

## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>ii</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>iii</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES .....</b>	<b>vii</b>
<b>CHAPITRE I</b>	
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1 Généralités .....	1
1.2 Coup d'œil sur les céramides.....	2
1.3 Céramides et Alzheimer .....	4
1.4 L'acétylcholine : une clef pour comprendre le fonctionnement du cerveau .....	5
1.5 Alzheimer et déficit cholinergique .....	9
1.6 Récepteurs cholinergiques et céramides : ils ne feraient pas bon ménage .....	10
<b>CHAPITRE II</b>	
<b>HYPOTHÈSE ET OBJECTIF DE RECHERCHE .....</b>	<b>14</b>
2.1 Est-ce que l'application de SMase neutre conduit à la production de céramides dans des tranches d'hippocampe? .....	14
2.2 Est-ce que l'application de SMase neutre se voit capable d'affecter la régulation muscarinique des réponses GABAergiques de l'hippocampe?.....	15
2.3 Est-ce la distribution cellulaire des récepteurs muscariniques est affectée par l'application de SMase neutre sur l'hippocampe?.....	16
2.4 Est-ce que l'interaction des récepteurs muscariniques avec les protéines kinases GRK-2 et la protéine d'internalisation $\beta$ -arrestine est affectée par la SMase neutre?.....	16
<b>CHAPITRE III</b>	
<b>MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE.....</b>	<b>18</b>
3.1 Préparation des tranches d'hippocampe .....	18
3.2 Aspects électrophysiologiques de la modulation GABAergique par les récepteurs muscariniques.....	19
3.3 Le dosage membranaire des récepteurs muscariniques.....	19

<b>CHAPITRE IV</b>	
<b>SPHINGOMYELINASE SELECTIVELY REDUCES M1 MUSCARINIC RECEPTORS IN RAT HIPPOCAMPAL MEMBRANES.....</b>	<b>21</b>
4.1 Résumé de l'article .....	21
4.2 Contribution des auteurs.....	22
4.3 Article .....	23
Abstract.....	24
Introduction.....	25
Materials and Methods .....	26
Slice preparation and treatments.....	26
Measurement of SMase activity .....	27
Results .....	31
SMase impairs pilocarpine-induced enhancement of GABA <sub>A</sub> -mediated responses in CA1 pyramidal cells .....	31
SMase decreases the membrane surface expression of M1 muscarinic receptors in rat hippocampal slices.....	32
SMase increases M1 muscarinic receptor interactions with GRK-2 and $\beta$ -arrestins.....	33
Discussion.....	33
References.....	37
Figure legends.....	40
<b>CHAPITRE V</b>	
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>48</b>
5.1 Céramides et régulation muscarinique des réponses inhibitrices de l'hippocampe .....	48
5.2 Céramides et internalisation des récepteurs muscariniques de type M1 dans l'hippocampe .....	51
5.3 Céramides et dérivés bioactifs.....	53
5.4 Céramides et pathologie Alzheimer.....	53
5.5 Conclusion .....	55
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>58</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Métabolisme des céramides .....	3
1.2	Principales voies cholinergiques.....	6
1.3	Intégration neurochimique .....	9
1.4	Mécanisme d'internalisation des récepteurs liés aux protéines G .....	12
5.1	Schéma intégrateur des modifications apportées par les céramides sur les systèmes de neurotransmissions .....	56

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
ACSF	Liquide cérebrospinal artificiel
APP	« Amyloid precursor protein »
ChAT	Choline acétyltransférase
EGF	Facteur de croissance de l'épiderme
ERK	« Extracellular signal regulated kinase »
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GRK	« G protein receptor kinase »
GSH	Glutathion SH (réduit)
LTD	Dépression à long terme
LTP	Potentialisation à long terme
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PP2A	Phosphatase 2 A
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
S1P	Sphingosine-1-phosphate
sIPCS	« Spontaneous inhibitory postsynaptic currents »
SMase	Sphingomyélinase
TNF- $\alpha$	Facteur de nécrose tumorale $\alpha$

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

#### 1.1 Généralités

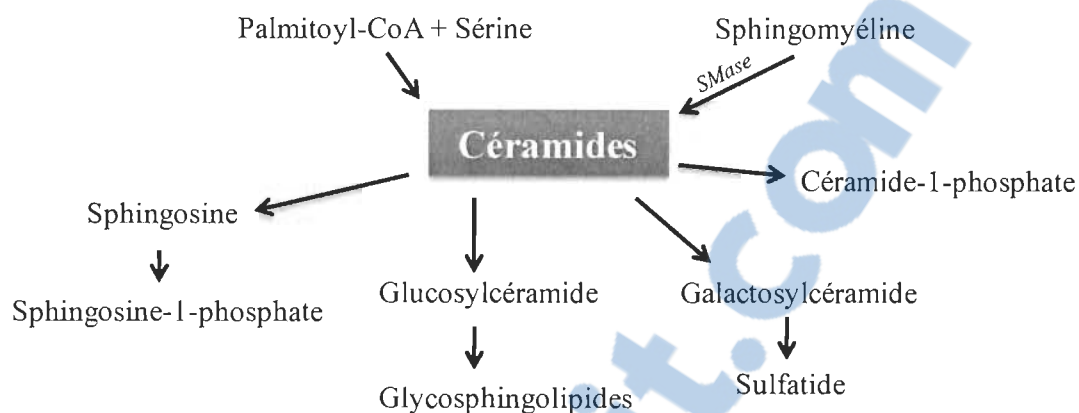
L'une des premières manifestations pathologiques de la maladie d'Alzheimer est l'apparition d'un déficit fonctionnel des neurones cholinergiques dans le cerveau. De ce fait, les cliniciens ont souvent recours à l'utilisation de médicaments susceptibles de contrer l'effondrement de cette activité, et ce, en favorisant l'accumulation du neurotransmetteur acétylcholine (ACh) et l'activation subséquente de ses récepteurs membranaires. Or, ces médicaments ne freinent que de façon plutôt modeste l'élagage inéluctable des fonctions cognitives chez les patients Alzheimer. Selon toute vraisemblance, le potentiel thérapeutique limité de cette approche pourrait s'expliquer par la disparition graduelle des récepteurs sensibles à l'acétylcholine; notamment ceux reconnus pour être activés par la nicotine (c.-à-d. les récepteurs nicotiniques). On a longtemps cru que les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine étaient épargnés au cours de la pathologie Alzheimer (Flynn et al., 1995). Ces récepteurs, couplés aux protéines G (ou RCPG), s'avèrent physiologiquement importants de par, entre autres, leur capacité à accroître la formation des souvenirs et à favoriser la survie neuronale. Des études biochimiques effectuées sur des cerveaux *post-mortem* de patients Alzheimer ont démontré que l'activité des récepteurs muscariniques de l'acétylcholine pourrait s'avérer compromise (Pakrasi et al., 2007). Toutefois, on ignore encore les mécanismes responsables de cette réduction d'influence muscarinique dans le vieillissement prématuré.

Récemment, des observations conduisent à penser qu'il existe une certaine relation entre maladie d'Alzheimer et niveaux élevés de céramides. De ce fait, plusieurs études proposent que ces lipides complexes, largement distribués dans les membranes cellulaires, exercent des effets néfastes sur les neurones. Leurs effets potentiellement

toxiques dans la maladie d'Alzheimer ont été envisagés, mais inexplorés dans l'optique d'une atteinte à la fonction muscarinique. Dans le cadre du présent mémoire, je me suis penchée sur la possibilité que l'accumulation de céramides dans le cerveau puisse, dans les faits, participer à la désactivation de ces récepteurs. Une hypothèse qui s'appuie nécessairement sur des résultats récents voulant que certains récepteurs liés aux protéines G soient modulés par des perturbations des niveaux intracellulaires de céramides (Khoa et al., 2006). Certes de nature fondamentale, les expériences proposées dans ce mémoire pourraient accroître, d'une part, nos connaissances sur les causes du dysfonctionnement précoce des neurones cholinergiques dans la maladie d'Alzheimer et fournir, d'autre part, des informations indispensables quant à la mise au point d'une stratégie thérapeutique efficace pour cette terrible affection.

## **1.2 Coup d'œil sur les céramides**

Les céramides proviennent, comme d'autres intermédiaires bioactifs, de la voie métabolique des sphingolipides (Cuvillier et al., 1996). Ils font référence à une famille de molécules lipidiques très proches les unes des autres, comptant au moins 50 molécules distinctes se différenciant par leurs chaînes d'acides gras. Celles-ci peuvent se composer de chaînes hydrocarbonées comptant de 2 à 24 atomes de carbones, mais celles qui en possèdent plus de 16 sont les plus fréquemment rencontrées dans la cellule eucaryote (Ben-David and Futerman, 2010). Les céramides sont considérées comme un point de convergence dans le métabolisme sphingolipidique, car ils occupent une position centrale dans la biosynthèse et le catabolisme des sphingolipides, assurant le rôle de précurseur de nombreux messagers lipidiques comme la sphingosine et la sphingosine-1-phosphate (voir Figure 1.1). Ils sont donc les chefs de file des sphingolipides bioactifs et peuvent être générés dans la cellule eucaryote par différentes voies métaboliques (Bartke and Hannun, 2009).



**Figure 1.1** Métabolisme des céramides.  
Adapté de (Arboleda et al., 2009).

La première voie est la synthèse dite *de novo*, commençant par la condensation du palmitoyl-CoA avec un acide aminé, la sérine. Cette réaction est connue pour mener à la formation de céramides à la surface cytosolique du réticulum endoplasmique (Tidhar and Futerman, 2013). De là, les céramides peuvent être réorientés vers l'appareil de Golgi, le site majeur de biosynthèse des sphingolipides complexes, où ils subissent une transformation en sphingomyéline et en glycosphingolipide (Wattenberg, 2010b). Les céramides peuvent également être générés par une seconde voie, le « cycle de la sphingomyéline ». Le cycle en question débute par un stimulus extracellulaire (choc thermique, stress oxydatif, cytokines) permettant d'induire l'activation de l'enzyme sphingomyélinase (SMase) et, conséquemment, l'hydrolyse spécifique de la sphingomyéline (Hannun, 1994). Le tout converge alors vers une augmentation des niveaux intracellulaires de céramides, et ce, principalement au niveau du feuillet interne de la membrane cytoplasmique (Huwiler et al., 2000). Les céramides sont d'importants seconds messagers impliqués dans de nombreux processus biologiques tels que l'induction de l'apoptose, de la différenciation, l'inhibition de la prolifération et la régulation du processus inflammatoire (Gorski et al., 2002). Fonctionnellement, les céramides sont des médiateurs et coordinateurs de la réponse au stress chez les eucaryotes (Hannun, 1996).

Les céramides ont aussi des fonctions structurales, puisqu'ils contribuent à l'ordonnement lipidique des membranes et affectent leur perméabilité (Ruvolo, 2003). Les membranes biologiques présentent des domaines aux propriétés particulières, moins fluides, où les lipides sont organisés en phase « liquide-ordonnée », insolubles dans les détergents à froid. Ces microdomaines lipidiques ou « rafts » présents dans la bicouche lipidique sont enrichis en sphingolipides et en cholestérol. Ils servent de plateformes de signalisation régulant la disponibilité des récepteurs et protéines transmembranaires (van Meer and Lisman, 2002).

Jusqu'à 70 % de la sphingomyéline cellulaire peut être trouvée dans les rafts, et de nombreuses études montrent que son hydrolyse en céramide par la SMase se produit dans les rafts (Pettus et al., 2002, Chakraborty and Jiang, 2013). Cette formation de céramide altère leurs propriétés. Ainsi, dans divers types cellulaires, l'activation de la SMase induite par de nombreux stimuli conduit rapidement à la formation de « plateformes » enrichies en céramides, qui fusionnent pour former des domaines plus larges, nécessaires à l'oligomérisation des récepteurs et à la transmission de leur signal (Kolesnick, 2002). De fait, moult protéines sont connues pour être attirées ou encore repoussées de ces microdomaines lipidiques durant la transmission d'un signal. Citons par exemple les protéines G, le récepteur à l'insuline et le récepteur du facteur de croissance de l'épiderme (EGF) (Zhang et al., 2009a).

### 1.3 Céramides et Alzheimer

L'examen *post mortem* du cerveau de patients décédés de la maladie d'Alzheimer a mis en évidence un bas niveau de sphingomyéline et un niveau élevé de céramides, suggérant une implication de la conversion de la sphingomyéline en céramides par l'enzyme SMase neutre dans cette pathologie neurodégénérative (He et al., 2010). De plus, des études réalisées sur des membranes neuronales isolées de différentes régions du cerveau présentant des lésions caractéristiques de l'Alzheimer ont montré une augmentation du niveau de céramides (Han et al., 2002, Cutler et al., 2004). Fait intéressant, l'accumulation excessive de céramides semble être associée à l'apparition



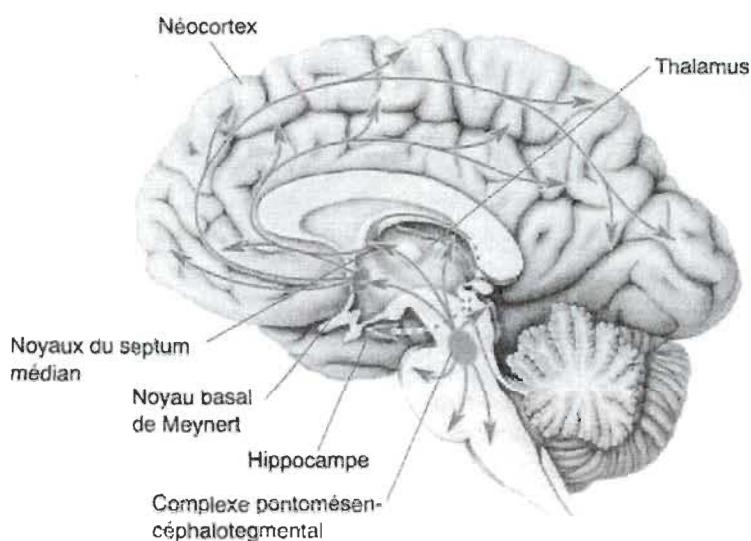
des dommages neuronaux typiques des cerveaux Alzheimer. Il s'agit, en réalité, de lésions histopathologiques caractérisées par des amas extracellulaires d'amyloïdes et d'une dégénérescence neurofibrillaires intracellulaire (Haughey et al., 2010).

Sur le plan quantitatif, l'étude récente de Michelle Mielke de la Clinique Mayo (Rochester) donne un éclairage impressionnant sur la contribution des céramides dans la maladie d'Alzheimer (Mielke and Haughey, 2012). Cette étude démontre que les femmes possédant de hautes concentrations de céramides dans le sang présentent un risque dix fois plus important que la normale de développer une démence de type Alzheimer. On ne manque pas d'hypothèse pour expliquer cette corrélation. On sait par exemple que l'accumulation dans les cerveaux Alzheimer du fragment toxique de la  $\beta$ -amyloïde de 42 acides aminés est susceptible de favoriser l'activité SMase et, conséquemment, la formation excessive de céramides (Lee et al., 2004). Par ailleurs, l'étude des espèces moléculaires en cause laisse présager que le dérèglement lipidique le plus drastique concerne, de fait, un dérivé lipidique des céramides, la galactosylcéramide (Hejazi et al., 2011). Des résultats récents suggèrent que ce dérivé constitue une composante importante de la cavéole, une vésicule d'endocytose issue des rafts lipidiques et contenant une proportion importante de récepteurs membranaires (Haidar, 2012). Il est évidemment permis d'imaginer que cette augmentation de céramides et/ou de ses dérivés pourrait se trouver impliquée dans l'élagage des fonctions neuronales réceptrices. De ce point de vue, notre étude se penche sur la possibilité que des niveaux élevés de céramides soient en mesure d'altérer la fonction des récepteurs muscariniques pour le neurotransmetteur acétylcholine.

#### **1.4 L'acétylcholine : une clef pour comprendre le fonctionnement du cerveau**

L'acétylcholine (abrégée ACh) est un neurotransmetteur qui joue un rôle important dans le système nerveux central. La vaste majorité des neurones cholinergiques proviennent de la base du cerveau. L'hippocampe, structure centrale de la consolidation mnésique de la mémoire, reçoit la majorité de son apport cholinergique par les neurones provenant des noyaux du septum médian (Mesulam, 1996). Par ailleurs, les autres régions du

cortex cérébral sont innervées principalement par le noyau basal de Meynert (Figure 1.2). Ensemble, ces nombreuses projections cholinergiques interviennent dans la mise en œuvre de fonctions cérébrales diverses telles que le développement neuronal, la modulation de l'activité corticale, le contrôle du flux sanguin cérébral ainsi que sur les cycles de veille et de sommeil (Picciotto et al., 2012). Au niveau de la cognition, l'ACh agit dans le cerveau pour améliorer la réflexion, la mémoire, l'attention et la capacité d'accomplir des tâches motrices simples (Hasselmo and Sarter, 2011).



**Figure 1.2 Principales voies cholinergiques.**

Coupe sagittale du cerveau démontrant les principales voies du système cholinergique. Les noyaux du septum médian et le noyau basal de Meynert innervent largement l'hippocampe. (Tiré de <http://www.neurone.fr/>.)

Comme bon nombre de neurotransmetteurs, l'ACh est stockée à concentration élevée dans les vésicules situées dans les terminaisons nerveuses. Elle est formée à partir de la choline et d'un acide acétique activé (acétylcoenzyme A) sous l'action d'une enzyme, la choline-acétyl-transférase. Lorsque stimulé, le neurone cholinergique libère le contenu de ses vésicules et l'ACh diffuse alors rapidement à travers la fente synaptique pour atteindre des récepteurs cibles (ou cholinergiques) situés sur des membranes synaptiques (Prado et al., 2002). Certains de ces récepteurs peuvent être stimulés par un alcaloïde, la

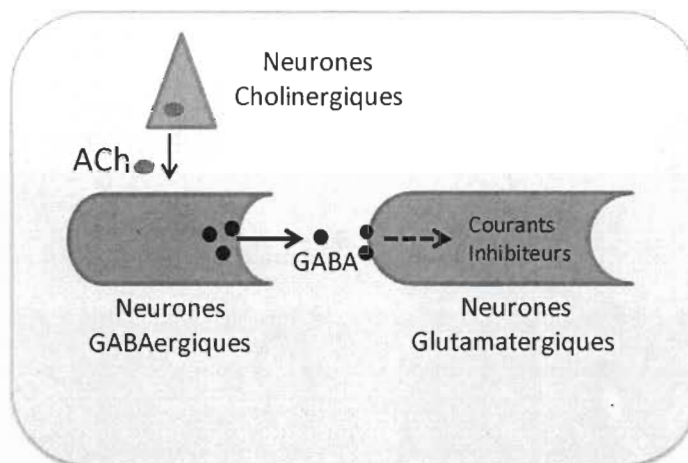
muscarine, il s'agit en fait des récepteurs muscariniques (ou récepteurs cholinergiques de type M). On retrouve, par ailleurs, des récepteurs cholinergiques de type N capables de fixer la nicotine. On le sait, l'ACh possède un temps d'action limité sur ses récepteurs et est rapidement inactivée par une enzyme extracellulaire, l'acétylcholinestérase (AChE). S'agissant de l'AChE, des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques pour cette enzyme sont généralement utilisés afin d'accroître les niveaux extracellulaires d'ACh dans des situations pathologiques caractérisées par un déficit cholinergique (Takeda et al., 2006). On y reviendra.

Bien que les récepteurs de types nicotiques exercent une action essentielle sur l'excitabilité neuronale, les récepteurs de types muscariniques sont, de loin, les récepteurs cholinergiques les plus abondants du cerveau. Il s'agit en fait d'une grande famille de récepteurs à 7 domaines transmembranaires subdivisée en 2 catégories (Hulme et al., 1990, Caulfield and Birdsall, 1998). La première contient les récepteurs qui ont une localisation préférentielle pour la région postsynaptique du neurone, soit les sous-types muscariniques M1, M3 et M5. Ces récepteurs, couplés à une protéine G de la famille  $G_{q/11}$ , ont pour effet d'accroître l'activité de la phospholipase C et, conséquemment, la mobilisation intracellulaire du calcium dans l'élément postsynaptique. La deuxième catégorie comprend les sous-types M2 et M4 qui sont liés avec une protéine G de la famille  $G_{i/o}$ . Ces derniers sont situés essentiellement au niveau des neurones présynaptiques et inhibent l'adénylate cyclase, ce qui a pour effet de diminuer les concentrations cytoplasmiques d'AMPc. Dans les faits, les récepteurs situés au niveau présynaptique ont comme rôle l'inhibition de la transmission cholinergique (Eglen, 2006).

Sur le plan neuropsychologique, on suspecte que les récepteurs de type N sont à même de contribuer à la consolidation des souvenirs, notamment ceux liés à la reconnaissance des odeurs et de l'environnement spatial. Le mécanisme mettrait en jeu des récepteurs nicotiques formés principalement de sous-unités protéiniques de type alpha-7 (Hogg et al., 2003). Selon toute vraisemblance, les récepteurs muscariniques sont également impliqués dans la mise en œuvre de la mémoire hippocampale concernant, tout

particulièrement, les mémoires dites associatives (Barker and Warburton, 2009). Concernant la distribution des récepteurs muscariniques, on sait que parmi les différentes espèces moléculaires, les récepteurs de type M1 sont de loin les plus abondants du cerveau. On les retrouve principalement dans l'hippocampe, le striatum et le thalamus. Ils représentent 60 % du nombre total de récepteurs de type muscariniques trouvés dans l'hippocampe (Tayebati et al., 2006). Leur abondance n'est pas sans importance puisque sur le plan physiologique, il est clair que les récepteurs muscariniques de type M1 exercent dans le cerveau de nombreux effets. Par exemple, la fonction des récepteurs M1 serait indispensable pour la mémorisation de diverses informations; celles liées à la reconnaissance de l'environnement spatiale ou encore à la mémorisation de souvenirs, comme le nom d'une personne, deux modalités cognitives affectées de façon prédominante chez les sujets Alzheimer (Miyakawa et al., 2001, Anagnostaras et al., 2003).

Les travaux récents du domaine de l'électrophysiologie, certainement une des disciplines les plus dynamiques dans le champ des sciences neurologiques, indiquent, par ailleurs, que les récepteurs muscariniques participent à la régulation fonctionnelle des réseaux synaptiques de l'hippocampe. On sait, à travers les expériences sur la plasticité neuronale, que les réponses glutamatergiques des neurones pyramidaux de l'hippocampe sont susceptibles de se voir modulées lors du stockage des souvenirs. Cette modulation découle d'une interaction de ces neurones excitateurs avec une famille neuronale dite inhibitrice. Cette dernière aurait comme fonction de moduler la force du signal exciteur en libérant le neurotransmetteur GABA (ou acide  $\gamma$ -aminobutyrique) sur les neurones pyramidaux (Sullivan et al., 2008). De ce point de vue, on notera à la Figure 1.3 que les récepteurs muscariniques sont à même d'exercer des actions sur la force du réseau glutamatergique, et ce, indirectement, en modulant l'activité des neurones inhibiteurs. L'une des idées originales de ce mémoire sera d'examiner les effets des céramides sur cette fonction exercée par les récepteurs muscariniques au niveau des réponses inhibitrices.



**Figure 1.3 Intégration neurochimique.**

On sait que l'acétylcholine provenant du septum médian a pour effet d'accroître l'activité des neurones GABAergiques de l'hippocampe et, conséquemment, la production de courants inhibiteurs dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe.

### 1.5 Alzheimer et déficit cholinergique

Dans le contexte de la pathologie Alzheimer, la dégénérescence des neurones cholinergiques touchera d'abord le noyau basal de Meynert de même que les noyaux du septum médian. Une atteinte qui provoquera, notamment, un dysfonctionnement au niveau des terminaisons cholinergiques atteignant la structure hippocampique, une région du lobe temporal dont l'intégrité est essentielle pour la mémoire, l'attention et l'apprentissage (Grothe et al., 2012). Il s'agit d'une atteinte relativement sélective qui laisse normalement intacte l'innervation du striatum et du thalamus. La conséquence de cette dégénérescence cholinergique est une perte de l'activité choline acétyltransférase (ChAT) dans le cerveau des sujets Alzheimer, qui fut initialement démontrée par Bowen et ses collaborateurs (Bowen et al., 1976, Bowen et al., 1979). Cette carence est évidemment associée à une diminution des contenus synaptiques en ACh. La pathologie Alzheimer est, de ce fait, souvent considérée comme une affection cognitive trouvant d'abord son origine dans ce déficit cholinergique.

Rappelons-le, les patients souffrant de démence sénile de type Alzheimer ont un déficit d'acétylcholine au niveau cérébral, au même titre que le parkinsonien manque de dopamine. En clinique, les inhibiteurs de l'AChE rendent l'acétylcholine plus disponible dans la fente synaptique en retardant, évidemment, sa dégradation. Ils aident ainsi à contrôler les symptômes. Ces médicaments agissent chez un nombre bien restreint de patients et ils seraient malheureusement sans effet sur la progression de la neurodégénérescence et l'espérance de vie (Fisher, 2012). Logiquement, l'efficacité d'un tel traitement dépend d'abord de la capacité du cerveau à produire et à libérer le neurotransmetteur ACh. En ce sens, l'utilisation des inhibiteurs de l'AChE s'avère plus adaptée aux phases précoces de la maladie, périodes durant lesquelles le cerveau est en mesure de soutenir une certaine relâche de neurotransmetteur. La réalité semble s'avérer plus complexe si l'on en juge par les observations biochimiques qui, parallèlement à la baisse d'ACh dans le cerveau, suggèrent qu'une chute des récepteurs sensibles à l'action de ce neurotransmetteur est également mise en cause (Nordberg, 2001).

### **1.6 Récepteurs cholinergiques et céramides : ils ne feraient pas bon ménage**

On débat depuis quelques années des relations potentiellement existantes entre l'accumulation de céramides dans les cerveaux Alzheimer et l'apparition du déficit cholinergique. Concernant les récepteurs nicotiques de l'ACh, Nordberg et ses collègues font remarquer qu'il y a lieu de tenir compte dans le traitement symptomatique de l'Alzheimer de la disparition graduelle des récepteurs de surface de type nicotinique dans certaines régions du cerveau (Nordberg, 2001). Qu'en est-il des mécanismes assurant cette perte de récepteurs nicotiques? Dans des publications sur le sujet, C.E. Gallegos et ses collaborateurs se sont efforcés de répondre à cette question épineuse. Leur analyse est d'ailleurs bien documentée, évoquant un rôle délétère exercé par les céramides sur la machinerie intracellulaire assurant la livraison des unités protéiques formant les récepteurs nicotiques à la surface neuronale (Gallegos et al., 2008b). Ces découvertes suggèrent à la fois l'implication des céramides dans les processus d'inactivation des récepteurs nicotiques et l'intérêt potentiel de médicaments anti-céramides comme cible thérapeutique susceptible de limiter l'élagage de ces récepteurs

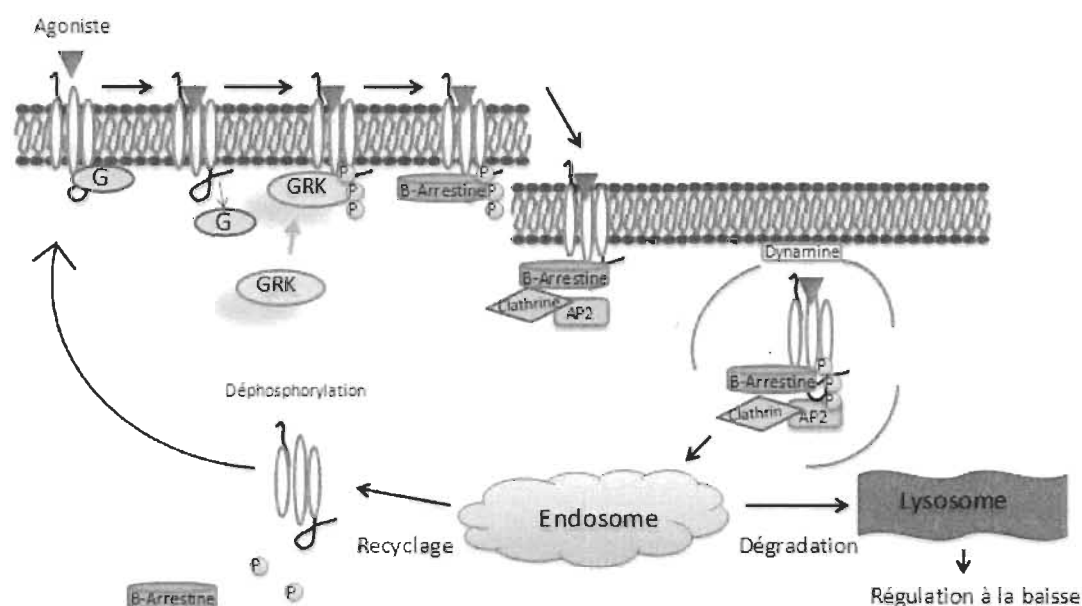


chez les sujets Alzheimer. Bien sûr, beaucoup reste à faire, y compris l'essentiel, qui serait d'identifier les espèces moléculaires de céramides responsables de la disparition des récepteurs nicotiniques à la surface des cellules nerveuses.

Concernant les anomalies apportées par la démence Alzheimer à l'échelle des récepteurs muscariniques, les choses apparaissent plus complexes. Quand on prend en considération que le facteur nombre, les études de radio-liaison démontrent que cette famille de récepteurs métabotropes est épargnée par le processus pathologique Alzheimer (Giacobini et al., 1989, Flynn et al., 1991, Flynn et al., 1995). Toutefois, les études effectuées sur les mécanismes de signalisation des récepteurs muscariniques semblent indiquer une perte fonctionnelle de ces récepteurs dans les cerveaux Alzheimer. Tsang et ses collaborateurs ont en effet montré que l'activation de l'enzyme phospholipase C qui survient normalement en réponse aux récepteurs muscariniques se trouve compromise (Tsang et al., 2006). On peut, à ce propos, suggérer que le déficit cholinergique dans la démence Alzheimer puisse également supposer une désensibilisation des récepteurs muscariniques. Élément particulièrement intéressant : des chercheurs ont révélé que l'accumulation intracellulaire de céramides est à même d'activer une enzyme clef assurant la désensibilisation, voir même, l'internalisation des récepteurs couplés aux protéines G, la protéine GRK (Khoa et al., 2006).

À ce propos, l'étude des mécanismes sous-jacents à la désensibilisation des récepteurs muscariniques (et autres RCPG) constitue un domaine particulièrement exaltant de la biologie cellulaire. On le sait, l'activation d'un RCPG par un agoniste induit non seulement le déclenchement de voies de signalisation, mais aussi une régulation de l'activité du récepteur. Cette régulation dite « négative » assure un contrôle de la durée d'activation de manière à éviter les effets néfastes d'une stimulation prolongée du récepteur. Pour être efficace, cette modulation nécessite un découplage physique entre le récepteur et la protéine G (Figure 1.4). Pour cela, le récepteur doit d'abord être phosphorylé sur des résidus sérine/thréonine, localisés dans son extrémité C-terminale (Krupnick and Benovic, 1998). Trois classes de protéines kinases sont susceptibles de réaliser cette phosphorylation: les protéines kinases A ou C (PKA, PKC), activées par

les seconds messagers (AMPc, calcium et diacylglycérol) qui phosphorylent le récepteur indépendamment de son état conformationnel et les GRK (sigles de l'anglais : G Protein Receptor Kinase) plus spécifiques des RCPG, qui phosphorylent le récepteur dans sa conformation active.



**Figure 1.4 Mécanisme d'internalisation des récepteurs liés aux protéines G.**  
Adapté de (Shmuel et al., 2007, Obrenovich et al., 2009a).

Concrètement, cette phosphorylation se traduit par le recrutement à la membrane plasmique d'une protéine cytosolique, la  $\beta$ -arrestine, qui verra à établir une connexion avec le récepteur membranaire. Cette étape précise signe normalement l'arrêt de la signalisation cellulaire induite par le récepteur fonctionnel. Une fois à la membrane, la  $\beta$ -arrestine devient alors un partenaire essentiel de la machinerie d'endocytose en assurant, entre autres, l'internalisation des récepteurs. À partir de là, le récepteur pourra se retrouver dans des boucles intracellulaires susceptibles de le conduire vers une dégradation ou encore vers un recyclage au niveau de la membrane cytoplasmique. Khoa et ses collaborateurs de l'Université de New-York (Khoa et al., 2006) ont démontré qu'une hausse des taux intracellulaires en céramides est à même de limiter la translocation membranaire de GRK et de limiter ultimement la désensibilisation des



récepteurs A<sub>2A</sub> de l'adénosine, en réponse à l'action du TNF- $\alpha$  (ou facteur de nécrose tumorale). En perturbant l'activité GRK, il n'est pas exclu que les céramides puissent être en mesure de modifier d'autres protéines membranaires réceptrices, les récepteurs muscariniques, notamment.

Sur le terrain physiologique, nombre d'expériences ont démontré que l'activité muscarinique n'est pas confinée qu'à un rôle de médiateur chimique dans la mémoire. Ces récepteurs exerceraient, parallèlement à leurs effets cognitifs, des actions potentiellement bénéfiques susceptibles de contrer les dommages induits au cours de la maladie d'Alzheimer, par exemple (Fisher, 2008). Concernant ces effets, il paraît que la stimulation des récepteurs cholinergiques de type M1 est d'ailleurs en mesure de réduire l'état d'hyperphosphorylation de la protéine Tau; un état biochimique caractéristique de la neurodégénérescence Alzheimer. Cette observation a conduit à l'hypothèse d'une thérapie Alzheimer dont l'essentiel de l'effet serait d'activer les récepteurs de type M1 (Tarr et al., 2012). Une approche actuellement considérée dans le cadre d'études cliniques et prenant avantage du développement d'agonistes allostériques qui, rappelons-le au passage, ont l'avantage de contourner les mécanismes de désensibilisation muscarinique.

Dans ce contexte, il s'avère évidemment important de vérifier la possibilité que l'augmentation de la production de céramides dans les cerveaux contribue bel et bien à affecter les réponses muscariniques. Une question centrale pour le domaine de la pharmacologie moléculaire que nous abordons dans le cadre du présent travail.

## CHAPITRE II

### HYPOTHÈSE ET OBJECTIF DE RECHERCHE

Le processus même à l'origine de la sénescence reste encore énigmatique. On implique souvent, d'une façon ou d'une autre, le développement d'un déficit cholinergique résultant d'une carence en ACh et en ses récepteurs. Il ressort de travaux récents que l'accumulation de céramides dans les cellules serait, en fait, associée à une baisse de livraison des récepteurs nicotiques à la surface des membranes cytoplasmiques. Cependant, comme les récepteurs de l'ACh dans le cerveau sont principalement des récepteurs muscariniques, liés à des protéines G, on est en droit de se questionner sur les effets potentiels des céramides sur cette famille de récepteurs cholinergiques.

Rappelons-le, l'activité inhibitrice exercée par les récepteurs GABAergiques sur les neurones pyramidaux de l'hippocampe est d'abord influencée par l'action des récepteurs muscariniques. En pratique, il est clairement démontré que l'application d'un agoniste muscarinique, la pilocarpine, se traduit sur le plan électrophysiologique par un accroissement des réponses spontanées inhibitrices enregistrées au niveau des neurones pyramidaux de l'hippocampe. Or, prenant avantage de cette approche expérimentale et celle de la biochimie traditionnelle, le présent travail s'est intéressé à l'idée qu'une accumulation de céramides puisse contribuer à réduire la fonction des récepteurs muscariniques. De cette hypothèse découlent quatre objectifs de recherche qui tenteront de répondre aux questions suivantes :

#### **2.1 Est-ce que l'application de SMase neutre conduit à la production de céramides dans des tranches d'hippocampe?**

Un regard nouveau sur les théories du vieillissement prématuré conduit à penser qu'un accroissement des niveaux de céramides dans l'organisme pourrait aller de pair avec le risque de développer la maladie d'Alzheimer. On sait que la région hippocampale est

préférentiellement affectée dans cette forme de démence, et le premier volet expérimental de ce travail de recherche consistera à évaluer la possibilité de générer des céramides sur des tranches d'hippocampe de rats. Ce volet portera sur l'effet exogène de la SMase neutre, une enzyme principalement retrouvée dans les membranes cytoplasmiques des cellules eucaryotes. La capacité de la SMase neutre à produire des céramides dans l'hippocampe sera estimée à l'aide d'un test biochimique (Amplex Red) révélateur de la présence de ces lipides.

## **2.2 Est-ce que l'application de SMase neutre se voit capable d'affecter la régulation muscarinique des réponses GABAergiques de l'hippocampe?**

Du fait de ses connexions avec les neurones glutamatergiques de l'hippocampe et les afférences cholinergiques, les interneurons libérateurs de GABA sont considérés comme une interface fonctionnelle indispensable dans les processus physiologiques sous-jacents à la mémoire. En outre, il apparaît que l'adaptation de la communication glutamatergique requise pour la formation des souvenirs implique un contrôle de nature GABAergique; lui-même conditionné par l'action des récepteurs muscariniques. Or, le second volet de cette recherche s'appliquera à estimer les effets apportés par la SMase neutre sur la modulation des réponses inhibitrices de type GABA par les récepteurs muscariniques. Cette question sera abordée en effectuant des enregistrements électrophysiologiques au niveau des neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe. Les courants postsynaptiques inhibiteurs spontanés (sIPSCs) seront isolés pharmacologiquement et analysés par la méthode de patch-clamp; en configuration cellule entière. Cette approche expérimentale implique l'imposition d'un potentiel déterminé sur la cellule isolée et permet, conséquemment, l'analyse rigoureuse des caractéristiques biophysiques des récepteurs en cause, c'est-à-dire, les aspects fréquentiels (ouverture) et ioniques (force du courant) des canaux GABAergiques.

### **2.3 Est-ce la distribution cellulaire des récepteurs muscariniques est affectée par l'application de SMase neutre sur l'hippocampe?**

La neurochimie a récemment braqué les projecteurs sur les céramides, lesquels se présentent comme des acteurs fondamentaux de la régulation des récepteurs nicotiques de l'ACh. Qu'en est-il toutefois des récepteurs cholinergiques de type muscariniques. La littérature identifie un sous-type de récepteurs muscariniques qui est principalement responsable de la modulation des neurones pyramidaux de l'hippocampe, les récepteurs de type M1. En utilisant la méthode de biotinylation comme procédure d'isolation des membranes cytoplasmiques, ce troisième volet de ma recherche consistera à évaluer la possibilité que les céramides générées par l'action de la SMase neutre soient en mesure d'induire un affaissement du nombre de récepteurs M1 sur les membranes de surface cellulaire. La spécificité de l'effet potentiel de la SMase sur la distribution des récepteurs M1 sera également étudiée en évaluant un autre sous-type de récepteurs muscariniques, localisés principalement sur la structure présynaptique des neurones, le récepteur de type M4.

### **2.4 Est-ce que l'interaction des récepteurs muscariniques avec les protéines kinases GRK-2 et la protéine d'internalisation $\beta$ -arrestine est affectée par la SMase neutre?**

Le processus d'internalisation est un mécanisme commun de régulation qui contrôle les récepteurs dits métabotropes dont font partie les récepteurs de type muscarinique. Après l'exposition du récepteur à son agoniste, il y a dissociation de la protéine G, permettant ainsi la phosphorylation des résidus sérine et thréonine spécifique à la 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire du récepteur par les GRK. Cette phosphorylation n'est pas suffisante à la désensibilisation, mais sert à créer un site de haute affinité pour la liaison de la protéine  $\beta$ -arrestine. Elle est alors nécessaire au processus final d'internalisation et permet l'arrêt de la transmission du signal. On verra dans ce dernier volet à évaluer, sur du matériel immunoprécipité avec des anticorps ciblant le récepteur M1, la capacité de l'enzyme SMase neutre à faciliter l'interaction de ce récepteur avec les protéines GRK et  $\beta$ -arrestine. Une emphase sera essentiellement portée sur la GRK de type 2 (GRK-2),

connue pour réguler la réactivité des récepteurs muscariniques dans des cultures de neurones de l'hippocampe (Willets et al., 2004).

## CHAPITRE III

### MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE

Les protocoles expérimentaux nécessaires pour répondre aux objectifs précédemment énoncés sont décrits dans l'article scientifique qui constitue le centre de ce mémoire. Pour le lecteur, il s'avère toutefois important de préciser les généralités concernant l'utilisation du modèle de tranches d'hippocampe pour l'étude fonctionnelle de la régulation GABAergique par les récepteurs muscariniques, de même que les informations traitant de la purification des membranes dites de surfaces par la méthode de biotinylation.

#### 3.1 Préparation des tranches d'hippocampe

Les études électrophysiologiques et biochimiques relatives à l'exploration de la fonction cholinergique seront effectuées sur des tranches minces d'hippocampe de rats. Cette préparation s'avère plus qu'intéressante puisqu'on peut y étudier une grande variété de processus physiologiques, comme le comportement électrophysiologique des cellules nerveuses, de même que les phénomènes biochimiques assurant la modulation des récepteurs membranaires. La procédure vise essentiellement à maintenir en vie pendant plusieurs heures les neurones hippocampiques en plaçant des tranches minces de cette structure du cerveau dans une chambre perfusée par un liquide cérebrospinal artificiel (ou ACSF) saturé en oxygène. La procédure exige que l'animal soit d'abord anesthésié légèrement, puis décérébré. Le cerveau est ensuite placé dans une boîte de Pétri maintenue sur la glace afin d'y prélever les portions corticales du cerveau. Le bloc de tissu est collé sur un support à Vibratome avec lequel des coupes frontales du cerveau sont préparées. De ces coupes de cerveau, on isole chirurgicalement des tranches d'hippocampe d'une épaisseur de 350  $\mu\text{m}$ . Cette approche expérimentale assure que les

régions spécifiques de l'hippocampe gardent leur intégrité fonctionnelle et morphologique.

### **3.2 Aspects électrophysiologiques de la modulation GABAergique par les récepteurs muscariniques**

L'étude du volet électrophysiologique repose essentiellement sur l'analyse de la fonction GABAergique exercée sur les neurones pyramidaux de l'hippocampe et de sa régulation par les récepteurs muscariniques de l'ACh. À cet effet, la modulation muscarinique des réponses inhibitrices est vérifiée par l'application de pilocarpine sur les tranches minces d'hippocampe. Après incubation à 32 °C, les tranches sont fixées au plancher de la chambre d'enregistrement et maintenues à température ambiante dans l'ACSF. L'illumination vidéo en infrarouge, couplée à la microscopie traditionnelle, permet une visualisation optimale des neurones pyramidaux de l'hippocampe et le positionnement adéquat d'une électrode d'enregistrement de patch-clamp.

Les enregistrements inhibiteurs de type GABAergique sont recueillis sur les neurones pyramidaux situés dans la portion CA1 de l'hippocampe, ces réponses sont facilement détectables dans des tranches préalablement traitées avec des antagonistes glutamatergiques. Les réponses inhibitrices résiduelles constituent dans les faits l'apparition de courants inhibiteurs spontanés postsynaptiques (ou sIPSC dans le jargon électrophysiologique) impliquant l'activation des récepteurs GABA de type A ( $GABA_A$ ). Les expériences électrophysiologiques présentées dans le cadre de ce mémoire montrent bien que l'agoniste muscarinique pilocarpine est à même d'accentuer les courants inhibiteurs de type  $GABA_A$  révélés sur les neurones pyramidaux, un effet nettement moins percevable dans les tranches exposées à la SMase neutre.

### **3.3 Le dosage membranaire des récepteurs muscariniques**

On sait que bon nombre de substances pharmacologiques sont à même de dérégler l'organisation des protéines se trouvant normalement à la surface des membranes

neuronaux. Dans la présente étude, nous avons évalué cette possibilité en effectuant le dosage des récepteurs muscariniques, et ce, à la suite de l'action de la SMase. Les étapes relatives à cette approche sont bien décrites dans l'article qui accompagne cet ouvrage. On se rappellera toutefois que les expériences concernant le dosage des récepteurs muscariniques exigent au préalable la purification des membranes de surface par une technique dite de biotinylation. La biotine, utilisée sous la forme *N*-Hydroxysulfosuccinimide (NHS-SS-biotin), est une substance capable de fixer les protéines ce qui se trouve à la surface des membranes cytoplasmiques (Holman and Henley, 2007). Ces membranes riches en biotine sont ensuite isolées par fixation à des billes de streptavidine. Les protéines membranaires sont finalement obtenues en exposant pendant quelques minutes le mélange lié à la streptavidine à une solution bouillante légèrement acide contenant du glycérol, du  $\beta$ -mercaptoéthanol et du bleu de bromophénol.

Cette approche nous permet, au final, d'étudier par la technique traditionnelle de Western blot le comportement spécifique des récepteurs de surface. Une information capitale qui nous permettra de vérifier si les céramides sont à même de diminuer le nombre de récepteurs muscariniques dans les cellules de l'hippocampe et l'interaction potentielle de ces récepteurs avec des protéines associatives comme la GRK et la  $\beta$ -arrestine.



## CHAPITRE IV

### SPHINGOMYELINASE SELECTIVELY REDUCES M1 MUSCARINIC RECEPTORS IN RAT HIPPOCAMPAL MEMBRANES

#### 4.1 Résumé de l'article

De nos jours, il y a de multiples évidences démontrant que les récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique sont affectés par les céramides. Par contre, on ne sait toujours pas comment les céramides affectent les récepteurs à l'acétylcholine de type muscarinique. Utilisant des techniques d'électrophysiologie, nous avons démontré que l'application d'un agoniste muscarinique, la pilocarpine, se traduit par l'accroissement des réponses spontanées inhibitrices dans la région CA1 des neurones pyramidaux de l'hippocampe. Par contre, ces réponses inhibitrices sont complètement abolies dans des tranches d'hippocampe de rats précédemment exposées à une enzyme, la SMase, capable de générer des céramides. Utilisant des techniques de biochimie traditionnelle, comme l'immunobuvardage de type Western, nous avons démontré sur des membranes biotinylées que cette perte de réponses électrophysiologiques serait possiblement reliée à la perte des récepteurs M1 à la surface membranaire. Cependant, cet effet serait relativement spécifique aux récepteurs M1 puisque l'expression des récepteurs M4 ne semble pas compromise par l'exposition à la SMase. Fait intéressant, nous avons démontré que les protéines GRK-2 et  $\beta$ -arrestine, toutes deux impliquées dans la régulation dite négative des récepteurs de type M, sont considérablement augmentées sur du matériel immunoprécipité avec un anticorps ciblant le récepteur M1. Pris ensemble, ces résultats suggèrent que l'internalisation des récepteurs M1 est augmentée lorsque les neurones sont soumis à un haut niveau de céramides.

**Mots clés :** Hippocampe, céramides, récepteur à l'acétylcholine, GRK-2, arrestine

## 4.2 Contribution des auteurs

Cet article scientifique a fait l'objet d'une publication dans la revue *Hippocampus* en janvier 2012. Étant la première auteure du manuscrit, j'ai rédigé l'article avec l'aide précieuse de mon directeur de recherche, le professeur Guy Massicotte. De plus, le professeur Michel Cyr a contribué, avec mon directeur de recherche, à l'ébauche conceptuel du projet et m'a très bien conseillé lors de la rédaction de l'article. Les expériences en électrophysiologie ont été entièrement réalisées par Christian Patenaude, candidat au postdoctorat en biophysique et biologie cellulaire. Il s'agit en fait des figures 1 à 3. Les analyses biochimiques, figure 4 à 6, ont été réalisées par moi-même.

**Référence de l'article :** *Hippocampus*, volume 22, issue 7, article ID : HIPO-11-149.R1, doi: 10.1002/hipo.21001

### 4.3 Article

#### **Sphingomyelinase Selectively Reduces M1 Muscarinic Receptors in Rat Hippocampal Membranes**

Eve DONTIGNY, Christian PATENAUDE, Michel CYR and Guy MASSICOTTE

Groupe de recherche en Neurosciences,  
Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada

**Grant Sponsor:** Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada;

**Grant Numbers:** 105942-08 to GM and 311763-07 to MC

Number of pages: 29

Number of figures: 6

Number of words: 5400

**Corresponding author's address:** **Guy Massicotte, Ph.D.**

Département de chimie-biologie

U.Q.T.R.

C.P. 500

Trois-Rivières, Québec

Canada G9A 5H7

Telephone: (819) 376-5053

Fax: (819) 376-5084

E-mail: [Guy.Massicotte@uqtr.ca](mailto:Guy.Massicotte@uqtr.ca)

## Abstract

Although there is evidence that nicotinic acetylcholine (ACh) receptors are influenced by ceramides, we do not currently know whether or not these sphingolipids can also regulate the muscarinic subtypes of ACh receptors. Using the whole-cell patch technique, we demonstrated that the effectiveness of the muscarinic receptor agonist pilocarpine, in enhancing spontaneous inhibitory postsynaptic currents in CA1 pyramidal cells, was completely abolished in hippocampal slices pre-exposed to the ceramide-generating enzyme sphingomyelinase (SMase). Western blot experiments, performed with biotinylated hippocampal membranes, showed that this electrophysiological defect possibly relies on the loss of M1 muscarinic ACh receptors at the cell surface. However, the effect appears to be relatively specific as the cell-surface expression of M4 muscarinic receptors was not found to be impacted by SMase treatment. Interestingly, we observed that G protein-coupled receptor kinases 2 and  $\beta$ -arrestin1/2 interactions with M1-immunoprecipitated proteins were substantially augmented in SMase-treated slices and that the reduction of cell-surface M1 muscarinic receptor expression generated was completely suppressed by the muscarinic antagonist atropine. Collectively, our data suggest that selective internalization of M1 muscarinic receptors can be accentuated in neurons subjected to high ceramide levels. The potential physiopathological implications of this finding are presented.

## Introduction

Ceramides are emerging as key sphingolipids contributing to a variety of cellular processes, such as the stress response, apoptosis and differentiation as well as the development of numerous pathological conditions (Dickson, 2008, Arboleda et al., 2009, Gangoiti et al., 2010). There are 2 principal sources of ceramides in most cells. The first source is synthesized by the direct condensation of serine and palmitoyl-CoA in the endoplasmic reticulum. After transportation to the Golgi apparatus, these ceramides normally act as precursors for the synthesis of other sphingolipids, such as glycosphingolipids and sphingomyelin (Wattenberg, 2010a). The second source of ceramides derives from specific hydrolysis of sphingomyelin by various forms of sphingomyelinase (SMase) located principally at the cell membrane and in lysosomes (Arboleda et al., 2009).

In cell-surface membranes, generation of ceramides within sphingolipid/cholesterol microdomains (i.e. lipid rafts) is known to favor the formation of large ceramide-enriched membrane platforms, which regulate the clustering of several receptor systems (for review see (Zhang et al., 2009b)). For instance, SMase activities and ceramide production were proposed to be involved in clustering of CD40 and CD95 receptors in lipid raft domains, facilitating B cell activation and cell apoptosis, respectively (Grassme et al., 2002). Cell surface ceramide generation was also postulated to control Fc-gamma receptor II clustering and phosphorylation in lipid rafts, which are important for inducing the phagocytosis of opsonized pathogens (Abdel Shakor et al., 2004). Consistent with a potential role in the regulation of neurotransmitter systems, ceramides were recently implicated in membrane-trafficking events involved in the maintenance of glutamatergic receptors at the membrane surface. In particular, Wheeler and his group demonstrated that ceramides, generated within minutes by the cytokine tumor necrosis factor, are capable of increasing the number of N-methyl-D-aspartate (NMDA) subtype of ionotropic glutamate receptors in lipid rafts of hippocampal synapses (Wheeler et al., 2009).

Initial reports examining the role of ceramides in the regulation of acetylcholine (ACh) receptors indicated that these sphingolipids are possibly involved in controlling the cell-surface expression of the nicotinic subtype of ACh receptors. In particular, using CHO-K1/A5 cells, a clonal cell line that heterologously expresses the adult murine muscle-type of ACh receptors, researchers have determined that ceramides impair the membrane expression of nicotinic receptors, an effect possibly mediated via mechanisms regulating the cell-surface insertion of new receptors from intracellular pools (Baier and Barrantes, 2007, Barrantes, 2007, Gallegos et al., 2008a). Although there is evidence that ceramides can also play an important role in regulating G protein-coupled receptors (Khoa et al., 2006), it remains unclear how these sphingolipids might influence the muscarinic subtypes of ACh receptors in the brain.

In this line of thinking, the goal of the present investigation was to explore whether ceramides can act to modulate both the functional and biochemical properties of muscarinic-subtypes of ACh receptors in hippocampal neurons. Adopting the whole-cell patch technique, we estimated the effects of endogenously-generated ceramides by the capacity of muscarinic receptors to regulate spontaneous inhibitory postsynaptic currents (sIPSCs) resulting from type A  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA<sub>A</sub>) receptor activation in rat hippocampal slices. Here, we present the first evidence that cholinergic modulation of GABA<sub>A</sub> responses can be impaired by ceramide production in CA1 pyramidal cells, an outcome that likely depends on reduction of M1 muscarinic ACh receptors in hippocampal membranes.

## **Materials and Methods**

### *Slice preparation and treatments*

All experiments were approved by the institutional animal care committee and were in accordance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Briefly, male Sprague-Dawley rats (22-40 days) were anesthetized by isoflurane inhalation (Baxter Corp., Mississauga, Ontario, Canada) and decapitated. Their brains were removed and

placed in cold cutting buffer containing (in mM) 126 NaCl, 3.5 KCl, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.3 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub> and 11 glucose, and saturated with 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> (pH ~7.4, 295-310 mOsm). Sagittal brain slices (350 μm thick) containing the hippocampus were prepared with a Vibratome Series 1000 tissue sectioning system in the cutting buffer. The slices were then transferred to artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (in mM): 126 NaCl, 3.5 KCl, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.3 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub> and 11 glucose, bubbled continuously with 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> at 31-32°C and with neutral SMase from *Bacillus cereus* (500 mU/ml) for periods ranging from 1 to 5 hr.

#### *Measurement of SMase activity*

Ceramide levels in rat hippocampal slices were monitored by estimating the formation of the fluorescent product resofurin with a SMase detection kit (Molecular Probes, Eugene, OR), which is based on the capacity of SMase to break down sphingomyelin into phosphorylcholine and ceramides. After various incubation times, control and SMase-treated slices were washed in fresh ACSF and then homogenized in lysis buffer (50 mM Tris, 100 μM EGTA, 5 μM leupeptin, 200 μM phenylmethylsulfonyl fluoride and 1 μg/ml N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone, pH 7.4). Tissue samples (10 μg of proteins) were diluted in 1X reaction buffer (pH 7.4) in a volume of 100 μl, mixed with 100 μM Amplex red working solution containing 2 U/ml horseradish peroxidase (HRP), 0.2 U/ml choline oxidase, 8 U/ml alkaline phosphatase and incubated at 37°C for 35 min. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generated by this enzyme-coupled assay, in the presence of HRP, reacts with Amplex red to finally elicit the fluorescent product resofurin. Fluorescence intensity was measured by FLUOStar OPTIMA scanning multi-well spectrophotometer (BMG Labtech Inc., Durham, NC) at excitation/emission wavelengths of 544/590 nm, in duplicate.

### *Whole-cell recordings*

Slices were transferred to a recording chamber for continuous perfusion at 2-3 ml min<sup>-1</sup> with oxygenated ACSF maintained at 27°C. Pyramidal neurons in the CA1 region were identified visually with an Olympus BX50WI upright microscope equipped with a long-range water immersion objective (40X, LUMPlanFI/IR) and an infrared camera (Cohu 6500, San Diego, CA). The recording pipettes (3-6 MΩ) were prepared from borosilicate capillaries (o.d.: 1.0 mm, i.d.: 0.58 mm) with a P-87 Flaming-Brown micropipette puller (Sutter Instrument Co., Novato, CA). They were then filled with (in mM): 140 CsCl, 5 NaCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, 2 ATP-Mg and 0.3 GTP-tris (pH adjusted to 7.2-7.3 with CsOH, 275-285 mOsm). To prevent action potential generation in recorded cells, QX-314 (5 mM) was incorporated in patch pipettes to block voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. Whole-cell voltage-clamp recordings were conducted in CA1 pyramidal cells voltage-clamped at -70 mV with a Patch-Clamp PC505A amplifier (Warner Instruments, Hamden, USA). GABA<sub>A</sub> receptor-mediated sIPSCs were obtained with a recording ACSF containing 10 μM 2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo [f] quinoxaline-7-sulfonamide (NBQX) and 50 μM (±)-2-amino-5-phosphopentanoic acid (AP5) to block excitatory amino acid receptors. Currents were low-pass filtered at 1 KHz and digitized at 5 KHz. Cells with series resistance varying by more than 20% during the recording period were rejected (series resistance was left uncompensated). sIPSCs were analyzed offline with the automatic event detection tool from pClamp 10, and each synaptic event was accepted after visual inspection.

### *Cell-surface biotinylation and Western blotting*

Hippocampal slices were incubated for 4 hr with or without SMase. After several washes with ACSF bubbled constantly with 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>, each hippocampal slice was incubated in 1 mg/ml sulfosuccinimidyl-2-(biotinamido) ethyl-dithiopropionate (sulfo-NHS-SS-biotin), followed by several washes with sulfo-NHS-SS-biotin blocking reagent (50 mM NH<sub>4</sub>Cl in phosphate-buffered saline (PBS) containing 1 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>) at 4°C to quench free sulfo-NHS-SS-biotin, followed by more than a few washes in ACSF at 4°C. Each slice was homogenized in 100 μl of Tris-acetate buffer



(50 mM, pH 7.4) containing 1 mM EGTA, 1 mM EDTA and numerous protease and phosphatase inhibitors (leupeptin 10  $\mu$ M, phenylmethylsulfonyl fluoride 1  $\mu$ g/ml, and N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone 1  $\mu$ g/ml). The samples were centrifuged for 10 min at 11,070 rpm at 4°C. The supernatants were removed, and the pellets were suspended in fresh, ice-cold Tris acetate buffer. Streptavidin beads (100  $\mu$ l/200  $\mu$ g of proteins) were washed 3 times with Tris acetate buffer. Biotinylated samples (200  $\mu$ g of proteins) were added to the Streptavidin beads (100  $\mu$ l) and mixed at room temperature for 4 hr. The beads were recovered by brief centrifugation, and the supernatants were removed. The beads were then washed 3 times with Tris acetate buffer, and biotinylated samples were eluted from them with 4 X sodium dodecyl sulphate-10% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) loading buffer (containing  $\beta$ -mercapto-ethanol) at 100°C for 10 min. The supernatants were removed, and biotinylated protein levels were detected by SDS-PAGE and immunoblotting.

For Western blotting, protein levels extracted from rat hippocampus sections were first measured by Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA). In most cases, protein lysates (40  $\mu$ g) underwent 10% SDS-PAGE. The separated proteins were transferred to nitrocellulose membranes, and nonspecific binding sites were blocked by incubation for 1 hr at room temperature in PBS, pH 7.4, containing 5% bovine serum albumin (BSA) from Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada). Then, selected primary antibodies for M1 muscarinic receptors or M4 muscarinic receptors were incubated overnight at 4°C. After several washes with 0.7% Tween 20, the blots were incubated for 1 hr at room temperature in specific secondary HRP-conjugated antibody solution. Both primary and secondary antibodies were diluted in Tris buffered saline (TBS)/0.1% Tween 20/0.7% BSA. Immunoreactivity was visualized by chemiluminescence reactions, and the intensity of the bands was quantified by densitometric scanning with Vision Work LS software (UVP Bioimaging, Upland, CA). The densitometry data were expressed as relative optical density.

### *Procedures for Immunoprecipitation*

Hippocampal slices were homogenized and lysed in buffer solution containing 50 mM Tris, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100 and numerous protease and phosphatase inhibitors. Then, hippocampal homogenates (200  $\mu$ g) were incubated with 1  $\mu$ g of primary antibody for 1 night at 4°C with constant rotation, before the addition of 20  $\mu$ g of protein A/G-agarose beads (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA). They were maintained overnight at 4°C with constant rotation. Agarose beads were pelleted by centrifugation at 2,500 rpm (~1,000g) for 5 min at 4°C. After extensive washes (4 to 5 times) with ice-cold lysis buffer, the beads were re-suspended in sample loading buffer, boiled for 4 to 5 min, and subject to SDS-PAGE and Western immunoblotting with antibodies recognizing proteins of interest (i.e. G protein-coupled receptor kinases 2 (GRK-2) and  $\beta$ -arrestins 1/2).

### *Statistical analysis*

Summary data reported in the bar graphs are means  $\pm$  standard error of measurements obtained from different rats. Variations in both ceramide levels and electrophysiological parameters were compared by analysis of variance, followed by Bonferroni's post hoc analysis with Graph Prism version 5.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA). On the other hand, differences in receptor subunit levels were compared by Student's t-tests as the experiments were performed independently. Conventional criteria of statistical significance were established to  $P < 0.05$  values.

## Results

### *SMase impairs pilocarpine-induced enhancement of GABA<sub>A</sub>-mediated responses in CA1 pyramidal cells*

Previous studies have demonstrated that the production of endogenous ceramides by exogenously-applied SMase can impair intercellular trafficking of nicotinic Ach receptors (Gallegos et al., 2008a). To establish whether ceramides can also regulate the muscarinic subtypes of Ach receptors at central synapses, we incubated hippocampal slices in the presence of the neutral form of SMase, an enzyme able to convert sphingomyelin present in cellular membranes to ceramides (Posse de Chaves, 2006). Figure 1 show that, over time, incubation of rat hippocampal slices with SMase resulted in increased ceramide levels. As reported, the effect was maximal 4 hr after SMase application and, at this time point, ceramide levels were almost double relative to the controls.

Electrophysiological experiments on CA1 pyramidal cells indicated that SMase treatment of hippocampal slices did not influence sIPSCs, which were pharmacologically isolated with ACSF containing 10  $\mu$ M NBQX and 50  $\mu$ M AP5 to block excitatory amino acid receptors. In fact, no statistically significant effects on frequency and amplitude of sIPSCs were noted within 4 hr after SMase application (Fig. 2). As expected, these sIPSCs were completely eliminated by 25  $\mu$ M bicuculline ( $n = 4$ ; data not included), confirming that GABA<sub>A</sub>-mediated responses are not influenced by high ceramide levels in pyramidal cells of area CA1 of the hippocampus.

Consistent with a previous report, we documented that GABA<sub>A</sub>-mediated currents are drastically altered after perfusion with medium containing the muscarinic agonist pilocarpine. As depicted in Figure 3A, perfusion of 10  $\mu$ M pilocarpine for 15 min caused a substantial increase in sIPSCs in control slices. In this condition, we observed that both frequency and amplitude of sIPSCs were augmented to maximal levels of  $63 \pm 6\%$  and  $58 \pm 6\%$ , respectively, compared to responses recorded during the baseline period (i.e. before pilocarpine application). The cumulative charge transfer of sIPSCs (sum of the

area under individual sIPSCs), estimated during a 5-s bin, also proved to be enhanced by pilocarpine in CA1 pyramidal cells (Fig. 3A). We found that pilocarpine perfusion resulted in the enhanced cumulative charge transfer of sIPSCs that reached  $140\pm 7\%$  of baseline values in control slices ( $n = 7$ ).

Figure 3B illustrates the capacity of pilocarpine to modulate GABA<sub>A</sub>-mediated currents in SMase-treated slices. In comparison to control neurons, the ability of pilocarpine to increase the frequency, amplitude and cumulative charge transfer of sIPSCs in cells pre-exposed for 4 hr to SMase was completely abolished to values of  $8.3\pm 8\%$ ,  $-5.6\pm 6\%$  and  $4.1\pm 9\%$ , respectively (Fig. 3B). In a different set of experiments, we observed that pilocarpine-induced enhancement of sIPSCs was also substantially attenuated in CA1 pyramidal cells pre-exposed to the C8-ceramide analog (data not reported).

*SMase decreases the membrane surface expression of M1 muscarinic receptors in rat hippocampal slices*

M1 muscarinic receptors are known to be mainly responsible for mediating the postsynaptic action of Ach in the brain (Porter et al., 2002, Dasari and Gullledge, 2011). To establish whether SMase-induced reduction of muscarinic responses depends on alterations of M1 membrane receptors, we first compared the surface expression of these receptors on biotinylated membrane preparations. As depicted in Figure 4A, the surface expression of M1 muscarinic receptors was reduced by almost 50% in biotinylated membranes purified from SMase-treated slices. However, we noted that the total amount of receptors remained unaltered after SMase treatment in hippocampal homogenates, indicating that ceramide production might rather influence intracellular mechanisms underlying M1 muscarinic receptor localization than receptor synthesis and/or degradation. In contrast, immunoblotting experiments on both biotinylated membranes and whole homogenates prepared from rat hippocampal slices suggested that M4 muscarinic receptor levels were not affected by SMase treatment (Fig. 4B), indicating that the effect on M1 muscarinic receptors might be relatively specific.

*SMase increases M1 muscarinic receptor interactions with GRK-2 and  $\beta$ -arrestins*

Because ceramides are known to influence several protein kinases in different experimental conditions (Khoa et al., 2006, Cabral et al., 2010, Turban and Hajduch, 2011a), we postulated that the intracellular sequestration of M1 muscarinic receptors described above may depend on activation of kinases likely to mediate the internalization of G protein-coupled receptors. As a first step, to test this possibility, we undertook experiments on M1-immunoprecipitated materials. In this preparation, the efficiency of GRK-2 in interacting with M1-immunoprecipitated proteins was noticeably increased after SMase treatment (Fig. 5A). Specifically, exposure of hippocampal slices to SMase for 4 hr was found to heighten the ability of GRK-2 to interact with M1 receptors by  $75\pm 6\%$ , compared to untreated slices. On the other hand, experiments performed with the same immunoprecipitated materials indicated that SMase treatment was able to also enhance M1 receptor interactions with  $\beta$ -arrestins. Using an antibody capable of recognizing both  $\beta$ -arrestin 1 and 2 isoforms, we noticed, in SMase-treated slices, that M1 receptor interaction with  $\beta$ -arrestin was significantly accentuated to about 80% of control values (Fig. 5B). These results led us to conclude that after SMase treatment M1 muscarinic receptors might become more sensitive to Ach, increasing their ability to internalize. Accordingly, we noticed that SMase-induced M1 muscarinic receptor reduction in biotinylated hippocampal membranes was completely attenuated in slices pre-treated with 50  $\mu$ M atropine, a competitive antagonist for the muscarinic family of Ach receptors (Fig. 6).

### **Discussion**

Neutral SMase has been reported elsewhere to influence the cell-surface expression of nicotinic Ach receptors (Gallegos et al., 2008a). Employing the whole-cell patch technique, we demonstrated that neutral SMase is also capable of impacting muscarinic receptor properties. According to the present investigation, the efficacy of pilocarpine in enhancing sIPSCs in CA1 pyramidal cells was markedly altered in hippocampal slices pre-exposed to the ceramide-generating enzyme SMase. From a biochemical

perspective, the pattern of results on SMase-treated slices suggests that the enzyme interferes with mechanisms responsible for maintaining M1 muscarinic Ach receptors on hippocampal membranes. How the SMase ceramide pathway causes M1 muscarinic receptor reduction at the membrane surface, whether this effect is mediated by increased Ach release and whether ceramides directly or indirectly affect intracellular mechanisms contributing to receptor internalization remain to be clarified.

Internalization (or sequestration) is a process that participates in the agonist-dependent regulation of many G-protein-coupled receptors, such as muscarinic receptors. Within minutes of agonist exposure, dissociation of G proteins allows phosphorylation of specific serine and threonine residues of the receptors by GRKs. Subsequently, this phosphorylation accentuates  $\beta$ -arrestin binding to first promote receptor desensitization and finally internalization away from its normal membrane environment (Obrenovich et al., 2009b). In fact, it appears that agonist-promoted sequestration is a common regulatory mechanism controlling all subtypes of muscarinic receptors (Chris J. van Koppena, 2003). The present observation that SMase-induced reduction of M1 muscarinic receptors on hippocampal membranes was totally abrogated by the muscarinic receptor antagonist atropine strongly indicates that M1 receptor internalization is probably accentuated by the SMase ceramide pathway.

While it appears that SMase treatment had a significant impact on M1 muscarinic receptor levels in hippocampal membranes, the M4 subtype of muscarinic receptors was not found to be altered under the same conditions. Indeed, the lack of effects on M4 receptor levels in biotinylated membranes suggests that SMase-induced M1 receptor sequestration is probably not dependent on increased Ach release at synaptic junctions. From a biochemical perspective, the family of muscarinic receptors consists of 5 mammalian subtypes, with M1, M3 and M5 subtypes predominantly activating phospholipase C via Gq, and M2 and M4 receptors efficiently inhibiting adenylate cyclase by interacting with Gi proteins (van Koppen and Kaiser, 2003). It has been established previously that M4 receptors are mainly located in the presynaptic elements of neurons, while M1 receptors appear to be highly concentrated in postsynaptic



structures (Sanchez et al., 2009). In this line, we can speculate that the lack of effect of SMase on M4 muscarinic receptors could result from molecular disparities in receptors located among the different structures of neurons. In agreement with such a scenario, there are indications that sequestration of M1 muscarinic receptors is essentially controlled by the enzyme GRK-2, whereas M4 receptor internalization appears to rely preferentially on GRK-5 activity (Walker et al., 2004, Willets et al., 2007). In the current investigation, we observed that exposure of hippocampal slices to SMase accentuated the association of both GRK-2 and  $\beta$ -arrestin with M1 immunoprecipitated proteins. Of course, the absence of effects on M4 muscarinic receptors suggests that GRK-5 activity is probably not influenced by the SMase ceramide pathway.

Our results strongly indicate that the SMase ceramide pathway can induce the sequestration of M1 muscarinic receptors by interacting with both GRK-2 and  $\beta$ -arrestins. However, it is worth mentioning that internalization of M1 muscarinic receptors might also work through arrestin-independent mechanisms (Lee et al., 1998), and we cannot yet rule out the possibility that the SMase ceramide pathway may be interacting with this phenomenon. On the other hand, Gallegos et al. (2008) have demonstrated that the SMase ceramide pathway is possibly inclined to down-regulate Ach nicotinic receptors at the plasma membrane by inhibiting the intracellular machinery contributing to the insertion of new membrane receptors (Gallegos et al., 2008a). Of course, studies will be required to estimate whether or not the SMase ceramide pathway is also implicated in the regulation of cellular processes promoting the insertion of M1 muscarinic receptors on plasma membranes. Another important issue for future investigation includes elucidating the involvement of lipid raft domains in regulating M1 muscarinic receptors.

Since several ceramides can be generated, studies will also be required to examine whether or not the regulation of M1 muscarinic receptors in hippocampal membranes is a phenomenon shared by all ceramide species (i.e. longer versus shorter acyl chain length). On the other hand, it is well-known that activation of the SMase ceramide pathway can initiate the formation of several ceramide derivatives capable of influencing

cell functions. In particular, cleavage of ceramides by ceramidases is known to favor the intracellular accumulation of active metabolites, such as sphingosine and sphingosine-1-phosphate, which are able to modulate numerous cellular events, such as apoptosis and cell proliferation (Dickson, 2008, Nixon, 2009). In this respect, further studies are required to determine whether ceramide derivatives are inclined to reduce M1 muscarinic receptors in hippocampal membranes, and, if so, what role these derivatives play in the regulation of synaptic function.

Independently of the mechanisms involved, our results may have interesting implications for understanding neurological conditions characterized by high ceramide levels in the brain, such as status epilepticus (Mikati et al., 2008a, Mikati et al., 2008b) and Alzheimer's disease (Soderberg et al., 1992, Malaplate-Armand et al., 2006, Marks et al., 2008, Wang et al., 2008). In the latter case, it was recently proposed that serum elevation of ceramides could be an early predictor of memory impairment in Alzheimer's disease (Soderberg et al., 1992, Mielke et al., 2010). Interestingly, cholinergic defects have been incriminated as an important step in Alzheimer's disease, and several experimental lines of evidence have suggested that down-regulation of M1 muscarinic receptors may play a role in Alzheimer's disease pathology by exacerbating both  $\beta$ -amyloid formation and Tau phosphorylation in the brain (Conn et al., 2009). Accordingly, considerable efforts have focused on the development of selective M1 agonists for the treatment of Alzheimer's disease (Conn et al., 2009) and other neurological illnesses (Langmead et al., 2008). Indeed, further studies are required to assess whether ceramides or their metabolites can effectively contribute to Alzheimer's disease by down-regulating M1 muscarinic function.

### **Acknowledgements**

The present work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to Guy Massicotte (Grant 105942) and Michel Cyr (Grant 311763-07). The authors thank the medical editor Ovid Da Silva (IRTC Inc.) for reviewing this manuscript.



## References

- Abdel Shakor AB, Kwiatkowska K, Sobota A. 2004. Cell surface ceramide generation precedes and controls FcγRII clustering and phosphorylation in rafts. *J Biol Chem* 279(35):36778-36787.
- Arboleda G, Morales LC, Benitez B, Arboleda H. 2009. Regulation of ceramide-induced neuronal death: cell metabolism meets neurodegeneration. *Brain Res Rev* 59(2):333-346.
- Baier CJ, Barrantes FJ. 2007. Sphingolipids are necessary for nicotinic acetylcholine receptor export in the early secretory pathway. *J Neurochem* 101(4):1072-1084.
- Barrantes FJ. 2007. Cholesterol effects on nicotinic acetylcholine receptor. *J Neurochem* 103 Suppl 1:72-80.
- Cabral LM, Wengert M, Almeida FG, Caruso-Neves C, Vieyra A, Einicker-Lamas M. 2010. Ceramide-activated protein kinases A and C zeta inhibit kidney proximal tubule cell Na<sup>(+)</sup>-ATPase. *Arch Biochem Biophys* 498(1):57-61.
- Chris J. van Koppena BK. 2003. Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Pharmacology & Therapeutics* 98 :197-220.
- Conn PJ, Jones CK, Lindsley CW. 2009. Subtype-selective allosteric modulators of muscarinic receptors for the treatment of CNS disorders. *Trends Pharmacol Sci* 30(3):148-155.
- Dasari S, Gullledge AT. 2011. M1 and M4 receptors modulate hippocampal pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 105(2):779-792.
- Dickson RC. 2008. Thematic review series: sphingolipids. New insights into sphingolipid metabolism and function in budding yeast. *J Lipid Res* 49(5):909-921.
- Gallegos CE, Pediconi MF, Barrantes FJ. 2008. Ceramides modulate cell-surface acetylcholine receptor levels. *Biochim Biophys Acta* 1778(4):917-930.
- Gangoiti P, Camacho L, Arana L, Ouro A, Granado MH, Brizuela L, Casas J, Fabrias G, Abad JL, Delgado A and others. 2010. Control of metabolism and signaling of simple bioactive sphingolipids: Implications in disease. *Prog Lipid Res* 49(4):316-334.
- Grassme H, Jendrossek V, Bock J, Riehle A, Gulbins E. 2002. Ceramide-rich membrane rafts mediate CD40 clustering. *J Immunol* 168(1):298-307.

- Khoa ND, Postow M, Danielsson J, Cronstein BN. 2006. Tumor necrosis factor- $\alpha$  prevents desensitization of G $\alpha$ q-coupled receptors by regulating GRK2 association with the plasma membrane. *Mol Pharmacol* 69(4):1311-1319.
- Langmead CJ, Watson J, Reavill C. 2008. Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. *Pharmacol Ther* 117(2):232-243.
- Lee KB, Pals-Rylaarsdam R, Benovic JL, Hosey MM. 1998. Arrestin-independent internalization of the m1, m3, and m4 subtypes of muscarinic cholinergic receptors. *J Biol Chem* 273(21):12967-12972.
- Malaplate-Armand C, Florent-Bechard S, Youssef I, Koziel V, Sponne I, Kriem B, Leininger-Muller B, Olivier JL, Oster T, Pillot T. 2006. Soluble oligomers of amyloid-beta peptide induce neuronal apoptosis by activating a cPLA2-dependent sphingomyelinase-ceramide pathway. *Neurobiol Dis* 23(1):178-189.
- Marks N, Berg MJ, Saito M. 2008. Glucosylceramide synthase decrease in frontal cortex of Alzheimer brain correlates with abnormal increase in endogenous ceramides: consequences to morphology and viability on enzyme suppression in cultured primary neurons. *Brain Res* 1191:136-147.
- Mielke MM, Bandaru VV, Haughey NJ, Rabins PV, Lyketsos CG, Carlson MC. 2010. Serum sphingomyelins and ceramides are early predictors of memory impairment. *Neurobiol Aging* 31(1):17-24.
- Mikati MA, Rizk E, El Dada S, Zeinieh M, Kurdi R, El Hokayem J, Rahmeh A, Kobeissi M, Azzam D, Usta J and others. 2008a. Programmed cell death in the lithium pilocarpine model: evidence for NMDA receptor and ceramide-mediated mechanisms. *Brain Dev* 30(8):513-519.
- Mikati MA, Zeinieh M, Habib RA, El Hokayem J, Rahmeh A, El Sabban M, Usta J, Dbaibo G. 2008b. Changes in sphingomyelinases, ceramide, Bax, Bcl(2), and caspase-3 during and after experimental status epilepticus. *Epilepsy Res* 81(2-3):161-166.
- Nixon GF. 2009. Sphingolipids in inflammation: pathological implications and potential therapeutic targets. *Br J Pharmacol* 158(4):982-993.
- Obrenovich ME, Palacios HH, Gasimov E, Leszek J, Aliev G. 2009. The GRK2 Overexpression Is a Primary Hallmark of Mitochondrial Lesions during Early Alzheimer Disease. *Cardiovasc Psychiatry Neurol* 2009:327-360.
- Porter AC, Bymaster FP, DeLapp NW, Yamada M, Wess J, Hamilton SE, Nathanson NM, Felder CC. 2002. M1 muscarinic receptor signaling in mouse hippocampus and cortex. *Brain Res* 944(1-2):82-89.

- Posse de Chaves EI. 2006. Sphingolipids in apoptosis, survival and regeneration in the nervous system. *Biochim Biophys Acta* 1758(12):1995-2015.
- Sanchez G, Alvares Lde O, Oberholzer MV, Genro B, Quillfeldt J, da Costa JC, Cervenansky C, Jerusalinsky D, Kornisiuk E. 2009. M4 muscarinic receptors are involved in modulation of neurotransmission at synapses of Schaffer collaterals on CA1 hippocampal neurons in rats. *J Neurosci Res* 87(3):691-700.
- Soderberg M, Edlund C, Alafuzoff I, Kristensson K, Dallner G. 1992. Lipid composition in different regions of the brain in Alzheimer's disease/senile dementia of Alzheimer's type. *J Neurochem* 59(5):1646-1653.
- Turban S, Hajduch E. 2011. Protein kinase C isoforms: mediators of reactive lipid metabolites in the development of insulin resistance. *FEBS Lett* 585(2):269-274.
- van Koppen CJ, Kaiser B. 2003. Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Pharmacol Ther* 98(2):197-220.
- Walker JK, Gainetdinov RR, Feldman DS, McFawn PK, Caron MG, Lefkowitz RJ, Premont RT, Fisher JT. 2004. G protein-coupled receptor kinase 5 regulates airway responses induced by muscarinic receptor activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286(2):L312-319.
- Wang G, Silva J, Dasgupta S, Bieberich E. 2008. Long-chain ceramide is elevated in presenilin 1 (PS1M146V) mouse brain and induces apoptosis in PS1 astrocytes. *Glia* 56(4):449-56.
- Wattenberg BW. 2010. Role of sphingosine kinase localization in sphingolipid signaling. *World J Biol Chem* 1(12):362-368.
- Wheeler D, Knapp E, Bandaru VV, Wang Y, Knorr D, Poirier C, Mattson MP, Geiger JD, Haughey NJ. 2009. Tumor necrosis factor-alpha-induced neutral sphingomyelinase-2 modulates synaptic plasticity by controlling the membrane insertion of NMDA receptors. *J Neurochem* 109(5):1237-1249.
- Willems JM, Nelson CP, Nahorski SR, Challiss RA. 2007. The regulation of M1 muscarinic acetylcholine receptor desensitization by synaptic activity in cultured hippocampal neurons. *J Neurochem* 103(6):2268-2280.
- Zhang Y, Li X, Becker KA, Gulbins E. 2009. Ceramide-enriched membrane domains--structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1788(1):178-183.

## Figure legends

**Figure 1: Time course formation of ceramides in SMase-treated slices.** Endogenous ceramide formation was monitored at different time intervals ranging from 1 to 5 hr in rat hippocampal slices. At the end of each incubation period, both control and SMase-treated slices were homogenized, and ceramide levels were quantified with a modified SMase detection kit in tissue samples containing 10  $\mu$ g of proteins. The data represent means  $\pm$  standard error (5 samples, in triplicate). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , SMase-treated versus control slices at different time intervals.

**Figure 2: GABA<sub>A</sub> receptor-mediated sIPSCs are not modified in SMase-treated slices.** A) Examples of sIPSCs recorded in control conditions or after hippocampal slice incubation with SMase for 4 hr. B) Summary data on the frequency and amplitude of sIPSCs recorded in controls and neurons pre-exposed to SMase are shown in the bar graph (means  $\pm$  standard error of measurements obtained from 6 different rats).

**Figure 3: Impairment of cholinergic-induced modulation of GABA<sub>A</sub> receptor-mediated sIPSCs in SMase-treated slices.** Examples of sIPSCs recorded in control (A) and SMase-treated (B) slices before and after hippocampal perfusion with 10  $\mu$ M pilocarpine. Enhancement of frequency, amplitude and total charge transfer resulting from muscarinic receptor activation was measured in each cell relative to responses recorded before pilocarpine application (i.e. baseline). Summary data on the frequency, amplitude and total charge transfer of sIPSCs recorded in control cells and cells pre-exposed to SMase are shown in the bar graph (means  $\pm$  standard error of measurements obtained from 7 different rats). \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , pilocarpine versus baseline. Note that the ability of pilocarpine to increase GABA<sub>A</sub> receptor-mediated sIPSCs is totally abrogated after SMase treatment (4 hr).

**Figure 4: Cell-surface expression of M1 muscarinic receptors is reduced in SMase-treated slices.** M1 and M4 receptor levels were estimated by Western blotting procedures on biotinylated membranes and whole homogenates obtained from acute hippocampal slices. Biotinylated receptor levels were normalized with respective total protein levels estimated in whole homogenates from slices incubated with or without SMase. Summary data on M1 (A) and M4 (B) receptor levels are shown in the bar graph (means  $\pm$  standard error of 7 different experiments). Since these experiments were performed independently, statistical significance was estimated by conventional unpaired t-test. \*\*\*P<0.001, SMase-treated (4 hr) versus controls.

**Figure 5: SMase treatment promotes GRK-2 and  $\beta$ -arrestin interactions with M1 immunoprecipitated proteins.** Hippocampal slices treated with and without SMase were homogenized, and tissue samples were immunoprecipitated with anti-M1 muscarinic antibody. Western blotting of M1 immunoprecipitated materials was then undertaken to detect both GRK-2 and  $\beta$ -arrestin1/2 proteins. Summary data on GRK-2 (A) and  $\beta$ -arrestin1/2 (B) levels are shown in the bar graph (means  $\pm$  standard error of 6 different experiments). As in Figure 5, statistical significance was estimated by conventional unpaired t-test. \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, SMase-treated (4 hr) versus the controls.

**Figure 6: SMase-induced reduction of cell-surface expression of M1 muscarinic receptors is impaired by the muscarinic antagonist atropine.** M1 receptor levels were estimated by Western blotting procedures on biotinylated membranes obtained from acute hippocampal slices. Biotinylated receptor levels were normalized with respective total protein levels estimated in whole homogenates from slices incubated with or without SMase. Summary data on M1 receptor levels detected in slices pre-incubated with and without the muscarinic antagonist atropine are shown in the bar graph (means  $\pm$  standard error of 5 different experiments). As in Figure 5, statistical significance was estimated by conventional unpaired t-test. \*\*P<0.01, SMase-treated (4 hr) versus the controls.

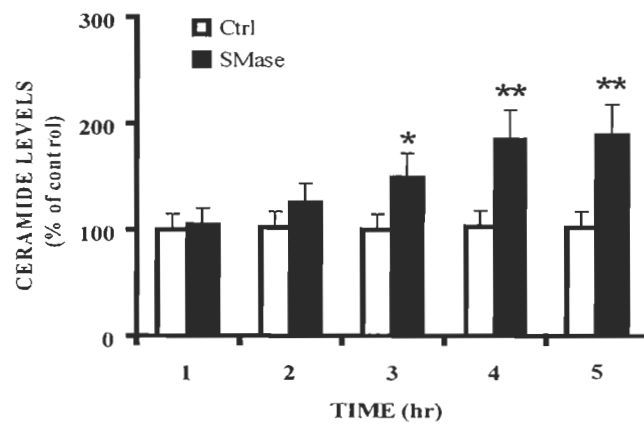


Figure 1 (Dontigny et al.)

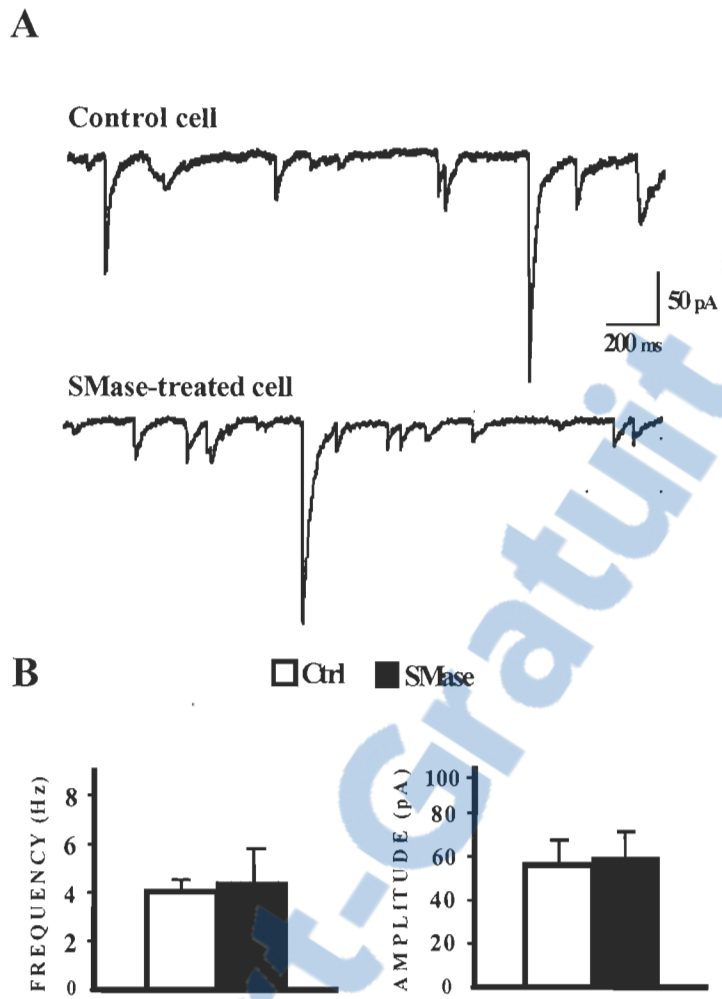
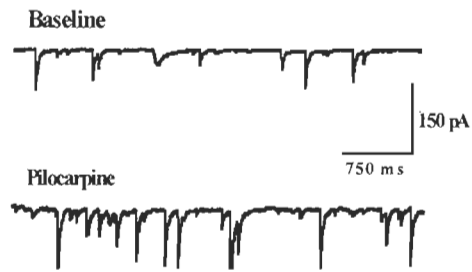


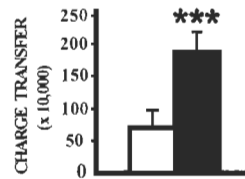
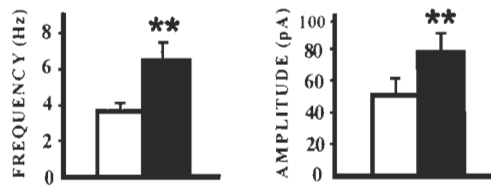
Figure 2 (Dontigny et al.)



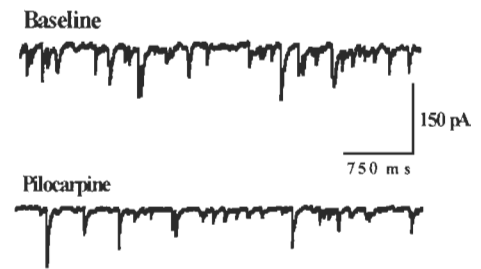
## A) Control cell



□ Baseline ■ Pilocarpine



## B) SMase-treated cell



□ Baseline ■ Pilocarpine

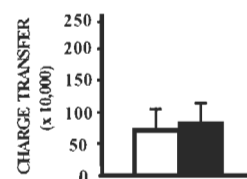
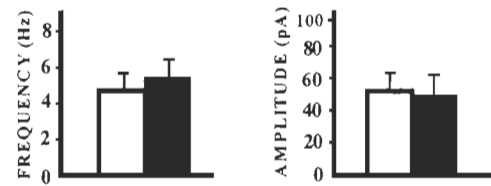


Figure 3 (Dontigny et al.)

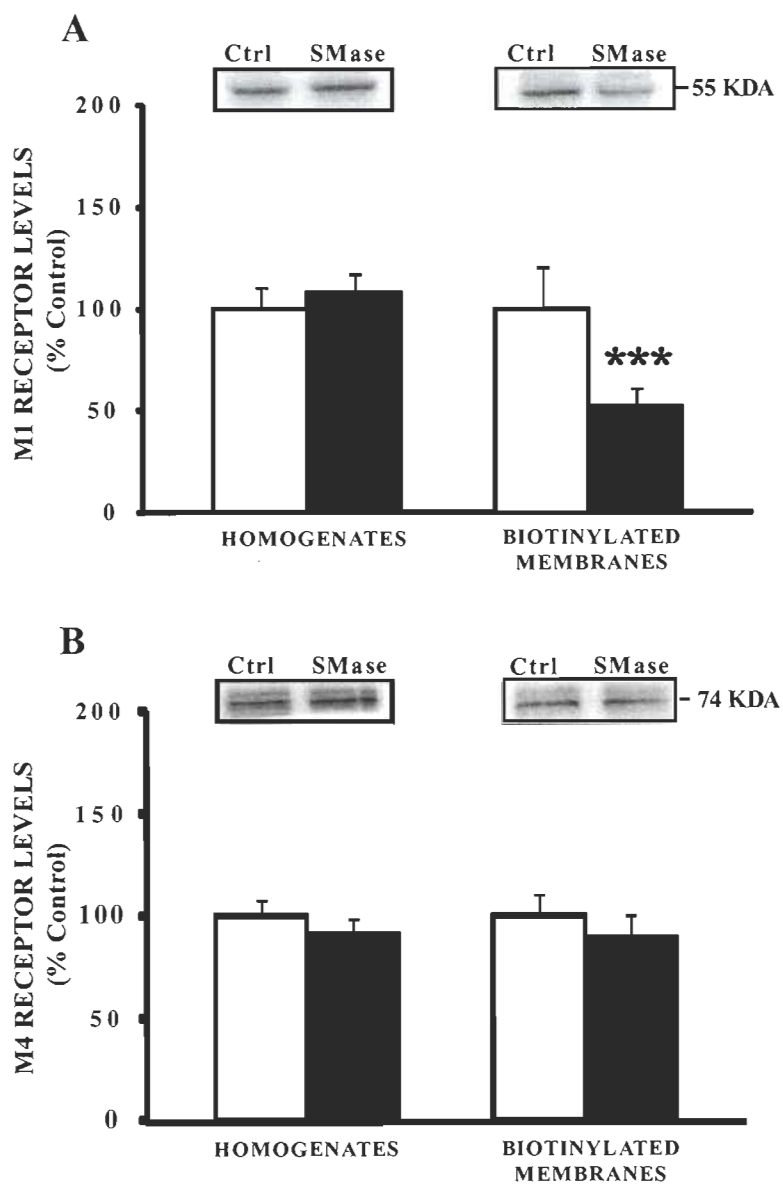


Figure 4 (Dontigny et al.)

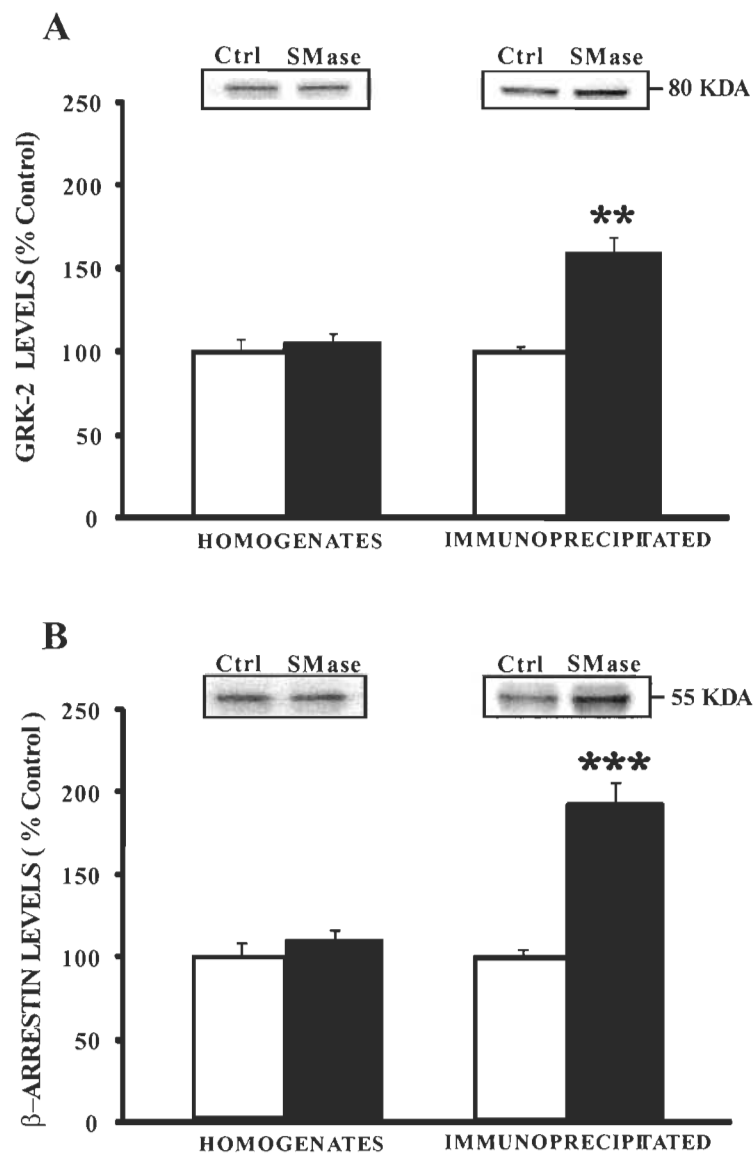


Figure 5 (Dontigny et al.)

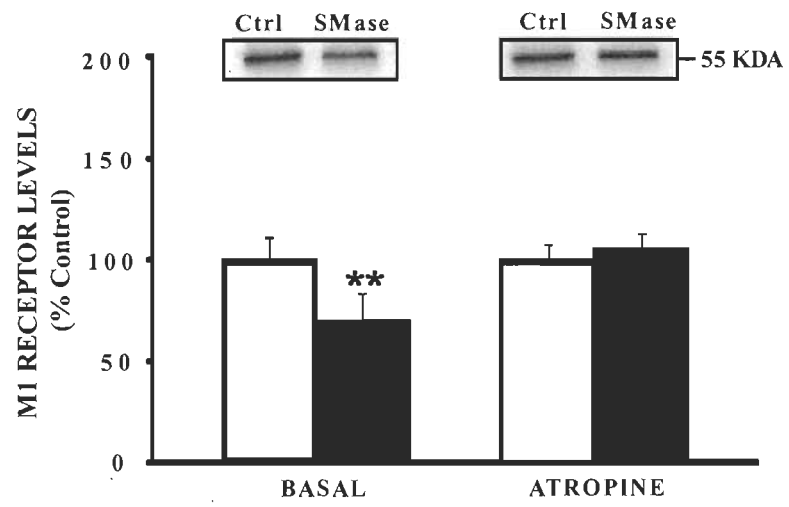


Figure 6 (Dontigny et al.)

## CHAPITRE V

### DISCUSSION

Un nombre intéressant de découvertes ont été effectuées relativement aux rôles joués par les récepteurs cholinergiques dans l'apprentissage et la mémoire. Par ailleurs, plusieurs études font valoir que la démence de type Alzheimer cible principalement la structure hippocampale, une région du cerveau enrichie en récepteurs muscariniques de type M1. Ceux-ci poseraient problème dans cette affection puisque des recherches récentes démontrent que la perte de fonction des récepteurs M1 de l'ACh serait en partie responsable de l'apparition du déficit cognitif chez les sujets Alzheimer.

Dans un ouvrage récent, des chercheurs ont démontré que la hausse de céramides dans le cerveau et le sang constitue un facteur déterminant dans la maladie d'Alzheimer. En effet, Mielke et ses collaborateurs ont estimé que l'augmentation des taux sanguins en céramides accroît de plus de dix fois le risque de développer la démence Alzheimer chez la femme âgée (Mielke and Haughey, 2012). La présente recherche donne à penser que l'accumulation de céramides dans le cerveau intervient dans la capacité des cellules nerveuses à livrer des récepteurs M1 à la surface des neurones. Les considérations fonctionnelles, biochimiques et pathologiques de cette observation sont prises en compte dans cette discussion.

#### **5.1 Céramides et régulation muscarinique des réponses inhibitrices de l'hippocampe**

En appliquant une enzyme responsable de la synthèse membranaire de céramides, la SMase, on rapporte dans la présente étude que ces sphingolipides sont également en mesure de réduire le nombre de récepteurs M1 de l'ACh. Ce travail révèle également que ce traitement entraîne une perte d'intégrité fonctionnelle de ces récepteurs, à savoir une incapacité de la pilocarpine (un agoniste muscarinique) à moduler l'activité

inhibitrice de type GABA<sub>A</sub> exercée sur les neurones pyramidaux de l'hippocampe. Cependant, on connaît toujours mal les fonctions physiologiques de cette modulation GABAergique par les récepteurs muscariniques, mais elle pourrait s'avérer essentielle pour la mise en œuvre des processus de plasticité synaptique requise pour la formation des souvenirs et l'ébauche de la rythmicité neuronale dans le cerveau (Teles-Grilo Ruivo and Mellor, 2013).

Les théories actuelles suggèrent un lien entre plasticité synaptique et mémoire (Sugisaki et al., 2011). Dans l'hippocampe, la modulation des mécanismes électrophysiologiques, qui sont la potentialisation (LTP) et la dépression à long-terme (LTD) des circuits glutamatergiques, semble constituer une étape incontournable de l'adaptation neuronale lors du stockage des informations. Le développement de ces phénomènes électrophysiologiques de plasticité synaptique est le fruit de nombreuses interactions neurochimiques faisant intervenir de multiples neurotransmetteurs, principalement le glutamate, mais également le GABA et l'ACh. Sur ce plan, on a établi que les récepteurs muscariniques de l'hippocampe sont des acteurs importants qui façonnent l'orientation de la plasticité des synapses glutamatergiques de l'hippocampe (Sugisaki et al., 2011). Les études sur le sujet ont montré, par exemple, que l'inhibition de réponse inhibitrice de type GABA par les récepteurs muscariniques de type M2 contribue à limiter l'effet inhibiteur des neurones GABAergiques sur les neurones pyramidaux et, conséquemment, à faciliter l'apparition de la LTP (Takkala and Woodin, 2013). Les récepteurs M1 de l'ACh ne seraient pas en reste et contribueraient avec les récepteurs NMDA du glutamate à moduler l'activité dendritique des canaux potassiques voltages-dépendants de type Kv4.2 dans le but de faciliter l'apparition de LTP (Losonczy et al., 2008).

Les modifications des récepteurs M1 de l'ACh par les céramides peuvent vraisemblablement contribuer à la détérioration des mécanismes de la plasticité neuronale requis pour le stockage des souvenirs. Bien qu'on ne connaisse que peu de choses sur l'influence apportée par les céramides sur la plasticité hippocampale, une étude publiée par Maalouf et Rho en 2008 tente à établir que la production de céramides

dans l'hippocampe est un facteur important capable de limiter la formation de la LTP dans cette partie du cerveau (Maalouf and Rho, 2008). Les mécanismes sous-jacents par lesquels les céramides exercent un effet négatif sur la LTP restent à préciser, mais pourraient impliquer l'activation d'une enzyme de déphosphorylation, la protéine phosphatase 2A (ou PP2A). Nos résultats d'électrophysiologie et de biochimie incitent à penser que la perte de réponse muscarinique de type M1 dans l'hippocampe peut contribuer aux effets nuisibles apportés par les céramides sur la plasticité du cerveau. Évidemment, une meilleure compréhension des effets apportés sur la fonction cholinergique par les céramides notamment sur la LTP pourrait être, d'un grand intérêt pour l'élucidation des mécanismes sous-jacents à l'apparition du déficit cholinergique dans la maladie d'Alzheimer.

Outre son implication dans la plasticité synaptique, l'ACh est également un important régulateur de la rythmicité neuronale des circuits inhibiteurs et excitateurs. On a ainsi trouvé que les projections cholinergiques acheminées du septum médian vers la région CA1 de l'hippocampe contribuent à façonner le territoire synaptique de manière à le rendre plus propice au stockage des souvenirs (Teles-Grilo Ruivo and Mellor, 2013). Il est intéressant de noter, à cet effet, que la modulation cholinergique de l'activité rythmique de type gamma dans l'hippocampe requiert l'activation des récepteurs M1 de l'ACh. À cet effet, Fisahn et ses collaborateurs ont montré, en 2002, que chez les souris transgéniques dépourvues en récepteurs M1, la rythmicité neuronale de type gamma est inexistante, confirmant le rôle central de l'ACh dans le contrôle fonctionnel de l'hippocampe (Fisahn et al., 2002).

Les résultats de la présente étude indiquent que l'efficacité des récepteurs muscariniques à engager la rythmicité GABAergique sur les neurones pyramidaux de l'hippocampe est complètement compromise par l'accumulation de céramides. Une observation nouvelle qui laisse penser qu'un taux élevé de céramides dans le cerveau serait susceptible de perturber les activités rythmiques du cerveau. Une histoire à suivre.



## 5.2 Céramides et internalisation des récepteurs muscariniques de type M1 dans l'hippocampe

La présente étude a bien mis en évidence que la perte de l'influence muscarinique exercée par les céramides sur les réponses GABAergiques dérive fort probablement d'une réduction du nombre de récepteurs M1 dans les membranes neuronales. En étudiant les relations entre GRK et protéines immunoprécipitées à l'aide d'un anticorps ciblant les sous-unités M1, nos résultats confirment que la production de céramides par la SMase neutre favorise la fixation de GRK-2 avec les récepteurs M1. Il en résulte également une fixation accrue de la protéine  $\beta$ -arrestine aux récepteurs.

Tel que mentionné précédemment, la phosphorylation des récepteurs M1 par la GRK se traduit par le recrutement à la membrane plasmique de la  $\beta$ -arrestine, qui verra à établir une connexion avec le récepteur membranaire. Cette étape précise signe l'arrêt de la signalisation cellulaire induite par le récepteur fonctionnel. Une fois à la membrane, la  $\beta$ -arrestine devient alors un partenaire essentiel de la machinerie d'endocytose en assurant, entre autres, l'internalisation des récepteurs (Shenoy and Lefkowitz, 2003). Ces observations plaident donc en faveur d'une facilitation de l'internalisation des récepteurs M1 par les céramides dans l'hippocampe. Ce phénomène semble toutefois concerner davantage les récepteurs muscariniques localisés dans les compartiments postsynaptiques, comme ceux de type M1. Notre étude montre, en effet, que l'internalisation des récepteurs de type M4, principalement situés sur les membranes présynaptiques, n'est d'aucune manière facilitée par l'accumulation de céramides dans les tranches d'hippocampe.

Les GRK sont des enzymes habituellement situées dans le cytosol cellulaire. Elles doivent donc se déplacer par un processus dit de « translocation » vers la membrane plasmique pour assurer la désensibilisation des récepteurs aux protéines G, comme ceux de la famille muscarinique. Les mécanismes par lesquels les GRK cytosoliques sont transloquées à la membrane cellulaire après activation du récepteur varient d'une kinase à l'autre. Le processus de prénylation qui consiste à l'ajout d'acides gras sur les cystéines contenant un motif C-terminal particulier (CAAX) serait susceptible de favoriser la

translocation de GRK-1 vers la membrane cellulaire (Christiansen et al., 2011). La palmitoylation qui réfère quant à elle à la capacité du palmitate à fixer certaines protéines serait un processus davantage susceptible de contrôler la translocation de GRK-4 (Krupnick and Benovic, 1998, Penn et al., 1998). Dans le contexte de la présente étude, une fixation accrue de GRK-2 à la membrane plasmique semble survenir à la suite d'une production de céramides par la SMase neutre. On pourrait donc imaginer que les céramides générés dans la cellule puissent, par leurs interactions avec GRK-2, favoriser le processus de translocation. On ignore cependant si une telle interaction biochimique céramide/GRK-2 existe bel et bien.

On le sait, les céramides sont des lipides très hétérogènes qui établissent des liens étroits avec de nombreuses protéines kinases susceptibles de réguler l'activité des GRK (Khoa et al., 2006, Cabral et al., 2010, Turban and Hajduch, 2011b). Par exemple, GRK-2 et GRK-5 sont des substrats de la protéine kinase C (PKC). Les conséquences fonctionnelles de la phosphorylation de ces deux enzymes sont toutefois différentes. La GRK-2 est rapidement activée par la protéine kinase C (Chuang et al., 1995), alors que l'activité enzymatique de GRK-5 est fortement réduite (Pronin et al., 1997). Concernant l'influence de la protéine kinase C sur GRK-2, les choses semblent bien complexes. Par exemple, on sait que la phosphorylation de GRK-2 par une protéine C dite atypique (l'isoforme delta) a pour effet d'augmenter la phosphorylation des substrats de GRK-2 (Ruvolo, 2003). Curieusement, des chercheurs ont récemment constaté que l'activité phosphorylante de GRK-2 peut être réduite par l'action d'une autre protéine kinase C, l'isoforme dite delta (Bessa et al., 2013). Bien entendu, la présente étude ne nous dit rien de l'implication de ces différentes isoformes de protéine kinase C sur la régulation de GRK-2 par les céramides. Or, cet aspect expérimental pourrait éventuellement constituer un jalon important de la compréhension des mécanismes sous-jacents à la régulation des récepteurs M1 par les céramides.

### 5.3 Céramides et dérivés bioactifs

Dans l'organisme, les céramides donnent naissance à de nombreux métabolites actifs comme la sphingosine, issue principalement de l'action des céramidases, de même que la sphingosine-1-phosphate (S1P) provenant de l'action des sphingosines kinases. La S1P générée par les cellules peut agir en se liant à l'un des cinq récepteurs de la S1P (S1P1-5 de type RCPG), et ce, afin d'influencer bon nombre de fonctions cellulaires comme la prolifération, la migration, l'invasion et la survie (Maceyka et al., 2012).

Dans le contexte de l'étude des modifications biochimiques impliquées dans la régulation des processus de translocation des protéines membranaires, quelques équipes s'intéressent aux rôles de la S1P. Dans un article récent, Usatyuk et ses collègues ont démontré que la translocation membranaire d'une protéine du cytosquelette, la coronine, survient à la suite de l'activation des récepteurs S1P. Détail intéressant, les chercheurs ont été à même de constater que cette translocation requiert avant toute chose une activité soutenue en protéine kinase C de type atypique (Usatyuk et al., 2013). La question des liens entre l'accumulation potentielle de ces métabolites et la régulation des récepteurs M1 muscariniques par les dérivés des céramides n'a pas été considérée dans le cadre de la présente étude. Dans ce contexte, nous pourrions imaginer que la production de S1P, découlant de l'accumulation de céramides, serait de nature à activer une protéine kinase C susceptible d'agir sur GRK-2 et ainsi favoriser l'internalisation des récepteurs M1. Il ne s'agit bien sûr que d'une hypothèse que nous souhaiterions valider dans le futur.

### 5.4 Céramides et pathologie Alzheimer

Il faut bien le reconnaître, les conséquences de l'affaiblissement des influences muscariniques par les céramides restent bien mystérieuses. Il se pourrait toutefois qu'elles puissent contribuer à l'élagage des fonctions cognitives dépendantes de l'activation des récepteurs muscariniques de type M1 comme la reconnaissance de l'environnement spatial. Or, au-delà de la régulation des mécanismes de mémorisation,

les récepteurs M1 de l'ACh peuvent également contribuer à activer des voies de signalisation intracellulaire susceptibles de limiter la production des peptides A $\beta$ ; principaux agents diaboliques engagés dans le développement de la mort neuronale chez les sujets Alzheimer.

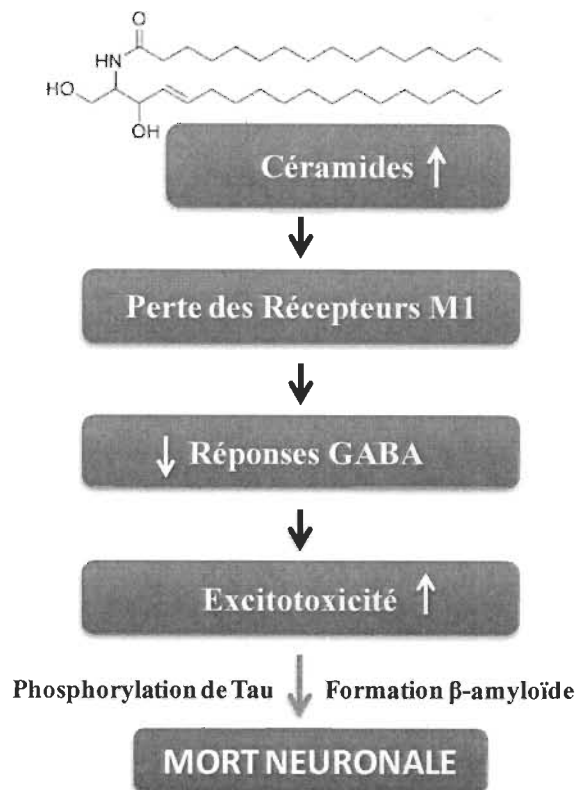
La preuve de ce concept voulant qu'un effondrement des réponses muscariniques de type M1 puisse contribuer à l'accumulation des peptides A $\beta$  apparaît envisageable sur le plan fondamental. En effet, des études portant sur l'ablation génétique des récepteurs M1 de l'ACh nous en apprennent beaucoup sur cette possibilité. Précisément, l'élimination des récepteurs M1 de l'ACh dans le cerveau aboutit à la production des peptides A $\beta$  et la formation des plaques d'amyloïdes chez des souris modèles de la maladie d'Alzheimer, notamment celles porteuses de mutations au niveau de la protéine précurseur de l'A $\beta$ , l'APP (Davis et al., 2010). Or, la possibilité de limiter simultanément la production de peptides A $\beta$  et la formation des plaques d'amyloïdes par l'activation des récepteurs cholinergiques ouvre des perspectives particulièrement intéressantes pour la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques de la maladie d'Alzheimer. Dans ce contexte, ces résultats ont incité au développement de plusieurs agonistes sélectifs du récepteur M1 comme le AF102B qui favorise une réduction des peptides A $\beta$  dans le liquide céphalorachidien, le composé AF276B qui entraîne l'élimination ERK-dépendante des plaques amyloïdes dans l'hippocampe et, plus récemment, le TBPB, un régulateur allostérique positif du récepteur M1 qui diminue la production de peptides A $\beta$  via une modulation des récepteurs glutamatergiques de type NMDA (Nitsch et al., 2000, Jones et al., 2008).

Le développement des agonistes sélectifs du récepteur M1 permettront d'autre part de limiter l'activation de la SMase neutre suite à la diminution des peptides A $\beta$ . Il fut établi par Lee et ses collaborateurs (Lee et al., 2004) que l'augmentation de la  $\beta$ -amyloïde favorise l'activation de la SMase neutre et conséquemment la formation excessive de céramides. Par contre le mécanisme exact qui sous-tend l'activation de la SMase par la  $\beta$ -amyloïde reste encore à élucider. Les chercheurs croient toutefois que le glutathion SH (GSH), composé ubiquitaire assurant le potentiel d'oxydo-réduction dans la cellule

eucaryote, y serait pour quelque chose puisqu'il est connu que la diminution du contenu en GSH entraîne l'augmentation de l'activité de la SMase neutre (Ichi et al. 2009). De plus, il fut démontré qu'une hausse des peptides A $\beta$  dans la cellule diminue le niveau de GSH (Muller et al, 1997, Pereira et al. 1999). Lançant ainsi l'hypothèse que la diminution du niveau de GSH, suite à l'accumulation des peptides A $\beta$ , activerait la SMase. Une histoire à suivre.

## 5.5 Conclusion

Les observations recueillies dans le cadre du présent travail nous invitent à mieux considérer l'augmentation des céramides comme mécanisme cellulaire susceptible de contribuer au développement du déficit cholinergique dans la maladie d'Alzheimer. Sous l'action de ces lipides complexes, la signalisation cellulaire serait modifiée à la faveur d'une réduction du nombre de récepteurs muscariniques de type M1. Il en résulterait une réduction d'influence cholinergique sur les neurones pyramidaux de l'hippocampe, se caractérisant par une incapacité des récepteurs M1 à entretenir l'influence inhibitrice exercée sur ces neurones. De façon générale, on tend à imaginer la neurodégénérescence de type Alzheimer comme le résultat de processus délétères faisant intervenir l'activation excessive des récepteurs NMDA du glutamate et la mise en œuvre du processus d'excitotoxicité (Ong et al., 2013). Selon cette façon de voir, on pourrait imaginer le déclin cognitif dans la maladie d'Alzheimer comme le fruit d'une déficience muscarinique, induite par les céramides, ayant comme ultime conséquence la perte de modulation des réponses inhibitrices, et ce, à la faveur des effets toxiques des récepteurs NMDA. La figure 5.1 présente notre modèle intégrateur des modifications apportées par les céramides sur ces différents systèmes de neurotransmission et leurs effets potentiels dans le développement de la pathologie Alzheimer.



**Figure 5.1** Schéma intégrateur des modifications apportées par les céramides sur les systèmes de neurotransmissions.

Depuis la découverte du déficit cholinergique dans la maladie d'Alzheimer, la recherche en biologie cellulaire s'est efforcée de comprendre les mécanismes susceptibles de limiter cette atteinte neurochimique. Des médicaments dont l'action est essentiellement d'accroître le contenu du cerveau en ACh ont été développés et homologués par de multiples agences de santé. Or, après des années d'utilisation clinique, les données recueillies semblent malheureusement converger vers la conclusion que ces médicaments n'améliorent que très peu les fonctions cognitives des sujets Alzheimer (Giacobini, 2001, Courtney et al., 2004). L'idée qui se dégage du présent mémoire est que le fait d'accumuler des céramides dans le cerveau est à même de réduire le nombre de récepteurs muscariniques M1 à la surface des neurones et, conséquemment, de limiter l'efficacité des médicaments procholinergiques. Il faut bien le reconnaître, les nouvelles décevantes se multiplient sur le terrain des essais cliniques contre la maladie d'Alzheimer et nos observations laissent présager que l'action potentiellement néfaste

des céramides sur les récepteurs muscariniques rendra sans doute plus difficile le traitement de cette maladie. Par contre, en incorporant l'action des céramides sur les récepteurs M1 dans un modèle biochimique cohérent, une thérapie plus appropriée devrait éventuellement voir le jour.



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel Shakor AB, Kwiatkowska K, Sobota A (Cell surface ceramide generation precedes and controls FcγRII clustering and phosphorylation in rafts. *J Biol Chem* 279:36778-36787.2004).
- Anagnostaras SG, Murphy GG, Hamilton SE, Mitchell SL, Rahnama NP, Nathanson NM, Silva AJ (Selective cognitive dysfunction in acetylcholine M1 muscarinic receptor mutant mice. *Nat Neurosci* 6:51-58.2003).
- Arboleda G, Morales LC, Benitez B, Arboleda H (Regulation of ceramide-induced neuronal death: cell metabolism meets neurodegeneration. *Brain Res Rev* 59:333-346.2009).
- Baier CJ, Barrantes FJ (Sphingolipids are necessary for nicotinic acetylcholine receptor export in the early secretory pathway. *J Neurochem* 101:1072-1084.2007).
- Barker GR, Warburton EC (Critical role of the cholinergic system for object-in-place associative recognition memory. *Learn Mem* 16:8-11.2009).
- Barrantes FJ (Cholesterol effects on nicotinic acetylcholine receptor. *J Neurochem* 103 Suppl 1:72-80.2007).
- Bartke N, Hannun YA (Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J Lipid Res* 50 Suppl:S91-96.2009).
- Ben-David O, Futerman AH (The role of the ceramide acyl chain length in neurodegeneration: involvement of ceramide synthases. *Neuromolecular Med* 12:341-350.2010).
- Bessa C, Pereira C, Leao M, Maciel C, Gomes S, Goncalves J, Corte-Real M, Costa V, Saraiva L (Using yeast to uncover the regulation of protein kinase Cδ by ceramide. *FEMS Yeast Res.*2013).
- Bowen DM, Smith CB, White P, Davison AN (Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain* 99:459-496.1976).
- Bowen DM, White P, Spillane JA, Goodhardt MJ, Curzon G, Iwangoff P, Meier-Ruge W, Davison AN (Accelerated ageing or selective neuronal loss as an important cause of dementia? *Lancet* 1:11-14.1979).

- Cabral LM, Wengert M, Almeida FG, Caruso-Neves C, Vieyra A, Einicker-Lamas M (Ceramide-activated protein kinases A and C zeta inhibit kidney proximal tubule cell Na(+)-ATPase. *Arch Biochem Biophys* 498:57-61.2010).
- Caulfield MP, Birdsall NJ (International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 50:279-290.1998).
- Chakraborty M, Jiang XC (Sphingomyelin and its role in cellular signaling. *Adv Exp Med Biol* 991:1-14.2013).
- Chris J. van Koppena BK (Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Pharmacology & Therapeutics* 98 :197-220.2003).
- Christiansen JR, Kolandaivelu S, Bergo MO, Ramamurthy V (RAS-converting enzyme 1-mediated endoproteolysis is required for trafficking of rod phosphodiesterase 6 to photoreceptor outer segments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:8862-8866.2011).
- Chuang TT, LeVine H, 3rd, De Blasi A (Phosphorylation and activation of beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *J Biol Chem* 270:18660-18665.1995).
- Conn PJ, Jones CK, Lindsley CW (Subtype-selective allosteric modulators of muscarinic receptors for the treatment of CNS disorders. *Trends Pharmacol Sci* 30:148-155.2009).
- Courtney C, Farrell D, Gray R, Hills R, Lynch L, Sellwood E, Edwards S, Hardyman W, Raftery J, Crome P, Lendon C, Shaw H, Bentham P (Long-term donepezil treatment in 565 patients with Alzheimer's disease (AD2000): randomised double-blind trial. *Lancet* 363:2105-2115.2004).
- Cutler RG, Kelly J, Storie K, Pedersen WA, Tammara A, Hatanpaa K, Troncoso JC, Mattson MP (Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2070-2075.2004).
- Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind S, Spiegel S (Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* 381:800-803.1996).
- Dasari S, Gullledge AT (M1 and M4 receptors modulate hippocampal pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 105:779-792.2011).

- Davis AA, Fritz JJ, Wess J, Lah JJ, Levey AI (Deletion of M1 muscarinic acetylcholine receptors increases amyloid pathology in vitro and in vivo. *J Neurosci* 30:4190-4196.2010).
- Dickson RC (Thematic review series: sphingolipids. New insights into sphingolipid metabolism and function in budding yeast. *J Lipid Res* 49:909-921.2008).
- Eglen RM (Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. *Auton Autacoid Pharmacol* 26:219-233.2006).
- Fisahn A, Yamada M, Duttaroy A, Gan JW, Deng CX, McBain CJ, Wess J (Muscarinic induction of hippocampal gamma oscillations requires coupling of the M1 receptor to two mixed cation currents. *Neuron* 33:615-624.2002).
- Fisher A (Cholinergic treatments with emphasis on m1 muscarinic agonists as potential disease-modifying agents for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* 5:433-442.2008).
- Fisher A (Cholinergic modulation of amyloid precursor protein processing with emphasis on M1 muscarinic receptor: perspectives and challenges in treatment of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 120 Suppl 1:22-33.2012).
- Flynn DD, Ferrari-DiLeo G, Mash DC, Levey AI (Differential regulation of molecular subtypes of muscarinic receptors in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 64:1888-1891.1995).
- Flynn DD, Weinstein DA, Mash DC (Loss of high-affinity agonist binding to M1 muscarinic receptors in Alzheimer's disease: implications for the failure of cholinergic replacement therapies. *Ann Neurol* 29:256-262.1991).
- Gallegos CE, Pediconi MF, Barrantes FJ (Ceramide modulate cell-surface acetylcholine receptor levels. *Biochim Biophys Acta* 1778:917-930.2008a).
- Gangoiti P, Camacho L, Arana L, Ouro A, Granado MH, Brizuela L, Casas J, Fabrias G, Abad JL, Delgado A, Gomez-Munoz A (Control of metabolism and signaling of simple bioactive sphingolipids: Implications in disease. *Prog Lipid Res* 49:316-334.2010).
- Giacobini E (Do cholinesterase inhibitors have disease-modifying effects in Alzheimer's disease? *CNS Drugs* 15:85-91.2001).

- Giacobini E, DeSarno P, Clark B, McIlhany M (The cholinergic receptor system of the human brain: neurochemical and pharmacological aspects in aging and Alzheimer. *Prog Brain Res* 79:335-343.1989).
- Gorski J, Dobrzyn A, Zendzian-Piotrowska M (The sphingomyelin-signaling pathway in skeletal muscles and its role in regulation of glucose uptake. *Ann N Y Acad Sci* 967:236-248.2002).
- Grassme H, Jendrossek V, Bock J, Riehle A, Gulbins E (Ceramide-rich membrane rafts mediate CD40 clustering. *J Immunol* 168:298-307.2002).
- Grothe M, Heinsen H, Teipel SJ (Atrophy of the cholinergic Basal forebrain over the adult age range and in early stages of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 71:805-813.2012).
- Haidar J (2012) Rôle du galactosylcéramide dans l'inhibition de l'apoptose induite par la daunorubicine: Implication potentielle des cavéoles. In: *Biologie, Santé: Université de Toulouse*.
- Han X, D MH, McKeel DW, Jr., Kelley J, Morris JC (Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease: potential role in disease pathogenesis. *J Neurochem* 82:809-818.2002).
- Hannun YA (The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J Biol Chem* 269:3125-3128.1994).
- Hannun YA (Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* 274:1855-1859.1996).
- Hasselmo ME, Sarter M (Modes and models of forebrain cholinergic neuromodulation of cognition. *Neuropsychopharmacology* 36:52-73.2011).
- Haughey NJ, Bandaru VV, Bae M, Mattson MP (Roles for dysfunctional sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease neuropathogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1801:878-886.2010).
- He X, Huang Y, Li B, Gong CX, Schuchman EH (Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 31:398-408.2010).
- Hejazi L, Wong JW, Cheng D, Proschogo N, Ebrahimi D, Garner B, Don AS (Mass and relative elution time profiling: two-dimensional analysis of sphingolipids in Alzheimer's disease brains. *Biochem J* 438:165-175.2011).

- Hogg RC, Raggenbass M, Bertrand D (Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 147:1-46.2003).
- Holman D, Henley JM (A novel method for monitoring the cell surface expression of heteromeric protein complexes in dispersed neurons and acute hippocampal slices. *J Neurosci Methods* 160:302-308.2007).
- Hulme EC, Birdsall NJ, Buckley NJ (Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30:633-673.1990).
- Huwiler A, Kolter T, Pfeilschifter J, Sandhoff K (Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochim Biophys Acta* 1485:63-99.2000).
- Jones CK, Brady AE, Davis AA, Xiang Z, Bubser M, Tantawy MN, Kane AS, Bridges TM, Kennedy JP, Bradley SR, Peterson TE, Ansari MS, Baldwin RM, Kessler RM, Deutch AY, Lah JJ, Levey AI, Lindsley CW, Conn PJ (Novel selective allosteric activator of the M1 muscarinic acetylcholine receptor regulates amyloid processing and produces antipsychotic-like activity in rats. *J Neurosci* 28:10422-10433.2008).
- Khoa ND, Postow M, Danielsson J, Cronstein BN (Tumor necrosis factor-alpha prevents desensitization of G $\alpha$  coupled receptors by regulating GRK2 association with the plasma membrane. *Mol Pharmacol* 69:1311-1319.2006).
- Kolesnick R (The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway. *J Clin Invest* 110:3-8.2002).
- Krupnick JG, Benovic JL (The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:289-319.1998).
- Langmead CJ, Watson J, Reavill C (Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. *Pharmacol Ther* 117:232-243.2008).
- Lee JT, Xu J, Lee JM, Ku G, Han X, Yang DI, Chen S, Hsu CY (Amyloid-beta peptide induces oligodendrocyte death by activating the neutral sphingomyelinase-ceramide pathway. *J Cell Biol* 164:123-131.2004).
- Lee KB, Pals-Rylaarsdam R, Benovic JL, Hosey MM (Arrestin-independent internalization of the m1, m3, and m4 subtypes of muscarinic cholinergic receptors. *J Biol Chem* 273:12967-12972.1998).
- Losonczy A, Makara JK, Magee JC (Compartmentalized dendritic plasticity and input feature storage in neurons. *Nature* 452:436-441.2008).

- Maalouf M, Rho JM (Oxidative impairment of hippocampal long-term potentiation involves activation of protein phosphatase 2A and is prevented by ketone bodies. *J Neurosci Res* 86:3322-3330.2008).
- Maceyka M, Harikumar KB, Milstien S, Spiegel S (Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends Cell Biol* 22:50-60.2012).
- Malaplate-Armand C, Florent-Bechard S, Youssef I, Koziel V, Sponne I, Kriem B, Leininger-Muller B, Olivier JL, Oster T, Pillot T (Soluble oligomers of amyloid-beta peptide induce neuronal apoptosis by activating a cPLA2-dependent sphingomyelinase-ceramide pathway. *Neurobiol Dis* 23:178-189.2006).
- Marks N, Berg MJ, Saito M (Glucosylceramide synthase decrease in frontal cortex of Alzheimer brain correlates with abnormal increase in endogenous ceramides: consequences to morphology and viability on enzyme suppression in cultured primary neurons. *Brain Res* 1191:136-147.2008).
- Mesulam MM (The systems-level organization of cholinergic innervation in the human cerebral cortex and its alterations in Alzheimer's disease. *Prog Brain Res* 109:285-297.1996).
- Mielke MM, Bandaru VV, Haughey NJ, Rabins PV, Lyketsos CG, Carlson MC (Serum sphingomyelins and ceramides are early predictors of memory impairment. *Neurobiol Aging* 31:17-24.2010).
- Mielke MM, Haughey NJ (Could plasma sphingolipids be diagnostic or prognostic biomarkers for Alzheimer's disease? *Clin Lipidol* 7:525-536.2012).
- Mikati MA, Rizk E, El Dada S, Zeinieh M, Kurdi R, El Hokayem J, Rahmeh A, Kobeissi M, Azzam D, Usta J, El Sabban M, Dbaibo G (Programmed cell death in the lithium pilocarpine model: evidence for NMDA receptor and ceramide-mediated mechanisms. *Brain Dev* 30:513-519.2008a).
- Mikati MA, Zeinieh M, Habib RA, El Hokayem J, Rahmeh A, El Sabban M, Usta J, Dbaibo G (Changes in sphingomyelinases, ceramide, Bax, Bcl(2), and caspase-3 during and after experimental status epilepticus. *Epilepsy Res* 81:161-166.2008b).
- Miyakawa T, Yamada M, Duttaroy A, Wess J (Hyperactivity and intact hippocampus-dependent learning in mice lacking the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *J Neurosci* 21:5239-5250.2001).
- Nitsch RM, Deng M, Tennis M, Schoenfeld D, Growdon JH (The selective muscarinic M1 agonist AF102B decreases levels of total Abeta in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 48:913-918.2000).

- Nixon GF (Sphingolipids in inflammation: pathological implications and potential therapeutic targets. *Br J Pharmacol* 158:982-993.2009).
- Nordberg A (Nicotinic receptor abnormalities of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Biol Psychiatry* 49:200-210.2001).
- Obrenovich ME, Palacios HH, Gasimov E, Leszek J, Aliev G (The GRK2 Overexpression Is a Primary Hallmark of Mitochondrial Lesions during Early Alzheimer Disease. *Cardiovasc Psychiatry Neurol* 2009:327360.2009a).
- Ong WY, Tanaka K, Dawe GS, Ittner LM, Farooqui AA (Slow excitotoxicity in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 35:643-668.2013).
- Pakrasi S, Colloby SJ, Firbank MJ, Perry EK, Wyper DJ, Owens J, McKeith IG, Williams ED, O'Brien JT (Muscarinic acetylcholine receptor status in Alzheimer's disease assessed using (R, R) 123I-QNB SPECT. *J Neurol* 254:907-913.2007).
- Penn RB, Panettieri RA, Jr., Benovic JL (Mechanisms of acute desensitization of the beta2AR-adenylyl cyclase pathway in human airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19:338-348.1998).
- Pettus BJ, Chalfant CE, Hannun YA (Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim Biophys Acta* 1585:114-125.2002).
- Picciotto MR, Higley MJ, Mineur YS (Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron* 76:116-129.2012).
- Porter AC, Bymaster FP, DeLapp NW, Yamada M, Wess J, Hamilton SE, Nathanson NM, Felder CC (M1 muscarinic receptor signaling in mouse hippocampus and cortex. *Brain Res* 944:82-89.2002).
- Posse de Chaves EI (Sphingolipids in apoptosis, survival and regeneration in the nervous system. *Biochim Biophys Acta* 1758:1995-2015.2006).
- Prado MA, Reis RA, Prado VF, de Mello MC, Gomez MV, de Mello FG (Regulation of acetylcholine synthesis and storage. *Neurochem Int* 41:291-299.2002).
- Pronin AN, Satpaev DK, Slepak VZ, Benovic JL (Regulation of G protein-coupled receptor kinases by calmodulin and localization of the calmodulin binding domain. *J Biol Chem* 272:18273-18280.1997).
- Ruvolo PP (Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacol Res* 47:383-392.2003).



- Sanchez G, Alvares Lde O, Oberholzer MV, Genro B, Quillfeldt J, da Costa JC, Cervenansky C, Jerusalinsky D, Kornisiuk E (M4 muscarinic receptors are involved in modulation of neurotransmission at synapses of Schaffer collaterals on CA1 hippocampal neurons in rats. *J Neurosci Res* 87:691-700.2009).
- Shenoy SK, Lefkowitz RJ (Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem J* 375:503-515.2003).
- Shmuel M, Nodel-Berner E, Hyman T, Rouvinski A, Altschuler Y (Caveolin 2 regulates endocytosis and trafficking of the M1 muscarinic receptor in MDCK epithelial cells. *Mol Biol Cell* 18:1570-1585.2007).
- Soderberg M, Edlund C, Alafuzoff I, Kristensson K, Dallner G (Lipid composition in different regions of the brain in Alzheimer's disease/senile dementia of Alzheimer's type. *J Neurochem* 59:1646-1653.1992).
- Sugisaki E, Fukushima Y, Tsukada M, Aihara T (Cholinergic modulation on spike timing-dependent plasticity in hippocampal CA1 network. *Neuroscience* 192:91-101.2011).
- Sullivan MA, Chen H, Morikawa H (Recurrent inhibitory network among striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* 28:8682-8690.2008).
- Takeda A, Loveman E, Clegg A, Kirby J, Picot J, Payne E, Green C (A systematic review of the clinical effectiveness of donepezil, rivastigmine and galantamine on cognition, quality of life and adverse events in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 21:17-28.2006).
- Takkala P, Woodin MA (Muscarinic acetylcholine receptor activation prevents disinhibition-mediated LTP in the hippocampus. *Front Cell Neurosci* 7:16.2013).
- Tarr JC, Turlington ML, Reid PR, Utley TJ, Sheffler DJ, Cho HP, Klar R, Pancani T, Klein MT, Bridges TM, Morrison RD, Blobaum AL, Xiang Z, Daniels JS, Niswender CM, Conn PJ, Wood MR, Lindsley CW (Targeting selective activation of M(1) for the treatment of Alzheimer's disease: further chemical optimization and pharmacological characterization of the M(1) positive allosteric modulator ML169. *ACS Chem Neurosci* 3:884-895.2012).
- Tayebati SK, Di Tullio MA, Amenta F (Muscarinic cholinergic receptor subtypes in cerebral cortex of Fisher 344 rats: a light microscope autoradiography study of age-related changes. *Mech Ageing Dev* 127:115-122.2006).

- Teles-Grilo Ruivo LM, Mellor JR (Cholinergic modulation of hippocampal network function. *Front Synaptic Neurosci* 5:2.2013).
- Tidhar R, Futerman AH (The complexity of sphingolipid biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1833:2511-2518.2013).
- Tsang SW, Lai MK, Kirvell S, Francis PT, Esiri MM, Hope T, Chen CP, Wong PT (Impaired coupling of muscarinic M1 receptors to G-proteins in the neocortex is associated with severity of dementia in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 27:1216-1223.2006).
- Turban S, Hajdich E (Protein kinase C isoforms: mediators of reactive lipid metabolites in the development of insulin resistance. *FEBS Lett* 585:269-274.2011a).
- Usatyuk PV, Burns M, Mohan V, Pendyala S, He D, Ebenezer DL, Harijith A, Fu P, Huang LS, Bear JE, Garcia JG, Natarajan V (Coronin 1B regulates S1P-induced human lung endothelial cell chemotaxis: role of PLD2, protein kinase C and Rac1 signal transduction. *PLoS One* 8:e63007.2013).
- van Koppen CJ, Kaiser B (Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Pharmacol Ther* 98:197-220.2003).
- van Meer G, Lisman Q (Sphingolipid transport: rafts and translocators. *J Biol Chem* 277:25855-25858.2002).
- Walker JK, Gainetdinov RR, Feldman DS, McFawn PK, Caron MG, Lefkowitz RJ, Premont RT, Fisher JT (G protein-coupled receptor kinase 5 regulates airway responses induced by muscarinic receptor activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286:L312-319.2004).
- Wang G, Silva J, Dasgupta S, Bieberich E (Long-chain ceramide is elevated in presenilin 1 (PS1M146V) mouse brain and induces apoptosis in PS1 astrocytes. *Glia* 56:449-456.2008).
- Wattenberg BW (Role of sphingosine kinase localization in sphingolipid signaling. *World J Biol Chem* 1:362-368.2010a).
- Wheeler D, Knapp E, Bandaru VV, Wang Y, Knorr D, Poirier C, Mattson MP, Geiger JD, Haughey NJ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced neutral sphingomyelinase-2 modulates synaptic plasticity by controlling the membrane insertion of NMDA receptors. *J Neurochem* 109:1237-1249.2009).

Willets JM, Nash MS, Challiss RA, Nahorski SR (Imaging of muscarinic acetylcholine receptor signaling in hippocampal neurons: evidence for phosphorylation-dependent and -independent regulation by G-protein-coupled receptor kinases. *J Neurosci* 24:4157-4162.2004).

Willets JM, Nelson CP, Nahorski SR, Challiss RA (The regulation of M1 muscarinic acetylcholine receptor desensitization by synaptic activity in cultured hippocampal neurons. *J Neurochem* 103:2268-2280.2007).

Zhang Y, Li X, Becker KA, Gulbins E (Ceramide-enriched membrane domains--structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1788:178-183.2009a).