

Table des matières

Résumé	III
Abstract	V
Table des matières	VII
Liste des tableaux	XI
Liste des figures	XIII
Liste des abréviations et sigles	XV
Remerciements	XXI

1 Introduction	1
1.1 La maladie d'Alzheimer	1
1.1.1 La forme sporadique de la maladie d'Alzheimer	2
1.1.2 La forme familiale de la maladie d'Alzheimer	3
1.1.3 Les traitements de la maladie d'Alzheimer	3
1.2 Caractéristiques cellulaires et moléculaires	4
1.2.1 L'hypothèse de la cascade amyloïde	4
1.2.2 L'effet pathologique des peptides A β	6
1.3 Les secrétases	8
1.3.1 Les secrétases responsables du clivage primaire de l'APP	9
1.3.2 La γ -secrétase responsable du clivage secondaire de l'APP	10
1.4 La préséniline 1	12
1.4.1 Propriétés moléculaires	12
1.4.2 La mutation PS1 Δ 9	14
1.4.3 Les rôles de PS1 indépendants de la voie amyloïde	15
1.4.3.1 PS1 et la voie de signalisation Notch	15
1.4.3.2 PS1 et les voies de signalisations tyrosine kinase dépendantes	17
1.4.3.3 PS1 interagit avec les protéines de la famille Armadillo	19
1.5 Hypothèse et objectifs de recherche	19

2	Matériel et méthodes	21
2.1	Préalables au criblage par double hybride en levure	21
2.1.1	Le système « split-ubiquitin »	22
2.1.2	Les levures <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
2.1.3	Liste des plasmides du système « split-ubiquitin »	25
2.1.3.1	« Appât » pBT3-N PS1-Cub-LexA-VP16	25
2.1.3.2	« Proie » pPR3-N-NubG-X	27
2.1.3.3	pNubG-Fe65, pTSU2-APP et pOst1-Nub	28
2.1.4	Construction du vecteur pBT3-N PS1-Cub-LexA-VP16	29
2.1.4.1	Extraction de l'ADNp pBT3-N de bactéries DH5 α	29
2.1.4.2	Obtention des inserts PS1 WT et Δ 9 par PCR	30
2.1.4.3	Digestion du vecteur pBT3-N et des inserts PS1 :	32
2.1.4.4	Ligation des inserts PS1 dans le vecteur pBT3-N :	33
2.1.4.5	Transformation des bactéries DH5 α	33
2.2	Criblage par double hybride en levure	35
2.2.1	Transformations des levures CD3-808 « MAT a » et CD3-809 « MAT α »	35
2.2.2	Essai fonctionnel du système « split-ubiquitin »	35
2.2.3	Criblage par accouplement des CD3-808 et CD3-809	37
2.2.3.1	Criblage pilote	37
2.2.3.2	Criblage de la banque d'ADNc extraits de cerveau humain	37
2.2.4	Analyse des clones positifs obtenus	38
2.2.4.1	Isolation des plasmides de levure	38
2.2.4.2	Identification des gènes candidats	40
2.2.4.3	Confirmation des interactions protéiques par double hybride en levure	41
2.3	Confirmation des interactions protéiques en cellules	41
2.3.1	Les HEK 293T	41
2.3.2	Liste des plasmides utilisés en cellule	42
2.3.2.1	pEGFP	43
2.3.2.2	pcDNA3 et pcDNA3.1-His C	43
2.3.2.3	pCMV-Zéo-HA PS1	45

2.3.3	Transfection des cellules	46
2.3.4	Lyse cellulaire et extraction protéique	47
2.3.5	Co-Immunoprécipitation	48
2.3.6	Immunodétection protéique par Western Blot	50
2.3.6.1	Électrophorèse sur gel polyacrylamide et transfert sur membrane PVDF	51
2.3.6.2	Immunodétection	52
3	Résultats	53
3.1	Essai fonctionnel du système « split-ubiquitin » en levure	53
3.2	Criblage utilisant l'appât PS1 WT-Cub-TF	54
3.2.1	L'appât pBT3-N PS1 WT-Cub-TF est fonctionnel	54
3.2.2	La fusion des levures CD3 808 « Mat a » contenant l'appât PS1 WT-Cub-TF est efficace	56
3.2.3	Criblage de la banque d'ADNc extraits de cerveau humain	57
3.2.4	Identification des plasmides candidats	57
3.2.5	Confirmation des interactions protéiques en levure	59
3.3	Criblage utilisant l'appât PS1 Δ 9-Cub-TF	61
3.3.1	Essai fonctionnel	61
3.3.2	Évaluation de la fusion des levures CD3 808 « Mat a » contenant l'appât PS1 Δ 9-Cub-TF	62
3.3.3	Criblage de la banque d'ADNc extraits de cerveau humain	63
3.3.4	Identification des plasmides candidats	63
3.3.5	Confirmation des interactions protéiques en levure	65
3.4	Étude de PS1 WT, PS1 Δ 9 et des protéines candidates en cellule HEK 293T	67
4	Discussion	71
4.1	Comparaison des interactions protéiques de PS1 WT et PS1 Δ 9	71
4.2	PS1 interviendrait dans les processus de réparation de l'ADN	73
4.3	PS1 permettrait le maintien du cycle cellulaire neuronal	75

4.4	PS1 participerait à une nouvelle voie de signalisation liée aux RTK	77
4.5	PS1 permettrait la stabilisation de l'activité transcriptionnelle ribosomale	77
4.6	PS1 participerait à l'inhibition de la PRPS	79
4.7	PS1 pourrait jouer un rôle dans l'homéostasie énergétique des astrocytes	79
5	Conclusions et perspectives	81
	Bibliographie	83

Liste des tableaux

Tableau 1 : Milieux de sélection pour criblage en levure	24
Tableau 2 : Liste des plasmides utilisés pour le criblage « split-ubiquitin » en levure	25
Tableau 3 : Composition du mélange réactionnel de PCR	30
Tableau 4 : Liste des oligonucléotides utilisés pour amplification des ADNc de PS1 WT et PS1 Δ 9	30
Tableau 5 : Cycles PCR mis en place pour l'obtention des inserts PS1 WT et PS1 Δ 9	31
Tableau 6 : Témoins de ligation et de transformation en bactérie	34
Tableau 7 : Essai fonctionnel du système « split-ubiquitin » en levure	36
Tableau 8 : Liste des plasmides utilisés en cellule HEK 293T	42
Tableau 9 : Transfections des cellules HEK 293T réalisées	46
Tableau 10 : Tampons d'extraction et de lavages protéiques	47
Tableau 11 : Liste des anticorps utilisés en Co-Immunoprécipitation	50
Tableau 12 : Liste des anticorps utilisés lors de l'immunodétection	50
Tableau 13 : Liste des partenaires protéiques potentiels de PS1 WT	59
Tableau 14 : Liste des partenaires protéiques potentiels de PS1 Δ 9	65

Liste des figures

Figure 1.1: Atrophie caractéristique d'un cerveau de patient atteint d'Alzheimer	1
Figure 1.2: Plaques amyloïdes et dégénérescences neurofibrillaires.	2
Figure 1.3: Hypothèse de la cascade amyloïde	5
Figure 1.4 : Les différentes positions des sites de clivage de l'APP par les secrétases	8
Figure 1.5 : Modèle moléculaire de la Préséniline 1	13
Figure 1.6 : Voie de signalisation Notch	16
Figure 1.7 : Voie de signalisation ErbB4	17
Figure 1.8 : Voie de signalisation Wnt : comparaison des récepteurs Ryk et Frizzled	18
Figure 2.1 : Système basique du double hybride	21
Figure 2.2 : Système split-ubiquitin	22
Figure 2.3 : Vecteur pBT3-N	26
Figure 2.4 : Vecteur pPR3-N	27
Figure 2.5 : Cartes des vecteurs utilisés dans l'essai fonctionnel	28
Figure 2.6 : Plasmide pEGFP	43
Figure 2.7 : Plasmide pcDNA3	44
Figure 2.8 : Plasmide pcDNA3.1 His-C	44
Figure 2.9 : Plasmides pCMV-Zéo et pGAD-T7	45
Figure 2.10 : Schématisation du protocole de Co-IP	48
Figure 3.1 : Analyse de l'essai fonctionnel du système "split-ubiquitin"	53
Figure 3.2 : Analyse du phénotype de levures CD3 808 surexprimant la construction "appât" pBT3-N PS1 WT-Cub-TF	55
Figure 3.3 : Étude des profils de digestions des plasmides pPR3-N-NubG-X des clones positifs de levures issus du criblage	58
Figure 3.4 : Analyse du double hybride testant les plasmides proies retenus lors du criblage utilisant PS1 WT-Cub-TF chez les levures CD3 808 pré-transformées.	60

Figure 3.5 : Analyse du phénotype de levures CD3 808 surexprimant la construction "appât" pBT3-N PS1 Δ 9-Cub-TF	62
Figure 3.6 : Étude des profils de digestion des plasmides pPR3-N-NubG-X des clones positifs de levures issus du criblage	64
Figure 3.7 : Analyse du double hybride testant les plasmides proies retenus lors du criblage utilisant PS1 Δ 9-Cub-TF chez les levures CD3 808 pré-transformées.	66
Figure 3.8 : Immunodétection des constructions permettant l'expression des protéines CETN2, PS1 WT et PS1 Δ 9 au sein des cellules HEK 293T	68
Figure 3.9 : Analyse de l'immunoprécipitation des protéines PS1 WT et PS1 Δ 9 avec CETN2	69

Liste des abréviations et sigles

%	Pourcent
α	Anti
A β	Amyloïde- β
ADAM	« A Disintegrin And Metalloprotease »
ADH1	« Alcohol Dehydrogenase »
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	Acide Désoxyribonucléique Complémentaire
ADNp	Acide Désoxyribonucléique Plasmidique
AICD	« Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain »
APH-1	« Anterior PHarynx defective 1 »
ApoE	Apolipoprotéine E
APP	« Amyloid Precursor Protein »
APS	Ammonium Persulfate
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique Messenger
ARNr	Acide Ribonucléique Ribosomal
ARNt	Acide Ribonucléique de Transfert
BACE 1	« β -site Amyloid precursor protein Cleaving Enzyme 1 »
BCHE	Butylcholinestérase
BDNF	« Brain-Derived Neurotrophic Factor »
BGH pA	« Bovine Growth Hormone Poly Adenylation signal »
BLAST	« Basic Local Alignment Search Tool »
BRCA2	« Breast Cancer 2 »
°C	Degrés Celsius
c-Ret	Récepteur Tyrosine Kinase Ret Proto-Oncogène
CETN2	« Centrin-2 »
Cfu	« Colony-forming Unit »
CHUL	Centre Hospitalier de l'Université Laval
CMV	Cytomégalovirus
Co2	Dioxyde de Carbone
Co-IP	Co-Immuno-précipitation
CP2	« Cathepsin B-like protease B2 »
CtF	Fragment C-Terminal
Cub	Fragment C-Terminal de l'ubiquitin
CYC1	Cytochrome C 1
DDBJ	« DNA Data Bank of Japan »
DMEM	« Dulbecco's Modified Eagle's medium »
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO ₆₀₀	Densité Optique mesurée à 600nm
DOK5	« Docking Protein 5 »
DOMs	« Drop Out Medium supplement »
DSS1	« Deleted In Split-Hand/Split-Foot 1 »
E4ICD	« ErbB4 Intracellular Domain »
ECL	« Enhanced Chemiluminescent »
EDTA	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
EGF	« Epidermal Growth Factor »

EGFP	« Enhanced Green Fluorescent Protein »
EMBL	« European Molecular Biology Laboratory »
ENY2	« Enhancer Of Yellow 2 Homolog »
EtOH	Ethanol
Fc	Fragment Crystallisable
Fig	Figure
FAD	« Familial Alzheimer Disease »
FBS	« Fetal Bovine Serum »
g	Gramme
<i>g</i>	Unité de force gravitationnelle
GANP	« Germinal center-Associated Nuclear Protein »
GDNF	« Glial Cell Line Derived Neurotrophic Factor »
GFAP	Protéine Acide Fibrillaire Gliale
GSK-3	« Glycogen Synthase Kinase 3 »
h	Heure
H2O _{dd}	Eau distillée, déionisée
HA	« Human Influenza Hemagglutinin »
HEK	« Human Embryonic Kidney »
HRP	« Horseradish Peroxidase »
I-CLiPs	« Intramembrane-Cleaving Proteases »
IFI16	« Gamma-Interferon-Inducible Protein 16 »
IgG	Immunoglobuline G
Kan	Kanamycine
Kb	Kilobase
kDa	Kilo Dalton
Ku80	Autoantigène Ku
-L	Milieu sans Leucine
LB	« Luria Broth »
LBP1	ou « UBP1 » : « Upstream Binding protein 1 »
LiAc	Acétate de Lithium
LSF	ou « TF _{CP2} » : « Alpha-globin transcription factor CP2 »
LRP	« Low-density lipoprotein Receptor-related Protein 1 »
M	Molaire
MAP	« Mitogen-Activated Protein »
MCS	« Multiple Cloning Site »
mg	Milligramme
mL	Millilitre
mm	Millimètres
mM	Millimolaire
ms	Millisecondes
N°	Numéro
NaCl	Chlorure de sodium
NCBI	« National Center for Biotechnology Information »
NCSTN	Nicastrin
NER	« Nucleotide Excision Repair »
ng	Nanogramme
NHEJ	« Non Homologous End Joining »
NICD	« Notch Intracellular Domain »
NLS	« Nuclear Localising Signal »
nM	Nanomolaire
NMDA	« N-Methyl-D-Aspartate »

NPRAP	« Nneural Plakophilin-Related Armadillo protein »
NT-3	« Neurotrophin 3 »
NtF	Fragment N-Terminal
Nub ou Nubl	Fragment N-Terminal de l'ubiquitin
NubG	Fragment N-Terminal de l'ubiquitin muté sur l'isoleucine 13 en glycine
Oligo	Oligonucléotide
Ost1	« Open Stomata 1 »
P3	Amyloïde β 17-42
p53	« Tumor suppressor p53 »
pb	Paire de bases
PBS	« Phosphate Buffered Saline »
PCR	« Polymérase Chain Reaction »
PDB	« Protein Data Bank »
PEG	Polyéthylène Glycol
PEN2	« Presenilin ENhancer 2 »
PFKM	« Phosphofructokinase du Muscle »
PFKB3	« 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fruuctose-2,6-Bisphosphatase »
pH	Potentiel Hydrogène
Phase G0	Phase de Quiescence
Phase G1	Phase de Croissance
Phase S	Phase de Synthèse
pRb	Protéine du Rétinoblastome
PRPS	« Phosphoribosyl Pyrophosphate Synthetase »
PRPSAP2	« Phosphoribosyl Pyrophosphate Synthetase Associated Protein 2 »
PS1	Préséniline 1
PS2	Préséniline 2
qsp	Quantité suffisante pour
RNaseL	« Ribonucléase L »
ROS	Radicaux libres ou « Reactive Oxygen Species »
RPL6	« Ribosomal Protein L6 »
RTK	Récepteur Tyrosine Kinase
sAPP α	« Soluble Amyloid Precursor Protein »
SDS	Dodécylsulfate de Sodium
SHFM1	« Split Hand Foot Malformation 1 »
SV40	Virus Simien 40
-T	sans Tryptophane
TAE	Tris Acétate EDTA
Tau	« Tubulin Associated Unit »
TBST	Tris-Buffered Saline et Tween 20
Tcf	« T-Cell transcription Factors »
TE	TrisEDTA 1X
TEF	« Translation Elongation Factor »
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TF	Facteur de Transcription LexA-VP16
-TL	Milieu sans Tryptophane ni Leucine
-TLHA	Milieu sans Tryptophane, Leucine, Histidine, ni Adénine
TIP60	« histone acetyl-Transferase tat-Interactive Protein 60 »
TM	domaine TransMembranaire
TP	Température Pièce
TREX2	« Transcription-Export Complex 2 »
TrisHCl	Tris Hydrochloride

UBPs	« Ubiquitin-specific Proteases »
µg	Microgramme
µL	Microlitre
µM	Micromolaire
V	Volume ou Volt
WT	« Wild-Type »
XPC	« Xeroderma Pigmentosum Complementation Group C »
XRCC5	« X-Ray Repair Complementing Defective Repair In Chinese Hamster Cells 5 »
YPAD	« Yeast Extract-Peptone-Adenine-Dextrose Medium »

*« Il est bon qu'un périple ait une fin,
mais à la fin, c'est le périple qui importe. »*

Remerciements

Avant tout, je souhaiterais remercier le Dr Georges Lévesque de m'avoir accueilli dans son équipe, et de m'avoir permis de mener à bien ce beau projet de maîtrise. Merci pour votre grand sens de l'écoute, et d'avoir accepté de répondre à mes nombreuses questions. Merci également pour votre confiance, votre soutien et votre aide, ainsi que pour vos nombreux encouragements lors de périodes de doutes passagers. Je vous remercie enfin pour l'ensemble des connaissances que la réalisation de cette maîtrise m'a apporté, autant du côté technique que théorique, et pour m'avoir transmis la curiosité et le goût de répondre au nombre grandissant de questions qu'apporte le monde de la recherche. Par ailleurs, je souhaiterais remercier le Dr Madeleine Carreau pour ses contributions scientifiques d'une part, dont les nombreux conseils et suggestions m'ont aidé à progresser dans certains domaines ; mais également pour ses petits gestes du quotidien, qui ont contribué à grandir notre (gourmand) bonheur !

À présent, c'est notre grande et belle équipe que je souhaiterais remercier. Merci à vous, Caroline, Audrey et Chantal, de m'avoir transmis votre savoir et vos compétences, et de m'avoir épaulée deux années durant ! Merci également infiniment pour votre présence et votre écoute infaillibles, autant dans les moments de joie que de peine, concernant les domaines professionnels, et ceux qui le sont un peu moins. Je souhaite également remercier Jacinthe, Christian, Delphine et Mélody, ainsi que les scientifiques en herbe Léonie, Carolanne et Guillaume ; dont la présence ou le passage antérieur dans le laboratoire a participé à rendre ces deux années pleines de rires et de joies. À vous toutes et tous, je vous souhaite le meilleur dans la vie, ainsi qu'un bel avenir !

Enfin, je désire remercier de tout mon cœur l'ensemble des personnes qui l'emplissent, qui ont construit ma vie et qui continuent d'y participer, inlassablement. Merci d'abord, à ma famille, désormais répartie sur deux continents ! Merci à vous tous qui, d'un simple appel, d'un simple mot, ou d'un accueil chaleureux savent me mettre du baume au cœur. Merci à mon père et à ma mère, d'avoir cru en moi et de m'avoir sans cesse soutenue, même lorsque je vous annonçais mon départ pour le (presque) bout du monde. Merci aux jeunes pousses, mes petits cousins et cousines, mes frères et sœur, d'apporter toujours plus de joie, d'amour et d'espoir dans ma vie ! Enfin, je souhaite remercier mes amis, ceux d'ici et ceux de plus loin, répartis désormais dans bien des pays, éparpillés sur tous les continents ! Je vous remercie tous pour votre présence, pour nos longues discussions à refaire le monde, à rire, à pleurer, à rêver ; pour tous les moments passés à s'aimer, et à profiter de la vie dans sa plus simple définition. Merci !

1 Introduction

1.1 La maladie d'Alzheimer

C'est en 1906 que la maladie d'Alzheimer est pour la première fois décrite par le médecin Alois Alzheimer (1). Celui-ci va définir un ensemble de caractéristiques cliniques et anatomiques qui permettent de distinguer la maladie d'Alzheimer d'une conséquence fortuite du vieillissement, en associant la pathologie à une toute nouvelle forme de démence sénile (2). En effet, c'est en étudiant une femme de 51 ans alors internée pour démence qu'il identifiera les symptômes de la maladie, à savoir une perte progressive de la mémoire, une désorientation spatio-temporelle mais aussi des troubles du comportement incluant une personnalité changeante et souvent imprévisible. Lors de l'autopsie suivant le décès de la patiente, quatre ans et demi seulement après les premiers symptômes, il observera les caractéristiques typiques retrouvées chez un patient atteint de la maladie; à savoir une atrophie du cerveau (Fig 1.1), une neurodégénérescence du néocortex et de l'hippocampe, ainsi que la présence de nombreux amas fibrillaires situés dans le milieu extracellulaire, les plaques amyloïdes; ou au sein d'un neurone en état de dégradation, alors appelés enchevêtrements neurofibrillaires (Fig 1.2). C'est seulement 80 ans plus tard que l'Américain George Glenner observe la présence anormalement élevée d'un peptide qu'il retrouve également systématiquement au sein des amas fibrillaires, et caractérise ainsi le peptide amyloïde A β (3).

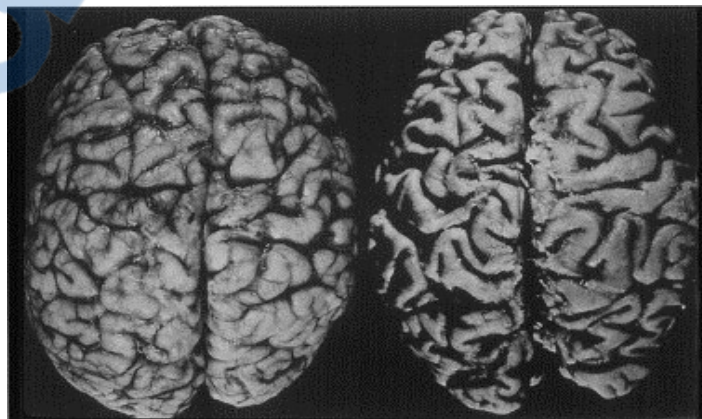


Figure 1.1: Atrophie caractéristique d'un cerveau de patient atteint d'Alzheimer

L'atrophie du cerveau, aujourd'hui reconnue comme une des principales caractéristiques d'un patient atteint de démence sénile, est ici évidente lors de la comparaison d'un cerveau issu d'un patient atteint de démence sénile (à droite) avec celui d'un patient sain, au même âge (à gauche). Image tirée de *Berchtold, "Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-Roman period to the 1960s", Neurobiol Aging 1998.*

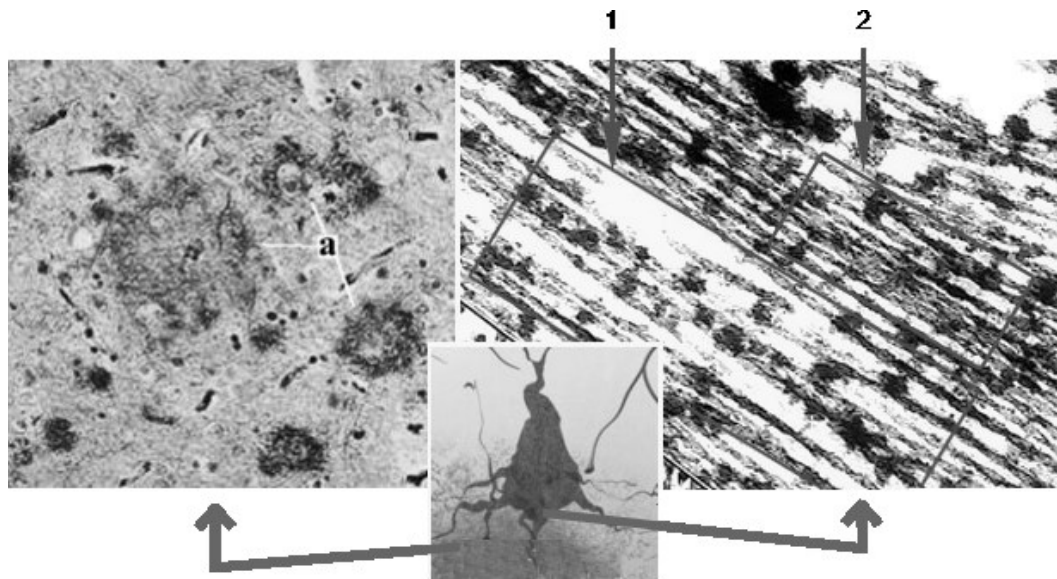


Figure 1.2: Plaques amyloïdes et dégénérescences neurofibrillaires.

Schématisation d'un neurone endommagé par la maladie d'Alzheimer (au centre). À gauche, coloration argentique d'une coupe de cortex humain, on y distingue des plaques amyloïdes (a). À droite, photo prise au microscope électronique d'une cellule présentant des régions saines (2) et des régions caractérisées par une formation d'enchevêtrements (1). Images modifiée, tirée de <http://lecerveau.mcgill.ca/>.

1.1.1 La forme sporadique de la maladie d'Alzheimer

En 2009, on comptait plus de 25 million de personnes souffrant de démences dont 75% étant atteintes de la maladie d'Alzheimer (4). Avec une population mondiale dont l'espérance de vie avancée conduit à une proportion de personnes âgées grandissante - passant de 420 million en 2000 à 1 milliard en 2030 – la maladie d'Alzheimer, dont l'occurrence est fortement associée au vieillissement, est amené à poser de sérieux problèmes de santé publique. En effet, les patients Alzheimer sont dans plus de 90% des cas, des femmes et des hommes âgés de 65 ans et plus, et l'âge reste à ce jour considéré comme le plus grand facteur à risque d'apparition de la maladie, dont la distribution apparemment aléatoire lui a alors valu l'appellation « forme sporadique ». Cependant, suite à des études récentes menées à large échelle, il est désormais indiscutable qu'une importante prédisposition génétique existe, comptant pour près de 58% à 79% des risques menant au développement de la maladie (5). Depuis plus de 10 ans et encore à ce jour, seul le gène ApoE (Apolipoprotéine E) a été identifié comme facteur génétique à risque, lorsque celui-ci est présent sous la forme allélique E4 (ApoE ϵ 4) (6, 7). L'apolipoprotéine est une protéine plasmatique impliquée dans le transport de cholestérol, ainsi que dans la croissance et la réparation du système nerveux, durant le développement ou suite à un traumatisme. Des études ont mis en évidence la relation entre la présence du gène ApoE ϵ 4 et l'accumulation des peptides A β (8), mais le mécanisme par lequel cet événement se produit est encore peu

compris. L'hypothèse la plus répandue est celle d'une interaction directe entre les deux protéines, empêchant alors l'élimination des peptides A β et conduisant à leur accumulation intra et extracellulaire (9, 10). D'autres études cependant, nient une telle interaction, et proposent un rôle indirect des protéines ApoE sur le métabolisme de l'A β . En effet, ces dernières sont en compétition pour les mêmes voies de clairance cellulaire, ApoE et A β étant deux ligands du récepteur LRP1 par exemple, et une liaison préférentielle de l'ApoE aurait pour effet de bloquer l'intégration puis l'élimination de l'A β par les astrocytes (11).

1.1.2 La forme familiale de la maladie d'Alzheimer

Il existe également une seconde forme plus rare de la maladie d'Alzheimer, appelée « forme précoce », ou encore « forme familiale de la maladie d'Alzheimer » (FAD), qui représente environ 10% des cas. La FAD se caractérise par une apparition précoce, en touchant des individus de 30 à 50 ans, et se transmet au sein de certaines familles en suivant une transmission autosomique dominante. Malgré sa rareté, la FAD représente une cible importante des recherches portant sur l'Alzheimer. D'abord par ce qu'elle représente un véritable fléau pour les personnes déclarant la pathologie, qui voient alors leur espérance de vie brutalement diminuée de moitié et laissent derrière elles famille, conjoints et enfants. De plus, la FAD ouvre la voie à de nombreuses études envisageant sous un angle nouveau la maladie d'Alzheimer. En effet, celle-ci a la particularité de se transmettre génétiquement suite à une mutation de gènes clés, étant, dans l'ordre d'occurrence : *PSEN1* codant pour la Préséniline 1 « PS1 » (12), qui est le plus fréquemment représenté avec près de 221 mutations menant à la pathologie identifiées (13), *APP* codant pour la protéine précurseur de l'amyloïde « APP », et enfin le gène *PSEN2* codant pour la Préséniline 2 « PS2 » (14). L'étude des phénotypes cellulaires associés à ces mutations a permis de comprendre plus en profondeur certains mécanismes conduisant à la pathologie d'Alzheimer. De plus, la FAD sert de modèle dans le cadre d'études cliniques, au cours desquelles les phénotypes associés aux différentes mutations provoquant à la maladie sont étudiés. Suite à cela, et grâce à l'apparition des tests génétiques, il sera alors possible d'effectuer un diagnostic pré-symptomatique, permettant de délivrer un traitement tôt avant l'apparition de la maladie.

1.1.3 Les traitements de la maladie d'Alzheimer

Plus de 100 ans après sa découverte, la maladie d'Alzheimer reste incurable, malgré les nombreux essais cliniques effectués et les médicaments existants sur le marché. A ce jour, l'une des principale voies de

lutte contre la maladie passe par l'utilisation d'inhibiteurs de cholinestérase (15), qui permettent de maintenir une certaine concentration d'acétylcholine, neurotransmetteur essentiel dans le processus de mémorisation, et dont le niveau baisse de manière cruciale conséquemment à la neurodégénérescence du système limbique des patients atteints. D'autres approches thérapeutiques sont employées, mais toutes, visant généralement à prévenir plutôt qu'à guérir la maladie, offrent de faibles victoires, en permettant au mieux l'amélioration des fonctions cognitives sur le court terme, ou bien le retard de leur aggravation (16).

Aujourd'hui, et depuis près de 20 ans, les espoirs d'une thérapie curative naissent dans la communauté scientifique, suite à la découverte de la mutation dominante « APP swedish » chez certain patients présentant une FAD (17), touchant le gène codant pour la protéine précurseur de l'amyloïde « APP ». En effet, celle-ci induit une augmentation de la fréquence du clivage de la protéine et par conséquent du nombre de ses produits, dont le peptide A β , déjà connu comme le principal composant des plaques amyloïdes retrouvées dans les cerveaux malades (18). Deux ans plus tard, cette découverte mènera à la formulation, par l'Anglais John A. Hardy, de l'hypothèse de la cascade amyloïde (19).

1.2 Caractéristiques cellulaires et moléculaires

1.2.1 L'hypothèse de la cascade amyloïde

APP est une glycoprotéine transmembranaire existant sous 8 isoformes. Celle-ci est codée par un gène situé sur le chromosome 21 et constitué d'au moins 18 exons, dont les 7^e, 8^e et 15^e peuvent être épissés alternativement donnant alors naissance à différents isoformes protéiques (20).

La cascade amyloïde, comme énoncée en 1992, se définit par l'ensemble des événements conduisant à la production de peptides A β , dont le dépôt serait la cause de la neuropathologie d'Alzheimer en induisant l'apparition d'enchevêtrements neurofibrillaires, de pertes synaptiques et neuronales et d'une dégénérescence vasculaire, qui sont les lésions typiques retrouvées chez les patients atteints (21).

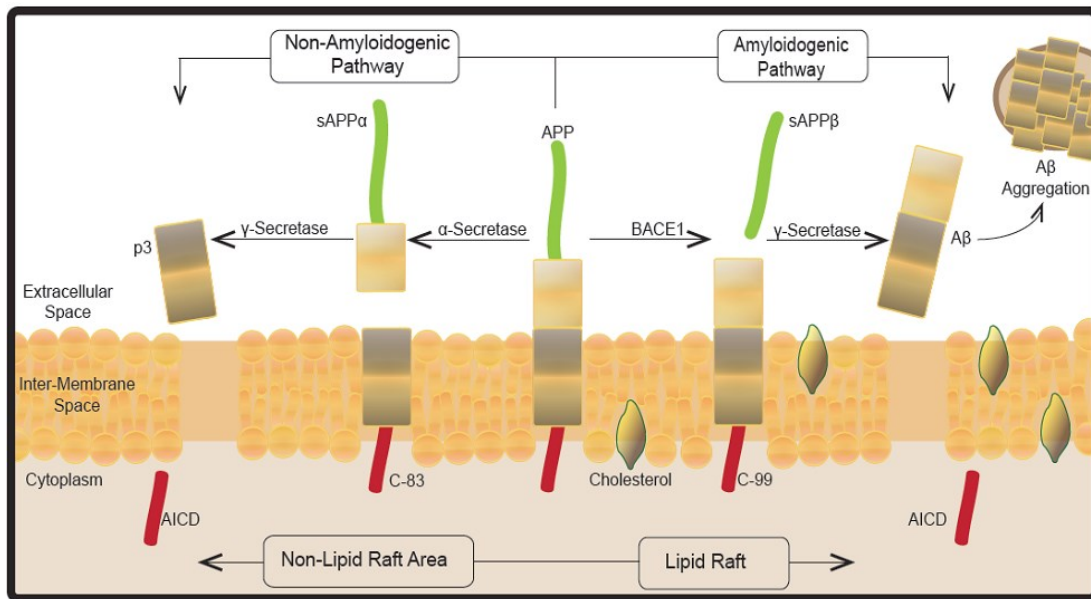


Figure 1.3: Hypothèse de la cascade amyloïde

La protéine APP peut être clivée selon la voie « Non Amyloïdogénique » à gauche, ou « Amyloïdogénique » à droite, menant à la formation de peptides amyloïdes neurotoxiques. Image tirée de « *Dropping the BACE: Beta Secretase (BACE1) as an Alzheimer's disease Intervention Target* », Suphioglu et al., NeuroAllergy Research Laboratory (NARL), 2013.

Selon la composition lipidique de la membrane dans laquelle elle se trouve, la protéine APP peut être dégradée selon deux voies différentes, appelées voies « amyloïdogénique » ou « non amyloïdogénique ». Chez les patients sains, APP subit majoritairement une protéolyse selon la voie « non amyloïdogénique ». Cependant, une mutation dans le gène codant pour APP ou pour l'une des présénilines PS1 ou PS2, amplifierait le clivage d'APP selon la voie dite « amyloïdogénique » induisant alors une accumulation de peptides Aβ toxique pour la cellule (22).

La voie non-amyloïdogénique permet le clivage d'APP par les secrétases α puis γ, induisant alors la libération du peptide soluble sAPPα puis de p3 et AICD (« APP intracelular domain »). Mis à part p3, dont le rôle biologique reste encore indéterminé, ces peptides sont connus pour avoir une fonction essentielle au sein du neurone. L'AICD d'abord, aurait un rôle de facteur de transcription en s'associant avec divers co-activateurs telle-que la protéine Fe65, qui permettrait ainsi sa liaison à plusieurs complexes transcriptionnels comme TIP60 (« Histone Acetyl-Transferase Tat-Interactive Protein ») (23) ou encore CP2/LSF/LBP1 (24). L'AICD, seul ou en complexe, permettrait alors la transcription de gènes impliqués dans la dynamique du cytosquelette cellulaire (25), et aurait un rôle dans l'apoptose cellulaire dépendante de p53 en augmentant la transcription de la dite protéine mais aussi l'activation de la caspase-3 (26). Le peptide sAPPα est libéré dans

le milieu extracellulaire suite au clivage primaire d'APP. Il est connu pour ses effets majeurs sur la plasticité et la survie neuronale, notamment en favorisant la croissance de neurites et en protégeant les cellules contre l'excitotoxicité (27, 28). Bien que le rôle propre de la protéine APP est encore inconnu à ce jour, ces données, suggèrent au vu de leur importance, que le clivage « non amyloïdogénique » de la protéine APP serait bénéfique voir essentiel aux bonnes conditions de survie des cellules neuronales. La protéine peut cependant emprunter la seconde voie de transformation dite « amyloïdogénique » qui serait responsable, en cas de dérégulation, de l'accumulation des peptides A β pouvant alors mener à la pathologie d'Alzheimer.

Dans le cadre de la voie amyloïdogénique, APP est tout d'abord clivé par BACE1 qui libère le peptide soluble sAPP β dans le milieu extracellulaire. Celui-ci jouerait les mêmes rôles neuroprotecteurs que le peptide sAPP α mais cependant 50 à 100 fois moins efficacement (29). Le peptide intramembranaire résultant de la protéolyse par BACE1 est ensuite clivé par la γ -secrétase, libérant alors le peptide AICD ainsi que le peptide insoluble A β dans le milieu extracellulaire. En cas de déséquilibre du clivage d'APP en faveur de la voie amyloïdogénique, les peptides A β vont s'accumuler et s'agréger, formant alors d'une part, les plaques extracellulaires caractéristiques de la maladie, et d'autre part, des enchevêtrements neurofibrillaires intracellulaires qui provoquent, à terme, la mort du neurone.

En effet, au cours de la voie amyloïdogénique, APP peut être dégradé en peptides A β de différentes longueurs, selon la position de l'acide aminé au niveau duquel a lieu le clivage. Les plus abondants sont les peptides A β 40 et A β 42, représentant respectivement 80-90% et 5-10% des peptides amyloïdes totaux chez une personne saine (30). Chez un individu malade, on retrouve une proportion plus importante du peptide A β 42 suite à la mutation d'APP, mais aussi en cas de mutations des présénilines (31, 32) qui permettraient alors un meilleur accès de la γ -secrétase au résidu 42 du peptide A β (33). Cependant, la position du clivage influence directement les propriétés physico-chimiques des peptides résiduels, car leurs hydrophobicité et fibrillogénicité augmentent proportionnellement à leur longueur. Ainsi, la dérégulation de la balance A β 40/A β 42 se reflète par une accumulation progressive de l'A β 42 qui, par sa longueur est l'un des peptides le plus hydrophobe et enclin à l'aggrégation (34).

1.2.2 L'effet pathologique des peptides A β

La forme agrégée, ou fibrillaire, de l'A β a longtemps été la cible des études menées sur la maladie d'Alzheimer, du fait qu'elle était constamment localisée dans les plaques amyloïdes extracellulaires (35-37). Des études ont notamment démontré que ces plaques induisaient des réactions anti-inflammatoires au sein du

cerveau, notamment en induisant la formation de radicaux libres ou « ROS » et de cytokines (38, 39). Cependant, depuis le début des années 2000, une nouvelle voie de pensée a éclos, selon laquelle l'aggrégation de l'A β dans les plaques ne serait pas la cause de la neurodégénérescence, mais plutôt la conséquence de l'augmentation du clivage de l'APP ; et il serait ainsi plus approprié de penser que la présence des plaques amyloïdes n'est pas la cause de la mise en place de la pathologie, mais plutôt l'un de ses marqueurs (40).

Aujourd'hui, la recherche se focalise sur l'A β sous sa forme oligomérique, dont les différents rôles pourraient l'impliquer dans les dommages neuronaux retrouvés dans la maladie d'Alzheimer. Dans un premier temps, les peptides amyloïdes sont étudiés pour leur implication dans l'amplification du stress oxydatif que subissent les cellules vieillissantes (41) en interférant avec plusieurs métabolites cellulaires. Les métaux tout d'abord, interagiraient avec les peptides amyloïdes et certains comme le fer et le cuivre, induiraient leur aggrégation. Cependant, l'A β aurait la capacité de catalyser la réduction du cuivre et du fer, induisant ainsi une production massive de ROS, toxines majeures pour la cellule (42). Les peptides A β joueraient également un rôle dans la peroxydation de lipides, l'oxydation de protéines, l'oxydation de l'ADN (43, 44) et auraient même la capacité d'entrer directement dans la mitochondrie (45), induisant alors la perturbation fonctionnelle de l'organelle, qui produirait à son tour une quantité massive de ROS. Dans une telle situation, le neurone se retrouverait engagé dans une spirale de surproduction de radicaux libres, induisant un stress oxydatif irréversible menant à terme à sa destruction. D'autres études encore, donnent aux peptides A β un rôle plus direct dans l'entrée des neurones en apoptose, notamment en s'accumulant au sein du réticulum endoplasmique. En effet, la gêne stérique occasionnée induirait de nombreuses anomalies de repliements des protéines en cours de maturation, et activerait alors la voie apoptotique de réponse au stress du réticulum (46).

De plus, à l'intérieur d'un neurone malade, les peptides A β peuvent aussi se retrouver sous forme filamenteuse associés à la protéine tau pour former les enchevêtrements neurofibrillaires (47). Tau est une phosphoprotéine associée aux microtubules qui est retrouvée hyperphosphorylée chez les patients Alzheimer. L'hyperphosphorylation de cette protéine induit sa désolidarisation des microtubules, provoquant alors leur effondrement et la déstabilisation du cytosquelette, et mènerait ainsi à la mort neuronale (48). Bien que le débat sur le rôle précis de tau dans la maladie d'Alzheimer est encore ouvert aujourd'hui, il est de plus en plus susceptible de croire que les enchevêtrements neurofibrillaires ne seraient pas la cause de la dégénérescence neuronale, mais plutôt une marque laissée par celle-ci, survenant à la suite de l'accumulation de la protéine tau hyperphosphorylée et désolidarisée des microtubules à l'intérieur de la cellule (49).

1.3 Les secrétases

On appelle secrétases les enzymes capables d'effectuer le clivage de protéines transmembranaires telles qu'APP. Ainsi, celle-ci va être clivée par le complexe α -secrétase ou par BACE1 dans le cadre de la voie non amyloïdogénique ou amyloïdogénique respectivement; puis par le complexe γ -secrétase dans les deux cas.

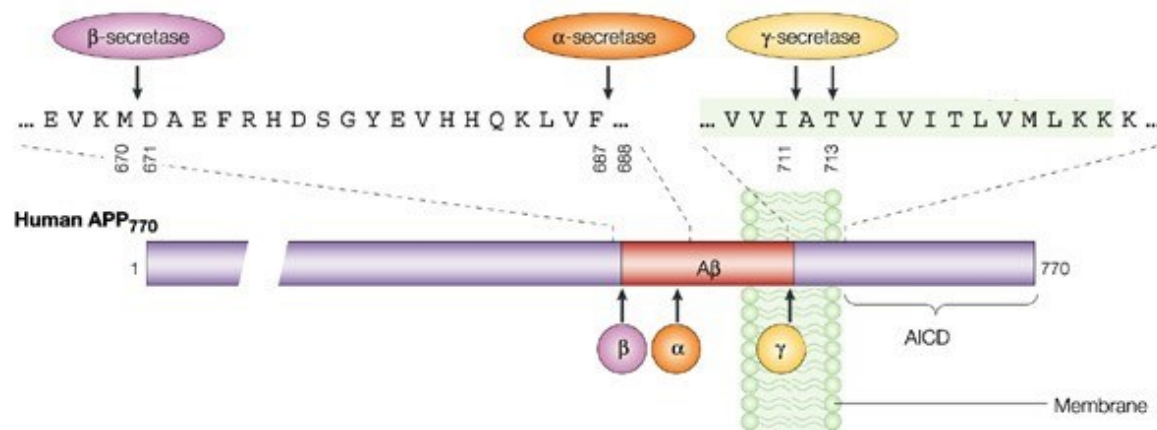


Figure 1.4 : Les différentes positions des sites de clivage d'APP

La protéine intramembranaire APP possède différents sites de clivages pour les secrétases α , β et γ . Le premier clivage est effectué par la α ou β secrétase, déterminant alors la dégradation d'APP selon une voie non amyloïdogénique ou amyloïdogénique respectivement. Le second clivage est effectué par la γ -secrétase, et permet le relâchement du peptide A β intégral dans le cadre de la voie amyloïdogénique. Image modifiée, tirée de « γ -secretase, notch, A β and alzheimer's disease : Where do the presenilins fit in ? » Sangram S. Sisodia & Peter H. St George-Hyslop, *Nature Reviews Neuroscience* 3, 281-290 (April 2002)

Il existe un débat encore ouvert à ce jour sur une éventuelle compétition entre les deux voies pour la protéolyse d'APP, suggérant alors que la voie « non amyloïdogénique » aurait un but protecteur en prévenant la génération de peptides amyloïdes. Cependant, des études ont démontré que l'annulation totale de l'activité de l' α -secrétase n'augmentait pas la quantité d'A β résultant de l'activité protéolytique de BACE1 *in vitro* (50), suggérant alors que les deux voies coexistent sans entrer en compétition pour cliver APP.

1.3.1 Les secrétases responsables du clivage primaire de l'APP

Dans le cadre de la voie non amyloïdogénique, APP est d'abord clivé par une protéine membranaire intégrale appartenant à la famille « A Disintegrin And Metalloprotease » (ADAM), la α -secrétase (51). Dans l'étude initiale, le rôle est attribué à la protéine ADAM10, dont un variant mutant suffit à inhiber l'activité α -secrétase endogène. Par la suite, plusieurs autres protéines se sont vues attribuer une fonction α -secrétase, incluant au moins 3 protéines de la famille ADAM à savoir ADAM9, ADAM10 et ADAM17 (52). À l'heure d'aujourd'hui, l'activité α -secrétase de la protéine ADAM10 n'est plus discutée, et cette dernière est même souvent définie comme synonyme du complexe; ce qui n'est pas le cas concernant les autres metalloprotéases dont la possible implication dans la protéolyse d'APP est encore discutée à ce jour (50). L'activité des protéines ADAMs correspond au mécanisme communément appelé « ectodomain shedding » durant lequel la partie extramembranaire d'une protéine intégrale est clivée puis libérée dans le milieu extracellulaire ou cytoplasmique, selon que cette dernière se trouve respectivement dans la membrane plasmique ou dans celle d'un organite. Concernant la protéine APP, celle-ci est clivée au niveau de la surface cellulaire (53, 54) ou bien du réseau trans-golgien (55). La protéolyse s'effectue au cœur de la séquence peptidique A β , entre les acides aminés 687 et 688 d'APP, libérant alors sa partie N-terminale soluble d'environ 115 kDa sAPP α et laissant une partie intramembranaire de 10 kDa nommée C83, qui contient la séquence peptidique tronquée de l'amyloïde β .

Durant la voie amyloïdogénique, APP est d'abord clivé par la β -secrétase, correspondant à la protéine BACE 1 dont l'abréviation signifie « β -site APP Cleaving Enzyme 1 ». BACE1 est une protéine transmembranaire de type I fortement exprimée au niveau du cerveau et du pancréas (56) mais dont l'activité se retrouve quasi essentiellement localisée au niveau cérébral (57). Elle possède un site catalytique aspartyl protéase, correspondant à deux résidus aspartates situés dans son domaine N-terminal, et justifiant son appartenance à la famille des protéases aspartiques. Comme ces dernières, BACE1 se localise préférentiellement dans les compartiments au pH acide, et est retrouvée en grande partie au niveau de l'appareil de Golgi (56). Bien qu'elle s'y trouve à un stade encore immature, elle est tout de même déjà capable d'effectuer le clivage d'APP (58) et pourrait ainsi être la principale responsable de la production intraneuronale de peptides A β (59, 60). Après sa maturation, BACE1 s'implante dans les membranes riches en lipides, microdomaines appelés radeaux lipidiques (61), où va s'effectuer le clivage amyloïdogénique d'APP. Celui-ci s'effectue entre ses acides aminés 670 et 671 ou 670 et 672, en amont de la séquence peptidique de l'amyloïde, permettant la future production de l'A β 40 ou de l'A β 42 respectivement. La protéolyse libère alors un fragment N-terminal soluble court d'environ 100 kDa appelé sAPP β , et laisse un peptide intracellulaire de 12 kDa appelé C99, qui contient donc la séquence peptidique intégrale de l'amyloïde β .

Au cours des dernières années, la β -secrétase est devenue une des cibles privilégiées de la recherche portant sur la maladie d'Alzheimer grâce à plusieurs découvertes révélant son fort potentiel amyloïdogène. La première découverte fût celle de la mutation de patients FAD nommée « APP swedish » (62), qui induit la production de protéines APP possédant une double mutation substituant une lysine en asparagine au niveau du codon 671 et une méthionine en leucine au niveau du codon 672. Celle-ci a la particularité de toucher directement le site de clivage d'APP par BACE, et induit un phénotype cellulaire de surproduction de peptides A β , leur taux pouvant être en effet jusqu'à 8 fois supérieur à celui retrouvé dans des cellules possédant APP non mutant (17). D'autre part, des expériences de « knock-out » de BACE1 chez la souris ont été menées, résultant en une absence de production de peptides A β tout en gardant un phénotype physiologique sain (63). C'est donc en toute logique que la β -secrétase a ouvert la porte à de nombreux espoirs thérapeutiques pour la maladie d'Alzheimer, mais il est à ce jour peu envisageable d'utiliser comme remède une inhibition de BACE1, sachant que celle-ci possède d'autres rôles essentiels au sein de la cellule. En effet, une déplétion de la protéine BACE1 pourrait influencer le bon fonctionnement de nombreux de ses partenaires, comme l'est par exemple la sous-unité bêta des canaux sodiques voltage-dépendants (64); ou encore la neuréguline, protéine impliquée dans la myélination des neurones des systèmes nerveux central et périphérique (65).

1.3.2 La γ -secrétase responsable du clivage secondaire de l'APP

La γ -secrétase est responsable du clivage secondaire de l'APP dans le cadre des deux voies, amyloïdogène et non amyloïdogène. Ainsi, si la protéine a suivie la première voie de dégradation, la γ -secrétase libèrera le fragment de 3kDa p3 dans le milieu extracellulaire. En revanche, si APP a suivie la seconde voie de dégradation, le clivage par la γ -secrétase induira le relâchement du peptide A β .

La γ -secrétase est un complexe protéique intramembranaire composé des protéines Nicastrin (NCSTN) (66), Anterior Pharynx defective 1 (APH-1) (67), Presenilin Enhancer 2 (PEN2) (68), ainsi que de la préséniline 1 ou 2 qui serait responsable, lorsqu'elle se trouve au sein du complexe, de l'activité aspartyl-protéase de la γ -secrétase grâce aux deux résidus aspartates transmembranaires hautement conservés présents dans sa structure (69, 70). Bien qu'elle soit la responsable de son activité catalytique, la préséniline requiert d'être au sein du complexe γ -secrétase afin de fonctionner de manière optimale. En effet, lors de la découverte des présénilines, plusieurs études démontrent la présence d'éléments « limitant » leur maturation (71, 72). Plusieurs années plus tard, le premier de ces éléments est isolé : il s'agit de la protéine intégrale de type I de 130 kDa NCSTN, ou « Aph-2 » chez *C. elegans*, dont la suppression d'expression induit des

caractéristiques phénotypiques similaires à celles induites par « knock-out » des homologues des présénilines chez *C. elegans*, « sel-12 » et « hop-1 » (66). Concernant APH-1 et PEN2, toutes deux sont des protéines polytopiques de 7 et 2 domaines transmembranaires respectivement, dont les fonctions chez *C. elegans* sont vraisemblablement similaires, et qui interagissent fortement avec les homologues de NCSTN, PS1 et PS2 (68). Au cours de la même étude, des preuves additionnelles sont apportées concernant la nécessité des trois facteurs dans la maturation et l'efficacité des présénilines. En effet, suite à l'inactivation indépendante de chacune des trois protéines par ARNi, les auteurs ont observé une réduction du clivage des principaux substrats de la γ -secrétase APP et Notch, associée à une baisse du niveau cellulaire de la forme mature de la préséniline. Par la suite, de nombreuses études de reconstitution et de « knock-down » ont été effectuées et ont prouvé que les quatre protéines PEN2, APH-1, NCSTN et préséniline, étaient nécessaires et suffisantes pour l'expression et l'activité de la γ -secrétase (73, 74).

La mise en place du complexe γ -secrétase mature est un processus complexe, impliquant des interactions entre chacune des protéines le composant. Tout d'abord, APH-1 s'associe à NCSTN immature au sein du réticulum endoplasmique (75). Ce sous-complexe s'additionne ensuite aux deux autres protéines, et leurs inter-régulations permettront la mise en place du complexe γ -secrétase mature. APH-1, serait un régulateur de la maturation des présénilines et de NCSTN. En effet, APH-1 interagit avec les deux protéines sous leurs formes mature et immature. Cependant, un « knock-out » d'APH-1 induit une dégradation des présénilines et de NCSTN, alors l'absence de préséniline ne réduit aucunement la quantité d'APH-1 (76). Une étude portant sur PEN2 effectuée dans la même année, vient conforter et améliorer cette hypothèse. De nombreuses évidences amènent à penser que PEN2 aurait un rôle direct dans le clivage protéolytique de PS1 et qu'APH-1 jouerait alors un rôle médiateur. En effet, une surexpression de PEN2 induit une hausse de PS1 sous forme mature, et un « knock-out » de PEN2, induit une accumulation de la forme immature de PS1 qui peut cependant être atténuée par « knock-out » d'APH-1 (77). Finalement, concernant les protéines PS1 et NCSTN, une étude révèle que celles-ci se régulent l'une l'autre. En effet, NCSTN jouerait un rôle dans la mise en place et la stabilisation de la préséniline dans les membranes cellulaires, alors même que l'absence de PS1 dans le complexe γ -secrétase inhibe fortement la maturation par glycosylation de NCSTN (78, 79).

1.4 La préséniline 1

1.4.1 Propriétés moléculaires

Les présénilines sont des aspartyl-protéases faisant partie de la famille des « Intramembrane-Cleaving Proteases » I-CLiPs. Ces protéines intramembranaires ont un site actif inséré au sein de la bicouche lipidique et clivent la partie transmembranaire de leur substrat par hydrolyse (80). Il existe à ce jour deux homologues de la préséniline, à savoir PS1, codée par le gène *PSEN1* présent sur le chromosome 14, et PS2, codée par le gène *PSEN2* présent sur le chromosome 1. Les deux protéines sont exprimées de manière ubiquitaire, mais sont surexprimées au niveau des tissus du cerveau en cours de développement (81). Celles-ci co-localisent au niveau des mêmes compartiments intracellulaires comme le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi précoce (82), partagent près de 67% de similarité (83), et subissent toutes deux une maturation par clivage endoprotéolytique. Celui-ci permet la production des fragments N-terminal (NtF) de 28 kDa et C-terminal (CtF) de 17 kDa (72) pour PS1, ainsi qu'un NtF de 40 kDa et un CtF de 23 kDa pour PS2 (84). En raison de la prévalence majeure de la FAD associée à la mutation de PS1, mais aussi au vu de la gravité des symptômes associés à la mutation de celle-ci en comparaison à ceux causés par la mutation de PS2 (85); l'étude menée lors de ce projet a été focalisée sur PS1, et c'est pourquoi nous détaillerons dans ce paragraphe les propriétés, environnement, et rôles de PS1 seulement.

PS1 est une protéine poly-transmembranaire de 467 acides aminés, retrouvée au niveau de membranes aussi diverses que la membrane plasmique, la membrane d'organelles intracellulaires, ou encore la membrane périnucléaire (86). Sa structure exacte est encore débattue à ce jour, mais les études les plus récentes proposent contre le modèle original de 8 domaines transmembranaires (TM) (87) un nouveau modèle composé de 9 hélices transmembranaires, dont les CtF et NTF seraient situés respectivement du côté extracellulaire/luminal et intracellulaire de la membrane, et la large boucle hydrophobe du côté cytosolique (88, 89). Bien que PS1 soit considérée comme une aspartyl-protéase, celle-ci se différencie de ses pairs par ses caractéristiques inusuelles. D'une part, les deux résidus aspartates « D275 » et « D385 » requis pour son activité catalytique se trouvent sur deux régions transmembranaires différentes, à savoir TM6 et TM7 respectivement (70). De plus, là où les aspartyl-protéases contiennent, de manière générale, un motif catalytique de type D(T/S)G(T/S), PS1 présente le motif GxGD (69). Cette particularité confère aux présénilines une place dans la famille des « Intramembrane-cleaving aspartyl proteases », où elles sont majoritairement représentées.

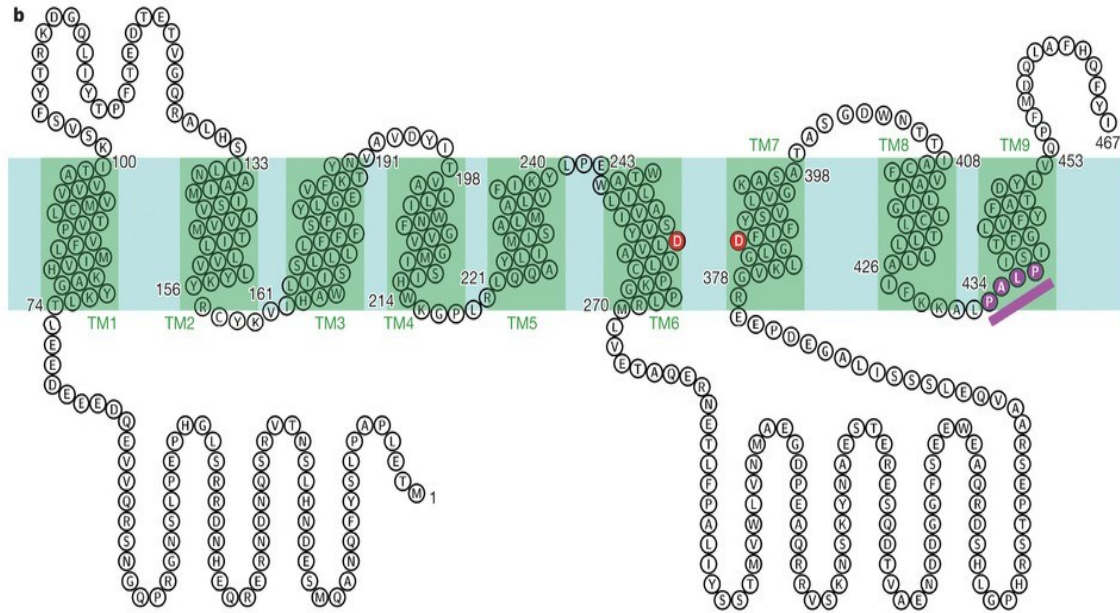


Figure 1.5 : Modèle moléculaire de la Préséniline 1

Modèle actuel de PS1 comprenant 9 domaines transmembranaires. Les résidus aspartates sont localisés aux positions « D275 » et « D385 » au niveau des TM6 et TM7 respectivement. Le motif « PALP » correspond à la séquence de reconnaissance du substrat. Image modifiée, d'après Li et al., *Nature*, 2013.

La protéine native de 43 kDa subit une maturation par clivage endoprotéolytique entre les acides aminés 291 et 299, donnant naissance aux deux fragments CtF et NtF. Ce clivage est effectué par une « présénilase » encore inconnue à ce jour, mais fortement suspectée d'être en fait PS1 elle-même, qui subirait donc une autoprolyse (90). La maturation s'effectuerait au sein du complexe γ -secrétase, initialement composé par NCSTN et APH-1 puis rejoint de PS1 pleine longueur, qui nécessiterait alors l'association finale de Pen-2 pour que la coupure ait lieu (77, 91). Une fois les CtF et NtF produits, une phosphatase encore inconnue à ce jour phosphoryle le CtF, induisant alors l'oligomérisation des deux fragments constituant dès lors la forme mature de PS1 (92).

A ce jour, près de 293 mutations provoquant la maladie d'Alzheimer sont recensées, et 221 sont retrouvées chez PS1 (13). Bien qu'il existe encore aujourd'hui un débat sur la notion de gain de fonction – perte de fonction en cas de mutation de la préséniline 1, il serait nécessaire de ne pas regrouper toutes les mutations de PS1 dans un seul et même ensemble, chacune d'entre elles provoquant un phénotype différent dans l'âge d'apparition de la maladie et son agressivité (longévité du patient, symptômes associés...) (93, 94). Aussi, même s'il est aujourd'hui globalement accepté que la plupart des mutations de PS1 induisent une augmentation du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$; les diverses études réalisées indiquent que cela est dû conséquemment à

une diminution de la production d'A β 40, d'une augmentation de la production d'A β 42, ou bien même des deux évènements conjoints, selon la mutation étudiée (95-97). Cependant, il est important de noter que toutes les mutations de PS1 ne mènent pas systématiquement à une augmentation de production de peptides amyloïdes, ni même un changement du ratio A β 40/A β 42 (98). Cette dernière information suppose ainsi que la mutation de PS1 pourrait causer une neurodégénéscence, et induire la maladie d'Alzheimer par une voie distincte de celle menant à une surproduction de peptides A β .

1.4.2 La mutation PS1 Δ 9

Le gène codant pour PS1 peut subir un épissage alternatif donnant alors naissance à différentes isoformes de la protéine. On retrouve ainsi naturellement la forme PS1 Δ 9 chez un sujet sain, mais au niveau des leucocytes uniquement (99). Dans un cadre pathologique, la mutation PS1 Δ 9 est décrite pour la première fois en 1995, chez des patients atteints d'un Alzheimer familial. Cette étude, pointe une mutation présente sur l'exon 9 du gène remplaçant un G en T dans le site accepteur d'épissage, menant à la délétion complète de l'exon lors de la transcription (100). Cette mutation se distingue de toutes les autres alors recensée jusque là chez PS1, qui consistent essentiellement en des mutations ponctuelles changeant simplement un acide aminé en un autre. Finalement, celle-ci mène à la production d'une protéine PS1 Δ 9 dépourvue de 29 acides aminés compris entre les positions 290 et 319 au sein de la boucle cytoplasmique, touchant alors le site de clivage endoprotéolytique se trouvant justement entre les position 260 et 320. Malgré cette délétion majeure, la protéine PS1 Δ 9 garde une structure identique à celle de l'holoprotéine PS1 WT. En revanche, la différence notable entre les deux variants protéiques se situe dans l'organisation de leurs formes matures. En effet, les patient Alzheimer dotés de PS1 Δ 9 présentent une accumulation de la forme immature non clivée, associée à un taux de fragments CtF et NtF drastiquement diminué par rapport à celui retrouvé dans une cellule de patient sain. Cela pourrait être expliqué par une destruction du site endoprotéolytique, ou par une altération de la conformation suite à la délétion des 29 acides aminés (101).

Il est important de noter que dans une cellule neuronale saine, c'est la forme mature de PS1 qui est majoritairement retrouvée, c'est-à-dire la forme oligomérisée des fragments CtF et NtF. En effet, la protéine holomérique possède une demi-vie d'environ une heure et demi, en comparaison aux fragments CtF et NtF qui possèdent une demi-vie de 24 heures (102). La forme immature de PS1 n'étant pas stabilisée et fonctionnelle au sein du complexe γ -secrétase, celle-ci est rapidement dégradée par le protéasome (103). Cependant, de manière très intéressante, il a non seulement été démontré que PS1 Δ 9 possède une demi-vie plus longue que l'oligomère CtF-NtF, mais que celle-ci possède en plus une activité peptidase intacte, sa

surexpression induisant même une surproduction d'A β 42 (104). Il a longtemps été spéculé que chez les patients possédant la forme PS1 Δ 9, la mise en place de la pathologie ainsi que l'accumulation de l'A β 42 étaient dus à l'absence de l'exon 9 de PS1. Or une étude prouve que la cause réelle serait la mutation dans le codon 290 provoqué par une telle délétion, changeant ainsi une sérine en cystéine (105).

1.4.3 Les rôles de PS1 indépendants de la voie amyloïde

1.4.3.1 PS1 et la voie de signalisation Notch

De nombreuses études soulignent l'évidence de l'implication de la préséniline 1 dans la voie de signalisation Notch. Chez *C. elegans* tout d'abord, le gène homologue de la préséniline 1 « *sel-12* » supporte l'expression des homologues de Notch « *glp-1* » et « *lin-12* » (106). Par la suite, des études chez la souris ont démontré la nécessité de PS1 dans le processus de développement structurel de l'embryon, grâce à l'observation du phénotype létal PS1^{-/-}. En effet, un « knock-out » de PS1 chez la souris entraîne une déformation grossière du squelette, des hémorragies, de nombreuses interférences au développement du système neuronal ; le tout suivi d'une mort rapide des souriceaux peu après leur naissance (107). La ressemblance du phénotype PS1^{-/-} avec celui de Notch^{-/-}, la baisse significative d'ARNm codant pour Notch1 dans le mésoderme présomitique des embryons de souris PS1^{-/-} (108), ou encore la forte co-expression de PS1 et Notch dans la zone ventriculaire des cerveaux d'embryons (109) sont d'autres évidences menant à penser que PS1 serait impliquée dans la mise en place de la voie de signalisation Notch.

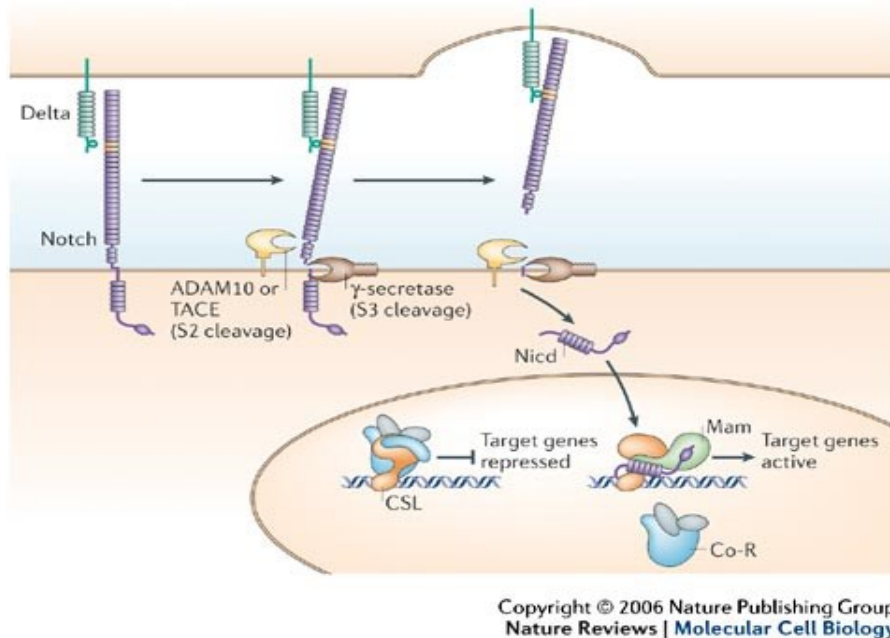


Figure 1.6 : Voie de signalisation Notch

La voie de signalisation Notch est mise en place suite à l'interaction entre le récepteur Notch1 et l'un de ses ligands, Delta ou Serrate. Ceux-ci induisent le clivage successif de Notch1 par une metalloprotéase de la famille ADAM puis par la γ -secrétase, qui permet le relâchement du promoteur transcriptionnel NICD. Image tirée de « *Notch signalling: a simple pathway becomes complex* », Sarah J. Bray, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.

La voie de signalisation Notch doit son nom à la protéine transmembranaire de type I Notch1. Celle-ci, tout comme ses deux ligands Delta et Serrate, est caractérisée par la répétition de domaines de type EGF (« Epidermal Growth Factor ») dans sa large partie extracellulaire. La liaison d'un des ligands au récepteur Notch1 induit le clivage subséquent de ce dernier par une metalloprotéases de la famille ADAM (110, 111) ; puis par la préséniline 1 elle-même (112), permettant alors le relâchement la partie intracellulaire de Notch1 NICD dans le cytosol. Celle-ci contenant une séquence NLS d'adressage nucléaire migre jusqu'au noyau et se lie au complexe de liaison à l'ADN CSL, nommé d'après les protéines le composant CBF1, Su(H) et LAG-1. L'ensemble néoformé est reconnu par la protéine Mastermind, qui va alors promouvoir la transcription de différents gènes, tels que le régulateur du cycle cellulaire p21 (113), les facteurs de transcription HES « Hairy/Enhancer of Split » (114, 115), ainsi que le gène Notch lui-même, créant alors une boucle d'autoactivation. La signalisation par Notch active par la suite un large spectre de fonctions cellulaires essentielles, généralement impliquées dans le développement embryonnaire, et la prolifération cellulaire (116).

1.4.3.2 PS1 et les voies de signalisations tyrosine kinase dépendantes

Un autre rôle joué par PS1 est celui d'activateur de la voie de signalisation initiée par le RTK (« Récepteur Tyrosine Kinase ») ErbB4. En effet, suite à la liaison de son ligand, la neuréguline, ErbB4 suit la classique voie d'activation des RTK consistant à la suite des évènements suivants : dimérisation du récepteur, activation par autophosphorylation, puis recrutement de protéines adaptatrices dans le but de transmettre le signal. Cependant, un évènement plus rare survient dans le processus de mise en place de la voie de signalisation, qui est la protéolyse intramembranaire d'ErbB4 suite à son activation. En effet, ErbB4 est clivé une première fois par la metalloprotéase ADAM17 (117), qui libère l'ectodomaine du récepteur dans la partie extracellulaire. Suite à cela, ErbB4 est pris en charge par la γ -secrétase puis son domaine transmembranaire est hydrolysé par PS1 (118). Ces évènements successifs mènent à la libération du domaine cytosolique d'ErbB4 « E4ICD » qui va alors former un complexe avec la protéine de signalisation TAB2 et le corépresseur N-CoR. Ceux-ci migrent ainsi jusqu'au noyau et répriment la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la différenciation de précurseurs neuronaux en astrocytes (119).

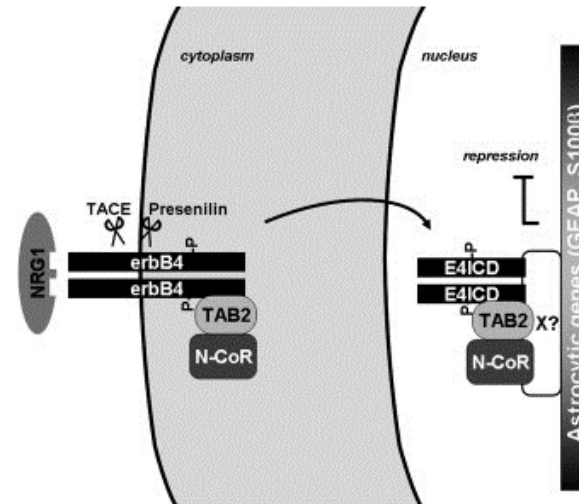


Figure 1.7 : Voie de signalisation ErbB4

La voie de signalisation ErbB4 est activée suite à l'interaction du RTK ErbB4 avec la neuréguline NRG1. Celle-ci induit le clivage du récepteur par PS1, qui permet la libération du fragment E4ICD. E4ICD s'associe aux protéines TAB2 et N-CoR et réprime la transcription de nombreux gènes proneuronaux. Image tirée de « *Presenilin-Dependent ErbB4 Nuclear Signaling Regulates the Timing of Astrogenesis in the Developing Brain* », Pablo Sardi, *Cell Volume 127, Issue 1*

Une autre RTK clivée par PS1 est la protéine Ryk, ayant la particularité de lier les ligands Wnt. La voie Wnt joue un rôle primordial dans le développement embryonnaire précoce, grâce à la mise en place de la polarité cellulaire et de la détermination de la destinée cellulaire. Les protéines Wnt sont des glycoprotéines secrétées hautement conservées dans l'évolution et communément étudiées dans la voie Wnt- β -caténine, suite à leur activation du récepteur à 7 domaines transmembranaires Frizzled associé à la protéine LRP5/6 (120). Ce n'est que récemment que leur capacité à activer certains RTK a été démontrée.

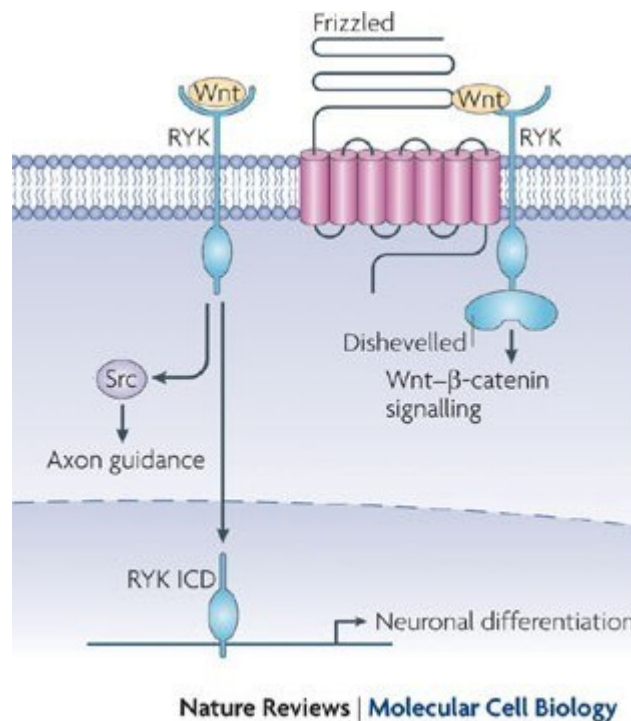


Figure 1.8 : Voie de signalisation Wnt : comparaison des récepteurs Ryk et Frizzled

La voie de signalisation Wnt est activée suite à la liaison du ligand Wnt sur les récepteurs Frizzled et/ou RYK. La signalisation se poursuit alors grâce à l'association de RYK avec différentes protéines cytoplasmiques, ou grâce à la libération du fragment RYK ICD suite au clivage du récepteur par Ps1. Image tirée de « *Proximal events in Wnt signal transduction* », Stéphane Angers, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.

La signalisation *via* le récepteur Ryk permet différents événements selon la nature du ligand lié : la liaison de Wnt3a permet la croissance de neurites au niveau des neurones de ganglions spinaux (121) ainsi que la différenciation neuronale; celle de Wnt5a induit l'inhibition de l'extension des axones corticaux (122); et enfin la liaison de Wnt3 permet la guidance axonale par chémo-répulsion (123). Le récepteur Ryk est un RTK

atypique du fait qu'il ne possède pas d'activité tyrosine kinase (124). La transmission du signal suivant l'activation de Ryk par un ligand Wnt serait permise grâce aux clivages successifs subits par Ryk, d'abord par une protéase encore inconnue, puis par la préséniline 1 (125). Le domaine intracellulaire de Ryk ainsi libéré migre jusqu'au noyau, et agit comme facteur transcriptionnel de gènes pro-neuronaux. D'autres études apportent des évidences supplémentaires quand au rôle de Ryk dans la transmission du signal Wnt, menant à penser que Ryk pourrait également s'associer au récepteur Frizzled (121) ou encore participer à la mise en place d'une signalisation cytoplasmique via son association avec une tyrosine kinase de la famille SRC (126).

1.4.3.3 PS1 interagit avec les protéines de la famille Armadillo

Les protéines de la famille Armadillo telles que la β -caténine, la plakoglobine, l' α -importine ou encore la p120 caténine sont connues pour leur rôle dans l'adhésion cellulaire. Certaines d'entre elles, et notamment les protéines p120, β -caténine, plakoglobine et la « Neural-Specific Plakophilin Related » NPRAP, aussi appelée δ -caténine, ont été retrouvées au sein du noyau; et des évidences indiquent qu'elles joueraient un rôle dans la transcription génique. Plusieurs études ont démontré que PS1 interagissait avec certaines de ces protéines à travers sa boucle cytoplasmique C-terminale, lui prêtant alors un rôle de médiateur transcriptionnel indirect. Tout d'abord, une étude démontre que l'interaction de PS1 avec la plakoglobine permet une régulation négative de la voie Wnt (127). En effet, un des maillons clés de la voie Wnt est le complexe composé de la protéine β -caténine liée au facteur de transcription Tcf-4, qui agit comme activateur de transcription d'un large ensemble de gènes répondant à la signalisation Wnt. Cependant, l'interaction de PS1 avec la plakoglobine induit cette dernière à se lier avec Tcf-4 et forme dès lors un complexe inactif, inhibant ainsi indirectement l'expression des gènes de la voie Wnt. Un autre partenaire intéressant de PS1 est la protéine NPRAP, spécifiquement retrouvée dans les neurones (128). Celle-ci jouerait un rôle de médiateur transcriptionnel indépendant de la voie Wnt, en promouvant notamment l'expression des inhibiteurs de transcription IFI16 et RNaseL impliqués dans la sénescence cellulaire; et inhibant celle du gène BCHE codant pour la butylcholinestérase, enzyme hautement impliquée dans la pathologie d'Alzheimer (129).

1.5 Hypothèse et objectifs de recherche

Une mutation de la protéine PS1, où qu'elle se situe, mène à la mise en place d'une forme précoce et agressive de la maladie d'Alzheimer. L'étude clinique et physiologique des patients révèle des symptômes

différents, variant d'une mutation à l'autre. De plus, et de manière fort intéressante, certains patients ne présentent pas de débalancement du ratio A β 40/A β 42, ni même d'accumulation de peptides amyloïdes au sein de leurs cerveau ; qui sont les caractéristiques typiques utilisées jusque lors dans le diagnostique de la pathologie. Cette dernière observation a ainsi mené à l'émission de l'hypothèse selon laquelle PS1 jouerait un rôle dans une voie concomitante à la voie amyloïdogénique dont le débalancement conduirait à la pathologie d'Alzheimer.

Le projet de cette maîtrise est né dans le but d'apporter de nouveaux éléments de réponse à cette problématique. Pour ce faire, nous essaierons de déterminer de nouveaux rôles de la protéine PS1, grâce à l'identification de nouveaux partenaires à travers un criblage par double hybride en levure. De plus, nous axerons l'ensemble de l'étude sur la comparaison interactionnelle de PS1 WT avec la forme mutée PS1 Δ 9. Celle-ci a en effet été jugée intéressante dans le cadre d'une étude de gain ou de perte d'interacteurs protéiques par sa particularité de garder une structure identique à la protéine native, tout étant dépourvue de 29 acides aminés initialement présents dans la boucle cytosolique C-terminale d'importance majeure dans les différentes interactions de PS1. Ainsi, cette étude permettra d'une part d'identifier de nouveaux partenaires de la préséniline 1, et d'autre part d'observer une éventuelle différence interactionnelle entre la protéine native et l'une de ses formes mutée. L'ensemble de ces données pourrait ainsi nous fournir des indices dans la quête d'explication de la mise en place de la FAD chez des patients possédant une forme mutée de PS1.

2 Matériel et méthodes

2.1 Préalables au criblage par double hybride en levure

Le système de criblage par double hybride en levure permet de détecter l'interaction entre deux protéines dans un contexte cellulaire. En effet, l'utilisation du modèle *Saccharomyces cerevisiae* permet d'observer une interaction protéique d'une manière indirecte mais rapide, grâce à la constatation binaire « pousse » ou « ne pousse pas » des levures contenant les protéines étudiées. Le principe de base de cette technique repose sur l'assemblage d'un activateur transcriptionnel survenant suite à l'interaction des deux protéines cibles. Ce dernier permettra alors la transcription d'un gène rapporteur permettant la pousse de la levure candidate sur milieux sélectif (voir Fig 2.1).

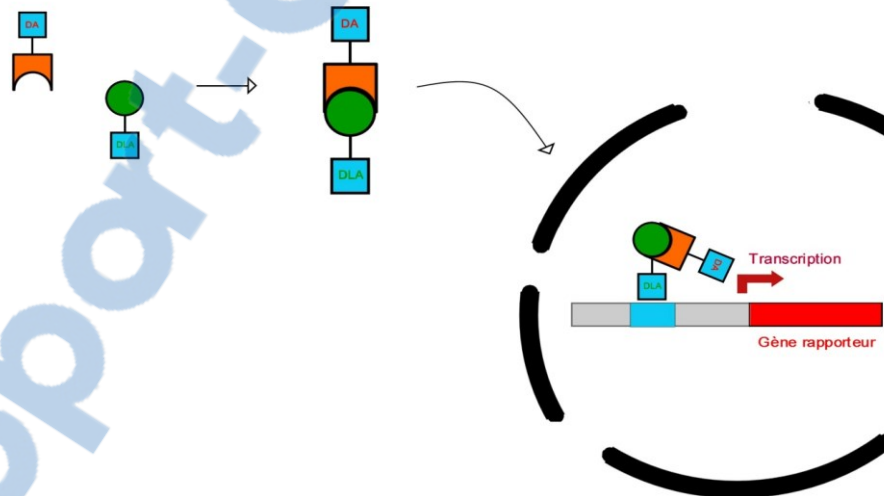


Figure 2.1 : Système basique du double hybride

Le système de double hybride permet l'interaction de deux protéines d'intérêt (ici en vert et orange), l'une étant fusionnée à un domaine de liaison à l'ADN « DLA » et l'autre à un domaine d'activation « DA ». La transcription du gène rapporteur, ici en rouge, ne sera possible que si les deux protéines interagissent, afin de rapprocher les deux domaines « DLA » et « DA », nécessaires à l'activation du complexe de transcription.

2.1.1 Le système « split-ubiquitin »

Comme mentionné précédemment, PS1 est une protéine hydrophobe située dans les membranes cellulaires, et son étude par la méthode classique du double hybride est rendue impossible par son incapacité physique à migrer dans le noyau. Pour parer à cela, l'étude d'interaction de PS1 s'est faite grâce à la méthode novatrice du « split-ubiquitin », développée par Johnsson et Varshavsky (130) (voir Fig 2.2).. Comparativement aux études de doubles-hybrides précédemment effectuées utilisant seulement des fragments de Ps1, cette méthode permet d'étudier la protéine pleine longueur, qui plus est dans un milieu membranaire; rendant ainsi les conditions d'expérimentation proches d'un contexte physiologique.

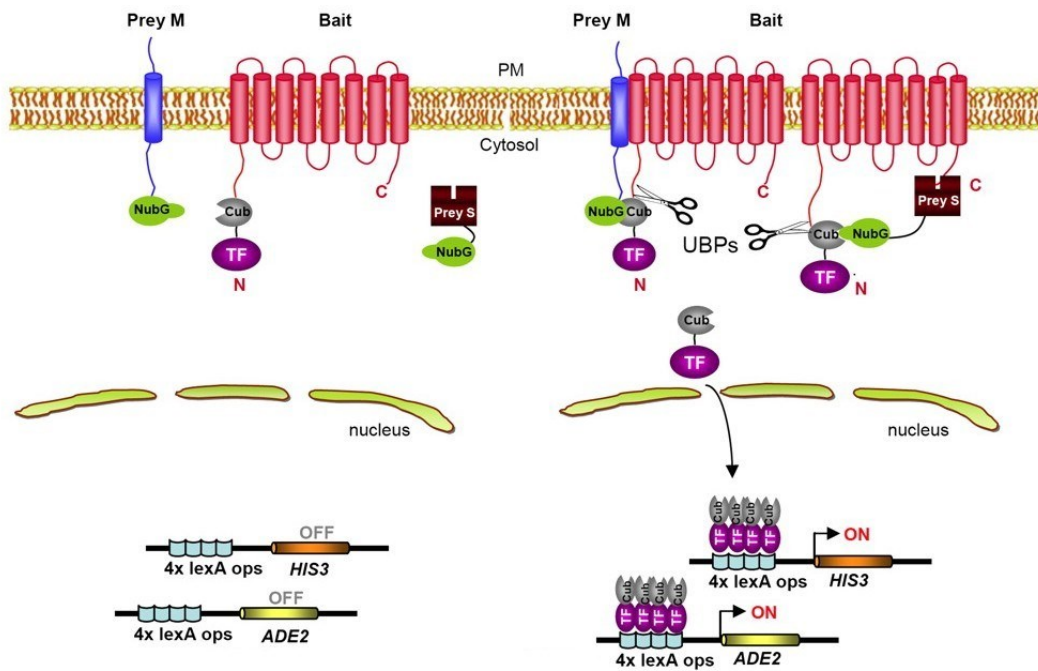


Figure 2.2 : Système split-ubiquitin

Détails du système « split-ubiquitin », hors interaction protéique à gauche, ou lors d'interaction à droite. La proie est ici appelée « Prey », l'appât « Bait », le CTF de l'ubiquitin est appelé « Cub » et le NTF muté « NubG ». TF désigne le facteur de transcription, LexA le domaine de liaison à l'ADN et enfin HIS3 et ADE2, sont les gènes rapporteurs transcrits grâce à l'action du TF. Image modifiée, d'après Gisler S., Kittanakom S.; *Molecular & Cellular Proteomics* 7, July 1 2008.

La méthode « split-ubiquitin » permet de détecter l'interaction entre une protéine d'intérêt membranaire, et une seconde protéine membranaire ou cytoplasmique. Pour cela, un « appât » et une « proie » ont été préalablement construits de la manière détaillée ci-après.

L'appât est constitué de PS1 fusionné à la partie C-terminale de l'ubiquitin que l'on appellera « Cub », ainsi qu'au facteur de transcription artificiel « TF ». TF est constitué de LexA, protéine de liaison à l'ADN provenant d'E. Coli, et du domaine d'activation de VP16, dérivé du virus herpes simplex (131). La proie quand à elle, est constituée d'une protéine « X » exprimée dans le cerveau humain (Dualsystem « normalized human fetal brain NubG-X » P02304) fusionnée à la partie N-terminale de l'ubiquitin mutée « NubG », dont l'isoleucine 13 a été substituée par une glycine.

Dans un contexte physiologique, l'ubiquitin joue un rôle d'« étiquette » et permet la dégradation d'une protéine via le processus de poly-ubiquitination. En effet, la présence d'un tel motif sur une protéine permet sa reconnaissance par les protéases spécifiques de l'ubiquitin « UBPs », qui vont alors cliver le peptide reliant l'ubiquitin à la protéine cible, tandis que celle-ci sera dégradée par le protéasome. Dans le système « split-ubiquitin », la fonctionnalité de l'ubiquitin est détournée afin de permettre les événements caractéristiques de la méthode, décrite ci-dessous.

Après avoir transformé la souche de levure répondant au système avec les plasmides codants chacune des protéines de fusions (décrit en section 2.2.1), celles-ci se trouvent exprimées dans la cellule. En cas d'interaction, Cub et NubG seraient alors assez proches dans l'espace pour s'associer et reformer ainsi une pseudo-molécule d'ubiquitin. A noter, la pré-modification de Nub en NubG a été effectuée spécifiquement pour la viabilité de cette étape, car elle permet l'association des deux moitiés d'ubiquitin uniquement en cas d'interaction de l'appât et de la proie. En effet, si Cub était en présence de Nub non modifié (Nubl), ces deux moitiés s'associeraient spontanément, ne reflétant alors aucunement l'interaction entre les deux protéines de fusion. Une fois la pseudo-molécule d'ubiquitin reconstituée, celle-ci est reconnue par les UBPS qui clivent le peptide en amont et permettent la libération dans le cytoplasme de Cub associé à TF : celui-ci pourra alors migrer dans le noyau et activer la transcription des gènes rapporteurs codant pour les acides aminés histidine et adénine. Dès lors, il sera aisé de distinguer les levures transformées contenant des protéines interactrice, du fait qu'elles soient les seules ayant la capacité de croître sur milieu sélectif.

2.1.2 Les levures *Saccharomyces cerevisiae*

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un modèle couramment utilisé en biologie cellulaire, et notamment dans le cadre de criblages, car celle-ci peut intégrer et exprimer des vecteurs codant pour des protéines humaines, permettant ainsi leur étude préliminaire dans un contexte cellulaire eucaryote. Lors de ce projet, nous avons utilisé les souches CD3-808 « MAT a » et CD3-809 « MAT α », afin d'effectuer un criblage combiné au système « split-ubiquitin ». En effet, ces levures ont été créées par l'*Arabidopsis Biological*

Resource Center (<https://abrc.osu.edu/>) afin de répondre au système « split-ubiquitin », grâce à l'insertion du domaine d'ancrage du facteur de transcription LexA-Vp16 dans son génome, lequel permet l'induction de la transcription des gènes *HIS3* et *ADE2* codant pour l'histidine et l'adénine respectivement. Les appellations « MAT a » et « MAT α » font référence aux allèles du locus « MAT » présents dans les cellules de levures haploïdes, permettant la reproduction sexuée des levures. En effet, les cellules haploïdes sont capables de « s'accoupler » avec les cellules porteuses de l'allèle *MAT* opposé, afin de créer une cellule diploïde stable. Pour ce faire, les levures « MAT a » produisent le « facteur a », et les levures « MAT α » produisent le « facteur α », chacun étant reconnu par les cellules de levures contenant l'allèle opposé. En réponse à cela, la levure va produire des projections cellulaires en direction de la levure du type opposé ayant sécrété le facteur d'accouplement. La rencontre des deux cellules va ainsi induire leur fusion en un seul être diploïde.

Les levures sont maintenues sur boîtes de pétris 100mm composé d'YPAD-Agar (10g peptone, 5g d'extrait de levure, 10g glucose, 20mg adénine, 10g agar, H₂O qsp 500mL). Une fois transformées, les clones positifs sont sélectionnés puis maintenus sur pétris contenant un milieu minimum de sélection (recette de base : 10g glucose, 3,35g « yeast nitrogen base », 10g agar, acide aminé à rajouter selon sa concentration, H₂O qsp 500mL). Ceux-ci manquent d'un ou de plusieurs acides aminés essentiels et ne permettent ainsi qu'aux transformants de survivre, grâce au vecteur intégré contenant la séquence codante pour le(s) dit(s) acide(s) aminé(s) (voir Tableau 1).

Tableau 1 : Milieux de sélection pour criblage en levure

Pétri sélectif : milieu minimum	Acide(s) aminé(s) ajouté(s)	Transformants sélectionnés
-T*	320mg DOMs [†] -TL + 50mg Leucine	Les levures contenant le vecteur « proie »
-L*	320mg DOMs [†] -TL + 10mg Tryptophane	Les levures contenant le vecteur « appât »
-TL*	320mg DOMs [†] -TL	Les levures contenant les vecteurs « appât » et « proie »
-TLHA*	300mg DOMs [†] -TLHA	Les levures contenant les vecteurs « appât » et « proie » ; codant pour des protéines interagtrices.

* -T sans tryptophane, -L sans leucine, -TLHA sans tryptophane, leucine, histidine ni adénine

† DOMs = « Drop Out Medium supplement »

Les mêmes recettes auxquelles l'agar a été retiré peuvent également être réalisées afin de permettre la croissance des levures en milieu liquide. L'utilisation d'une méthode de culture liquide permet d'obtenir un nombre de colonies de levures bien supérieur à celui obtenu sur boîte de pétris, et a été généralement choisie dans le but de procéder à la transformation ou à l'accouplement des levures (voir sections 2.2.1 et 2.2.3).

2.1.3 Liste des plasmides du système « split-ubiquitin »

Tableau 2 : Liste des plasmides utilisés pour le criblage « split-ubiquitin » en levure

Nom de l'insert	Vecteur hôte	Taille de l'insert	Protéine résultante
PS1 WT	pBT3-N	1403 pb	PS1 WT – Cub - TF
PS1Δ9	pBT3-N	1317 pb	PS1Δ9 – Cub - TF
« X »	pPR3-N	-	« X » -NubG
-	pPR3-N	-	Peptide non sens - NubG
Fe65	pNubG	1962 pb	Fe65 - NubG
APP	pTSU2	2131 pb	APP – Cub - TF
Ost1	pOst1	1521 pb	Ost1 - Nubl

2.1.3.1 « Appât » pBT3-N PS1-Cub-LexA-VP16

Le vecteur pBT3-N (Dualsystem) a permis l'expression de la protéine de fusion « appât » (construction détaillée en section 2.1.4). L'ADNc codant pour PS1 WT ou PS1Δ9 a été inséré au niveau du MCS (Multiple Cloning site) dans les sites de restriction Pst1 et Nco1. Le vecteur pBT3-N recombinant permet, sous contrôle du promoteur du cytochrome C1 de levure CYC1, l'expression de la protéine de fusion PS1 liée par son domaine N-terminal à Cub, ainsi qu'au TF LexA-VP16 (voir Tableau 2). Conformément au modèle

structurel le plus récent, la partie N-terminale de PS1 se trouve du côté cytosolique de la membrane (89). La construction permet ainsi la localisation de la partie Cub-TF dans le cytoplasme, pré-requis essentiel au fonctionnement du système « split-ubiquitin ».

Le vecteur pBT3-N contient une séquence de résistance à l'antibiotique Kanamycine (*KanR*), permettant de sélectionner les transformants bactériens. Il contient également le gène codant pour l'acide aminé leucine (*Leu2*), permettant ainsi de rendre les levures transformées prototrophes pour cet acide aminé. Cette caractéristique acquise leur permettra d'être sélectionnées lorsqu'elles seront portées à croître sur un milieu -L.

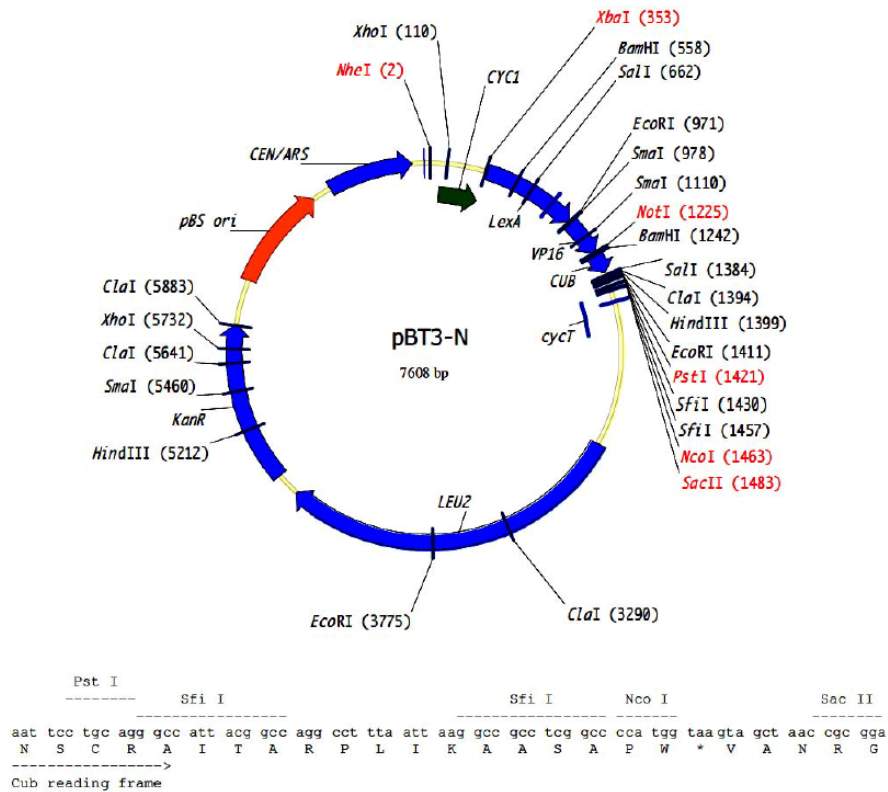


Figure 2.3 : Vecteur pBT3-N

Carte du vecteur pBT3-N dans lequel sera inséré l'ADNc de Ps1 WT ou Ps1 Δ 9, permettant l'expression de la protéine de fusion PS1-Cub-TF. Tiré de Mo Bi Tech, « Y2H Membrane starter kit ».

2.1.3.2 « Proie » pPR3-N-NubG-X

Le vecteur pPR3-N-NubG-X provient d'une banque pré-transformée (Dualsystem « normalized human fetal brain NubG-X » P02304). Le promoteur de levure *CYC1* permet l'expression d'un ADNc « X » provenant d'un extrait total de cerveau humain préalablement cloné entre les sites *Sfi*1 par la compagnie; ainsi que celle de la séquence codante pour NubG. La protéine résultante du vecteur recombinant est alors composée d'une protéine « X » fusionnée à NubG par son domaine NtF, et constitue ainsi la « proie » dans le système « split-ubiquitin » (voir Tableau 2). La sélection des bactéries transformantes s'effectue grâce à la séquence de résistance à l'antibiotique Ampicilline (*Amp*). Aussi, le vecteur possède le gène permettant la production de l'acide aminé tryptophane (*Trp1*) rendant ainsi les levures transformées prototrophes pour cet acide aminé, et sélectionnables sur un milieu –T.

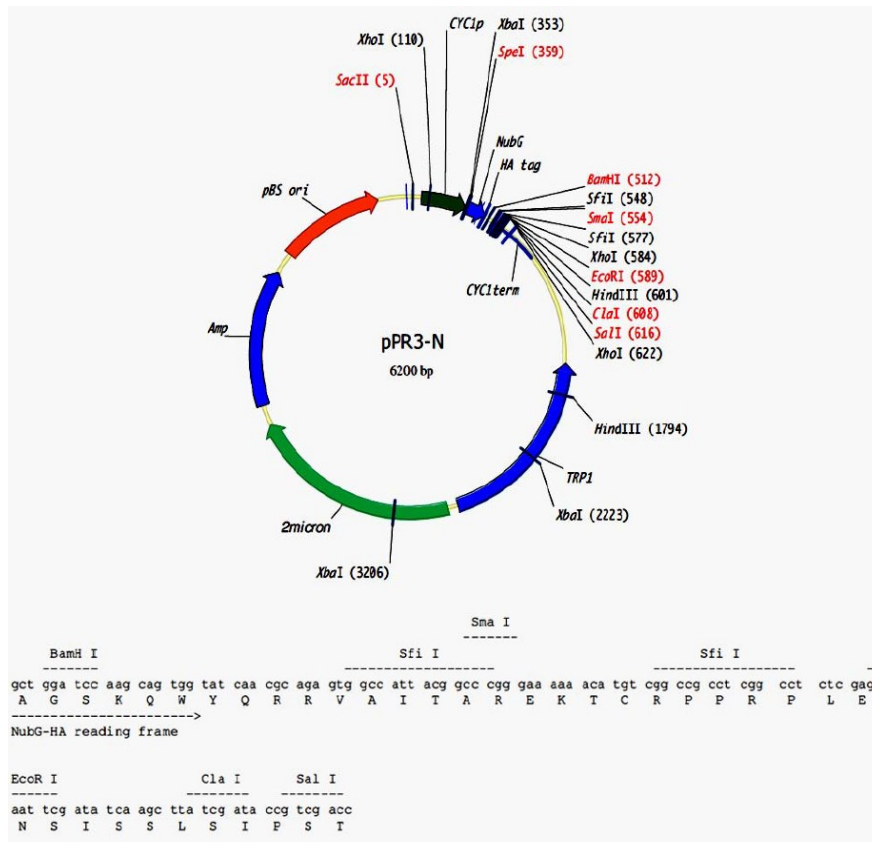


Figure 2.4 : Vecteur pPR3-N

Carte du vecteur pPR3-N dans lequel sont insérés les ADNc codant pour des protéines exprimées au niveau du cerveau humain. Tiré de Mo Bi Tech, « Y2H Membrane starter kit » ; DualsystemBiotech, « cDNA Library Construction Kit».

Le vecteur vide pPR3-N permettant l'expression d'un peptide non-sens fusionné à NubG a également été utilisé (voir Tableau 2), notamment à des fins de contrôle négatif dans certaines étapes du projet.

2.1.3.3 pNubG-Fe65, pTSU2-APP et pOst1-Nub

Les vecteurs pNubG-Fe65, pTSU2-APP et pOst1-Nubl (Dualsystem) sont utilisés lors de l'essai fonctionnel détaillé dans la section (2.2.2). Les vecteur pNubG-Fe65 et pOst1-Nubl permettent l'expression de protéines « proies » dans le cadre de l'essai fonctionnel. Ils expriment respectivement les protéines de fusion Fe65-NubG et Ost1-Nubl (la partie N-terminale de l'ubiquitin non modifiée), sous le contrôle du promoteur de levure alcool déshydrogénase ADH1. Tous deux contiennent les séquences permettant respectivement une résistance à l'antibiotique Ampicilline (*AmpR*), ou bien l'expression de l'acide aminé tryptophane (*Trp1*) par les bactéries ou levures ayant intégré le plasmide. Le vecteur pTSU2-APP permet l'expression d'une protéine « appât » dans le cadre de l'essai fonctionnel. Celui-ci permet en effet, sous contrôle du promoteur TEF1, l'expression de la protéine APP fusionnée à Cub-LexA-VP16, et contient les gènes de résistance à l'ampicilline (*KanR*) et celui codant pour la leucine (*Leu2*).

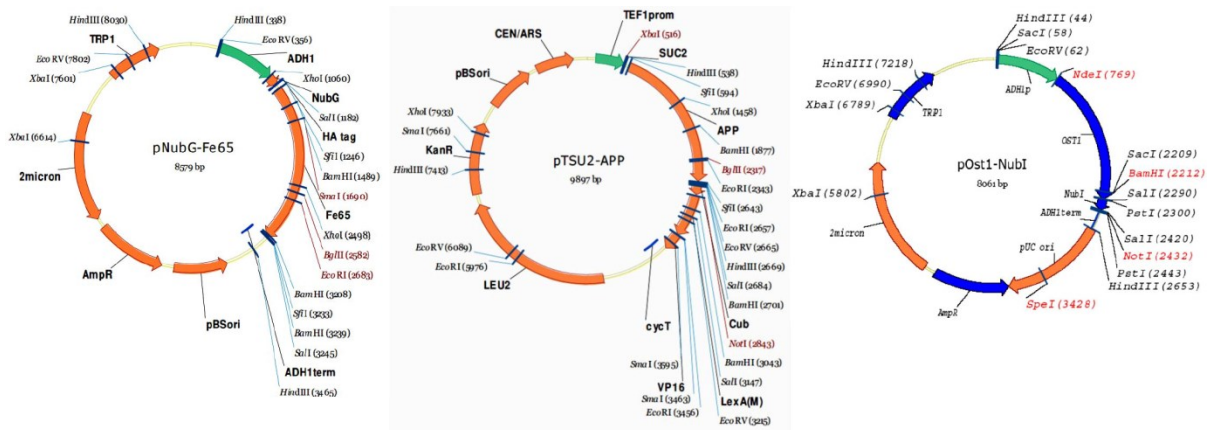


Figure 2.5 : Cartes des vecteurs utilisés dans l'essai fonctionnel

Carte des plasmides pNubG-Fe65, pTSU2-APP et pOst1-Nubi utilisés dans le cadre de l'essai fonctionnel du système split-ubiquitin. Tiré de Mo Bi Tech, « Y2H Membrane starter kit ».

2.1.4 Construction du vecteur pBT3-N PS1-Cub-LexA-VP16

2.1.4.1 Extraction de l'ADNp pBT3-N de bactéries DH5α

Le vecteur pBT3-N provient du le stock glycérol bactérien à -80°C du laboratoire (750µL de la culture bactérienne + 750µL de LB+glycérol 30%). Afin de l'obtenir, nous avons donc procédé aux méthodes classiques d'extraction et de purification d'ADN plasmidique à partir de bactéries.

Pour cela, une loupe de bactéries provenant du stock glycérol est inoculée dans un milieu composé de LB (5g tryptone, 2,5g d'extrait de levure, 2,5g de NaCl pour 500mL qsp) contenant de la Kanamycine dosée à 1/1000. Le plasmide pBT3-N contenant une séquence de résistance à la kanamycine, l'ajout de celui-ci dans le milieu de culture permet de sélectionner spécifiquement les bactéries contenant le plasmide pBT3-N que l'on souhaite extraire. L'inoculum, de 5 ou 50mL, selon la quantité de plasmides désirée par la suite, est ensuite mis sous agitation 220g à 37°C sur la nuit. Suite à cela, la culture bactérienne est centrifugée, et le culot bactérien récupéré : le protocole d'extraction d'ADN plasmidique varie alors selon que l'on utilise une méthode commerciale (type Zymo Research ou Qiagen) ou bien dite « maison ». Nous décrivons ici cette dernière, étant donné que les protocoles basiques d'extraction d'ADN plasmidique reposent sur le même principe de lyse alcaline (132), permettant d'isoler les plasmides désirés tout en éliminant l'ADN du chromosome bactérien.

Dans cette méthode, le culot bactérien issu de 2mL de culture est d'abord centrifugé, puis resuspendu dans 250µL du tampon « P1 » (50mM TrisHCl, 10mM EDTA, 1% RNase A, pH8) qui permet d'éviter la contamination de l'ADN plasmidique par de l'ARN. Par la suite, 250µL de « P2 » (200mM NaOH, 1% SDS, pH13) est ajouté au milieu : celui-ci va permettre la lyse des bactéries et la dénaturation de l'ADN bactérien par séparation de ses deux brins. Après avoir agité le milieu réactionnel par inversion, celui-ci est laissé 5 minutes à température pièce puis on y ajoute le tampon « P3 » (3M KOAc pH=5,5) qui permet de neutraliser de la solution, et provoquer ainsi la renaturation brutale de l'ADN chromosomique qui va former des enchevêtrements insolubles. La mixture est ensuite laissée 5 minutes sur glace afin d'assurer une parfaite neutralisation, puis elle est centrifugée 10 minutes à 13 000g, à 4°C. Cette étape permet de séparer les composés bactériens insolubles précipitant dans le culot de l'appendorf de l'ADN plasmidique soluble présent dans le surnageant. Celui-ci est alors récupéré et transféré dans un nouvel eppendorf, et 0,7V d'isopropanol est ajouté afin de faire précipiter l'ADNp. A nouveau, une centrifugation de 10 minutes à 13 000g 4°C est effectuée à 4°C. Le culot d'ADN plasmidique est alors repris et lavé dans 250µL d'EtOH, avant d'être une dernière fois centrifugé, 5 minutes à 13 000g et 4°C, puis resuspendu dans 30µL d'H₂Odd (eau distillée,

déionisée). Le plasmide ainsi obtenu est dosé grâce au spectrophotomètre puis est stocké à -20°C jusqu'à sa réutilisation.

2.1.4.2 Obtention des inserts PS1 WT et $\Delta 9$ par PCR

Concernant les ADNc de PS1 WT et $\Delta 9$, ceux-ci sont obtenus par PCR (« Polymérase Chain Reaction ») sur les vecteurs pcDNA3 PS1 WT et pcDNA3 PS1 $\Delta 9$ préalablement créés et présents au laboratoire. Les détails de la procédure réalisée sont exposés ci-après.

Tableau 3 : Composition du mélange réactionnel de PCR

Produits	Quantité pour 50 μ L (en μ L)
H ₂ O	32,5
5X Phusion Buffer*	10
10nM dNTPs	1
10 μ M Oligo. 334	2,5
10 μ M Oligo. 335	2,5
Vecteur pcDNA3-PS1 (WT ou $\Delta 9$)	1
Phusion DNA Polymerase*	0,5

* Phusion®, Life Technologies

Les oligonucléotides ont été spécialement créés afin de permettre l'amplification de la séquence codante pour PS1 comprise dans le vecteur. De plus, les sites de restrictions PstI et NcoI ont été insérés au niveau de ses extrémités 5' et 3' respectivement afin de permettre son clonage dans le vecteur pBT3-N (voir Tableau 4).

Tableau 4 : Liste des oligonucléotides utilisés pour amplification des ADNc de PS1 WT et PS1 $\Delta 9$

Oligonucléotide	Séquence nucléotidique	Site de restriction contenu*	Site nucléotidique d'hybridation à PS1
PS1-1 « Forward » PstI	TTTTT CTGCAGG ATGACAGAGTTACCTGCA	PstI	n°1 à n°18
PS1-1405 « Reverse » – Stop NcoI	TTTTTTTT CCATGG CTAGATATAAAATTGATGGAA	NcoI	n°1385 à n°1405

*Les sites de restrictions sont indiqués en gras italique dans la séquence nucléotidique.

La caractérisation des températures d'hybridation des oligonucléotides s'est effectuée grâce au calcul suivant :

$$T = 62,3 \text{ °C} + 0,41 \times (\% \text{ G+C}) - (500/\text{nombre de bases})$$

Au cours des premiers cycles de PCR, il est important de paramétrer les différentes températures que l'on appellera « T_x » et « T_{xTOT} », afin d'amplifier sélectivement la séquence génique de PS1 et réduire les chances d'amplification d'artéfacts. T_x est effet la température d'hybridation de la partie génique de l'oligonucléotide, alors que T_{xTOT} est la température d'hybridation de l'oligonucléotide dans son ensemble.

Les détails du calcul sont donnés pour l'oligonucléotide 334 :

$$T_x \text{ 334} = 62,3 \text{ °C} + 0,41 \times (8 \times 100 / 18) - (500 / 30)$$

$$T_x \text{ 334} = 64 \text{ °C}$$

De même, on obtient :

$$T_x \text{ 335} = 57,8 \text{ °C}$$

$$T_{xTOT} \text{ 334} = 64,8 \text{ °C}$$

$$T_{xTOT} \text{ 335} = 58,5 \text{ °C}$$

D'après les spécifications de la polymérase Phusion® (Life Technologies), la température d'hybridation finale est celle de la température calculée la plus basse des deux oligonucléotides +3°C. On retiendra donc $T_x = 60,8 \text{ °C}$ et $T_{xTOT} = 61,5 \text{ °C}$. Les cycles du programme PCR mis en place sont décrits dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Cycles PCR mis en place pour l'obtention des inserts PS1 WT et PS1Δ9

Nature du cycle	Nombre de fois répété	Température	Temps	Étape correspondante
Hybridation génique	4	98°C	4 minutes	Dénaturation
		60,8°C	10 secondes	Hybridation
		72°C	30 secondes	Élongation
Hybridation totale	35	72°C	30 secondes	Élongation
		61,5°C	10 secondes	Hybridation
		72°C	30 secondes	Élongation

Une fois la PCR terminée, le milieu réactionnel est déposé sur gel d'agarose 1% (1% agarose, tampon TAE1X) et migre par électrophorèse dans le tampon TAE1X (0,5% TrisBase, 0,11% acide acétique, 100µM EDTA). Cette méthode permet de séparer les séquences d'ADN selon leur poids moléculaire, au fur et à mesure que celles-ci traversent la matrice d'agarose. Une fois la migration effectuée, la bande d'ADN de 1500kb environ, correspondant supposément à notre amplicon, est excisée du gel grâce à un scalpel, puis purifiée sur colonne grâce au kit « Zymoclean™ Gel RNA Recovery » (Zymo Research).

2.1.4.3 Digestion du vecteur pBT3-N et des inserts PS1 :

Afin d'insérer les séquences codantes pour PS1 WT et PS1Δ9 dans le vecteur pBT3-N, tous sont digérés par les enzymes PstI et NcoI. Ces deux sites de restriction ont été spécifiquement choisis car ils sont les seuls à n'être présents qu'une seule fois dans le MCS du vecteur pBT3-N. Ils avaient alors été intégrés à la séquence d'ADN codant pour PS1 amplifiée par PCR, décrite dans le Tableau 4.

Les milieux réactionnels de digestion sont composés de 5µL ADN, 1µL NcoI, 1µL PstI, 2µL tampon H, qsp 20µL H₂O. Ceux-ci sont préparés 3 fois pour chacun des ADN (plasmidique ou PCR), et laissés incuber 1h30 à 37°C. Par la suite, 4µL de LD6X (0.25% bleu de bromophénol, 0.25% xylene cyanol FF, 30% glycérol, H₂O_{dd}) sont rajoutés à chacun des tubes, lesquels sont ensuite regroupés par ADN correspondants. Afin d'augmenter la concentration de produit final, les 72µL obtenus pour chaque réactions seront déposés sur deux puits de gel d'agarose. Le gel est ensuite soumis à une électrophorèse, et les bandes d'ADN correspondantes à celles attendues sont excisées et purifiées sur colonne.

Une fois les différents ADN élués, chacun se voit prélever un aliquot de 2µL qui est dilué à 1/50^{ième} dans 100µL d'H₂O_{dd}. La solution est ensuite déposée dans une cuvette 1mm, afin d'être dosée au spectrophotomètre.

2.1.4.4 Ligation des inserts PS1 dans le vecteur pBT3-N :

Les ligations sont effectuées selon les paramètres calculés avec le calcul suivant :

$$\text{ng insert} = \frac{50\text{ng plasmide} \times \text{Kb insert}}{\text{Kb plasmide}}$$

Ce calcul vaut pour un ratio *insert : vecteur* = 1 : 1. Afin d'augmenter les chances de rencontre entre l'insert et le plasmide, la quantité d'insert calculée pourra être multipliée par un coefficient habituellement compris entre 2 et 5; un surplus d'insert pouvant en effet augmenter les chances d'obtenir une liaison indésirable entre deux inserts, ou encore deux inserts et un plasmide par exemple.

Les réactions de ligation sont effectuées dans un volume de 10µL comprenant 1µL de la ligase (T4 DNA Ligase, ROCHE), 1µL de son tampon, complété avec le volume adéquat d'insert et de vecteur afin de répondre aux résultats du calcul ci-dessus. De plus, des réactions témoins sont effectuées, et permettent de vérifier différents paramètres de la réaction de ligation. Premièrement, on effectue un témoin positif de digestion du vecteur pBT3-N, correspondant à pBT3-N digéré par Pst1 et Nco1, en l'absence de ligase dans le milieu réactionnel : cette condition contrôle simplement la bonne digestion du vecteur. Ensuite, on effectue un contrôle négatif de cohésion, correspondant à pBT3-N digéré par PstI-NcoI mis en présence de ligase dans le milieu réactionnel : cette condition contrôle la possibilité de cohésion entre les deux extrémités normalement non compatibles du vecteur. Enfin, un témoin positif d'efficacité de la ligase est effectué, et correspond au vecteur pBT3-N simplement digéré par Pst1 ou Nco1 afin de créer des extrémités cohésives, mis en présence de la ligase dans le milieu réactionnel.

2.1.4.5 Transformation des bactéries DH5α

Afin d'être vérifiés et amplifiés, les produits de ligation sont transformés dans des bactéries DH5β selon le protocole suivant :

Pour chaque condition, 30µL de bactéries sont incubées 20 minutes sur glace avec 3µL de chacun des produits de ligations. Un tube supplémentaire de 30µL est incubé en présence d'1µL de plasmide non digéré (ici, pBT3-N), témoin d'efficacité de la transformation. Suite à cela, un choc thermique de 30 secondes à 42°C est appliqué à l'ensemble des tubes, et les bactéries sont immédiatement refroidies 3 minutes sur glace. On ajoute ensuite 1mL de LB à chaque tube, puis ceux-ci sont incubés de 1 à 3 heures à 37°C sous

agitation 240g, afin de permettre l'expression du plasmide nouvellement intégré. Les bactéries sont ensuite centrifugées une minute à 8000g, et le culot est resuspendu dans 100µL du volume résiduel. Celui-ci est alors étalé sur une boîte de pétri constituée de LB/agar et d'antibiotique approprié (ici Ampicilline). Celles-ci sont laissées incuber une nuit complète à 37°C. Si la ligation du vecteur s'est faite correctement, celui-ci sera exprimé dans les bactéries et ces dernières pourront pousser sur les pétris 100mm sélectifs : on les appelle alors les « clones positifs ». Concernant les bactéries transformées avec les plasmides témoins, leur présence ou non sur les boîtes de pétris sélectifs nous donne un ensemble d'information regroupé dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Témoins de ligation et de transformation en bactérie

Témoin	Pousse sur pétris sélectif	Signification
T+L	X	Le gène de résistance à l'antibiotique n'est pas exprimé : le vecteur ne s'est refermé sur lui-même et ses extrémités ne sont pas cohésives.
T-L	X	Le gène de résistance à l'antibiotique n'est pas exprimé : le vecteur ne s'est pas refermé sur lui-même, en cas d'extrémités à bouts francs ; ou bien le vecteur avait bien été ouvert par les 2 enzymes de restrictions.
T+	✓	Le gène de résistance à l'antibiotique est exprimé, le vecteur s'est correctement refermé sur lui-même, la ligase est efficace.
Témoin transformation	✓	Le gène de résistance à l'antibiotique est exprimé, le plasmide témoin a bien été transformé dans les bactéries, la transformation a été efficace.

X : ne doit pas pousser sur pétris sélectif.

✓ : doit pousser sur pétris sélectif.

Si les témoins attestent de la viabilité des clones obtenus, ces derniers subiront la seconde étape de vérification par profil de digestion. Pour cela, une colonie bactérienne est piquée et incubée dans 5mL de LB + ampicilline à 37°C sous agitation 240g toute une nuit. Le lendemain, les plasmides sont extraits des bactéries en culture (protocole décrit en section 2.1.4.1) puis digérés par NcoI et PstI. Le milieu réactionnel est alors déposé sur gel d'agarose et migré par électrophorèse : si la ligation a réussie, l'insert sera extrait du vecteur et sera visible sur gel à la présence de deux bandes, une première d'environ 7kb représentant le vecteur linéarisé et une deuxième à 1,5kb représentant l'insert. Une fois que la viabilité du clone positif est confirmée, celui-ci est intégré au stock glycérol du laboratoire afin d'être réamplifié à volonté pour les prochaines expériences.

2.2 Criblage par double hybride en levure

2.2.1 Transformations des levures CD3-808 « MAT a » et CD3-809 « MAT α »

Les levures sont transformées selon le protocole « Yeast Transformation » de Clontech, supplémenté de quelques étapes ou modifications (notamment l'étape d'incubation après choc thermique) afin d'en augmenter le rendement. La méthode employée est décrite ci-dessous :

Incuber quelques colonies isolées dans 50mL YPAD toute une nuit à 30°C sous agitation 250rpm. Le lendemain, diluer la culture afin que sa densité optique, mesurée à 600nm au spectrophotomètre, soit de $DO_{600}=0,25$ environ. Incuber encore 3 heures afin d'atteindre une $DO_{600}=0,5$; correspondant à la valeur d'absorbance pour laquelle la culture est en phase exponentielle de croissance; puis centrifuger cette dernière dans différents falcons 50mL, 5 minutes à 1000g. Resuspendre vigoureusement les culots dans du TE 1X (10mM Tris, 1mM EDTA, pH=7,5) puis les rassembler dans un seul falcon 50mL. Centrifuger 5 minutes à 1000g puis resuspendre les culots dans 1,5mL de TE/LiAc (1mL TE 1X + 1mL LiAc 100mM). Dans un eppendorf 1,5mL mélanger 1,5 μ g de plasmide à transformer et 0,1mg de « salmon sperm DNA carrier » préalablement bouilli 5 à 20 minutes puis refroidi sur glace. Rajouter à chacun de ces tubes 100 μ L de la préparation de levures et vortexer. Ajouter à chaque tube 600 μ L de PEG/LiAc (8mL PEG 50%, 1mL TE 10X, 1mL LiAc 1M) et vortexer 10 secondes. Laisser incuber 30 minutes à 30°C sous agitation 200rpm. Ajouter ensuite 70 μ L de DMSO à chaque tube, puis effectuer le choc thermique en plongeant les tubes 15 minutes dans un bain à 42°C. Centrifuger au maximum pendant 5 secondes, et resuspendre les culots dans 1mL d'YPAD 2X. Les levures sont alors incubées de 2 à 4 heures à 30°C sous agitation 200rpm. Le culot est par la suite rincé deux fois et resuspendu dans 500 μ L de TE. Plater 100 à 300 μ L des différents tubes sur les boîtes sélectives appropriées, puis laisser incuber à 30°C deux à quatre jours, le temps de voir les colonies apparaître. Les levures CD3-809 ont été transformées selon le même protocole afin d'y exprimer les plasmides de banque pPR3-N-NubG-X. Cependant, afin de permettre la transformation de 7 μ g de plasmides, nous avons augmenté les quantités des différents produits environ 7 fois.

2.2.2 Essai fonctionnel du système « split-ubiquitin »

Avant de commencer le criblage, le système « split-ubiquitin » est vérifié grâce à une série de transformations « tests » résumée dans le tableau 7.

Tableau 7 : Essai fonctionnel du système « split-ubiquitin » en levure

N°	Plasmides transformés	Pousse sur -TL	Pousse sur -TLHA
1	pBT3-N PS1 + pOst1-Nubl	✓	✓
2	pBT3-N PS1 + pPR3-N	✓	X
3	pTSU2-APP + pNubG-Fe65	✓	✓
4	pTSU2-APP + pPR3-N	✓	X

X : ne doit pas pousser sur pétris sélectif.

✓ : doit pousser sur pétris sélectif.

La co-transformation 1 permet la co-expression de la protéine de fusion Ost1-Nubl et de la protéine appât PS1-Cub-TF. Tout comme pour PS1, Ost1 est une protéine membranaire dont le CtF est situé du côté cytosolique de la membrane. Ainsi, grâce à la construction décrite dans la section 2.1.3.3, la protéine de fusion Ost1-Nubl permet l'expression de la partie N-terminale non modifiée de l'ubiquitin du côté cytosolique de la membrane où elle se trouve exprimée. Ce test permet de vérifier la bonne expression de l'appât PS1-Cub-TF dans la levure : en effet, si celui-ci a correctement été intégré dans la membrane, la partie Cub-TF sera localisée du côté cytoplasmique, et la reconstitution de la pseudo-molécule d'ubiquitin permise par la forte affinité entre Cub et Nubl permettra alors au système de s'activer, et à la levure de pousser sur -TLHA.

La co-transformation 2 permet la co-expression de l'appât PS1-Cub-TF et d'un peptide non-sens fusionné à NubG, provenant du vecteur vide pPR3-N destiné à exprimer les protéines proies. Celle-ci ne devrait pas induire la reconstitution de la pseudo-molécule d'ubiquitin, en raison de la supposée faible affinité entre Cub et NubG, et de la non-interaction protéique entre PS1 et le peptide non-sens. Ce test permet ainsi de confirmer que notre construction appât PS1-Cub-TF n'autoactive pas le système *via* une interaction spontanée avec la structure commune des proies.

La co-transformation 3 permet la co-expression des protéines APP et Fe65 respectivement fusionnées à Cub-TF et NubG. Fe65 est un co-régulateur de transcription connu pour interagir avec APP, et forme notamment un complexe transcriptionnel actif lorsqu'elle s'associe avec l'AICD. L'expression des deux protéines APP et Fe65 au sein d'une cellule de levure devrait ainsi permettre la reconstitution de la pseudo-

molécule d'ubiquitin grâce à la forte affinité des deux protéines. Ce test permet donc de confirmer le fonctionnement du système « split-ubiquitin ».

La co-transformation 4 permet la co-expression de la protéine de fusion APP-Cub-TF et d'un peptide non-sens associé à NubG. APP n'étant pas supposé interagir avec le peptide non sens, et Cub n'étant pas naturellement afin pour NubG, les deux constructions ne devraient pas induire la reconstitution de la pseudo-molécule d'ubiquitin, ni donc activer le système. Ce test sert ainsi de témoin négatif au test n°3.

2.2.3 Criblage par accouplement des CD3-808 et CD3-809

2.2.3.1 Criblage pilote

La capacité de fusion des levures CD3-808 « MAT a » et CD3-809 « MAT α » nous a permis d'exprimer différents plasmides au sein d'une même cellule de levure. Afin d'évaluer l'efficacité de fusion entre les deux souches de levures, deux criblages pilotes ont été effectués, l'un effectué avec CD3-808 « MAT a » PS1 WT et l'autre CD3-808 « MAT a » PS1 Δ 9. Nous décrivons ici la procédure effectuée pour un criblage pilote « général », sachant que le même protocole a été effectué en parallèle pour les deux lots de levures.

Le criblage pilote a été effectué grâce à la fusion des levures CD3-808 « MAT a » contenant le vecteur appât avec les levures CD3-809 « MAT α » contenant le vecteur vide pPR3-N. En premier lieu, quelques colonies de chaque population de levures ont été portées à croître 24h à 200g dans un même 500 μ L de milieu YPAD 2X (milieu YPAD concentré deux fois). Ce milieu ultra-riche permet d'offrir les conditions optimales nécessaires aux levures pour fusionner. Le bouillon de culture obtenu est centrifugé, et les levures sont resuspendues dans du YPAD 0,5X (milieu YPAD déconcentré deux fois). Celles-ci sont alors diluées selon un ratio 1/100, 1/1000 ou 1/10 000, puis étalées sur des boîtes de sélections -T, -L et -TL.

2.2.3.2 Criblage de la banque d'ADNc extraits de cerveau humain

Afin de procéder au criblage véritable, nous avons préalablement transformé les levures CD3-808 « MAT a » avec le plasmide « appât » PS1 WT ou PS1 Δ 9; et les CD3-809 « MAT α » avec les plasmides « proies » provenant de la banque, codant chacun pour une protéine « X » exprimée au niveau des cellules de cerveau humain. Comme mentionné précédemment, deux criblages ont été faits en parallèle, un utilisant

l'appât PS1 WT et l'autre utilisant PS1 Δ 9. Pour des simplifications d'écriture, nous décrivons ici la procédure effectuée pour un criblage, sachant que le même protocole a été effectué pour chacun d'entre eux.

La population de levures contenant l'appât est mise en culture liquide –L toute la nuit, puis est centrifugée et resuspendue dans 48mL d'YPAD 2X contenant de la Kanamycine, afin d'éviter les contaminations pouvant survenir durant la longue agitation de fusion. La population de levures contenant les proies est directement récupérée sur pétris suite à sa transformation, concentrée dans 2mL d'YPAD 2X + Kan, puis rajoutée à la culture de levures appât afin de former un milieu de 50mL contenant les deux souches nécessaires à l'accouplement. La culture ainsi formée est mise sous agitation lente dans une fiole de 2 Litres, à 30°C et 50rpm, pendant 24h. Le bouillon de culture produit est transféré dans deux Falcons 50mL que l'on centrifuge 10 minutes à 1000g. Le surnageant est jeté, tandis que la fiole de 2L est rincée deux fois avec 50mL de YPAD 2X + Kan afin de récupérer les éventuelles levures encore présentes à l'intérieur. Les culots de levures sont resuspendus dans chacun des 50mL de rinçage, puis centrifugés à nouveau 10 minutes à 1000g. Les deux culots de levures obtenus sont ensuite resuspendus dans 10mL YPAD 0,5X, et 9 aliquots sont mis de côtés afin d'effectuer 3 lots de solutions de levures de 100 μ L, diluées à 1/1000, 1/10 000 et 1/100 000. Comme pour le criblage pilote, ces aliquots seront étalées sur des boîtes de sélections –T, -L et –TL afin d'effectuer les calculs d'efficacité d'accouplement. Le reste de la culture de levure est étalé sur 49 boîtes de pétris –TLHA 150mm afin de sélectionner spécifiquement les diploïdes ayant intégré au moins un plasmide appât et un plasmide proie codant pour des protéines interagtrices.

De 3 à 21 jours après l'étalement des levures sur les boîtes –TLHA, les colonies correspondant aux clones positifs de levures commencent à apparaître. Celles-ci seront alors notées selon l'ordre de leur apparition chronologique puis soumises aux analyses nécessaires à l'identification du ou des gène(s) encodé(s) par le ou les plasmide(s) proie qu'elles contiennent. Pour d'éventuelles futures analyses, chacun des clones obtenu a été conservé dans le stock glycérol du laboratoire, à -80°C.

2.2.4 Analyse des clones positifs obtenus

2.2.4.1 *Isolation des plasmides de levure*

Chacun des clones obtenus sur les pétris –TLHA 150mm est repiqué et étalé en strie sur une nouvelle boîte –TLHA. Si les levures issues du clone repoussent, celles-ci sont considérées comme de vraies positives, et l'on procède à une extraction de leur ADNp.

Pour cela, quelques levures issues d'une colonie sont resuspendues dans 30µL de « tampon de suspension » (10mM TrisHCl pH=8, 1mM EDTA, Lyticase 4,5U/µL) puis incubées 30 minutes à 37°C. On ajoute ensuite 170µL de tampon de lyse (2% TritonX100, 1% SDS, 100mM NaCl, 10mM TrisHCl pH=8, 1mM EDTA), 200µL de billes de verre (Sigma) et 200µL de phénol-chloroforme. Le tout est vortexé pendant 5 minutes puis centrifugé à 13 000g pendant 10 minutes. Le phénol chloroforme étant immiscible avec l'eau, il va se former deux phases de densités différentes, séparées par une couche intermédiaire constituée de matériel cellulaire et de protéines. Dans notre cas, c'est la phase supérieure aqueuse qui nous intéresse, car celle-ci contient les plasmides que l'on souhaite extraire. Celle-ci doit donc être récupérée avec prudence, afin d'éviter toute contamination avec du matériel cellulaire indésirable. La solution de plasmides ainsi obtenue est alors mise dans un nouvel eppendorf avec 8µL d'acétate d'ammonium 10M et 500µL d'EtOH 100% puis incubée 1 heure à -80°C afin de précipiter l'ADN. La solution est ensuite centrifugée à 13 000g pendant 10 minutes. Le culot est resuspendu et lavé dans de l'éthanol 70%, puis une nouvelle centrifugation est effectuée. L'éthanol est ensuite aspiré, le culot laissé sécher 5 minutes puis resuspendu dans 20µL d'H₂O. La solution de plasmides alors obtenue est conservée à -20°C.

Les levures ont la particularité de pouvoir contenir plusieurs plasmides, et les clones positifs obtenus pourraient alors très bien posséder plusieurs copies du plasmide appât et plusieurs plasmides proies. Il est alors nécessaire d'isoler chacun des plasmides contenus dans la solution plasmidique extraite de levure, afin d'identifier spécifiquement la protéine proie interactrice avec notre appât. Pour ce faire, les plasmides extraits d'un clone de levure sont insérés dans des bactéries, qui ne peuvent contenir qu'un seul plasmide à la fois. La méthode d'extraction de plasmides décrite précédemment est certes efficace pour briser l'épaisse membrane des cellules de levure, cependant la solution de plasmides récupérée contient beaucoup d'impuretés. À cause de cela, les plasmides ne peuvent être simplement transformés dans les bactéries comme décrit en section 2.1.4.5, mais doivent être électroporés. La technique d'électroporation consiste à appliquer un champ électrique aux bactéries en suspension dans le but de déstabiliser leurs membranes, permettant alors à l'ADNp présent dans le milieu de suspension de pénétrer les cellules.

Le protocole réalisé a été le suivant : 20µL de bactéries électro-compétentes DH10B sont mélangées avec 3µL d'ADN plasmidique extrait de levure dans une cuvette 1mm, sur glace. Ceux-ci sont ensuite soumis à un champ d'électroporation de paramètres 1800V, 15µF, 335R pendant 275ms. Les bactéries transformées sont resuspendue dans 1mL de LB puis transférées dans un eppendorf et incubées 90 minutes à 37°C, afin de leur permettre d'exprimer le plasmide nouvellement intégré. Celles-ci sont ensuite centrifugées 1 minute à 13 000g puis le culot est resuspendu dans 100µL du volume résiduel. Les bactéries sont ensuite étalées sur des boîtes de pétris contenant de l'ampicilline, afin sélectionner spécifiquement les bactéries contenant le vecteur proie pPR3-N-NubG-X qui possède, contrairement au vecteur appât, le gène de résistance à

l'ampicilline (voir section 2.1.3.2). Une fois les bactéries poussées, les boîtes de pétris sont conservées à 4°C afin de permettre leur analyse.

2.2.4.2 Identification des gènes candidats

Chaque boîte de pétris obtenue à l'étape précédente représente en quelque sorte le « pool » de plasmides contenu dans le clone positif de levure initial. Ainsi, on considère que la proportion d'un plasmide « x » présent en bactéries est représentatif de la proportion qu'il occupait en levure. Afin de différencier les différents plasmides proie présents dans chaque lot bactérien, s'il y en a effectivement plusieurs, ceux-ci sont extraits des bactéries, puis soumis à un profil de digestion. Par la suite, chaque plasmide au profil différent obtenu pour un lot de bactérie sera envoyé à séquencer

Pour ce faire, chacun des clones bactériens est identifié puis 5 à 10 bactéries sont sélectionnées afin de procéder à une extraction plasmidique selon le même protocole que celui décrit dans la section 2.1.4.1. Les plasmides ainsi obtenus sont digérés par les enzymes EcoRI et BamHI et la solution de digestion est soumise à migration par électrophorèse. Deux bandes au moins devraient alors apparaître sur le gel, l'une de hauteur connue, correspondant au vecteur pPR3-N digéré, et au moins une autre correspondant au gène extrait du vecteur. En considérant que des bandes de hauteur différentes correspondent à des gènes différents, un plasmide de chaque profil est envoyé à séquencer. Pour ce faire, les plasmides sont à nouveau extraits des bactéries à l'aide du kit « Zippy™ Plasmid Miniprep » (Zymo Research) qui permet l'obtention d'un produit plus pur; puis sont dilués à 50ng/μL. La plateforme ayant permis la réalisation des séquençages est la « Plateforme de séquençage et de génotypage des génomes » du centre de recherche du CHUL.

Une fois les séquences géniques obtenues, celles-ci ont permis de cribler la banque nucléotidique informatique mondiale regroupant les séquences « GenBank », « EMBL », « DDBJ », « PDB » et « RefSeq », grâce à l'outil BLAST présent sur le site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Cet outil se base sur la recherche d'alignements locaux entre deux séquences, permettant ainsi de suggérer une homologie protéique selon une certaine valeur statistique.

2.2.4.3 Confirmation des interactions protéiques par double hybride en levure

La seconde étape à effectuer, en parallèle de l'attente des résultats de séquençages, est de reconfirmer de manière individuelle l'interaction entre nos appâts, PS1 WT et/ou PS1 Δ 9 avec chacune des proies identifiées lors du criblage; en effectuant un double hybride en levure.

Pour ce faire, chaque plasmide est transformé dans les levures CD3 808 contenant l'appât PS1 WT ainsi que dans les levures CD3 808 contenant PS1 Δ 9, selon le même protocole que celui décrit dans la section 2.2.1. Les levures sont ensuite étalées sur boîte –TL, afin de sélectionner celles exprimant les deux plasmides proie et appât; puis sont striées sur –TLHA, afin de vérifier si le plasmide proie transformé était effectivement le plasmide codant pour une proie interactrice lors du criblage. En cas de réponse négative, c'est-à-dire si les levures possédant les deux types de plasmides ne repoussent pas sur –TLHA, cela signifie que le clone positif de levure initial contenait plusieurs plasmides proies, et que c'est un autre parmi ceux-là qui permettait l'expression d'une proie interactrice lors du criblage.

En croisant les données obtenues lors de la confirmation d'interaction individuelle avec les résultats du séquençage, il sera possible d'établir une liste de gènes codant pour des protéines capables d'interagir avec PS1 WT, PS1 Δ 9 ou les deux; en levure.

2.3 Confirmation des interactions protéiques en cellules

2.3.1 Les HEK 293T

Les cellules HEK 293 ou « Human Embryonic Kidney 293 cells », sont des fibroblastes modifiés issus d'épithélium de rein humain, ayant vu le jour dans le début des années 1970s grâce au Dr Alex Van der Eb. Ce dernier a effectué la transformation des cellules originales à l'aide de l'adénovirus de type 5, produisant alors une lignée cellulaire au fort rendement de transfection, supposément grâce à l'incorporation d'une séquence virale de près de 4,5kb au sein de son chromosome 19. La lignée HEK 293T est issue de cellules HEK 293 ayant intégré l'antigène T du virus simien SV40, qui permet la réplication épisomale de tout plasmide transfecté contenant l'origine de réplication SV40. Les cellules résultantes ont non seulement un fort rendement de transfection, mais également une croissance quasi infinie, grâce à l'antigène T se liant aux protéines inhibant le cycle cellulaire.

La lignée HEK 293T a été utilisée pour vérifier l'interaction de PS1 WT et PS1 Δ 9 avec les différents candidats identifiés lors du double hybride en levure. Les cellules sont cultivées dans du DMEM (« Dulbecco's Modified Eagle's Medium », Hyclone) contenant 10 % de FBS (« Fetal Bovine Serum », Hyclone), et sont maintenues sur pétris 100mm, dans un incubateur humidifié prodiguant un environnement à 37°C et 5% de Co₂. Elles peuvent être incubées pour des périodes variant de 24h à 72h, puis sont dispersées lorsqu'elles arrivent à confluence. Ceci s'effectue grâce à la méthode de trypsinisation (TripLE Express; Life Technologies) qui permet l'hydrolyse des liaisons peptidiques installées entre les cellules en culture et la boîte de pétris. Les cellules ainsi désolidarisées de leur boîte vont pouvoir être aspirées et diluées dans de nouveaux pétris contenant un milieu DMEM frais; et seront ainsi entraînées dans un nouveau cycle de croissance. L'ensemble des manipulations sur cellules s'est fait sans aucun usage d'antibiotique, les travaux ont donc été effectués sous une hotte stérile, en salle de culture.

2.3.2 Liste des plasmides utilisés en cellule

Tableau 8 : Liste des plasmides utilisés en cellule HEK 293T

Nom de l'insert	Vecteur hôte	Taille de l'insert	Sites de restrictions pour clonage	Taille de la protéine résultante
PS1 WT	pcDNA3	2110 pb	EcoR1	55 kDa
PS1Δ9	pcDNA3	2024 pb	EcoR1	50 kDa
HA-PS1 WT	pCMV-Zéo	2110 pb	BamH1-Xho1	57kDa
HA-PS1Δ9	pCMV-Zéo	2024 pb	Bgl2	52kDa
PS1 WT	pEGFP	2110 pb	BamH1-EcoR1	75kDa
-	pEGFP	-	-	27kDa
CETN2	pcDNA3.1-His C	518 pb	BamH1-EcoR1	22 kDa
Ku80	pcDNA3.1-His C	2198 pb	BamH1-EcoR1	80 kDa
DOK5	pcDNA3.1-His C	920 pb	EcoR1-Xho1	35 kDa
DSS1	pcDNA3.1-His C	212 pb	BamH1-EcoR1	9 kDa
RPL6	pcDNA3.1-His C	866 pb	BamH1-EcoR1	33 kDa
PFKM	pcDNA3.1-His C	2555 pb	BamH1-Xho1	85 kDa
PRPSAP2	pcDNA3.1-His C	1109 pb	Xho1	41 kDa

2.3.2.1 pEGFP

Le plasmide pEGFP (Clontech) a été utilisé comme contrôle de transfection cellulaire. En effet, il permet l'expression de la protéine fluorescente « Enhanced Green Fluorescent Protein » EGFP sous le contrôle du promoteur ubiquitaire CMV, provenant du Cytomégalovirus Humain. Il est ainsi possible de vérifier la bonne intégration et expression du plasmide grâce à l'observation des cellules fluorescentes, grâce à un microscope à fluorescence sous une excitation de 488nm. Dans le même esprit, le vecteur pEGFP a également servi d'hôte à l'ADNc codant pour PS1, inséré dans le MCS grâce aux enzymes de restriction EcoR1 et BamH1; permettant ainsi de vérifier sa correcte expression au sein de la cellule.

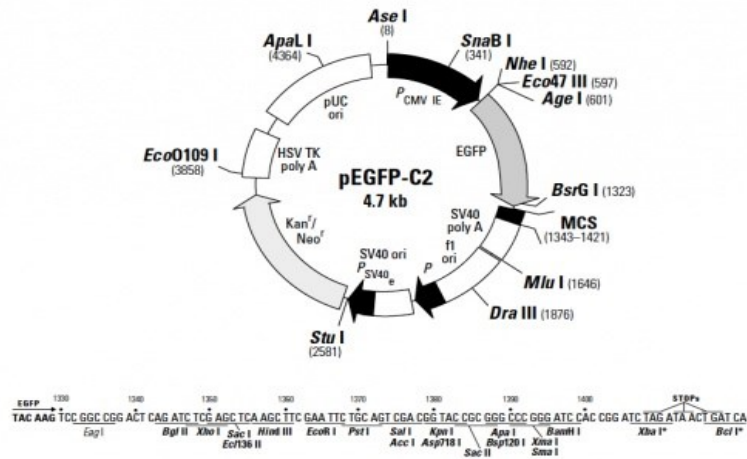


Figure 2.6 : Plasmide pEGFP

Le plasmide pEGFP a été utilisé à des fins de contrôle de transfection cellulaire, grâce à l'expression de la protéine fluorescente EGFP, permise grâce au promoteur CMV. Image tirée de www.addgene.org

2.3.2.2 pcDNA3 et pcDNA3.1-His C

Le plasmide pcDNA3 (Invitrogen) a permis l'expression des protéines PS1 WT et PS1 Δ 9 sous contrôle du promoteur CMV (Tableau 8). Une expression épisomale du plasmide est également permise via la présence du promoteur SV40 (voir section 2.3.1). Les ADNc codant pour les différentes formes de préséniline 1 furent insérés dans les sites de restriction EcoR1 du MCS. Le plasmide pcDNA3 contient également les gènes de résistances aux antibiotiques Néomycine et Ampicilline, permettant la sélection des cellules ou des bactéries l'ayant intégré.

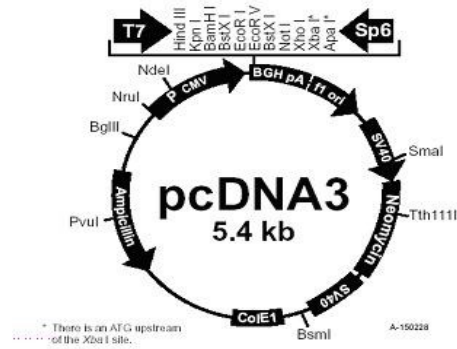


Figure 2.7 : Plasmide pcDNA3

Le plasmide pcDNA3 a permis l'expression en cellule des protéines PS1 WT et Ps1 Δ 9. Image modifiée provenant de www.lifetechnologies.com

Un variant plus récent du plasmide pcDNA3 est le vecteur pcDNA3.1, qui en plus de posséder toutes les caractéristiques du vecteur pcDNA3 contient deux nouveaux épitopes, à savoir le tag multi-histidines (6xHis sur la figure 2.8) et le tag Xpress. Le vecteur pcDNA3.1 His existe sous trois variants, A, B et C; chacun contenant un MCS de cadre de lecture différent. Au cours de ce projet, nous n'avons utilisé que le variant pcDNA3.1 His-C, afin d'y cloner les ADNc des gènes candidats identifiés lors du criblage par double hybride. Ceux-ci ont été obtenus suite à l'amplification par PCR (protocole similaire à celui décrit en section 2.1.4.2) des séquences correspondantes à partir d'une banque d'ADNc de cerveau humain (Dualsystem « Human Brain » P02221m) (Tableau 8). Les protéines résultantes seront alors associée aux épitopes multi-histidines et Xpress, qui présenteront un intérêt lors des expériences de Co-IP (section 2.3.5) et d'immunodétection (section 2.3.6.2).

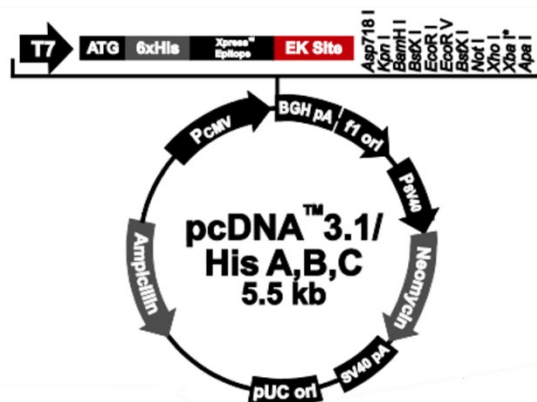


Figure 2.8 : Plasmide pcDNA3.1 His-C

Le plasmide pcDNA3.1 His-C contient les épitopes multi-histidines et Xpress, qui se retrouveront finalement associés à la protéine encodée par l'ADNc inséré dans le MCS. Image modifiée provenant de www.lifetechnologies.com

2.3.2.3 pCMV-Zéo-HA PS1

Le vecteur pCMV-Zéo est une création du Dr Georges Lévesque, et correspond à la base du plasmide pZeoSV auquel on a inséré un fragment provenant du vecteur pcDNA3. Celui-ci contient le promoteur pCMV, le signal de polyadénylation bovin BGHpA, ainsi que le MCS présent entre ces deux éléments, qui contient des sites de restriction plus accessibles que ceux présents sur le vecteur pZeoSV d'origine. Ce plasmide a permis l'expression des ADNc codant pour PS1 WT ou PS1 Δ 9 associés en 5' à l'épitope HA. Pour ce faire, la méthode « couper-coller » a été effectuée, laquelle consiste à extraire une séquence donnée d'un plasmide connu afin de la liguer dans le vecteur hôte désiré. Les ADNc de PS1 WT et PS1 Δ 9 étant déjà présent dans le vecteur pGAD-T7 au sein de notre laboratoire, ceux-ci ont été extraits grâce à une digestion BamH1-Bgl2 qui permet en même temps l'extraction de l'épitope HA présent dans le plasmide pGAD-T7. Le site de restriction Bgl2 étant compatible avec le site BamH1; les séquences ont pu être liguées dans le site BamH1 du vecteur pCMV-Zéo (tel que décrit dans la section 2.1.4.4) afin de permettre l'expression de protéines de fusion PS1-HA (voir Tableau 8).

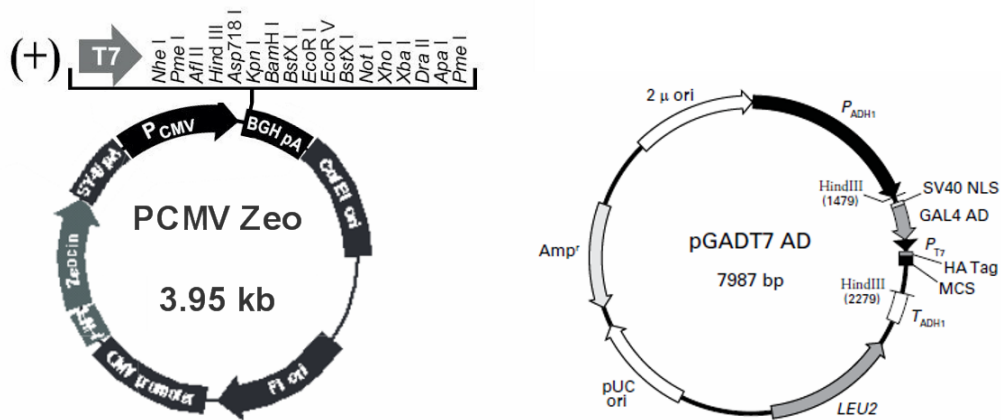


Figure 2.9 : Plasmides pCMV-Zéo et pGAD-T7

Le vecteur pCMV-Zéo est une création du Dr Georges Lévesque. La digestion BamH1 – Bgl2 du vecteur pGADT7 a permis l'extraction des ADNc codant pour PS1 WT et PS1 Δ 9 associés à l'épitope HA par leur NtF. image originale du vecteur pGADT7 tirée de www.clontech.com

2.3.3 Transfection des cellules

Différentes méthodes de transfection cellulaire ont été employées, à savoir la transfection au jetPRIME® (Polyplus Transfection), au Chlorure de Calcium ou à la Lipofectamine (Life Technologies). Nous décrivons ici la méthode de transfection au jetPRIME®, étant celle la plus utilisée grâce à sa haute efficacité de transfection.

Tableau 9 : Transfections des cellules HEK 293T réalisées

Transfection \ Plasmide transfecté	1	2	3	4	5	6	7	8
pCMV-Zéo PS1 WT-HA	10/5µg				10/5µg			
pCMV-Zéo PS1Δ9-HA		10/5µg				10/5µg		
pcDNA3-PS1 WT			10/5µg					
pcDNA3-PS1Δ9				10/5µg				
pcDNA3.1 Xpress - « Candidat »	10/5µg	10/5µg	10/5µg	10/5µg			10/5µg	
pCDNA3.1 Xpress					10/5µg	10/5µg		
pCMV-Zéo HA							10/5µg	
pEGFP								10/5µg

Pour chaque réaction, 5 ou 10µg des plasmides à transférer ou co-transférer sont dilués dans 500µL de tampon jetPRIME®, à l'intérieur d'un eppendorf 1,5mL. La solution est ensuite vortexée 10 secondes, puis 20µL du réactif jetPRIME® y est ajouté, afin de permettre un ratio ADN : jetPRIME® de 1:1 ou 2:1 selon que l'on ait initialement dilué 5 ou 10µg d'ADN. Le milieu réactionnel est à nouveau vortexé 10 secondes puis légèrement centrifugé afin de faire redescendre les éventuelles gouttes. Les tubes sont laissés 10 minutes à température pièce, afin de permettre la liaison des molécules d'ADN au réactif jetPRIME®. Le complexe ainsi formé est chargé positivement, ce qui va permettre son endocytose dans la cellule puis la rupture de l'endosome dans le cytoplasme, permettant ainsi d'y libérer le plasmide.

Chacun des milieux réactionnel est ensuite déposé goutte à goutte dans différents pétris de cellules confluentes de 60% à 80%. Le milieu réactionnel est changé 4h à 10h plus tard afin de prévenir l'éventuelle

cytotoxicité de la solution de transfection, puis les cellules sont incubées dans 10mL de DMEM frais pour 48h, dans le but de permettre aux cellules d'exprimer les plasmides transformés.

2.3.4 Lyse cellulaire et extraction protéique

48h après leur transfection, les cellules sont lysées afin d'en extraire les protéines. Un lot de pétris contenant des cellules non transfectées est également soumis à une extraction protéique, afin de servir de contrôle dans les différentes expériences. La lyse cellulaire peut s'effectuer grâce à différents tampons, dont les composants sont décrits dans le Tableau 10. Après plusieurs essais, il s'est avéré que le tampon d'extraction le plus efficace pour nos analyses était le tampon Triton 1%, qui est vraisemblablement le seul détergeant assez efficace pour lyser les membranes cellulaires, sans toutefois dénaturer la protéine membranaire PS1.

Tableau 10 : Tampons d'extraction et de lavages protéiques

Tampon	NaCL	TrisHCl pH=7,6	EDTA	NP40	TritonX100	Hepes	Inhibiteur de protéases*
Triton 1%	150mM	-	2mM	-	1%	25mM	1 pour 10mL
STEN A	150mM	50mM	2mM	0,2%	0,5%	-	1 pour 10mL
STEN B	150mM	50mM	2mM	0,2%	1%	-	1 pour 10mL
STEN C	300mM	50mM	2mM	0,2%	0,5%	-	1 pour 10mL

* Pastille cOmplete mini, EDTA free; ROCHE

Les cellules sont lysées sur glace, afin d'inhiber l'activité des protéases libérées lors de la lyse des membranes cellulaires, qui pourraient détériorer voir dégrader nos protéines d'intérêt. Le milieu DMEM est d'abord retiré, puis le pétris est rincé au PBS 4°C (« Phosphate Buffered Saline » Hyclone). Un volume de 750µL à 1mL de tampon de lyse est ensuite appliqué sur les cellules, et celles-ci sont récupérées à l'aide d'un râteau de plastique. Les cellules des éventuels duplicatas ou triplicatas de transfections (effectués pour les transfection 1 et 2 ou 3 et 4, voir Tableau 9) sont à ce moment là réunies afin d'homogénéiser la solution de lyse, et la quantité de protéines résultante. Les cellules sont ensuite incubées pour une durée d'une demi-

heure minimum, afin de permettre une lyse optimale. Le lysat résultant est centrifugé 15 minutes à 12 000g à 4°C, puis le surnageant, représentant la fraction protéique, est conservé à -20°C ou soumis directement aux analyses désirées.

2.3.5 Co-Immuno-précipitation

La technique de co-immuno-précipitation (Co-IP) permet de concentrer le ou les partenaires protéiques d'une protéine d'intérêt, grâce à la précipitation directe de cette dernière. En effet, si la protéine d'intérêt se trouve en complexe avec d'autres protéines au sein de notre échantillon, sa précipitation permettra de faire tomber l'ensemble de ses partenaires directs et indirects par la même occasion.

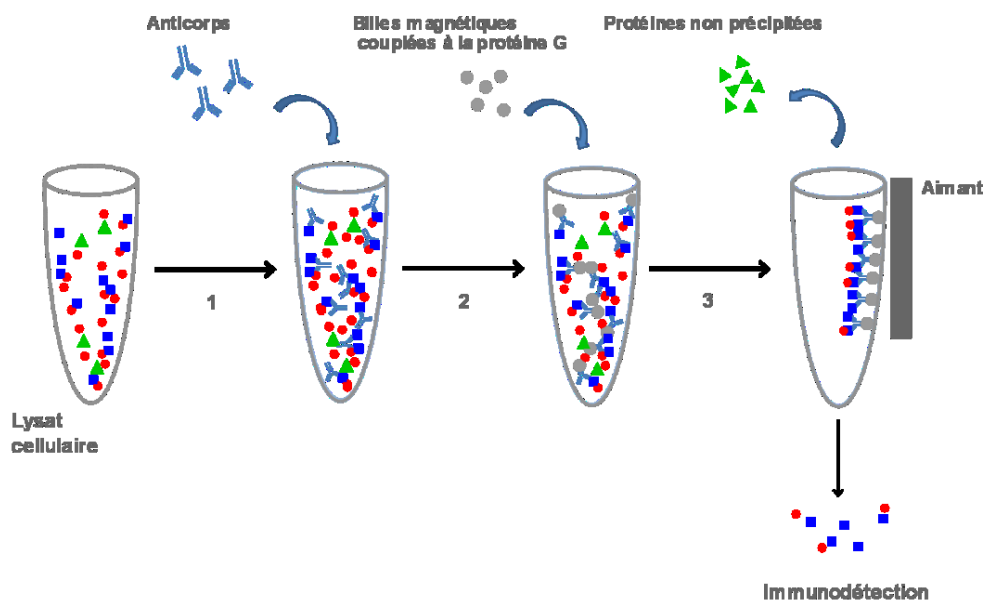


Figure 2.10 : Schématisation du protocole de Co-IP

(1) Suite à la lyse cellulaire, la fraction protéique est récupérée, et des anticorps dirigés contre la protéine d'intérêt y sont ajoutés. La liaison anticorps-antigène est assurée après une incubation de 10h minimum. (2) Des billes magnétiques couplées à la protéine G sont ajoutées aux mélanges. Le Fc des anticorps se lie à la protéine G pendant une incubation de 2h. (3) Un aimant est placé sur le côté du tube afin de concentrer les billes, elles-mêmes couplées aux anticorps ayant lié la protéine d'intérêt seule ou en complexe. Plusieurs lavages sont effectués afin d'évacuer les protéines non complexées à la protéine d'intérêt. L'échantillon final est alors élué en milieu dénaturant, et les protéines immunoprécipitées sont analysées par immunodétection.

Nous avons voulu vérifier grâce à cette méthode si les interactions détectées en levure entre les différents candidats avec PS1 WT et/ou PS1 Δ 9 étaient reproductibles dans les cellules HEK 293T. Pour ce faire, la procédure décrite ci-après a été réalisée. La fraction protéique récupérée suite à la lyse cellulaire est fragmentée en 3 volumes équivalents. Un aliquot de 50 μ L est également conservé à -20°C : il correspondra à l'« extrait total » déposé sur gel (décrit en section 2.3.6.1) qui aura l'utilité de confirmer la présence de la protéine d'intérêt dans le lysat total, avant d'avoir procédé à la Co-IP. On rajoute à chacune des trois fractions protéiques 2 μ g d'anticorps (les différents anticorps utilisés sont décrits dans le Tableau 11) : la première reçoit les anticorps visant à précipiter la préséniline, la seconde reçoit les anticorps visant à précipiter la protéine candidate, et enfin le troisième sert de contrôle négatif et reçoit du sérum de souris. Les solutions sont alors agitées par inversion toute une nuit à 4°C, afin de permettre la liaison des différents anticorps avec leurs antigènes. Ceux-ci sont récupérés dès le lendemain, et ajoutés à de nouveaux tubes contenant 40 μ L de billes magnétiques couplées à une protéine G (Dynabeads, Life Technologies), préalablement lavées avec le tampon utilisé pour l'extraction protéique. Les échantillons sont de nouveau agités par inversion à 4°C pendant 2h, afin de permettre la liaison de la partie Fc (fragment constant) des anticorps aux protéines G présentes sur les billes magnétiques. Les tubes sont ensuite récupérés et placés le long d'un aimant (DynaMag2™, Life Technologies), afin de permettre la séparation des billes, retenant à présent notre protéine d'intérêt seule ou en complexe; du reste du lysat cellulaire. Le surnageant est alors jeté puis remplacé par 200 μ L de tampon STEN A ou STEN C (voir Tableau 10); et les tubes sont placés sous agitation par inversion pour 5 minutes. Le choix du tampon STEN A ou C va dépendre de la stringence d'interaction désirée : en effet, une forte concentration de NaCl dans le tampon de lavage permet une haute stringence, ne retenant ainsi que les interactions protéiques fortes. Les échantillons sont de nouveaux récupérés, les billes séparées du surnageant, et le surnageant jeté. Le lavage des billes est ainsi répété 3 fois. Finalement, un volume d'environ 40 μ L de Leampli 2X (0,5 M TrisHCl pH 6,8; 20% glycerol; 4% SDS; 10% 2-mercaptoéthanol; 0,006% bleu de bromophénol) est ajouté, afin de dénaturer les liaisons protéiques présentes entre les différentes molécules présentes dans l'échantillon. À ce stade, il est également possible de bouillir les échantillons 5 minutes afin d'augmenter la dénaturation, mais cette règle n'a pas été appliquée concernant nos échantillons de Co-IP. En effet, cette étape favorise la dénaturation des IgGs présents dans l'échantillon, qui libèrent alors leurs chaînes lourdes de 50kDa. Or, le poids moléculaire attendu pour la protéine PS1 est également de 50kDa, et sa visibilité serait occultée lors de l'immunodétection. Les échantillons protéiques sont ensuite débarrassés des billes, puis conservés à -20°C ou directement utilisés pour une immunodétection.

Tableau 11 : Liste des anticorps utilisés en Co-Immunoprécipitation

Anticorps	Description	Compagnie	Antigène reconnu	Protéine précipitée
α-PS1 N19	Polyclonal de chèvre	Santa Cruz	Boucle N-terminale de PS1	PS1
α-HA	Monoclonal de souris	ROCHE	Épitope HA	PS1
α-Xpress	Monoclonal de souris	Invitrogen	Épitope Xpress	Candidat
α-IgG de souris	Polyclonal de chèvre	Santa Cruz	IgG mouse	Non spécifique

2.3.6 Immunodétection protéique par Western Blot

L'immunodétection de protéines, aussi appelée « Western Blot » est une méthode biochimique *in vitro* couramment utilisée dans le cadre d'études protéiques. Celle-ci consiste à sonder une membrane contenant des bandes protéiques avec des anticorps dits « anticorps primaires », reconnaissant spécifiquement une protéine ou un épitope d'intérêt. Leur présence pourra alors être détectée grâce à l'utilisation d' « anticorps secondaires » capables de reconnaître les premiers, dont la visibilité est ensuite permise grâce à une réaction de chimiluminescence, en autoradiographie. L'ensemble des anticorps utilisés à des fins d'immunodétection est présenté dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Liste des anticorps utilisés lors de l'immunodétection

Nom	Description	Compagnie	Dilution d'utilisation
α-PS1 Ab14	Anticorps primaire, polyclonal de lapin	Don du Dr Paul Fraser	1/2500
α-HA	Anticorps primaire, monoclonal de souris	ROCHE	1/2000
α-Xpress	Anticorps primaire, monoclonal de souris	Invitrogen	1/5000
α-IgG de souris HRP	Anticorps secondaire, polyclonal de chèvre	Santa Cruz	1/10 000
α-IgG de lapin HRP	Anticorps secondaire, polyclonal de chèvre	Santa Cruz	1/10 000

2.3.6.1 *Électrophorèse sur gel polyacrylamide et transfert sur membrane PVDF*

En premier lieu, il est nécessaire de dénaturer les échantillons protéiques utilisés afin de permettre leur migration correcte sur gel polyacrylamide. Pour ce faire, un volume V de Leammli 6X ou 2X est ajouté aux échantillons, où V correspond respectivement à un sixième ou un demi du volume d'échantillon total final. Ceux-ci sont chauffés pendant 5 minutes à 98°C, ou bien 37°C s'ils contiennent l'une ou l'autre des protéines PS1 WT ou PS1 Δ 9.

L'électrophorèse sur gel polyacrylamide est une technique qui permet de séparer des protéines selon leur poids moléculaire. Le gel polyacrylamide, servant de matrice de séparation, est composé d'une partie de « concentration » des protéines, ainsi que d'une partie de « séparation » des protéines. Selon le poids moléculaire de la protéine étudiée, les gels de séparation préparés varient de 8% à 15% de polyacrylamide (recette d'un gel 10% : 10% Acrylamide-Bis-Acrylamide 29 :1 ; 250 μ M TrisHCl pH=8,8 ; 0,1% SDS ; 0,1% APS ; 0,1% TEMED). Le gel de concentration quand à lui est préparé selon la même recette (6% Acrylamide-Bis-Acrylamide 29 :1 ; 125 μ M TrisHCl pH 6,8 ; 0,1% SDS ; 0,1% APS ; 0,1% TEMED). Les différents échantillons protéiques ainsi que le marqueur de poids moléculaire (Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards ; BIO RAD) ayant été déposés sur gel, celui-ci est soumis à une migration par électrophorèse dans un tampon dénaturant Tris-Glycine (0,3% Tris; 1,4% glycine; 0,1% SDS), à 125V pendant 1h30.

Afin de procéder à l'immunodétection, il est nécessaire de transférer les protéines du gel sur une membrane PVDF (Polyvinylidene difluoride; Immobilon™, Millipore). Celle-ci est préalablement perméabilisée en l'immergeant dans du méthanol, puis mise au contact du gel polyacrylamide. Une migration par électrophorèse s'effectue ensuite dans un tampon de transfert (25 mM Tris; 200 mM glycine; 20 % méthanol) à 4°C pendant 1h30, à un ampérage constant de 400mA et un voltage d'environ 250V. L'ensemble des cassettes de transfert, des boîtes d'électrophorèse, ou encore des glaces de verre permettant les différentes manipulations d'électrophorèse proviennent de la compagnie BIORAD, et ont été utilisées selon les recommandations de la compagnie. Le transfert terminé, la membrane PVDF contenant nos protéines est immergée dans une solution de rouge Ponceau (5% acide acétique, 1% Ponceau S), qui permet de vérifier la présence de bandes protéiques nous assurant alors de la qualité des échantillons et du transfert. Celle-ci est ensuite rincée dans du tampon TBST (248mM Tris; 1,4M NaCl ; 27mM KC1 ; 0,1 % Tween 20).

2.3.6.2 Immunodétection

Avant de procéder à l'immunodétection des protéines présentes sur la membrane, il est nécessaire de « bloquer » cette dernière dans une solution TBST-5% lait pendant une heure. Cette étape permet le blocage de sites d'interactions non spécifiques qui pourraient avoir lieu entre la membrane et les anticorps primaires. La membrane est ensuite rincée 3 fois 5 minutes dans du TBST puis elle est incubée de 1h à 3h avec l'anticorps primaire désiré (voir Tableau 12), sous agitation par rotation à 4°C. Après avoir effectué à nouveau 3 rinçages de 5 minutes, la même procédure est réalisée afin de permettre l'incubation de la membrane avec l'anticorps secondaire. Celui-ci est conjugué à la peroxydase de raifort ou « horseradish peroxidase » (HRP), qui permet, grâce à son activité catalytique réductrice, de détecter l'anticorps secondaire suite à l'utilisation d'un substrat chimiluminescent de type ECL (EMD Millipore Immobilon™, Fisher). L'observation de la membrane par autoradiographie permet alors de détecter de manière indirecte la présence des protéines d'intérêt.

3 Résultats

3.1 Essai fonctionnel du système « split-ubiquitin » en levure

Dans le but d'identifier de nouveaux partenaires de la préséniline 1 pleine longueur, un criblage a été effectué en double hybride en levure. Cette protéine étant hautement hydrophobe, elle se trouve localisée au niveau des membranes cellulaires. Bien des criblages avaient été effectués précédemment avec cette protéine, mais jamais encore on ne l'avait étudiée sous sa forme intégrale et dans son milieu naturel membranaire. Nous avons ainsi choisi un système de double hybride novateur appelé « split-ubiquitin » spécialement conçu pour les protéines membranaires; permettant ainsi l'étude d'interactions protéines-protéines d'un point de vue proche du contexte physiologique, et fournissant des résultats d'autant plus pertinents. Plusieurs étapes de mises au point et de vérifications ont cependant d'abord dû être effectués, à commencer par l'essai fonctionnel du système lui-même. Différentes co-transformations ont été effectuées au sein de la levure CD3 808 « Mat a », et celles-ci ont été étalées sur différentes boîtes de sélection. Les phénotypes des différents lots de levures présentés dans la figure 3.1 correspondent à ceux attendus, les levures transformées ne poussant que sur les milieux pour lesquels elles sont désormais prototrophes.

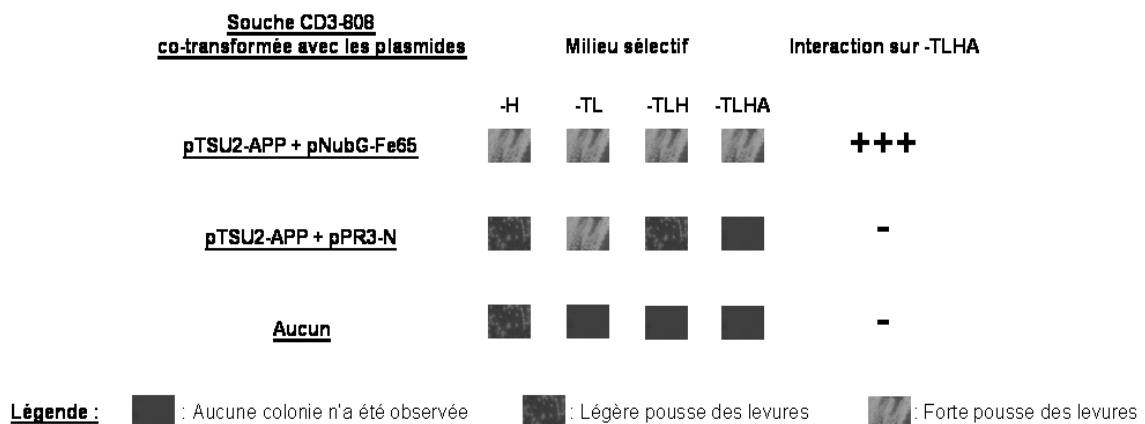


Figure 3.1 : Analyse de l'essai fonctionnel du système "split-ubiquitin"

Le contrôle de co-transfection est assuré par l'étalement des levures sur milieu dépourvu des acides aminés tryptophane et leucine pour lesquels elles sont désormais prototrophes. La co-transformation pTSU2-APP + pNubG-Fe65 active le système chez les levures transformantes, désormais également prototrophes pour l'histidine et l'adénine. Une légère pousse de levures est observable sur les milieux dépourvus d'histidine dans le cas de la transformation contrôlée pTSU2-APP + pPR3-N, amputable au phénotype de la souche CD3-808 légèrement prototrophe pour cet acide aminé.

L'analyse de l'essai fonctionnel permet de confirmer le fonctionnement adéquat du système « split-ubiquitin ». En effet, la co-transformation de pTSU2-APP + pNubG-Fe65 active fortement le système, les levures transformées étant désormais prototrophes pour l'histidine et l'adénine poussent de manière significative sur les boîtes de sélection –TLH et –TLHA. Ce résultat est appuyé par la co-transformation contrôle pTSU2-APP + pPR3-N, qui nous assure que pTSU2-APP n'autoactive pas le système « split-ubiquitin ». Il est cependant notable que les levures n'ayant subi aucune transfection ou la co-transfection contrôle sont capables de pousser sur les milieux dépourvus d'histidine. Cette « fuite à l'histidine » est un phénomène récurrent chez les levures, et ce problème a été contourné par l'utilisation de boîtes plus stringentes –TLHA lors du criblage.

3.2 Criblage utilisant l'appât PS1 WT-Cub-TF

Au cours de cette étude, nous avons désiré mieux comprendre l'implication de PS1 dans différents processus cellulaires, ainsi que lui conférer de nouveaux rôles au sein de la cellule neuronale qui pourraient expliquer le phénotype sévère observé chez les patients exprimant la protéine mutée. Nous avons pour cela effectué le criblage d'une banque d'ADNc d'extrait de cerveau humain, correspondant donc à l'ensemble du transcriptome retrouvé au sein des cellules du cerveau d'un patient sain. Le criblage effectué grâce au système de double hybride « split-ubiquitin » en levure a tout d'abord nécessité des études préliminaires vérifiant le comportement adéquat de notre construction « appât ». De plus, un criblage pilote a été effectué en amont du véritable criblage, et l'efficacité de fusion de nos deux souches de levure a systématiquement été calculée.

3.2.1 L'appât pBT3-N PS1 WT-Cub-TF est fonctionnel

Afin de s'assurer de l'efficacité de notre vecteur appât pBT3-N PS1 WT-Cub-TF dans le système « split-ubiquitin », un essai fonctionnel a été effectué. Son efficacité a pu être estimée grâce au calcul :

$$\% \text{ Transformants} = \frac{\text{Nombre de colonies sur pétri sélectif} \times 100}{\text{Nombre de colonies sur pétri} - \text{TL}}$$

Après comptage de près de 57 colonies sur boîtes –TLHA contre 298 sur boîte –TL, l'efficacité de notre essai est estimée à 19%. Le résultat devant être supérieur à 10%, nous pouvons considérer les résultats de notre essai comme significatifs. Leur analyse est présentée dans la figure 3.2. Celle-ci nous permet en premier lieu de confirmer que l'expression de notre construction n'est pas toxique pour les cellules de levures hôtes, celles-ci présentant une pousse « normale » sur pétris. De plus, la co-transformation de notre appât avec le plasmide pOst1-Nubl permet d'affirmer que la protéine de fusion PS1 WT-Cub-TF est exprimée dans la levure, et laisse également supposer que son insertion dans la membrane s'est faite de manière adéquate, la partie Cub-TF tournée vers le cytosol, permettant alors son association avec la partie Nubl de la protéine proie Ost1-Nubl. Enfin, la co-transformation de pBT3-N PS1 WT-Cub-TF avec le vecteur vide pPR3-N confirme que l'appât n'autoactive pas le système « split-ubiquitin », aucune levure n'ayant poussé sur le milieu sélectif –TLHA.

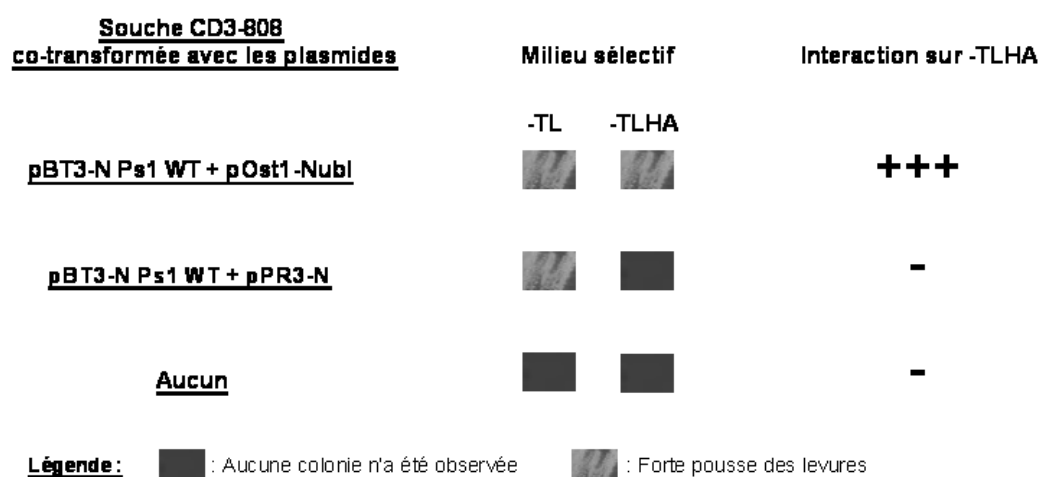


Figure 3.2 : Analyse du phénotype des levures CD3 808 surexprimant la construction "appât" pBT3-N PS1 WT-Cub-TF

Le contrôle de co-transfection est assuré par l'étalement des levures sur un milieu -TL. La co-transformation de pBT3-N PS1 WT-Cub-TF avec pOst1-Nubl permet aux levures hôtes de pousser sur milieu –TLHA, prouvant l'efficacité de notre appât à activer le système « split-ubiquitin ». La co-transformation de pBT3-N PS1 WT-Cub-TF avec pPR3-N prouve que le résultat précédemment observé ne relève pas de l'autoactivation de notre appât.

3.2.2 La fusion des levures CD3 808 « Mat a » contenant l'appât PS1 WT-Cub-TF est efficace

Avant de procéder au véritable criblage, il est important de s'assurer de l'efficacité de fusion des souches de levures hôtes. En effet, un défaut dans la pousse ou l'accouplement de nos levures pourrait engendrer une perte considérable de potentiels interacteurs, diminuer le rendement de notre criblage, et le rendre non représentatif des gènes exprimés dans le cerveau humain. Afin d'évaluer l'efficacité de fusion entre nos deux souches d'intérêt, un criblage pilote a été effectué; utilisant la souche CD3 808 « Mat a » transformée avec le plasmide appât pBT3-N PS1 WT-Cub-TF contre la souche CD3 809 « Mat a » transformée avec pPR3-N. L'évaluation de l'efficacité de fusion a été permise suite au dénombrement des levures ayant poussé sur les boîtes de sélection -T, -L et -TL. En premier lieu, nous avons caractérisé le nombre de colonies viables par mL de culture grâce à la formule :

$$\text{Colonies viables (Cfu) / mL} = \frac{\text{Cfu x 1000 } \mu\text{L/mL}}{\text{V étalé (}\mu\text{L) x facteur de dilution}}$$

Les colonies viables ou « Cfu » (« pour Colony Forming Unit ») ont été dénombrées sur chacune des boîtes de sélection. Suite aux calculs, le nombre de Cfu/mL sur les milieux -L, -T et -TL furent respectivement de $5,6 \cdot 10^4$; $3,2 \cdot 10^4$ et $1,8 \cdot 10^3$. Les chiffres obtenus d'après les colonies comptées sur les boîtes -L et -T permettent de connaître la viabilité des levures haploïdes. Le lot ayant obtenu le plus petit résultat est qualifié de « limitant » et représente l'ensemble des levures n'ayant pas fusionné. Le chiffre obtenu d'après les boîtes -TL nous indique la viabilité des levures diploïdes, et nous permet de connaître le pourcentage de levures diploïdes résultantes de la fusion grâce au calcul suivant :

$$\% \text{ Diploïdes} = \frac{\text{Cfu/mL diploïdes}}{\text{Cfu/mL limitant}}$$

Afin d'être considérée comme efficace, la fusion de nos deux souches de levure doit fournir un pourcentage de diploïde de 2% minimum. La division du nombre de Cfu diploïdes/mL de $1,8 \cdot 10^3$ par le nombre de Cfu haploïdes limitants/mL de $3,2 \cdot 10^4$ a démontré une efficacité de fusion de 5,6%, bien supérieure au seuil

demandé, confirmant alors que les levures CD3 808 contenant l'appât PS1 WT-Cub-TF sont capables de fusionner efficacement avec les levures CD3-809.

3.2.3 Criblage de la banque d'ADNc extraits de cerveau humain

La banque d'ADNc d'extrait de cerveau humain, est par définition représentative des gènes transcrits au niveau des cellules de notre cerveau. Le choix de cette banque est évidemment justifié par les affectations cellulaires observées au niveau des cerveaux de patients Alzheimer possédant une mutation de PS1. À nouveau, nous avons évalué l'efficacité de fusion entre les levures CD3 808 « Mat a » contenant pBT3-N PS1 WT-Cub-TF et les levures CD3 809 « Mat α » transformées avec 21 μ g de plasmides de la banque pPR3-N-NubG-X au total. Pour rappel, les calculs ont pu être effectués grâce à l'étalement d'aliqots de 100 μ L de dilutions 1/1000, 1/10 000 et 1/100 000 de la population de levure résultant de la longue incubation de fusion. Le nombre de Cfu/mL obtenus pour les boîtes -L, -T et -TL furent respectivement de 2,56.10⁵ ; 6,65.10³ et 2,45.10². L'efficacité de fusion estimée grâce au nombre de Cfu/mL de diploïdes de 2,45.10² et le nombre de Cfu/mL d'haploïde limitant de 6,65.10³ fût de 3,7%, confirmant alors que nos deux souches de levures ont accompli une fusion efficace.

Afin d'identifier la maximum de nouveaux partenaires, le criblage de la banque s'est effectué « à grande échelle » et 49 pétris -TLHA de 150mm ont été utilisés. Au total, 112 colonies furent dénombrées et notées selon une logique chronologique de type « 1A », où « 1 » correspond au jour 1 du comptage, et « A » correspond à la première colonie comptée ce jour-ci. Chacun des clones a systématiquement été repiqué sur un nouveau pétris -TLHA dans le but de confirmer sa dénomination de « clone positif ». Cette manipulation a révélé l'incapacité de plusieurs clones à survivre de manière isolée sur pétris -TLHA : ceux-ci ont dès lors été considérés comme de faux positifs, et n'ont pas été étudiés lors des expérimentations ultérieures.

3.2.4 Identification des plasmides candidats

L'ADNp des 11 premiers clones positifs de levures apparus lors du criblage fut extrait, puis électroporé dans les bactéries électro-compétentes DH10B. Cette manipulation permet d'isoler chacun des plasmides proie contenus dans les levures candidates, chaque clone bactérien contenant en effet un seul des plasmides originaire du clone de levure. De plus, l'étalement des bactéries transformées sur un milieu

contenant de l'ampicilline permet de sélectionner uniquement les bactéries ayant intégré un vecteur pPR3-NubG-X. Par la suite, 5 à 10 colonies bactériennes isolées ont été nommées aléatoirement de 1 à 10 puis soumises à une extraction d'ADNp. Les plasmides ainsi obtenus ont été digérés par les enzymes BamH1 et EcoR1 afin d'en sortir les inserts. L'étude du profil de digestion présenté par les différents plasmides est présentée dans la figure 3.3. Celle-ci nous a permis de noter près de 14 profils de digestion différents, que nous avons identifiés comme suit : 1D4, 2A1, 2C1, 2E1, 2E2, 2G3, 2F1, 2D1, 2D4, 3A1, 3G1, 3I1, 3I5 et 3J1.

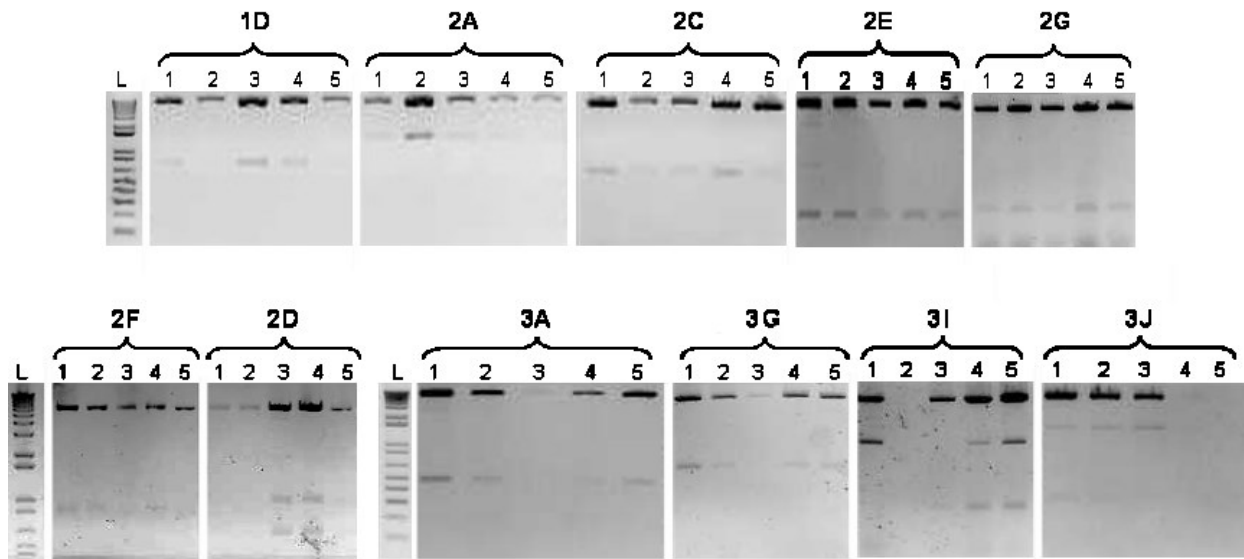


Figure 3.3 : Étude des profils de digestions des plasmides pPR3-NubG-X des clones positifs de levures issus du criblage

Après avoir électroporé les bactéries DH10B avec l'ADNp extrait des clones positifs de levures issus du criblage ; nous avons extrait les plasmides de 5 clones bactériens. Ceux-ci ont été digérés par les enzymes BamH1 et EcoR1 afin d'obtenir leur profil de digestion. 16 profils différents ont été identifiés, à savoir 1D4, 2A1, 2C1, 2E1, 2E2, 2G3, 2F1, 2D1, 2D4, 3A1, 3G1, 3I1, 3I5 et 3J1. Les plasmides correspondants ont alors été envoyés au séquençage afin d'identifier l'insert qu'ils contiennent.

Chacun des 14 plasmides correspondant aux profils de digestions différents a été envoyé à la « Plateforme de séquençage et de génotypage des génomes » du CHUL, afin de séquencer leur insert. L'analyse des séquences nucléotidiques reçues nous a permis d'identifier différents gènes, codant donc de potentiels interacteurs protéiques de PS1 WT dont la liste est présentée dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Liste des partenaires protéiques potentiels de PS1 WT

Clones	Homologie nucléotidique	Protéine correspondante
1D4	TOP2A	Topoisomerase (DNA) II Alpha
2A1	CETN2	Centrin-2
2C1	SHFM1	26S Proteasome Complex Subunit DSS1 (DSS1)
2G3	TXLNA	Taxilin Alpha
2F1	DPYSL3	DihydroPyrimidinase-Like 3
2D1 2D4	PRPSAP2	Phosphoribosyl Pyrophosphate Synthetase Associated Protein 2
2E1 2E2	BLCAP	Bladder Cancer Associated Protein
3A1	PAQR6	Progesterin and AdipoQ Receptor Family Member VI
3G1	RPL6	Ribosomal Protein L6
3I1 3I5	XRCC5	Ku80
3J1	DOK5	Docking protein 5

3.2.5 Confirmation des interactions protéiques en levure

Comme mentionné précédemment, les clones positifs de levure obtenus lors du criblage peuvent contenir plusieurs plasmides. L'électroporation de ceux-ci dans les bactéries DH10B nous ayant permis de les isoler, nous avons pu vérifier quels étaient les réels vecteurs proies pPR3N-NubG-X permettant la production d'une protéine partenaire de PS1. De plus, souhaitant comparer les capacités d'interaction protéiques des protéines PS1 WT et PS1 Δ 9, nous avons effectué une seconde étude en double hybride durant laquelle les levures CD3-808 préalablement transformées avec le vecteur appât pBT3-N PS1 WT-Cub-TF ainsi que les levures CD3-808 préalablement transformées avec le vecteur appât pBT3-N PS1 Δ 9-Cub-TF ont été de nouveau transformées avec chacun des plasmides isolés retenus lors de l'étude des profils de digestion. L'analyse a été permise grâce à l'étalement des levures transformées sur milieu -TL, dont 3 colonies de chaque transformation ont ensuite été striées sur un milieu -TLHA de manière indépendante. La moyenne résultant des pousses observée est illustrée dans la figure 3.4.

Plasmide candidat	CD3 808 pBT3-N Ps1 WT-Cub-TF			CD3 808 pBT3-N Ps1Ex9-Cub-TF		
	Milieu sélectif		Interaction	Milieu sélectif		Interaction
	-TL	-TLHA		-TL	-TLHA	
<u>pPR3-N 1D4</u>			-			-
<u>pPR3-N 2A1</u>			+++			+++
<u>pPR3-N 2C1</u>			+			+++
<u>pPR3-N 2E1</u>			-			+
<u>pPR3-N 2G3</u>			-			+
<u>pPR3-N 2F1</u>			-			+
<u>pPR3-N 2D1</u>			+			+++
<u>pPR3-N 3A1</u>			+			+
<u>pPR3-N 3G1</u>			+			+++
<u>pPR3-N 3I1</u>			+			+++
<u>pPR3-N 3J1</u>			+++			+++

Légende : : Aucune colonie n'a été observée : Légère pousse des levures : Forte pousse des levures

Figure 3.4 : Analyse du double hybride testant les plasmides proies retenus lors du criblage utilisant PS1 WT-Cub-TF chez les levures CD3 808 pré-transformées. À l'exception du plasmide pPR3-N 1D4, tous les plasmides candidats transformés dans les levures CD3 808 contenant l'un ou l'autre des vecteurs appâts pBT3-N PS1 WT-Cub-TF ou pBT3-N PS1 Δ 9-Cub-TF ont confirmé leur capacité à produire une protéine interagissant avec la préséniline se reflétant par la pousse des levures hôtes sur milieu -TLHA. L'activation du système « split-ubiquitin » est systématiquement plus forte dans les levures CD3 808 contenant l'appât PS1 Δ 9-Cub-TF que dans les levures CD3 808 contenant PS1 WT-Cub-TF. Ces dernières ne présentent de surcroît aucune activation lorsque les plasmides candidats pPR3-N 2E1, pPR3-N 2G3 et pPR3-N 2F1 ont été transformés.

L'analyse du double hybride nous indique tout d'abord qu'à l'exception du vecteur pPR3-N 1D4, tous les vecteurs identifiés et retenus suite au profil de digestion permettent l'expression d'une protéine interagissant avec la préséniline 1. Cependant, la comparaison du niveau d'interaction présentée par PS1 WT avec celui de PS1 Δ 9 nous indique une forte différence en faveur de la protéine mutante. En effet, chacun des

vecteurs proie transformés chez les levures CD3 808 contenant pBT3-N-PS1 Δ 9-Cub-TF permet l'activation du système « split-ubiquitin », phénomène non applicable concernant les levures CD3 808 contenant pBT3-N-PS1 WT-Cub-TF. En raison de la forte pousse observée pour les levures ayant intégré les plasmides correspondant aux profils de digestions 2A1, 2C1, 2D1, 3G1, 3I1 et 3J1; nous avons choisis de poursuivre notre étude en se concentrant sur les protéines candidates partiellement encodées par ces clones, étant respectivement CETN2, DSS1, PRPSAP2, RL6, Ku80 et DOK5.

Les résultats obtenus lors du criblage utilisant l'appât PS1 WT-Cub-TF ont permis de répondre au premier objectif de ce projet, étant l'identification de nouveaux partenaires biochimiques potentiels de PS1 WT en levure. Par ailleurs, ce projet avait comme objectif secondaire d'étudier une éventuelle différence interactionnelle entre la forme native de la protéine, et la forme protéique mutée PS1 Δ 9; afin d'identifier d'éventuels gains ou pertes de fonction suite à cette mutation de la protéine.







3.3 Criblage utilisant l'appât PS1 Δ 9-Cub-TF

En parallèle du criblage précédemment décrit, nous avons procédé à un second criblage permettant d'identifier de nouveaux partenaires protéiques de la protéine appât PS1 Δ 9-Cub-TF. Celle-ci a permis de cribler la même banque d'ADNc d'extrait de cerveau humain, et l'ensemble des procédures réalisées ont été identiques à celles réalisées lors du criblage utilisant PS1 WT. Nous exposerons à présent l'ensemble des études préliminaires visant à vérifier le comportement adéquat de notre construction « appât » et la viabilité de notre criblage.

3.3.1 Essai fonctionnel

Pour vérifier l'efficacité de notre vecteur appât pBT3-N PS1 Δ 9-Cub-TF dans le système « split-ubiquitin », nous avons tout d'abord réalisé un essai fonctionnel. Suite au comptage de 44 colonies sur boîte – TLHA et 306 sur boîte –TL, permettant d'évaluer l'efficacité de notre essai à 14%. Le résultat devant être supérieur à 10%, nous pouvons considérer les résultats de notre essai comme significatifs. Leur analyse est présentée dans la figure 3.3. Nous pouvons y constater que notre construction ne présente aucune toxicité pour la levure car celle-ci croît normalement sur les boîtes de pétris. De plus, la co-transformation de l'appât avec le plasmide pOst1-Nubl confirme que la protéine de fusion PS1 Δ 9-Cub-TF est exprimée dans la levure,

et qu'elle est supposément correctement insérée dans les membranes en permettant l'assemblage de Cub et Nubl activant le système « split-ubiquitin ». Enfin, la co-transformation de pBT3-N PS1Δ9-Cub-TF avec pPR3-N nous confirme que l'appât n'autoactive pas le système « split-ubiquitin ».

<u>Souche CD3-808</u> <u>co-transformée avec les plasmides</u>	<u>Milieu sélectif</u>		<u>Interaction sur -TLHA</u>
	<u>-TL</u>	<u>-TLHA</u>	
<u>pBT3-N Ps1 Ex9 + pOst1-Nubl</u>			+++
<u>pBT3-N Ps1 Ex9 + pPR3-N</u>			-
<u>Aucun</u>			-



Légende :  : Aucune colonie n'a été observée  : Forte pousse des levures

Figure 3.5 : Analyse du phénotype de levures CD3 808 surexprimant la construction "appât" pBT3-N PS1Δ9-Cub-TF

Le contrôle de co-transfection est assuré par l'étalement des levures sur milieu -TL. La co-transformation de pBT3-N PS1Δ9-Cub-TF avec pOst1-Nubl active le système « split-ubiquitin » et permet aux levures hôtes de pousser sur milieu – TLHA. La co-transformation de de pBT3-N PS1Δ9-Cub-TF avec pPR3-N prouve également que notre appât n'autoactive pas le système.

3.3.2 Évaluation de la fusion des levures CD3 808 « Mat a » contenant l'appât PS1Δ9-Cub-TF

Avant d'effectuer le véritable criblage, l'efficacité de fusion des souches de levures hôtes a été évaluée. Pour cela, nous avons effectué un criblage pilote utilisant la souche CD3 808 « Mat a » transformée avec le plasmide appât pBT3-N PS1Δ9-Cub-TF contre la souche CD3 809 « Mat α » transformée avec le vecteur vide pPR3-N. L'évaluation de l'efficacité de fusion a été permise suite au comptage des levures ayant poussé sur les boîtes de sélection –L, -T et –TL, qui furent respectivement de $6,2 \cdot 10^4$; $5,7 \cdot 10^3$ et $1,7 \cdot 10^3$. La division du nombre de Cfu diploïdes/mL de $1,7 \cdot 10^3$ par le nombre de Cfu haploïdes limitants/mL de $5,7 \cdot 10^3$ a démontré une efficacité de fusion de 30%. L'aberrance de ce chiffre étonnement élevé peut s'expliquer par la

faible pousse des levures CD3 809 transformées avec le vecteur vide pPR3-N sur milieu -T, suite à l'incubation de fusion. Le fait que cet événement ne se soit pas produit lors du criblage pilote avec PS1 WT, nous avons octroyé l'aberrance de ce résultat à de possibles incidents techniques survenus lors de la manipulation. De plus, la pousse défectueuse concerne seulement le lot de levures contenant le vecteur pPR3-N. Les résultats obtenus concernant la pousse des levures haploïdes contenant notre vecteur appât ainsi que ceux concernant les levures diploïdes semblent « normaux » (l'ordre de grandeur des résultats sont effectivement comparables à ceux obtenus lors du criblage pilote utilisant PS1 WT, décrits dans la section 3.2.3). Nous avons ainsi choisi de poursuivre à l'étape suivante.

3.3.3 Criblage de la banque d'ADNc extraits de cerveau humain

Suite au criblage « à grande échelle », 49 pétris -TLHA de 150mm ont été étalés. Au total, 154 colonies furent dénombrées et repiquées sur un nouveau pétris -TLHA dans le but de confirmer leur dénomination de « clone positif. Le nom des clones a été attribué selon une logique chronologique de type « A1 » ; où « A » correspond au jour 1 du comptage, et « 1 » correspond à la première levure comptée ce jour-ci. L'efficacité de fusion entre les levures CD3 808 « Mat a » contenant pBT3-N PS1 Δ 9-Cub-TF et les levures CD3 809 « Mat α » transformées avec 21 μ g des plasmides de banque pPR3-N-NubG-X a été évaluée. L'étalement d'aliqots de 100 μ L de dilutions 1/1000, 1/10 000 et 1/100 000 de la population de levure résultant de l'incubation de fusion nous a permis de dénombrer $1,74 \cdot 10^5$; $4,7 \cdot 10^3$ et $1 \cdot 10^2$ Cfu/mL sur les boîtes -L, -T et -TL respectivement. Ainsi, nous avons estimé une efficacité de fusion égale à 2,1%; prouvant cette fois-ci la fusion efficace des levures CD3 808 « Mat a » contenant pBT3-N PS1 Δ 9-Cub-TF avec les levures CD3 809 « Mat α » contenant les différents plasmides de banque.

3.3.4 Identification des plasmides candidats

L'ADNp des 12 premiers clones positifs de levures apparus lors du criblage a été extrait et électroporé dans les bactéries électro-compétentes DH10B. Celles-ci ont alors été étalées sur un milieu contenant de l'ampicilline afin de ne sélectionner que les transformants d'un vecteur pPR3-N-NubG-X. Par la suite, l'ADNp de 5 à 10 colonies bactériennes isolées a été extrait, afin de subir une digestion par les enzymes BamH1 et EcoR1 permettant de sortir les inserts plasmidiques. L'étude du profil de digestion présenté par les différents plasmides est présentée dans la figure 3.6. Celle-ci nous a permis de noter près de 12 profils de

digestion différents, que nous avons identifiés comme suit : 1A3, 1A4, 2A1, 3I2, 3F3, 3G3, 4A1, 6D1, 6B2, 6N5, 6W4 et 6X4.

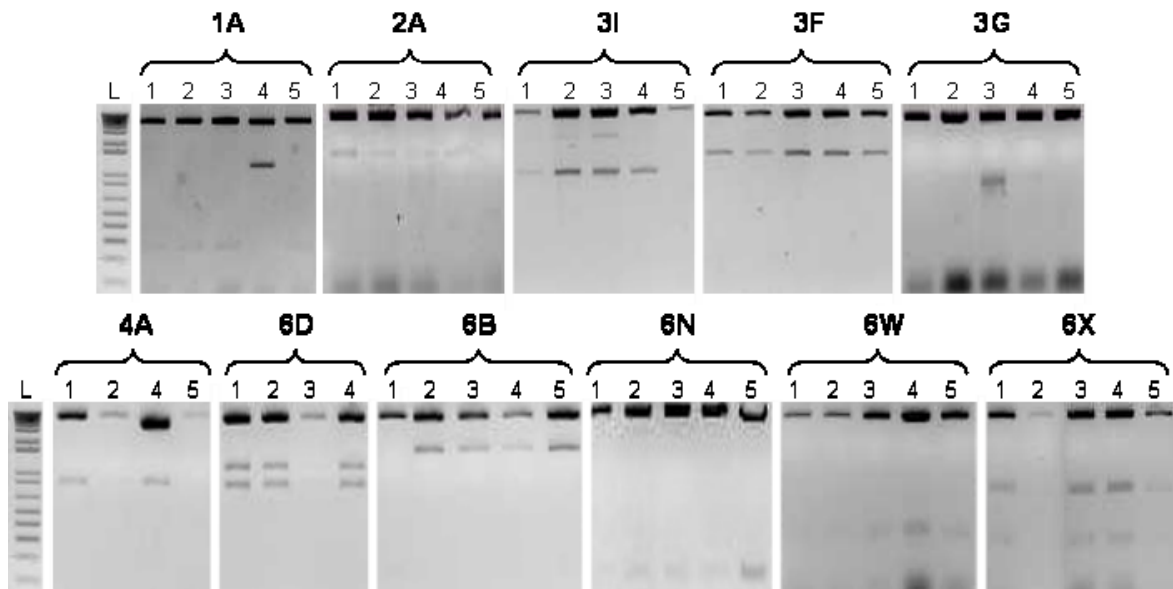


Figure 3.6 : Étude des profils de digestion des plasmides pPR3-N-NubG-X des clones positifs de levures issus du criblage

Les bactéries DH10B ont été électroporées avec l'ADNp extrait des clones positifs de levures issus du criblage. Les plasmides de 5 clones bactériens ont été extraits puis digérés par les enzymes BamH1 et EcoR1 afin d'obtenir leur profil de digestion. 12 profils différents ont été identifiés, à savoir 1A3, 1A4, 2A1, 3I2, 3F3, 3G3, 4A1, 6D1, 6B2, 6N5, 6W4 et 6X4. Les plasmides correspondant ont alors été envoyés au séquençage afin d'identifier l'insert qu'ils contiennent.

Les 12 plasmides correspondant aux profils de digestions différents ont été envoyés à la « Plateforme de séquençage et de génotypage des génomes » du CHUL, afin de séquencer leurs inserts. À l'exception des clones 2A1 et 6N5, les séquences nucléotidiques reçues nous ont permis d'identifier différents gènes codant de potentiels interacteurs protéiques de PS1Δ9, dont la liste est présentée dans le Tableau 14. Les deux clones négatifs 2A1, dont l'insert correspond à un locus du chromosome 10 non identifié à ce jour; et 6N5, dont l'insert n'a trouvé aucune correspondance suite au BLAST effectué sur le site NCBI; n'ont pas été retenus pour des études plus approfondies.

Tableau 14 : Liste des partenaires protéiques potentiels de PS1 Δ 9

Clones	Homologie nucléotidique	Protéine correspondante
1A3	TXLNA	Taxilin Alpha
1A4	CETN2	Centrin 2
2A1	Séquence CHR10	-
3I2	CD63	CD63 Antigen
3F3	PFKM	Phosphofructokinase, Muscle
3G3	RPL18A	Ribosomal Protein L18 A
4A1	AFAP1	Actin Filament-Associated Protein 1
6B2	CRYL1	Crystallin Lambda 1
6D1	TCP1	T-Complex Protein 1 Subunit Alpha
6N5	-	-
6W4	LARP1	La-Related Protein 1
6X4	ZBTB4	Zinc Finger And BTB Domain Containing 4

3.3.5 Confirmation des interactions protéiques en levure

Suite à l'obtention des plasmides isolés provenant des bactéries transformées avec l'ADNp des clones de levures issus du criblage; nous avons procédé à la vérification d'interaction spécifique entre chacune des protéines qu'ils expriment et la préséniline 1. Tout comme pour le criblage utilisant l'appât PS1 WT-Cub-TF, nous avons comparé les capacités d'interaction protéiques des protéines PS1 WT et PS1 Δ 9 grâce à une étude en double hybride. Pour cela, les levures CD3-808 préalablement transformées avec le vecteur appât pBT3-N PS1 WT-Cub-TF ainsi que les levures CD3-808 préalablement transformées avec le vecteur appât pBT3-N PS1 Δ 9-Cub-TF ont été de nouveau transformées avec chacun des plasmides isolés retenus lors de l'étude des profils de digestion. L'analyse a été permise grâce à l'étalement des levures transformées sur milieu –TL, dont 3 colonies de chaque transformation ont ensuite été striées sur un milieu –

TLHA de manière indépendante. L'analyse des différents niveaux de pousse de levure est illustrée dans la figure 3.7.

<u>Plasmide candidat</u>	<u>CD3 808 pBT3-N Ps1 WT-Cub-TF</u>		<u>CD3 808 pBT3-N Ps1Ex9-Cub-TF</u>	
	<u>Milieu sélectif</u>	<u>Interaction</u>	<u>Milieu sélectif</u>	<u>Interaction</u>
	-TL -TLHA		-TL -TLHA	
<u>pPR3-N 1A3</u>		-		+
<u>pPR3-N 1A4</u>		+		++++
<u>pPR3-N 3I2</u>		-		+
<u>pPR3-N 3F3</u>		+		++++
<u>pPR3-N 3G3</u>		-		+
<u>pPR3-N 4A1</u>		+		+
<u>pPR3-N 6B2</u>		-		+
<u>pPR3-N 6D1</u>		-		+
<u>pPR3-N 6W4</u>		-		+
<u>pPR3-N 6X4</u>		-		+

Légende : : Aucune colonie n'a été observée : Légère pousse des levures : Forte pousse des levures

Figure 3.7 : Analyse du double hybride testant les plasmides proies retenus lors du criblage utilisant PS1 Δ 9-Cub-TF chez les levures CD3 808 pré-transformées. Tous les plasmides candidats transformés dans les levures CD3 808 contenant l'un ou l'autre des vecteurs appâts pBT3-N PS1 WT-Cub-TF ou pBT3-N PS1 Δ 9-Cub-TF ont confirmé leur capacité à produire une protéine interagissant avec la préséniline se reflétant par la pousse des levures hôtes sur milieu -TLHA. Les levures CD3 808 contenant l'appât PS1 Δ 9-Cub-TF présentent une activation du système « split-ubiquitin » systématiquement plus forte dans celle observée dans les levures CD3 808 contenant PS1 WT-Cub-TF. En effet, la quasi-totalité des interactions est même perdue au sein de cette dernière, à l'exception des levures ayant intégré les plasmides pPR3-N 1A4, pPR3-N 3F3 et pPR3-N 4A1.

L'analyse du double hybride nous permet de constater que tous les vecteurs candidats permettent l'activation du système « split-ubiquitin » dans les levures contenant l'appât PS1 Δ 9-Cub-TF. Les levures exprimant l'appât PS1 WT-Cub-TF sont capables de pousser sur milieu –TLHA uniquement lorsqu'elles expriment les protéines codées par les vecteurs pPR3-N 1A4, pPR3-N 3F3 et pPR3-N 4A1. Afin de poursuivre nos analyses, nous avons décidé de ne prendre en compte que les clones plasmidiques semblant interagir fortement avec PS1 Δ 9, entraînant alors une pousse significative des levures hôtes sur boîte –TLHA. Ces clones sont ici identifiés comme étant 1A4 et 3F3, et correspondent aux séquences partielles des gènes codant pour les protéines CETN2 et PFKM respectivement.

3.4 Étude de PS1 WT, PS1 Δ 9 et des protéines candidates en cellule HEK 293T

Afin d'approfondir l'étude des interactions identifiées lors du criblage de la banque d'ADNc de cerveau humain utilisant les protéines PS1 WT ou PS1 Δ 9 comme appât ; nous avons souhaité réaliser des co-immunoprécipitations dans le modèle cellulaire HEK 293T transfecté transitoirement avec des vecteurs exprimant les protéines PS1 WT, PS1 Δ 9 et les protéines candidates. Pour rappel, celles-ci correspondent aux différentes protéines partiellement encodées par les vecteurs candidats isolés des clones positifs issus des différents criblages, et sont identifiées comme suit : CETN2, PRPSAP2, DOK5, Ku80, RPL6, DSS1 et PFKM. Par souci d'étudier chacune des interactions protéiques dans un contexte se rapprochant le plus possible du contexte physiologique, nous avons cloné l'ADNc permettant l'expression intégrale de chacune de ces protéines au sein du vecteur d'expression cellulaire pcDNA3.1-His C. À l'heure d'aujourd'hui, seule la construction pcDNA3.1-His C CETN2 a démontré sa capacité à exprimer la protéine candidate CETN2 associée à l'épitope Xpress en cellule HEK 293T. Concernant les présénilines PS1 WT et PS1 Δ 9, différentes constructions ont été produites puis employées, à savoir pcDNA3 PS1 WT; pcDNA3 PS1 Δ 9 ; pCMV-Zéo-HA PS1 WT ; pCMV-Zéo-HA PS1 Δ 9 et enfin pEGFP PS1 WT, et chacune a permis l'expression de l'une ou l'autre des formes de préséniline 1 en cellule HEK 293T avec succès. Les immunodétections démontrant l'expression des différentes protéines nommées au sein des cellules HEK 293T sont présentées dans la figure 3.8.

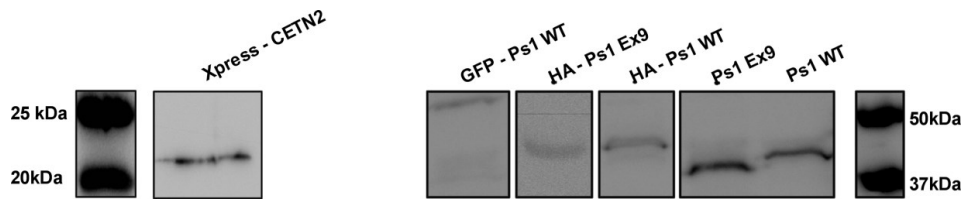


Figure 3.8 : Immunodétection des constructions permettant l'expression des protéines CETN2, PS1 WT et PS1 Δ 9 au sein des cellules HEK 293T L'expression de la construction pCDN3.1 His C a été vérifiée dans les cellules HEK 293T transfectées transitoirement par ce vecteur. La protéine de fusion Xpress-CETN2 est détectable par l'anticorps α -Xpress à un poids moléculaire d'environ 22kDa, conformément aux données retrouvées dans la littérature. L'ensemble des constructions permettant l'expression des protéines PS1 WT et PS1 Δ 9 ont été transfectées indépendamment et transitoirement dans les cellules HEK 293T. La détection des présénilines a été effectuée grâce à l'utilisation de l'anticorps α -PS1 Ab14 dirigé contre la partie N-terminale de PS1. La protéine native PS1 WT est détectable à un poids moléculaire d'environ 40kDa, et la protéine PS1 Δ 9 est détectable à un poids à peine plus faible, conformément aux observations attendues. L'ajout des épitopes HA ou GFP est respectivement permis par les constructions pCMV-Zéo-HA-PS1 WT et pCMV-Zéo-HA-PS1 Δ 9 ou pEGFP PS1 WT; et induit la détection des protéines à des poids moléculaires plus élevés, d'environ 2kDa concernant l'ajout de l'épitope HA, et d'environ 25kDa concernant l'ajout du GFP. Ces observations correspondent à celles attendues et décrites dans la littérature.

À ce jour, plusieurs expériences d'immunoprécipitations ont été menées dans le but de confirmer l'interaction de la préséniline 1, native et/ou mutée avec la protéine CETN2 ; qui avait été détectée lors des deux criblages en levure. Nous avons ainsi induit la co-expression de la protéine CETN2 avec l'une ou l'autre des variants de préséniline 1 de manière indépendante. Pour ce faire, nous avons co-transfecté le vecteur pCDNA3.1-His C CETN2 avec, d'une part l'un des vecteurs permettant l'expression de PS1 WT (pCDNA3 PS1 WT ou pCMV-Zéo-HA PS1 WT); et d'autre part avec l'un des vecteurs permettant l'expression de PS1 Δ 9 (pCDNA3 PS1 Δ 9 ou pCMV-Zéo-HA PS1 Δ 9). La co-expression des protéines CETN2 et PS1 au sein de la cellule a systématiquement été vérifiée, mais malheureusement pas toujours détectée. Après plusieurs tentatives, utilisant différentes conditions d'extraction (Triton ou STEN, 1 heure ou plus, lyse à la seringue ou non...), mais également plusieurs méthodes d'immunoprécipitation protéique de PS1 (anticorps α -N19 ou α -HA), une seule expérimentation nous a fourni un résultat intéressant, dont l'analyse est fournie dans la figure 3.9. Celle-ci a été permise suite à la transfection transitoire des plasmides pCDN3.1-His C CETN2 avec pCMV-Zéo-HA PS1 WT ou avec pCMV-Zéo-HA PS1 Δ 9. Cependant, malgré la reproduction des conditions expérimentales qui avaient été appliquées, les résultats observés n'ont pas été reproduits à ce jour.

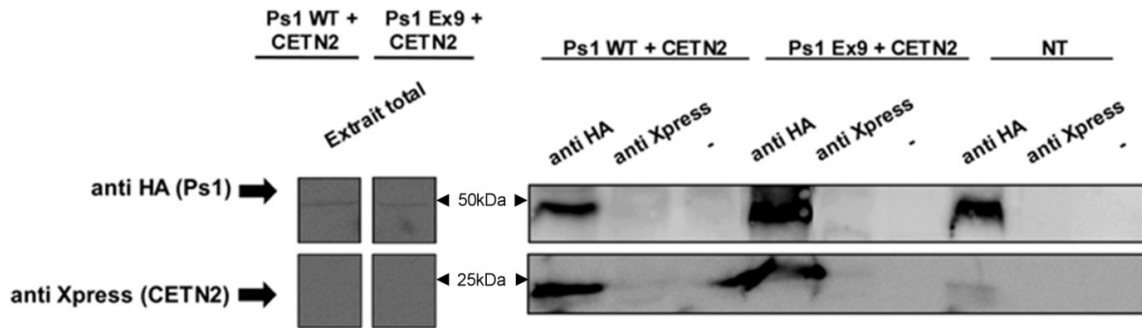


Figure 3.9 : Analyse de l'immunoprécipitation des protéines PS1 WT et PS1 Δ 9 avec CETN2

Suite à la transfection transitoire des cellules HEK 293T par les plasmides pCMV-Zéo-HA PS1 WT et pCMV-Zéo-HA PS1 Δ 9, l'expression protéique des protéines CETN2, PS1 WT et PS1 Δ 9 est évaluée. Des aliquots d'extraits totaux issus de l'une ou l'autre des co-transfections sont déposés sur un gel qui sera sondé par un anticorps α -HA ; et sur un gel sondé par un anticorps α -Xpress. Une bande protéique de 50kDa nous confirme la présence de PS1 WT et PS1 Δ 9 dans chacun des extraits totaux correspondants. En revanche, la détection de CETN2 a échoué dans chacun des extraits totaux. Le reste des extraits protéiques des cellules co-transfectées et non transfectées (NT) est soumis à une Co-IP puis les échantillons sont déposés sur un gel sondé anti HA et un gel sondé anti Xpress. Le gel sondé α -HA nous révèle la présence de bandes protéiques à la hauteur attendue pour PS1 dans les échantillons de co-transfection précipités HA et dans les échantillons NT, révélant alors de l'aspécificité. Le gel sondé α -Xpress nous révèle la présence de bandes protéiques à la hauteur attendue pour CETN2 dans les échantillons de co-transfection précipités HA.

Suite à la co-transfection transitoire des cellules HEK 293T par 10 μ g des plasmides pCMV-Zéo-HA PS1 WT et pCMV-Zéo-HA PS1 Δ 9, les cellules sont lysées afin d'en récupérer la fraction protéique. Un lot de cellules HEK 293T non transfectées est également lysé, afin de servir de contrôle négatif de Co-IP. Plusieurs aliquots d'échantillons protéiques provenant des cellules co-transfectées sont également conservés afin de servir de contrôles d'extraits totaux. Les extraits protéiques sont ensuite divisés en trois fractions égales afin de procéder à la Co-IP. La première fraction contient l'anticorps α -HA permettant de précipiter la protéine de fusion HA-PS1 WT ou HA-PS1 Δ 9 selon la co-transfection préalablement réalisée ; la seconde fraction contient l'anticorps α -Xpress permettant de précipiter la protéine de fusion Xpress-CETN2 ; et enfin la dernière nous sert de contrôle négatif et ne contient aucun anticorps.

En premier lieu, avons évalué l'expression des protéines CETN2, PS1 WT et PS1 Δ 9 au sein des extraits totaux précédemment aliquotés. Grâce à un sondage par l'anticorps α -HA, nous avons confirmé la présence de chacune des formes de préséniline 1 au sein des extraits totaux protéiques. En revanche, la protéine CETN2 n'a pu être détectée par sondage α -Xpress dans aucun des extraits totaux.

Ensuite, l'ensemble des extraits protéiques soumis à une Co-IP a été déposé sur deux gels sondés par les anticorps α -HA ou α -Xpress. Le premier gel est sondé par l'anticorps α -HA et nous révèle la présence de bandes protéiques à la hauteur attendue pour PS1 dans les échantillons immunoprécipités par l'anticorps

α -HA. En revanche, la présence d'une bande de même hauteur dans les échantillons NT révèle de l'aspécificité, correspondant probablement aux anticorps α -HA utilisés afin de précipiter PS1. Cette dernière observation et nous empêche ainsi de conclure sur la détection des protéines PS1 WT et PS1 Δ 9 suite à leur propre immunoprécipitation, dû au conflit apparaissant entre la bande protéique correspondant à PS1 et celle correspondant à l'anticorps α -HA; migrant toutes deux à la même hauteur. Nous pouvons également remarquer que l'immunoprécipitation de la protéine de fusion Xpress-CETN2 n'entraîne pas celle de l'un ou l'autre des variants de préséniline 1. Le second gel est sondé α -Xpress et nous révèle la présence de bandes protéiques à la hauteur attendue pour CETN2 dans les échantillons de co-transfection précipités par l'anticorps α -HA. Bien que la protéine CETN2 n'ait pas été détectée dans les extraits totaux issus des co-transfections, il est connu que la manipulation de Co-IP a un effet concentrateur sur les protéines d'intérêt, et cela pourrait expliquer une telle observation. Par ailleurs, on observe la présence d'une faible bande protéique de la même hauteur dans l'échantillon NT ayant subi une immunoprécipitation par l'anticorps α -HA. Celle-ci pourrait ainsi correspondre à l'anticorps et nous révéler le caractère aspécifique des bandes observées dans les échantillons de co-transfection. Cependant, au vu de la différence flagrante d'intensité des bandes, et en considérant que les échantillons de co-transfection contiennent une quantité de protéines bien plus importante que les échantillons NT; nous pouvons estimer que l'hypothèse selon laquelle CETN2 interagit avec les protéines de fusion HA-PS1 WT et HA-PS1 Δ 9 mérite d'être considérée.

4 Discussion

Bien qu'elle corresponde à une partie minoritaire des cas, la forme familiale de la maladie d'Alzheimer constitue un objet d'étude des plus intéressants qui a déjà permis d'amener de nouvelles connaissances sur la mise en place mécanistique de la maladie. Malgré son caractère dévastateur pour les familles et patients touchés, elle reste aujourd'hui peu étudiée et demeure encore moins comprise. Cependant, à la différence des cas sporadique, la FAD est entièrement liée au génotype du patient ; et notamment au gène codant pour la préséniline 1 dont la mutation est responsable de la mise en place de la maladie chez 60% des patients. Cette évidence reste aujourd'hui sans explication, les rôles déjà définis pour PS1 ne suffisant pas à comprendre le phénotype sévère et précoce touchant les patients porteurs d'une mutation. C'est à partir de cette problématique qu'est né le projet de cette maîtrise, au cours duquel nous avons souhaité ouvrir de nouvelles voies d'études de la fonctionnalité de PS1 dans la mise en place de la pathologie d'Alzheimer familial. Pour ce faire, nous avons effectué la classique mais efficace méthode de criblage par double hybride en levure, dans le but d'identifier de nouveaux partenaires protéiques de PS1. L'étude de la littérature et la connaissance de leurs rôles précis au sein de la cellule pourraient alors nous donner les indices nécessaires à une meilleure compréhension de l'implication de PS1 dans la mise en place de la pathologie chez les personnes exprimant une forme mutée de la protéine. Comme il n'est pas encore connu si les résultats obtenus sont reproductibles en cellule ou non ; nous ne pouvons pas non plus conclure sur une possible interaction préférentielle avec la forme native ou mutée de PS1. Ainsi, nous émettrons les différentes hypothèses en considérant que la mutation de PS1 entraînerait une perturbation de l'interaction qui, peu importe si elle est augmentée, diminuée ou perdue ; induirait un défaut dans le fonctionnement principal de la protéine partenaire.

4.1 Comparaison des interactions protéiques de PS1 WT et PS1 Δ 9

Nous avons procédé à deux criblages par double hybride en levure, permettant l'étude interactionnelle des variants protéiques de la préséniline 1 native, nommée PS1 WT ; ou présentant une délétion de l'exon 9, nommée PS1 Δ 9. Le choix de la mutation de patient PS1 Δ 9 parmi les 221 recensées à ce jour n'a cependant pas été fait au hasard. À la différence de l'ensemble des criblages utilisant la préséniline 1 précédemment

effectués nous avons pris pour appât la forme pleine longueur de PS1 ; et bien que l'ensemble des mutations ponctuelles de PS1 entraîne une FAD, nous avons jugé qu'il serait plus pertinent pour une telle étude d'utiliser une forme protéique se distinguant de la forme native par une délétion complète de son site endoprotéolytique. En effet, la délétion de l'exon 9 au sein du gène de la préséniline mène à la formation d'une holoprotéine fonctionnelle, mais dépourvue de 29 acides aminés présents au sein de son site de maturation. En conséquence de cette perte physique, ou bien à cause d'une altération conformationnelle résultante; la protéine PS1 Δ 9 se retrouve exprimée sous une forme immature non clivée, à la différence de PS1 WT qui se présente sous une forme d'oligomère composé de ses CtF et NtF réunis.

Bien qu'il s'agisse d'une démonstration indirecte de la présence d'interactions protéiques en levure, le système « split-ubiquitin » est outil permettant de travailler dans un contexte proche du contexte physiologique; fournissant un résultat tranché en présence ou en absence d'interaction des protéines proie et appât, comme l'ont démontré les différents tests fonctionnels effectués. Par ailleurs, il est important de rappeler que l'essai fonctionnel vérifiant l'autoactivation de la construction appât PS1 Δ 9-Cub-TF nous avait fourni un résultat sans appel, nous assurant que la construction était fiable. Dans notre idée de départ, l'utilisation de PS1 Δ 9 comme appât du second criblage devait servir de contrôle négatif, démontrant alors une perte d'interaction protéique comparativement à l'utilisation de l'appât PS1 WT. Or, de manière très intéressante; c'est cependant exactement le contraire que nous avons observé lors des études interactionnelles en levures. En effet, l'appât comprenant PS1 Δ 9 s'est révélé un interacteur plus puissant que PS1 WT face à la quasi-totalité des proies comprenant les protéines détectées grâce au criblage utilisant PS1 WT (voir section 3.2.5). Une telle observation pourrait être expliquée par la différence structurelle existant entre les deux variants protéiques. On pourrait en effet imaginer que PS1 Δ 9 possède un potentiel interacteur plus fort face aux protéines partenaires identifiées; qui pourrait être dû à une absence de sa maturation, ou bien encore au remplacement d'une sérine en cystéine consécutif à la délétion de l'exon 9.

Étant donné que l'ensemble des candidats retenus ont démontré leur capacité d'interaction avec PS1 WT et PS1 Δ 9 en levure; nous pourrions imaginer que la mutation conférerait un gain de fonction à PS1, permettant alors une plus forte interaction avec les dites protéines. Dans le contexte de la maladie d'Alzheimer, un tel gain de fonction de PS1 pourrait alors influencer la fonctionnalité des partenaires avec lesquels elle interagit. En effet, si la préséniline est capable d'établir une interaction plus forte, ou plus longue dans le temps avec l'un de ses partenaires; celui-ci pourrait alors être détourné de ses autres fonctions, dérégulant alors d'importants systèmes et mécanismes cellulaires. Bien que la mutation PS1 Δ 9 ne soit pas la plus étudiée à ce jour, plusieurs données démontrent certains gains de fonctions ; comme l'observation d'une augmentation du clivage de la N-cadhérine en sa présence (133), ou encore l'interaction favorisée de la protéine GSK-3 avec PS1 lorsque celle-ci présente la délétion des acides aminés 290 à 319 (134). Ainsi, il

serait intéressant d'observer si les différences interactionnelles entre PS1 WT et PS1 Δ 9 observées en levure se retrouvent dans les cellules HEK 293T afin d'identifier de nouvelles fonctions acquises par la mutation PS1 Δ 9. L'identification de nouveaux gains de fonctions vis-à-vis des protéines identifiées lors des différents criblages permettrait en effet d'ouvrir de nouveaux champs de possibilités quand à la mise en place de la maladie chez les patients possédant le variant PS1 Δ 9.

4.2 PS1 interviendrait dans les processus de réparation de l'ADN

Grâce aux criblages par double hybride effectués en levure, nous avons identifié de possibles nouveaux partenaires de la préséniline 1. En se penchant de plus près sur la liste des gènes identifiés, il est observable qu'une partie est impliquée dans la transcription et la réparation de l'ADN. La protéine Centrin 2 tout d'abord, présente un intérêt particulier car celle-ci a été identifiée à la suite des deux criblages. Bien que notre étude soit axée sur la comparaison interactionnelle de PS1 WT et PS1 Δ 9, l'identification d'un même partenaire dans les premiers jours de deux criblages indépendants indique que celui-ci possède un potentiel interacteur important qu'il ne faudrait absolument pas négliger. Comme son nom le laisse entendre, la protéine Centrin 2 a initialement été identifiée comme un élément essentiel des centrosomes (135). Par la suite, des études ont rapporté le rôle clé de cette protéine au sein du complexe XPC, responsable de l'initiation du processus de NER (« Nucleotide Excision Repair ») lors de dommages à l'ADN (136). Enfin, CETN2 serait membre du complexe de transcription et d'exportation de l'ARNm TREX2. Sa présence spécifique au niveau de la membrane nucléaire, auprès des complexes de pores nucléaires, lui suggère ainsi un rôle majeur dans l'exportation de l'ARNm (137). L'importance du complexe TREX2 est telle que celui-ci est fortement conservé au sein de l'évolution, et des homologues de chaque protéine ont été retrouvés aussi bien chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* que chez la plante *Arabidopsis thaliana*. Or, et de manière fort intéressante, on retrouve dans les homologues du complexe TREX2 de ces organismes une seconde protéine partenaire identifiée lors du criblage avec PS1 WT, la protéine DSS1 (138). Bien que cette protéine soit majoritairement étudiée pour son rôle au sein du 26S protéasome (139), des études prouvent la nécessité de DSS1 dans le processus de réparation à l'ADN, notamment grâce à son interaction avec la protéine suppresseur de tumeur BRCA2 (140) connue pour se lier aux protéines du complexe TREX2 (141). Allant dans ce sens, DSS1 jouerait le rôle de protéine de vérification de dommages à l'ADN *via* le recrutement des protéines Rad24p et Cdc25p aux lieux de cassures doubles brins (142). Etant donné que la protéine DSS1 a été identifiée suite à la méthode « split-ubiquitin », basée sur l'utilisation détournée des protéines du système du protéasome ; son interaction spécifique avec PS1 « hors système » devrait impérativement être évaluée afin de s'assurer qu'elle ne constitue pas une fausse positive. Finalement, nous avons identifié comme partenaire de PS1 WT la

protéine Ku80, fortement connue pour son rôle dans la réparation de fins d'assemblages non homologues « NHEJ » (« Non Homologous End Joining »). En effet, Ku80 forme un hétérodimère avec Ku70 à l'extrémité de l'ADN présentant une cassure double brin, puis recrute les facteurs nécessaires au processus de réparation à l'ADN (143). Le défaut d'une des protéines du complexe alors formé provoque des dommages majeurs au sein de la cellule, et mène notamment à une apoptose neuronale massive (144).

Les dommages à l'ADN forment une caractéristique retrouvée dans les neurones de patients Alzheimer. Il est aujourd'hui pensé que cela serait le fruit d'un stress oxydatif global survenant suite à l'accumulation de l'A β (voir section 2.2.1), en corrélation avec le simple vieillissement (145). Celui-ci pourrait en effet être responsable de la baisse de transcription de gènes neuronaux clés, notamment impliqués dans la transmission et la plasticité synaptique; dans l'homéostasie du calcium; dans la réponse au stress; ou encore dans la fonction mitochondriale (146). De plus, dans le cadre de la FAD, il est pensé que PS1 jouerait aussi un rôle d'induction de stress oxydatif en perturbant l'homéostasie calcique du réticulum endoplasmique (147), et en influençant directement l'intégrité de la mitochondrie (148). Cependant, à la différence de personnes saines les patients Alzheimer présenteraient des défauts de réparation à l'ADN, les rendant alors moins aptes à contrer les différentes lésions liées à l'oxydation. En effet, il a d'abord été rapporté que des cellules non-neuronales de types fibroblastiques et lymphoblastiques issues de patients Alzheimer étaient plus sensibles aux irradiations UV et aux agents alkylants que les cellules de mêmes types issus de patients sains. Cette observation a alors soumis l'idée selon laquelle les cellules de patients étaient moins aptes à réparer les lésions à l'ADN (149). Plusieurs études ont ensuite démontré la présence de dommages à l'ADN dans les neurones de patients (150, 151), et ces observations ont orienté la recherche vers l'étude des protéines de réparation à l'ADN chez les personnes atteintes de la pathologie d'Alzheimer. Il a alors été observé à plusieurs reprises une diminution de l'activité de certaines protéines impliquées dans la réparation à l'ADN, autant dans le cerveau de personnes atteintes de déficits cognitifs légers, stade précédant généralement la déclaration de la pathologie d'Alzheimer (152); que dans les cerveaux de patients présentant déjà la maladie (153, 154). Finalement, il existe un ensemble d'études venant appuyer l'idée selon laquelle PS1, la réparation à l'ADN, et la maladie d'Alzheimer seraient liées. Tout d'abord une première étude localisait PS1 au niveau des membranes nucléaires, et montrait sa capacité à interagir avec les chromosomes interphasiques afin de les maintenir à la surface interne du noyau, conformation nécessaire lors de la transcription. L'auteur avait déjà alors émis l'hypothèse selon laquelle PS1 aurait un rôle dans le recrutement de protéines jusqu'à l'ADN (155). Par la suite, une étude démontre que l'expression d'un mutant FAD de PS1 chez la souris induit un nombre de cassures simple brin significativement plus important que ceux induits chez la souris exprimant une forme mutée d'APP, ou même les deux protéines mutées (156). Enfin, il a été prouvé que les patients présentant les symptômes neuropathologiques typiques (plaques amyloïdes et enchevêtrement fibrillaires) et possédant un système de réparation à l'ADN et de maintien du cycle cellulaire intègre ne développent pas les dysfonctions

cognitives caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (157). En revanche, celles-ci seraient fortement atténuées conséquemment à la diminution de l'expression de la préséniline 1 dans le cerveau de souris vieillissantes (158). Ainsi, PS1 pourrait jouer un rôle primordial dans le maintien d'une fonction cognitive saine, qui pour la première fois semble être étroitement reliée aux mécanismes assurant l'intégrité génomique.

Finalement, l'ensemble de ces données croisé à l'étude bibliographique des protéines CETN2, DSS1 et Ku80, nous amène à émettre l'hypothèse suivante : PS1 serait essentielle au recrutement de protéines de réparation à l'ADN, et un défaut de son expression induirait d'importantes lésions de l'ADN responsables de la mise en place des troubles cognitifs typiques de la maladie. Ainsi, en considérant le rôle inducteur de stress oxydatif prêté à la protéine PS1 mutée, on pourrait imaginer observer une spirale de lésions à l'ADN non réversibles, qui mènerait à une mort cellulaire rapide, et une apparition de la maladie avant même les premiers signes d'oxydation cellulaire liés au vieillissement.

4.3 PS1 permettrait le maintien du cycle cellulaire neuronal

Comme il a été précédemment mentionné, CETN2 est une protéine particulièrement intéressante : non seulement celle-ci a été identifiée dans les deux criblages, mais elle exerce en plus différentes fonctions. En effet, en plus de ses rôles de réparation et transcription de l'ADN précédemment décrits, CETN2 se trouve être une protéine essentielle du centrosome, sa déplétion empêchant une duplication du centriole durant la phase G1/S du cycle cellulaire (135).

Au cours des différentes études menées sur la pathologie d'Alzheimer, de nombreuses dysfonctions du cycle cellulaire ont été répertoriées. Tout d'abord, notons que les neurones sont des cellules « en dormance » bloquées au stade G0, et une entrée malencontreuse du neurone au sein d'un nouveau cycle cellulaire mène invariablement à sa mort (159). Cependant, de plus en plus d'études rapportent la présence de protéines indiquant l'engagement d'un cycle cellulaire dans les neurones de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (160, 161). L'entrée du neurone en cycle cellulaire serait un événement précoce apparaissant en amont des signes neuropathologiques liés à la déposition d'amyloïde et d'agrégation de tau. Certaines études ayant également observé une augmentation de tels signes émettent l'hypothèse selon laquelle l'entrée du neurone dans un cycle cellulaire serait en partie responsable de l'augmentation des peptides A β et de tau hyperphosphorylé (162, 163). L'hypothèse actuelle, serait que le neurone malade entrerait dans un cycle cellulaire pour tenter de remédier aux dommages sévères qu'il présente, notamment suite à l'accumulation de lésions imputables au stress oxydatif au sein de la cellule. Cependant, le neurone étant incapable de

compléter un cycle cellulaire stopperait au stade G1/S, bien que certaines études rapportent la présence de neurones binucléés ayant donc accompli la phase S, spécifiquement localisés dans les zones cérébrales en dégénération (164, 165). Une telle observation a ainsi permis la spéculation selon laquelle la progression des neurones dans la phase G1/S serait un événement déclenchant leur dégénération. Dans le cadre de la FAD, de nombreuses études rapportent un lien direct entre un défaut d'expression de PS1 et un défaut du cycle cellulaire neuronal, et non neuronal. Tout d'abord, et de manière intéressante, une étude datant d'il y a près de 20 ans observait la présence de PS1 auprès des centrosomes, suggérant alors que la préséniline 1 possédait un rôle en rapport avec la ségrégation chromosomique (155). Au cours de plus récentes études, il a été observé chez la souris qu'un « knock-in » d'une protéine PS1 retrouvée chez des patients FAD induit une signalisation β -caténine aberrante, menant à la surexpression de la cycline D1, et une progression rapide des neurones en phase S (166). Au contraire, une étude comparant différents mutants de PS1 observe une augmentation des protéines Cycline D1, pRb et p53 associée à un blocage de lymphocytes en phase G1 (167). Les protéines cycline D1, pRb et p53 étant des facteurs limitants dans le cadre de la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S ; de telles observations ont amenées à poser les deux hypothèses suivantes : soit l'accumulation de ces protéines est responsable d'une progression anormale du stade G1/S ; soit au contraire, c'est l'anormalité du déroulement de la phase G1/S qui induit une accumulation de ces protéines (168). Dans le cadre de notre étude, la deuxième hypothèse semble d'une importance considérable. Alors qu'une première étude démontre qu'une activité intrinsèque du centriole est nécessaire au passage des cellules en phase S (169), il a par la suite été prouvé que CETN2 est essentielle à la duplication du centriole, durant la phase G1/S du cycle cellulaire.

Les anomalies du cycle cellulaires des patients Alzheimer survenant au stade G1/S, et l'identification de CETN2 qui possède justement un rôle essentiel à cette phase cellulaire pourraient être une coïncidence. Cependant, au vu du nombre de données conférant un rôle majeur de PS1 dans la régulation du cycle cellulaire ; et prenant en compte que CETN2 a été identifiée indépendamment lors de deux criblages, l'étude de cette interaction semble être une piste importante à suivre. Bien qu'il soit difficile avec les données acquises d'émettre une hypothèse précise sur la fonction de PS1 au travers son interaction avec CETN2, nous proposons l'hypothèse suivante : PS1 participerait à la mise en place de la duplication normale des chromosomes durant la phase S à travers son interaction avec CETN2, et un défaut de son expression conduirait à un déséquilibre de la phase G1/S, amenant les neurones engagés dans cette voie vers une dégénérescence précoce.

4.4 PS1 participerait à une nouvelle voie de signalisation liée aux RTK

Suite au criblage utilisant l'appât PS1 WT, nous avons identifié la protéine DOK5 comme potentielle interactrice. Celle-ci fait partie de la famille des « Docking Protein », petites protéines membranaires adaptatrices permettant la transmission du signal de récepteurs tyrosines kinases. Alors que la majeure partie des protéines DOK sont exprimées dans les tissus hématopoïétiques, DOK5 se trouve spécifiquement exprimée dans les tissus neuronaux. De plus, elle se distingue une fois encore des membres de sa famille par sa capacité à activer la voie des MAP kinases, là où la majorité exerce une activité inhibitrice. En effet, il a d'abord été observé que l'association de DOK5 avec le récepteur tyrosine kinase c-Ret permettait l'activation de la voie des MAP kinases. De manière intéressante, cette même étude démontre aussi que DOK5 a la capacité d'induire une voie signalétique promouvant l'excroissance de neurites, dans la lignée cellulaire PC12 (170). Une récente étude prouve par ailleurs que l'activation de c-Ret par le facteur GDNF (« Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor ») permettait l'activation de la voie MAP, et aidait les neurones de l'hippocampe exposés au NMDA (« N-Methyl-D-Aspartate ») à survivre (171). L'activation de la voie MAP kinase est également permise par l'association de DOK5 avec les récepteurs TrkB et TrkC activés par BDNF et NT-3 respectivement. Ces deux molécules font partie de la famille des neurotrophines, qui sont un ensemble de facteurs de croissance essentiels dans le développement et la survie neuronale (172). Par ailleurs, l'association de DOK5 avec TrkC permet de transmettre le signal d'inhibition d'apoptose induit par NT-3 (173).

Il existe déjà plusieurs RTK connus pour s'associer avec PS1 (voir section 1.4.3.2). L'ensemble des données recueillies sur la protéine récemment identifiée DOK5 conforte l'hypothèse selon laquelle PS1 et DOK5 interagiraient au sein du neurone. La fonction d'une telle interaction cependant, reste encore à élucider. Cependant, il est évident que DOK5 intervient dans des voies pro-neurales, permettant également de transmettre des signaux induisant la survie du neurone. Bien qu'aucune hypothèse solide ne peut être émise, on pourrait imaginer qu'une mutation de PS1 inhiberait la fonction normale de DOK5, réduisant alors les chances du neurone d'assimiler des voies anti-apoptotiques, et accélérant par ce fait sa dégénération.

4.5 PS1 permettrait la stabilisation de l'activité transcriptionnelle ribosomale

Grâce au criblage effectué avec la préséniline 1 sauvage, nous avons identifié le partenaire potentiel RPL6. La « ribosomal protein L6 » est, comme son nom l'indique, une protéine ribosomale, appartenant à la

sous unité 60S. Celle-ci constitue la « grande sous unité » du complexe final 80S, et est composée de plusieurs protéines ribosomales associées aux ARNr 28S, 5.8S et 5S. Une fois constitués, les ribosomes se lient à un ARNm dans le cytoplasme afin d'initier sa traduction : l'ensemble alors formé est nommé polyribosome. Par la suite, celui-ci est rejoint par les ARN de transferts (ARNt) afin de procéder à l'élongation de l'ARNm, et produire une séquence peptidique (174).

Dans le cadre de la pathologie d'Alzheimer, il est évident que la production protéique est dérégulée. Beaucoup d'études le montrent, certaines l'expliquent, mais malgré les différentes hypothèses émises ce phénomène reste encore peu compris. Il a premièrement été observé qu'une diminution globale de la quantité d'ARNm survenait chez les patients Alzheimer, en corrélation avec une inhibition de l'activité du complexe inhibiteur de ribonucléase (175). Il fût ensuite rapporté que le stress oxydatif entraînait une altération de l'ARN, incluant ainsi les espèces ARNt et ARNr, dont le rôle est essentiel à la synthèse protéique (176). Parallèlement à cela, une étude démontre l'existence d'une diminution région-spécifique de la quantité et de la qualité transcriptionnelle des polyribosomes lorsque ceux-ci proviennent des cortex frontaux de patients décédés de la maladie, diminuant alors significativement la quantité d'ARNm traduite (177). Venant conforter ces observations, il a plus récemment été rapporté que, pour quantité équivalente, la capacité de synthèse protéique était fortement diminuée dans les polysomes provenant spécifiquement de régions impliquées dans les régulations cognitives (à savoir le lobe pariétal inférieur et le gyrus temporal moyen), aussi bien chez les personnes atteintes de déficits cognitifs légers que d'Alzheimer (174). Enfin, il existe à ce jour une étude corrélant la préséniline 1 à une fonction de synthèse protéique. En effet, l'auteur observe une augmentation de l'activité transcriptionnelle dans des fibroblastes PS2^{-/-} comparativement à des fibroblastes contrôles, lorsque l'ensemble des cellules est cultivé en conditions d'inhibition de la synthèse protéique, suggérant ainsi une activité naturellement inhibitrice de PS2 sur la synthèse protéique (178).

Au vu de l'ensemble de ces observations, il est difficile d'émettre une hypothèse précise sur la finalité de l'interaction entre PS1 et RPL6. En effet, il est aujourd'hui largement reconnu que la préséniline 1 possède différentes caractéristiques de gain ou de perte de fonction, selon la mutation étudiée. Cependant, sachant que les présénilines se trouvent majoritairement exprimées dans le réticulum endoplasmique, connu pour être partiellement bordé de ribosomes ; nous pouvons facilement imaginer que PS1 stabiliserait la fonction de synthèse protéique des polyribosomes *via* son interaction avec la protéine RPL6. Ainsi, une mutation de la préséniline 1 pourrait modifier son interaction avec les ribosomes, et perturberait leur capacité à synthétiser de nouvelles protéines.

4.6 PS1 participerait à l'inhibition de la PRPS

La « Phosphoribosyl Pyrophosphate Synthetase-Associated Protein 2 » PRPSAP2 a été identifiée lors du criblage utilisant l'appât PS1 WT. Celle-ci permettrait la régulation négative de la PRPS, enzyme catalysant la transformation du Ribose-5-phosphate en Phosphoribosyl pyrophosphate. Ce substrat permet par la suite la création de nucléotides, de cofacteurs NAD et NADP, ainsi que des acides aminés histidine et tryptophane.

En raison de leur nature non prolifératrice, les neurones auraient un moins grand besoin de précurseurs d'acides nucléiques, et posséderaient une activité de leur synthèse *de novo* relativement basse comparativement à des cellules mitotiques (179). Il a cependant été observé que des gènes impliqués dans la synthèse de pyrimidine étaient hautement exprimés dans le néocortex et l'hippocampe de cerveaux de rats adultes (180). De plus, de nombreuses études rapportent que l'administration d'acides aminés pyrimidiques augmente les capacités de mémorisation des modèles de rat ou souris vieillissants (181), et induirait également la réduction des signes cliniques et neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer chez des animaux modèles (182).

Bien que cela soit peu caractérisé aujourd'hui, il semblerait que la synthèse *de novo* ait lieu dans l'hippocampe et le néocortex, régions particulièrement denses en neurones, et touchées lors de la déclaration de la maladie d'Alzheimer. Il serait ainsi nécessaire de recueillir les données de plus profondes analyses, afin d'observer si la PRPS serait dérégulée chez les patients, et s'il serait possible d'établir un lien entre une mutation de PS1, et une augmentation de l'activité inhibitrice de PRPSAP2 sur la PRPS.

4.7 PS1 pourrait jouer un rôle dans l'homéostasie énergétique des astrocytes

L'enzyme 6-Phosphofructokinase du muscle, ou PFKM, a été identifiée suite au criblage utilisant la PS1 Δ 9. La PFK est connue pour son rôle clé dans l'homéostasie glucidique cellulaire en catalysant la transformation du fructose-6-phosphate en fructose-1,6-biphosphate lors de la glycolyse. Pour des cellules aussi gluco-dépendantes que sont les neurones, elle joue ainsi un rôle primordial. Cette protéine existe sous trois isoformes: la PFK du cerveau PFKC, la PFK du muscle PFKM, et la PFK du foie PFKL ; et les trois sont exprimées au niveau cérébral.

À ce jour, le fonctionnement métabolique des cerveaux malades est encore peu compris. Cependant, il est globalement observé qu'une baisse de la consommation glucidique survient dans les cellules cérébrales

des patients Alzheimer, autant dans les cas sporadiques que dans la forme familiale; et que celle-ci survient majoritairement dans les régions du cortex frontal et pariétal (183-185). La mesure du niveau d'expression de nombreuses enzymes du métabolisme a été évalué, et il est notable que celui-ci varie considérablement lors de la mise en place de la maladie (186). On retiendra essentiellement une baisse de l'activité de la Glucose-6-phosphate déshydrogénase de la voie des pentoses phosphates, contre une augmentation de l'activité des enzymes Lactate déshydrogénase, PFK et de la Pyruvate kinase, toutes trois impliquées dans la glycolyse. Parallèlement à cette hausse, une augmentation de la protéine acide fibrillaire gliale « GFAP », marqueur spécifique des astrocytes a été de nombreuses fois reportée. Cette observation a alors poussé l'étude spécifique de ces cellules, et a permis de formuler une toute nouvelle hypothèse sur les changements métaboliques observés dans les cerveaux des patients Alzheimer. Tout d'abord, il a été observé que les astrocytes avaient la capacité d'intégrer les peptides A β , et qu'elles possédaient, comparativement aux neurones, une plus forte résistance à leur toxicité (187, 188). Une étude a ensuite comparé les mécanismes bioénergétiques de réponse au stress de neurones et d'astrocytes, suite à leur exposition à l'oxyde nitrique, connue pour inhiber la respiration mitochondriale. Sous de telles conditions, les neurones présentent un effondrement de leur potentiel mitochondrial, une baisse importante de leur production d'ATP, le tout suivi d'une dégénérescence accrue. Au contraire, les astrocytes augmentent leur production d'ATP par glycolyse, et maintiennent leur potentiel mitochondrial (189). De telles observations ont pu être expliquées par la présence de PFKFB3, un activateur puissant de la PFK fortement retrouvé dans les astrocytes mais quasi absent au sein des neurones (190). Ainsi, la baisse de consommation de glucose cérébrale observée chez les patients Alzheimer serait le fruit d'une dégénérescence neuronale accrue, et l'activation des enzymes métaboliques telles que la PFK serait une conséquence de la réponse astrocytaire à l'augmentation de facteurs de stress, permettant la recapture des peptides A β .

Basé sur de telles observations, il serait désormais possible d'imaginer une fonction de l'interaction entre PS1 et PFKM, si celle-ci s'avère véritable. En effet, dans le cas où PS1 permettrait la stabilisation de PFK et facilitant ainsi son activation par la PFKFB3, il serait possible qu'une mutation de PS1 inhibe l'activation de PFK au sein des astrocytes, inhibant en même temps la protection contre le stress oxydatif qu'ils offrent aux neurones. Dans le cadre de la FAD, une telle hypothèse expliquerait la caractéristique précoce et agressive de l'évolution de la maladie.

5 Conclusions et perspectives

La pathologie d'Alzheimer possède une prévalence grandissante mais les mécanismes de sa mise en place restent encore un mystère. Bien que l'hypothèse de la cascade amyloïde et l'analyse des signes neuropathologiques typiques aient nourri la recherche pendant ces 30 dernières années, leur étude ne suffit pas à expliquer l'ensemble des cas observés. C'est l'observation d'un phénotype sévère survenant chez des personnes jeunes, et l'absence de signes neuropathologiques liés à un dépôt d'amyloïde ou une hyperphosphorylation de tau chez certains patients; qui ont amené notre équipe à se questionner sur l'existence de voies parallèles qui justifieraient les caractéristiques agressives de la FAD. Dans 60%, c'est une mutation de la préséniline 1 qui est responsable de la mise en place de la pathologie. Quelque soit l'acide aminé touché, les 221 mutations recensées à ce jour sont capables d'induire la maladie d'Alzheimer, avec des symptômes neuropathologiques, des signes cliniques, et une sévérité de progression différant pour chacune. Plusieurs études de doubles hybrides ont été effectuées au sein de ce laboratoire, et partout autour du monde, afin de tenter de comprendre la raison pour laquelle PS1 est primordiale à la survie neuronale. Pour la première fois, nous avons utilisé la préséniline 1 dans sa forme pleine longueur, et ainsi physiologiquement associée aux membranes cellulaires, dans le cadre d'un criblage par double hybride en levure. L'ensemble des résultats acquis nous provenant de cette technique, il serait à présent nécessaire de les confirmer lors d'expériences de co-immunoprécipitation en cellules humaines.

Bien que les résultats acquis soient considérés comme préliminaires, ceux-ci nous ont permis d'explorer de nouveaux champs d'étude de l'implication de PS1 dans la pathologie d'Alzheimer. Nous avons ainsi émis un certain nombre d'hypothèses, basées sur l'observation des nombreux rôles attribués à PS1 dans la littérature, et qu'il serait intéressant de conforter dans le futur grâce à l'étude des différentes protéines identifiées.

L'étude des protéines CETN2 et DSS1 semble particulièrement intéressante, par le fait que les deux protéines identifiées de manière indépendante lors des criblages fassent en vérité parti d'un même complexe, TREX2. Ainsi, il serait primordial de vérifier si les interactions de ces deux protéines avec PS1 sont reproductibles en cellule humaine HEK 293T, grâce à des expériences de co-immunoprécipitations. Par ailleurs, il serait intéressant d'appliquer cette expérience concernant les autres partenaires du complexe TREX2, GANP et ENY2. Il en va de même pour la protéine Ku80, dont le rôle est essentiellement lié à la réparation de l'ADN, et qui se trouve en complexe avec Ku70 au moins, au sein du noyau. Si chacune de ces

interactions est confirmée, il serait intéressant de procéder à des études plus approfondies afin de comprendre par quel moyen PS1 influencerait ses partenaires à effectuer une réparation correcte de l'ADN ou une exportation des ARNm vers le cytoplasme efficace.

Concernant la protéine DOK5, il serait intéressant de vérifier si elle serait toujours en mesure d'accomplir son rôle de transmission de signal suite à l'expression cellulaire d'un variant muté de PS1. De même, il serait primordial de vérifier le rôle exact que jouerait PS1 dans le métabolisme protéique, nucléotidique et glucidique, suite à ses interactions avec les protéines RPL6, PRPSAP2 et PFKM respectivement. La connaissance de nouvelles fonctions exercées par PS1 au sein de différentes voies cellulaires pourrait ainsi apporter de nouveaux éléments de réponse, qui peut être constitueront le premier pas vers une meilleure compréhension de la maladie d'Alzheimer.

Bibliographie

1. Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat* 1995;8(6):429-431.
2. Berchtold NC, Cotman CW. Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-Roman period to the 1960s. *Neurobiol Aging* 1998;19(3):173-189.
3. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;120(3):885-890.
4. Qiu C, Kivipelto M, von Strauss E. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin Neurosci* 2009;11(2):111-128.
5. Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S, Fiske A, Pedersen NL. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry* 2006;63(2):168-174.
6. Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrand P, Gauthier S. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 1993;342(8873):697-699.
7. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(5):1977-1981.
8. Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak-Vance MA, Goldgaber D, Roses AD. Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(20):9649-9653.
9. Wisniewski T, Frangione B. Apolipoprotein E: a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid. *Neurosci Lett* 1992;135(2):235-238.
10. Carter DB. The interaction of amyloid-beta with ApoE. *Subcell Biochem* 2005;38:255-272.
11. Verghese PB, Castellano JM, Garai K, Wang Y, Jiang H, Shah A, Bu G, Frieden C, Holtzman DM. ApoE influences amyloid-beta (Abeta) clearance despite minimal apoE/Abeta association in physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(19):E1807-1816.
12. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, *et al.* Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 1995;375(6534):754-760.
13. <http://www.alzforum.org>.
14. Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T, *et al.* Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 1995;376(6543):775-778.
15. Roberson ED, Mucke L. 100 years and counting: prospects for defeating Alzheimer's disease. *Science* 2006;314(5800):781-784.
16. Haley WE. The family caregiver's role in Alzheimer's disease. *Neurology* 1997;48(5 Suppl 6):S25-29.
17. Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ. Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 1992;360(6405):672-674.
18. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82(12):4245-4249.
19. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 1992;256(5054):184-185.
20. Sandbrink R, Masters CL, Beyreuther K. APP gene family. Alternative splicing generates functionally related isoforms. *Ann N Y Acad Sci* 1996;777:281-287.
21. J.L Price JCM. So what if tangles precede plaques? *Neurobiol Aging* 2004;25(6):721-723.
22. Suphioglu JRaC. Dropping the BACE: Beta Secretase (BACE1) as an Alzheimer's Disease Intervention. *Neurodegenerative Diseases* 2013.

23. Cao X, Sudhof TC. A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 2001;293(5527):115-120.
24. Zambrano N, Minopoli G, de Candia P, Russo T. The Fe65 adaptor protein interacts through its PID1 domain with the transcription factor CP2/LSF/LBP1. *J Biol Chem* 1998;273(32):20128-20133.
25. Muller T, Concannon CG, Ward MW, Walsh CM, Tirniceriu AL, Tribl F, Kogel D, Prehn JH, Egensperger R. Modulation of gene expression and cytoskeletal dynamics by the amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). *Mol Biol Cell* 2007;18(1):201-210.
26. Alves da Costa C, Sunyach C, Pardossi-Piquard R, Sevalle J, Vincent B, Boyer N, Kawarai T, Girardot N, St George-Hyslop P, Checler F. Presenilin-dependent gamma-secretase-mediated control of p53-associated cell death in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2006;26(23):6377-6385.
27. Araki W, Kitaguchi N, Tokushima Y, Ishii K, Aratake H, Shimohama S, Nakamura S, Kimura J. Trophic effect of beta-amyloid precursor protein on cerebral cortical neurons in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;181(1):265-271.
28. Mattson MP, Cheng B, Culwell AR, Esch FS, Lieberburg I, Rydel RE. Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron* 1993;10(2):243-254.
29. Furukawa K, Sopher BL, Rydel RE, Begley JG, Pham DG, Martin GM, Fox M, Mattson MP. Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J Neurochem* 1996;67(5):1882-1896.
30. Murphy MP, LeVine H, 3rd. Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. *J Alzheimers Dis* 2010;19(1):311-323.
31. Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, Prada CM, Kim G, Seekins S, Yager D, Slunt HH, Wang R, Seeger M, Levey AI, Gandy SE, *et al.* Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate A β 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 1996;17(5):1005-1013.
32. Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J, Hutton M, Buee L, Harigaya Y, Yager D, Morgan D, Gordon MN, Holcomb L, Refolo L, Zenk B, *et al.* Increased amyloid-beta₄₂(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 1996;383(6602):710-713.
33. Xia W, Zhang J, Perez R, Koo EH, Selkoe DJ. Interaction between amyloid precursor protein and presenilins in mammalian cells: implications for the pathogenesis of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(15):8208-8213.
34. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 2001;81(2):741-766.
35. Cummings BJ, Pike CJ, Shankle R, Cotman CW. Beta-amyloid deposition and other measures of neuropathology predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1996;17(6):921-933.
36. Geula C, Wu CK, Saroff D, Lorenzo A, Yuan M, Yankner BA. Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity. *Nat Med* 1998;4(7):827-831.
37. Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y. Visualization of A β 42(43) and A β 40 in senile plaques with end-specific A β monoclonals: evidence that an initially deposited species is A β 42(43). *Neuron* 1994;13(1):45-53.
38. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, *et al.* Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2000;21(3):383-421.
39. Weiner HL, Frenkel D. Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Nat Rev Immunol* 2006;6(5):404-416.
40. Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(11):6448-6453.
41. Kim HC, Yamada K, Nitta A, Olariu A, Tran MH, Mizuno M, Nakajima A, Nagai T, Kamei H, Jhoo WK, Im DH, Shin EJ, Hjelle OP, Ottersen OP, Park SC, *et al.* Immunocytochemical evidence that amyloid beta (1-42) impairs endogenous antioxidant systems in vivo. *Neuroscience* 2003;119(2):399-419.

42. Huang X, Atwood CS, Moir RD, Hartshorn MA, Vonsattel JP, Tanzi RE, Bush AI. Zinc-induced Alzheimer's Abeta1-40 aggregation is mediated by conformational factors. *J Biol Chem* 1997;272(42):26464-26470.
43. Chauhan V, Chauhan A. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Pathophysiology* 2006;13(3):195-208.
44. Pratico D. Evidence of oxidative stress in Alzheimer's disease brain and antioxidant therapy: lights and shadows. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1147:70-78.
45. Reddy PH. Amyloid precursor protein-mediated free radicals and oxidative damage: implications for the development and progression of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2006;96(1):1-13.
46. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 2000;403(6765):98-103.
47. Goedert M, Wischik CM, Crowther RA, Walker JE, Klug A. Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(11):4051-4055.
48. Gray EG, Paula-Barbosa M, Roher A. Alzheimer's disease: paired helical filaments and cytomembranes. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1987;13(2):91-110.
49. Kril JJ, Patel S, Harding AJ, Halliday GM. Neuron loss from the hippocampus of Alzheimer's disease exceeds extracellular neurofibrillary tangle formation. *Acta Neuropathol* 2002;103(4):370-376.
50. Kuhn PH, Wang H, Dislich B, Colombo A, Zeitschel U, Ellwart JW, Kremmer E, Rossner S, Lichtenthaler SF. ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J* 2010;29(17):3020-3032.
51. Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(7):3922-3927.
52. Asai M, Hattori C, Szabo B, Sasagawa N, Maruyama K, Tanuma S, Ishiura S. Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;301(1):231-235.
53. Sisodia SS. Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(13):6075-6079.
54. Ikezu T, Trapp BD, Song KS, Schlegel A, Lisanti MP, Okamoto T. Caveolae, plasma membrane microdomains for alpha-secretase-mediated processing of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 1998;273(17):10485-10495.
55. Kuentzel SL, Ali SM, Altman RA, Greenberg BD, Raub TJ. The Alzheimer beta-amyloid protein precursor/protease nexin-II is cleaved by secretase in a trans-Golgi secretory compartment in human neuroglioma cells. *Biochem J* 1993;295 (Pt 2):367-378.
56. Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, *et al.* Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 1999;286(5440):735-741.
57. Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J, Jacobson-Croak K, Jewett N, Keim P, Knops J, Lieberburg I, *et al.* Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 1999;402(6761):537-540.
58. Creemers JW, Ines Dominguez D, Plets E, Serneels L, Taylor NA, Multhaup G, Craessaerts K, Annaert W, De Strooper B. Processing of beta-secretase by furin and other members of the proprotein convertase family. *J Biol Chem* 2001;276(6):4211-4217.
59. Hartmann T, Bieger SC, Bruhl B, Tienari PJ, Ida N, Allsop D, Roberts GW, Masters CL, Dotti CG, Unsicker K, Beyreuther K. Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides. *Nat Med* 1997;3(9):1016-1020.
60. Cook DG, Forman MS, Sung JC, Leight S, Kolson DL, Iwatsubo T, Lee VM, Doms RW. Alzheimer's A beta(1-42) is generated in the endoplasmic reticulum/intermediate compartment of NT2N cells. *Nat Med* 1997;3(9):1021-1023.

61. Ehehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol* 2003;160(1):113-123.
62. Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* 1992;1(5):345-347.
63. Luo Y, Bolon B, Kahn S, Bennett BD, Babu-Khan S, Denis P, Fan W, Kha H, Zhang J, Gong Y, Martin L, Louis JC, Yan Q, Richards WG, Citron M, *et al.* Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat Neurosci* 2001;4(3):231-232.
64. Wong HK, Sakurai T, Oyama F, Kaneko K, Wada K, Miyazaki H, Kurosawa M, De Strooper B, Saftig P, Nukina N. beta Subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE1) and gamma-secretase. *J Biol Chem* 2005;280(24):23009-23017.
65. Hu X, Hicks CW, He W, Wong P, Macklin WB, Trapp BD, Yan R. Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat Neurosci* 2006;9(12):1520-1525.
66. Yu G, Nishimura M, Arawaka S, Levitan D, Zhang L, Tandon A, Song YQ, Rogaeva E, Chen F, Kawarai T, Supala A, Levesque L, Yu H, Yang DS, Holmes E, *et al.* Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature* 2000;407(6800):48-54.
67. Goutte C, Tsunozaki M, Hale VA, Priess JR. APH-1 is a multipass membrane protein essential for the Notch signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(2):775-779.
68. Francis R, McGrath G, Zhang J, Ruddy DA, Sym M, Apfeld J, Nicoll M, Maxwell M, Hai B, Ellis MC, Parks AL, Xu W, Li J, Gurney M, Myers RL, *et al.* aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell* 2002;3(1):85-97.
69. Haass C, Steiner H. Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases. *Trends Cell Biol* 2002;12(12):556-562.
70. Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT, Selkoe DJ. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 1999;398(6727):513-517.
71. Baumann K, Paganetti PA, Sturchler-Pierrat C, Wong C, Hartmann H, Cescato R, Frey P, Yankner BA, Sommer B, Staufenbiel M. Distinct processing of endogenous and overexpressed recombinant presenilin 1. *Neurobiol Aging* 1997;18(2):181-189.
72. Thinakaran G, Harris CL, Ratovitski T, Davenport F, Slunt HH, Price DL, Borchelt DR, Sisodia SS. Evidence that levels of presenilins (PS1 and PS2) are coordinately regulated by competition for limiting cellular factors. *J Biol Chem* 1997;272(45):28415-28422.
73. Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesold B, Steiner H, Haass C. Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol* 2003;5(5):486-488.
74. Kimberly WT, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, Ye W, Wolfe MS, Selkoe DJ. Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(11):6382-6387.
75. LaVoie MJ, Fraering PC, Ostaszewski BL, Ye W, Kimberly WT, Wolfe MS, Selkoe DJ. Assembly of the gamma-secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin. *J Biol Chem* 2003;278(39):37213-37222.
76. Gu Y, Chen F, Sanjo N, Kawarai T, Hasegawa H, Duthie M, Li W, Ruan X, Luthra A, Mount HT, Tandon A, Fraser PE, St George-Hyslop P. APH-1 interacts with mature and immature forms of presenilins and nicastrin and may play a role in maturation of presenilin.nicastrin complexes. *J Biol Chem* 2003;278(9):7374-7380.
77. Luo WJ, Wang H, Li H, Kim BS, Shah S, Lee HJ, Thinakaran G, Kim TW, Yu G, Xu H. PEN-2 and APH-1 coordinately regulate proteolytic processing of presenilin 1. *J Biol Chem* 2003;278(10):7850-7854.
78. Edbauer D, Winkler E, Haass C, Steiner H. Presenilin and nicastrin regulate each other and determine amyloid beta-peptide production via complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(13):8666-8671.
79. Tomita T, Katayama R, Takikawa R, Iwatsubo T. Complex N-glycosylated form of nicastrin is stabilized and selectively bound to presenilin fragments. *FEBS Lett* 2002;520(1-3):117-121.

80. Wolfe MS. Intramembrane-cleaving proteases. *J Biol Chem* 2009;284(21):13969-13973.
81. Lee MK, Slunt HH, Martin LJ, Thinakaran G, Kim G, Gandy SE, Seeger M, Koo E, Price DL, Sisodia SS. Expression of presenilin 1 and 2 (PS1 and PS2) in human and murine tissues. *J Neurosci* 1996;16(23):7513-7525.
82. Kovacs DM, Fausett HJ, Page KJ, Kim TW, Moir RD, Merriam DE, Hollister RD, Hallmark OG, Mancini R, Felsenstein KM, Hyman BT, Tanzi RE, Wasco W. Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nat Med* 1996;2(2):224-229.
83. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 1995;269(5226):973-977.
84. Tomita T, Maruyama K, Saido TC, Kume H, Shinozaki K, Tokuhira S, Capell A, Walter J, Grunberg J, Haass C, Iwatsubo T, Obata K. The presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer disease (Volga German families) increases the secretion of amyloid beta protein ending at the 42nd (or 43rd) residue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(5):2025-2030.
85. Herreman A, Hartmann D, Annaert W, Saftig P, Craessaerts K, Serneels L, Umans L, Schrijvers V, Checler F, Vanderstichele H, Baekelandt V, Dressel R, Cupers P, Huylebroeck D, Zwijsen A, et al. Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(21):11872-11877.
86. Takashima A, Sato M, Mercken M, Tanaka S, Kondo S, Honda T, Sato K, Murayama M, Noguchi K, Nakazato Y, Takahashi H. Localization of Alzheimer-associated presenilin 1 in transfected COS-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;227(2):423-426.
87. Doan A, Thinakaran G, Borchelt DR, Slunt HH, Ratovitsky T, Podlisny M, Selkoe DJ, Seeger M, Gandy SE, Price DL, Sisodia SS. Protein topology of presenilin 1. *Neuron* 1996;17(5):1023-1030.
88. Oh YS, Turner RJ. Topology of the C-terminal fragment of human presenilin 1. *Biochemistry* 2005;44(35):11821-11828.
89. Laudon H, Hansson EM, Melen K, Bergman A, Farmery MR, Winblad B, Lendahl U, von Heijne G, Naslund J. A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1. *J Biol Chem* 2005;280(42):35352-35360.
90. Brunkan AL, Martinez M, Walker ES, Goate AM. Presenilin endoproteolysis is an intramolecular cleavage. *Mol Cell Neurosci* 2005;29(1):65-73.
91. Takasugi N, Tomita T, Hayashi I, Tsuruoka M, Niimura M, Takahashi Y, Thinakaran G, Iwatsubo T. The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature* 2003;422(6930):438-441.
92. Seeger M, Nordstedt C, Petanceska S, Kovacs DM, Gouras GK, Hahne S, Fraser P, Levesque L, Czernik AJ, George-Hyslop PS, Sisodia SS, Thinakaran G, Tanzi RE, Greengard P, Gandy S. Evidence for phosphorylation and oligomeric assembly of presenilin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(10):5090-5094.
93. Gomez-Tortosa E, Barquero S, Baron M, Gil-Neciga E, Castellanos F, Zurdo M, Manzano S, Munoz DG, Jimenez-Huete A, Rabano A, Sainz MJ, Guerrero R, Gobernado I, Perez-Perez J, Jimenez-Escrig A. Clinical-genetic correlations in familial Alzheimer's disease caused by presenilin 1 mutations. *J Alzheimers Dis* 2010;19(3):873-884.
94. Gomez-Isla T, Growdon WB, McNamara MJ, Nochlin D, Bird TD, Arango JC, Lopera F, Kosik KS, Lantos PL, Cairns NJ, Hyman BT. The impact of different presenilin 1 and presenilin 2 mutations on amyloid deposition, neurofibrillary changes and neuronal loss in the familial Alzheimer's disease brain: evidence for other phenotype-modifying factors. *Brain* 1999;122 (Pt 9):1709-1719.
95. Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, Larson E, Levy-Lahad E, Viitanen M, Peskind E, Poorkaj P, et al. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 1996;2(8):864-870.
96. Citron M, Westaway D, Xia W, Carlson G, Diehl T, Levesque G, Johnson-Wood K, Lee M, Seubert P, Davis A, Kholodenko D, Motter R, Sherrington R, Perry B, Yao H, et al. Mutant presenilins of Alzheimer's

disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med* 1997;3(1):67-72.

97. Bentahir M, Nyabi O, Verhamme J, Tolia A, Horre K, Wiltfang J, Esselmann H, De Strooper B. Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms. *J Neurochem* 2006;96(3):732-742.

98. Shioi J, Georgakopoulos A, Mehta P, Kouchi Z, Litterst CM, Baki L, Robakis NK. FAD mutants unable to increase neurotoxic Abeta 42 suggest that mutation effects on neurodegeneration may be independent of effects on Abeta. *J Neurochem* 2007;101(3):674-681.

99. Rogaev EI, Sherrington R, Wu C, Levesque G, Liang Y, Rogaeva EA, Ikeda M, Holman K, Lin C, Lukiw WJ, de Jong PJ, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop P. Analysis of the 5' sequence, genomic structure, and alternative splicing of the presenilin-1 gene (PSEN1) associated with early onset Alzheimer disease. *Genomics* 1997;40(3):415-424.

100. Perez-Tur J, Froelich S, Prihar G, Crook R, Baker M, Duff K, Wragg M, Busfield F, Lendon C, Clark RF, et al. A mutation in Alzheimer's disease destroying a splice acceptor site in the presenilin-1 gene. *Neuroreport* 1995;7(1):297-301.

101. Thinakaran G, Borchelt DR, Lee MK, Slunt HH, Spitzer L, Kim G, Ratovitsky T, Davenport F, Nordstedt C, Seeger M, Hardy J, Levey AI, Gandy SE, Jenkins NA, Copeland NG, et al. Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron* 1996;17(1):181-190.

102. Ratovitski T, Slunt HH, Thinakaran G, Price DL, Sisodia SS, Borchelt DR. Endoproteolytic processing and stabilization of wild-type and mutant presenilin. *J Biol Chem* 1997;272(39):24536-24541.

103. Fraser PE, Levesque G, Yu G, Mills LR, Thirlwell J, Frantseva M, Gandy SE, Seeger M, Carlen PL, St George-Hyslop P. Presenilin 1 is actively degraded by the 26S proteasome. *Neurobiol Aging* 1998;19(1 Suppl):S19-21.

104. Mehta ND, Refolo LM, Eckman C, Sanders S, Yager D, Perez-Tur J, Younkin S, Duff K, Hardy J, Hutton M. Increased Abeta42(43) from cell lines expressing presenilin 1 mutations. *Ann Neurol* 1998;43(2):256-258.

105. Steiner H, Romig H, Grim MG, Philipp U, Pesold B, Citron M, Baumeister R, Haass C. The biological and pathological function of the presenilin-1 Deltaexon 9 mutation is independent of its defect to undergo proteolytic processing. *J Biol Chem* 1999;274(12):7615-7618.

106. Levitan D, Greenwald I. Facilitation of lin-12-mediated signalling by sel-12, a *Caenorhabditis elegans* S182 Alzheimer's disease gene. *Nature* 1995;377(6547):351-354.

107. Shen J, Bronson RT, Chen DF, Xia W, Selkoe DJ, Tonegawa S. Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell* 1997;89(4):629-639.

108. Wong PC, Zheng H, Chen H, Becher MW, Sirinathsinghji DJ, Trumbauer ME, Chen HY, Price DL, Van der Ploeg LH, Sisodia SS. Presenilin 1 is required for Notch1 and Dll1 expression in the paraxial mesoderm. *Nature* 1997;387(6630):288-292.

109. Berezovska O, Xia MQ, Page K, Wasco W, Tanzi RE, Hyman BT. Developmental regulation of presenilin mRNA expression parallels notch expression. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997;56(1):40-44.

110. Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, Doedens JR, Cumano A, Roux P, Black RA, Israel A. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell* 2000;5(2):207-216.

111. Wen C, Metzstein MM, Greenwald I. SUP-17, a *Caenorhabditis elegans* ADAM protein related to *Drosophila* KUZBANIAN, and its role in LIN-12/NOTCH signalling. *Development* 1997;124(23):4759-4767.

112. De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V, Wolfe MS, Ray WJ, Goate A, Kopan R. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 1999;398(6727):518-522.

113. Rangarajan A, Talora C, Okuyama R, Nicolas M, Mammucari C, Oh H, Aster JC, Krishna S, Metzger D, Chambon P, Miele L, Aguet M, Radtke F, Dotto GP. Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO J* 2001;20(13):3427-3436.

114. Davis RL, Turner DL. Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene* 2001;20(58):8342-8357.

115. Bailey AM, Posakony JW. Suppressor of hairless directly activates transcription of enhancer of split complex genes in response to Notch receptor activity. *Genes Dev* 1995;9(21):2609-2622.
116. Radtke F, Raj K. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat Rev Cancer* 2003;3(10):756-767.
117. Rio C, Buxbaum JD, Peschon JJ, Corfas G. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme is required for cleavage of erbB4/HER4. *J Biol Chem* 2000;275(14):10379-10387.
118. Ni CY, Murphy MP, Golde TE, Carpenter G. gamma -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Science* 2001;294(5549):2179-2181.
119. Sardi SP, Murtie J, Koirala S, Patten BA, Corfas G. Presenilin-dependent ErbB4 nuclear signaling regulates the timing of astrogenesis in the developing brain. *Cell* 2006;127(1):185-197.
120. Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J, Nusse R. A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. *Nature* 1996;382(6588):225-230.
121. Lu W, Yamamoto V, Ortega B, Baltimore D. Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth. *Cell* 2004;119(1):97-108.
122. Keeble TR, Halford MM, Seaman C, Kee N, Macheda M, Anderson RB, Stacker SA, Cooper HM. The Wnt receptor Ryk is required for Wnt5a-mediated axon guidance on the contralateral side of the corpus callosum. *J Neurosci* 2006;26(21):5840-5848.
123. Schmitt AM, Shi J, Wolf AM, Lu CC, King LA, Zou Y. Wnt-Ryk signalling mediates medial-lateral retinotectal topographic mapping. *Nature* 2006;439(7072):31-37.
124. Katso RM, Russell RB, Ganesan TS. Functional analysis of H-Ryk, an atypical member of the receptor tyrosine kinase family. *Mol Cell Biol* 1999;19(9):6427-6440.
125. Lyu J, Yamamoto V, Lu W. Cleavage of the Wnt receptor Ryk regulates neuronal differentiation during cortical neurogenesis. *Dev Cell* 2008;15(5):773-780.
126. Wouda RR, Bansraj MR, de Jong AW, Noordermeer JN, Fradkin LG. Src family kinases are required for WNT5 signaling through the Derailed/Ryk receptor in the Drosophila embryonic central nervous system. *Development* 2008;135(13):2277-2287.
127. Raurell I, Castano J, Franci C, Garcia de Herreros A, Dunach M. Presenilin-1 interacts with plakoglobin and enhances plakoglobin-Tcf-4 association. Implications for the regulation of beta-catenin/Tcf-4-dependent transcription. *J Biol Chem* 2006;281(3):1401-1411.
128. Levesque G, Yu G, Nishimura M, Zhang DM, Levesque L, Yu H, Xu D, Liang Y, Rogueva E, Ikeda M, Duthie M, Murgolo N, Wang L, VanderVere P, Bayne ML, *et al.* Presenilins interact with armadillo proteins including neural-specific plakophilin-related protein and beta-catenin. *J Neurochem* 1999;72(3):999-1008.
129. Koutras C, Lessard CB, Levesque G. A nuclear function for the presenilin 1 neuronal partner NPRAP/delta-catenin. *J Alzheimers Dis* 2011;27(2):307-316.
130. Johnsson N, Varshavsky A. Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(22):10340-10344.
131. Snider J, Kittanakom S, Curak J, Stagljar I. Split-ubiquitin based membrane yeast two-hybrid (MYTH) system: a powerful tool for identifying protein-protein interactions. *J Vis Exp* 2010(36).
132. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979;7(6):1513-1523.
133. Woodruff G, Young JE, Martinez FJ, Buen F, Gore A, Kinaga J, Li Z, Yuan SH, Zhang K, Goldstein LS. The presenilin-1 DeltaE9 mutation results in reduced gamma-secretase activity, but not total loss of PS1 function, in isogenic human stem cells. *Cell Rep* 2013;5(4):974-985.
134. Takashima A, Murayama M, Murayama O, Kohno T, Honda T, Yasutake K, Nihonmatsu N, Mercken M, Yamaguchi H, Sugihara S, Wolozin B. Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(16):9637-9641.
135. Salisbury JL, Suino KM, Busby R, Springett M. Centrin-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. *Curr Biol* 2002;12(15):1287-1292.

136. Araki M, Masutani C, Takemura M, Uchida A, Sugasawa K, Kondoh J, Ohkuma Y, Hanaoka F. Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair. *J Biol Chem* 2001;276(22):18665-18672.
137. Resendes KK, Rasala BA, Forbes DJ. Centrin 2 localizes to the vertebrate nuclear pore and plays a role in mRNA and protein export. *Mol Cell Biol* 2008;28(5):1755-1769.
138. Lu Q, Tang X, Tian G, Wang F, Liu K, Nguyen V, Kohalmi SE, Keller WA, Tsang EW, Harada JJ, Rothstein SJ, Cui Y. Arabidopsis homolog of the yeast TREX-2 mRNA export complex: components and anchoring nucleoporin. *Plant J* 2010;61(2):259-270.
139. Paraskevopoulos K, Kriegenburg F, Tatham MH, Rosner HI, Medina B, Larsen IB, Brandstrup R, Hardwick KG, Hay RT, Kragelund BB, Hartmann-Petersen R, Gordon C. Dss1 is a 26S proteasome ubiquitin receptor. *Mol Cell* 2014;56(3):453-461.
140. Kristensen CN, Bystol KM, Li B, Serrano L, Brennehan MA. Depletion of DSS1 protein disables homologous recombinational repair in human cells. *Mutat Res* 2010;694(1-2):60-64.
141. Bhatia V, Barroso SI, Garcia-Rubio ML, Tumini E, Herrera-Moyano E, Aguilera A. BRCA2 prevents R-loop accumulation and associates with TREX-2 mRNA export factor PCID2. *Nature* 2014;511(7509):362-365.
142. Selvanathan SP, Thakurta AG, Dhakshnamoorthy J, Zhou M, Veenstra TD, Dhar R. *Schizosaccharomyces pombe* Dss1p is a DNA damage checkpoint protein that recruits Rad24p, Cdc25p, and Rae1p to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 2010;285(19):14122-14133.
143. Liang F, Romanienko PJ, Weaver DT, Jeggo PA, Jasin M. Chromosomal double-strand break repair in Ku80-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(17):8929-8933.
144. Gao Y, Sun Y, Frank KM, Dikkes P, Fujiwara Y, Seidl KJ, Sekiguchi JM, Rathbun GA, Swat W, Wang J, Bronson RT, Malynn BA, Bryans M, Zhu C, Chaudhuri J, *et al.* A critical role for DNA end-joining proteins in both lymphogenesis and neurogenesis. *Cell* 1998;95(7):891-902.
145. Harman D. Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1067:10-21.
146. Lu T, Pan Y, Kao SY, Li C, Kohane I, Chan J, Yankner BA. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature* 2004;429(6994):883-891.
147. Supnet C, Bezprozvanny I. Presenilins as endoplasmic reticulum calcium leak channels and Alzheimer's disease pathogenesis. *Sci China Life Sci* 2011;54(8):744-751.
148. Sepulveda-Falla D, Barrera-Ocampo A, Hagel C, Korwitz A, Vinueza-Veloz MF, Zhou K, Schonewille M, Zhou H, Velazquez-Perez L, Rodriguez-Labrada R, Villegas A, Ferrer I, Lopera F, Langer T, De Zeeuw CI, *et al.* Familial Alzheimer's disease-associated presenilin-1 alters cerebellar activity and calcium homeostasis. *J Clin Invest* 2014;124(4):1552-1567.
149. Scudiero DA, Polinsky RJ, Brumback RA, Tarone RE, Nee LE, Robbins JH. Alzheimer disease fibroblasts are hypersensitive to the lethal effects of a DNA-damaging chemical. *Mutat Res* 1986;159(1-2):125-131.
150. Wang J, Markesbery WR, Lovell MA. Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in mild cognitive impairment. *J Neurochem* 2006;96(3):825-832.
151. Mullaart E, Boerrigter ME, Ravid R, Swaab DF, Vijg J. Increased levels of DNA breaks in cerebral cortex of Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging* 1990;11(3):169-173.
152. Levey A, Lah J, Goldstein F, Steenland K, Bliwise D. Mild cognitive impairment: an opportunity to identify patients at high risk for progression to Alzheimer's disease. *Clin Ther* 2006;28(7):991-1001.
153. Weissman L, Jo DG, Sorensen MM, de Souza-Pinto NC, Markesbery WR, Mattson MP, Bohr VA. Defective DNA base excision repair in brain from individuals with Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. *Nucleic Acids Res* 2007;35(16):5545-5555.
154. Shao C, Xiong S, Li GM, Gu L, Mao G, Markesbery WR, Lovell MA. Altered 8-oxoguanine glycosylase in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease brain. *Free Radic Biol Med* 2008;45(6):813-819.
155. Li J, Xu M, Zhou H, Ma J, Potter H. Alzheimer presenilins in the nuclear membrane, interphase kinetochores, and centrosomes suggest a role in chromosome segregation. *Cell* 1997;90(5):917-927.

156. Michelsen KA, Korr H, Steinbusch HW, Schmitz C. Presenilin 1-related alterations in DNA integrity in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res* 2010;1316:139-144.
157. Silva AR, Santos AC, Farfel JM, Grinberg LT, Ferretti RE, Campos AH, Cunha IW, Begnami MD, Rocha RM, Carraro DM, de Braganca Pereira CA, Jacob-Filho W, Brentani H. Repair of oxidative DNA damage, cell-cycle regulation and neuronal death may influence the clinical manifestation of Alzheimer's disease. *PLoS One* 2014;9(6):e99897.
158. Kaja S, Sumien N, Shah VV, Puthawala I, Maynard AN, Khullar N, Payne AJ, Forster MJ, Koulen P. Loss of Spatial Memory, Learning, and Motor Function During Normal Aging Is Accompanied by Changes in Brain Presenilin 1 and 2 Expression Levels. *Mol Neurobiol* 2014.
159. Lee HG, Casadesus G, Zhu X, Castellani RJ, McShea A, Perry G, Petersen RB, Bajic V, Smith MA. Cell cycle re-entry mediated neurodegeneration and its treatment role in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 2009;54(2):84-88.
160. Yang Y, Mufson EJ, Herrup K. Neuronal cell death is preceded by cell cycle events at all stages of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2003;23(7):2557-2563.
161. Zhu X, Lee HG, Perry G, Smith MA. Alzheimer disease, the two-hit hypothesis: an update. *Biochim Biophys Acta* 2007;1772(4):494-502.
162. Vincent I, Zheng JH, Dickson DW, Kress Y, Davies P. Mitotic phosphoepitopes precede paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1998;19(4):287-296.
163. Park KH, Hallows JL, Chakrabarty P, Davies P, Vincent I. Conditional neuronal simian virus 40 T antigen expression induces Alzheimer-like tau and amyloid pathology in mice. *J Neurosci* 2007;27(11):2969-2978.
164. Zhu X, Siedlak SL, Wang Y, Perry G, Castellani RJ, Cohen ML, Smith MA. Neuronal binucleation in Alzheimer disease hippocampus. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2008;34(4):457-465.
165. Yang Y, Geldmacher DS, Herrup K. DNA replication precedes neuronal cell death in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2001;21(8):2661-2668.
166. Malik B, Currais A, Andres A, Towilson C, Pitsi D, Nunes A, Niblock M, Cooper J, Hortobagyi T, Soriano S. Loss of neuronal cell cycle control as a mechanism of neurodegeneration in the presenilin-1 Alzheimer's disease brain. *Cell Cycle* 2008;7(5):637-646.
167. Bialopiotrowicz E, Szybinska A, Kuzniewska B, Buizza L, Uberti D, Kuznicki J, Wojda U. Highly pathogenic Alzheimer's disease presenilin 1 P117R mutation causes a specific increase in p53 and p21 protein levels and cell cycle dysregulation in human lymphocytes. *J Alzheimers Dis* 2012;32(2):397-415.
168. Raina AK, Zhu X, Rottkamp CA, Monteiro M, Takeda A, Smith MA. Cyclin' toward dementia: cell cycle abnormalities and abortive oncogenesis in Alzheimer disease. *J Neurosci Res* 2000;61(2):128-133.
169. Hinchcliffe EH, Miller FJ, Cham M, Khodjakov A, Sluder G. Requirement of a centrosomal activity for cell cycle progression through G1 into S phase. *Science* 2001;291(5508):1547-1550.
170. Grimm J, Sachs M, Britsch S, Di Cesare S, Schwarz-Romond T, Alitalo K, Birchmeier W. Novel p62dok family members, dok-4 and dok-5, are substrates of the c-Ret receptor tyrosine kinase and mediate neuronal differentiation. *J Cell Biol* 2001;154(2):345-354.
171. Boscia F, Esposito CL, Di Crisci A, de Franciscis V, Annunziato L, Cerchia L. GDNF selectively induces microglial activation and neuronal survival in CA1/CA3 hippocampal regions exposed to NMDA insult through Ret/ERK signalling. *PLoS One* 2009;4(8):e6486.
172. Shi L, Yue J, You Y, Yin B, Gong Y, Xu C, Qiang B, Yuan J, Liu Y, Peng X. Dok5 is substrate of TrkB and TrkC receptors and involved in neurotrophin induced MAPK activation. *Cell Signal* 2006;18(11):1995-2003.
173. Pan Y, Zhang J, Liu W, Shu P, Yin B, Yuan J, Qiang B, Peng X. Dok5 is involved in the signaling pathway of neurotrophin-3 against TrkC-induced apoptosis. *Neurosci Lett* 2013;553:46-51.
174. Ding Q, Markesbery WR, Chen Q, Li F, Keller JN. Ribosome dysfunction is an early event in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2005;25(40):9171-9175.
175. Sajdel-Sulkowska EM, Marotta CA. Alzheimer's disease brain: alterations in RNA levels and in a ribonuclease-inhibitor complex. *Science* 1984;225(4665):947-949.

176. Honda K, Smith MA, Zhu X, Baus D, Merrick WC, Tartakoff AM, Hattier T, Harris PL, Siedlak SL, Fujioka H, Liu Q, Moreira PI, Miller FP, Nunomura A, Shimohama S, *et al.* Ribosomal RNA in Alzheimer disease is oxidized by bound redox-active iron. *J Biol Chem* 2005;280(22):20978-20986.
177. Langstrom NS, Anderson JP, Lindroos HG, Winblad B, Wallace WC. Alzheimer's disease-associated reduction of polysomal mRNA translation. *Brain Res Mol Brain Res* 1989;5(4):259-269.
178. Gamliel A, Teicher C, Michaelson DM, Pradier L, Hartmann T, Beyreuther K, Stein R. Increased expression of presenilin 2 inhibits protein synthesis. *Mol Cell Neurosci* 2002;19(1):111-124.
179. Evans DR, Guy HI. Mammalian pyrimidine biosynthesis: fresh insights into an ancient pathway. *J Biol Chem* 2004;279(32):33035-33038.
180. Gerlach J, Loffler M, Schafer MK. Gene expression of enzymes required for the de novo synthesis and degradation of pyrimidines in rat peripheral tissues and brain. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2011;30(12):1147-1154.
181. Teather LA, Wurtman RJ. Dietary CDP-choline supplementation prevents memory impairment caused by impoverished environmental conditions in rats. *Learn Mem* 2005;12(1):39-43.
182. Saydoff JA, Olariu A, Sheng J, Hu Z, Li Q, Garcia R, Pei J, Sun GY, von Borstel R. Uridine prodrug improves memory in Tg2576 and TAPP mice and reduces pathological factors associated with Alzheimer's disease in related models. *J Alzheimers Dis* 2013;36(4):637-657.
183. Hoyer S, Oesterreich K, Wagner O. Glucose metabolism as the site of the primary abnormality in early-onset dementia of Alzheimer type? *J Neurol* 1988;235(3):143-148.
184. Mielke R, Herholz K, Grond M, Kessler J, Heiss WD. Differences of regional cerebral glucose metabolism between presenile and senile dementia of Alzheimer type. *Neurobiol Aging* 1992;13(1):93-98.
185. Meier-Ruge W, Bertoni-Freddari C, Iwangoff P. Changes in brain glucose metabolism as a key to the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Gerontology* 1994;40(5):246-252.
186. Bigl M, Bruckner MK, Arendt T, Bigl V, Eschrich K. Activities of key glycolytic enzymes in the brains of patients with Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 1999;106(5-6):499-511.
187. Nagele RG, D'Andrea MR, Lee H, Venkataraman V, Wang HY. Astrocytes accumulate A beta 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. *Brain Res* 2003;971(2):197-209.
188. Garwood CJ, Pooler AM, Atherton J, Hanger DP, Noble W. Astrocytes are important mediators of Abeta-induced neurotoxicity and tau phosphorylation in primary culture. *Cell Death Dis* 2011;2:e167.
189. Almeida A, Almeida J, Bolanos JP, Moncada S. Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: the role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(26):15294-15299.
190. Herrero-Mendez A, Almeida A, Fernandez E, Maestre C, Moncada S, Bolanos JP. The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nat Cell Biol* 2009;11(6):747-752.