la quantité de ce dernier au sein du LCR des patients MA MCI, ce qui serait en accord avec l'étude menée par Bousiges *et al.* (2016). Cependant, la possibilité que ces signaux proviennent d'autres peptides $A\beta$ ou d'autres composés n'est pas exclue. De précédentes études ont utilisé l'aire d'intégration d'une bande comme outil de discrimination entre deux états physiopathologiques (Ahmed *et al.*, 2010 ; Erukhimovitch *et al.*, 2006). Mais le but ici est de mesurer l'ensemble des changements métaboliques qui s'opèrent dans le LCR suite au développement de la maladie d'Alzheimer. Une ACP a donc été réalisée dans la gamme spectrale considérée comme l'empreinte moléculaire du LCR. Les résultats montrent que lorsque les dérivées des spectres sont calculées, une séparation partielle peut être faite entre les groupes contrôle, MA MCI et MA démence. Toutefois, l'ACP n'est qu'une méthode exploratoire. Elle ne permet pas à elle seule d'être une méthode valide pour établir un diagnostic. Pour cela, elle doit être couplée à une analyse supervisée qui définit des règles permettant de classer des spectres dans des classes. Parmi les plus utilisées dans la littérature, il y a l'analyse discriminante linéaire (LDA), la régression des moindres carrés partiels (PLS), la méthode SVM (de l'anglais Support Vector Machine) ou l'analyse en code barre (Gautam *et al.*, 2015 ; Gaydou *et al.*, 2015 ; Hands *et al.*, 2016 ; Nallala *et al.*, 2013 ; Rohleder *et al.*, 2005). Cependant, l'application de ces méthodes nécessitent un grand nombre d'échantillons puisqu'il doit être supérieur au nombre de variables. Il existe tout de même des alternatives comme pour la méthode SVM où une validation croisée « leave-one-out cross-validation » peut être utilisée (Hamel, 2009 ; Joachims, 2005).

Jusqu'à maintenant, très peu d'études ont été à notre connaissance réalisées sur le LCR que ce soit dans le cadre de la maladie d'Alzheimer ou d'autres maladies (Griebe *et al.*, 2007). En effet, la plupart des études IR réalisées sur des fluides biologiques se focalisent sur le plasma ou le sérum en raison de leur disponibilité dans des banques (Burns *et al.*, 2009 ; Carmona *et al.*, 2015 ; Peuchant *et al.*, 2008 ; Ryzhikova *et al.*, 2015 ; Sevinc *et al.*, 2015).

Conclusion :

Le potentiel de la spectroscopie IR dans le diagnostic précoce de la maladie d'Alzheimer à partir de l'étude du LCR a été évalué ici. Les résultats de cette étude pilote montrent des différences entre les spectres provenant des patients atteints de la maladie d'Alzheimer au stade prodromal ou démence et des patients contrôles. Cependant, le calcul préalable des dérivées est nécessaire pour faire ressortir au mieux les différences entre les différents groupes.

La prochaine étape est d'étudier un nombre plus important d'échantillons au sein de chaque groupe afin de confirmer les variations mises en évidence ici et ainsi de valider la méthode. D'autres méthodes chimométriques telles que des analyses supervisées qui pourraient peut-être mieux mettre en évidence les variations entre les différents groupes devront être également utilisées et la précision de la méthode dans le diagnostic devra être déterminée.

4.3.2 Etude par SERS

La figure 4.33 présente une série de spectres issus d'un échantillon LCR séché sur une fenêtre de CaF₂. Lors du séchage, l'échantillon cristallise donnant ainsi lieu à la présence de structures régulières et de zones amorphes. Selon la région analysée, différents spectres peuvent être obtenus. Il est donc impossible avec cette méthode, d'identifier les variations induites par la maladie au sein du LCR. Une étude en solution a donc été privilégiée. Cependant, sans l'ajout de nanoparticules, aucun signal ne peut être détecté (Figure 4.34 c).

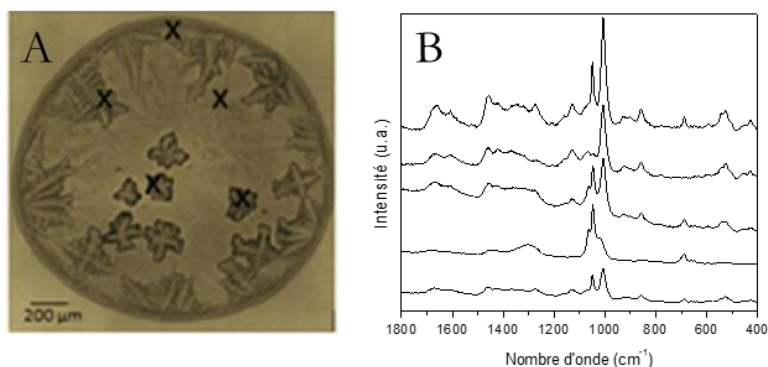


Figure 4.33 : Image microscopique d'une goutte d'échantillon LCR séchée (A). Les régions marquées d'une croix correspondent aux zones où les spectres Raman présentés en B ont été enregistrés.

Quatre types de nanoparticules ont été testés : des nanoparticules d'or et d'argent synthétisées à partir de citrates et des nanoparticules d'argent synthétisées à partir de NaBH_4 ou d'hydroxylamine. La figure 4.34 montre qu'avec une longueur d'onde excitatrice de 514 nm, un effet SERS a été obtenu uniquement avec les nanoparticules d'argent synthétisées à partir de citrates ou d'hydroxylamine. Toutefois, seules les dernières ont été utilisées par la suite puisque les deux types de nanoparticules présentent la même surface de charge. De plus, la méthode de synthèse est plus simple et plus rapide et conduit à des données hautement reproductibles.

Afin d'identifier l'ensemble des contributions présentes au sein du spectre SERS du LCR, les différents composés modèles étudiés précédemment par spectroscopie IR ont également été analysés ici. La figure 4.35 présente les spectres SERS de ces composés. Il est important de rappeler qu'en SERS, seules les molécules adsorbées sur les nanoparticules sont détectées.

Ainsi, les bandes à 1584, 1451, 1329, 1098 et 723 cm^{-1} (Figure 4.34 a) au sein du spectre SERS du LCR suggèrent la présence d'hypoxanthine au sein du LCR (Figure 4.35 a). Le large signal dans la région 1720-1600 cm^{-1} peut être attribué à plusieurs molécules telles que les protéines, la créatinine, le glucose ou l'acide lactique (Figure 4.35 e-g). Dans la région 3000-2850 cm^{-1} sont retrouvées les vibrations CH.

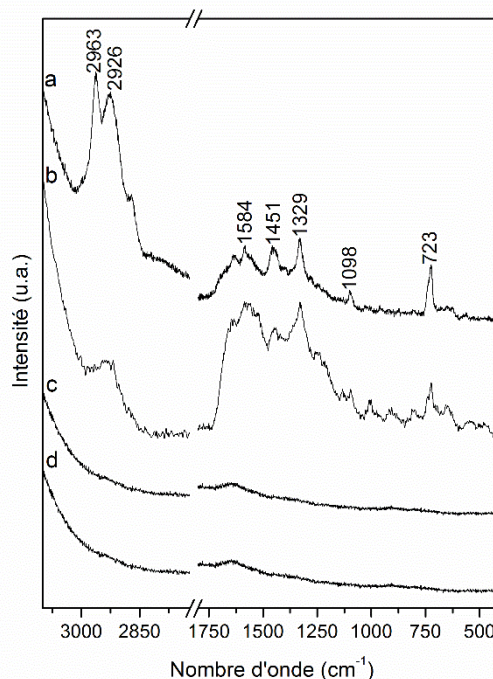


Figure 4.34: a et b) Spectres SERS du LCR en présence de nanoparticules d'argent synthétisées à partir d'hydroxylamine (a) ou de citrates (b), c) spectre Raman du LCR, d) spectre SERS des nanoparticules d'argent.

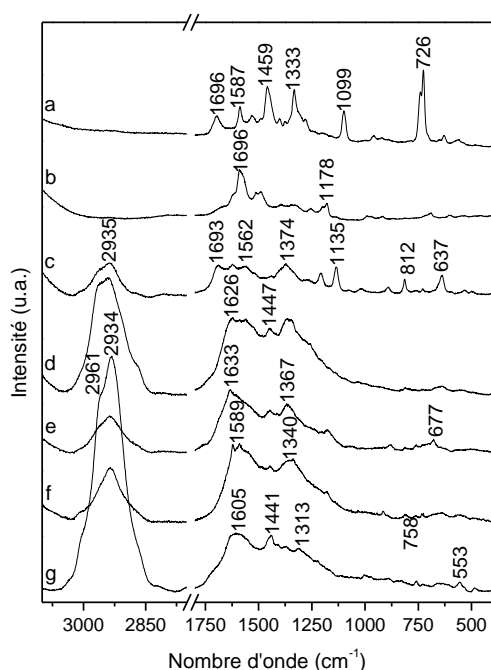


Figure 4.35: Spectres SERS de l'hypoxanthine (a), de l'acide folique (b), de l'acide urique (c), de la pyridoxine (d), de la créatinine (e), du glucose (f) et de l'acide lactique (g) en présence de nanoparticules d'argent synthétisées à partir d'hydroxylamine.

La figure 4.36 compare les spectres moyens des différents échantillons LCR provenant des groupes contrôle, MA MCI et MA démence. Pour chaque échantillon, cinq spectres ont été enregistrés à différents endroits de l'échantillon. Le faible écart-type entre les différents spectres témoignent de l'homogénéité de l'échantillon.

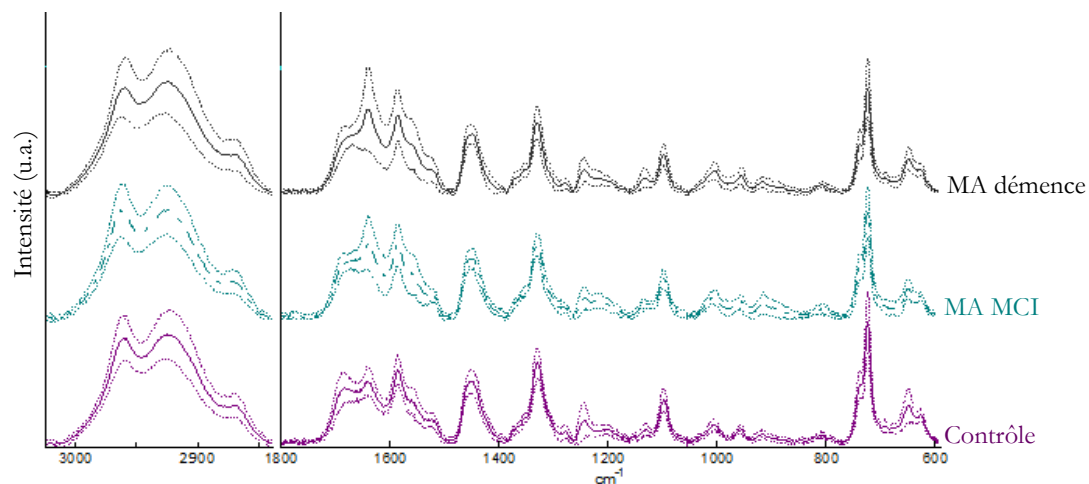


Figure 4.36 : Spectres SERS moyens (lignes continues) +/- écart type (lignes pointillées) des échantillons LCR pour les groupes contrôle, MA MCI et MA démence.

Afin de mieux visualiser les modifications spectrales engendrées par la maladie, le spectre moyen du LCR représentant le groupe contrôle a été soustrait de celui représentant le groupe MA MCI et MA démence. De même, celui représentant le groupe MA MCI a été soustrait de celui représentant le groupe MA démence. A chaque nombre d'onde, un test de Student ($\alpha=1\%$) a été réalisé afin de vérifier la significativité du changement. Les résultats sont présentés en figure 4.37.

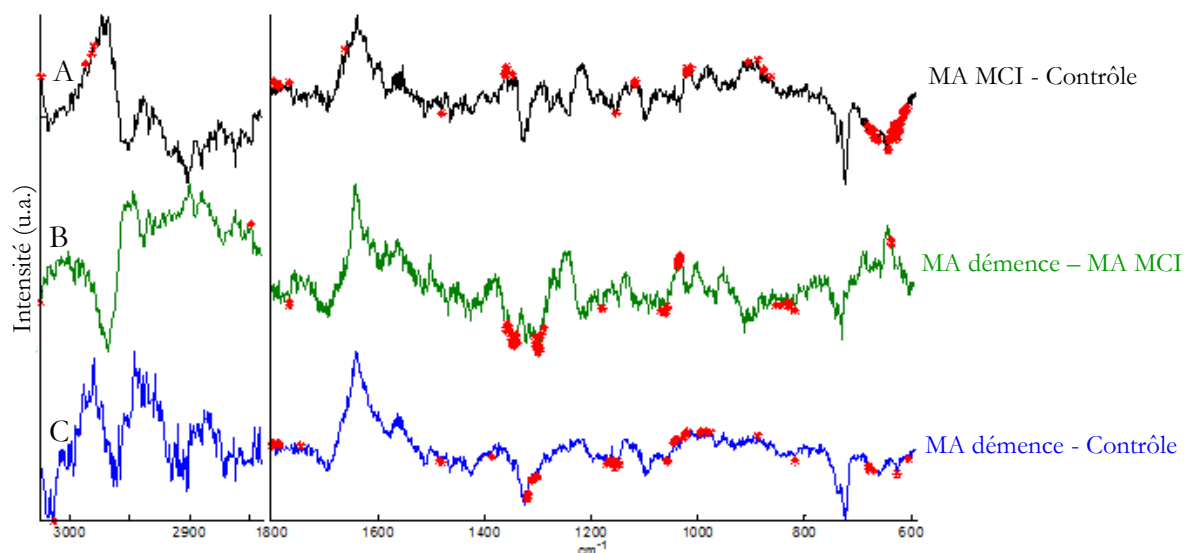


Figure 4.37 : Spectres différentiels calculés à partir des spectres SERS moyens du LCR provenant des trois groupes : contrôle, MA MCI et MA démence. A) Le spectre représentant le groupe contrôle soustrait de celui représentant le groupe MA MCI ; B) Le spectre représentant le groupe MA MCI soustrait de celui représentant le groupe MA démence ; C) Le spectre représentant le groupe contrôle soustrait de celui représentant le groupe MA démence. Les nombres d'ondes significativement différents sont représentés par des points rouges selon le test de Student ($\alpha=1\%$).

De nombreux faux points positifs peuvent être observés à cause du bruit des spectres, mais très peu de variations significatives visibles entre les différents groupes.

Afin d'aller plus loin dans la comparaison des spectres, une ACP a été réalisée. Les huit premières CP représentant 99% de la variance ont été sélectionnées (leur représentation graphique sont présentées en annexe 5). La figure 4.38A montre la distribution de tous les spectres obtenus à l'aide des deux premières composantes principales ; CP1 et CP2 qui représentent la plus grande variance : 68,6 et 19,0% respectivement. La figure 4.38B montre la distribution des spectres selon les composantes les plus discriminantes ; CP5 et CP7. Ces dernières ont été déterminées à l'aide du test de Wilcoxon ($\alpha=1\%$) réalisé sur tous les scores des CP comparant les groupes contrôle, MA MCI et MA démente.

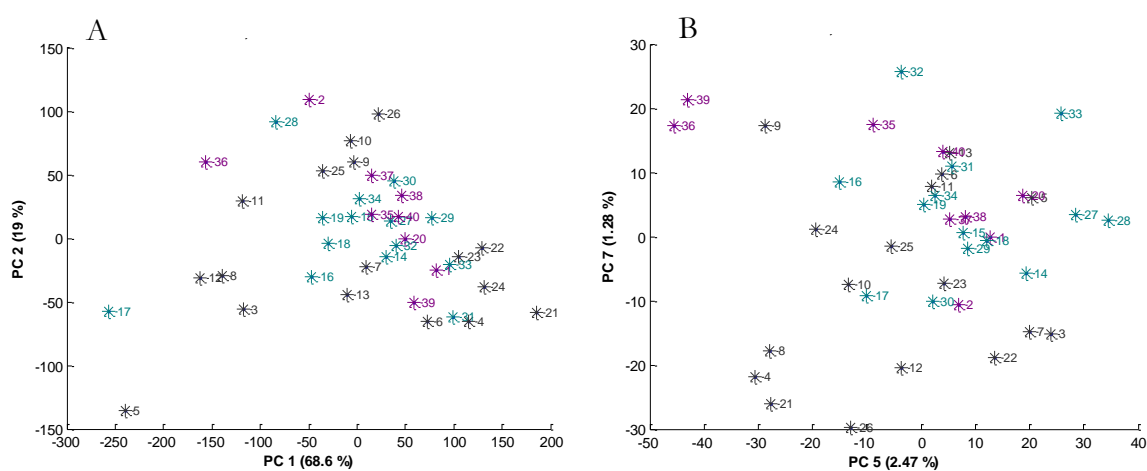


Figure 4.38 : Projection 2D de l'ensemble des spectres SERS des LCR provenant des patients contrôle (violet), MA MCI (turquoise) et MA démente (noir) dans l'espace des composantes principales. La gamme spectrale utilisée est 3013-2834 et 1800-590 cm^{-1} . Les pourcentages entre parenthèses indiquent la variance du set de données représentée par la CP en question. A) Projection 2D selon les CP 1 et 2 ; CP représentant la plus grande variance. B) Projection 2D selon les CP 6 et CP 7 ; CP les plus discriminantes selon le test de Wilcoxon ($\alpha=1\%$).

Aucune séparation entre les spectres n'est possible malgré l'utilisation des CP les plus discriminantes. Cela suggère une grande similitude entre les spectres des échantillons LCR provenant des différents groupes.

A notre connaissance, aucune étude SERS n'a été pour le moment reportée sur le LCR pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer et très peu pour d'autres maladies (Gracie *et al.*, 2014 ; Kaminska *et al.*, 2016). Par contre, plusieurs études ont montré le potentiel de la spectroscopie Raman exaltée de surface dans le diagnostic du cancer colorectal (Ito *et al.*, 2014 ; Lin *et al.*, 2011) du nasopharynx (Feng *et al.*, 2010), du foie (Li *et al.*, 2015) ou de l'estomac par exemple (Feng *et al.*, 2011 ; Ito *et al.*, 2014) via l'étude du plasma ou du sérum. Afin de mettre en évidence des variations

spectrales, la plupart de ces études ont soit appliqué des analyses multivariées PCA-LDA, ou soit une analyse SVM.

L'absence de variations ici entre les spectres des LCR provenant des groupes contrôle, MA MCI et MA démence suggèrent donc la nécessité d'utiliser des méthodes chimiométriques plus sophistiquées telles que des analyses supervisées afin de mettre en évidence de faibles variations entre les spectres ou, que les molécules détectées ne sont pas des marqueurs de la maladie.

Conclusion :

L'identification de marqueurs vibrationnels de la maladie n'a pas été possible dans les conditions expérimentales testées ici, malgré l'utilisation d'analyses multivariées telles que l'ACP. L'application d'autres méthodes chimiométriques plus sophistiquées est donc nécessaire.

Une des autres possibilités à envisager est l'utilisation d'un autre laser. En effet, comme il l'a été montré, selon la longueur d'onde excitatrice utilisée, plusieurs types de nanoparticules présentant des surfaces de charge différentes peuvent être utilisés. Cela a pour conséquence l'adsorption et donc la détection d'autres molécules qui pourraient conduire à une meilleure séparation des groupes.

Chapitre 5

Etude de la maladie à corps de
Lewy

La maladie à corps de Lewy (MCL) représente la seconde cause de démence et partage des symptômes communs avec la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer, et ce notamment dans les premiers stades. Trouver de nouveaux outils qui permettent d'établir un diagnostic précoce différentiel est donc nécessaire.

Le but de ce chapitre est d'évaluer pour la première fois le potentiel de la spectroscopie IR et SERS dans le diagnostic de la maladie à corps de Lewy et dans le diagnostic différentiel avec la maladie d'Alzheimer. Pour ce faire, une étude pilote a été réalisée sur 44 échantillons de liquides céphalorachidiens provenant de patients contrôles (n=9) et de patients atteints de la maladie à corps de Lewy au stade prodromal (MCI) (n=23) ou démence (n=12) afin d'identifier des marqueurs vibrationnels de la maladie qui pourraient discriminer les différents stades mais également qui pourraient différencier les patients atteints de cette maladie de ceux atteints de la maladie d'Alzheimer.

5.1 Etude des liquides céphalorachidiens par spectroscopie infrarouge

5.1.1 Application au diagnostic précoce de la maladie à corps de Lewy

La même démarche que celle pour l'étude de la maladie d'Alzheimer a été utilisée ici. En d'autres termes, les spectres d'absorption, les dérivées secondes et premières ont été analysés. Dans chaque cas, afin de mieux visualiser les modifications spectrales engendrées par la maladie, le spectre moyen du LCR représentant le groupe contrôle a été soustrait de celui représentant le groupe MCL MCI et MCL démence. De même, celui représentant le groupe MCL MCI a été soustrait de celui représentant le groupe MCL démence. A chaque nombre d'onde, un test de Student ($\alpha=1\%$) a été réalisé afin de vérifier la significativité du changement.

○ Spectres d'absorption

Les spectres IR moyens des différents échantillons LCR provenant des groupes contrôle, MCL MCI et MCL démence sont présentés en figure 5.1. Les spectres différentiels entre chaque groupe sont présentés en figure 5.2. Pour plus de détails sur les différentes contributions au sein des spectres, se référer au chapitre 4, paragraphe 4.3.

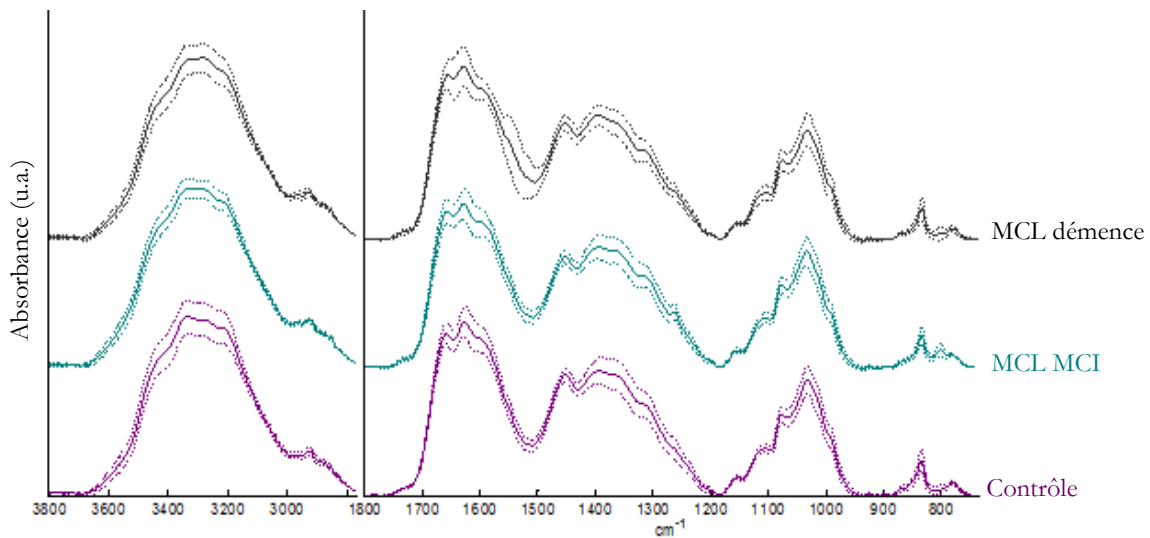


Figure 5.1 : Spectres IR moyens (lignes continues) +/- écart type (lignes pointillées) des LCR pour les groupes contrôle, MCL MCI et MCL démence.

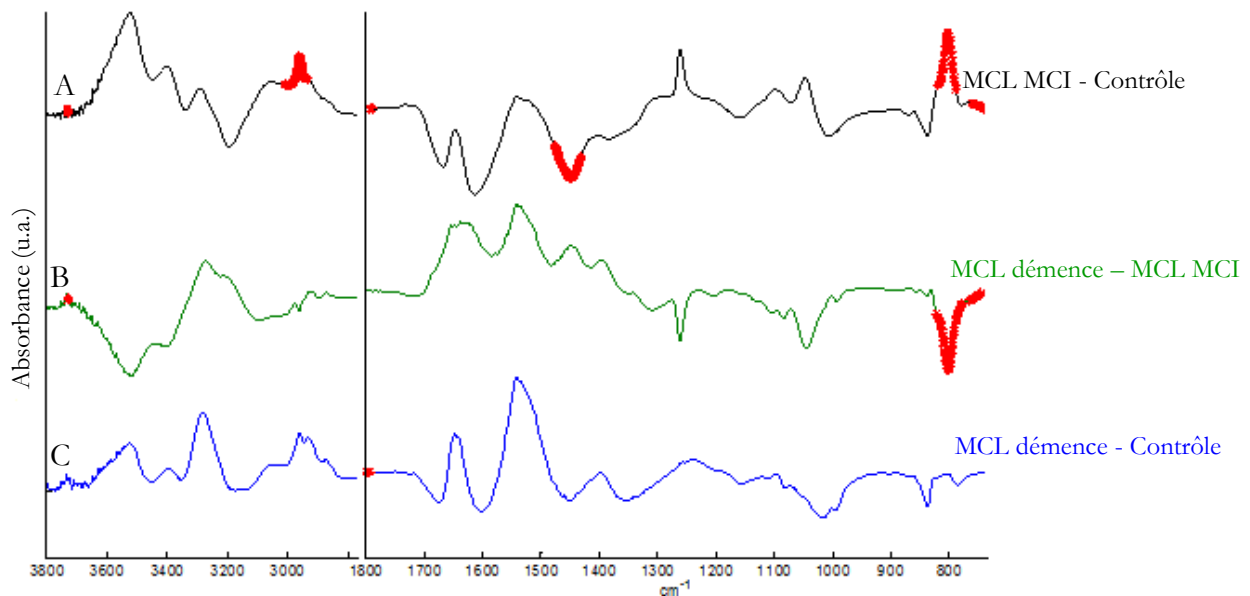


Figure 5.2 : Spectres différentiels calculés à partir des spectres IR moyens du LCR provenant des trois groupes : contrôle, MCL MCI et MCL démence. A) Le spectre représentant le groupe contrôle soustrait de celui représentant le groupe MCL MCI ; B) Le spectre représentant le groupe MCL MCI soustrait de celui représentant le groupe MCL démence ; C) Le spectre représentant le groupe contrôle soustrait de celui représentant le groupe MCL démence. Les nombres d'ondes significativement différents sont représentés par des points rouges selon le test de Student ($\alpha=1\%$).

5.1 Etude des liquides céphalorachidiens par spectroscopie infrarouge

Les bandes positives et négatives reflètent les groupements chimiques plus ou moins abondants au sein des LCR du groupe contrôle, MCL MCI ou MCL démence. Les points rouges représentent les nombres d'ondes significativement différents entre les deux groupes impliqués (selon le test de Student, $\alpha=1\%$). Peu de variations significatives peuvent être observées entre les différents groupes, à l'exception de la bande à 802 cm^{-1} qui est plus intense pour le groupe MCL MCI comparé aux deux autres et de celles à 2961 et 1451 cm^{-1} lorsque le groupe MCL MCI est comparé au groupe contrôle.

○ Dérivées secondes

La figure 5.3 présente les spectres IR moyens des LCR représentant les groupes contrôle, MCL MCI et MCL démence, obtenus après calcul de la dérivée seconde. Les spectres différentiels entre chaque groupe sont présentés en figure 5.4.

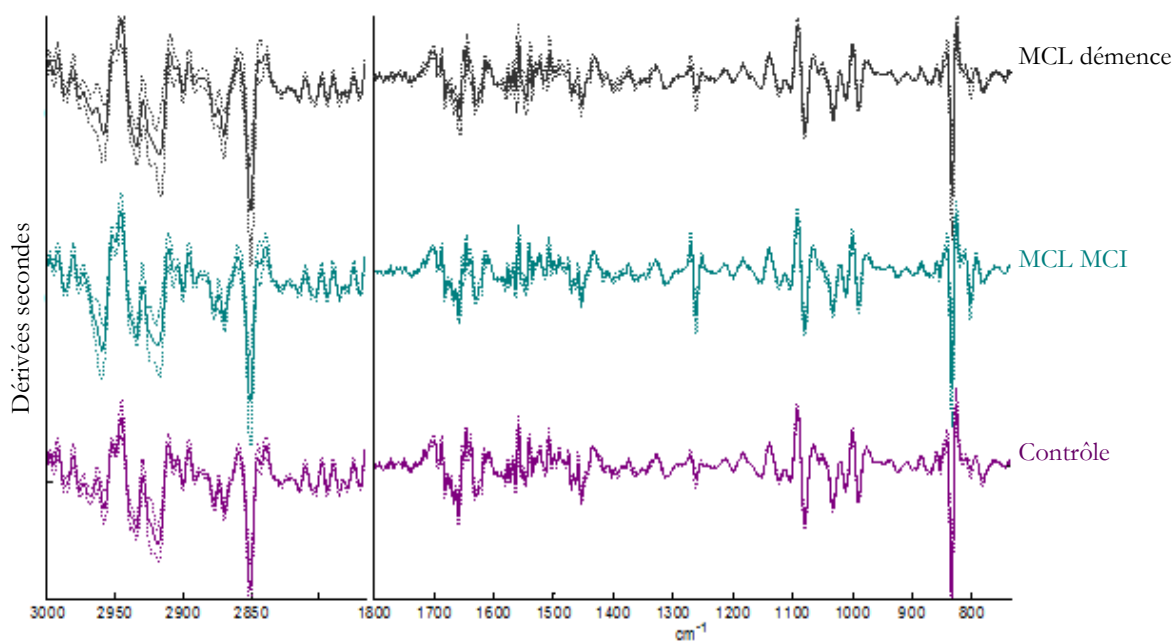


Figure 5.3 : Spectres IR moyens représentant la dérivée seconde (lignes continues) +/- écart type (lignes pointillées) des LCR pour les groupes contrôle, MCL MCI et MCL démence.

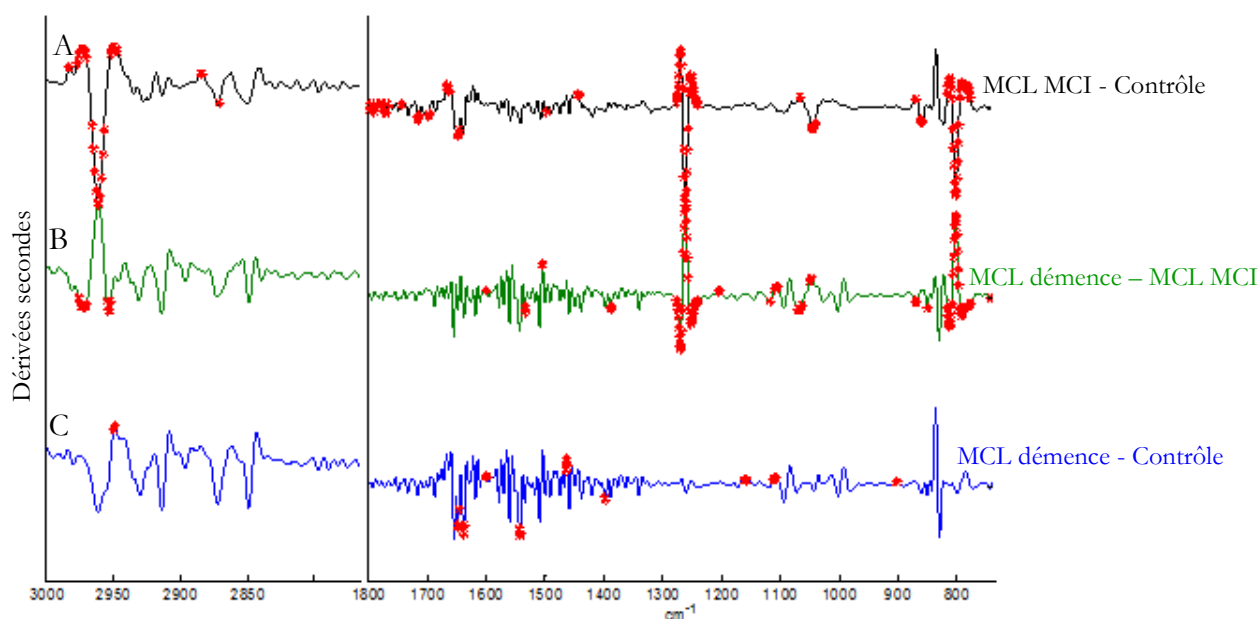


Figure 5.4 : Spectres différentiels calculés à partir des dérivées secondes des spectres IR moyens du LCR provenant des trois groupes : contrôle, MCL MCI et MCL démence. A) Le spectre représentant le groupe contrôle soustrait de celui représentant le groupe MCL MCI ; B) Le spectre représentant le groupe MCL MCI soustrait de celui représentant le groupe MCL démence ; C) Le spectre représentant le groupe contrôle soustrait de celui représentant le groupe MCL démence. Les nombres d'ondes significativement différents sont représentés par des points rouges selon le test de Student ($\alpha=1\%$).

Malgré l'observation d'un nombre un peu plus important de faux points positifs, l'utilisation de la dérivée seconde permet de révéler des informations spectrales supplémentaires par rapport à l'utilisation des spectres d'absorption. En effet, l'augmentation de l'intensité des bandes à 2961 et 802 cm^{-1} pour le groupe MCL MCI par rapport au groupe contrôle est retrouvée ici. Cependant, une augmentation de celle à 1260 cm^{-1} peut être également observée. De plus, ces trois bandes apparaissent significativement différentes entre le groupe MCL MCI et MCL démence.

○ Dérivées premières

La figure 5.5 présente les spectres IR moyens des LCR représentant les groupes contrôle, MCL MCI et MCL démence, obtenus après calcul de la dérivée première et les spectres différentiels entre chaque groupe sont présentés en figure 5.6.

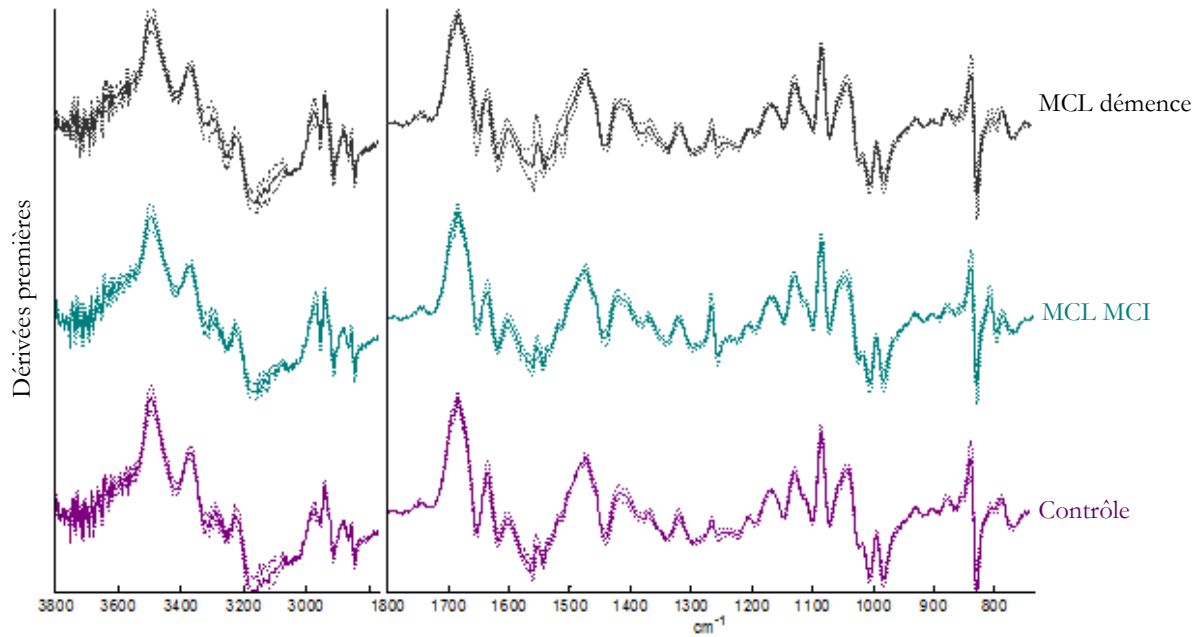


Figure 5.5 : Spectres IR moyens représentant la dérivée première (lignes continues) +/- écart type (lignes pointillées) des LCR pour les groupes contrôle, MCL MCI et MCL démente.

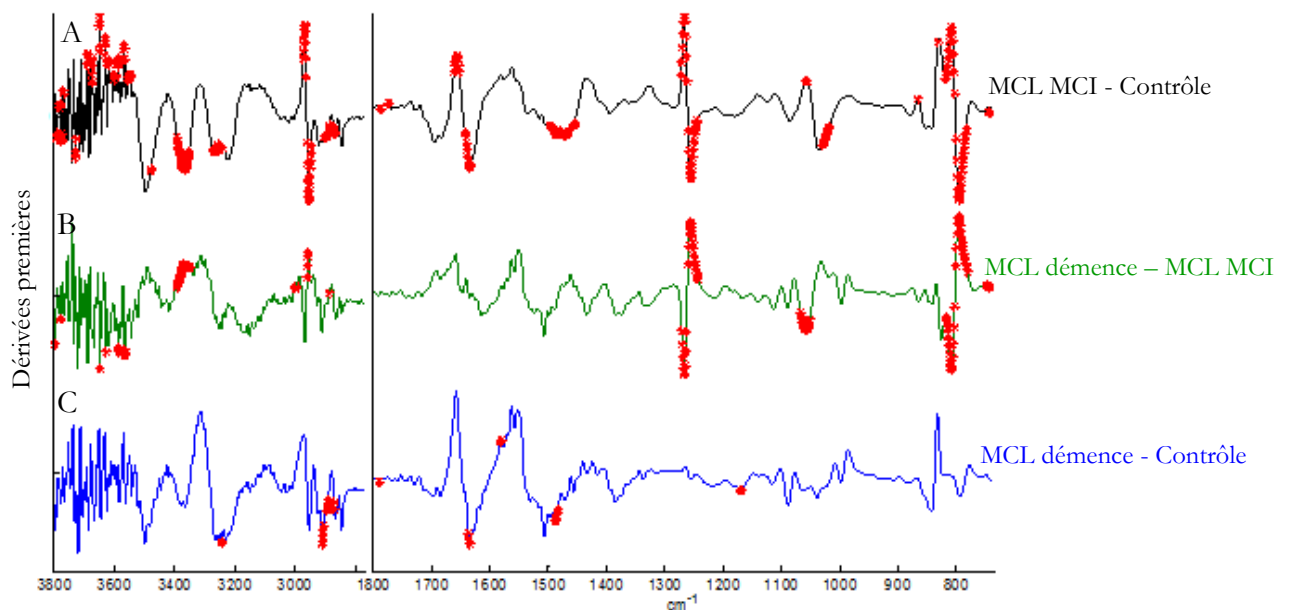
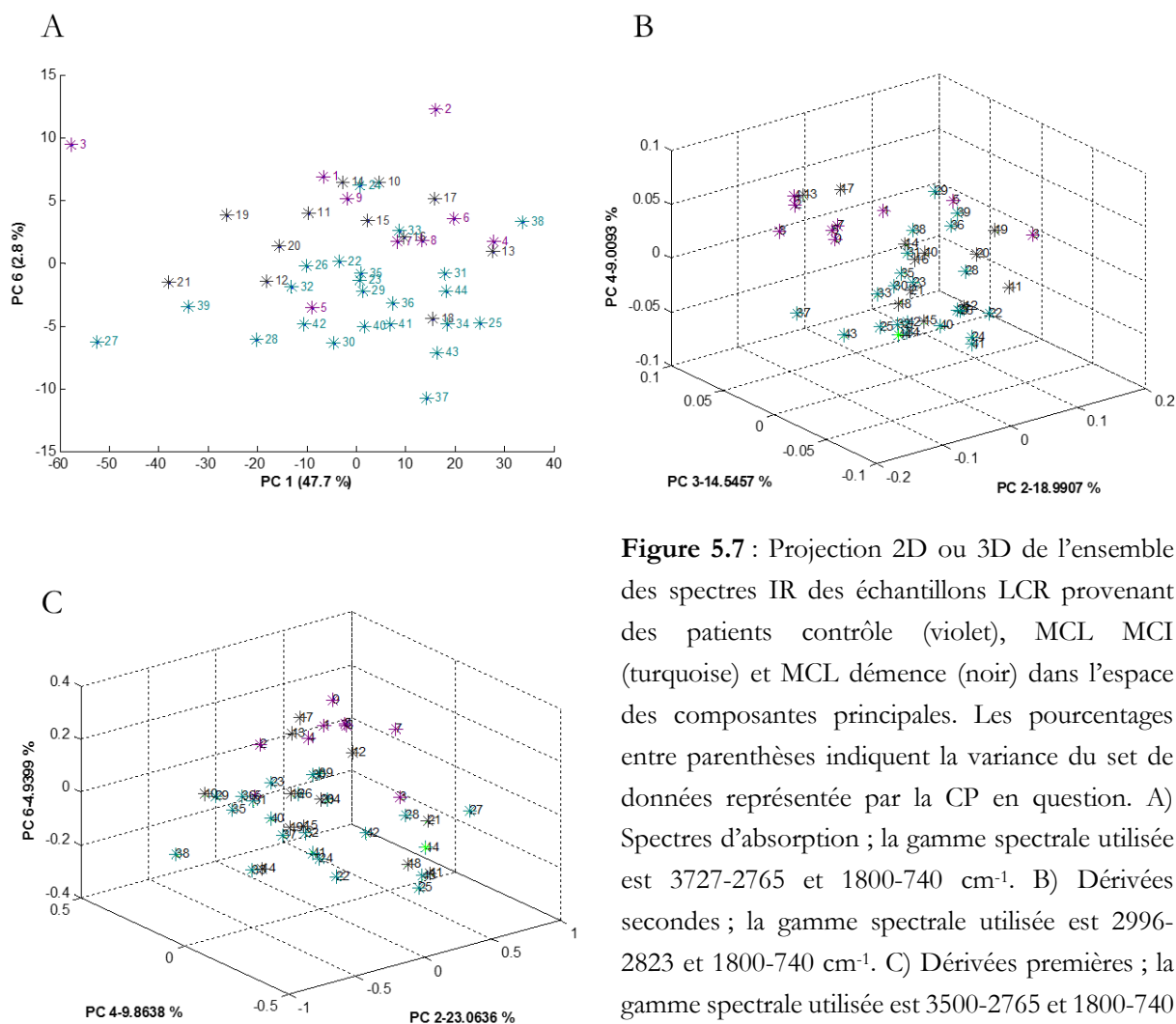


Figure 5.6 : Spectres différentiels calculés à partir des dérivées premières des spectres IR moyens du LCR provenant des trois groupes : contrôle, MCL MCI et MCL démente. A) Le spectre représentant le groupe contrôle soustrait de celui représentant le groupe MCL MCI ; B) Le spectre représentant le groupe MCL MCI soustrait de celui représentant le groupe MCL démente ; C) Le spectre représentant le groupe contrôle soustrait de celui représentant le groupe MCL démente. Les nombres d'ondes significativement différents sont représentés par des points rouges selon le test de Student ($\alpha=1\%$).

De faux points positifs peuvent être observés en raison de l'amplification du bruit. Néanmoins, l'utilisation de la dérivée première permet de révéler comme la dérivée seconde des informations spectrales supplémentaires par rapport à l'utilisation des spectres d'absorption.

Afin d'étudier la similarité des spectres des échantillons LCR provenant des patients contrôle, MCL MCI et MCL démence et compte tenu de la faible quantité d'échantillons (n=44), une analyse en composantes principales a été réalisée sur les spectres d'absorption, les dérivées secondes et premières. Les huit premières composantes principales (CP) représentant 99% de la variance ont été sélectionnées (leur représentation graphique sont présentées en annexe 6). La figure 5.7 présente les projections 2D ou 3D de l'ensemble des spectres dans l'espace des CP qui permet une meilleure séparation des groupes (CP discriminantes déterminées à l'aide du test de Wilcoxon, $\alpha=5\%$).



5.1 Etude des liquides céphalorachidiens par spectroscopie infrarouge

Les représentations graphiques de l'ACP montrent que dans le cas des spectres d'absorption, aucune séparation n'est possible entre les différents groupes. Par contre, lorsque les dérivées des spectres sont utilisées, une séparation partielle peut être observée entre les groupes MCL MCI et contrôle mais pas entre les groupes MCL MCI et MCL démence.

Ces résultats suggèrent que les différences observées précédemment entre le groupe MCL MCI et MCL démence au niveau des bandes 2961, 1260 et 802 cm^{-1} ne sont pas suffisantes pour différencier les deux groupes lorsque l'ensemble de la région dite « empreinte moléculaire » est utilisée. Par contre, si l'ACP est réalisée sur les dérivées secondes et premières dans une gamme spectrale plus petite (entre 2980-2945 et 1300-745 cm^{-1} , où sont retrouvées principalement ces vibrations), le groupe MCL MCI peut être séparé partiellement des deux autres groupes (Figure 5.8).

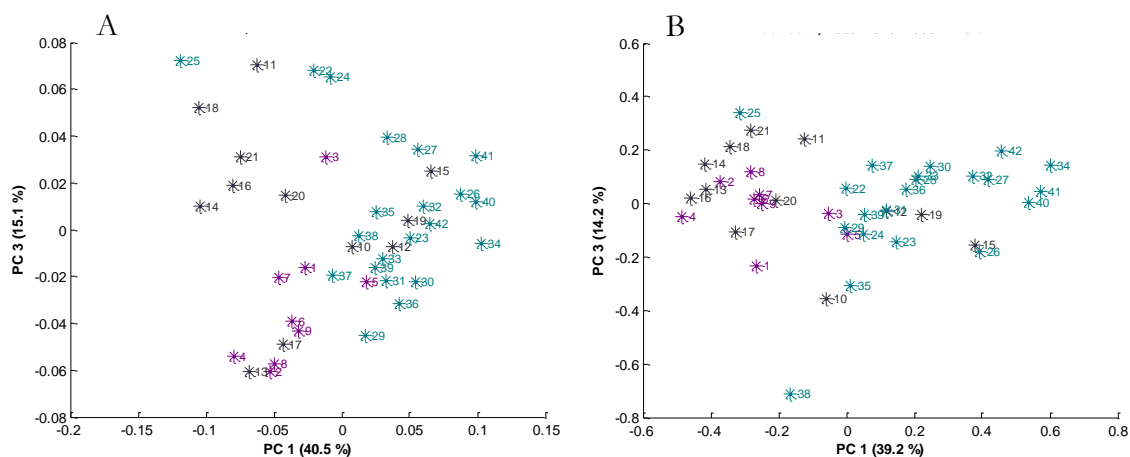


Figure 5.8 : Projection 2D de l'ensemble des spectres IR des échantillons LCR provenant des patients contrôle (violet), MCL MCI (turquoise) et MCL démence (noir) dans l'espace des composantes principales. La gamme spectrale utilisée est 2980-2945 et 1300-745 cm^{-1} . Les pourcentages entre parenthèses indiquent la variance du set de données représentée par la CP en question. A) Dérivées secondes. B) Dérivées premières.

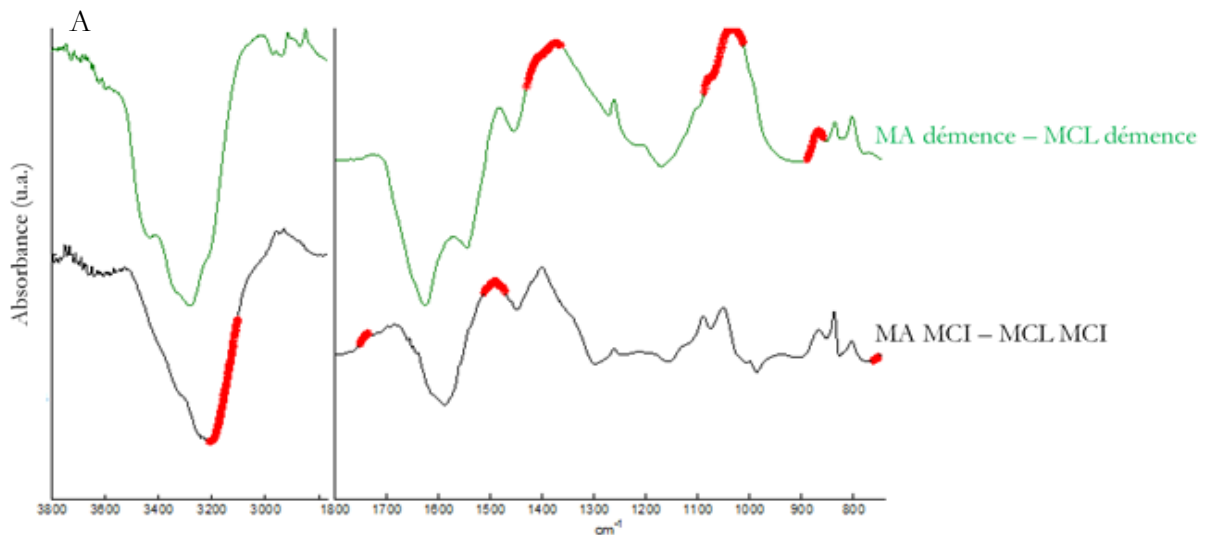
Une augmentation de l'intensité de ces trois bandes a pu être également observée pour le groupe MA MCI dans le chapitre précédent. Il a été discuté que ces bandes pourraient être attribuées aux peptides $A\beta_{40}$. Cela suggère donc une augmentation de la quantité de ce dernier au sein du LCR des patients MCL MCI. Cependant, ces résultats contredisent l'étude menée par Bousiges *et al.*, qui ont dosé les peptides $A\beta_{40}$ par la méthode ELISA (2016). Différentes explications peuvent être avancées : la première est celle précédemment évoquée pour les études menées sur les LCR dans le cadre de la maladie d'Alzheimer suggérant la possibilité que ces signaux proviennent d'autres peptides $A\beta$ ou d'autres composés non identifiés. La deuxième est la différence de sensibilité entre les deux méthodes. En effet, la méthode ELISA n'est pas très sensible aux peptides organisés sous

forme de feuillets β contrairement à la spectroscopie IR qui permet de détecter l'ensemble des conformations.

En résumé, ces résultats mettent en évidence des différences entre les spectres des LCR provenant des patients atteints de la maladie à corps de Lewy au stade prodromal ou de démence et des patients contrôles. Cependant, en fonction de la gamme spectrale utilisée pour l'ACP, la séparation des groupes n'est pas la même. L'application d'autres méthodes chimiométriques de type analyses supervisées est donc nécessaire. Une autre méthode d'analyse non supervisée a été testée ici, l'HCA mais aucune séparation n'a été possible entre les différents groupes (données non montrées).

5.1.2 Application au diagnostic différentiel entre la maladie à corps de Lewy et la maladie d'Alzheimer

Afin d'identifier des modifications spectrales entre les spectres des LCR provenant des patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou de la maladie à corps de Lewy, les spectres différentiels représentant les groupes MA démence moins MCL démence et les groupes MA MCI moins MCL MCI ont été calculés à partir des spectres d'absorbance, des dérivées secondes ou des dérivées premières. Ils sont présentés en figure 5.9.



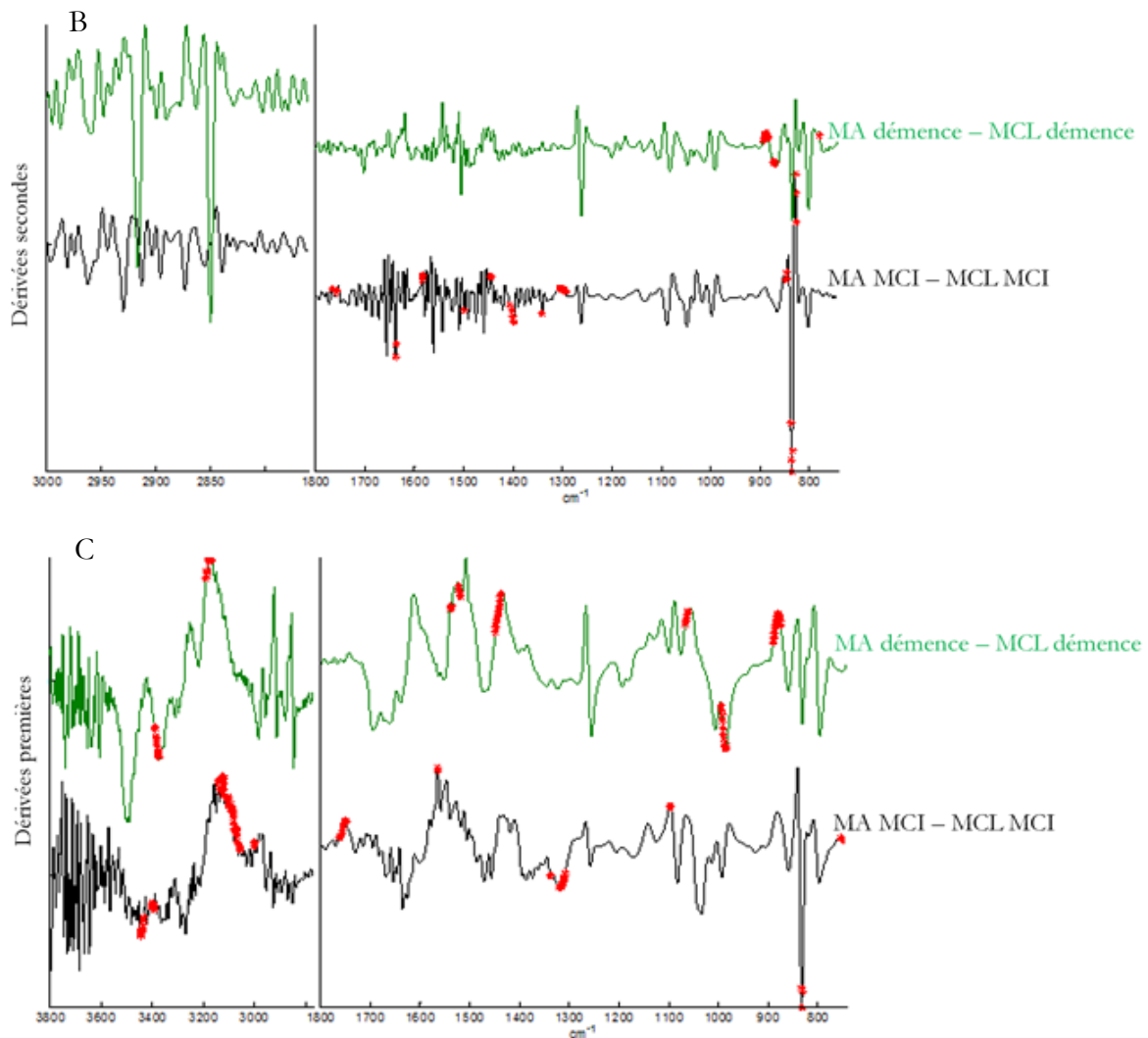


Figure 5.9 : Spectres différentiels calculés à partir des spectres IR moyens du LCR (A), des dérivées secondes (B) ou des dérivées premières (C) des spectres IR moyens du LCR provenant des groupes MA MCI, MA démence, MCL MCI et MCL démence. Les nombres d'ondes significativement différents sont représentés par des points rouges selon le test de Student ($\alpha=1\%$).

Très peu de variations significatives peuvent être observées entre les groupes MA MCI et MCL MCI ou MA démence et MCL démence, et ce quels que soit les prétraitements réalisés sur les spectres (correction de la ligne de base dans le cas des spectres d'absorption ou calcul des dérivées).

Une ACP a été réalisée sur l'ensemble des spectres d'absorption, des dérivées secondes et premières. Les huit premières CP représentant 99% de la variance ont été sélectionnées (leur représentation graphique sont présentées en annexe 7). La figure 5.10 présente les projections 2D ou 3D de l'ensemble des spectres dans l'espace des CP qui représentent la plus grande variance.

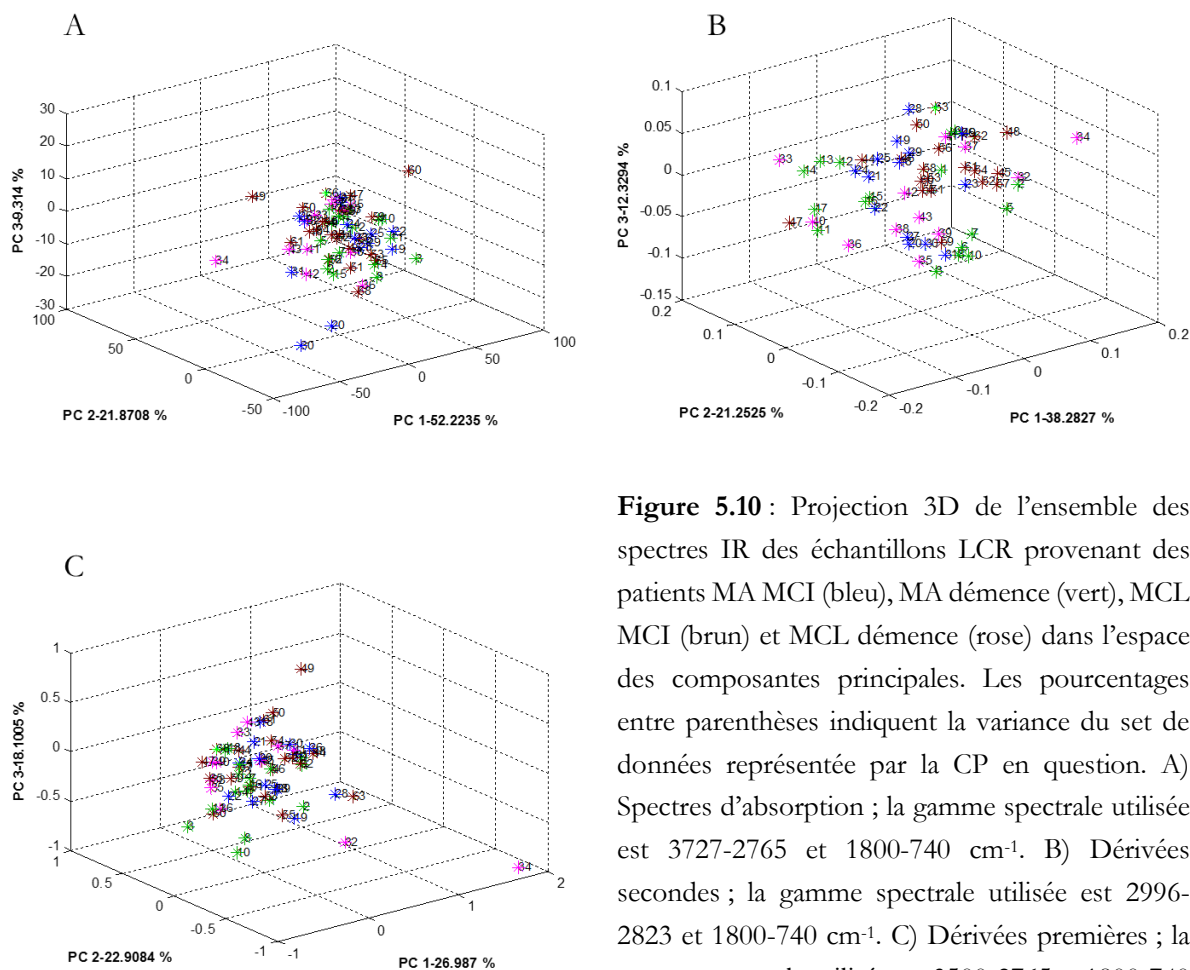


Figure 5.10 : Projection 3D de l'ensemble des spectres IR des échantillons LCR provenant des patients MA MCI (bleu), MA démence (vert), MCL MCI (brun) et MCL démence (rose) dans l'espace des composantes principales. Les pourcentages entre parenthèses indiquent la variance du set de données représentée par la CP en question. A) Spectres d'absorption ; la gamme spectrale utilisée est 3727-2765 et 1800-740 cm^{-1} . B) Dérivées secondes ; la gamme spectrale utilisée est 2996-2823 et 1800-740 cm^{-1} . C) Dérivées premières ; la gamme spectrale utilisée est 3500-2765 et 1800-740 cm^{-1} .

Les représentations graphiques de l'ACP montrent qu'aucune séparation ne peut être faite entre les groupes MA et MCL. Les mêmes résultats ont été obtenus en utilisant les CP les plus discriminantes ou en réduisant la gamme spectrale utilisée. Cela suggère une grande similitude entre les spectres des différents groupes.

En effet, à l'aide des spectres différentiels, il a été montré que l'augmentation de l'intensité des bandes à 2961, 1260 et 802 cm^{-1} observée pour le groupe MA MCI est également retrouvée pour le groupe MCL MCI. Cela permet d'éliminer ces bandes de la liste des bandes marqueurs potentielles pour établir un diagnostic différentiel entre les deux maladies. Par ailleurs, l'utilisation de méthodes statistiques non supervisées, qui permettent d'étudier l'ensemble des contributions au sein d'un spectre, n'a pas permis de mettre en évidence d'autres variations plus subtiles entre les spectres comme il l'avait été observé précédemment. L'application d'autres méthodes chimiométriques plus sophistiquées est donc nécessaire.

Conclusion :

Pour la première fois, le potentiel de la spectroscopie IR dans le diagnostic de la maladie à corps de Lewy et dans le diagnostic différentiel avec la maladie d'Alzheimer à partir de l'étude du LCR a été évalué. Des différences ont pu être mises en évidence entre les groupes MCL MCI, MCL démence et contrôle et ce notamment, grâce au calcul préalable des dérivées des spectres.

Cependant, avec l'application seule d'analyses multivariées non supervisées (ACP en particulier), aucune séparation n'a pu être faite entre les spectres des échantillons de LCR provenant de patients atteints de la maladie à corps de Lewy ou de la maladie d'Alzheimer.

La prochaine étape est donc d'aller plus loin dans l'identification de variations entre les différents groupes à l'aide d'analyses multivariées supervisées. Toutefois, afin que ces données soient valables, il serait bien d'augmenter le nombre d'échantillons étudiés.

5.2 Etude des liquides céphalorachidiens par SERS

5.2.1 Application au diagnostic précoce de la maladie à corps de Lewy

La figure 5.11 compare les spectres moyens des différents échantillons LCR provenant des groupes contrôle, MCL MCI et MCL démence. Pour chaque échantillon, cinq spectres ont été enregistrés à différents endroits de l'échantillon. Le faible écart-type entre les différents spectres témoigne de l'homogénéité de l'échantillon. Pour plus de détails sur les différentes contributions présentes au sein des spectres, se référer au chapitre 4, paragraphe 4.3.

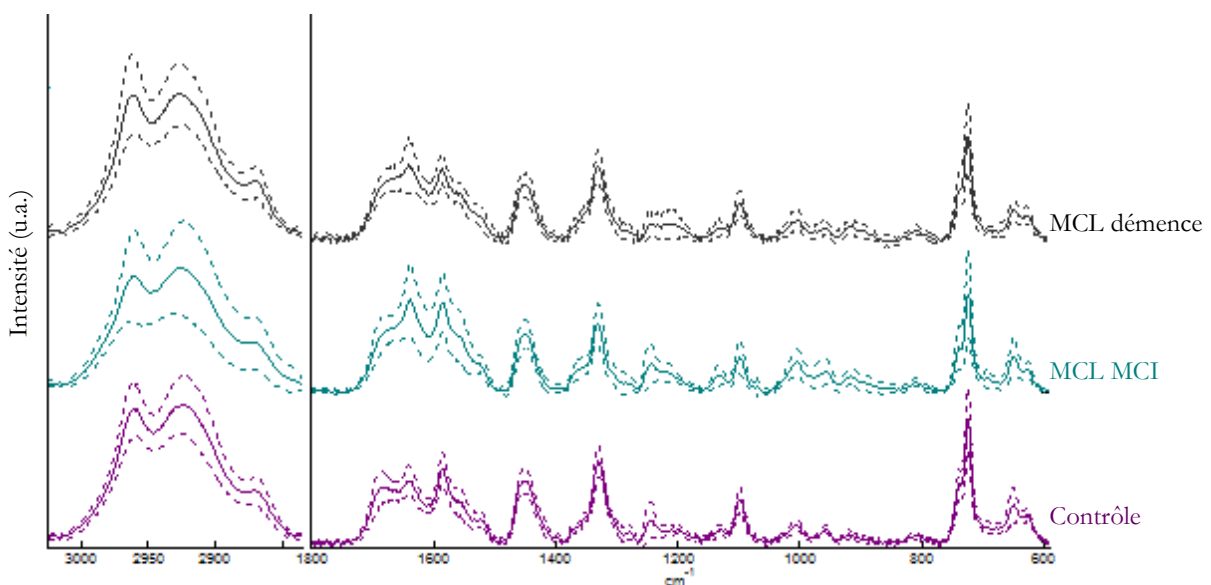


Figure 5.11 : Spectres SERS moyens (lignes continues) +/- écart type (lignes pointillées) des échantillons LCR pour les groupes contrôle, MCL MCI et MCL démence.

Afin de mieux visualiser les modifications spectrales engendrées par la maladie, les spectres différentiels entre chaque groupe ont été calculés. Ils sont présentés en figure 5.12.

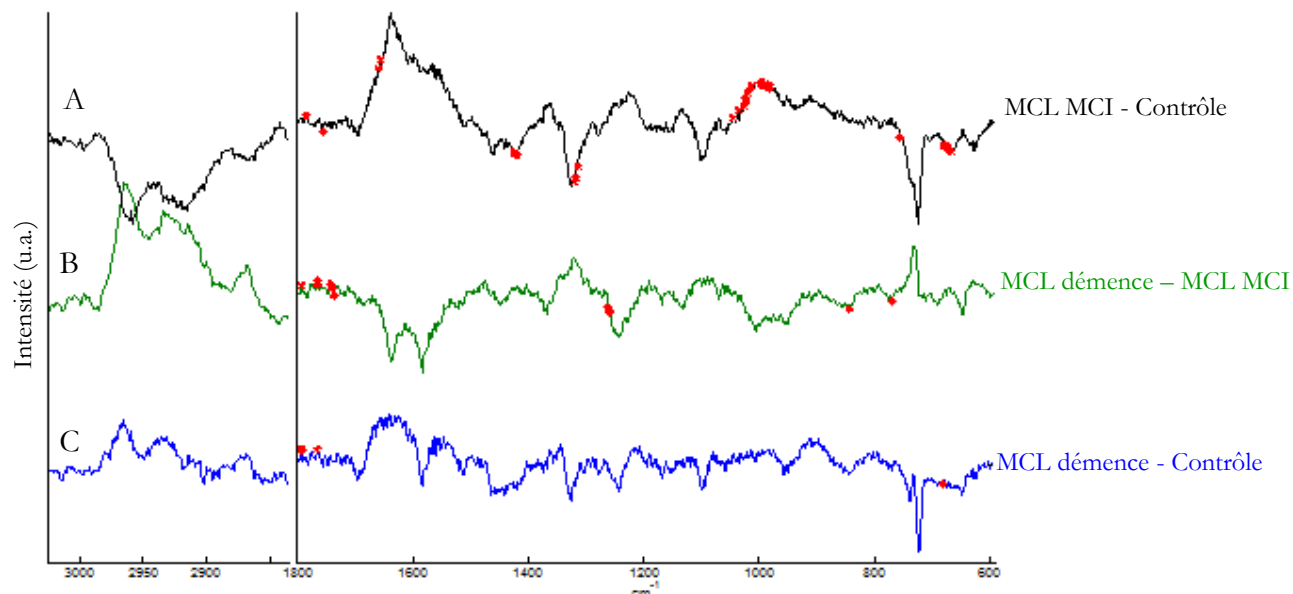


Figure 5.12 : Spectres différentiels calculés à partir des spectres SERS moyens du LCR provenant des trois groupes : contrôle, MCL MCI et MCL démence. A) Le spectre représentant le groupe contrôle soustrait de celui représentant le groupe MCL MCI ; B) Le spectre représentant le groupe MCL MCI soustrait de celui représentant le groupe MCL démence ; C) Le spectre représentant le groupe contrôle soustrait de celui représentant le groupe MCL démence. Les nombres d'ondes significativement différents sont représentés par des points rouges selon le test de Student ($\alpha=1\%$).

Aucune variation significative ne peut être observée entre les différents groupes. Ainsi, comme pour la spectroscopie IR, afin de mettre en évidence des variations spectrales permettant de distinguer les différents groupes, une ACP a été appliquée. Les huit premières composantes principales représentant 99% de la variance ont été sélectionnées (leur représentation graphique sont présentées en annexe 6). La figure 5.13 montre la distribution de tous les spectres obtenus à l'aide des deux premières composantes principales ; CP1 et CP2 qui représentent la plus grande variance : 63,0 et 20,9% respectivement.

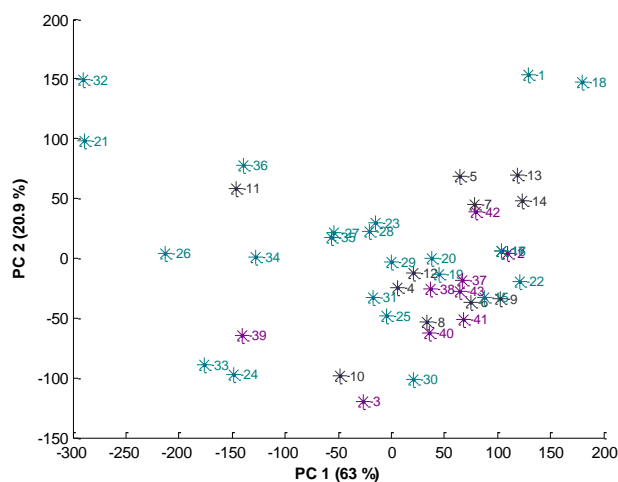


Figure 5.13 : Projection 2D de l'ensemble des spectres SERS des LCR provenant des patients contrôle (violet), MCL MCI (turquoise) et MCL démence (noir) dans l'espace des composantes principales. La gamme spectrale utilisée est 3013-2834 et 1800-590 cm^{-1} . Les pourcentages entre parenthèses indiquent la variance du set de données représentée par la CP en question.

Aucune séparation entre les spectres n'est possible suggérant ainsi une grande similitude entre les spectres des échantillons LCR provenant des différents groupes ou que les molécules adsorbées sur les nanoparticules ne sont pas marqueurs de la maladie.

5.2.2 Application au diagnostic différentiel entre la maladie à corps de Lewy et la maladie d'Alzheimer

Bien que les études menées dans le cadre de la maladie à corps de Lewy et de la maladie d'Alzheimer n'ont pas été concluantes, les spectres différentiels représentant les groupes MA démente moins MCL démente et MA MCI moins MCL MCI ont été calculés. Ils sont présentés en figure 5.14. Une ACP a également été réalisée sur l'ensemble des spectres. Les huit premières CP représentant 99% de la variance ont été sélectionnées (leur représentation graphique sont présentées en annexe 7). La figure 5.15 présente la projection 3D de l'ensemble des spectres dans l'espace des CP qui représentent la plus grande variance.

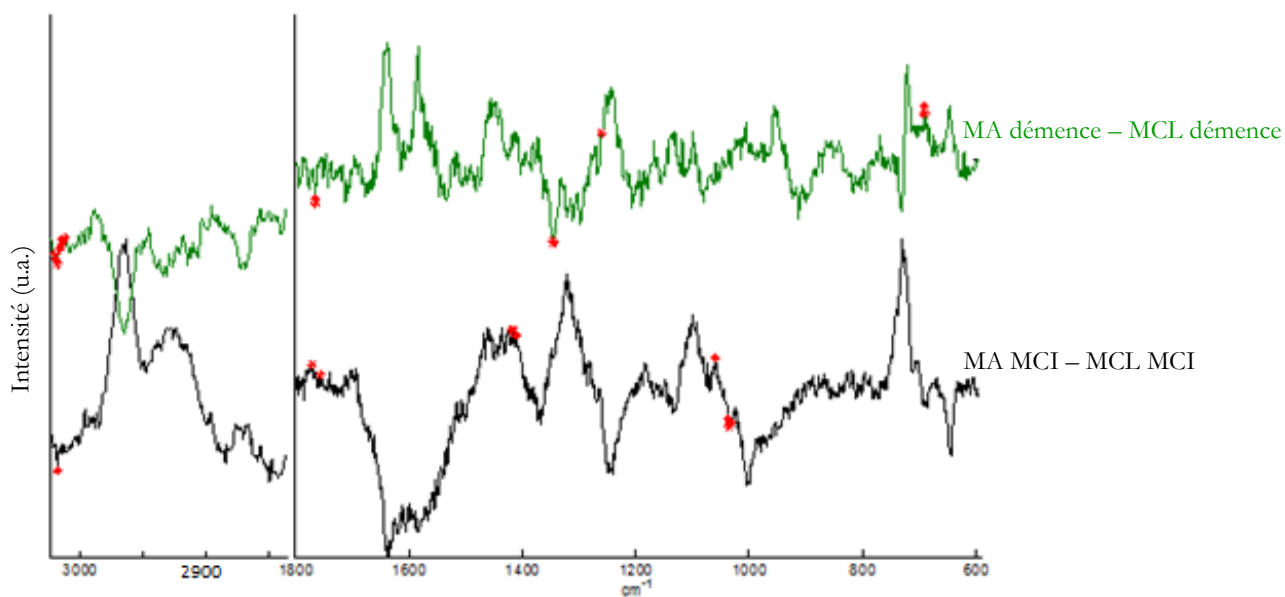


Figure 5.14 : Spectres différentiels calculés à partir des spectres SERS moyens du LCR provenant des groupes MA MCI, MA démente, MCL MCI et MCL démente. Les nombres d'ondes significativement différents sont représentés par des points rouges selon le test de Student ($\alpha=1\%$).

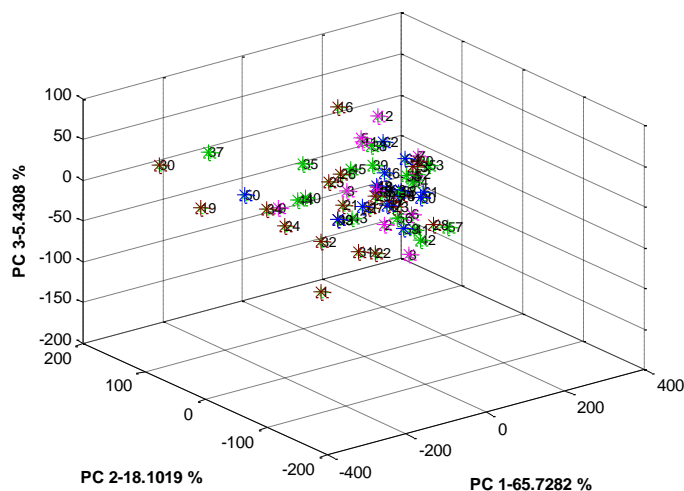


Figure 5.15 : Projection 2D de l'ensemble des spectres SERS des LCR provenant des patients MA MCI (bleu), MA démente (vert), MCL MCI (brun) et MCL démente (rose) dans l'espace des composantes principales. La gamme spectrale utilisée est 3013-2834 et 1800-590 cm^{-1} . Les pourcentages entre parenthèses indiquent la variance du set de données représentée par la CP en question.

Aucune variation significative ne peut être observée entre les groupes MA MCI et MCL MCI ou MA démente et MCL démente lorsque les spectres sont comparés entre eux. De même, l'application d'une ACP ne permet pas de mettre en évidence des variations plus subtiles entre les différents spectres.

Conclusion :

L'identification de marqueurs vibrationnels permettant de différencier les différents stades de la maladie et/ou de différencier un patient atteint de la maladie à corps de Lewy d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer n'a pas été possible dans les conditions expérimentales testées ici, malgré l'utilisation d'analyses multivariées telles que l'ACP. L'application d'autres méthodes chimiométriques plus sophistiquées telles que des analyses supervisées est donc nécessaire.

Egalement, comme il l'a déjà été évoqué dans le chapitre précédent, une des autres possibilités à envisager est l'utilisation d'un autre laser.

Chapitre 6

Etude de la sclérose en plaques

La sclérose en plaques représente la maladie neurodégénérative la plus fréquente chez les jeunes. Elle se caractérise par la destruction des gaines de myéline suite à des processus inflammatoires. Différentes phases peuvent être observées au cours de la maladie avec notamment des poussées suivies d'un rétablissement partiel ou complet des symptômes. En fonction des signes cliniques observés, un score clinique est attribué.

A l'heure actuelle, aucun traitement curatif n'existe. Ainsi, de nombreuses équipes tentent d'identifier de nouveaux traitements thérapeutiques dont celle du Pr. A.G. Mensah-Nyagan (Université de Strasbourg) qui nous a fourni les échantillons de tissus cérébraux pour les études menées sur la maladie d'Alzheimer.

Le but de cette étude est de suivre par microspectroscopie Raman et IR, l'effet de différents éventuels traitements identifiés par l'équipe du Pr. A.G. Mensah-Nyagan. Toutefois, il est nécessaire d'évaluer au préalable, le potentiel de ces spectroscopies dans l'identification des lésions cérébrales et notamment pour la microspectroscopie Raman puisqu'aucune étude n'a encore été reportée à notre connaissance, à l'exception de celles réalisées par CARS (Fu *et al.*, 2011 ; Imitola *et al.*, 2011). Ce chapitre présente les résultats de cette étude préliminaire.

Des souris saines ou malades présentant un score clinique (SC) de 4, 7 (phase de poussée) ou 0 (phase de rémission) ont été étudiées et plus particulièrement leur cervelet¹, puisqu'il s'agit d'une des régions les plus touchées par la sclérose en plaques. La figure 6.1 présente une image des coupes cérébrales étudiées ; la zone entourée délimite le cervelet. En coupe sagittale, la substance blanche et la substance grise du cervelet peuvent être très bien identifiées ; la substance grise pouvant être divisée en deux parties : la couche granulaire et la couche moléculaire.

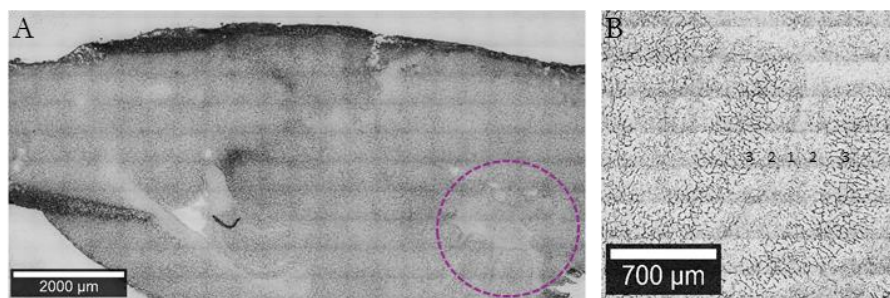


Figure 6.1 : A) Image d'une coupe sagittale de cerveau de souris (la zone en pointillée délimite le cervelet) obtenue à l'aide d'un microscope Raman. B) Zoom sur le cervelet. 1 : substance blanche ; 2 : couche granulaire ; 3 : couche moléculaire (2+3 : substance grise).

6.1 Etude par microspectroscopie Raman

Différentes régions du cervelet ont été analysées pour chacun des échantillons. Les cartes Raman représentant la répartition des lipides et des protéines dans le tissu sont montrées en figure 6.2.

¹ Le cervelet est une partie du cerveau qui joue un rôle important dans le contrôle moteur.

Elles ont été créées à partir de l'aire des bandes entre 2914-2817 et 3000-2917 cm^{-1} respectivement (pour plus de détails, sur l'attribution des bandes, se référer au tableau 6.1 et à l'étude des composés modèles présentée dans le paragraphe 4.2).

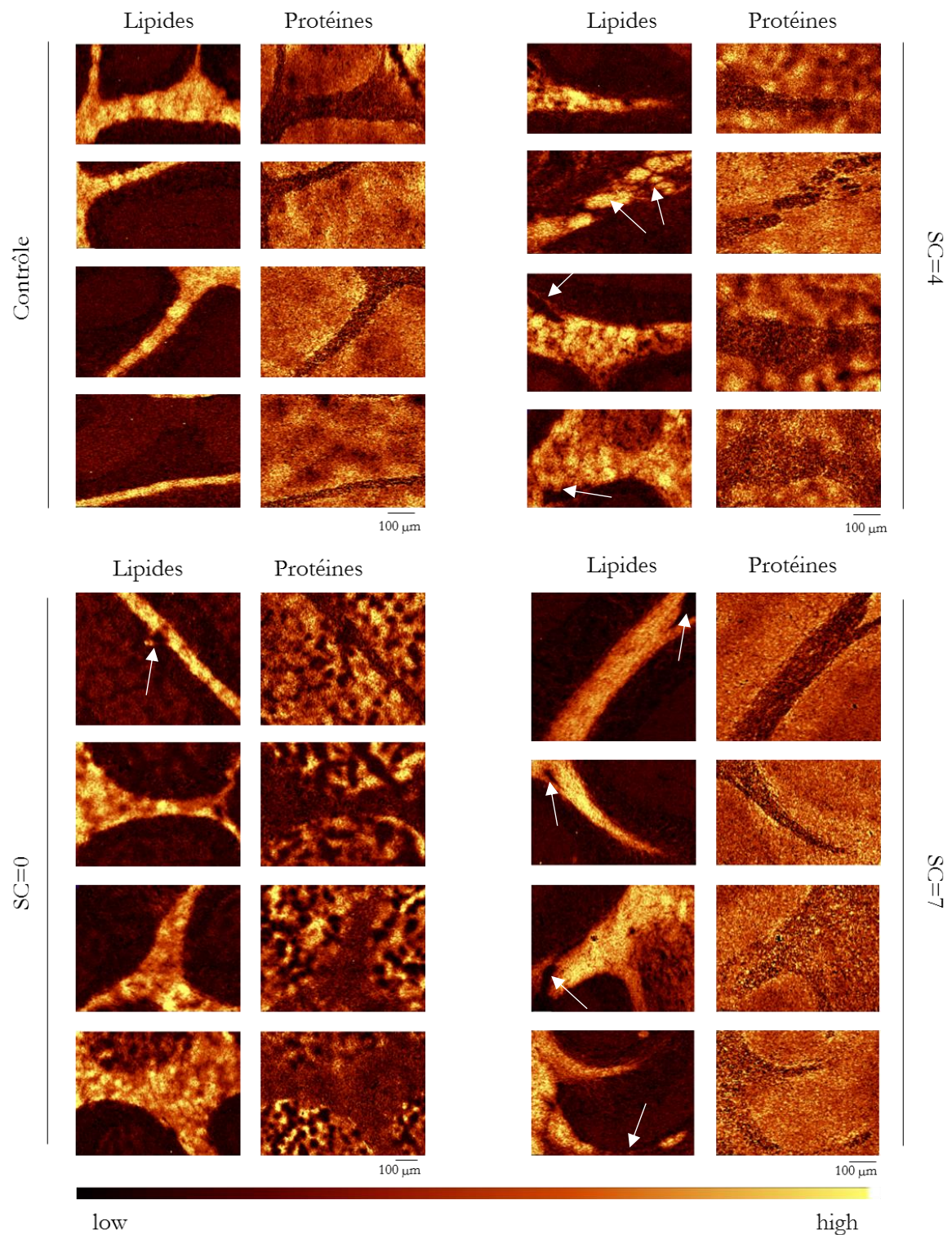


Figure 6.2 : Cartes Raman de différentes régions du cervelet d'une souris saine et malade avec un score clinique (SC) de 4, 7 ou 0 représentant la répartition des lipides et des protéines à partir de l'aire entre 2914-2817 et 3000-2917 cm^{-1} respectivement. Un objectif x20 a été utilisé et la distance entre chaque point de mesure est de 4,5 μm . La longueur d'onde excitatrice est 532 nm. Les flèches représentent des discontinuités au sein de la substance blanche.

Comme il peut être observé sur les différentes cartes et d'après la structure du cervelet (Figure 6.1), la microspectroscopie Raman de ce dernier permet de différencier la substance blanche, la couche granulaire et la couche moléculaire. La figure 6.3 présente les spectres Raman typiques de ces trois régions.

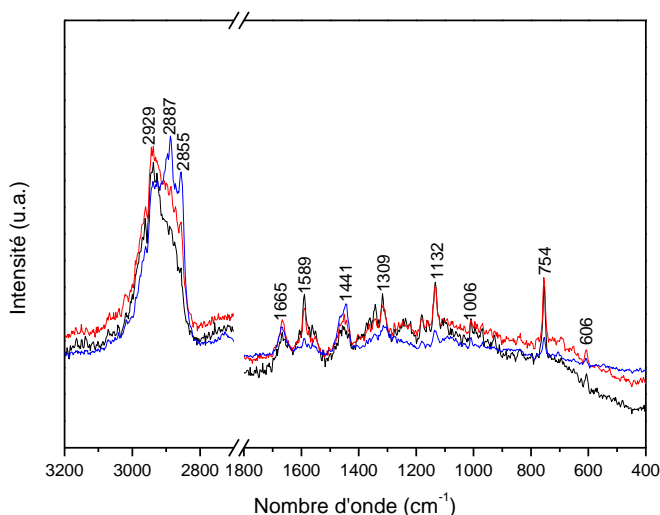


Figure 6.3 : Spectre Raman typique de la substance blanche (bleu) et de la substance grise avec la couche moléculaire (rouge) et granulaire (noir) dans la région 3200-2700 et 1800-400 cm^{-1} . La longueur excitatrice est 532 nm.

La substance blanche présente une plus grande quantité de lipides avec des bandes plus intenses dans la région 2920-2800 cm^{-1} et à 1441 cm^{-1} mais une plus faible quantité de protéines que le tissu environnant avec des bandes plus faibles dans la région 3000-2920 cm^{-1} et à 1665 cm^{-1} (se référer au tableau 6.1 pour l'attribution des bandes). Ceci est en accord avec le fait que la substance blanche est composée majoritairement d'axones entourés d'une gaine de myéline ; cette dernière étant composée de 70% de lipides et 30% de protéines environ.

A l'inverse, la couche granulaire qui est située à proximité de la substance blanche contient une faible quantité de lipides et une grande quantité de protéines. La couche moléculaire quant à elle, contient une quantité intermédiaire de lipides et de protéines par rapport aux deux autres régions.

Des régions au niveau de la substance blanche avec moins de lipides peuvent être observées sur les cartes reflétant la composition du cervelet de souris malades qui présentent un score clinique de 4 ou de 7, comparées aux souris contrôles (régions indiquées par des flèches sur la figure 6.2). Ces régions sont associées à une augmentation de la quantité de protéines et pourraient correspondre aux lésions pathologiques de la gaine de la myéline.

Pour les souris malades mais en phase de rémission (SC=O), seule une petite altération dans la composition lipidique peut être observée sur la première carte. Cela tend à suggérer que la restauration de la gaine de myéline durant cette phase a été complète.

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Composé chimique	Tentative d'attribution
606	Lipides, protéines	Cholestérol, $\delta(\text{O}-\text{C}=\text{O})$ Phe
754	Protéines, hèmes	Symmetric breathing Trp, noyau porphyrine (ν_{15})
1006	Protéines	$\delta(\text{ring})$ Phe
1068	Acides nucléiques, lipides	$\nu(\text{C}-\text{C}), \nu(\text{C}-\text{O})$ phospholipides, $\nu_s(\text{CC}), \nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ acides nucléiques
1132	Hèmes	Noyau porphyrine (ν_{22})
1176	Protéines	$\delta(\text{C}-\text{H})$ Tyr
1230	Protéines, acides nucléiques	$\nu(\text{CN}), \delta(\text{NH})$ Amide III, $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ acides nucléiques
1309	Protéines, acides nucléiques, lipides, hèmes	$\delta(\text{CH}_2), \gamma_w(\text{CH}_3/\text{CH}_2), \gamma_t(\text{CH}_3/\text{CH}_2),$ noyau porphyrine (ν_{21})
1343	Protéines, acides nucléiques	$\delta(\text{CH}_3), \delta(\text{CH}_2), \gamma_w(\text{CH}_3/\text{CH}_2), \gamma_t(\text{CH}_3/\text{CH}_2)$
1441	Protéines, lipides	$\delta(\text{CH}_2), \delta(\text{CH}_3)$
1553	Protéines, hèmes	$\nu(\text{CN}), \delta(\text{NH})$ Amide II, $\nu(\text{C}=\text{C})$ Trp, Tyr, noyau porphyrine (ν_{11})
1589	Protéines, Hèmes	$\nu(\text{C}=\text{C})$ Phe, noyau porphyrine (ν_2)
1665	Protéines	$\nu(\text{C}=\text{O})$ Amide I
2855	Lipides, protéines	$\nu_s(\text{CH}_2)$
2887	Lipides, protéines	$\nu(\text{CH}_2)$ résonance de Fermi
2929	Protéines, lipides	$\nu_s(\text{CH}_3)$
2665	Protéines, lipides	$\nu_{as}(\text{CH}_3)$

Tableau 6.1 : Position et tentatives d'attribution des bandes provenant d'un spectre Raman typique du cervelet (Attributions faites à partir de Howell *et al.*, 1999 ; Krafft, 2005 ; Rehman *et al.*, 2013).

6.2 Etude par microspectroscopie infrarouge

Différentes régions du cervelet de souris saines et malades avec un score clinique de 7 ont été étudiés. Les cartes IR montrant la répartition des lipides et des protéines au sein du tissu sont présentées en figure 6.4.

Comme dans le cas de la microspectroscopie Raman, la cartographie du cervelet par microspectroscopie IR permet de différencier la substance blanche de la substance grise. La figure 6.5 présente les spectres IR typiques de la substance blanche et de la substance grise.

La substance blanche montre une plus grande quantité de lipides par rapport à la substance grise avec des bandes plus intenses dans la région 2993-2817 cm⁻¹ et à 1740 cm⁻¹ attribuées aux vibrations des groupements CH₂/CH₃ et du groupement carbonyle des fonctions esters des lipides respectivement. A l'inverse, la substance grise présente une plus grande quantité de protéines et montre des bandes plus intenses entre 1711 et 1482 cm⁻¹ où sont retrouvées les vibrations amide I et amide II (Tableau 6.2). Toutefois, seule la couche granulaire peut être visualisée ici en raison des dimensions de la région analysée.

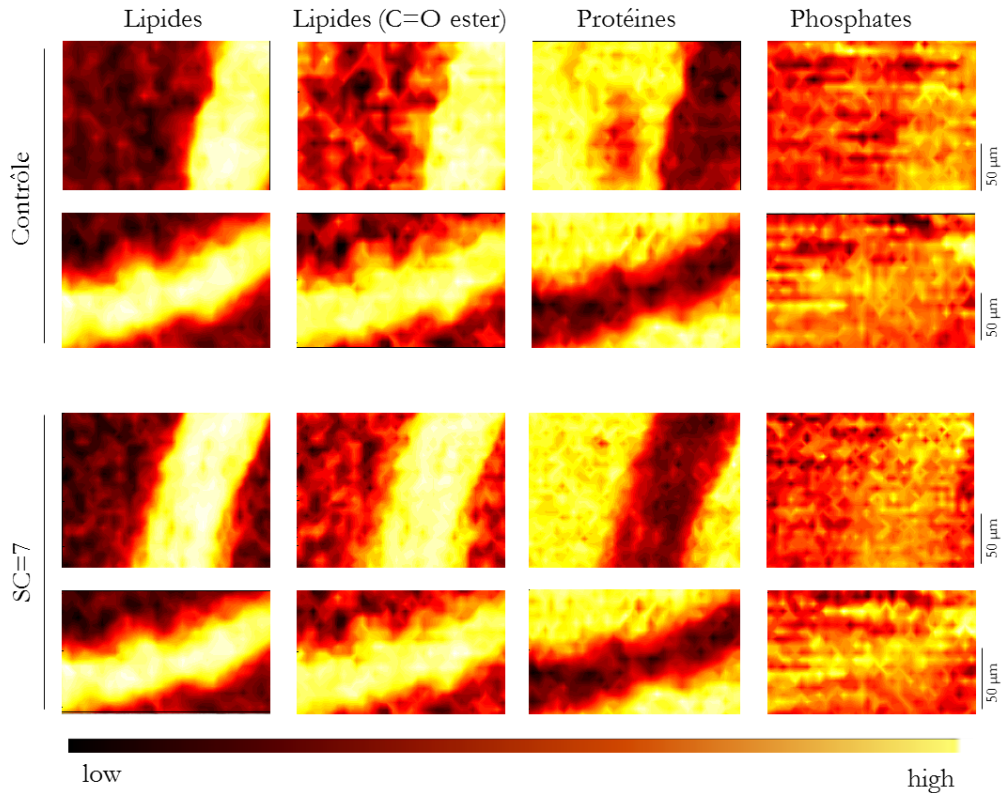


Figure 6.4 : Cartes IR de différentes régions du cervelet d'une souris saine et malade avec un score clinique de 7 représentant l'aire entre 2993-2817 (lipides totaux), 1761-1719 (groupement carbonyle des lipides), 1711-1482 (protéines) et 1131-1000 cm^{-1} (groupement phosphate). L'ouverture du microscope est de 12,5 μm et la distance entre chaque point de mesure est de 6 μm .

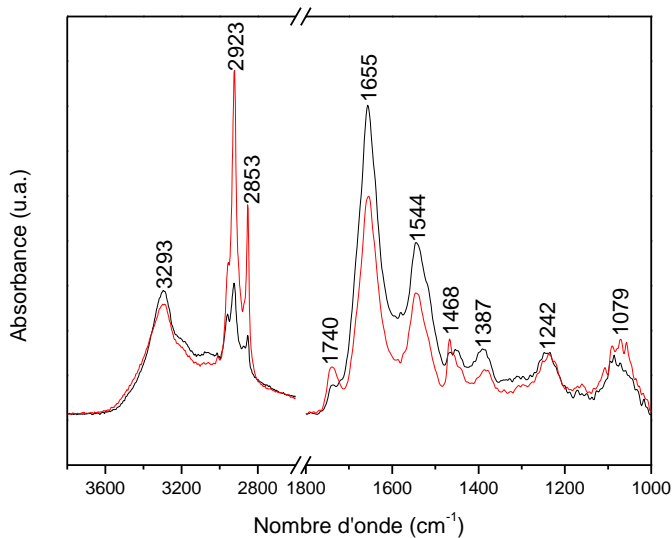


Figure 6.5 : Spectre IR typique de la substance blanche (rouge) et de la substance grise (noir) dans la région 3800-2700 et 1800-1000 cm^{-1} .

Aucune altération ne peut être observée au niveau de la substance blanche des souris malades présentant un score clinique de 7. Cependant, seules deux régions ont pu être analysées pour chaque échantillon suite à des problèmes techniques qui ont influencé sur mon temps de mesure disponible. En effet, pour rappel, toutes les mesures de microspectroscopie IR ont été réalisées au synchrotron de Karlsruhe.

Les vibrations des groupements phosphates (νPO_2) ont également été analysées à partir de l'aire de la bande à 1079 cm^{-1} car il a été mis en évidence la présence d'un grand nombre de cellules nucléées (lymphocytes, macrophages, cellules microgliales par exemple) au sein des lésions (Frohman *et al.*, 2006 ; Lassmann *et al.*, 1994). D'après les cartes IR présentées en figure 6.5, une quantité plus importante peut être observée au niveau de la substance blanche contrairement à ce qui a pu être publié précédemment (Heraud *et al.*, 2010). La raison est que les groupements phosphates ont deux origines différentes : les lipides et les acides nucléiques. Ainsi, l'identification de variations au niveau des acides nucléiques et donc la confirmation d'une augmentation du nombre de cellules nucléées au sein des lésions pourra s'avérer difficile avec de simples analyses univariées.

Nombre d'onde (cm^{-1})	Composé chimique	Tentative d'attribution
1047	Acides nucléiques, glucides	$\nu(\text{PO}_2^-)$, couplage entre $\nu(\text{CO})$ et $\delta(\text{CO})$
1062	Glucides, lipides	Couplage entre $\nu(\text{CO})$ et $\delta(\text{CO})$, $\nu(\text{CC})$, cholestérol
1081	Acides nucléiques, glucides	$\nu_s(\text{PO}_2^-)$, $\nu(\text{CO})$
1095	Acides nucléiques, lipides	$\nu_s(\text{PO}_2^-)$
1117	Glucides	$\nu(\text{CO})$, $\nu(\text{CC})$
1163	Protéines, glucides	$\nu(\text{CO})$
1184	Protéines, glucides	$\nu(\text{CO})$, $\nu(\text{C-OH})$
1230	Acides nucléiques, lipides	$\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$
1240	Acides nucléiques, lipides, protéines	$\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$, Amide III
1263	Acides nucléiques, lipides, protéines	$\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$, Amide III
1286	Acides nucléiques, lipides	$\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$
1304	Protéines	Amide III
1338	Protéines	Amide III
1381	Protéines, lipides	$\nu(\text{CO})$, $\delta(\text{CH})$, $\delta(\text{NH})$, cholestérol
1411	Protéines	$\delta(\text{CH}_3)$, $\nu_s(\text{COO}^-)$
1432	Lipides	$\delta(\text{CH}_2)$
1443	Lipides	$\delta(\text{CH}_2)$
1463	Lipides	$\delta(\text{CH}_2)$
1513	Lipides, protéines	$\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH})$ des groupements phényles
1545	Protéines, acides nucléiques	Amide II, $\nu(\text{C}=\text{C})$, $\nu(\text{C}=\text{N})$
1597	Protéines, acides nucléiques	$\nu(\text{CC})$ des groupements phényles
1656	Protéines	Amide I
1740	Lipides	$\nu(\text{C}=\text{O})$
2852	Lipides	$\nu_s(\text{CH}_2)$
2884	Lipides, protéines	$\nu_s(\text{CH}_3)$
2924	Lipides, protéines	$\nu_{as}(\text{CH}_2)$
2962	Lipides, protéines	$\nu_{as}(\text{CH}_3)$
3010	Lipides	$\nu(\text{=CH})$
3300	Protéines	Amide A

Tableau 6.2 : Position et tentatives d'attribution des bandes provenant d'un spectre IR typique du cervelet (Attributions faites à partir de Barth, 2000 ; Krafft, 2009 ; Rehman *et al.*, 2013). Les positions ont été déterminées à partir de la dérivée seconde du spectre IR.

Conclusion :

Des tissus cérébraux provenant de souris saines et de souris atteintes de la forme récurrente-rémittente de la sclérose en plaques ont été étudiés par microspectroscopie Raman et IR. Les résultats Raman montrent qu'au cours de la phase de poussée, une altération de la composition lipidique et protéique peut être observée au niveau de la substance blanche suite à la dégradation de la gaine de myéline. Durant la phase de rémission, les résultats sont très similaires à ceux obtenus pour les souris saines suggérant une restauration complète de cette dernière. Ces résultats sont donc prometteurs pour étudier l'effet de différents traitements thérapeutiques. Toutefois, afin de confirmer que les régions qui présentent une diminution de la quantité de lipides correspondent aux lésions dues au développement de la maladie, une analyse par immunofluorescence utilisant des anticorps dirigés contre la protéine de la myéline devra être réalisée en parallèle des mesures. Egalement, il peut être envisagé dans le futur d'étendre les études à la moelle épinière où de nombreuses lésions peuvent y être observées.

Concernant la microspectroscopie IR, aucune variation n'a pu être mise en évidence entre une souris saine et une souris atteinte de la sclérose en plaques. Cependant, seule une petite région du cervelet a pu être étudiée dans chaque cas. Des études supplémentaires sont donc nécessaires. Il est toutefois important de noter que les temps de mesure sont très longs en raison principalement de la taille des zones à analyser. En effet, en l'absence d'analyses préalables permettant de localiser les lésions, l'ensemble du cervelet doit être cartographié. Il peut donc être intéressant par la suite, d'envisager de faire de l'imagerie IR qui permet de réduire considérablement les temps de mesure.

Conclusion et perspectives

Les maladies neurodégénératives sont des pathologies progressives liées à un dysfonctionnement métabolique du système nerveux. Selon les régions cérébrales touchées, une altération des fonctions cognitives et/ou motrices peut être observée. Trois maladies ont été étudiées : la maladie d'Alzheimer, la maladie à corps de Lewy et la sclérose en plaques.

La maladie d'Alzheimer est la maladie neurodégénérative la plus répandue dans le monde. Cependant, malgré de nombreuses recherches, l'origine et les mécanismes de cette dernière ne sont pas complètement compris et aucun traitement curatif n'existe encore à l'heure actuelle. Ainsi, afin de mieux comprendre et diagnostiquer cette maladie, la spectroscopie infrarouge et Raman ont été utilisées.

En premier, la coordination des peptides amyloïdes β avec les métaux Cu(II) et Zn(II) a été étudiée puisque ces derniers semblent jouer un rôle important dans le développement de la maladie d'Alzheimer. Pour ce faire, les peptides GHK et DAHK dont la sphère de coordination avec le Cu(II) est très bien connue ont servi de modèles. Les résultats ont montré l'implication des résidus His dans la sphère de coordination avec les deux métaux.

Les études se sont ensuite portées sur des tissus cérébraux de souris transgéniques (Tg2576) âgées de 18 mois afin de mieux comprendre la formation et/ou le rôle des plaques séniles. Le couplage de la spectroscopie infrarouge ou Raman à la microscopie, a permis de mettre en évidence pour la première fois une colocalisation entre les peptides amyloïdes β , principaux composants des plaques et le cytochrome c . Une modification de la composition lipidique autour des plaques a également été montrée. L'accumulation de cytochrome c au sein de ces dernières suggère un dysfonctionnement mitochondrial suite à l'interaction des peptides amyloïdes β avec la membrane cellulaire ; ce qui conduirait au déclenchement des mécanismes apoptotiques et donc à la mort des cellules neuronales. Ces résultats permettent de clarifier le rôle des amyloïdes β dans les mécanismes de toxicité et ouvrent la voie à de futures recherches pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à moduler ou inhiber l'accumulation de cytochrome c au sein des plaques séniles par exemple. L'effet de ces différents traitements pourra être envisagé d'être suivi par microspectroscopie infrarouge et Raman.

Des études pilotes ont également été réalisées sur des échantillons de liquides céphalorachidiens provenant de patients atteints ou non de la maladie d'Alzheimer au stade prodromal ou démence, afin d'évaluer le potentiel de la spectroscopie infrarouge et Raman dans le diagnostic précoce de cette maladie. Dans le cadre des mesures infrarouges, différents prétraitements ont été comparés. Les résultats montrent que le calcul des dérivées premières ou secondes des spectres permet une meilleure séparation entre les groupes. L'utilisation de méthodes chimiométriques est toutefois nécessaire. Dans le cadre des mesures Raman, différentes conditions d'analyses ont été testées. Par exemple, des mesures ont été réalisées sur des échantillons secs et en solution. Il a été montré qu'afin d'obtenir des résultats reproductibles, les mesures devaient être effectuées en solution, mais ces dernières ne peuvent être faites que si le signal est exalté. Différents types de nanoparticules ont donc été testés et celles retenues pour nos conditions de mesures ont été des nanoparticules d'argent synthétisées à partir d'hydroxylamine. Cependant, malgré l'utilisation d'analyses

multivariées telles qu'une analyse en composantes principales ou une analyse hiérarchique ascendante, aucune différence significative entre les différents groupes n'a pas pu être mise en évidence suggérant une grande similarité entre les spectres.

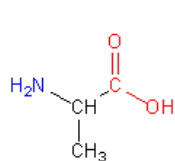
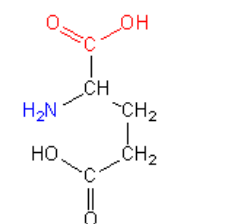
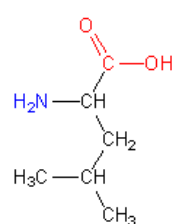
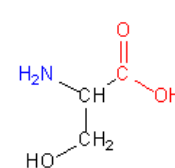
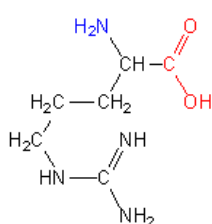
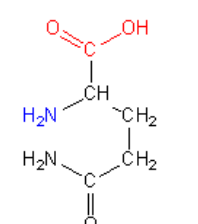
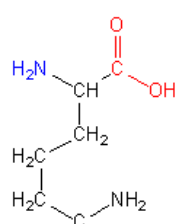
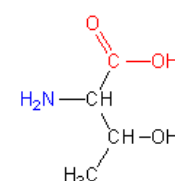
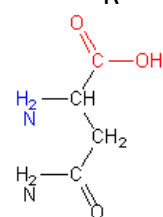
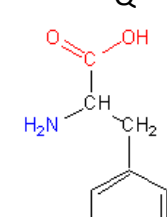
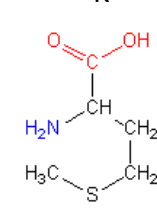
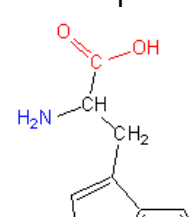
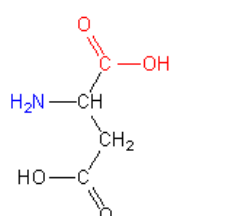
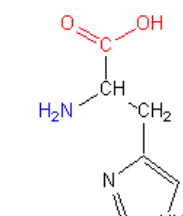
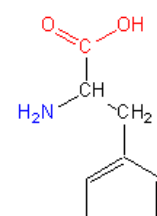
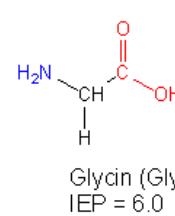
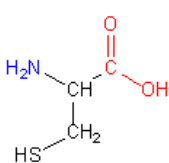
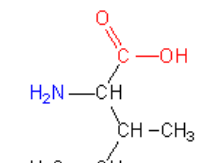
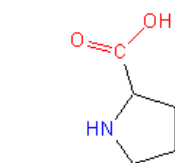
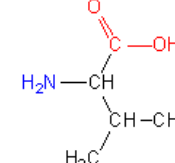
D'après ces études pilotes, il semblerait donc que la spectroscopie infrarouge soit une méthode plus adaptée pour une éventuelle utilisation clinique. De plus, la spectroscopie infrarouge présente un intérêt supplémentaire puisqu'elle peut réaliser des analyses à haut débit. Toutefois, un plus grand nombre d'échantillons devra être étudié afin de confirmer ces données. L'utilisation d'analyses supervisées devra être également envisagée pour la suite car seules des analyses non supervisées ont été utilisées ici.

En vue de ces résultats, le potentiel de la spectroscopie infrarouge et SERS a également été évalué pour le diagnostic précoce de la maladie à corps de Lewy et pour le diagnostic différentiel de cette dernière avec la maladie d'Alzheimer puisque ces deux présentent des symptômes communs dans les premiers stades. Différents échantillons de liquides céphalorachidiens provenant de patients atteints ou non de la maladie à corps de Lewy au stade prodromal ou démence ont donc été étudiés. Les résultats montrent qu'une séparation peut être faite entre les différents groupes à l'aide de la spectroscopie infrarouge mais pas avec la spectroscopie SERS. Toutefois, le calcul des dérivées des spectres et l'utilisation d'analyses chimiométriques sont nécessaires. Concernant l'étude différentielle, aucune séparation n'a pu être faite entre les échantillons de liquides céphalorachidiens issus de patients atteints de la maladie à corps de Lewy ou de la maladie d'Alzheimer, suggérant que les biomarqueurs identifiés pour chacune des deux maladies sont les mêmes. L'utilisation d'analyses chimiométriques plus poussées telles que les analyses supervisées, pourra peut-être permettre de mieux mettre en évidence les variations entre les différents groupes.

Enfin, une étude préliminaire a été réalisée sur des tissus cérébraux de souris dans lesquelles une encéphalomyélite auto-immune a été induite (modèle animal de la sclérose en plaques). Cette étude avait pour but d'évaluer l'intérêt de la microspectroscopie Raman et infrarouge dans le diagnostic de la sclérose en plaques. Seule la microspectroscopie Raman a permis de mettre en évidence des altérations au niveau de la substance blanche correspondant à la destruction de la gaine de myéline observée au cours de la maladie. Cependant, les études pour la microspectroscopie infrarouge doivent être complétées. Ces résultats ouvrent donc la voie pour de futures études avec notamment, le suivi de l'effet de différents traitements thérapeutiques.

Annexes

Annexe 1 : Les vingt acides aminés naturels

Alanine (Ala)
AAcide glutamique (Glu)
ELeucine (Leu)
LSérine (Ser)
SArginine (Arg)
RGlutamine (Gln)
QLysine (Lys)
KThréonine
(Thr)
TAsparagine (Asn)
NTyrosine (Tyr)
YMéthionine (Met)
MTryptophane (Trp)
WAcid aspartique (Asp)
DHistidine (His)
HPhénylalanine (Phe)
FGlycin (Gly)
IEP = 6.0**G**Cystéine (Cys)
CIsoleucine (Ile)
IProline (Pro)
PValine
(Val)
V

Annexe 2 : Déconvolutions des bandes amide I des spectres des plaques séniles

La bande amide I de différentes plaques séniles sont présentées en figure S1. Les déconvolutions de la bande amide I de différentes plaques séniles, ainsi que celle représentant le tissu cérébral sain sont présentées en figure S1. Les résultats sont résumés dans le tableau S1.

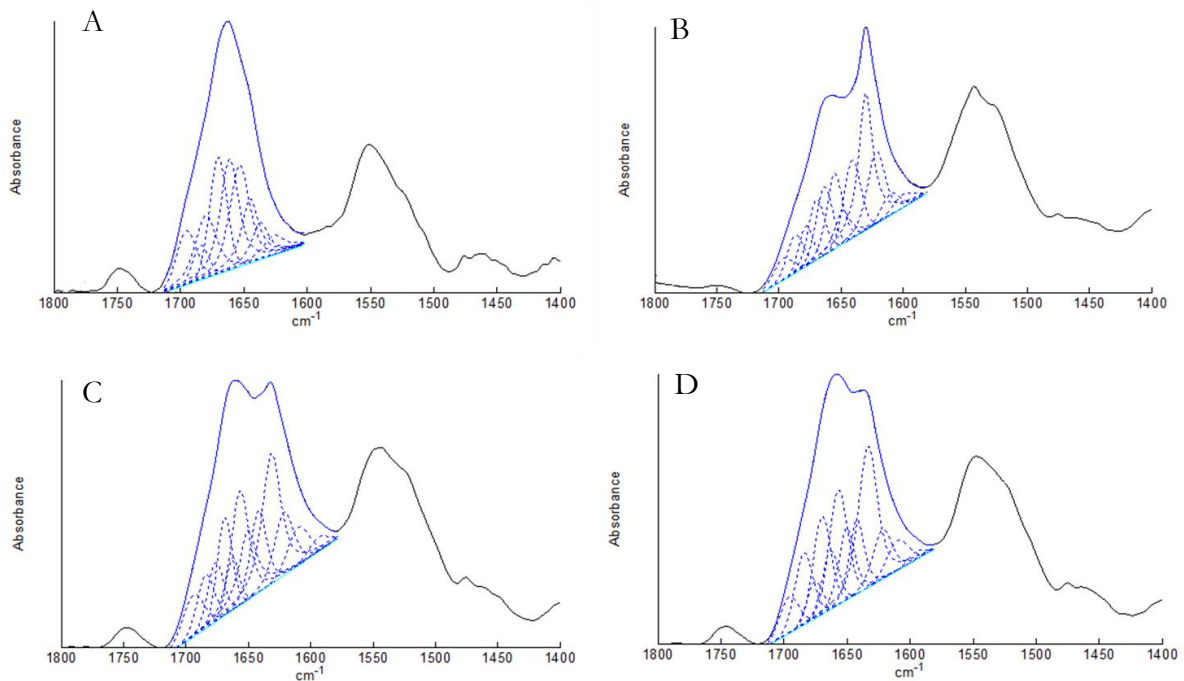


Figure S1 : Décomposition de la bande amide I des spectres représentant le tissu cérébral sain (A) et de trois plaques séniles (B à D respectivement pour les plaques 1 à 3).

Tissu sain		Plaque sénile 1		Plaque sénile 2		Plaque sénile 3		Tentative d'attribution
Position (cm ⁻¹)	Pourcentage	Position (cm ⁻¹)	Pourcentage	Position (cm ⁻¹)	Pourcentage	Position (cm ⁻¹)	Pourcentage	
1590	-	1600	-	1594	-	1595	-	Chaines latérales
1615	0	1610	3	1610	5	1610	4	Feuillets β
1627	6	1621	13	1621	9	1622	8	Feuillets β
1637	6	1630	23	1632	20	1634	22	Feuillets β
1645	12	1641	11	1642	9	1642	8	Structures désorganisées
1654	14	1650	6	1650	10	1650	9	Hélices α
1661	25	1655	11	1657	15	1657	15	Hélices α
-		1664	10	1663	4	1663	6	Coudes
1670	10	1670	9	1670	9	1670	11	Coudes
1680	6	1678	5	1676	6	1675	4	Coudes
1687	9	1687	5	1684	6	1684	9	Coudes
1697	-	1697	-	1694	-	1696	-	

Tableau S1 : Pourcentage des différentes contributions de la bande amide I des spectres représentant le tissu cérébral sain et les plaques séniles avec leur nombre d'onde associé. Les chaines latérales n'ont pas été prises en compte dans le calcul du pourcentage de chaque composante.

Annexe 3 : Correspondance entre les attributions des bandes Raman marqueurs des hèmes et les vibrations du cycle porphyrique

Attribution	Vibration correspondante
v15	Pyrrole breathing
v22	$\nu_s(\text{pyrrole half-ring}), \nu(\text{C}_\alpha\text{N})$
v30	$\nu_s(\text{pyrrole half-ring})$
v13	$\delta(\text{C}_m\text{H})$
v21	$\delta(\text{C}_m\text{H})$
v41	$\nu_s(\text{pyrrole half-ring})$
v4	$\nu_s(\text{pyrrole half-ring})$
v20	$\nu(\text{pyrrole quarter-ring})$
v3	$\nu_s(\text{C}_\alpha\text{N})$
v11	$\nu(\text{C}_\beta\text{C}_\beta)$
v2	$\nu(\text{C}_\beta\text{C}_\beta)$
v10	$\nu_{as}(\text{C}_\alpha\text{C}_m)$

Tableau S2 : Correspondance entre les attributions des bandes Raman marqueurs des hèmes et les vibrations du cycle porphyrique.

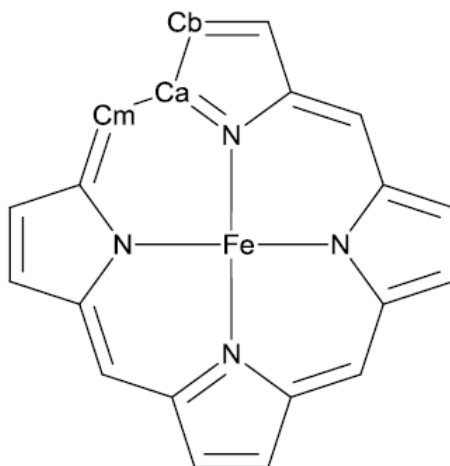
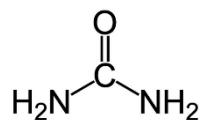


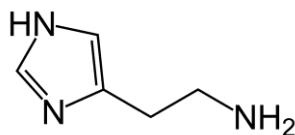
Figure S2 : Nomenclature des carbones du cycle porphyrique.

Annexe 4 : Structure des composés modèles étudiés dans le cadre de l'étude des liquides céphalorachidiens

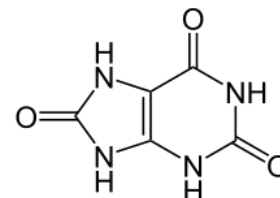
Substances azotées



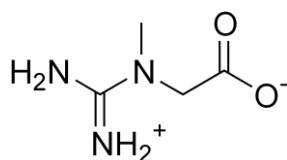
Urée



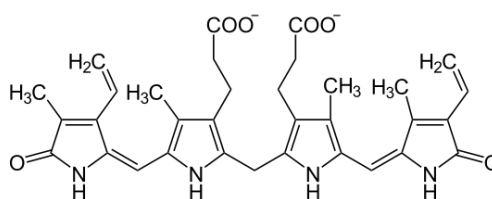
Histamine



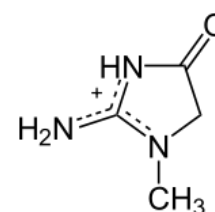
Acide urique



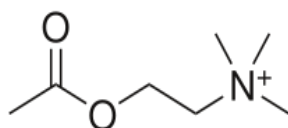
Créatine



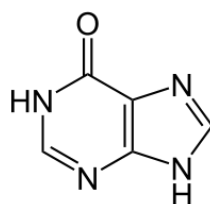
Bilirubine



Créatinine

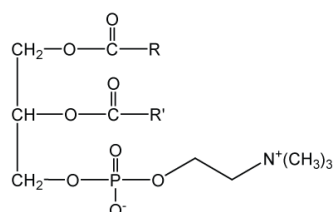


Acétylcholine

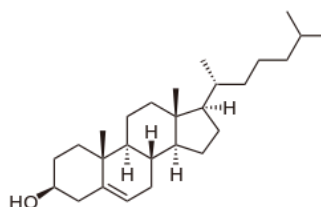


Hypoxanthine

Lipides

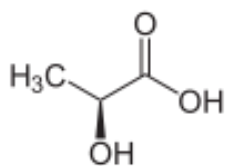


Phosphatidylcholine

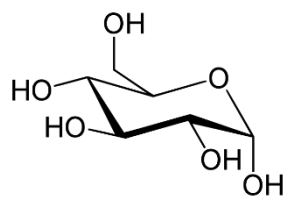


Cholesterol

Substances non azotées

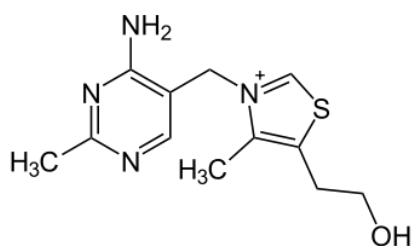


Acide lactique

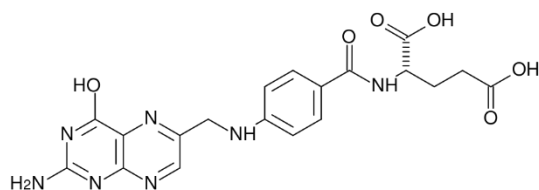


Glucose

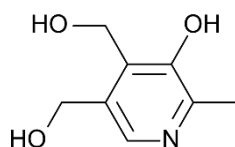
Vitamines



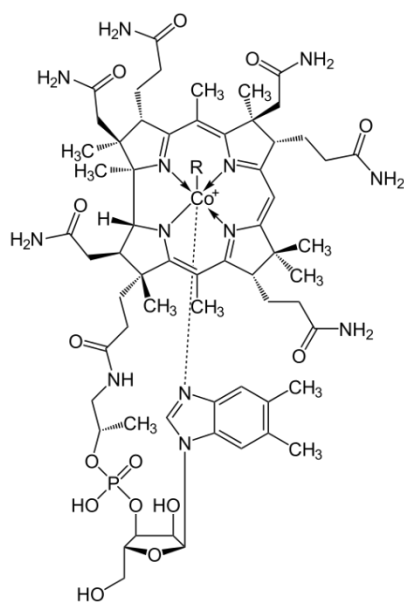
Thiamine



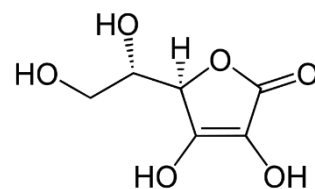
Acide folique



Pyridoxine



Cobalamine



Acide ascorbique

Annexe 5 : Représentation graphique des composantes principales calculées dans le cadre de l'étude des LCR pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer

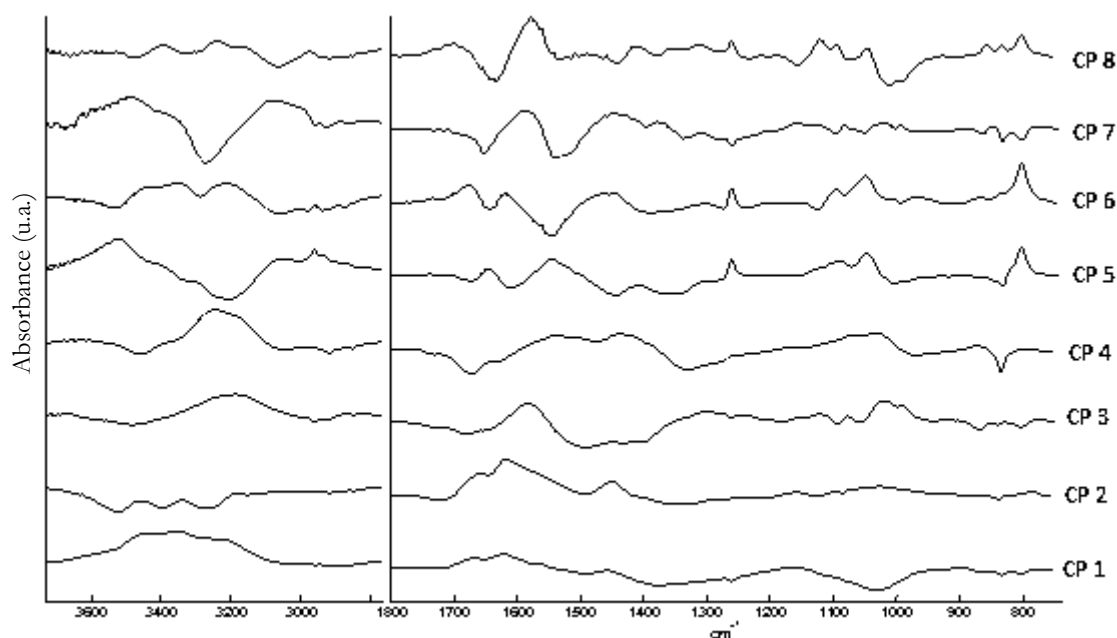


Figure S3 : Représentation graphique des huit premières composantes principales calculées à partir des spectres IR pour les régions 3727-2765 et 1800-740 cm^{-1} .

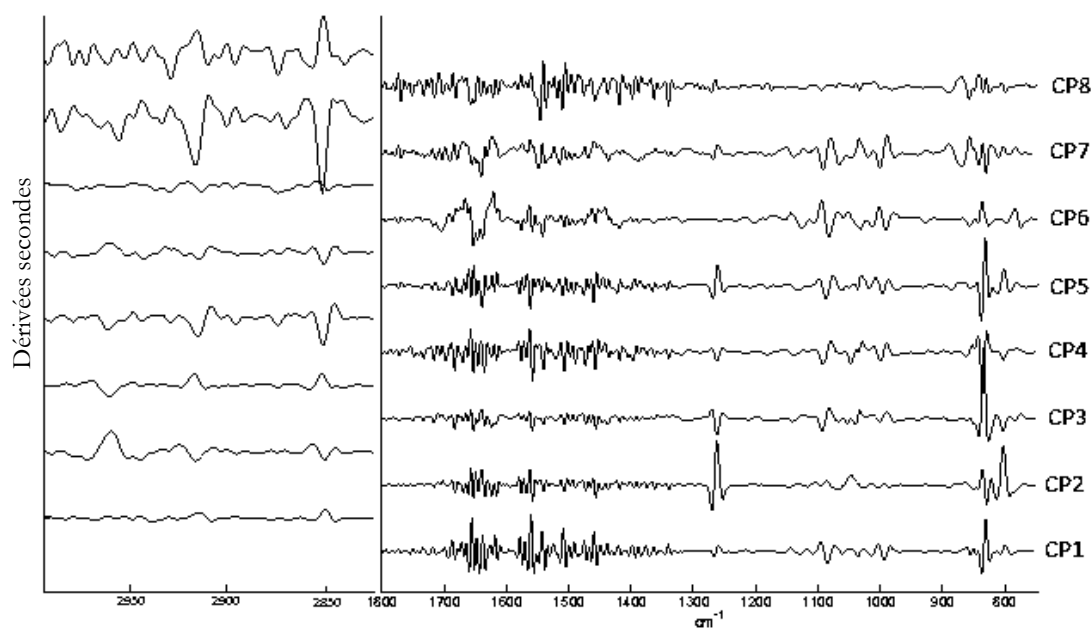


Figure S4 : Représentation graphique des huit premières composantes principales calculées à partir des dérivées secondes des spectres IR pour les régions 2996-2823 et 1800-740 cm^{-1} .

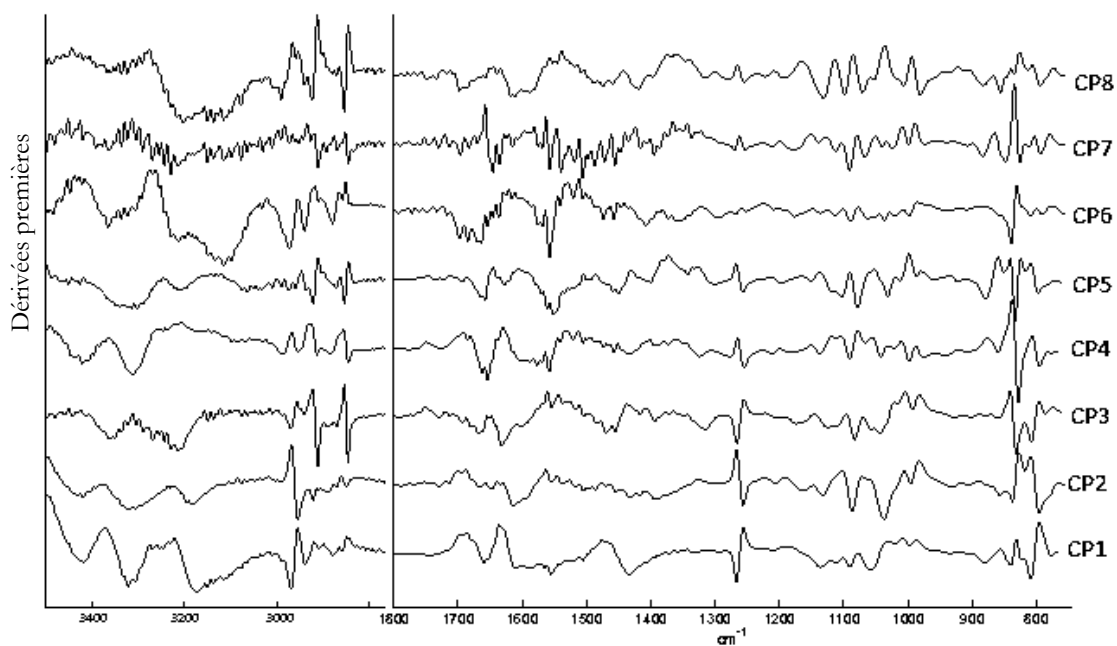


Figure S5 : Représentation graphique des huit premières composantes principales calculées à partir des dérivées premières des spectres IR pour les régions 3500-2765 et 1800-740 cm^{-1} .

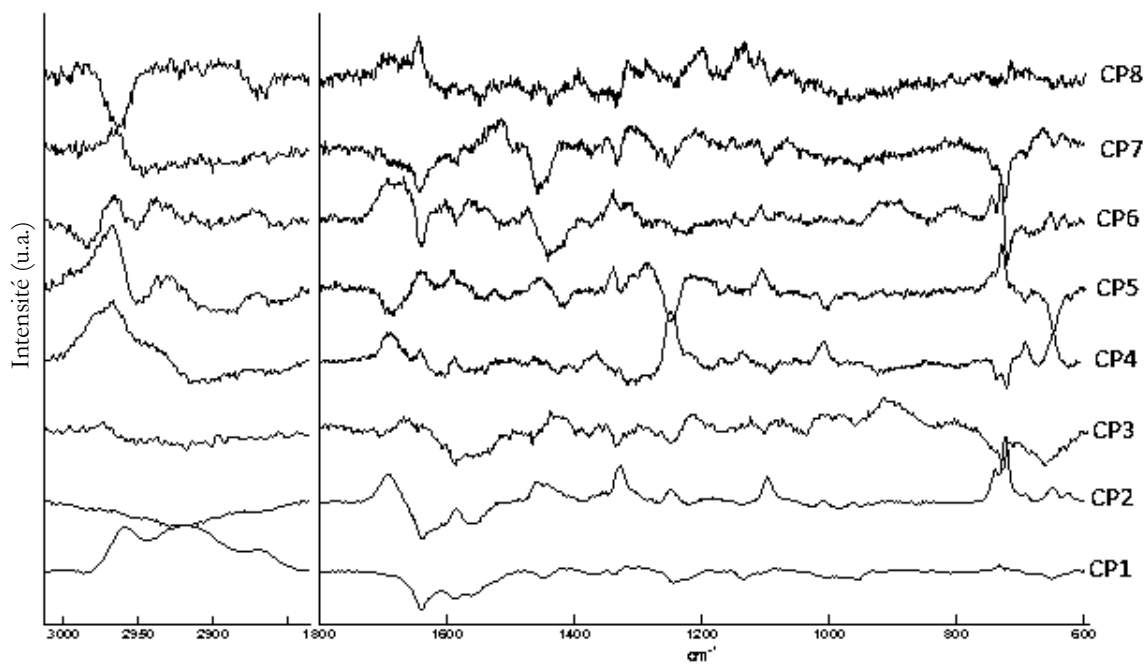


Figure S6 : Représentation graphique des huit premières composantes principales calculées à partir des spectres SERS pour les régions 3013-2834 et 1800-590 cm^{-1} .

Annexe 6 : Représentation graphique des composantes principales calculées dans le cadre de l'étude des LCR pour le diagnostic de la maladie à corps de Lewy

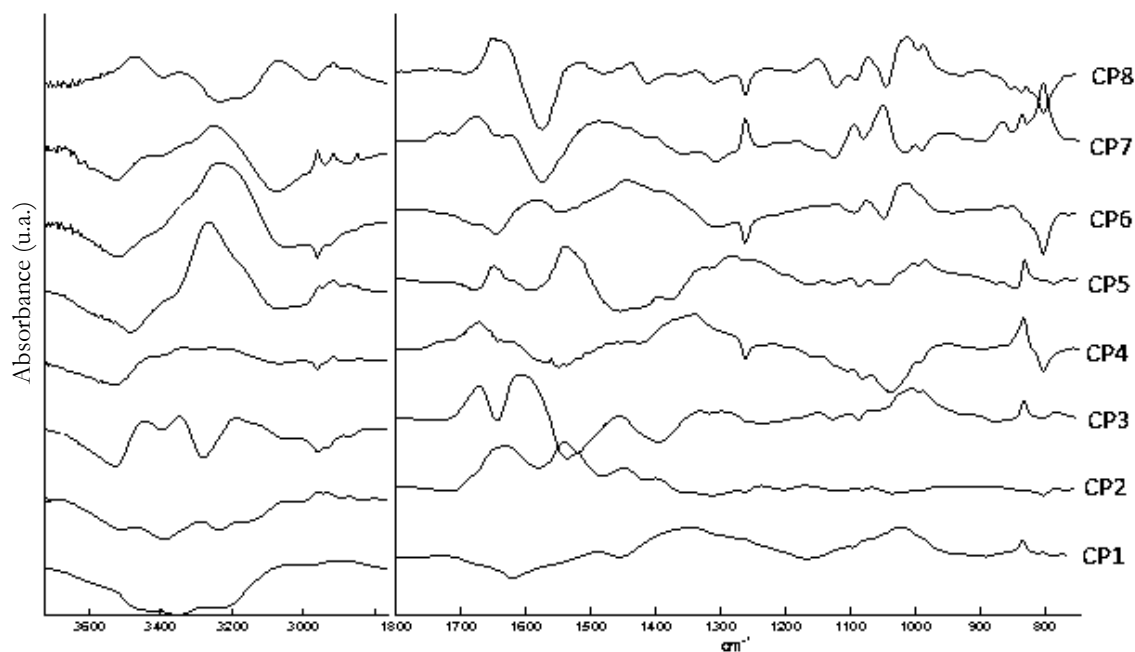


Figure S7 : Représentation graphique des huit premières composantes principales calculées à partir des spectres IR pour les régions 3727-2765 et 1800-740 cm^{-1} .

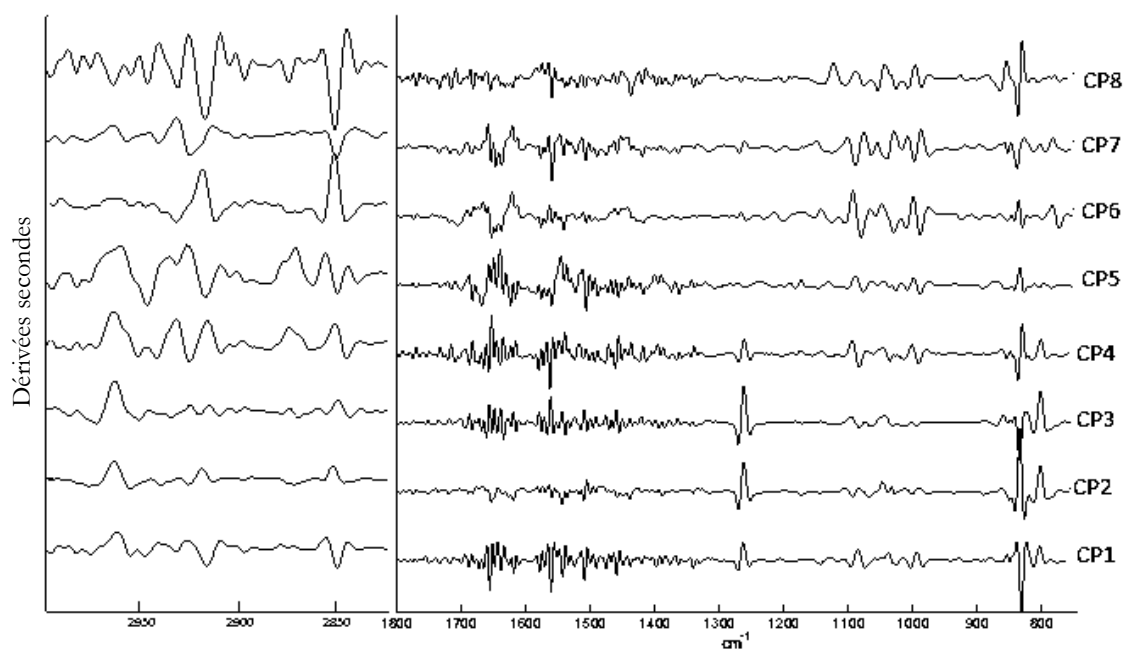


Figure S8 : Représentation graphique des huit premières composantes principales calculées à partir des dérivées secondes des spectres IR pour les régions 2996-2823 et 1800-740 cm^{-1} .

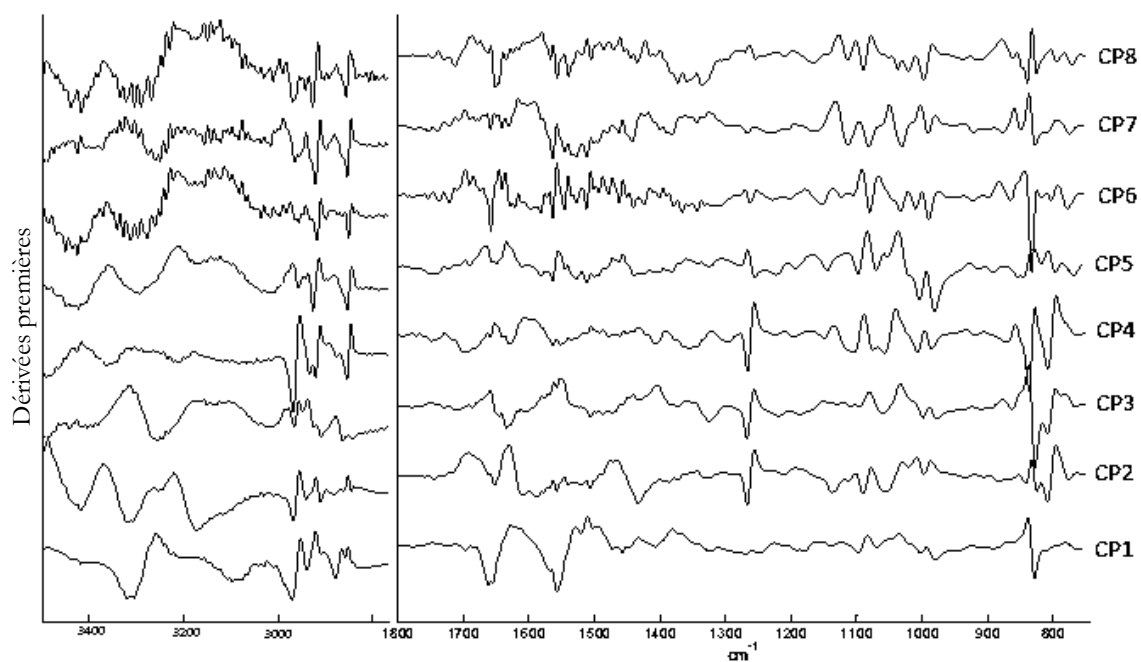


Figure S9 : Représentation graphique des huit premières composantes principales calculées à partir des dérivées premières des spectres IR pour les régions 3500-2765 et 1800-740 cm⁻¹.

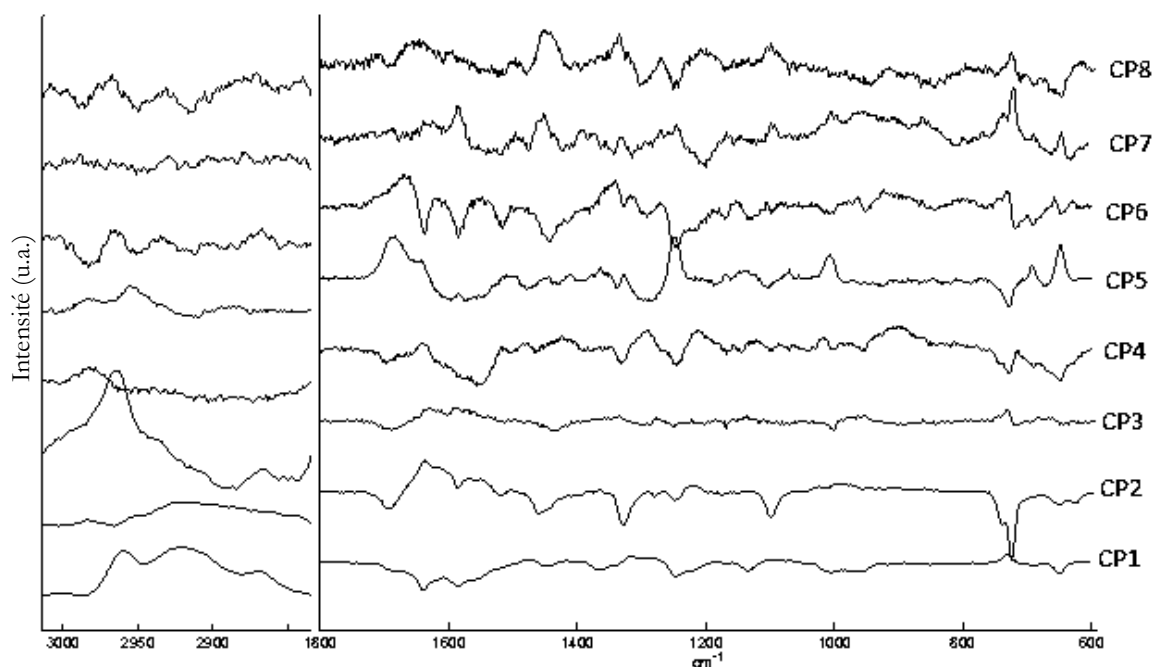


Figure S10 : Représentation graphique des huit premières composantes principales calculées à partir des spectres SERS pour les régions 3013-2834 et 1800-590 cm⁻¹.

Annexe 7 : Représentation graphique des composantes principales calculées dans le cadre de l'étude des LCR pour le diagnostic différentiel entre la maladie d'Alzheimer et la maladie à corps de Lewy

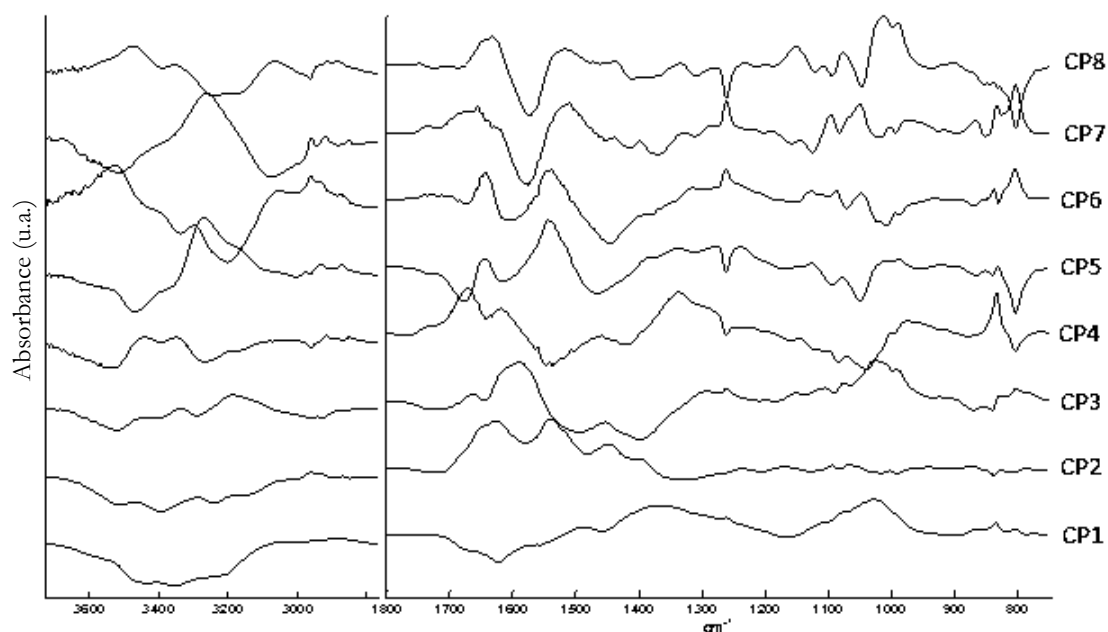


Figure S11 : Représentation graphique des huit premières composantes principales calculées à partir des spectres IR pour les régions 3727-2765 et 1800-740 cm^{-1} .

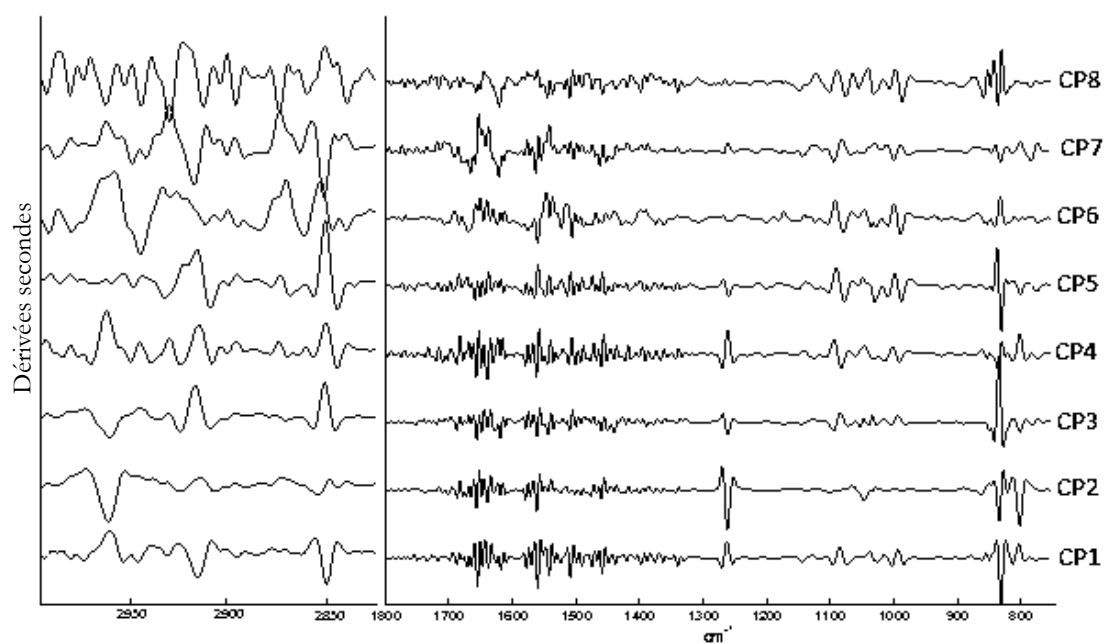


Figure S12 : Représentation graphique des huit premières composantes principales calculées à partir des dérivées secondes des spectres IR pour les régions 2996-2823 et 1800-740 cm^{-1} .

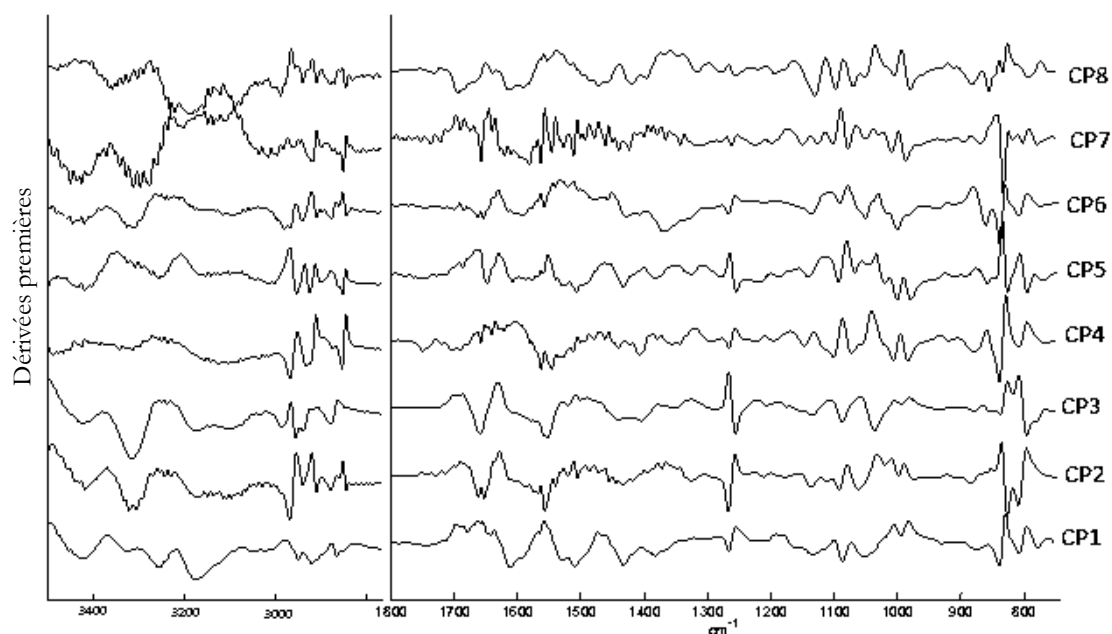


Figure S13 : Représentation graphique des huit premières composantes principales calculées à partir des dérivées premières des spectres IR pour les régions 3500-2765 et 1800-740 cm^{-1} .

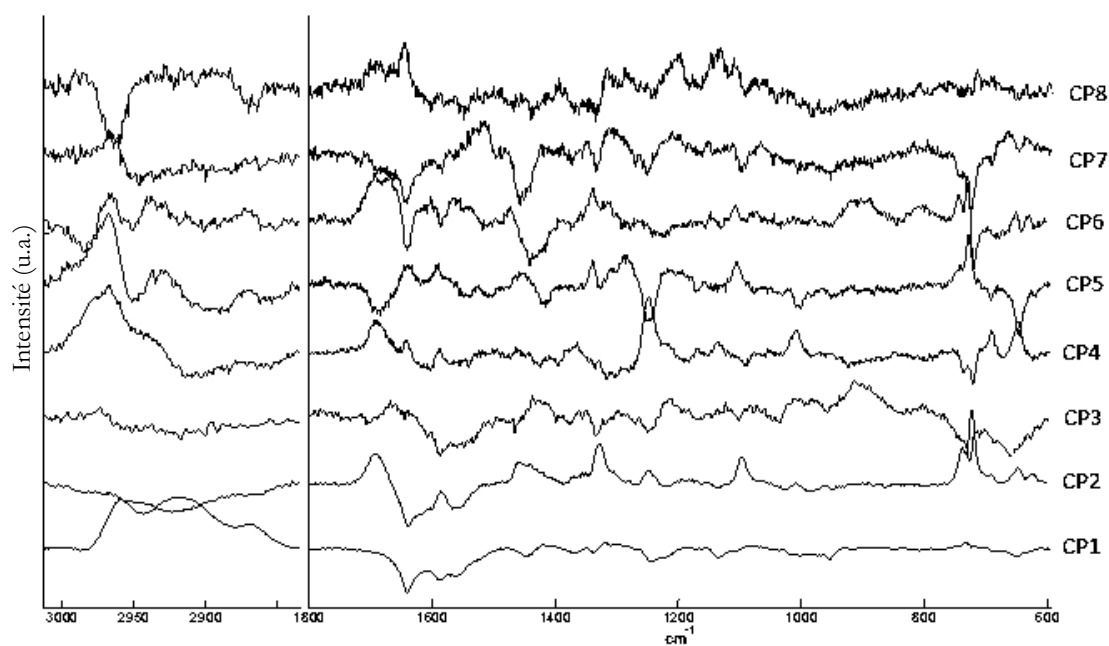


Figure S14 : Représentation graphique des huit premières composantes principales calculées à partir des spectres SERS pour les régions 3013-2834 et 1800-590 cm^{-1} .

Références

Adar, F., Erecinska, M., Spectral evidence for interactions between membrane-bound hemes: Resonance Raman spectra of mitochondrial cytochrome b–c1 complex as a function of redox potential, *FEBS Letters*, 80, 1977, 195-200.

Adlard, P.A., Cherny, R.A., Finkelstein, D.I., Gautier, E., Robb, E., Cortes, M., Volitakis, I., Liu, X., Smith, J.P., Perez, K., Laughton, K., Li, Q.X., Charman, S.A., Nicolazzo, J.A., Wilkins, S., Deleva, K., Lynch, T., Kok, G., Ritchie, C.W., Tanzi, R.E., Cappai, R., Masters, C.L., Barnham, K.J., Bush, A.I., Rapid restoration of cognition in Alzheimer's transgenic mice with 8-hydroxy quinoline analogs is associated with decreased interstitial Abeta, *Neuron*, 59, 2008, 43-55.

Aiken, J.D., Finke, R.G., A review of modern transition-metal nanoclusters: their synthesis, characterization, and applications in catalysis, *J Mol Catal A: Chem*, 145, 1999, 1-44.

Aisen, P.S., Gauthier, S., Vellas, B., Briand, R., Saumier, D., Laurin, J., Garceau, D., Alzhemed: a potential treatment for Alzheimer's disease, *Curr Alzheimer Res*, 4, 2007, 473-478.

Albert, M.S., DeKosky, S.T., Dickson, D., Dubois, B., Feldman, H.H., Fox, N.C., Gamst, A., Holtzman, D.M., Jagust, W.J., Petersen, R.C., Snyder, P.J., Carrillo, M.C., Thies, B., Phelps, C.H., The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 7, 2011, 270-279.

Aleshkov, S., Abraham, C.R., Zannis, .VI., Interaction of nascent ApoE2, ApoE3, and ApoE4 isoforms expressed in mammalian cells with amyloid peptide beta (1-40), Relevance to Alzheimer's disease, *Biochemistry*, 36, 1997, 10571-10580.

Alies, B., Conte-Daban, A., Sayen, S., Collin, F., Kieffer, I., Guillon, E., Faller, P., Hureau, C., Zinc(II) binding site to the amyloid- β peptide: Insights from spectroscopic studies with a wide series of modified peptides, *Inorg Chem*, article ASAP.

Allmond, C.E., Sellinger, A.T., Gogick, K., Fitz-Gerald, J.M., Photo-chemical synthesis and deposition of noble metal nanoparticles, *Appl Phys A*, 86, 2007, 477-480.

Andersson, M., Zetterberg, H., Minthon, L., Blennow, K., Londos, E., The cognitive profile and CSF biomarkers in dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease dementia, *Int J Geriatr Psychiatry*, 26, 2011, 100-105.

- André, W., Sandt, C., Dumas, P., Djian, P., Hoffner, G.**, Structure of inclusions of Huntington's disease brain revealed by synchrotron infrared microspectroscopy: polymorphism and relevance to cytotoxicity, *Anal Chem*, 85, 2013, 3765-3773.
- Andreasen, N., Blennow, K.**, CSF biomarkers for mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease, *Clin Neurol Neurosurg*, 107, 2005, 165-173.
- Andrushchenko, V.V., Vogel, H.J., Prenner, E.J.**, Optimization of the hydrochloric acid concentration used for trifluoroacetate removal from synthetic peptides, *J Pept Sci*, 13, 2007, 37-43.
- Araki, K., Yagi, N., Ikemoto, Y., Yagi, H., Choong, C., Hayakawa, H., Beck, G., Sumi, H., Fujimura, H., Moriwaki, T., Nagai, Y., Mochizuki, H.**, Synchrotron FTIR microspectroscopy for structural analysis of Lewy bodies in the brain of Parkinson's disease patients, *Scientific Reports*, 5, 2015, 17625.
- Arce, F.T., Jang, H., Kagan, B.L., Nussinov, R., Lal, R.**, *Structure-Function Studies of Amyloid Pores in Alzheimer's Disease as a Case Example of Neurodegenerative Diseases*, in *Bio-nanoimaging, Protein misfolding & aggregation*, Ed. Uversky, V.N., Lyubchenko, Y.L., Elsevier, 2014, 397-404.
- Armstrong, R.A.**, A critical analysis of the amyloid cascade hypothesis; *Folia Neuropathol*, 52, 2014, 211-225.
- Arnold, A.P., Stanley, D.M., Collins, J.G.**, Zn²⁺-induced deprotonation of a peptide nitrogen in angiotensin I, *FEBS J*, 289, 1991, 96-98.
- Arriagada, P.V., Growdon, J.H., Hedley-Whyte, E.T., Hyman, B.T.**, Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease, *Neurology*, 1992, 42, 631-639.
- Arrondo, J.L., Muga, A., Castresana, J., Goni, F.M.**, Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy, *Prog Biophys Mol Biol*, 59, 1993, 23-56.
- Ashikawa, I., Itoh, K.**, Raman spectra of polypeptides containing L-histidine residues and tautomerism of imidazole side chain, *Biopolymers*, 18, 1979, 1859-1876.
- Askarova, S., Xiaoguang, Y., Lee, J.C.M.**, Impacts of Membrane Biophysics in Alzheimer's Disease: From Amyloid Precursor Protein Processing to A β Peptide-Induced Membrane Changes, *Int J Alzheimers Dis*, 2011, 2011, 12 pages.
- Atamna, H.**, Heme binding to Amyloid-beta peptide: mechanistic role in Alzheimer's disease, *J Alzheimers Dis*, 10, 2006, 255-266.
- Atamna, H., Boyle, K.**, Amyloid- β peptide binds with heme to form a peroxidase: Relationship to the cytopathologies of Alzheimer's disease, *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 2006, 3381-3386.

Atamna, H., Frey II, W. H., A role for heme in Alzheimer's disease: Heme binds amyloid β and has altered metabolism, *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 2004, 11153-11158.

Atwood, C.S., Moir, R.D., Huang, X., Scarpa, R.C., Bacarra, N.M., Romano, D.M., Hartshorn, M.A., Tanzi, R.E., Bush, A.I., Dramatic aggregation of Alzheimer abeta by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis, *J Biol Chem*, 273, 1998, 12817-12826.

Atwood, C.S., Perry, G., Zeng, H., Kato, Y., Jones, W.D., Ling, K.Q., Huang, X., Moir, R.D., Wang, D., Sayre, L.M., Smith, M.A., Chen, S.G., Bush, A.I., Copper mediates dityrosine cross-linking of Alzheimer's amyloid-beta, *Biochemistry*, 43, 2004, 560-568.

Baruch-Suchodolsky, R., Fischer, B., Abeta40, either soluble or aggregated, is a remarkably potent antioxidant in cell-free oxidative systems, *Biochemistry*, 48, 2009, 4354-4370.

Baldassarre, M., Chenge, L., Eremina, N., Goormaghtigh, E., Barth, A., Simultaneous fitting of absorption spectra and their second derivatives for an improved analysis of protein infrared spectra, *Molecules*, 20, 2015, 12599-12622.

Barnham, K.J., Ciccotosto, G.D., Tickler, A.K., Ali, F.E., Smith, D.G., Williamson, N.A., Lam, Y.H., Carrington, D., Tew, D., Kocak, G., Volitakis, I., Separovic, F., Barrow, C.J., Wade, J.D., Masters, C.L., Cherny, R.A., Curtain, C.C., Bush, A.I., Cappai, R., Neurotoxic, redox-competent Alzheimer's beta-amyloid is released from lipid membrane by methionine oxidation, *J Biol Chem*, 278, 2003, 42959-42965.

Barrow, C.J., Yasuda, A., Kenny, P.T., Zagorski, M.G., Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid beta-peptides of Alzheimer's disease. Analysis of circular dichroism spectra, *J Mol Biol*, 225, 1992, 1075-1093.

Barth, A., The infrared absorption of amino acids side chains, *Prog Biophys Mol Biol*, 74, 2000, 141-173.

Barth, A., Infrared spectroscopy of proteins, *Biochim Biophys Acta*, 1767, 2007, 1073-1101.

Becker, J.S., Zoriy, M.V., Pickhardt, C., Palomero-Gallagher, N., Zilles, K., Imaging of copper, zinc, and other elements in thin section of human brain samples (hippocampus) by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal Chem*, 77, 2005, 3208-3216.

Beel, A.J., Mobley, C.K., Kim, H.J., Tian, F., Hadziselimovic, A., Jap, B., Prestegard, J.H., Sanders, C.R., Structural studies of the transmembrane C-terminal domain of the amyloid precursor protein (APP): does APP function as a cholesterol sensor?, *Biochemistry*, 47, 2008, 9428-9446.

Benard, A., IR imaging in breast cancer: from histopathological recognition to characterization of tumour microenvironment, Thèse de l'université libre de Bruxelles, 2012.

- Benard, A., Desmedt, C., Smolina, M., Szternfeld, P., Verdonck, M., Rouas, G., Kheddoumi, N., Rothé, F., Larsimont, D., Sotiriou, C., Goormaghtigh, E.**, Infrared imaging in breast cancer: automated tissue component recognition and spectral characterization of breast cancer cells as well as the tumor microenvironment, *Analyst*, 139, 2014, 1044-1056.
- Benard, A., Goormaghtigh, E.**, *Discrimination of breast tissue structures by FTIR FPA imaging*, in *Vibrational spectroscopy in diagnosis and screening*, Ed. Severcan, F., Haris, P.I., IOS Press, 2012, 195-211.
- Bendor, J., Logan, T., Edwards, R.H.**, The Function of α -Synuclein, *Neuron*, 79, 2013, 43 pages.
- Benseny-Cases, N., Klementieva, O., Cotte, M., Ferrer, I., Cladera, J.**, Microspectroscopy (μ FTIR) Reveals Co-localization of Lipid Oxidation and Amyloid Plaques in Human Alzheimer Disease Brains, *Anal Chem*, 86, 2014, 12047-12054.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L.**, *Biochemistry, Fifth edition*, W.H. Freeman, New York, 2002, 1100 pages.
- Berridge, M.J.**, Calcium hypothesis of Alzheimer's disease, *Pflüg Arch Eur J Phys*, 459, 2010, 441-449.
- Berthelot, K., Cullin, C., Lecomte, S.**, What does make an amyloid toxic: Morphology, structure or interaction with membrane?, *Biochimie*, 95, 2013, 12-19.
- Bhat, R.V., Budd Haerberlein, S.L., Avila, J.**, Glycogen synthase kinase 3: a drug target for Cns therapies, *J neurochem*, 89, 2004, 1313-1317.
- Biancalana, M., Koide, S.**, Molecular mechanism of thioflavin-T binding to amyloid fibrils, *Biochim Biophys Acta*, 1804, 2010, 1405-1412.
- Birks, J.**, Cholinesterase inhibitors for alzheimer's disease, *Cochrane Database Syst Rev*, 2006.
- Bittner, S., Afzali, A.M., Wiendl, H., Meuth, S.G.**, Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG₃₅₋₅₅) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice, *J Vis Exp*, 86, 2014, e51275.
- Blake, C., Serpell, L.**, Synchrotron X-ray studies suggest that the core of the transthyretin amyloid fibril is a continuous β -sheet helix, *Structure*, 4, 1996, 989-998.
- Blennow, K.**, Cerebrospinal fluid protein biomarkers for alzheimer's disease, *NeuroRx*, 1, 2004, 213-225.
- Blennow, K., Hampel, H.**, CSF markers for incipient Alzheimer's disease, *Lancet Neurol*, 2, 2003, 605-613.
- Blin, C.**, Traitement de la sclérose en plaques par le Natalizumab: bilan d'utilisation et évaluation de la qualité de vie au CHU de Nancy, Thèse de l'université de Lorraine, 2011.

- Bocklitz, T., Walter, A., Hartmann, K., Rösch, P., Popp, J.**, How to pre-process Raman spectra for reliable and stable models?, *Anal. Chim Acta*, 704, 2011, 47–56.
- Bokvist, M., Lindström, F., Watts, A., Gröbner, G.**, Two Types of Alzheimer's b-Amyloid (1–40) Peptide Membrane Interactions: Aggregation Preventing Transmembrane Anchoring Versus Accelerated Surface Fibril Formation, *J Mol Biol*, 335, 2004, 1039-1049.
- Bouchard, M., Zurdo, J., Nettleton, E.J., Dobson, C.M., Robinson, C.V.**, Formation of insulin amyloid fibrils followed by FTIR simultaneously with CD and electron microscopy, *Protein Sci*, 9, 2000, 1960-1967.
- Bousejra-ElGarah, F., Bijani, C., Coppel, Y., Faller, P., Hureau, C.**, Iron(II) Binding to Amyloid- β , the Alzheimer's Peptide, *Inorg Chem*, 50, 2011, 9024-9030.
- Bousiges, O., Cretin, B., Lavaux, T., Philippi, N., Jung, B., Hezard, S., Heitz, C., Demuynck, C., Gabel, A., Martin-Hunyadi, C., Blanc, F.**, Diagnostic Value of Cerebrospinal Fluid Biomarkers (Phospho-Tau181, total-Tau, A42, and A40) in Prodromal Stage of Alzheimer's Disease and Dementia with Lewy Bodies, *J Alzheimers Dis*, 51, 2016, 1069-1083.
- Bouwman, F.H., Schoonenboom, N.S., Verwey, N.A., van Elk, E.J., Kok, A., Blankenstein, M.A., Scheltens, P., van der Flier, W.M.**, CSF biomarker levels in early and late onset Alzheimer's disease, *Neurobiol Aging*, 30, 2009, 1895-1901.
- Brion, J.P.**, Neurofibrillary tangles and Alzheimer's disease, *Eur Neurol*, 40, 1998, 130-140.
- Bryngelson, J.D., Onuchic, J.N., Socci, N.D., Wolynes, P.G.**, Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: a synthesis, *Proteins*, 21, 1995, 167-195.
- Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C.M., Stefani, M.**, Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases, *Nature*, 416, 2002, 507-511.
- Bucciantini, M., Rigacci, S., Stefani, M.**, Amyloid Aggregation: Role of Biological Membranes and the Aggregate–Membrane System, *J Phys Chem Letter*, 5, 2014, 517-527.
- Buée, L., Bussièrè, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., Hof, P.R.**, Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders, *Brain Res*, 33, 2000, 95-130.
- Bull World Health**, The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), 54, 1976, 129-139.
- Bürger née Buch, K., Padberg, F., Nolde, T., Teipel, S.J., Stübner, S., Haslinger, A., Schwarz, M.J., Sunderland, T., Arai, H., Rapoport, S.I., Möller, H.J., Hampel, H.**, Cerebrospinal fluid tau protein shows a better discrimination in young old (<70 years) than in old old patients with Alzheimer's disease compared with controls, *Neurosci Lett*, 17, 1999, 21-24.

- Burns, D.H., Rosendahl, S., Bandilla, D., Maes, O.C., Chertkow, H.M., Schipper, H.M.,** Near-infrared spectroscopy of blood plasma for diagnosis of sporadic Alzheimer's disease, *J Alzheimers Dis*, 17, 2009, 391-397.
- Bush, A.I., Tanzi, R.E.,** Therapeutics for Alzheimer's disease based on the metal hypothesis, *Neurotherapeutics*, 5, 2008, 421-432.
- Cárdenas-Aguayo, M. d. C., Silva-Lucero, M. d. C., Cortes-Ortiz, M., Jiménez-Ramos, B., Gómez-Virgilio, L., Ramírez-Rodríguez, G., Meraz-Ríos, M.,** Physiological Role of Amyloid Beta in Neural Cells: The Cellular Trophic Activity, *InTech*, 2014.
- Carmona, P., Molina, M., Calero, M., Bermejo-Pareja, F., Martinez-Martin, P., Toledano, A.,** Discrimination analysis of blood plasma associated with Alzheimer's disease using vibrational spectroscopy, *J Alzheimers Dis*, 34, 2013, 911-920.
- Carson, J.A., Turner, A.J.,** Beta-amyloid catabolism: roles for neprylisin (NEP) and other metallopeptidases?, *J Neurochem*, 81, 2002, 1-8.
- Castellani, R.J., Rolston, R.K., Smith, M.A.,** Alzheimer disease, *Dis Mon*, 56, 2010, 484-546.
- Cecchi, C., Nichino, D., Zampagni, M., Bernacchioni, C., Evangelisti, E., Pensalfini, A., Liguri, G., Gliozzi, A., Stefani, M., Relini, A.,** A protective role for lipid raft cholesterol against amyloid-induced membrane damage in human neuroblastoma cells, *Biochim Biophys Acta*, 1788, 2009, 2204-2216.
- Cecchi, C., Rosati, F., Pensalfini, A., Formigli, L., Nosi, D., Liguri, G., Dichiara, F., Morello, M., Danza, G., Pieraccini, G., Peri, A., Serio, M., Stefani, M.,** Seladin-1/DHCR24 protects neuroblastoma cells against A β toxicity by increasing membrane cholesterol content, *J Cell Mol Med*, 12, 2008, 1990-2002.
- Celej, M.S., Sarroukh, R., Goormaghtigh, E., Fidelio, G.D., Ruyschaert, J.M., Raussens, V.,** Toxic prefibrillar α -synuclein amyloid oligomers adopt a distinctive antiparallel β -sheet structure, *Biochem J*, 443, 2012, 719-726.
- Cerf, E., Sarroukh, R., Tamamizu-Kato, S., Breydo, L., Derclaye, S., Dufrene, Y.F., Narayanaswami, V., Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J.M., Raussens, V.,** Antiparallel beta-sheet: a signature structure of the oligomeric amyloid beta-peptide, *Biochem J*, 421, 2009, 415-423.
- Chalmers, J.M.,** *Mid-infrared Spectroscopy: The basics*, in *Biomedical Applications of Synchrotron Infrared Spectroscopy*, ed. Moss D., The royal Society of Chemistry, Cambridge, 2011, 29-66.
- Chalmers, J.M., Dent, G.,** *Vibrational Spectroscopic Methods in Pharmaceutical Solid-state Characterization*, in *Polymorphism in the Pharmaceutical Industry*, ed. Hilfiker R., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim, 2006, 95-138.

- Checler, F.**, *Neuropeptide degrading peptidases*, in *Methods in neurotransmitters and neuropeptides research*, ed. Nagatsu, T., Parvez, H., Naoi, M., Parvez, S., Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1993, 375-418.
- Chen, M., Margittai, M., Chen, J., Langen, R.**, Investigation of alpha-synuclein fibril structure by site-directed spin labeling, *J Biol Chem*, 282, 2007, 24970-24979.
- Chen, P., Shen, A., Zhao, W., Baek, S.J., Yuan, H., Hu, J.**, Raman signature from brain hippocampus could aid Alzheimer's disease diagnosis, *Appl Opt*, 48, 2009, 4743-4748.
- Choo, L.P., Jackson, M., Halliday, W.C., Mantsch, H.H.**, Infrared spectroscopic characterisation of multiple sclerosis plaques in the human central nervous system, *Biochim Biophys Acta*, 1182, 1993, 333-337.
- Choo, L.P., Mansfield, J.R., Pizzi, N., Somorjai, R.L., Jackson, M., Halliday, W.C., Mantsch, H.H.**, Infrared spectra of human central nervous system tissue: Diagnosis of Alzheimer's disease by multivariate analyses, *Biospectroscopy*, 1, 1995, 141-148.
- Choo, L.P., Wetzel, D.L., Halliday, W.C., Jackson, M., LeVine, S.M., Mantsch, H.H.**, In situ characterization of beta-amyloid in Alzheimer's diseased tissue by synchrotron Fourier transform infrared microspectroscopy, *Biophys J*, 71, 1996, 1672-1679.
- Choo-Smith, L.P., Garzon-Rodriguez, W., Glabe, C.G., Surewicz, W.K.**, Acceleration of amyloid fibril formation by specific binding of Aβ(1-40) peptide to ganglioside-containing membrane vesicles, *J Biol Chem*, 272, 1997, 22987-22990.
- Chou, I.H., Benford, M., Beier, H.T., Coté, G.L.**, Nanofluidic Biosensing for β-amyloid Detection Using Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS), *Nano Lett*, 8, 2008, 1729-1735.
- Chow, V.W., Mattson, M.P., Wong, P.C., Gleichmann, M.**, An overview of APP processing enzymes and products, *Neuromolecular Med*, 12, 2010, 1-12.
- Citron, M.**, Beta-secretase inhibition for the treatment of Alzheimer's disease--promise and challenge, *Trends Pharmacol Sci*, 25, 2004, 92-97.
- Cleary, J.P., Walsh, D.M., Hofmeister, J.J., Shankar, G.M., Kuskowski, M.A., Selkoe, D.J., Ashe, K.H.**, Natural oligomers of the amyloid-β protein specifically disrupt cognitive function, *Nature*, 8, 2004, 79-84.
- Colagar, A.H., Chaichi, M.J., Khadjvand, T.**, Fourier transform infrared microspectroscopy as a diagnostic tool for distinguishing between normal and malignant human gastric tissue, *J Biosci*, 36, 2011, 669-677.
- Colurso, G.J., Nilson, J.E., Vervoort, L.G.**, Quantitative assessment of DNA fragmentation and beta-amyloid deposition in insular cortex and midfrontal gyrus from patients with Alzheimer's disease, *Life Sci*, 73, 2003, 1795-1803.

- Compston, A.**, *The story of multiple sclerosis*, in *McAlpine's Multiple sclerosis*, Ed. Compston, A., Confavreux, C., Lassmann, H., McDonald, I., Miller, D., Noseworthy, J., Smith, K., Wekerle, H., Elsevier, 2006, 3-68.
- Consensus report of the working group on « molecular and biochemical markers of Alzheimer's disease »**, The Ronald and Nancy Reagan research institute of the Alzheimer's association and the National institute on aging working group, *Neurobiol Aging*, 19, 1998, 109-116.
- Creighton, J.A., Blatchford, C.G., Albrecht, M.G.**, Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength, *J.Chem.Soc Faraday Trans 2 Mol Chem Phys*, 75, 1979, 790-798.
- Crews, L., Spencer, B., Masliah, E.**, *Immunotherapy Strategies for Lewy Body and Parkinson's Diseases*, in *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, Ed. Lajtha, A., Banik, N., Ray, S.K, Springer, 2009, 599-613.
- Cuervo, A.M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P.T., Sulzer, D.**, Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy, *Science*, 305, 2004, 1292-1295.
- Curtain, C.C., Ali, F.E, Volitakis, I., Cherny, R.A., Norton, R.S., Beyreuther, K., Barrow, C.J., Masters, C.L., Bush, A.I., Barnham, K.J.**, Alzheimer's disease amyloid-beta binds copper and zinc to generate an allosterically ordered membrane-penetrating structure containing superoxide dismutase-like subunits, *J Biol Chem*, 276, 2001, 20466-20473.
- Curtain, C.C., Ali, F.E., Smith, D.G., Bush, A.I., Masters, C.L., Barnham, K.J.**, Metal Ions, pH, and Cholesterol Regulate the Interactions of Alzheimer's Disease Amyloid- β Peptide with Membrane Lipid, *J Biol Chem*, 278, 2003, 2977-2982.
- Cushing, B.L., Kolesnichenko, V.L., O'Connor, C.J.**, Recent advances in the liquid-phase syntheses of inorganic nanoparticles, *Chem Rev*, 104, 2004, 3893-3946.
- Daignault, S.A., Arnold, A.P., Isab, A.A., Rabenstein, D.L.**, Nuclear magnetic resonance studies of the solution chemistry of metal complexes. 22. Complexation of zinc by the growth-modulating tripeptide glycylhistidyllysine, *Inorg Chem*, 24, 1985, 3984-3988.
- Dansokho, C., Ait, A.D, Aid, S., Toly-Ndour, C., Chaigneau, T., Calle, V., Cagnard, N., Holzenberger, M., Piaggio, E., Aucouturier, P., Dorothée, G.**, Regulatory T cells delay disease progression in Alzheimer-like pathology, *Brain*, 139, 2016.
- Danzer, K.M., Haasen, D., Karow, A.R., Moussaud, S., Habeck, M., Giese, A., Kretzschmar, H., Hengerer, B., Kostka, M.**, Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding, *J Neurosci*, 27, 2007, 9220-9232.
- Davidson, W.S., Jonas, A., Clayton, D.F., George, J.M.**, Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes, *J Biol Chem*, 271, 1998, 9443-9449.

- Davis, D. G., Schmitt, F. A., Wekstein, D. R., Markesbery, W. R.**, Alzheimer neuropathologic alterations in aged cognitively normal subjects, *J Neuropathol Exp Neurol*, 58, 1999, 376-388.
- Demuro, A., Smith, M., Parker, I.**, Single-channel Ca^{2+} imaging implicates $\text{A}\beta_{1-42}$ amyloid pores in Alzheimer's disease pathology, *J Cell Biol*, 195, 2011, 515-524.
- Deramecourt, V., Bombois, S., Maurage, C.A., Ghestem, A., Drobecq, H., Vanmechelen, E., Lebert, F., Pasquier, F., Delacourte, A.**, Biochemical staging of synucleinopathy and amyloid deposition in dementia with Lewy bodies, *J Neuropathol Exp Neurol*, 65, 2006, 278-288.
- De strooper, B.**, Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma secretase complex, *Neuron*, 38, 2003, 9-12.
- De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J.S., Schroeter, E.H., Schrijvers, V., Wolfe, M.S., Ray, W.J., Goate, A., Kopan, R.**, A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain, *Nature*, 398, 1999, 518-522.
- De Strooper, B., Vassar, R., Golde, T.**, The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease, *Nat Rev Neurol*, 6, 2010, 99-107.
- Dickson, D.W.**, Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: cause or effect?, *J Clin Invest*, 114, 2004, 23-27.
- Diem, K., Lentner, C.**, *Tables scientifiques*, 7ème edition, Ciba-Geigy SA, Bâle, 1973, 646-651.
- Dong, A., Huang, P., Caughey, W.S.**, Protein secondary structure in water from second derivative amide I infrared spectra, *Biochemistry*, 29, 1990, 3303-3308.
- Dong, J., Atwood, C.S., Anderson, V.E., Siedlak, S.L., Smith, M.A., Perry, G., Carey, P.R.**, Metal binding and oxidation of amyloid-beta within isolated senile plaques core: Raman microscopic evidence, *Biochemistry*, 42, 2003, 2768-2773.
- Dong, S., Duan, Y., Hu, Y., Zhao, Z.**, Advances in the pathogenesis of Alzheimer's disease: a re-evaluation of amyloid cascade hypothesis, *Transl Neurodegener*, 1, 2012, 1-18.
- Dorlet, P., Gambarelli, S., Faller, P., Hureau, C.**, Pulse EPR spectroscopy reveals the coordination sphere of copper(II) ions in the 1-16 amyloid-beta peptide: a key role of the first two N-terminus residues, *Angew Chem Int Ed Engl*, 48, 2009, 9273-9276.
- Dörr, S., Schade, U., Hellwig, P.**, Far infrared spectroscopy on hemoproteins: A model compound study from 1800-100 cm^{-1} , *Vib Spectrosc*, 47, 2008, 59-65.
- Dousseau, F., Pezolet, M.**, Determination of the secondary structure content of proteins in aqueous solutions from their amide I and amide II infrared bands. Comparison between classical and partial least-squares methods, *Biochemistry*, 29, 1990, 8771-8779.

- Drew, S.C., Noble, C.J., Masters, C.L., Hanson, G.R., Barnham, K.J., Pleomorphic copper coordination by Alzheimer's disease amyloid- β peptide, *J Am Chem Soc*, 131, 2009, 1195-1207.
- Dubois, B., Feldman, H.H., Jacova, C., Dekosky, S.T., Barberger-Gateau, P., Cummings, J., Delacourte, A., Galasko, D., Gauthier, S., Jicha, G., Meguro, K., O'Brien, J., Pasquier, F., Robert, P., Rossor, M., Salloway, S., Stern, Y., Visser, P.J., Scheltens, P., Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: Revising the NINCDS-ADRDA criteria, *Lancet Neurol*, 6, 2007, 734-746.
- Ege, C., Majewski, J., Wu, G., Kjaer, K., Lee, K.Y., Templating effect of lipid membranes on Alzheimer's amyloid beta peptide, *Chemphyschem*, 6, 2005, 226-229.
- Ehehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C., Simons, K., Amyloidogenic processing of the Alzheimer β -amyloid precursor protein depends on lipid rafts, *J Cell Biol*, 160, 2003, 113-123.
- El Khoury, Y., Dorlet, P., Faller, P., Hellwig, P., New insights into the coordination of Cu(II) by the amyloid-B 16 peptide from Fourier transform IR spectroscopy and isotopic labeling, *J Phys Chem B*, 115, 2011, 14812-14821.
- Erukhimovitch, E., Talyshinsky, M., Souprun, Y., Huleihel, M., FTIR spectroscopy examination of leukemia patients plasma, *Vib Spectrosc*, 40, 2006, 40-46.
- Esbensen, K.H., *Multivariate data analysis-in practice*, 5th edition, Camo, 2004.
- Etcheberrigaray, R., Tan, M., Dewatchter, I., Kuipéri, C., Van der Auwera, I., Wera, S., Qiao, L., Bank, B., Nelson, T.J., Kozikowski, A.P., Van Leuven, F., Alkon, D.L., Therapeutic effects of PKC activators in Alzheimer's disease transgenic mice, *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 2004, 1141-1146.
- Etienne, M.A., Edwin, N.J., Aucoin, J.P., Russo, P.S., McCarley, R.L., Hammer, R.P., Beta-amyloid protein aggregation, *Methods Mol Biol*, 386, 2007, 203-225.
- Fabian, H., Mantele, W., *Infrared spectroscopy of proteins*, in *Handbook of vibrational spectroscopy*, Ed. Chalmers, J.M, Griffiths, P.R., Wiley, 2006.
- Faller, P., Hureau, C., Bioinorganic chemistry of copper and zinc ions coordinated to amyloid-b peptide, *Dalton Trans*, 2009, 1080-1094.
- Faller, P., Hureau, C., La Penna, G., Metal Ions and Intrinsically Disordered Proteins and Peptides: From Cu/Zn Amyloid- β to General Principles, *Acc Chem Res*, 47, 2014, 2252-2259.
- Fändrich, M., On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates, *Cell Mol Life Sci*, 64, 2007, 2066-2078.
- Fantini, J., Garmy, N., Mahfoud, R., Yahi, N., Lipid rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimer's and prion diseases, *Expert Rev Mol Med*, 4, 2002, 1-22.

- Fantini, J., Yahi, N., Garmy, N.**, Cholesterol accelerates the binding of Alzheimer's β -amyloid peptide to ganglioside GM1 through a universal hydrogen-bond-dependent sterol tuning of glycolipid conformation, *Front Physiol*, 4, 2013, 10 pages.
- Feldman, H.H., Woodward, M.D.**, The staging and assessment of moderate to severe Alzheimer disease, *Neurology*, 65, 2005, S10-17.
- Feng, S., Chen, R., Lin, J., Pan, J., Chen, G., Li, Y., Cheng, M., Huang, Z., Chen, J., Zeng, H.**, Nasopharyngeal cancer detection based on blood plasma surface-enhanced Raman spectroscopy and multivariate analysis, *Biosens Bioelectron*, 25, 2010, 2414-2419.
- Feng, S., Chen, R., Lin, J., Pan, J., Wu, Y., Li, Y., Chen, J., Zeng, H.**, Gastric cancer detection based on blood plasma surface-enhanced Raman spectroscopy excited by polarized laser light, *Biosens Bioelectron*, 26, 2011, 3167-3174.
- Feng, Y., Wang, X.**, Antioxidant Therapies for Alzheimer's Disease, *Oxid Med Cell Longev*, 2012, 2012, 17 pages.
- Fezoui, Y., Hartley, D.M., Harper, J.D., Khurana, R., Walsh, D.M., Condrón, M.M., Selkoe, D.J., Lansbury, P.T., Fink, A.L., Teplow, D.B.**, An improved method of preparing the amyloid β -protein for fibrillogenesis and neurotoxicity experiments, *Amyloid*, 7, 2000, 166-178.
- Fischer, P.H.H., McDowell, C.A.**, The infrared spectra of urea-hydrocarbon adducts, *Can J Chem*, 38, 1960, 187-193.
- Fitzpatrick, A.W.P., Delouchina, G.T., Bayro, M.J., Clare, D.K., Caporini, M.A., Baja, V.S., Jaroniec, C.P., Wang, L., Ladizhansky, V., Müller, S.A., MacPhee, C.E., Waudby, C.A., Mott, H.R., De Simone, A., Knowles, T.P.J., Saibil, H.R., Vendruscolo, M., Orlova, E.V., Griffin, R.G., Dobson, C.M.**, Atomic structure and hierarchical assembly of a cross- β amyloid fibril, *Proc Natl Acad Sci USA*, 110, 2013, 5468-5473.
- Fortin, D.L., Troyer, M.D., Nakamura, K., Kubo, S., Anthony, M.D., Edwards, R.H.**, Lipid rafts mediate the synaptic localization of alpha-synuclein, *J Neurosci*, 24, 2004, 6715-6723.
- Frederickson, C.J., Koh, J.Y., Bush, A.I.**, The neurobiology of zinc in health and disease, *Nat Rev Neurosci*, 6, 2005, 449-462.
- Frohman, E.M., Racke, M.K., Raine, C.S.**, Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis, *N Engl J Med*, 354, 2006, 942-955.
- Fromont, A., Binquet, C., Sauleau, E.A., Fournel, I., Bellisario, A., Adnet, J., Weill, A., Vukusic, S., Confavreux, C., Debouverie, M., Clerc, L., Bonithon-Kopp, C., Moreau, T.**, Geographic variations of multiple sclerosis in France, *Brain*, 133, 2010, 1889-1899.

- Fu, Y., Frederick, T.J., Huff, T.B., Goings, G.E., Miller, S.D., Cheng, J.X.**, Paranodal myelin retraction in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis visualized by coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy, *J Biomed Opt*, 16, 2011, 106006.
- Gaigneaux, A.**, Determination of diagnostic and prognostic markers in varied tumoral pathologies by ATR-FTIR spectroscopy, thèse de l'université libre de Bruxelles, 2004.
- Gautam, R., Vanga, S., Ariese, F., Umapathy, S.**, Review of multidimensional data processing approaches for Raman and infrared spectroscopy, *EPJ Tech Instrum*, 2, 2015, 38 pages.
- Gaydou, V., Lecellier, A., Toubas, D., Mounier, J., Castrec, L., Barbier, G., Ablain, W., Manfait, M., Sockalingum, G.D.**, Assessing the discrimination potential of linear and non-linear supervised chemometric methods on a filamentous fungi FTIR spectral database, *Anal Methods*, 7, 2015, 766-778.
- Gazi, E., Gardner, P.**, *Preparation of tissues and cells for infrared and Raman spectroscopy and imaging*, in *Vibrational spectroscopic imaging for biomedical applications*, ed. Srinivasan, G., The McGraw-Hill Companies, 2010, 59-98.
- Gella, A., Durany, N.**, Oxidative stress in Alzheimer disease, *Cell Adh Migr*, 3, 2009, 88-93.
- Gervais, F., Paquette, J., Morissette, C., Krzywkowski, P., Yu, M.**, Targeting soluble A β peptide with tramiprosate for the treatment of brain amyloidosis, *Neurobiol of Aging*, 28, 2006, 537-547.
- Ghosh, C., Manas, S., Mukherjee, S., Dey, S.G.**, Alzheimer's Disease: A Heme-A β Perspective, *Acc Chem Res*, 48, 2015, 2556-2564.
- Ghosh, S.K., Pal, A., Kundu, S., Nath, S., Pal, T.**, Fluorescence quenching of 1-methylaminopyrene near gold nanoparticles: size regime dependence of the small metallic particles, *Chemical Physics Letters*, 395, 2004, 366-372.
- Giasson, B.I., Murray, I.V., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.**, A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly, *J Biol Chem*, 276, 2001, 2380-2386.
- Glenner, G.G., Wong, C.W.**, Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein, *Biochem Biophys Res Commun*, 120, 1984, 885-890.
- Godyn, J., Jonczyk, J., Panek, D., Malawska, B.**, Therapeutic strategies for alzheimer's disease in clinical trials, *Pharmacol Rep*, 68, 2016, 127-138.
- Golde, T.E., Koo, E.H., Felsenstein, K.M., Osborne, B.A., Miele, L.**, Gamma-secretase inhibitors and modulators, *Biochim Biophys Acta*, 1828, 2013, 2898-2907.

- Gomez-Tortosa, E., Newell, K., Irizarry, M.C., Sanders, J.L., Hyman, B.T.,** Alpha-Synuclein immunoreactivity in dementia with Lewy bodies: morphological staging and comparison with ubiquitin immunostaining, *Acta Neuropathol*, 99, 2000, 352-357.
- Gracie, K., Correa, E., Mabbott, S., Dougan, J.A., Graham, D., Goodarce, R., Faulds, K.,** Simultaneous detection and quantification of three bacterial meningitis pathogens by SERS, *Chem Sci*, 2014, 5., 1030-1040.
- Graeber, M.B., Mehraein, P.,** Reanalysis of the first case of Alzheimer's disease, *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 249, 1999, suppl. 3.
- Griebe, M., Daffertshofer, M., Stroick, M., Syren, M., Ahmad-Nejad, P., Neumaier, M., Backhaus, J., Hennerici, M.G., Fatar, M.,** Infrared spectroscopy: A new diagnostic tool in Alzheimer disease, *Neurosci Lett*, 420, 2007, 29-33.
- Gu, J., Sigurdsson, E.M.,** Immunotherapy for tauopathies, *J Mol Neurosci*, 45, 2011, 690-695.
- Gunnarsson, M., Malmeström, C., Axelsson, M., Sundström, P., Dahle, C., Vrethem, M., Olsson, T., Piehl, F., Norgren, N., Rosengren, L., Svenningsson, A., Lycke, J.,** Axonal damage in relapsing multiple sclerosis is markedly reduced by natalizumab, *Ann Neurol*, 69, 2011, 83-89.
- Haass, C., Selkoe, D.J.,** Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 2007, 101-112.
- Hamel, L.,** *Knowledge discovery with support vector machines*, John Wiley & Sons Inc, Hoboken, 2009, 262 pages.
- Hands, J.R., Clemens, G., Stables, R., Ashton, K., Brodbelt, A., Davis, C., Dawson, T.P., Jenkinson, M.D., Lea, R.W., Walker, C., Baker, M.J.,** Brain tumour differentiation: rapid stratified serum diagnostics via attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy, *J Neurooncol*, 127, 2016, 463-472.
- Hane, F., Drolle, E., Gaikwad, R., Faught, E., Leonenko, Z.,** Amyloid- β aggregation on model lipid membranes: an atomic force microscopy study, *J Alzheimers Dis*, 26, 2011, 485-494.
- Hane, F., Leonenko, Z.,** Effects of metals on kinetic pathways of amyloid- β aggregation, *Biomolecules*, 4, 2014, 101-116.
- Hane, F., Tran, G., Attwood, S.J., Leonenko, Z.,** Cu²⁺ affects Amyloid- β (1-42) aggregation by increasing peptide-peptide binding forces, *PLoS ONE*, 8, 2013, e59005.,
- Hansson, O., Zetterberg, H., Buchhave, P., Londos, E., Blennow, K., Minthon, L.,** Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study, *Lancet Neurol*, 5, 2006, 228-234.

- Hansson, O., Zetterberg, H., Buchhave, P., Andreasson, U., Londos, E., Minthon, L., Blennow, K.**, Prediction of Alzheimer's disease using the CSF Abeta42/Abeta40 ratio in patients with mild cognitive impairment, *Dement Geriatr Cogn Disord*, 23, 2007, 316-320.
- Hardy, J.**, Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease, *Trends Neurosci*, 20, 1997, 154-159.
- Hardy, J.**, A hundred years of Alzheimer's disease research, *Neuron*, 52, 2006, 3-13.
- Hardy, J., Allsop, D.**, Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease, *Trends Pharmacol Sci*, 12, 1991, 383-388.
- Hardy, J., Selkoe, D.J.**, The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics, *Science*, 297, 2002, 353-356.
- Harford, C., Sarkar, B.**, Amino Terminal Cu(II)- and Ni(II)-Binding (ATCUN) Motif of Proteins and Peptides: Metal Binding, DNA Cleavage, and Other Properties, *Acc Chem Res*, 30, 1997, 123-130.
- Hashimoto, M., Rockenstein, E., Crews, L., Masliah, E.**, Role of protein aggregation in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases, *Neuromolecular Med*, 4, 2003, 21-36.
- Hefti, F., Goure, W.F., Jerecic, J., Iverson, K.S., Walicke, P.A., Krafft, G.A.**, The case for soluble A β oligomers as a drug target in Alzheimer's disease, *Trends Pharmacol Sci*, 34, 2013, 261-266.
- Hellwig, P., Behr, J., Ostermeier, C., Richter, O.M., Pfitzner, U., Odenwald, A., Ludwig, B., Michel, H., Maentele, W.**, Involvement of glutamic acid 278 in the redox reaction of the cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans* investigated by FTIR spectroscopy, *Biochemistry*, 37, 1998, 7390-7399.
- Hellwig, P., Pfitzner, U., Behr, J., Rost, B., Pesavento, R. P., von Donk, W., Gennis, R.B., Michel, H., Ludwig, B., Mantele, W.**, Vibrational modes of tyrosines in cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*: FTIR and electrochemical studies on Tyr-D-4-labeled and on Tyr280His and Tyr35Phe mutant enzymes, *Biochemistry*, 41, 2002, 9116-9125.
- Henriksen, K., O'Bryant, S.E., Hampel, H., Trojanowski, J.Q., Montine, T.J., Jeromin, A., Blennow, K., Lönneborg, A., Wyss-Coray, T., Soares, H., Bazenet, C., Sjögren, M., Hu, W., Lovestone, S., Karsdal, M.A., Weiner, M.W.**, Blood-Based Biomarker Interest Group: The future of blood-based biomarkers for Alzheimer's disease, *Alzheimers Dement*, 10, 2013, 115-131.
- Henry, S., Vignaud, H., Bobo, C., Decossas, M., Lambert, O., Harte, E., Alves, I.D., Cullin, C., Lecomte, S.**, Interaction of A β 1-42 Amyloids with Lipids Promotes "Off-Pathway" Oligomerization and Membrane Damage, *Biomacromolecules*, 16, 2015, 944-950.

- Heraud, P., Caline, S., Campanale, N., Karnezis, T., McNaughton, D., Wood, B.R., Tobin, M.J., Bernard, C.C.**, Early detection of the chemical changes occurring during the induction and prevention of autoimmune-mediated demyelination detected by FT-IR imaging, *Neuroimage*, 49, 2010, 1180-1189.
- Heraud, P., Wood, B.D., Beardall, J., McNaughton, D.**, Effects of preprocessing of Raman spectra on *in vivo* classification of nutrient status of microalgal cells, *J Chemom*, 20, 2006, 193-197.
- Hermann, D., Both, M., Ebert, U., Gross, G., Schoemaker, H., Draguhn, A., Wicke, K., Nimmrich, V.**, Synaptic transmission is impaired prior to plaque formation in amyloid precursor protein-overexpressing mice without altering behaviorally-correlated sharp wave-ripple complexes, *Neuroscience*, 162, 2009, 1081-1090.
- Hernandez-Zimbron, L. F., Luna-Munoz, J., Mena, R., VazquezRamirez, R., Kubli-Garfias, C., Cribbs, D. H., Manoutcharian, K., Gevorkian, G.**, Amyloid- β Peptide Binds to Cytochrome C Oxidase Subunit 1, *PLoS One*, 7, 2012, e42344.
- Herrup, K.**, The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis, *Nat Neurosci*, 18, 2015, 794-799.
- Hock, C., Konietzko, U., Streffer, J. R., Tracy, J., Signorell, A., Muller-Tillmanns, B., Lemke, U., Henke, K., Moritz, E., Garcia, E., et al.**, Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease, *Neuron*, 38, 2003, 547-554.
- Holdorff B.**, Friedrich Heinrich Lewy (1885-1950) and his work, *J Hist Neurosci*, 11, 2002, 19-28.
- Holdorff, B., Rodrigues e Silva, A.M., Dodel, R.**, Centenary of Lewy bodies (1912-2012), *J Neural Transm*, 120, 2013, 509-516.
- Hori, R., Sugiyama, J.**, A combined FTIR microscopy and principal component analysis on softwood cell walls, *Carbohydr Polym*, 52, 2003, 449-453.
- Hou., L., Kang, I., Marchant, R.E., Zagorski, M.G.**, Methionine 35 oxidation reduces fibril assembly of the amyloid abeta-(1-42) peptide of Alzheimer's disease, *J Biol Chem*, 277, 2002, 40173-40176.
- Hou, L., Lee, H.G., Han, F., Tedesco, J.M., Perry, G., Smith, M.A., Zagorski, M.G.**, Modification of amyloid- β 1-42 fibril structure by methionine-35 oxidation, *J Alzheimer Dis*, 37, 2013, 9-18.
- Hou, L., Shao, H., Zhang, Y., Li, H., Menon, N.K., Neuhaus, E.B., Brewer, J.M., Byeon, I.J., Ray, D.G., Vitek, M.P., Iwashita, T., Makula, R.A., Przybyla, A.B., Zagorski, M.G.**, Solution NMR studies of the A beta(1-40) and A beta(1-42) peptides establish that the Met35 oxidation state affects the mechanism of amyloid formation, *J Am Chem Soc*, 126, 2004, 1992-2005.

- Howell, N.K., Arteaga, G., Nakai, S., Li-Chan, E.C.Y., Raman spectral analysis in the C-H stretching region of proteins and amino acids for investigation of hydrophobic interactions, *J Agr Food Chem*, 47, 1999, 924-933.
- Howlett, D.R., Jennings, K.H., Lee, D.C., Clark, M.S., Brown, F., Wetzel, R., Wood, S.J., Camilleri, P., Roberts, G.W., Aggregation state and neurotoxic properties of Alzheimer beta-amyloid peptide, *Neurodegeneration*, 4, 1995, 23-32.
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., Cole, G., Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice, *Science*, 274, 1996, 99-103.
- Hsu, L.J., Sagara, Y., Arroyo, A., Rockenstein, E., Sisk, A., Mallory, M., Wong, J., Takenouchi, T., Hashimoto, M., Masliah, E., Alpha-synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress, *Am J Pathol*, 157, 2000, 401-410.
- Hu, S., Morris, I.K., Singh, J.P., Smith, K.M., Spiro, T.G., Complete assignment of cytochrome *c* resonance Raman spectra via enzymatic reconstitution with isotopically labeled hemes, *J Am Chem Soc*, 115, 1993, 12446-12458.
- Huang, X., Cuajungco, M.P., Atwood, C.S., Hartshorn, M.A., Tyndall, J.D., Hanson, G.R., Stokes, K.C., Leopold, M., Multhaup, G., Goldstein, L.E., Scarpa, R.C., Saunders, A.J., Lim, J., Moir, R.D., Glabe, C., Bowden, E.F., Masters, C.L., Fairlie, D.P., Tanzi, R.E., Bush, A.I., Cu(II) potentiation of alzheimer abeta neurotoxicity. Correlation with cell-free hydrogen peroxide production and metal reduction, *J Biol Chem*, 274, 1999, 37111-37116.
- Humpel, C., Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease, *Trends Biotechnol*, 29, 2011, 26-32.
- Hye, A., Lynham, S., Thambisetty, M., Causevic, M., Campbell, J., Byers, H.L., Hooper, C., Rijdsdijk, F., Tabrizi, S.J., Banner, S., Shaw, C.E., Foy, C., Poppe, M., Archer, N., Hamilton, G., Powell, J., Brown, R.G., Sham, P., Ward, M., Lovestone, S., Proteome-based plasma biomarkers for Alzheimer's disease, *Brain*, 129, 2006, 3042-3050.
- Imitola, J., Côté, D., Rasmussen, S., Xie, X.S., Liu, Y., Chitnis, T., Sidman, R.L., Lin, C.P., Khoury, S.J., Multimodal coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy reveals microglia-associated myelin and axonal dysfunction in multiple sclerosis-like lesions in mice, *J Biomed Opt*, 16, 2011, 021109.
- Inglese, M., Petracca, M., Therapeutic strategies in multiple sclerosis: A focus on neuroprotection and repair and relevance to schizophrenia, *Schizophr Res*, 161, 2015, 94-101.
- Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Inhibition of neurofibrillary degeneration: a promising approach to Alzheimer's disease and other tauopathies, *Curr Drug Targets*, 5, 2004, 495-502.

- Isaksson, H., Turunen, M.J., Rieppo, L., Saarakkala, S., Tamminen, I.S., Rieppo, J., Kröger, H., Jurvelin, J.S.**, Infrared Spectroscopy Indicates Altered Bone Turnover and Remodeling Activity in Renal Osteodystrophy, *J Bone Miner Res*, 25, 2010, 1360-1366.
- Ito, H., Inoue, H., Hasegawa, Y., Shimizu, T., Kimura, S., Onimaru, M., Ikeda, H., Kudo, S.E.**, Use of surface-enhanced Raman scattering for detection of cancer-related serum-constituents in gastrointestinal cancer patients, *Nanomedicine*, 10, 2014, 599-608.
- Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., Ihara, Y.**, Visualization of A β 42(43) and A β 40 in senile plaques with end-specific A β monoclonals: evidence that an initially deposited species is A β 42(43), *Neuron*, 13, 1994, 45-53.
- Jahn, T.R., Radford, S.E.**, The Yin and Yang of protein folding, *FEBS J*, 272, 2005, 5962-5970.
- Jankowsky, J.L., Slunt, H.H., Gonzales, V., Savonenko, A.V., Wen, J.C., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Younkin, L.H., Lester, H.A., Younkin, S.G., Borchelt, D.R.**, Persistent amyloidosis following suppression of Abeta production in a transgenic model of Alzheimer disease, *PLoS Med*, 2, 2005, e355.
- Jarrett, J.T., Lansbury, P.T. Jr.**, Seeding “One-dimensional crystallization” of amyloid: A pathogenic mechanism in Alzheimer’s disease and scrapie?, *Cell*, 73, 1993, 1055-1058.
- Jiménez, J.L., Nettleton, E.J., Bouchard, M., Robinson, C.V., Dobson, C.M., Saibil, H.R.**, The protofilament structure of insulin amyloid fibrils, *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 2002, 9196-9201.
- Joachims, T.**, A Support Vector Method for Multivariate Performance Measures, *Proceedings of the 22nd International Conference on Machine Learning, Bonn*, 2005.
- Johnson, R.A., Wichern, D.W.**, *Applied multivariate statistical analysis*, Ed. Johnson, R.A., Wichern, D.W., Pearson, New Jersey, 2007, 773 pages.
- Kagan, B.L., Thundimadathil, J.**, Amyloid peptide pores and the beta sheet conformation, *Adv Exp Med Biol*, 677, 2010, 150-167.
- Kakio, A., Nishimoto, S.I., Yanagisawa, K., Kozutsumi, Y., Matsuzaki, K.**, Interactions of Amyloid β -Protein with Various Gangliosides in Raft-Like Membranes: Importance of GM1 Ganglioside-Bound Form as an Endogenous Seed for Alzheimer Amyloid, *Biochemistry*, 41, 2002, 7385-7390.
- Kaminska, A., Witkowska, E., Kowalska, A., Skoczynska, A., Gawryszewska, I., Guzewicz, E., Sniquirenko, D., Waluk, J.**, Highly efficient SERS-based detection of cerebrospinal fluid neopterin as a diagnostic marker of bacterial infection, *Anal Bioanal Chem*, 2016, 16, 4319-4327.
- Kandimalla, V.K.**, Influence of Metal Nanoparticles on Fluorescence Properties, Master’s Theses and Doctoral Dissertations, 2010.

- Kanemaru, K., Kameda, N., Yamanouchi, H.**, Decreased CSF amyloid beta42 and normal tau levels in dementia with Lewy bodies, *Neurology*, 54, 2000, 1875-1876.
- Kapaki, E., Paraskevas, G.P., Emmanouilidou, E., Vekrellis, K.**, The Diagnostic Value of CSF α -Synuclein in the Differential Diagnosis of Dementia with Lewy Bodies vs. Normal Subjects and Patients with Alzheimer's Disease, *PLoS One*, 2013, e81654.
- Kasuga, K., Tokutake, T., Ishikawa, A., Uchiyama, T., Tokuda, T., Onodera, O., Nishizawa, M., Ikeuchi, T.**, Differential levels of alpha-synuclein, beta-amyloid42 and tau in CSF between patients with dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 81, 2010, 608-610.
- Kawarabayashi, T., Shoji, M., Younkin, L.H., Wen-Lang, L., Dickson, D.W., Murakami, T., Matsubara, E., Abe, K., Ashe, K.H., Younkin, S.G.**, Dimeric amyloid beta protein rapidly accumulates in lipid rafts followed by apolipoprotein E and phosphorylated tau accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease, *J Neurosci*, 24, 2004, 3801-3809.
- Kayed, R., Head, E., Thompson, J.L., McIntire, T.M., Milton, S.C., Cotman, C.W., Glabe, C.G.**, Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis, *Science*, 300, 2003, 486-489.
- Kenche, V.B., Barnham, K.J.**, Alzheimer's disease & metals: therapeutic opportunities, *Br J Pharmacol*, 163, 2011, 211-219.
- Kim, S.I., Yi, J.S., Ko, Y.G.**, Amyloid beta oligomerization is induced by brain lipid rafts, *J Cell Biochem*, 99, 2006, 878-889.
- Kim, W.S., Kagedal, K., Halliday, G.M.**, Alpha-synuclein biology in Lewy body diseases, *Alzheimers Res Ther*, 6, 2014, 9 pages.
- Kiskis, J., Fink, H., Nyberg, L., Thyrs, J., Li, J.L., Enejder, A.**, Plaque-associated lipids in Alzheimer's diseased brain tissue visualized by nonlinear microscopy, *Scientific Reports*, 5, 13489.
- Klein, W.L., Krafft, G.A., Finch, C.E.**, Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum?, *Trends Neurosci*, 24, 2001, 219-224.
- Klunk, W.E., Jaco, R.F., Mason, R.P.**, Quantifying amyloid by congo red spectral shift assay, *Methods Enzymol*, 309, 1999, 285-305.
- Kobayashi, S., Tanaka, Y., Kiyono, M., Chino, M., Chikuma, T., Hoshi, K., Ikeshima, H.**, Dependence pH and proposed mechanism for aggregation of Alzheimer's disease-related amyloid- β (1-42) protein, *J Mol Struct*, 1094, 2015, 109-117.
- Kohler, A., Kristian, A.N., Martens, H.**, *Chemometrics in Biospectroscopy*, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, PB - John Wiley & Sons Ltd, 2006.

- Kondo, D., Ota, K., Kasanuki, K., Fujishiro, H., Chiba, Y., Murayama, N., Sato, K., Hirayasu, Y., Arai, H., Iseki, E.**, Characteristics of mild cognitive impairment tending to convert into Alzheimer's disease or dementia with Lewy bodies: A follow-up study in a memory clinic, *J Neurol Sci*, 369, 2016, 102-108.
- Kong, J., Yu, S.**, Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures, *Acta Biochim Biophys Sin*, 39, 2007, 549-559.
- Kontush, A.**, Alzheimer's amyloid-beta as a preventive antioxidant for brain lipoproteins, *Cell Mol Neurobiol*, 21, 2001, 299-315.
- Koric, L., Felician, O., Ceccaldi, M.**, Use of CSF biomarkers in the diagnosis of alzheimer's disease in clinical practice, 167, *Revue Neurologique*, 2011, 474-484.
- Krafft, C.**, *Vibrational spectroscopic imaging of soft tissue*, in *Infrared and Raman spectroscopic imaging*, Ed. Salzer, R., Siesler, H.W., Wiley, VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim, 2009, 113-143.
- Krafft, C., Neudert, L., Simat, T., Salzer, R.**, Near infrared Raman spectra of human brain lipids, *Spectrochim Acta A*, 61, 2005, 1529-1535.
- Krafft, C., Sobottka, S.B., Geiger, K.D., Schackert, G., Salzer, R.**, Classification of malignant gliomas by infrared spectroscopic imaging and linear discriminant analysis, *Anal Bioanal Chem*, 387, 2007, 1669-1677.
- Kretlow, A., Wang, Q., Kneipp, J., Lasch, P., Beekes, M., Miller, L., Naumann, D.**, FTIR-microspectroscopy of prion-infected nervous tissue, *Biochim Biophys Acta*, 1758, 2006, 948-959.
- Krishna, C.M., Sockalingum, G.D., Bhat, R.A., Venteo, L., Kushtagi, P., Pluot, M., Manfait, M.**, FTIR and Raman microspectroscopy of normal, benign, and malignant formalin-fixed ovarian tissues, *Anal Bioanal Chem*, 387, 2007, 1649-1656.
- Kumar, A., Paslay, L.C., Lyons, D., Morgan, S.E., Correia, J.J., Rangachari, V.**, Specific Soluble Oligomers of Amyloid- β Peptide Undergo Replication and Form Non-fibrillar Aggregates in Interfacial Environments, *J Biol Chem*, 287, 2012, 21253, 21264.
- Kumar, N., Bansal, A., Sarma, G.S, Rawal, R.K.**, Chemometrics tools used in analytical chemistry: An overview, *Talanta*, 123, 2014, 186-199.
- Kumar, S., Walter, J.**, Phosphorylation of amyloid beta (A β) peptides – a trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease, *Aging*, 3, 2011, 803-812.
- Kuzyk, A., Kastyak, M., Agrawal, V., Gallant, M., Sivakumar, G., Rak, M., Del Bigio, M.R., Westaway, D., Julian, R., Gough, K.M.**, Association among amyloid plaque, lipid, and creatine in hippocampus of TgCRND8 mouse model for Alzheimer disease, *J Biol Chem*, 285, 2010, 31202-31207.

- LaFerla, F.M.**, Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in alzheimer's disease, *Nature*, 3, 2002, 862-872.
- LaFerla, F.M., Oddo, S.**, Alzheimer's disease: A β , tau and synaptic dysfunction, *Trends Mol Med*, 11, 2005, 170-176.
- LaFerla, F.M., Tinkle, B.T., Bieberich, C.J., Haudenschild, C.C., Jay, G.**, The Alzheimer's A beta peptide induces neurodegeneration and apoptotic cell death in transgenic mice, *Nat Genet*, 9, 1995, 21-30.
- Lanctôt, K.L., Rajaram, R.D., Hermann, N.**, Therapy for Alzheimer's disease: How effective are current treatments?, *Ther Adv Neurol Disord*, 2, 2009, 163-180.
- Lannfelt, L., Relkin, N.R., Siemers, E.R.**, Amyloid- β -directed immunotherapy for Alzheimer's disease, *J Intern Med*, 275, 2014, 284-295.
- Larkin, P.**, *Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation*, Elsevier, Waltham, 228 pages.
- Lasch, P.**, Spectral pre-processing for biomedical vibrational spectroscopy and microspectroscopic imaging, *Chemometr Intell Lab Syst*, 117, 2012, 100-114.
- Lasch, P., Naumann. D.**, Spatial resolution in infrared microspectroscopic imaging of tissues, *Biochim Biophys Acta*, 1758, 2006, 814-829.
- Lasch, P., Petrich, W.**, *Data acquisition and analysis in biomedical vibrational spectroscopy*, in *Biomedical applications of synchrotron infrared microspectroscopy*, Ed. Moss, D., The royal Society of Chemistry, Cambridge, 2011, 192-225.
- Lassmann, H., Suchanek, G., Ozawa, K.**, Histopathology and the blood-cerebrospinal fluid barrier in multiple sclerosis, *Ann Neurol*, 36, 1994, S42-46.
- Lau, T.L., Ambroggio, E.E., Tew, D.J., Cappai, R., Masters, C.L., Fidelio, G.D., Barnham, K.J., Separovic, F.**, Amyloid-beta peptide disruption of lipid membranes and the effect of metal ions, *J Mol Biol*, 356, 2006, 759-770.
- Le Corre, S., Klafki, H.W., Plesnila, N., Hubinger, G., Obermeier, A.**, An inhibitor of tau hyperphosphorylation prevents severe motor impairments in tau transgenic mice, *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 2006, 9673-9678.
- Le Ru, E.C., Etchegoin, P.G.**, *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*, Elsevier, 2009.
- Lecomte, S., Wackerbarth, H., Hildebrandt, P., Soulimane, T.**, Potential-dependent surface enhanced resonance Raman spectroscopy of cytochrome c552 from *Thermus thermophilus*, *J Raman Spectrosc*, 29, 1998, 687-692.

- Lee, H.J., Bae, E.J., Lee, S.J.**, Extracellular α -synuclein—a novel and crucial factor in Lewy body diseases, *Nat Rev Neurol*, 10, 2014, 92-98.
- Lee, J.T., Wheeler, T.C., Li, L., Chin, L.S.**, Ubiquitination of alpha-synuclein by Siah-1 promotes alpha-synuclein aggregation and apoptotic cell death, *Hum Mol Genet*, 17, 2008, 906-917.
- Lee, J.Y., Cole, T.B., Palmiter, R.D., Suh, S.W., Kih, J.Y.**, Contribution by synaptic zinc to the gender-disparate plaque formation in human Swedish mutant APP transgenic mice, *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 2002, 7705-7710.
- Lee, P.C., Meisel, D.**, Adsorption and surface enhanced Raman of dyes on silver and gold sols, *J Phys Chem*, 86, 1982, 3391-3395.
- Lee, S.Y., Yoon, K.A., Jang, S.H., Ganbold, E.O., Uuriintuya, D., Shin, S.M., Ryu, P.D., Joo, S.W.**, Infrared spectroscopy characterization of normal and lung cancer cells originated from epithelium, *J Vet Sci*, 10, 2009, 299-304.
- Leopold, N., Lendl, B.**, A new method for fast preparation of highly surface enhanced Raman scattering (SERS) active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride, *J Phys Chem B*, 107, 2003, 5723-5727.
- Leskovjan, A.C., Kretlow, A., Miller, L.M.**, Fourier transform infrared imaging showing reduced unsaturated lipid content in the hippocampus of a mouse model of Alzheimer's disease, *Anal Chem*, 82, 2010, 2711-2716.
- LeVine, H.**, Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution, *Protein Sci*, 2, 1993, 404-410.
- LeVine, S.M., Wetzel, D.L.**, Chemical analysis of multiple sclerosis lesions by FT-IR microspectroscopy, *Free Radic Biol Med*, 25, 1998, 33-41.
- Li, X., Yang, T., Li, S., Jin, L., Wang, D., Guan, D., Ding, J.**, Noninvasive liver diseases detection based on serum surface enhanced Raman spectroscopy and statistical analysis, *Opt Express*, 2015, 23, 18361-18372.
- Liao, C.R., Rak, M., Unger, M., Platt, E., Albensi, B.C., Hirschmugl, C.J., Gough, K.M.**, Synchrotron FTIR reveals lipid around and within amyloid plaques in transgenic mice and Alzheimer's disease brain, *Analyst*, 138, 2013, 3991-3997.
- Lin, D., Feng, S., Pan, J., Chen, Y., Lin, J., Chen, G., Xie, S., Zeng, H., Chen, R.**, Colorectal cancer detection by gold nanoparticle based surface-enhanced Raman spectroscopy of blood serum and statistical analysis, *Opt Express*, 19, 2011, 13565-13577.

- Lin, M.S., Chen, X.B., Wang, S.S., Chang, Y., Chen, W.Y.**, Dynamic fluorescence imaging analysis to investigate the cholesterol recruitment in lipid monolayer during the interaction between beta-amyloid (1-40) and lipid monolayers, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 74, 2009, 59-66.
- Lindström, V., Ihse, E., Fagerqvist, T., Bergström, J., Nordström, E., Möller, C., Lannfelt, L., Ingelsson, M.**, Immunotherapy targeting α -synuclein, with relevance for future treatment of Parkinson's disease and other Lewy body disorders, *Immunotherapy*, 6, 2014, 141-153.
- Lipton, H.L., Liang, Z., Hertzler, S., Son, K.N.**, A specific viral cause of multiple sclerosis: one virus, one disease, *Ann Neurol*, 61, 2007, 514-523.
- Loehr, T.M., Loehr, J.S.**, Determination of oxidation and spin states of heme iron. Resonance raman spectroscopy of cytochrome c, microperoxidase, and horseradish per oxidase, *Biochem Biophys Res Comm*, 55, 1973, 218-223.
- Lovell, M.A., Obertson, J.D., Teesdale, W.J., Campbell, J.L., Markesbery, W.R.**, Cooper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques, *J Neurol Sci*, 158, 1998, 47-52.
- Lovell, M.A., Smith, J.L., Xiong, S., Markesbery, W.R.**, Alterations in zinc transporter protein-1 (ZnT-1) in the brain of subjects with mild cognitive impairment, early, and late-stage Alzheimer's disease, *Neurotox Res*, 7, 2005, 265-271.
- Lublin, F.D., Reingold, S.C., Cohen, J.A., Cutter, G.R., Sørensen, P.S., Thompson, A.J., Wolinsky, J.S., Balcer, L.J., Banwell, B., Barkhof, F., Bebo, B. Jr, Calabresi, P.A., Clanet, M., Comi, G., Fox, R.J., Freedman, M.S., Goodman, A.D., Inglese, M., Kappos, L., Kieseier, B.C., Lincoln, J.A., Lubetzki, C., Miller, A.E., Montalban, X., O'Connor, P.W., Petkau, J., Pozzilli, C., Rudick, R.A., Sormani, M.P., Stüve, O., Waubant, E., Polman, C.H.**, Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions, *Neurology*, 83, 2014, 278-286.
- Lue, L.F., Kuo, Y.M., Roher, A.E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, J.H., Rydel, R.E., Rogers, J.**, Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease, *Am J Pathol*, 155, 1999, 853-862.
- Lührs, T., Ritter, C., Adrian, M., Riek-Loher, D., Bohrmann, B., Döbeli, H., Schubert, D., Riek, R.**, 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils, *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 2005, 17342-17347.
- Luo, Y., Bolon, B., Kahn, S., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Denis, P., Fan, W., Kha, H., Zhang, J., Gong, Y., Martin, L., Louis, J.C., Yan, Q., Richards, W.G., Citron, M., Vassar, R.**, Mice deficient in BACE1, the Alzheimer beta secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation, *Nat Neurosci*, 4, 2001, 231-232.

Magi, S., Castaldo, P., Macri, M.L., Maiolino, M., Matteucci, A., Bastioli, G., Gratteri, S., Amoroso, S., Lariccia, V., Intracellular Calcium Dysregulation: Implications for Alzheimer's Disease, *BioMed Res Int*, 2016, 2016, 14 pages.

Maiti, N.C., Apetri, M.M, Zagorski, M.G., Carey, P.R., Anderson, V.E., Raman spectroscopic characterization of secondary structure in natively unfolded proteins: α -synuclein, *J Am Chem Soc*, 126, 2004, 2399-2408.

Malchiodi-Albedi, F., Contrusciere, V., Raggi, C., Fecchi, K., Rainaldi, G., Paradisi, S., Matteucci, A., Santini, M.T., Sargiacomo, M., Frank, C., Gaudiano, M.C., Diociaiuti, M., Lipid raft disruption protects mature neurons against amyloid oligomer toxicity, *Biochim Biophys Acta*, 1802, 2010, 406-415.

Marques, O., Outeiro, T.F., Alpha-synuclein: from secretion to dysfunction and death, *Neuroscience*, 3, 2012, e350.

Mason, R.P., Shoemaker, W.J., Shajenko, L., Chambers, T.E., Herbette, L.G., Evidence for changes in the Alzheimer's disease brain cortical membrane structure mediated by cholesterol, *Neurobiol Aging*, 13, 1992, 413-419.

Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.M.C., de Jong, S., Lewi, P.J., Smeyers-Verbeke, J., *Handbook of chemometrics and qualimetrics*, in *Data handling in science and technology*, Elsevier, 20, 1997, 1-867.

Matsuzaki, K., Kato, K., Yanagisawa, K., Abeta polymerization through interaction with membrane gangliosides, *Biochim Biophys Acta*, 1801, 2010, 868-877.

Mattson, M.P., Pathways towards and away from Alzheimer's disease, *Nature*, 430, 2004, 631-639.

Mattson, M.P., Chan, S.L., Dysregulation of cellular calcium homeostasis in Alzheimer's disease: bad genes and bad habits, *J Mol Neurosci*, 17, 2001, 205-224.

Mattsson, N., Zetterberg, H., Hansson, O., Andreasen, N., Parnetti, L., Jonsson, M., Herukka, S.K., van der Flier, W.M., Blankenstein, M.A., Ewers, M., Rich, K., Kaiser, E., Verbeek, M., Tsolaki, M., Mulugeta, E., Rosén, E., Aarsland, D., Visser, P.J., Schröder, J., Marcusson, J., de Leon, M., Hampel, H., Scheltens, P., Pirttilä, T., Wallin, A., Jönhagen, M.E., Minthon, L., Winblad, B., Blennow, K., CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment, *JAMA*, 302, 2009, 385-393.

Mawuenyega, K.G., Sigurdson, W., Ovod, V., Munsell, L., Kasten, T., Morris, J.C., Yarasheski, K.E., Bateman, R.J., Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease, *Science*, 330, 2010, 1774.

Maynard, C.J., Cappai, R., Volitakis, I., Cherny, R.A., White, A.R., Beyreuther, K., Masters, C.L., Bush, A.I., Li, Q.X., Overexpression of Alzheimer's disease amyloid-beta

opposes the age-dependent elevations of brain copper and iron, *J Biol Chem*, 277, 2002, 44670-44676.

Maziak, D.E., Do, M.T., Shamji, F.M., Sundaresan, S.R., Perkins, D.G., Wong, P.T., Fourier-transform infrared spectroscopic study of characteristic molecular structure in cancer cells of esophagus: an exploratory study, *Cancer Detect Prev*, 31, 2007, 244-253.

McAlpine, F.E., Tansey, M.G., Neuroinflammation and tumor necrosis factor signaling in the pathophysiology of Alzheimer's disease, *J Inflamm Res*, 1, 2008, 29-39.

McGowan, E., Pickford, F., Kim, J., Onstead, L., Eriksen, J., Yu, C., Skipper, L., Murphy, M.P., Beard, J., Das, P., Jansen, K., Delucia, M., Lin, W.L., Dolios, G., Wang, R., Eckman, C.B., Dickson, D.W., Hutton, M., Hardy, J., Golde, T., Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice, *Neuron*, 47, 2005, 191-199.

McKeith, I.G., Dickson, D.W., Lowe, J., Emre, M., O'Brien, J.T., Feldman, H., Cummings, J., Duda, J.E., Lippa, C., Perry, E.K., Aarsland, D., Arai, H., Ballard, C.G., Boeve, B., Burn, D.J., Costa, D., Del Ser, T., Dubois, B., Galasko, D., Gauthier, S., Goetz, C.G., Gomez-Tortosa, E., Halliday, G., Hansen, L.A., Hardy, J., Iwatsubo, T., Kalaria, R.N., Kaufer, D., Kenny, R.A., Korczyn, A., Kosaka, K., Lee, V.M., Lees, A., Litvan, I., Londos, E., Lopez, O.L., Minoshima, S., Mizuno, Y., Molina, J.A., Mukaetova-Ladinska, E.B., Pasquier, F., Perry, R.H., Schulz, J.B., Trojanowski, J.Q., Yamada, M., Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: Third report of the DLB Consortium, *Neurology*, 65, 2005, 1863-1872.

McKhann, G.M., Knopman, D.S., Chertkow, H., Hyman, B.T., Jack, C.R. Jr., Kawas, C.H., Klunk, W.E., Koroshetz, W.J., Manly, J.J., Mayeux, R., Mohs, R.C., Morris, J.C., Rossor, M.N., Scheltens, P., Carrillo, M.C., Thies, B., Weintraub, S., Phelps, C.H., The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease, *Alzheimers Dement*, 7, 2011, 263-269.

McLean, C.A., Cherny, R.A., Fraser, F., Fuller, S.J., Smith, M.J., Beyreuther, K., Bush, A.I., Masters, C.L., Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease, *Ann Neurol*, 46, 1999, 860-866.

Meidleman, S.L., *Occurrence and response to environmental stresses in nonmammalian organisms*, in: *Phospholipids Handbook*, Ed. Cevc, G., Marcel Dekker, New York, 1993, 23-38.

Meraz-Rios, M.A., Toral-Rios, D., Franco-Bocanegra, D., Villeda-Hernandez, J., Campos-Pena, V., Inflammatory process in Alzheimer's disease, *Front Integr Neurosci*, 7, 2013, 15 pages.

Mesu, J.G., Visser, T., Soulimani, F., van Faassen, E.E., de Peinder, P., Beale, A.M., Weckhuysen, B.M., New insights into the coordination chemistry and molecular structure of copper(II) histidine complexes in aqueous solutions, *Inorg Chem*, 45, 2006, 1960-1971.

- Mesu, J.G., Visser, T., Soulimani, F., Weckhuysen, B.M.**, Infrared and Raman spectroscopic study of pH-induced structural changes of L-histidine in aqueous environment, *Vib Spectrosc*, 39, 2005, 114-125.
- Miake, H., Mizusawa, H., Iwatsubo, T., Hasegawa, M.**, Biochemical characterization of the core structure of alpha-synuclein filaments, *J Biol Chem*, 277, 2002, 19213-19219.
- Mikhonin, A.V., Bykov, S.V., Myshakina, N.S., Asher, S.A.**, Peptide secondary structure folding reaction coordinate: Correlation between UV Raman amide III frequency, Ψ Ramachandran angle, and hydrogen bonding, *J Phys Chem B*, 110, 2006, 1928-1943.
- Milo, R., Kahana, E.**, Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment, *Autoimmun Rev*, 9, 2010, A387-394.
- Miller, L., Dumas, P.**, Chemical imaging of biological tissue with synchrotron infrared light, *Biochim Biophys Acta*, 1758, 2006, 846-857.
- Miller, L.M., Wang, Q., Telivala, T.P., Smith, R.J., Lanzirotti, A., Miklossy, J.**, Synchrotron-based infrared and X-ray imaging shows focalized accumulation of Cu and Zn co-localized with beta-amyloid deposits in Alzheimer's disease, *J Struct Biol*, 155, 2006, 30-37.
- Miura, T., Satoh, T., Hori-I, A., Takeuchi, H.**, Raman marker bands of metal coordination sites of histidine side chains in peptides and proteins, *J Raman Spectrosc*, 29, 1998, 41-47.
- Miura, T., Suzuki, K., Kohata, N., Takeuchi, H.**, Metal binding modes of Alzheimer's amyloid beta-peptide in insoluble aggregates and soluble complexes, *Biochemistry*, 39, 2000, 7024-7031.
- Moechars, D., Dewachter, I., Lorent, K., Reversé, D., Baekelandt, V., Naidu, A., Tesseur, I., Spittaels, K., Haute, C.V., Checler, F., Godaux, E., Cordell, B., Van Leuven, F.**, Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain, *J Biol Chem*, 274, 1999, 6483-6492.
- Mohlenhoff, B., Romeo, M., Diem, M., Wood, B.R.**, Mie-Type Scattering and Non-Beer-Lambert Absorption Behavior of Human Cells in Infrared Microspectroscopy, *Biophys J*, 88, 2005, 3635-3640.
- Mollenhauer, B., Cepek, L., Bibl, M., Wiltfang, J., Schulz-Schaeffer, W.J., Ciesielczyk, B., Neumann, M., Steinacker, P., Kretschmar, H.A., Poser, S., Trenkwalder, C., Otto, M.**, Tau protein, Abeta42 and S-100B protein in cerebrospinal fluid of patients with dementia with Lewy bodies, *Dement Geriatr Cogn Disord*, 19, 2005, 164-170.
- Mollenhauer, B., Cullen, V., Kahn, I., Krastins, B., Outeiro, T.F., Pepivani, I., Ng, J., Schulz-Schaeffer, W., Kretschmar, H.A., McLean, P.J., Trenkwalder, C., Sarracino, D.A., Vonsattel, J.P., Locascio, J.J., El-Agnaf, O.M., Schlossmacher, M.G.**, Direct

quantification of CSF alpha-synuclein by ELISA and first cross-sectional study in patients with neurodegeneration, *Exp Neurol*, 213, 2008, 315-325.

Morgan, D., Diamond, D. M., Gottschall, P. E., Ugen, K. E., Dickey, C., Hardy, J., Duff, K., Jantzen, P., DiCarlo, G., Wilcock, D., et al., Abeta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease, *Nature*, 408, 2000, 982-985.

Mori, K., Mahmood, M.I., Neya, S., Matsuzaki, K., Hoshino, T., Formation of GM1 ganglioside clusters on the lipid membrane containing sphingomyeline and cholesterol, *J Phys Chem B*, 116, 2012, 5111-5121.

Mudher, A., Lovestone, S., Alzheimer's disease-do tauists and Baptists finally shake hands?, *Trends Neurosci*, 25, 2002, 22-26.

Nabers, A., Ollesch, J., Schartner, J., Köttning, C., Genius, J., Hafermann, H., Klafki, H., Gertwert, K., Wiltfang, J., Amyloid- β -Secondary Structure Distribution in Cerebrospinal Fluid and Blood Measured by an Immuno-Infrared-Sensor: A Biomarker Candidate for Alzheimer's Disease, *Anal Chem*, 88, 2016, 2755-2762.

Nakagawa, T., Yuan, J., Cross-Talk between Two Cysteine Protease Families, *J Cell Biol*, 150, 2000, 887-894.

Nallala, J., Piot, O., Diebold, M.D., Gobinet, M.D., Bouché, O., Manfait, M., Sockalingum, G.D., Infrared Imaging as a Cancer Diagnostic Tool: Introducing a New Concept of Spectral Barcodes for Identifying Molecular Changes in Colon Tumors, *Cytometry A*, 83, 2013, 294-300.

Nallala, J., Diebold, M.D., Gobinet, C., Bouché, O., Sockalingum, G.D., Piot, O., Manfait, M., Infrared spectral histopathology for cancer diagnosis: a novel approach for automated pattern recognition of colon adenocarcinoma, *Analyst*, 2014, 139, 2014, 4005-4015.

Naslund, J., Schierhorn, A., Hellman, U., Lannfelt, L., Roses, A.D., Tjernberg, L.O., Silberring, J., Gandy, S.E., Winblad, B., Greengard, P., Relative abundance of Alzheimer A β amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging, *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 1994, 8378-8382.

Necula, M., Chirita, C.N., Kuret, J., Cyanine dye N744 inhibits tau fibrillization by blocking filament extension: Implications for the treatment of tauopathic neurodegenerative diseases, *Biochemistry*, 44, 2005, 10227-10237.

Nelson, P.T., Braak, H., Markesbery, W.R., Neuropathology and cognitive impairment in Alzheimer disease: a complex but coherent relationship, *J Neuropathol Exp Neurol*, 68, 2009, 1-14.

Nemani, V.M., Lu, W., Berge, V., Nakamura, K., Onoa, B., Lee, M.K., Chaudhry, F.A., Nicoll, R.A., Edwards, R.H., Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle recluster after endocytosis, *Neuron*, 65, 2010, 66-79.

- Nicoll, J. A., Wilkinson, D., Holmes, C., Steart, P., Markham, H., Weller, R. O.,** Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid beta peptide: a case report, *Nat Med*, 9, 2003, 448-452.
- Noguchi-Shinohara, M., Tokuda, T., Yoshita, M., Kasai, T., Ono, K., Nakagawa, M., El-Agnaf, O.M.A., Yamada, M.,** CSF α -synuclein levels in dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease, *Brain Res*, 1251, 2009, 1-6.
- Nonaka, T., Iwatsubo, T., Hasegawa, M.,** Ubiquitination of alpha-synuclein, *Biochemistry*, 44, 2005, 361-368.
- Novak, M.,** Tau vaccine: active immunization with misfolded tau protein attenuates tau pathology in the transgenic rat model of tauopathy, *Alzheimer's Dement*, 5, 2009, 93.
- Oberg, K.A., Ruyschaert, J.M., Goormaghtigh, E.,** The optimization of protein secondary structure determination with infrared and circular dichroism spectra, *Eur J Biochem*, 271, 2004, 2937-2948.
- Obi, K., Akiyama, H., Kondo, H., Shimomura, Y., Hasegawa, M., Iwatsubo, T., Mizuno, Y., Mochizuki, H.,** Relationship of phosphorylated alpha-synuclein and tau accumulation to Abeta deposition in the cerebral cortex of dementia with Lewy bodies, *Exp Neurol*, 210, 2008, 409-420.
- O'Brien, R.J., Wong, P.C.,** Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease, *Annu Rev Neurosci*, 34, 2011, 185-204.
- Ognibene, E., Middei, S., Daniele, S., Adriani, W., Ghirardi, O., Caprioli, A., Laviola, G.,** Aspects of spatial memory and behavioral disinhibition in Tg2576 transgenic mice as a model of Alzheimer's disease, *Behav Brain Res*, 156, 2005, 225-232.
- Ohyagi, Y., Asahara, H., Chui, D.H., Tsuruta, Y., Sakae, N., Miyoshi, K., Yamada, T., Kikuchi, H., Taniwaki, T., Murai, H., Ikezoe, K., Furuya, H., Kawarabayashi, T., Shoji, M., Checler, F., Iwaki, T., Makifuchi, T., Takeda, K., Kira, J., Tabira, T.,** Intracellular Abeta42 activates p53 promoter: a pathway to neurodegeneration in Alzheimer's disease, *FASEB J*, 19, 2005, 255-257.
- Okazaki, H., Lipkin, L.E., Aronson, S.M.,** Diffuse intracytoplasmic ganglionic inclusions (Lewy type) associated with progressive dementia and quadraparesis in flexion, *J Neuropathol Exp Neurol*, 20, 1961, 237-244.
- Olanow, C.W., Brundin, P.,** Parkinson's disease and alpha-synuclein: Is Parkinson's disease a Prion-like disorder?, *Mov Disord*, 28, 2013, 31-40.
- Opazo, C., Huang, X., Cherny, R.A., Moir, R.D., Roher, A.E., White, A.R., Cappai, R., Masters, C.L., Tanzi, R.E., Inestrosa, N.C., Bush, A.I.,** Metalloenzyme-like activity of

Alzheimer's disease beta-amyloid. Cu-dependent catalytic conversion of dopamine, cholesterol, and biological reducing agents to neurotoxic H₂O₂, *J Biol Chem*, 277, 2002, 40302-40308.

Palop, J.J., Jones, B., Kekoni, L., Chin, J., Yu, G.Q., Raber, J., Masliah, E., Mucke, L., Neuronal depletion of calcium-dependent proteins in the dentate gyrus is tightly linked to Alzheimer's disease-related cognitive deficits, *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 2003, 9572-9577.

Panza, F., Logroscino, G., Imbimbo, B.P., Solfrizzi, V., Is there still any hope for amyloid-based immunotherapy for Alzheimer's disease?, *Curr Opin Psychiatry*, 27, 2014a, 128-137.

Panza, F., Solfrizzi, V., Imbimbo, B.P., Tortelli, R., Santamato, A., Logroscino, G., Amyloid-based immunotherapy for Alzheimer's disease in the time of prevention trials: the way forward, *Expert Rev Clin Immunol*, 10, 2014b, 405-419.

Pappola, M.A., Omar, R.A., Kim, K.S., Robakis, N.K., Immunohistochemical evidence of oxidative [corrected] stress in Alzheimer's disease, *Am J Pathol*, 140, 1992, 621-628.

Pardossi-Piquard, R., Petit, A., Kawarai, T., Sunyach, C., Alves, D.A., Costa, C., Presenilin-dependent transcriptional control of the A β -degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of β APP and APLP, *Neuron*, 46, 2005, 541-554.

Parnetti, L., Tiraboschi, P., Lanari, A., Peducci, M., Padiglioni, C., D'Amore, C., Pierguidi, L., Tambasco, N., Rossi, A., Calabresi, P., Cerebrospinal fluid biomarkers in Parkinson's disease with dementia and dementia with Lewy bodies, *Biol Psychiatry*, 64, 2008, 850-855.

Parthasarathi, N., Hansen, C., Yamagushi, S., Spiro, T.G., Metalloporphyrin core size resonance Raman marker bands revisited: implications for the interpretation of hemoglobin photoproduct Raman frequencies, *J Am Chem Soc*, 109, 1987, 3865-3871.

Paul, V., Ekambaram, P., Involvement of nitric oxide in learning & memory processes, *Indian J Med Res*, 133, 2011, 471-478.

Pelton, J.T., McLean, L.R., Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure, *Anal Biochem*, 227, 2000, 167-176.

Peng, C., Chiappini, F., Kaščáková, S., Danulot, M., Sandt, C., Samuel, D., Dumas, P., Guettier, C., Le Naour, F., Vibrational signatures to discriminate liver steatosis grades, *Analyst*, 140, 2015, 1107-1118.

Petersen, R.C., Mild cognitive impairment as a diagnostic entity, *J Intern Med*, 256, 2004, 183-194.

Petkova, A.T., Ishii, Y., Balbach, J.J., Antzutkin, O.N., Leapman, R.D., Delaglio, F., Tycko, R., A structural model for Alzheimer's beta-amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR, *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 2002, 16742-16747.

- Peuchant, E., Richard-Harston, S., Bourdel-Marchasson, I., Dartigues, J.F., Letenneur, L., Barberger-Gateau, P., Arnaud-Dabernat, S., Daniel, J.Y.**, Infrared spectroscopy: a reagent-free method to distinguish Alzheimer's disease patients from normal-aging subjects, *Transl Res*, 152, 2008, 103-112.
- Pezzei, C., Pallua, J.D., Schaefer, G., Seifarth, C., Huck-Pezzei, V., Bittner, L.K., Klocker, H., Bartsch, G., Bonn, G.K., Huck, C.W.**, Characterization of normal and malignant prostate tissue by Fourier transform infrared microspectroscopy, *Mol Biosyst*, 6, 2010, 2287-2295.
- Piasek, Z., Urbanski, T.**, The infrared absorption spectrum and structure of urea, *Org Chem*, 1962, 113-120.
- Pickhardt, M., Gazova, Z., von Bergen, M., Khlistunova, I., Wang, Y., Hascher, A., Mandelkow, E.M., Biernat, J., Mandelkow, E.**, Anthraquinones inhibit tau aggregation and dissolve Alzheimer's paired helical filaments in vitro and in cells, *J Biol Chem*, 280, 2005, 3628-3635.
- Pike, C.J., Walencewicz, A.J., Glabe, C.G., Cotman, C.W.**, In vitro aging of beta amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity, *Brain Res*, 563, 1991, 311-314.
- Pizzi, N., Choo, L.P., Mansfield, J., Jackson, M., Halliday, W.C., Mantsch, H.H., Somorjai, R.L.**, Neural network classification of infrared spectra of control and Alzheimer's diseased tissue, *Artif Intell Med*, 7, 1995, 67-79.
- Pletnikova, O., West, N., Lee, M.K., Rudow, G.L., Skolasky, R.L., Dawson, T.M., Marsh, L., Troncoso, J.C.**, Abeta deposition is associated with enhanced cortical alpha-synuclein lesions in Lewy body diseases, *Neurobiol Aging*, 26, 2005, 1183-1192.
- Polman, C.H., Reingold, S.C., Edan, G., Filippi, M., Hartung, H.P., Kappos, L., Lublin, F.D., Metz, L.M., McFarland, H.F., O'Connor, P.W., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A.J., Weinshenker, B.G., Wolinsky, J.S.**, Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria", *Ann Neurol*, 58, 2005, 840-846.
- Polman, C.H., Reingold, S.C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J.A., Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Lublin, F.D., Montalban, X., O'Connor, P., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A.J., Waubant, E., Weinshenker, B., Wolinsky, J.S.**, Diagnostic criteria form multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria, *Ann Neurol*, 69, 2011, 292-302.
- Pramanik, D., Ghosh, C., Dey, S.G.**, Heme-Cu bound a β peptides: spectroscopic characterization, reactivity, and relevance to Alzheimer's disease, *J Am Chem Soc*, 133, 2011a, 15545-15552.
- Pramanik, D., Ghosh, C., Dey, S.G.**, Active Site Environment of Heme-Bound Amyloid Peptide Associated with Alzheimer's Disease, *J Am Chem Soc*, 133, 2011b, 81, 87.

- Prince, M., Wimo, A., Guerchet, M., Ali, G.C., Wu, Y.T, Prina, M., World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia, *Alzheimer's Disease International*, 2015.
- Qiu, L., Lewis, A., Como, J., Vaughn, M.W., Huang, J., Somerharju, P., Virtanen, J., Cheng, K.H., Cholesterol modulates the interaction of beta-amyloid peptide with lipid bilayers, *Biophys J*, 96, 2009, 4299-4307.
- Querfurth, H.W., LaFerla, F.M., Alzheimer's disease, *N Engl J Med*, 362, 2010, 329-344.
- Rainulf A., Stelzmann, H., Schnitzlein, N., Murtagh, F.R., An english translation of Alzheimer's 1907 paper, "uber eine eigenartige erkankung der hirnrinde", *Clin Anat*, 8, 1995, 429-431.
- Rak, M., Del Bigio, M.R., Mai, S., Westaway, D., Gough, K., Dense-core and diffuse Abeta plaques in TgCRND8 mice studied with synchrotron FTIR microspectroscopy, *Biopolymers*, 87, 2007, 207-217.
- Rambaran, R.N., Serpell, L.C., Amyloid fibrils, Abnormal protein assembly, *Prion*, 2, 2008, 112-117.
- Reesink, F.E., Lemstra, A.W., van Dijk, K.D., Berendse, H.W., van de Berg, W.D., Klein, M., Blankenstein, M.A., Scheltens, P., Verbeek, M.M., van der Flier, W.M., CSF α -synuclein does not discriminate dementia with Lewy bodies from Alzheimer's disease, *J Alzheimers Dis*, 22, 2010, 87-95.
- Regland, B., Lehmann, W., Abedini, I., Blennow, K., Jonsson, M., Karlsson, I., Sjögren, M., Wallin, A., Xilinas, M., Gottfries, C.G., Treatment of alzheimer's disease with clioquinol, *Dement Geriatr Cogn Disor*, 12, 2001, 408-414.
- Rehman, I.U., Movasaghi, Z., Rehman, S., *Vibrational spectroscopy for tissue analysis*, CRC Press, 2013.
- Reitsma, S., Slaaf, D.W., Vink, H., van Zandvoort, M.A.M.J., oude Egbrink, M.G.A., The endothelial glycocalyx: composition, functions and visualization, *Pflugers Arch*, 454, 2007, 345-359.
- Reitz, C., Alzheimer's disease and the amyloid cascade hypothesis: A critical review, *Int J Alzheimers Dis*, 2012, 2012, 11 pages.
- Robinson, D.M., Keating, G.M., Memantine: a review of its use in Alzheimer's disease, *Drugs*, 23, 2006, 1515-1534.
- Rodriguez, J.A., Ivanova, M.I., Sawaya, M.R., Cascio, D., Reyes, F.E., Shi, D., Sangwan, S., Guenther, E.L., Johnson, L.M., Zhang, M., Jiang, L., Arbing, M.A., Nannenga, B.L., Hattne, J., Whitelegge, J., Brewster, A.S., Messerschmidt, M., Boutet, S., Sauter, N.K., Gonen, T., Eisenberg, D.S., Structure of the toxic core of α -synuclein from invisible crystals, *Nature*, 525, 2015, 486-490.

- Roher, A.E., Ball, M.J., Bhave, S.V., Wakade, A.R.,** β -Amyloid from Alzheimer disease brains inhibits sprouting and survival of sympathetic neurons, *Biochem Biophys Res Commun*, 174, 1991, 572-579.
- Rohleder, D., Kocherscheidt, G., Gerber, K., Kiefer, W., Köhler, W., Möcks, J., Petrich, W.,** Comparison of mid-infrared and Raman spectroscopy in the quantitative analysis of serum, *J Biomed Opt*, 10, 2005, 031108.
- Rohn, T.T., Head, E., Su, J.H., Anderson, A.J., Bahr, B.A., Cotman, C.W., Cribbs, D.H.,** Correlation between caspase activation and neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease, *Am J Pathol*, 158, 2001, 189-198.
- Roychaudhuri, R., Yang, M., Hoshi, M.M, Teplow, D.B.,** Amyloid β -protein assembly and Alzheimer disease, *J Biol Chem*, 284, 2009, 4749-4753.
- Rubio-Perez, J.M., Morillas-Ruiz, J.M.,** A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines, *ScientificWorldJournal*, 2012, 2012, 15 pages.
- Rushworth, J.V., Hooper, N.M.,** Lipid Rafts: Linking Alzheimer's Amyloid- β Production, Aggregation, and Toxicity at Neuronal Membranes, *Int J Alzheimers Dis*, 2011, 2011, 14 pages.
- Russo, C., Angelini, G., Dapino, D., Piccini, A., Piombo, G., Schettini, G., Chen, S., Teller, J.K., Zaccheo, D., Gambetti, P., Tabaton, M.,** Opposite roles of apolipoprotein E in normal brains and in Alzheimer's disease, *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 1998, 15598-15602.
- Ryan, T.M., Caine, J., Mertens, H.D.T, Kirby, N., Nigro, J., Breheney, K., Waddington, L.J., Streltsov, V.A., Curtain, C., Masters, C.L., Roberts, B.R.,** Ammonium hydroxide treatment of A β produces an aggregate free solution suitable for biophysical and cell culture characterization, *PeerJ*, 1:e73, 2013.
- Rygula, A., Majzner, K., Marzec, K.M., Kaczor, A., Pilarczyk, M., Baranska, M.,** Raman spectroscopy of proteins: A review, *J Raman spectrosc*, 44, 2013, 1061-1076.
- Ryzhikova, E., Kazakov, O., Halamkova, L., Celminus, D., Malone, P., Molho, E., Zimmerman, E.A., Lednev, I.K.,** Raman spectroscopy of blood serum for Alzheimer's disease diagnostics: specificity relative to other types of dementia, *J Biophotonics*, 8, 2015, 584-596.
- Sabaté, R., Gallardo, M., Eserlrich, J.,** Spontaneous incorporation of β -amyloid peptide into neutral liposomes, *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, 270, 2005, 13-17.
- Sajid, J., Elhaddaoui, A., Turell, S.,** Investigation of the binding of Congo red to amyloid in Alzheimer's diseased tissue, *J Mol Struct*, 408-409, 1997, 181-184.
- Sane, S.U., Cramer, S.M., Przybycien, T.M.,** A holistic approach to protein secondary structure characterization using amide I band Raman spectroscopy, *Anal Biochem*, 269, 1999, 255-272.

- Sarroukh, R., Cerf, E., Derclaye, S., Dufrene, Y.F., Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J.M., Raussens, V.**, Transformation of amyloid β (1-40) oligomers into fibrils is characterized by a major change in secondary structure, *Cell Mol Life Sci*, 68, 2011, 1429-1438.
- Sarroukh, R., Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J.M., Raussens, V.**, ATR-FTIR: A “rejuvenated” tool to investigate amyloid proteins, *Biochim Biophys Acta*, 1828, 2013, 2328-2338.
- Savitzky, A., Golay, M.J.E.**, Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures, *Anal Chem*, 36, 1964, 1627-1639.
- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandevent, C., Walker, S., Woqlis, M., Yednock, T., Games, D., Seubert, P.**, Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse, *Nature*, 400, 1999, 173-177.
- Schenk, D., Hagen, M., Seubert, P.**, Current progress in beta-amyloid immunotherapy, *Curr Opin Immunol*, 16, 2004, 599-606.
- Schlücker, S., Schaeberle, M.D., Huffman, S.W., Levin, I.W.**, Raman microspectroscopy: A comparison of point, line, and wide-field imaging methodologies, *Anal Chem*, 75, 2003, 4312-4318.
- Schöneich, C.**, Methionine oxidation by reactive oxygen species: reaction mechanisms and relevance to Alzheimer's disease, *Biochim Biophys Acta*, 1703, 2005, 111-119.
- Schrader, B.**, *Infrared and Raman spectroscopy*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 787 pages.
- Scott, D.A., Tabarean, I., Tang, Y., Cartier, A., Masliah, E., Roy, S.**, A pathologic cascade leading to synaptic dysfunction in alpha-synuclein-induced neurodegeneration, *J Neurosci*, 30, 2010, 8083-8095.
- Scott, L.J., Figgitt, D.P.**, Mitoxantrone: a review of its use in multiple sclerosis, *CNS Drugs*, 18, 2004, 379-396.
- Selkoe, D.J.**, Alzheimer's disease: Genes, proteins and therapy, *Physiol Rev*, 81, 2001, 741-766.
- Sergeant, N., Delacourte, A., Buée, L.**, Tau protein as a differential biomarker of tauopathies, *Biochim Biophys Acta*, 1739, 2005, 179-197.
- Serpell, L.C.**, Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly, *Biochim Biophys Acta*, 1502, 2000, 16-30.
- Serpell, L.C., Berriman, J., Jakes, R., Goedert, M., Crowther, R.A.**, Fiber diffraction of synthetic alpha-synuclein filaments shows amyloid-like cross-beta conformation, *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 2000, 4897-4902.

Sevinc, A., Dilek, Y., Feride, S., Investigation of neurodegenerative diseases from body fluid samples using Fourier transform infrared spectroscopy, *Biomed Spectrosc Imaging*, 4, 2015, 341-357.

Sharma, N., Singh, A.N., Exploring biomarkers for Alzheimer's disease, *J Clin Diagn Res*, 7, 2016, KE01-KE06.

Shim, H., Harris, Z.L., Genetic defects in copper metabolism, *J Nutr*, 133, 2003, S1527-1531.

Shim, M.G., Wilson, B.C., The effects of ex vivo handling procedures on the near infrared Raman spectra of normal mammalian tissues, *Photochem Photobiol*, 63, 1996, 662-671.

Shoji, M., Cerebrospinal fluid Ab40 and Ab42: natural course and clinical usefulness, *Front Biosci*, 7, 2002, d997-1006.

Singer, S.J., Nicolson, G.L., The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*, 175, 1972, 720-731.

Singh, B.R., Basic aspects of the technique and applications of infrared spectroscopy of peptides and proteins, *ACS symposium series*, 750, 1999, 2-37.

Singh, B.R., DeOliveira, D.B., Fu, F.N., Fuller, M.P, Fourier transform infrared analysis of amide III bands of proteins for the secondary structure estimation, *Proceedings of SPIE*, 1890, 2003, 47-55.

Sjögren, M., Vanderstichele, H., Agren, H., Zachrisson, O., Edsbacke, M., Wikkelso, C., Skoog, I., Wallin, A., Wahlund, L.O., Marcusson, J., Nägga, K., Andreasen, N., Davidsson, P., Vanmechelen, E., Blennow, K., Tau and Abeta42 in cerebrospinal fluid from healthy adults 21-93 years of age: establishment of reference values, *Clin Chem*, 47, 2001, 1776-1781.

Small, D.H., Cappai, R., Alois Alzheimer and Alzheimer's disease: a centennial perspective, *J Neurochem*, 99, 2006, 708-710.

Smith, B.C., *Proper use of spectral processing*, in *Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy*, CRC Press, Boca Raton, 2011, 55-85.

Smith, D.G., Cappai, R., Barnham, K.J., The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid β peptide, *Biochim Biophys Acta*, 1768, 2007, 1976-1990.

Smith, D.P., Ciccotosto, G.D., Tew, D.J., Fodero-Tavoletti, M.T., Johanssen, T., Masters, C.L., Barnham, K.J., Cappai, R., Concentration dependent Cu^{2+} induced aggregation and dityrosine formation of the Alzheimer's disease amyloid-beta peptide, *Biochemistry*, 46, 2007, 2881-2891.

Smith, E., Dent, G., *Introduction, Basic Theory and Principles*, in *Modern Raman Spectroscopy-A Practical Approach*, John Wiley & Sons, Chichester, 2005, 1-21.

- Smith, J.L., Xiong, S., Markesbery, W.R., Lovell, M.A.**, Altered expression of zinc transporters-4 and -6 in mild cognitive impairment, early and late Alzheimer's disease brain, *Neuroscience*, 140, 2006, 879-888.
- Smith, M.A., Harris, P.L., Sayre, L.M., Perry, G.**, Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals, *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 1997, 9866-9868.
- Smith, M.A., Rottkamp, C.A., Nunomura, A., Raina, A.K., Perry, G.**, Oxidative stress in Alzheimer's disease, *Biochim Biophys Acta*, 1502, 2000, 139-144.
- Soares, H.D., Potter, W.Z., Pickering, E., Kuhn, M., Immermann, F.W., Shera, D.M., Ferm, M., Dean, R.A., Simon, A.J., Swenson, F., Siuciak, J.A., Kaplow, J., Thambisetty, M., Zagouras, P., Koroshetz, W.J., Wan, H.I., Trojanowski, J.Q., Shaw, L.M.; Biomarkers Consortium Alzheimer's Disease Plasma Proteomics Project**, Plasma biomarkers associated with the apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease, *Arch Neurol*, 69, 2012, 1310-1317.
- Soellner, I.A., Rabe, J., Mauri, V., Kaufmann, J., Addicks, K., Kuerten, S.**, Differential aspects of immune cell infiltration and neurodegeneration in acute and relapse experimental autoimmune encephalomyelitis, *Clin Immunol*, 149, 2013, 519-529.
- Song, E.S., Juliano, M.A., Juliano, L., Hersh, L.B.**, Substrate activation of insulin degrading enzyme (insulysin). A potential target for drug development, *J Biol Chem*, 278, 2003, 49789-49794.
- Song, F., Poljak, A., Smythe, G.A., Sachdev, P.**, Plasma biomarkers for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease, *Brain Res Rev*, 61, 2009, 69-80.
- Song, R.G., Yamaguchi, M., Nishimura, O., Suzuki, M.**, Investigation of metal nanoparticles produced by laser ablation and their catalytic activity, *Appl Surf Sci*, 253, 2007, 3093-3097.
- Spiro, T.G.**, *Biological applications of Raman spectroscopy*, Vol 3, Wiley, New York, 1988.
- Spiro, T.G., Streckas, T.C.**, Resonance Raman spectra of heme proteins. Effects of oxidation and spin state, *J Am Chem Soc*, 96, 1973, 338-345.
- Stroud, J.C., Liu, C., Teng, P.K., Eisenberg, D.**, Toxic fibrillary oligomers of amyloid- β have cross- β structure, *Proc Natl Acad Sci USA*, 109, 2012, 7717-7722.
- Stuart, B.**, *Infrared spectroscopy: Fundamentals and applications*, John Wiley & Sons, Ltd, 2004.
- Su, J.H., Zhao, M., Anderson, A.J., Srinivasan, A., Cotman, C.W.**, Activated caspase-3 expression in Alzheimer's and aged control brain: correlation with Alzheimer pathology, *Brain Res*, 898, 2001, 350-357.
- Syme, C.D., Nadal, R.C., Rigby, S.E., Viles, J.H.**, Copper binding to the amyloid-beta (A β) peptide associated with Alzheimer's disease: folding, coordination geometry, pH dependence,

stoichiometry, and affinity of A β (1-28): insights from a range of complementary spectroscopic techniques, *J Biol Chem*, 279, 2004, 18169-18177.

Szczerbowska-Boruchowska M., Dumas, P., Kastyak, M.Z., Chwiej, J., Lankosz, M., Adamek, D., Krygowska-Wajs, A., Biomolecular investigation of human substantia nigra in Parkinson's disease by synchrotron radiation Fourier transform infrared microspectroscopy, *Arch Biochem Biophys*, 459, 2007, 241-248.

Takashima, A., GSK-3 is essential in the pathogenesis of Alzheimer's disease, *J Alzheimers Dis*, 9, 2006, 309-317.

Takeuchi, H., Raman structural markers of tryptophan and histidine side chains in proteins, *Biopolymers*, 72, 2003, 305-317.

Takeuchi, H., UV Raman markers for structural analysis of aromatic side chains in proteins, *Anal Sci*, 27, 2011, 1077-1086.

Tanaka, S., Shiojiri, S., Takahashi, Y., Kitaguchi, N., Ito, H., Kameyama, M., Kimura, J., Ueda, K., Tissue specific expression of three types of beta protein precursor mRNA: enhancement of protease inhibitor harboring types in Alzheimer's disease brain, *Biochem Biophys Res Comm*, 165, 1989, 1406-1414.

Tariot, P.N., Farlow, M.R., Grossberg, G.T., Graham, S.M., McDonald, S., Gergel, I., Memantine Study Group, Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial, *JAMA*, 291, 2004, 317-324.

Tateno, F., Sakakibara, R., Kawai, T., Kishi, M., Murano, T., Alpha-synuclein in the cerebrospinal fluid differentiates synucleinopathies (Parkinson Disease, dementia with Lewy bodies, multiple system atrophy) from Alzheimer disease, *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 26, 2012, 213-216.

Tateno, M., Kobayashi, S., Saito, T., Imaging Improves Diagnosis of Dementia with Lewy Bodies, *Psychiatry Investig*, 6, 2009, 233-240.

Teplow, D.B., Preparation of amyloid beta-protein for structural and functional studies, *Methods Enzymol*, 413, 2006, 20-33.

Thambisetty, M., Lovestone, S., Blood-based biomarkers of Alzheimer's disease: challenging but feasible, *Biomark Med*, 4, 2010, 65-79.

Thayanidhi, N., Helm, J.R., Nycz, D.C., Bentley, M., Liang, Y., Hay, J.C., α -Synuclein Delays Endoplasmic Reticulum (ER)-to-Golgi Transport in Mammalian Cells by Antagonizing ER/Golgi SNAREs, *Mol Biol Cell*, 21, 2010, 1850-1863.

- Tofoleanu, F., Buchete, N.V.**, Alzheimer A β peptide interactions with lipid membranes, *Prion*, 6, 2012, 339-345.
- Torreggiani, A., Bonora, S., Fini, G.**, Raman and IR spectroscopic investigation of zinc(II)-carnosine complexes, *Biopolymers*, 57, 2000a, 352-364.
- Torreggiani, A., Tamba, M., Bonora, S., Fini, G.**, Binding of copper(II) to carnosine: Raman and IR spectroscopic study, *Biopolymers*, 57, 2000b, 149-159.
- Torreggiani, A., Tamba, M., Bonora, S., Fini, G.**, Raman and IR study on copper binding of histamine, *Biopolymers*, 72, 2003, 290-298.
- Trapaidze, A., Hureau, C., Bal, W., Winterhalter, M., Faller, P.**, Thermodynamic study of Cu²⁺ binding to the DAHK and GHK peptides by isothermal titration calorimetry (ITC) with the weaker competitor glycine, *J Biol Inorg Chem*, 17, 2012, 37-47.
- Trivella, A., Gaillard, T., Stote, R.H., Hellwig, P.**, Far infrared spectra of solid state aliphatic amino acids in different protonations states, *J Chem Phys*, 132, 2010, 115105.
- Trujano-Ortiz, L.G., Gonzalez, F.J., Quintanar, L.**, Redox cycling of copper-amyloid β 1-16 peptide complexes is highly dependent on the coordination mode, *Inorg Chem*, 54, 2015, 4-6.
- Tsai, L.H., Lee, M.S., Cruz, J.**, Cdk5, a therapeutic target for Alzheimer's disease?, *Biochim Biophys Acta*, 1697, 2004, 137-142.
- Tullman, M.J.**, A review of current and emerging therapeutic strategies in multiple sclerosis, *Am J Manag Care*, 19, 2013, S21-27.
- Tumiatti, V., Minarini, A., Bolognesi, M.L., Milelli, A., Rosini, M., Melchiorre, C.**, Tacrine derivatives and Alzheimer's disease, *Curr Med Chem*, 17, 2010, 1825-1838.
- Turkevich, J., Stevenson, P.C., Hillier, J.**, A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discuss Faraday Soc*, 11, 1951, 55-75.
- Turner, P.R., O'Connor, K., Tate, W.P., Abraham, W.C.**, Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory, *Prog Neurobiol*, 70, 2003, 1-32.
- Tycko, R.**, Progress towards a molecular-level structural understanding of amyloid fibrils, *Curr Opin Struct Biol*, 14, 2004, 96-103.
- Uversky, V.N.**, Neuropathology, biochemistry, and biophysics of α -synuclein aggregation, *J Neurochem*, 103, 2007, 17-37.
- Van Oijen, M., Hofman, A., Soares, H.D., Koudstaal, P.J., Breteler, M.M.**, Plasma Abeta (1-40) and Abeta (1-42) and the risk of dementia: a prospective case-cohort study, *Lancet Neurol*, 5, 2006, 655-660.

- Vassar, R.**, BACE1 inhibitor drugs in clinical trials for Alzheimer's disease, *Alzheimers Res Ther*, 6, 2014, 14 pages.
- Venyaminov, S.Y., Prendergast, F.G.**, Water (H₂O and D₂O) molar absorptivity in the 1000-4000 cm⁻¹ range and quantitative infrared spectroscopy of aqueous solutions, *Anal Biochem*, 248, 1997, 234-245.
- Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., Selkoe, D.J.**, Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo, *Nature*, 416, 2002, 535-539.
- Wang, H., Wang, M., Wang, B., Li, M., Chen, H., Yu, X., Yang, K., Chai, Z., Zhao, Y., Feng, W.**, Immunogold labeling and X-ray fluorescence microscopy reveal enrichment ratios of Cu and Zn, metabolism of APP and amyloid- β plaque formation in a mouse model of Alzheimer's disease, *Metallomics*, 4, 2012, 1113-1118.
- Wang, J., Tan, L., Wang, H.F., Tan, C.C., Meng, X.F., Wang, C., Tang, S.W., Yu, J.T.**, Anti-inflammatory drugs and risk of Alzheimer's disease: an updated systematic review and meta-analysis, *J Alzheimers Dis*, 44, 2015, 385-396.
- Wang, Q., Rowan, M.J., Anwyl, R.**, Beta-amyloid-mediated inhibition of NMDA receptor-dependent long-term potentiation induction involves activation of microglia and stimulation of inducible nitric oxide synthase and superoxide, *J Neurosci*, 24, 2004, 6049-6056.
- Wang, W.Y., Tan, M.S., Yu, J.T., Tan, L.**, Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease, *Ann Transl Med*, 3, 2015, 15 pages.
- Wang, Z.Y., Han, Z.M., Liu, Q.F., Tang, W., Ye, K., Yao, Y.Y.**, Use of CSF α -synuclein in the differential diagnosis between Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders, *Int Psychogeriatr*, 27, 2015, 1429-1438.
- Ward, J.H.**, Hierarchical grouping to optimize an objective function, *JASA*, 58, 1963, 236-244.
- Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y., Kirschner, M.W.**, A protein factor essential for microtubule assembly, *Proc Natl Acad Sci USA*, 72, 1975, 1858-1862.
- Weinstock-Guttman, B., Ramanathan, M., Zivadinov, R.**, Interferon-beta treatment for relapsing multiple sclerosis, *Expert Opin Biol Ther*, 8, 2008, 1435-1447.
- Westerman, M.A., Cooper-Blacketer, D., Mariash, A., Kotilinek, L., Kawarabayashi, T., Younkin, L.H., Carlson, G.A., Younkin, S.G., Ashe, K.H.**, The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease, *J Neurosci*, 22, 2002, 1858-1867.
- White, A. R., Reyes, R., Mercer, J. F. B., Camakaris, J., Zheng, H., Bush, A. I., Multhaup, G., Beyreuther, K., Masters, C., Cappai, R.**, Copper levels are increased in the cerebral cortex and liver of APP and APLP2 knockout mice, *Brain Res*, 842, 1999, 439-444.

- Williams, G.P.**, *Synchrotron and Free Electron Laser Sources of Infrared Radiation*, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, ed. Chalmers, J.M. and Griffiths, P.R., Vol. 1, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 2002, 341-348.
- Williams, T.L., Serpell, L.C.**, Membrane and surface interactions of Alzheimer's A β peptide—insights into the mechanism of cytotoxicity, *FEBS J*, 20, 2011, 3905-3917.
- Wisniewski, T., Goni, F.**, Immunotherapy for Alzheimer's disease, *Biochem Pharmacol*, 88, 2014, 499-507.
- Wold, S.**, Chemometrics, why, what and where to next?, *J Pharm Biomed Anal*, 9, 1991, 589-596.
- Wolfe, M.S.**, Therapeutic strategies for Alzheimer's disease, *Nat Rev Drug Discov*, 1, 2002, 859-866.
- Wolpert, M., Hellwig, P.**, Infrared spectra and molar absorption coefficients of the 20 alpha amino acids in aqueous solutions in the spectral range from 1800 to 500cm⁻¹, *Spectrosc Acta A*, 64, 2006, 987-1001.
- Wolynes, P.G., Onuchic, J.N., Thirumalai, D.**, Navigating the folding route, *Science*, 267, 1995, 1619-1620.
- Wood, S.J., Wypych, J., Stevenson, S., Louis, J.C., Citron, M., Biere, A.L.**, α -Synuclein Fibrillogenesis Is Nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease, *J Biol Chem*, 274, 1999, 19509-19512.
- Xu, S., Xie, Y., Xu, C.**, Routine classification of food pathogens *Staphylococcus* and *Salmonella* by ATR-FT-IR spectroscopy, *Spectroscopy*, 26, 2011, 53-58.
- Yahi, N., Aulas, A., Fantini, J.**, How Cholesterol Constrains Glycolipid Conformation for Optimal Recognition of Alzheimer's β Amyloid Peptide (A β ₁₋₄₀), *PLoS One*, 5, 2010, e9079.
- Yan, R., Vassar, R.**, Targeting the beta secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy, *Lancet Neurol*, 13, 2014, 319-329.
- Yang, F., Sun, X., Beech, W., Teter, B., Wu, S., Sigel, J., Vinters, H.V., Frautschy, S.A., Cole, G.M.**, Antibody to caspase-cleaved actin detects apoptosis in differentiated neuroblastoma and plaque-associated neurons and microglia in Alzheimer's disease, *Am J Pathol*, 152, 1998, 379-389.
- Yang, H., Yang, S., Kong, J., Dong, A., Yu, S.**, Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy, *Nature protocols*, 10, 2015, 382-396.
- Yassine, N., Lazaris, A., Dorner-Ciossek, C., Despres, O., Meyer, L., Maitre, M., Mensah-Nyagan, A.G., Cassel, J.C., Mathis, C.**, Detecting spatial memory deficits beyond blindness in tg2576 Alzheimer mice, *Neurobiol Aging*, 34, 2013, 716-730.

- Yip, C.M., McLaurin, J.**, Amyloid-beta peptide assembly: a critical step in fibrillogenesis and membrane disruption, *Biophys J*, 80, 2001, 1359-1371.
- Yu, W., Zou, K., Gong, J.S., Ko, M., Yanagisawa, K., Michikawa, M.**, Oligomerization of amyloid beta-protein occurs during the isolation of lipid rafts, *J Neurosci Res*, 80, 2005, 114-119.
- Zang, Q., Kim, Y.C., Narayanan, N.S.**, Disease-modifying therapeutic directions for Lewy-Body dementias, *Front Neurosci*, 9, 2015, 9 pages.
- Zetterberg, H., Blennow, K.**, Cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease: more to come?, *J Alzheimers Dis*, 33, 2013, S361-369.
- Zhao, H., Tuominen, E.K., Kinnunen, P.K.**, *Biochemistry*, 43, 2004, 10302-10307.
- Zhou, Y., Liu, C.H., Sun, Y., Pu, Y., Boydston-White, S., Liu, Y., Alfano, R.R.**, Human brain cancer studied by resonance Raman spectroscopy, *J Biomed Opt*, 17, 2012, 116021.
- Zhu, G., Zhu, X., Fan, Q., Wan, X.**, Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions, *Spectrosc Acta A*, 78, 2011, 1187-1195.
- Zirah, S., Kozin, S.A., Mazur, A.K., Blond, A., Cheminant, M., Ségalas-Milazzo, I., Debey, P., Rebuffat, S.**, Structural changes of region 1-16 of the Alzheimer disease amyloid beta-peptide upon zinc binding and in vitro aging, *J Biol Chem*, 281, 2006, 2151-2161.
- Zou, K., Gong, J.S., Yanagisawa, K., Michikawa, M.**, A novel function of monomeric amyloid beta-protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage, *J Neurosci*, 22, 2002, 4833-4841.
- Zupancic, M., Mahajan, A., Handa, K.**, Dementia with Lewy bodies: diagnosis and management for primary care providers, *Prim Care Companion CNS Disord*, 13, 2011.

Les maladies neurodégénératives : Etude de peptides modèles, de tissus cérébraux et de liquides céphalorachidiens par (micro)spectroscopie infrarouge et Raman

Résumé

Les maladies neurodégénératives représentent un défi sociétal majeur. Trouver des outils pour mieux comprendre et diagnostiquer ces maladies est donc nécessaire. La spectroscopie infrarouge (IR) et Raman semblent être de bons candidats puisqu'elles peuvent caractériser l'état physiopathologique d'un échantillon. Le but de cette thèse a été d'appliquer ces méthodes à l'étude de peptides modèles, de tissus cérébraux et de liquides céphalorachidiens (LCR). Dans le cadre de l'étude des tissus cérébraux, la spectroscopie IR et Raman ont été couplées à la microscopie afin de combiner des informations spectrales et spatiales. Cela a permis de mieux comprendre la formation et le rôle des plaques amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer (MA). Egalement, cela a permis de montrer l'intérêt d'utiliser ces méthodes dans des études futures pour suivre l'effet de différents traitements contre la sclérose en plaques. Concernant l'étude des LCR, la spectroscopie IR en mode ATR et la spectroscopie Raman exaltée de surface ont été utilisées afin de mettre en évidence des marqueurs spectroscopiques de la MA et de la maladie à corps de Lewy qui pourraient permettre un diagnostic plus précoce de ces maladies et un diagnostic différentiel entre ces deux.

Mots-clés : Maladie d'Alzheimer, amyloïde β , liquide céphalorachidien, maladie à corps de Lewy, spectroscopie infrarouge et Raman, sclérose en plaques, chimiométrie.

Résumé en anglais

Neurodegenerative diseases represent a major societal challenge. So, it is necessary to develop new tools for a better understanding and diagnosing of these diseases. Infrared (IR) and Raman spectroscopies seem to be good candidates since they can characterize the physiopathological conditions of a biological sample. The purpose of this thesis was to apply these methods to the study of model peptides, brain tissues and cerebrospinal fluids (CSF). As a part of brain tissue analysis, IR and Raman spectroscopy were coupled to microscopy in order to combine spectral and spatial information. This methodology improved our understanding of the formation and the role of amyloid plaques in Alzheimer's disease (AD). Moreover, it allowed to demonstrate the potential of these approaches in future studies on the effect of various treatments against multiple sclerosis. Concerning the study of CSF, IR-ATR and surface enhanced Raman spectroscopy were applied to identify spectroscopic markers of AD and Lewy body disease that could enable early diagnosis of these diseases and discrimination between them.

Keywords: Alzheimer's disease, β -amyloid, cerebrospinal fluid, Lewy body disease, infrared and Raman spectroscopy, multiple sclerosis, chemometrics.