

MARIE EVE BRAULT

**DÉVELOPPEMENT D'UN ESSAI *IN VIVO* POUR
MESURER L'ACTIVITÉ DE BACE ET SON
IMPLICATION DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en biologie cellulaire et moléculaire
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

AVRIL 2007

Résumé

La protéine BACE (β -site APP Cleaving Enzyme) joue un rôle clé dans la production du peptide amyloïde β ($A\beta$) à l'origine de l'établissement de la maladie d'Alzheimer. À cause de son rôle central dans la maladie, BACE représente une cible potentielle dans le développement de thérapies. Récemment, un premier rôle physiologique pour BACE a été identifié, remettant en doute les approches thérapeutiques visant son inhibition. Des stratégies alternatives ciblant des modulateurs de l'activité de BACE pourraient représenter une approche plus sécuritaire pour traiter la maladie. Dans cette étude, nous avons tenté de développer un essai pour cribler des modulateurs de l'activité de BACE en utilisant deux systèmes différents : le système rapporteur luciférase et un système basé sur le Bioluminescence Resonance Energy Transfert 2 (BRET2). Malgré les nombreuses optimisations réalisées, nous n'avons pas réussi à mettre au point un essai efficace permettant de cribler des modulateurs de l'activité de BACE.

Avant-Propos

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Dr. Georges Lévesque, pour m'avoir soutenue et encouragée tout au long de ma maîtrise. J'aimerais le remercier de m'avoir accueillie chaleureusement dans son laboratoire et de s'être montré aussi disponible et patient pour répondre à mes questions. Nos discussions ont toujours été très stimulantes et très formatrices. Merci aussi d'avoir pris le temps de m'écouter et de m'aider dans mes choix futurs. J'aimerais aussi remercier le Dre. Madeleine Carreau pour les nombreux conseils et suggestions pour l'avancement de mon projet.

Merci aussi à toutes ces personnes qui ont su faire de mon séjour à Québec un moment aussi agréable. Merci à Cédric pour son aide avec le système luciférase mais aussi pour la peinture, la crème glacée et les rigolades. Merci à Marie-Claude pour sa joie de vivre, sa générosité et pour les légendaires missions au dépanneur. Merci à Chantal pour toutes les techniques qu'elle m'a enseignées au début de ma maîtrise, pour ses encouragements et ses histoires. Merci à Caroline pour sa bonne humeur et pour m'avoir aussi gentiment intégré dans son équipe de Ultimate Freesbee. Merci à Christian pour ses conseils sur mon projet et pour sa personnalité. Enfin, merci à Manel, Ouassila, Valérie, Marie-Chantal, Rahima, Marie-Pier et Marc-André.

J'aimerais aussi remercier Christian Larochelle de l'Institut National de Santé Publique du Québec pour sa grande disponibilité et ses conseils pour l'utilisation de l'appareil Victor3. Merci aussi au Dr. Martin Gagnon de l'équipe du Dr. Claude Gravel de l'Hôpital Robert-Giffard pour sa disponibilité pour l'utilisation de l'appareil Fusion α . Merci enfin à Joseph Berthiaume de la compagnie PerkinElmer Inc. pour sa générosité pour le prêt d'équipement et son aide avec la technologie BRET2.

J'aimerais aussi remercier les membres de ma famille qui m'encouragent depuis si longtemps : maman, papa, Jean-Si, Marie-Josée, Roland et grand-maman Dodo. Enfin un merci tout spécial à Polo pour m'avoir encouragée et soutenue à distance pendant ces deux années et pour me donner aujourd'hui la force et la possibilité de poursuivre mes études.

Table des matières

1	INTRODUCTION	1
1.1	LA MALADIE D'ALZHEIMER	1
1.2	LES DEUX FORMES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER.....	2
1.2.1	<i>La forme sporadique de la maladie d'Alzheimer.....</i>	<i>2</i>
1.2.1.1	L'âge, le facteur de risque le plus important	2
1.2.1.2	L'allèle ApoE4.....	3
1.2.1.3	Les autres facteurs de risques	3
1.2.2	<i>La forme familiale de la maladie d'Alzheimer</i>	<i>4</i>
1.2.2.1	Quatre gènes sont impliqués.....	4
1.3	LE PROCESSUS PROTÉOLYTIQUE D'APP	5
1.3.1	<i>La protéine précurseur de l'amyloïde</i>	<i>5</i>
1.3.2	<i>APP peut être clivée selon deux voies catalytiques</i>	<i>6</i>
1.4	LE RÔLE DE LA CASCADE AMYLOÏDE.....	7
1.5	LE COMPLEXE GAMMA-SÉCRÉTASE.....	9
1.6	LA BETA-SÉCRÉTASE, ENZYME LIMITANTE LORS DE LA PRODUCTION D'AMYLOÏDE	9
1.6.1	<i>La protéine BACE1 subit une maturation complexe</i>	<i>10</i>
1.6.2	<i>BACE1 colocalise avec APP.....</i>	<i>11</i>
1.6.3	<i>Le clivage d'APP par BACE1 implique des rafts lipidiques</i>	<i>11</i>
1.6.4	<i>L'implication du cholestérol.....</i>	<i>12</i>
1.6.5	<i>La régulation de BACE1</i>	<i>12</i>
1.6.6	<i>L'inhibition de BACE1 représente un potentiel thérapeutique important.....</i>	<i>13</i>
1.6.7	<i>Structure cristallographique de BACE1</i>	<i>14</i>
1.6.8	<i>Substrats connus de BACE1</i>	<i>15</i>
1.6.9	<i>La découverte d'une fonction pour BACE1</i>	<i>16</i>
1.7	OBJECTIF DE RECHERCHE.....	17
1.7.1	<i>Approches utilisées</i>	<i>17</i>
2	MATÉRIEL ET MÉTHODES	19
2.1	TECHNIQUES DE BASE	19
2.1.1	<i>Mini-préparation d'ADN plasmidique.....</i>	<i>19</i>
2.1.2	<i>Digestion d'ADN.....</i>	<i>19</i>
2.1.3	<i>Analyse sur gel d'agarose.....</i>	<i>20</i>
2.1.4	<i>Extraction de l'ADN d'un gel d'agarose.....</i>	<i>20</i>
2.1.5	<i>Ligation.....</i>	<i>21</i>
2.1.6	<i>Transformation bactérienne par choc thermique</i>	<i>21</i>
2.1.6.1	Criblage des transformants	22
2.1.7	<i>PCR.....</i>	<i>22</i>
2.1.8	<i>Synthèse d'ADN par hybridation d'oligonucléotides</i>	<i>23</i>
2.2	TECHNIQUE DE BIOLOGIE CELLULAIRE.....	24
2.2.1	<i>Transfection au chlorure de calcium</i>	<i>24</i>
2.2.2	<i>Transfection à la lipofectamine 2000</i>	<i>24</i>
2.2.3	<i>Extraction d'ARN au trizol</i>	<i>24</i>
2.2.4	<i>Transcription inverse.....</i>	<i>25</i>
2.2.5	<i>Analyse sur gel SDS-PAGE</i>	<i>25</i>

2.2.6	<i>Immunobuvardage</i>	26
2.3	LE SYSTÈME RAPPORTEUR LUCIFÉRISE	27
2.3.1	<i>Principe des gènes rapporteurs</i>	27
2.3.1.1	Principe du système rapporteur luciférase.....	27
2.3.2	<i>Clonages des gènes chimériques</i>	27
2.3.2.1	Clonage du plasmide pCDNA3/ β -site short/H-Notch.....	28
2.3.2.2	Clonage du plasmide pCDNA3/ β -site long/H-Notch.....	29
2.3.2.3	Clonage du plasmide pCDNA3/actine/ $\beta\beta'$ /NICD.....	31
2.3.2.4	Clonage du plasmide pCMVzeo/APP5' $\rightarrow\beta$ /H-Notch.....	33
2.3.2.5	Clonage du plasmide pCMVzeo/APP5' $\rightarrow\beta\beta'$ /H-Notch.....	34
2.3.2.6	Clonage du plasmide pCMVzeo/swe β site/H-Notch.....	34
2.3.2.7	Clonage du plasmide pCMVzeo/APPswe5' $\rightarrow\beta\beta'$ /H-Notch.....	35
2.3.3	<i>Clonage de BACE et des variants de BACE</i>	37
2.3.3.1	Clonage de pCMVzeo/BACE.....	38
2.3.3.2	Clonage de pCMVzeo/BACED93A, pCMVzeo/BACED289A et pCMVzeo/BACED93AD289A.....	38
2.3.4	<i>Expression des gènes chimériques</i>	38
2.3.5	<i>Culture cellulaire</i>	38
2.3.6	<i>Transfection transitoire</i>	39
2.3.7	<i>Établissement d'une lignée cellulaire stable</i>	39
2.3.8	<i>Clonage de pHES/luciférase/neomycine</i>	39
2.3.9	<i>Sélection au G418-sulfate</i>	39
2.3.10	<i>Dosage de l'activité luciférase</i>	40
2.3.10.1	Extraits cellulaires.....	40
2.3.10.2	Dosage de l'activité.....	41
2.4	LE SYSTÈME BRET2.....	41
2.4.1	<i>Principe du BRET2</i>	41
2.4.2	<i>Clonage des plasmides biosenseurs</i>	44
2.4.3	<i>Optimisation des conditions</i>	46
2.4.4	<i>Type cellulaire</i>	46
2.4.5	<i>Transfection</i>	47
2.4.6	<i>Dosage BRET2</i>	47
2.4.6.1	Préparation des échantillons pour le dosage BRET2.....	47
2.4.6.2	Dosage BRET2.....	47
2.4.6.3	Calcul du ratio BRET2.....	48
2.4.7	<i>Extraits cellulaires et analyse par immunobuvardage</i>	49
2.4.8	<i>Essais avec inhibiteur</i>	49
3	RESULTATS	50
3.1	ESSAIS RAPPORTEURS LUCIFÉRISE.....	50
3.1.1	<i>Génération de protéines chimériques</i>	50
3.1.2	<i>Essai luciférase avec pCDNA3/β-site short/H-Notch et pCDNA3/β-site long/H-Notch</i>	50
3.1.3	<i>Établissement d'une lignée cellulaire stable exprimant pHES-luciférase</i>	52
3.1.4	<i>Essai luciférase avec le clone 24</i>	54
3.1.5	<i>Essai luciférase avec cellules HEK293</i>	55
3.1.6	<i>Essai luciférase avec cellules COS-1</i>	56

3.1.7	<i>Essai luciférase avec pCMVzeo/sweβsite/H-Notch et pCMVzeo/APPswe5'→β/H-Notch</i>	57
3.2	ESSAIS BRET2	59
3.2.1	<i>Génération des protéines de fusion</i>	59
3.2.2	<i>Optimisation des paramètres BRET2 avec le plasmide parental pCMV-hGFP2-MCS-hRLuc</i>	59
3.2.2.1	Optimisation du type cellulaire et quantité d'ADN transfecté	59
3.2.3	<i>Ajout de BACE1 dans les essais BRET2</i>	60
3.2.3.1	Vérification de l'expression de BACE	61
3.2.3.2	Optimisation de la concentration de BACE utilisée	62
3.2.4	<i>Vérification de l'expression des protéines de fusion</i>	62
3.2.5	<i>Localisation cellulaire</i>	63
3.2.6	<i>Longueur du peptide biosenseur</i>	64
3.2.7	<i>Lecteur de plaque</i>	65
3.2.8	<i>Optimisation des paramètres de l'essai avec le lecteur de plaque Fusiona</i>	65
3.2.9	<i>Essais avec les protéines de fusion et BACE</i>	66
3.2.10	<i>Essai avec inhibiteur de β-sécrétase</i>	67
3.2.10.1	Essai avec inhibiteur de β-sécrétase Z-VLL-CHO	67
3.2.10.2	Optimisation de la concentration de l'inhibiteur de β-sécrétase Z-VLL-CHO	68
3.2.10.3	Contrôle de l'ajout d'inhibiteur de β-sécrétase Z-VLL-CHO	70
3.2.10.4	Inhibition de l'activité endogène de BACE par APP	72
4	DISCUSSION	74
4.1	LE SYSTEME RAPPORTEUR LUCIFERASE	74
4.2	LE SYSTEME BRET2.....	78
5	CONCLUSION	86

Liste des abréviations

°C	degrés Celsius
α	alpha
β	beta
γ	gamma
Å	Ångström (100 picomètres)
A β	β amyloïde
ADAM	disintegrin and metalloproteinase
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AICD	APP intracellular domain
ApoE4	allèle ϵ 4 de l'apolipoprotéine E
APP	amyloid precursor protein
APP-FL	protéine APP pleine longueur
APPs- α	fragment soluble de la protéine précurseur de l'amyloïde obtenu par le clivage par la α -sécrétase
APPs- β	fragment soluble de la protéine précurseur de l'amyloïde obtenu par le clivage par la β -sécrétase
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messager
BRET	bioluminescence resonance energy transfer
BRET2	bioluminescence resonance energy transfer de seconde génération
C83	fragment C-terminal d'APP de 83 acides aminés
C99	fragment C-terminal d'APP de 99 acides aminés
cps	comptes par seconde
DTT	dithiothréitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GGA	Golgi-localized, γ -ear-containing, ADP ribosylation factor-binding
g/L	gramme par litre
HES	hairy and enhancer of split
Kb	kilobase d'ADN
LB	Luria Bertani

LDL	low density lipoprotein
MA	maladie d'Alzheimer
mg	milligramme
ml	millilitre
mmol	millimolaire
NICD	notch intracellular domain
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyéthylène glycol
PS1	préséniline 1
PS2	préséniline 2
RE	réticulum endoplasmique
rpm	revolutions per minute
RT	reverse transcription
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-page polyacrylamide gel electrophoresis
TACE	tumor necrosis factor alpha converting enzyme
TE	tris-EDTA
TP	température pièce
VLDL	very low density lipoprotein
µg	microgramme
µl	microlitre
µM	micromolaire
v/v	volume/volume
wt	wild type
Z-VLL-CHO	N-benzyloxycarbonyl-valine-leucine-leucinal.

Liste des tableaux

<i>TABLEAU 2-1 : AMORCES UTILISÉES LORS DU CLONAGE DU PLASMIDE PCDNA3/B-SITE SHORT/H-NOTCH.</i>	28
<i>TABLEAU 2-2 : AMORCES UTILISÉES LORS DU CLONAGE DU PLASMIDE PCDNA3/B-SITE LONG/H-NOTCH.</i>	30
<i>TABLEAU 2-3 : AMORCES UTILISÉES LORS DU CLONAGE DU PLASMIDE PCDNA3/ACTINE/BB'/NICD.</i>	32
<i>TABLEAU 2-4 : AMORCES UTILISÉES LORS DU CLONAGE DU PLASMIDE PCMVZEO/APP5'→BB'/H-NOTCH.</i>	34
<i>TABLEAU 2-5 : AMORCES UTILISÉES LORS DU CLONAGE DU PLASMIDE PCMVZEO/SWEBSITE/H-NOTCH.</i>	35
<i>TABLEAU 2-6 : AMORCES UTILISÉES LORS DU CLONAGE DU PLASMIDE PCMVZEO/APP5WE5'→BB'/H-NOTCH.</i>	35
<i>TABLEAU 2-7 : PAIRES D'OLIGONUCLÉOTIDES UTILISÉES POUR LE CLONAGE DES SUBSTRATS DE BACE AUX SITES HINDIII ET BGLII DU PLASMIDE PARENTAL PCMV-HGFP2-MCS-HRLUC.</i>	46
<i>TABLEAU 2-8 : AMORCES UTILISÉES POUR LA VÉRIFICATION DES PLASMIDES BIOSENSEURS.</i>	46
<i>TABLEAU 3-1 : ANALYSE BRET2.</i>	60
<i>TABLEAU 3-2 : ESSAI BRET2 AVEC AJOUT D'INHIBITEUR DE B-SECRETASE (Z-VLL-CHO) DIRECTEMENT DANS LA PLAQUE DE DOSAGE.</i>	72

Liste des figures

<i>FIGURE 1-1 : LE PROCESSUS PROTÉOLYTIQUE D'APP.</i>	7
<i>FIGURE 1-2 : L'HYPOTHÈSE DE LA CASCADE AMYLOÏDE (ADAPTÉ D'APRÈS SELKOE 2005)</i> ...	8
<i>FIGURE 1-3 : STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE BACE1 (PROTEIN DATA BANK)</i>	15
<i>FIGURE 2-1 : CONDITIONS GÉNÉRALES DE PCR AVEC L'ENZYME PHUSION</i>	23
<i>FIGURE 2-2 : SOMMAIRE DES RÉGIONS D'APPWT AMPLIFIÉES POUR LE CLONAGE DES DIFFÉRENTES CONSTRUCTIONS CHIMÉRIQUES.</i>	30
<i>FIGURE 2-3 : SOMMAIRE DES DIFFÉRENTES RÉGIONS DE NOTCH-1 AMPLIFIÉES POUR LE CLONAGE DES DIFFÉRENTES CONSTRUCTIONS CHIMÉRIQUES.</i>	33
<i>FIGURE 2-4 : SOMMAIRE DES RÉGIONS D'APPSWE AMPLIFIÉES POUR LE CLONAGE DES DIFFÉRENTES CONSTRUCTIONS CHIMÉRIQUES.</i>	36
<i>FIGURE 2-5 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES DIFFÉRENTES PROTÉINES CHIMÉRIQUES CRÉÉES POUR LE PROJET LUCIFÉRASE.</i>	37
<i>FIGURE 2-6 : AMORCES UTILISÉES POUR LA VÉRIFICATION DE L'EXPRESSION DU PLASMIDE PHES-LUCIFÉRASE DANS LES CELLULES HEK293 STABLES.</i>	40
<i>FIGURE 2-7 : PRINCIPE DU BRET2</i>	42
<i>FIGURE 2-8 : PRINCIPE DE L'ESSAI BIOSENSEUR BRET2</i>	44
<i>FIGURE 2-9 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES DIFFÉRENTS PEPTIDES BIOSENSEURS GÉNÉRÉS.</i>	45
<i>FIGURE 3-1 : DOSAGE DE L'ACTIVITÉ LUCIFÉRASE AVEC CELLULES HEK293.</i>	51
<i>FIGURE 3-2 : DOSAGE DE L'ACTIVITÉ LUCIFÉRASE AVEC CELLULES HEK293.</i>	52
<i>FIGURE 3-3 : VÉRIFICATION DES CLONES EXPRIMANT PHES-LUCIFÉRASE DE FAÇON STABLE.</i>	53
<i>FIGURE 3-4 : DOSAGE DE L'ACTIVITÉ LUCIFÉRASE AVEC LE CLONE 24.</i>	55
<i>FIGURE 3-5 : DOSAGE DE L'ACTIVITÉ LUCIFÉRASE AVEC CELLULES HEK293.</i>	56
<i>FIGURE 3-6 : DOSAGE DE L'ACTIVITÉ LUCIFÉRASE AVEC CELLULES COS-1.</i>	57

FIGURE 3-7 : DOSAGE DE L'ACTIVITÉ LUCIFÉRIQUE AVEC CELLULES COS-1.	58
FIGURE 3-8 : ANALYSE BRET2. DES CELLULES HELA ONT ÉTÉ CO-TRANSFECTÉES AVEC 1μG DE PLASMIDES BIOSENSEURS ET 1μG DE BACE, DE MUTANT INACTIF DE BACE OU DE VECTEUR VIDE.	61
FIGURE 3-9 : VÉRIFICATION DE L'EXPRESSION DE BACE DANS LES ESSAIS BRET2 PAR IMMUNOBUVARDAGE SUR DES CELLULES HELA.	62
FIGURE 3-10 : VÉRIFICATION DE L'EXPRESSION DE LA PROTÉINE DE FUSION PGFP2-APPWT-RLUC DANS DES CELLULES HELA.	63
FIGURE 3-11 : VÉRIFICATION DE L'IMPORTANCE DU CONTEXTE CELLULAIRE POUR L'ESSAI BRET2.	64
FIGURE 3-12 : MISE AU POINT DES CONDITIONS DE L'ESSAI BRET2 AVEC L'APPAREIL FUSIONA.	66
FIGURE 3-13 : ESSAI BRET2 AVEC L'APPAREIL FUSION.	67
FIGURE 3-14 : ESSAI BRET2 AVEC INHIBITEUR DE B-SÉCRÉTASE (Z-VLL-CHO).	68
FIGURE 3-15 : ESSAI BRET2 AVEC CONCENTRATION ÉLEVÉE D'INHIBITEUR DE B-SÉCRÉTASE (Z-VLL-CHO).	69
FIGURE 3-16 : ESSAI BRET2 AVEC CONCENTRATION ÉLEVÉE D'INHIBITEUR DE B-SÉCRÉTASE (Z-VLL-CHO).	70
FIGURE 3-17 : ESSAI BRET2 AVEC AJOUT D'INHIBITEUR DE B-SECRETASE (Z-VLL-CHO) DIRECTEMENT DANS LA PLAQUE DE DOSAGE.	71
FIGURE 3-18 : ESSAI BRET2 AVEC QUANTITÉ CROISSANTE D'APP FL.	73

1 Introduction

1.1 La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative qui se caractérise par une détérioration progressive du cerveau des personnes atteintes. Elle représente la forme de démence la plus répandue dans la population et on estime qu'elle affecte actuellement 18 millions d'individus à travers le monde. Avec le vieillissement de la population, on estime qu'en 2025 ce nombre pourrait atteindre 34 millions (OMS).

Cette maladie a été identifiée pour la première fois en 1906 par le médecin qui allait plus tard lui donner son nom : le Dr. Alois Alzheimer. Dans un hôpital de Frankfurt, le neuropsychiatre allemand reçut une patiente de 51 ans présentant des troubles de mémoire accompagnés de troubles de compréhension, de comportement, une profonde désorientation, des hallucinations ainsi que des signes de paranoïa. Après la mort de la patiente quelques années plus tard, l'autopsie de son cerveau révéla la présence de plaques denses à l'extérieur des neurones accompagnées d'amas anormaux de fibrilles à l'intérieur des neurones, des lésions qui n'avaient jamais été décrites auparavant.

Encore aujourd'hui, l'observation de plaques et d'amas fibrillaires par l'autopsie du cerveau est le seul moyen permettant de confirmer un diagnostic de maladie d'Alzheimer. Avec les années, on en a toutefois appris davantage sur la nature réelle de ces lésions et sur la maladie. On sait que les plaques, appelées plaques amyloïdes, sont formées majoritairement par l'accumulation progressive et irréversible d'un peptide de 42 acides aminés, le peptide β -amyloïde (A β) (Glennner and Wong 1984; Selkoe 1997). Les enchevêtrements neurofibrillaires sont quant à eux causés par l'hyperphosphorylation de la protéine Tau, une protéine requise pour la polymérisation des microtubules (Grundke-Iqbal, Iqbal et al. 1986). Ces deux anomalies provoquent une perte neuronale et synaptique graduelle dans le cerveau des patients, entraînant la perte des fonctions associées aux régions cérébrales atteintes (Smale, Nichols et al. 1995). Traduites d'abord par des oublis bénins ou des changements d'humeurs, ces neurodégénérescences se manifestent ensuite par des troubles de concentration et d'orientation chez les individus. À un stade avancé,

elles finissent même par affecter les fonctions vitales de l'organisme, causant le décès du malade.

Malgré les nombreux progrès réalisés depuis 100 ans, on ignore encore l'étiologie exacte de la maladie; on ne connaît toujours pas toutes les causes et les facteurs qui amorcent tout le processus de neurodégénération. Plusieurs hypothèses soutiennent le rôle des plaques et des enchevêtrements dans le processus de neurodégénération mais certains des mécanismes impliqués demeurent obscurs.

1.2 Les deux formes de la MA

La MA se présente sous deux formes : la forme familiale et la forme sporadique. Ces deux formes, bien qu'elles présentent les deux mêmes types de lésions caractéristiques de la maladie et qu'elles se traduisent par les mêmes symptômes, originent de causes différentes. L'hérédité est mise en cause dans la forme familiale de la maladie mais on ignore encore si elle joue un rôle dans la forme sporadique. Pour cette dernière forme toutefois, on a réussi à identifier certains facteurs comme étant associés à un risque plus élevé de développer la maladie. Ces facteurs sont appelés facteurs de risque.

1.2.1 La forme sporadique de la MA

La forme sporadique de la maladie est la forme la plus courante et représente environ 90% des cas observés. La forme sporadique est associée à un développement tardif de la maladie, c'est-à-dire chez les individus âgés de plus de 60 ans (Morris 1999).

1.2.1.1 L'âge, le facteur de risque le plus important

Le facteur de risque le plus important pour cette forme de la maladie est l'âge; l'occurrence de la maladie augmente de façon proportionnelle avec l'âge. À partir de 65 ans, la fréquence de la maladie double à chaque tranche d'âge de 5 ans pour atteindre 50% à l'âge de 85 ans. (Morris 1999; Puglielli, Ellis et al. 2003) Pour cette raison, la maladie d'Alzheimer a longtemps été considérée à tort comme faisant partie du processus normal de vieillissement. Or, ce ne sont pas toutes les personnes âgées qui finissent par développer la maladie.

1.2.1.2 L'allèle ApoE4

La présence de l'allèle $\epsilon 4$ du gène de l'apolipoprotéine E est un facteur de risque génétique associé à la forme sporadique de la maladie et semblerait agir comme modulateur de l'âge de développement de la maladie chez les individus déjà susceptibles à la maladie (Strittmatter, Saunders et al. 1993). Le gène de l'apolipoprotéine E est situé sur le chromosome 19 et possède trois allèles : $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$, jouant chacune un rôle différent dans l'homéostasie des lipides (Smith 2002). Les individus portant deux copies de l'allèle Apo $\epsilon 4$ ont une probabilité de 50 à 90% de développer la maladie et ceux portant une seule copie de l'allèle ont une probabilité de 45% de développer la maladie comparativement à 20% pour la population en général. L'implication de l'allèle Apo $\epsilon 4$ dans la maladie semblerait associée à une incapacité à éliminer les plaques amyloïdes du cerveau contrairement aux autres allèles. L'allèle Apo $\epsilon 4$ ne permet cependant pas d'expliquer tout les cas de la maladie; seulement 15% des personnes atteintes de la MA sont homozygotes pour cette allèle.

1.2.1.3 Les autres facteurs de risques

Des recherches intensives ont été menées afin d'identifier d'autres facteurs génétiques ou environnementaux pouvant être impliqués dans la maladie. Aucun autre gène candidat n'a été trouvé. Parmi les facteurs épigénétiques : le sexe, l'activité physique (Teri, McCurry et al. 1998) et mentale, la consommation de tabac (Merchant, Tang et al. 1999), l'aluminium (Suay Llopis and Ballester Diez 2002), la prise d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens et les traumatismes crâniens à répétition ont été proposés mais des recherches plus poussées sont réalisées afin de préciser le rôle de ces facteurs.

Contrairement à la forme sporadique de la MA, des mutations sur des gènes ont été associées à la forme familiale de la maladie. L'analyse de ces gènes et des mutations associées a permis de faire grandement avancer les connaissances sur les mécanismes biologiques impliqués dans la maladie.

1.2.2 La forme familiale de la MA

La forme familiale de la maladie ne représente que 5 à 10% des cas observés mais est associée à une forme plus agressive ou plus précoce de la maladie : les patients atteints de la forme familiale développent généralement la maladie avant l'âge de 60 ans (Blennow, de Leon et al. 2006). Des cas ont même été observés chez des patients à un âge aussi précoce que 30 ans (Portet, Dauvilliers et al. 2003). La forme familiale de la MA se transmet selon un mode autosomique dominant d'une génération à l'autre.

1.2.2.1 Quatre gènes sont impliqués

L'analyse génétique des personnes des familles touchées a permis d'identifier 4 gènes qui lorsque mutés, causent la MA : le gène de la protéine Préséniline 1 (PS1) situé sur le chromosome 14, le gène de la protéine Préséniline 2 situé sur le chromosome 1, le gène de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) situé sur le chromosome 21 ainsi que le gène de la protéine Presenilin enhancer-2 (PEN-2) située sur le chromosome 19. Ensemble, les mutations de ces gènes sont responsables de 30 à 50% des cas de maladie de forme familiale (Bird 2005).

Le premier gène qui fut identifié comme étant directement impliqué dans la MA lorsque muté est le gène APP (Kang, Lemaire et al. 1987). À l'heure actuelle, on dénombre 25 mutations dans ce gène. Elles conduisent à l'apparition de la maladie chez les individus à l'âge de 45 à 60 ans (<http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations/default.cfm?MT=1&ML=1&Page=MutByGene>). Le second gène qui fut identifié est le gène PS1 (Sherrington, Rogaev et al. 1995). Depuis sa découverte, 155 mutations ont été identifiées. Les mutations associées à PS1 conduisent à la forme la plus agressive de la maladie, les individus développent généralement les premiers symptômes dès l'âge de 30 à 50 ans. Après l'identification du gène PS1, le gène PS2, son homologue, a été découvert dans des familles atteintes. On compte aujourd'hui 10 mutations associées à PS2 et qui conduisent au développement de la maladie à partir de l'âge de 45 ans. Finalement, on a récemment identifié une première mutation associée au gène PEN-2 bien que l'implication pathologique de cette mutation ne soit pas encore claire (Sala Frigerio, Piscopo et al. 2005). Le rôle pathologique des mutations dans les trois autres gènes APP, PS1 et PS2 est

cependant plus clair. On sait qu'elles agissent en modifiant le clivage protéolytique de la protéine APP pour favoriser la production de peptide β -amyloïde neurotoxique, le constituant majeur des plaques amyloïdes.

1.3 Le processus protéolytique d'APP

1.3.1 La protéine précurseur de l'amyloïde

Le peptide β -amyloïde, constituant majeur des plaques amyloïdes, est en effet dérivé d'une protéine de plus haut poids moléculaire, la protéine précurseur de l'amyloïde (APP). Le locus du gène APP est localisé sur le chromosome 21q21 et code pour un groupe de protéines transmembranaires de type I exprimées ubiquitairement chez l'humain (Goldgaber, Lerman et al. 1987). Le gène subit un épissage alternatif qui permet de créer dix isoformes différents. Parmi ces dix isoformes on retrouve trois isoformes plus communs nommés A, B et C et qui possèdent respectivement 770, 751 et 695 acides aminés. Les isoformes A et B sont largement exprimés dans toutes les cellules du corps alors que l'isoforme C est exprimé majoritairement au niveau des neurones et très faiblement dans les autres types de cellules. La protéine APP a été largement conservée dans l'évolution ce qui laisse supposer qu'elle possède un rôle physiologique précis, bien que ce dernier n'ait pas encore été identifié.

Suivant sa traduction, un peptide signal permet la translocation de la protéine APP à l'intérieur du réticulum endoplasmique et la modification post-traductionnelle de cette dernière à travers les voies de sécrétion. Au cours du routage d'APP à travers ces voies de sécrétion, la protéine peut subir différents clivages protéolytiques menant à formation de divers fragments. On ignore encore la fonction de chacun des fragments libérés mais l'analogie entre APP et la protéine Notch, une autre protéine à simple domaine transmembranaire, laisse supposer que chacun d'eux possède une fonction bien précise (Ray, Yao et al. 1999).

1.3.2 APP peut est clivée selon deux voies catalytiques

Le clivage d'APP est réalisé selon deux voies catalytiques alternatives, dépendamment des protéases impliquées dans ce clivage (Fig.1-1). La voie la plus commune, dite voie non-amyloïdogénique, implique un premier clivage assuré par une α -sécrétase de la famille ADAM, un groupe de métalloprotéases incluant ADAM-10 et TACE. L' α -sécrétase clive APP dans sa partie extracellulaire au site α , à l'intérieur du domaine A β ce qui prévient la formation du peptide amyloïde. Alternativement, APP peut être clivée via la voie dite amyloïdogénique par une β -sécrétase, l'aspartyl-protéase BACE, au site β situé à l'extrémité N-terminale du domaine A β . Le clivage par BACE est parfois dirigé vers un site alternatif de clivage, le site β' , changement qui pourrait être produit par une différence d'expression de BACE (Creemers, Ines Dominguez et al. 2001). Ce clivage au site β' est aussi amyloïdogénique, mais semblerait davantage observé chez le rat (Gouras, Xu et al. 1998). Peu importe la voie empruntée, cette première étape de clivage permet la libération de longs fragments solubles d'APP (APPs- α ou APPs- β) dans l'espace extracellulaire tandis que les fragments C83 ou C99, de 83 ou 99 acides aminés, demeurent ancrés dans la membrane. Une seconde étape de clivage est commune aux deux voies et implique le clivage intramembranaire des fragments C83 ou C99 au site γ ou ϵ , assuré par le complexe γ -sécrétase. Le clivage du fragment C83 par le complexe γ -sécrétase permet la libération du domaine AICD (APP Intracellular Domain) dans l'espace intracellulaire et celle d'un peptide de 3kDa, le peptide p3, dans l'espace extracellulaire. Le clivage du fragment C99 permet lui aussi la libération d'un domaine AICD mais génère un fragment extracellulaire de taille supérieure au peptide p3, le peptide A β (Haass, Hung et al. 1993). Dépendamment du site de clivage utilisé par le complexe γ -sécrétase, soit le site γ ou le site ϵ , la longueur du peptide A β variera entre 40 et 42 acides aminés. Alors que le peptide p3 semble inoffensif parce que rapidement dégradé, le peptide A β (1-42) insoluble et toxique s'accumule dans l'espace extracellulaire pour former les plaques amyloïdes caractéristiques de la MA.

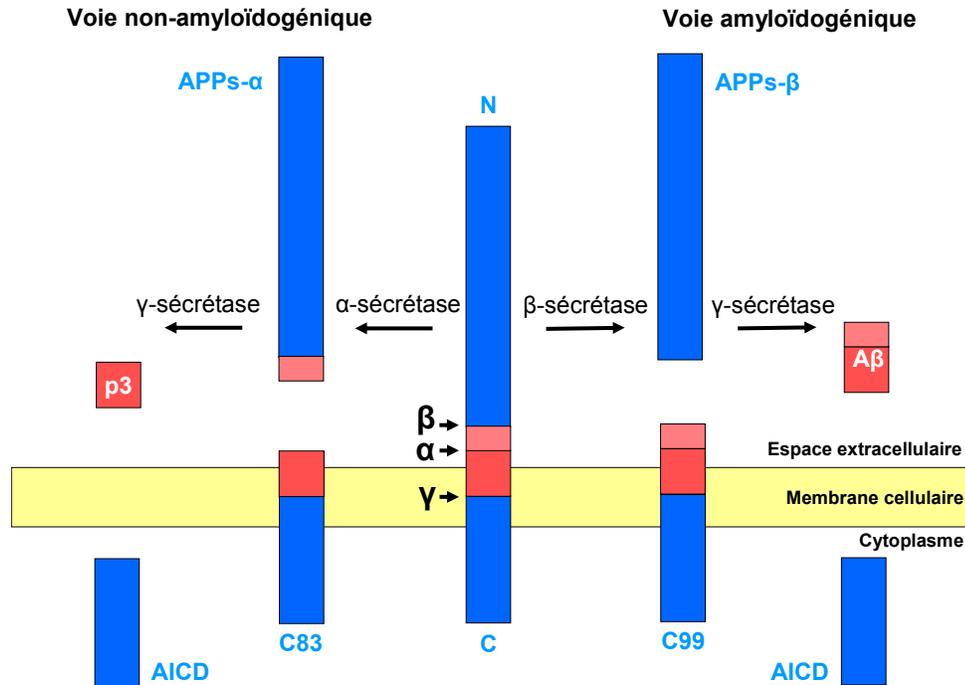


Figure 1-1 : Le processus protéolytique d'APP.

1.4 Le rôle de la cascade amyloïde

Depuis son identification, on suppose que le peptide Aβ est le facteur initial qui déclenche le reste de la cascade d'événements menant à la MA. Cette hypothèse dite de la « cascade amyloïde », a été proposée pour la première fois en 1991 par J. Hardy et D. Allsop (Hardy and Allsop 1991). Elle suggère que le processus protéolytique dérégulé de la protéine APP serait à l'origine d'un déséquilibre entre la production et l'élimination du peptide Aβ et que cette accumulation graduelle d'Aβ initierait des changements au niveau de la réponse inflammatoire, des dommages oxydatifs, des enchevêtrements neurofibrillaires en causant finalement une perte neuronale (Figure 1-2) (Selkoe 2005). Bien qu'elle soit contestée par certains, l'hypothèse de la cascade amyloïde est supportée par plusieurs observations. Parmi les plus importantes, on retrouve des plaques amyloïdes dans le cerveau de tous les patients atteints de la MA et cela en plus grand nombre que celle retrouvées chez les personnes normales. Par ailleurs, la sévérité des déficits mentaux est en corrélation avec le nombre de plaques amyloïdes retrouvées. Enfin, les 4 gènes qui ont été identifiés comme

causant la maladie sous forme familiale augmentent soit la production ou l'agrégation de l'A β .

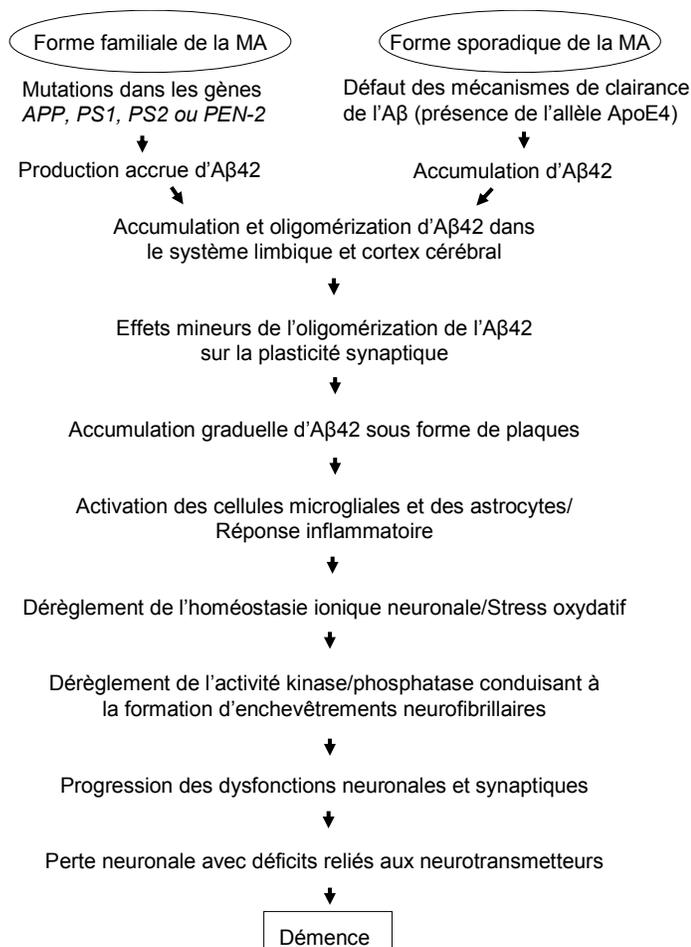


Figure 1-2 : L'hypothèse de la cascade amyloïde (Adapté d'après Selkoe 2005)

Parce que l'A β possède un rôle central et initial dans l'établissement de la MA, les thérapies visant à empêcher sa production semblent représenter d'excellentes approches dans le traitement de la MA. Le développement de ces thérapies requiert une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans la génération de l'A β , voies qui, tel que décrit précédemment, impliquent l'action de différentes sécrétases.

1.5 Le complexe γ -sécrétase

Le clivage au site γ d'APP est assuré par un large complexe multiprotéique de 500 à 600KDa nommé complexe γ -sécrétase (Edbauer, Winkler et al. 2002). Ce complexe est formé de quatre protéines membranaires : nicastrine (Yu, Nishimura et al. 2000), Aph-1, Pen-2 (Francis, McGrath et al. 2002; Goutte 2002) et PS1 (préséniline-1) ou son homologue PS2 (préséniline-2) (Li, Xu et al. 2000). Le clivage d'APP au site γ est très particulier puisque le clivage a lieu à l'intérieur de la membrane. Ce processus particulier de protéolyse est appelé Protéolyse Intramembranaire Régulée (RIP) et est assuré par des protéines de la famille des RIP-protéases (Brown, Ye et al. 2000). Plusieurs évidences supportent l'hypothèse que les présénilines sont responsable de l'activité γ -sécrétase du complexe. Des mutations autosomales dominantes sur les gènes PS1 et PS2 ont été découvertes et ces mutations ont pour effet de déplacer le clivage au site- γ de la position 40 à 42, augmentant ainsi la production d'A β 42 responsable de la formation des plaques amyloïdes (Citron, Westaway et al. 1997; De Strooper, Saftig et al. 1998). Par ailleurs, le remplacement des deux résidus aspartate de PS1 abolit complètement l'activité γ -sécrétase (Wolfe, Xia et al. 1999). PS1 assurerait donc la RIP de APP et les autres protéines du complexe joueraient un rôle dans la formation, la stabilisation et l'activation du complexe (Francis, McGrath et al. 2002; Takasugi, Tomita et al. 2003).

1.6 La β -sécrétase, l'enzyme limitante lors de la production d'amyloïde

La β -sécrétase suscite un intérêt particulier puisque c'est elle qui initie le catabolisme dérégulé de l'APP à l'origine des plaques amyloïdes. L'étude des propriétés et de l'activité de cette enzyme est donc essentielle à l'avancement des connaissances sur la maladie. L'enzyme BACE1 (β -site APP Cleaving Enzyme), aussi appelée Asp2 ou Memapsin, a été identifiée pour la première fois en 1999 comme étant la β -sécrétase responsable du clivage en N-terminal d'APP. BACE1 est une protéine transmembranaire de type I qui comprend un domaine catalytique situé dans l'espace luminal, un seul domaine transmembranaire et un court domaine cytoplasmique. Faisant partie de la famille des aspartyl protéases, la protéine a une longueur de 501 acides aminés et est exprimée dans la plupart des types

cellulaires et organes bien que son expression soit prédominante au niveau du pancréas et ensuite au niveau des neurones (Vassar, Bennett et al. 1999). Par contre, l'activité β -sécrétase de BACE1 est majoritaire au niveau du cerveau et bien que son ARNm soit détecté à de hauts niveaux dans le pancréas, son activité y est faible ou quasiment nulle. L'absence d'activité malgré l'expression abondante dans ce tissu serait due à la présence d'un variant catalytiquement inactif de BACE1, dépourvu d'une partie de l'exon 3 par épissage alternatif (Bodendorf, Fischer et al. 2001). Après la découverte de BACE1, plusieurs groupes ont rapporté l'existence d'un homologue, la protéine BACE2 (Yan, Bienkowski et al. 1999). Cependant, la β -sécrétase responsable de la production d'A β serait BACE1 et non BACE2 (Vassar 2004).

1.6.1 La protéine BACE1 subit une maturation complexe

BACE1 demeure une protéine encore bien mal comprise en raison des nombreuses modifications post-traductionnelles qu'elle subit au cours de sa maturation et qui influencent son activité de manières plus ou moins connues. Tout comme les autres membres de la famille des aspartyl protéase, BACE1 est d'abord synthétisée sous la forme de zymogène inactif contenant un pro-domaine N-terminal qui est retiré pendant sa maturation. Le clivage du pro-domaine est en général nécessaire à l'activation des aspartyl protéases (Tang and Wong 1987). Toutefois, il semblerait que le clivage du pro-domaine ne soit pas nécessaire pour activer l'enzyme car pro-BACE produit une quantité considérable de fragment C99 (Creemers, Ines Dominguez et al. 2001). BACE1 n'est donc pas un zymogène strict nécessitant le clivage de son pro-domaine pour devenir une enzyme active. Pourtant, le clivage du pro-domaine serait requis pour la maturation de la protéine. Il serait en fait nécessaire pour la sortie de BACE1 du RE et il a été démontré qu'une construction de BACE1 dont le pro-domaine a été retiré s'accumule dans le RE (Benjannet, Elagoz et al. 2001).

Le zymogène est d'abord glycosylé sur 4 résidus asparagine Asn153, -172, -223 et -354 et ensuite assemblé en homodimère dans le RE. En effet, alors que le complexe γ -sécrétase est formé d'au moins quatre protéines différentes, BACE1 agit sous la forme d'un homodimère qui est formé avant même que le pro-domaine soit retiré (Westmeyer, Willem

et al. 2004). L'homodimère est ensuite rapidement transporté dans l'appareil de Golgi où le pro-domaine est clivé par une furine ou autre convertase de la famille des furines pour former l'enzyme mature (Bennett, Denis et al. 2000). Le clivage a lieu à la séquence RLPR*R, un motif de reconnaissance pour la furine. Une fois activée, BACE1 est ensuite dirigée vers les endosomes puis vers la membrane plasmique où elle peut être réinternalisée vers les endosomes. La protéine cycle ainsi plusieurs fois entre les endosomes et la membrane plasmique au cours de son existence, pour finalement être dégradée à l'intérieur du protéasome (Qing, Zhou et al. 2004). La demi-vie de la protéine serait d'environ 14 à 16 heures (Huse and Doms 2000). Un certain nombre de protéines sont aussi transportées de façon rétrograde vers le Golgi. Il a été démontré qu'un motif dileucine DXXLL présent dans la partie cytoplasmique de la protéine et la modulation de ce motif par la phosphorylation d'un résidu sérine à proximité (S498) sont essentiels au ciblage de BACE1 vers des compartiments cellulaires spécifiques (Huse, Pijak et al. 2000; Wahle, Prager et al. 2005). Le motif DXXLL serait en fait un site de reconnaissance pour les protéines GGA (Golgi-localized, γ -ear-containing, ADP ribosylation factor-binding), des protéines impliquées dans l'adressage de BACE1 (Wahle, Prager et al. 2005).

1.6.2 BACE1 colocalise avec APP

BACE1 semble suivre la même voie de sécrétion conventionnelle que APP et il a été démontré que les deux protéines colocalisent dans le Golgi, les endosomes et à la membrane plasmique (Huse, Byant et al. 2003). Cependant, le clivage amyloïdogénique de APP aurait lieu majoritairement dans les endosomes ou le Golgi, là où BACE1 possède une activité optimale en raison du pH acide de ces compartiments. En effet, tout comme les autres membres de la famille des aspartyl protéases, BACE1 est majoritairement active à un pH acide, soit environ de 4.5 à 5.5 (Lin, Koelsch et al. 2000). Une faible quantité d'APP est toutefois aussi clivée à la membrane plasmique.

1.6.3 Le clivage d'APP par BACE1 implique des rafts lipidiques

On suppose que la génération d'A β à la membrane plasmique, golgienne et endosomale implique des « rafts » lipidiques, des domaines de la membrane enrichis en cholestérol, sphingolipides, et glycolipides. Ces domaines représentent des plateformes organisées

impliquées dans la transduction de signal, le routage des protéines et certains processus protéolytiques (Simons and Ikonen 1997). Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, il a été proposé que le clivage amyloïdogénique de APP aurait lieu au niveau des « rafts » lipidiques riches en cholestérol tandis que le clivage non-amyloïdogénique de APP aurait lieu dans des régions de la membrane pauvres en cholestérol (Kojro, Gimpl et al. 2001; Wolozin 2001). Ce modèle de compartimentalisation membranaire permettrait d'expliquer comment une même protéine peut être clivée selon deux voies protéolytiques différentes.

1.6.4 L'implication du cholestérol

Un lien entre le cholestérol et le développement de la maladie d'Alzheimer avait été suggéré pour la première fois en 1994 (Sparks, Scheff et al. 1994) et depuis ce temps de nombreuses évidences ont confirmé ce lien. L'identification de l'allèle $\epsilon 4$ de *APOE*, un gène codant pour une protéine majeure des VLDLs (very low density lipoprotein), comme étant un facteur de risque associé à la forme sporadique de la maladie a contribué à supporter le rôle du cholestérol dans la maladie d'Alzheimer. Il a aussi été rapporté que l'augmentation du cholestérol total et celui présent au niveau des LDLs (low density lipoprotein) serait associée à une accumulation accrue de peptide amyloïde chez l'humain (Kuo, Emmerling et al. 1998). Par ailleurs, l'augmentation de l'apport alimentaire en cholestérol chez le lapin ou la souris augmenterait la formation de plaque amyloïde chez ces derniers (Refolo, Malester et al. 2000).

1.6.5 La régulation de BACE1

Les mécanismes impliqués dans la régulation de BACE1 sont aussi encore mal compris. Plusieurs études ont démontré que le niveau protéique de BACE1 et son activité sont augmentés dans l'hippocampe et le néocortex du cerveau des patients atteints de la MA (Fukumoto, Cheung et al. 2002; Holsinger, McLean et al. 2002). Cette augmentation de l'activité de BACE1 serait en corrélation avec une production accrue de peptide A β dans ces régions du cerveau (Li, Lindholm et al. 2004). Toutefois, jusqu'à ce jour, aucun polymorphisme ou mutation à l'intérieur du gène de BACE1 permettant d'expliquer cette augmentation d'expression et d'activité n'ont été identifiés. L'existence de partenaires de BACE1 agissant comme modulateurs de son activité pourrait cependant expliquer ces

changements. Plusieurs interactions entre BACE1 et d'autres protéines ont été identifiées, mais l'implication de ces interactions dans la régulation de BACE1 reste à confirmer. Il a été démontré que les membres de la famille des réticulons interagissent avec BACE1 et que cette interaction aurait un effet inhibiteur sur l'activité de BACE1 (He, Lu et al. 2004). D'autre part, tel que mentionné précédemment, les protéines GGA agiraient comme modulateurs de l'activité de BACE1 en favorisant son transport des endosomes vers la surface cellulaire (He, Li et al. 2005). Finalement, sorLA, un récepteur membranaire de type I, interagit avec BACE1 et exercerait un effet inhibiteur sur ce dernier en empêchant son accès à APP (Spoelgen, von Arnim et al. 2006). Il a été démontré que BACE1 peut aussi être régulé au niveau transcriptionnel. Par exemple, le clonage et la caractérisation de la région promotrice du gène BACE1 ont permis de démontrer que le facteur de transcription Sp1 joue un rôle important dans la régulation de la transcription du gène BACE1 (Christensen, Zhou et al. 2004). Cette régulation transcriptionnelle de BACE1 a toutefois été critiquée par plusieurs puisque plusieurs études ont mise en évidence une augmentation du niveau protéique de BACE1 dans la maladie d'Alzheimer mais aucune n'a pu rapporter une augmentation du niveau de l'ARNm de BACE1. Il semblerait donc que le niveau protéique de BACE1 soit davantage régulé au niveau traductionnel que transcriptionnel.

1.6.6 L'inhibition de BACE1 représente un potentiel thérapeutique important

L'identification de la protéine BACE1 a été rapportée simultanément par quatre groupes de chercheurs en 1999 (Hussain, Powell et al. 1999; Sinha, Anderson et al. 1999; Vassar, Bennett et al. 1999; Yan, Bienkowski et al. 1999). À l'époque, le clonage et la caractérisation de la protéine ont permis de démontrer que BACE1 possédait toutes les caractéristiques attendues pour la β -sécrétase. Il restait cependant à confirmer si BACE1 était l'unique β -sécrétase ou s'il existait d'autres β -sécrétases à l'origine de la production d'amyloïde. De plus, on ignorait encore si BACE1 possédait une fonction essentielle *in vivo* ou non, et donc si son inhibition pouvait représenter une cible thérapeutique potentielle sans effets indésirables. Ainsi, plusieurs groupes ont généré des souris déficientes en BACE1 pour élucider ces questions. Le knockout de BACE1 a permis d'abolir l'activité β -

sécrétase complètement et les souris BACE1^{-/-} générées se sont révélées viables, fertiles et présentant toutes les caractéristiques d'une souris de type sauvage (Cai, Wang et al. 2001; Luo, Bolon et al. 2001; Roberds, Anderson et al. 2001). Ces résultats suggéraient que BACE1 était la principale β -sécrétase dans le cerveau et que son inhibition pouvait être une stratégie efficace pour empêcher la production d'amyloïde sans effets secondaires sérieux. L'inhibition de BACE1 présentait ainsi un intérêt plus élevé que l'inhibition de la γ -sécrétase, la seconde sécrétase impliquée dans la génération de l'amyloïde, étant donné l'implication de cette dernière dans le clivage protéolytique de multiples protéines incluant Notch, une protéine essentielle au développement.

1.6.7 Structure cristallographique de BACE1

L'élucidation de la structure tridimensionnelle de BACE1 par L. Hong (Hong, Koelsch et al. 2000) a grandement contribué au développement de molécules inhibitrices. La structure tridimensionnelle de BACE1 avec un inhibiteur OM-99 a révélé une poche catalytique de BACE1 plus large que pour les autres aspartyl protéases et recouverte d'une structure susceptible de modifier la liaison de l'enzyme à son substrat. La structure a aussi permis de mettre en évidence certaines liaisons entre des résidus situés sur BACE1 et des résidus situés sur son substrat APP pour expliquer la spécificité de substrat de BACE1. Notamment, il a été démontré qu'il y a création d'un lien hydrogène supplémentaire entre le résidu R296 de BACE1 et l'asparagine de la séquence APP^{swe} (NL*D) comparativement à la lysine de la séquence APP^{wt} (KM*D), créant une plus grande affinité de BACE1 pour APP^{swe} que son APP^{wt} (Sauder, Arthur et al. 2000). La double mutation swedish KM→NL a été identifiée pour la première fois dans une famille suédoise et il a été démontré qu'elle entraîne une augmentation de production de peptide amyloïde de trois à six fois par rapport à la normale (Cai, Golde et al. 1993).

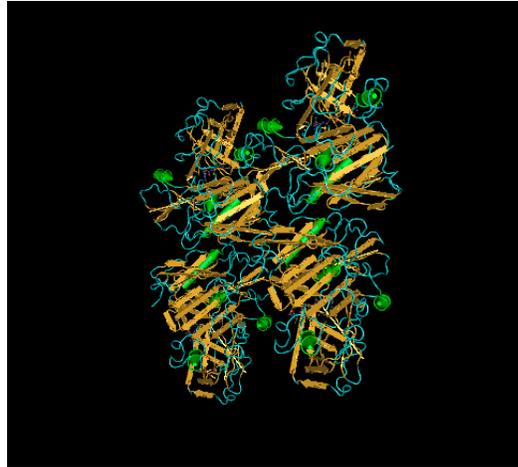


Figure 1-3 : Structure tridimensionnelle de BACE1 (Protein Data Bank)

Bien que l'élucidation de la structure tridimensionnelle de l'enzyme ait aidé au développement d'inhibiteurs, l'enzyme s'est toutefois révélée être une cible plus récalcitrante que prévu, en raison de la largeur de sa poche catalytique et de sa localisation cellulaire et tissulaire. Pour être efficaces, les inhibiteurs de BACE1 doivent être suffisamment volumineux pour occuper la majeure partie des huit sous-sites catalytiques de l'enzyme mais suffisamment petits et liposolubles pour parvenir à traverser la barrière hématoencéphalique. Cette liposolubilité est aussi essentielle pour permettre à l'inhibiteur de traverser la bicouche lipidique pour se rendre jusqu'à l'appareil de Golgi et les endosomes, où est située BACE1.

1.6.8 Substrats connus de BACE1

On a récemment identifié des substrats de BACE1 en plus d'APP, incluant la sialyltransférase ST6Gal I (Kitazume, Tachida et al. 2001), la protéine d'adhésion P-selectin glycoprotein ligand-1 (Psgl-1) (Lichtenthaler, Dominguez et al. 2003), les protéines APP-like APLP-1 (Li and Sudhof 2004) et APLP-2 (Pastorino, Ikin et al. 2004), LRP (von Arnim, Kinoshita et al. 2005), les sous-unités β des canaux sodiques voltages-dépendants VGSC β (Wong, Sakurai et al. 2005) et Neuregulin-1 de type III (Willem, Garratt et al. 2006).

1.6.9 La découverte d'une fonction pour BACE1

Malgré la découverte de ces 8 substrats de BACE, jusqu'à tout récemment, aucune fonction physiologique n'avait été identifiée pour BACE1. Récemment, on a toutefois découvert que BACE1 et NRG1 de type III sont coexprimés dans les neurones moteurs et sensitifs (Willem, Garratt et al. 2006). NRG1 de type III est une protéine impliquée dans le contrôle de la myélination des axones (Michailov, Sereda et al. 2004). La progression de la myélination a donc été suivie dans des souris BACE1 -/- qui ont démontré des déficits dans les processus de myélination. Il a été démontré que l'activité protéolytique de BACE1 catalyse le clivage de NRG1 de type III et est donc essentiel à sa maturation.

1.7 Objectif de recherche

La protéine BACE1 joue un rôle clé dans la production du peptide amyloïde. Plusieurs hypothèses soutiennent l'implication du peptide amyloïde dans la cascade d'événements menant à la dégénérescence neuronale observée chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Une accumulation du peptide amyloïde est par ailleurs observée autant dans la forme sporadique que la forme familiale de la maladie. Pour toutes ces raisons, le développement d'inhibiteurs de la protéine BACE1 semble une approche extrêmement intéressante dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. Depuis sa découverte en 1999, la protéine BACE1 a fait l'objet d'intensives recherches pourtant, plusieurs aspects de la protéine demeurent peu connus. Une fonction précise de la protéine n'a été proposée que tout récemment. BACE1 jouerait un rôle essentiel dans la régulation de la myélination des cellules neuronales. La nature peu connue de BACE1 et la récente découverte d'un rôle pour cette dernière suggèrent une certaine prudence quant à l'utilisation d'inhibiteurs dirigés contre cette protéine. Par contre, une inhibition partielle de la protéine ou la modulation de son activité pourraient s'avérer être des stratégies anti-amyloïde à la fois efficaces et sécuritaires, en n'interférant pas avec la fonction physiologique de BACE1. En se basant sur cette dernière stratégie, nous avons imaginé un système permettant d'identifier les protéines pouvant modifier l'activité de la protéine BACE1. Ce système permettrait le criblage à grande échelle de diverses protéines afin d'identifier des modulateurs de l'activité de BACE1. Ces modulateurs de l'activité de BACE1 pourraient éventuellement être ciblés de façon à réduire la production de peptide amyloïde dans la cellule.

1.7.1 Approches utilisées

Nous avons utilisé deux approches différentes pour développer notre système. Dans un premier temps, nous avons voulu développer un essai basé sur le système rapporteur luciférase. Pour ce faire, nous avons créé une lignée cellulaire exprimant le plasmide rapporteur pHES-luciférase. Nous avons ensuite généré différents gènes chimériques et mesuré l'activité luciférase de ces différents chimères. Les résultats que nous avons obtenus avec cet essai se sont avérés très variables malgré l'utilisation d'une lignée

cellulaire exprimant le plasmide rapporteur de façon stable. Nous avons donc imaginé un second système basé sur le principe du BRET2 (Bioluminescence Resonance Energy Transfer 2). Pour développer l'essai, plusieurs paramètres de l'essai ont été optimisés, notamment le type cellulaire, la méthode de transfection, la quantité d'ADN et le nombre de cellules utilisées. Nous avons validé chaque étape du développement de l'essai par analyse SDS-PAGE et immunobuvardage. Des essais supplémentaires avec un inhibiteur de BACE1 ont été utilisés.

2 Matériel et Méthodes

2.1 Techniques de base

2.1.1 Mini-préparation d'ADN plasmidique

La mini-préparation d'ADN plasmidique permet de purifier environ 5µg d'ADN plasmidique à partir d'une culture bactérienne de 5ml. On inocule 5ml de milieu LB (10g/L tryptone, 5g/L extrait de levure, 5g/L NaCl) avec une colonie d'une souche bactérienne *E.coli* et la culture bactérienne est incubée pendant une nuit complète à 37°C avec agitation à 250rpm. Le lendemain, 3ml de culture bactérienne est centrifugé à 13 000g pendant une minutes et le culot est resuspendu dans 200µl de tampon de resuspension P1 froid (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ mL RNase A). On ajoute ensuite 200µl de tampon de lyse P2 (NaOH 200mM, SDS 1%) avant de mélanger par inversion pour libérer l'ADN et on laisse incuber 5 minutes à TP. La lyse est arrêtée par l'ajout de 200µl de tampon de neutralisation P3 froid (acétate de potassium 3 M à pH 5,5). La solution est incubée sur glace pendant 5 minutes pour faire précipiter les protéines et elle est centrifugée à 13 000rpm pendant 10 minutes. Le surnageant contenant l'ADN est récupéré, on y ajoute 650µl d'isopropanol et on mélange pour faire précipiter l'ADN. La solution est ensuite centrifugée à 13 000rpm 15 minutes à 4°. Le culot est lavé avec 300µl d'éthanol 70% et centrifugé à 13 000rpm 10 minutes. L'éthanol est ensuite retiré par aspiration, le culot est séché à l'air libre pendant environ 5 minutes et resuspendu ensuite dans 30µl d'eau.

2.1.2 Digestion d'ADN

L'ADN plasmidique obtenu peut être analysé par digestion enzymatique. Généralement, la digestion enzymatique se fait dans un volume final de 20µl où on utilise 1µg d'ADN, 10U d'enzyme de restriction et le tampon de digestion spécifique à l'enzyme à une concentration finale de 1X. La solution de digestion est ensuite incubée à 37°C pendant une heure. On peut utiliser deux enzymes différentes dans une même réaction, dans ce cas, on s'assure que chacune d'elle possède au moins 75% d'activité dans le tampon choisi. S'il

est impossible de trouver un tampon dans lequel les deux enzymes seront actives, on peut procéder à une réaction de digestion séquentielle avec les deux tampons spécifiques de chaque enzyme. Pour ce faire, on effectue une première digestion enzymatique avec une seule enzyme dans un volume final de 10 μ l avec le tampon le moins chargé en sel. Après une heure d'incubation, on complète à 20 μ l avec la seconde enzyme et le tampon le plus chargé en sel et on continue la digestion pour une heure.

2.1.3 Analyse sur gel d'agarose

Les fragments obtenus après digestion peuvent être analysés sur gel d'agarose. Les fragments d'ADN sont en effet séparés en fonction de leur taille lorsqu'on les soumet à un courant électrique. Pour ce faire, on charge l'ADN dans un gel de 0.5 à 2.0% d'agarose, dépendamment de la taille attendue des fragments analysés. Plus les fragments sont courts, plus on utilisera un gel d'agarose concentré pour permettre une meilleure résolution de séparation des fragments. On ajoute du tampon de charge 5X (0.25% bleu de bromophénol, 50% glycérol, TAE1X) à l'ADN pour pouvoir facilement déposer l'ADN dans les puits du gel. L'agarose est dissout dans un tampon TAE1X (40 mM Tris:acetate, 2 mM Na₂EDTA.2H₂O) et le même tampon est utilisé pour recouvrir le gel. Le gel est aussi additionné de bromure d'éthidium (5 μ g/ml) qui permet de visualiser l'ADN sous lumière UV. La migration des fragments d'ADN est effectuée dans un appareil d'électrophorèse sous un courant de 100V de 30 à 45 minutes.

2.1.4 Extraction de l'ADN d'un gel d'agarose

Il est possible de purifier les fragments d'ADN qui ont été isolés par gel d'agarose. Pour ce faire, on utilise un kit de purification commercial (QIAQuick Gel Extraction Kit, QIAGEN). Le fragment d'ADN est d'abord excisé de l'agarose à l'aide d'une lame chirurgicale en minimisant la quantité d'agarose prélevée. Le segment d'agarose est pesé et resuspendu dans 300 μ l de tampon de dissolution QG pour chaque 100mg d'agarose 1% prélevé. L'agarose est dissout à 50°C pendant 10 minutes. On ajoute ensuite 100 μ l d'isopropanol par 100mg d'agarose dissout et la solution est appliquée sur une colonne et centrifugée à 13 000rpm pendant 1 minute. L'éluat est retiré, 750 μ l de tampon de lavage PE est appliqué sur la colonne et la colonne est centrifugée à 13 000rpm pendant 1 minute.

L'éluat est retiré et la colonne est centrifugée à 13 000rpm 1 minute pour une deuxième fois. La colonne est déposée dans un nouveau tube et on y applique 30µl d'eau. On laisse reposer la colonne 1 minute à TP avant de la centrifuger à 13 000rpm 1 minute pour éluer l'ADN. Cette procédure permet de purifier jusqu'à 10µg d'ADN à partir d'un gel d'agarose.

2.1.5 Ligation

L'ADN purifié est alors prêt à être utilisé dans une réaction de ligation. La ligation de deux molécules d'ADN, généralement un insert et un vecteur est réalisée dans un volume de réaction final de 10µl. La quantité d'ADN utilisée est dépendante de la taille des fragments à lier et de la nature de leurs extrémités. Généralement, on utilise un ratio molaire insert : vecteur de 1 : 1 lorsque les extrémités à lier sont cohésives et de 5 : 1 lorsque les extrémités à lier sont franches. Deux inserts peuvent être liés entre eux avec un ratio de 1 :1 avant d'être ligués ensemble dans un vecteur. Le ratio molaire est quand à lui calculé en fonction de la taille des fragments et de leur concentration. Une estimation de la concentration des fragments peut être obtenue en faisant migrer les fragments sur gel d'agarose et en les comparant à l'œil nu ou avec une échelle de masse moléculaire (DNA Mass Ladder, Invitrogen). La réaction de ligation est réalisée dans un tampon de ligation (66 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM dithioerythritol, 1 mM ATP, pH 7.5) spécifique à la T4 DNA ligase avec 1U de T4 DNA ligase (Roche Applied Science). La réaction de ligation est réalisée dans un appareil à PCR où elle est incubée à 20°C pendant une heure et ensuite soumise à 30 cycles : 1 minute à 16°C, 30 secondes à 30°C.

2.1.6 Transformation bactérienne par choc thermique

Les produits de ligation doivent ensuite être amplifiés pour obtenir une quantité de plasmide suffisante pour travailler. Pour ce faire, les plasmides sont introduits par choc thermique dans des bactéries *E.coli* DH5a compétentes (Invitrogen), qui vont produire le plasmide en grande quantité. Un aliquot de 20µl de cellules compétentes est dégelé sur glace et on y ajoute environ 10 à 50ng d'ADN, soit environ 3µl du produit de ligation. Les cellules sont incubées sur glace 30 minutes et le choc thermique est induit à 42° pendant 30 secondes. Les cellules sont remises sur glace pendant 2 minutes. On ajoute ensuite 950µl

de milieu de croissance LB stérile et les cellules sont incubées une heure à 37°C. Les cellules sont finalement étalées sur un pétri de LB solide contenant l'antibiotique de sélection adéquat et incubées à 37°C jusqu'au lendemain pour voir apparaître les colonies de transformants.

2.1.6.1 Criblage des transformants

À la suite de la transformation, il est nécessaire de s'assurer que les plasmides qui ont été intégrés par les transformants contiennent bel et bien l'insert. Pour ce faire, on sélectionne une dizaine de clones qui sont repiqués dans 5ml de LB avec antibiotique pour préparer des mini-préparations d'ADN plasmidique (cf. 2.1.1). L'ADN obtenu est ensuite digéré (cf. 2.1.2) avec les mêmes enzymes de restriction qui ont servis au clonage. Les produits de digestion sont ensuite analysés sur gel d'agarose (cf. 2.1.3) pour vérifier la présence de deux bandes : une correspondant à l'insert et la seconde correspondant au vecteur.

2.1.7 PCR

Dans mes travaux, les inserts qui ont été utilisés pour les différents clonages ont été soit isolés à partir de fragments d'ADN déjà clonés ou créés directement par synthèse d'ADN. Lorsqu'il existe dans le laboratoire un plasmide qui contient déjà l'insert voulu bordé des sites de restriction souhaités, il suffit de digérer le plasmide à ces sites de restrictions, d'isoler l'insert et de le liguer dans un nouveau plasmide. Toutefois, cette solution n'est que rarement possible. Souvent, il est nécessaire d'amplifier une séquence d'ADN désirée à partir d'ADN plasmidique ou d'ADNc en utilisant des amorces spécifiques à cette séquence. Les amorces servent aussi à ajouter les sites de restriction voulus aux extrémités des séquences d'ADN amplifiée de façon à permettre leur clonage dans des vecteurs d'expression. L'amplification du gène d'intérêt est réalisée dans un volume de réaction final de 50µl. Le mélange d'amplification contient 0.4µM d'amorce sens « forward », 0.4µM d'amorce antisens « reverse », 400µM de chaque dNTP, 1U d'enzyme DNA polymerase Phusion (New England Biolabs), environ 1µg d'ADN et le tampon de réaction à une concentration finale de 1X. L'ADN polymerase Phusion est utilisée pour l'amplification d'ADN qui servira au clonage en raison de sa grande vitesse de synthèse et de sa haute fidélité, elle possède en fait un taux d'erreur 50X moins élevé que la Taq

polymérase ordinaire. Les conditions générales de PCR pour l'enzyme Phusion sont présentées dans le tableau 2-1. La température d'hybridation est dépendante des T_m des amorces utilisées et est donc différentes selon les réactions. Le T_m est calculé selon la formule ($T_m = 62.3 + (0.41X(\%G+C)) - (500/nb \text{ bases})$). Le temps d'extension est calculé en fonction de la longueur du produit de PCR attendu, généralement de 30sec/Kb. Alternativement, lorsque la fidélité de l'amplification n'est pas importante, comme lors de la vérification de clones, la Taq polymérase est utilisée. Les conditions générales de PCR pour l'enzyme Taq polymérase sont identiques à celles de la polymérase Phusion mais la dénaturation est effectuée à 94°C au lieu de 95°C et on n'ajoute pas 3°C à la valeur du T_m .

	Température	Temps	Cycles
Dénaturation initiale	95°C	4min	1
Amplification			
Dénaturation	95°C	30sec	30-35
Hybridation	Variable (=T _m +3°C)	30sec	
Extension	72°C	Variable (=30sec/kb)	
Extension finale	72°C	10min	1

Figure 2-1 : Conditions générales de PCR avec l'enzyme Phusion

2.1.8 Synthèse d'ADN par hybridation d'oligonucléotides

Il est aussi possible de créer des inserts en hybridant une paire d'oligonucléotides sens et antisens directement entre eux. Dans ce cas, les extrémités des oligonucléotides utilisés sont générées de façon à ce qu'à la suite de l'hybridation des deux oligonucléotides, les duplex créés possèdent déjà des extrémités cohésives. Il n'est donc pas nécessaire de digérer le produit d'hybridation pour sa ligation dans un vecteur. Généralement, on utilise 25µM de chacun des oligonucléotides avec du tampon One-Phor-All (Pharmacia) dans un volume de réaction final de 20µl. La réaction de ligation se fait dans un appareil à PCR selon les conditions suivantes : 2min à 94°C, 30sec à 37°C, 30sec à 22°C, 30sec à 4°C, 20 minutes à 22°C. On utilise généralement 50nM soit 2µl de la réaction diluée 1/100 pour la ligation dans un vecteur.

2.2 Technique de biologie cellulaire

2.2.1 Transfection au chlorure de calcium

Selon la méthode de transfection au chlorure de calcium, les cellules sontensemencées à une densité de $1.5 \text{ à } 2.0 \times 10^6$ cellules/pétris de 100mm et incubées pour une période d'environ 16 heures. Un maximum de $20\mu\text{g}$ d'ADN plasmidique est combiné à $40\mu\text{l}$ de TE 10X (100mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA) et le volume est ensuite complété à $250\mu\text{l}$ avec de l'eau distillée. $250\mu\text{l}$ de chlorure de calcium 0.5M sont ajoutés au mélange. Finalement, $500\mu\text{l}$ de HEBS 2X (50mM HEPES, 280mM NaCl, 1,5mM Na_2HPO_4 , pH 7,05) est ajouté, goutte-à-goutte, au mélange précédent et le tube de réaction est agité doucement en donnant 15 coups à la base du tube avec le doigt, afin de favoriser la formation de bulles d'air dans le tube. Après 30 minutes d'incubation, le mélange est ajouté aux cellules et les cellules sont incubées pour une période de 24 heures. Après 24 heures, les cellules sont lavées avec du PBS1X, le milieu est remplacé par du milieu frais et les cellules sont incubées pour une seconde période de 24 heures.

2.2.2 Transfection à la lipofectamine 2000

Selon la méthode de transfection à la lipofectamine 2000 (Invitrogen), les cellules sontensemencées à une densité de 1.5×10^5 cellules/puits de 35mm et incubées pour une période d'environ 16 heures. Dans un premier tube, $2\mu\text{g}$ d'ADN plasmidique sont dilués dans $250\mu\text{l}$ d'Opti-MEM (Invitrogen). Dans un second tube, $4\mu\text{l}$ de Lipofectamine 2000 (ratio ADN : Lipofectamine 2000 de 1 :2) sont dilués dans $250\mu\text{l}$ d'Opti-MEM et incubés 5 minutes. Le contenu des deux tubes est ensuite combiné, mélangé par inversion et incubé 15 minutes. La solution finale est ajoutée aux cellules et les cellules sont incubées pour une période de 5 heures. Après 5 heures, le milieu est remplacé par du milieu frais et les cellules sont incubées pour une période supplémentaire de 48 heures.

2.2.3 Extraction d'ARN au trizol

Suite à la transfection, il est possible de vérifier si le gène d'intérêt a été intégré en effectuant une extraction de l'ARN total au trizol et en vérifiant ensuite la présence du gène par PCR. Le milieu de culture est enlevé et les cellules sont récoltées dans 1ml de Trizol

(Invitrogen) par pétri de 100mm. Les cellules sont transférées dans un microtube et incubées pendant 5 minutes à TP pour permettre la dissociation complète des complexes nucléoprotéiques. Deux cents microlitres de chloroforme 100% sont ensuite ajoutés aux extraits, le tube est mélangé durant 15 secondes et incubé à TP de 2 à 3 minutes. Les extraits sont ensuite centrifugés à 13 000rpm pendant 15 minutes à 4°C. Cette étape permet de séparer l'ARN, qui se retrouvera dans la phase aqueuse, de l'ADN et des protéines qui se retrouveront dans la phase intermédiaire et organique. La phase aqueuse est donc transférée dans un autre tube en y ajoutant 500µl d'isopropanol 100% par ml de trizol utilisé afin de faire précipiter l'ARN. La solution est mélangée, incubée 10 minutes à TP et centrifugée à 13 000rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est retiré, et le culot d'ARN est lavé avec 500µl d'éthanol 70%, bien mélangé et centrifugé à 13 000rpm pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est retiré, le culot est séché à l'air libre quelques minutes puis resuspendu dans 50µl d'eau. L'ARN extrait peut être conservé à -20°C.

2.2.4 Transcription inverse

Pour analyser l'ARN extrait, il est nécessaire de convertir l'ARN en ADNc par la méthode de transcription inverse. L'ADNc obtenu peut ensuite être utilisé dans une réaction de PCR. On utilise généralement 2µg d'ARN auquel on ajoute 1,25µg d'oligos dT (Pharmacia) et la solution est complétée avec de l'eau pour obtenir un volume final de 29µl. La solution d'ARN est chauffée 10 minutes à 70°C dans un appareil à PCR. On ajoute ensuite 10µl de tampon 5X de l'enzyme Reverse Transcriptase Superscript (Invitrogen), 5µl de DTT 0.1M et 2.5µl de mélange de dNTPs à 10mM chacun. La solution est chauffée 2 minutes à 42°C, on ajoute 200U d'enzyme RT SuperScript (Invitrogen) et la solution finale est chauffée 50 minutes à 42°C. L'enzyme RT est ensuite inactivée en plaçant le tube de réaction 15 minutes à 70°C.

2.2.5 Analyse sur gel SDS-PAGE

Il est possible d'analyser l'expression d'une protéine particulière après transfection en effectuant une analyse sur gel SDS-PAGE suivie d'un immunobuvardage. Les cellules transfectées sont d'abord lavées avec du PBS1X puis resuspendues dans du tampon de lyse. La composition du tampon de lyse varie en fonction des protéines à analyser. Les cellules

sont incubées sur glace pendant une période de 30 minutes et ensuite passées 10 fois à travers une aiguille 23g (Terumo) afin de dissocier les amas protéiques. Les cellules sont centrifugées à 13 000rpm 15 minutes à 4°C et le surnageant est récupéré dans un nouveau tube. Un volume égal de tampon de chargement pour protéines (0,5M Tris-HCl pH 6,8, 20% glycérol, 10% SDS, 0,1% bleu bromophénol et 5% β -mercaptoéthanol) est ajouté aux extraits. Les extraits sont bouillis 3 à 5 minutes avant d'en charger 30 μ l sur un gel SDS-PAGE de 6 à 12% d'acrylamide. Les extraits sont migrés 1h30 à 150V dans un appareil à électrophorèse en présence d'un marqueur de poids protéique (BenchMark Prestained Protein Ladder, Invitrogen) dans du tampon de migration 1X (tampon 10X : 29g Tris, 144g Glycine, 10g SDS dans 1L d'eau).

2.2.6 Immunobuvardage

Après la migration, les protéines ayant migré à l'intérieur du gel sont transférées sur une membrane de PVDF (Amersham) pour pouvoir procéder à l'immunobuvardage. Avant le transfert, la membrane est équilibrée 30 secondes dans du méthanol, 1 minute dans de l'eau distillée et jusqu'à 20 minutes dans du tampon de transfert (12mM Tris, 96mM glycine, 20% méthanol). Un montage est alors réalisé en ajoutant dans l'ordre une éponge, un papier filtre, le gel, la membrane, un papier filtre et une éponge. Les bulles sont délicatement enlevées du montage par une légère pression et le montage est mis dans la cassette de transfert (BioRad). La cassette est insérée dans une cuvette de transfert avec un réfrigérant et recouverte de tampon de transfert. Le transfert est effectué à 4°C O.N à 100 mA ou 2h à 250 mA. Suite au transfert, la membrane est soumise à l'immunobuvardage. La membrane est bloquée en l'incubant dans du TBS-Tween (6.05g/L Tris pH7.5, 8.76g/L NaCl, 0.1% Tween-20) 5% lait en poudre 1 heure à TP. L'anticorps primaire dilué selon la concentration recommandée est ajouté dans 10 ml de TBS-Tween 5% lait et agité 1 heure à TP. La membrane est lavée dans du TBS-Tween 6 fois 5 minutes avec agitation à TP. L'anticorps secondaire est dilué dans 10 ml de TBS-Tween 5% lait et incubé 45 minutes à TP avec agitation. La membrane est lavée 6 fois 5 minutes avec agitation dans du TBS-Tween à TP une dernière fois avant d'être révélée avec le kit ECL plus (Amersham). La solution B est diluée 1 :40 dans la solution A et déposée sur la membrane en incubant 5 minutes. La membrane est asséchée entre 2 papier et enveloppée dans du papier cellophane

en faisant attention de faire le moins de bulle possible. La membrane est exposée avec un film dans une chambre noire selon le temps désiré et développée.

2.3 Le système rapporteur luciférase

2.3.1 Principe des gènes rapporteurs

Les systèmes de gènes rapporteurs sont largement utilisés en biologie moléculaire à de multiples applications. Brièvement, le concept de gène rapporteur repose sur le fait qu'une séquence nucléotidique introduite dans un système biologique génère un phénotype mesurable lorsqu'elle est exprimée. Au départ, les systèmes rapporteurs étaient surtout utilisés pour l'analyse d'éléments génétiques agissant en cis, tels les promoteurs ou enhancers mais on les utilise maintenant à d'autres usages, telles l'analyse de facteurs de transcription.

2.3.1.1 Principe du système rapporteur luciférase

Un des systèmes rapporteurs les plus utilisés aujourd'hui est le système basé sur l'expression de la protéine bioluminescente luciférase. L'enzyme luciférase catalyse l'oxydation de la luciférine en présence d'ATP, de Mg^{2+} et d' O_2 pour générer de l'oxyluciférine et de la lumière à une longueur d'onde de 562nm. Dans le système rapporteur luciférase, on peut cloner un gène d'intérêt en amont du gène de la luciférase afin que l'expression de la luciférase devienne sous le contrôle de ce gène d'intérêt. L'activité transcriptionnelle du gène est alors mesuré par l'expression de la luciférase. La détection de l'activité luciférase est réalisée *in vitro*, après extraction protéique et ajout du substrat luciférine, d' O_2 et d'ATP.

2.3.2 Clonages des gènes chimériques

Nous avons utilisé un plasmide d'expression du gène de la luciférase placé sous le contrôle du promoteur *hes*. La suite de notre essai reposait ensuite sur l'activité transcriptionnelle du domaine intracellulaire de Notch-1 (NICD) qui est libéré dans l'espace intracellulaire suite au clivage intramembranaire de Notch-1 (Schroeter, Kisslinger et al. 1998). Il a été démontré que suite au clivage de Notch-1, NICD transloque à l'intérieur du noyau

cellulaire pour activer la transcription de plusieurs gènes, un des mieux caractérisé étant le gène *hes* (Jarriault, Brou et al. 1995). Nous avons donc généré des gènes chimériques en clonant différentes portions du gène *notch-1* en aval de régions déterminées du gène APP comprenant le site β , le site de clivage de BACE1 sur APP. Les différentes constructions réalisées sont décrites ci-dessous et représentées dans la figure 2-5.

2.3.2.1 Clonage du plasmide pCDNA3/ β -site short/H-Notch

Le plasmide pCDNA3/ β -site short/H-Notch a été construit en deux temps. Premièrement, le gène H-Notch a été excisé du plasmide pGADT7/H-Notch par digestion EcoRI/ XhoI. Le fragment a ensuite été ligué à l'intérieur du vecteur pCDNA3 à l'intérieur des sites EcoRI et XhoI. Deuxièmement, la région entourant le site de clivage β d'APP a été amplifiée à partir du plasmide pCDNA3/APPwt avec les amorces P167 et P46. L'amorce P167 « forward » contenait le site de restriction EcoRI en 5' (voir séquence soulignée ci-dessous) tandis que l'amorce P46 « reverse » ne contenait aucun site de restriction. Les séquences des amorces synthétisées (Service de Synthèse de Peptides de l'Est) sont les suivantes : P167 5'-TTTTGAATTCGTTGATGCCCCGCCCTGCT-3' et P46 5'-TTTCTCGAGGTTCTGCATCTGCTCAAG -3'. Le fragment d'APP amplifié par ces deux amorces est représenté dans la figure 2-2. Finalement, le fragment a été inséré au site EcoRI en amont du gène H-Notch, à partir du plasmide pCDNA3/N-Notch construit dans la première partie du clonage. L'orientation de l'insert a été vérifiée par digestion avec BglII. Le plasmide final a été vérifié par séquençage (Service de Synthèse de Peptides de l'Est).

Amorces	Séquence	Application
P167F	5'-TTTTGAATTCGTTGATGCCCCGCCCTGCT-3'	Amplification de β -cleavage
P146R	5'-TTTCTCGAGGTTCTGCATCTGCTCAAG -3'	site short
P167F	5'-TTTTGAATTCGTTGATGCCCCGCCCTGCT-3'	Vérification de l'orientation
P110R	5'-TTTGTAGCTCGAGCTTGAACGCCTCCGGGATG-3'	
P159F	5'-TCGTAACAACCTCCGCCCAT-3'	Séquençage
P99R	5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'	

Tableau 2-1 : Amorces utilisées lors du clonage du plasmide pCDNA3/ β -site short/H-Notch.

2.3.2.2 Clonage du plasmide pCDNA3/ β -site long/H-Notch

Le plasmide pCDNA3/ β -site long/H-Notch a aussi été construit en deux temps. Premièrement, le gène H-Notch a été excisé du plasmide pGADT7/H-Notch par digestion EcoRI/ XhoI. Le fragment a ensuite été ligué à l'intérieur du vecteur pCDNA3 à l'intérieur des sites EcoRI et XhoI. Deuxièmement, la région entourant le site de clivage β d'APP a été amplifiée à partir du plasmide pCDNA3/APPwt avec les amorces P167 et P168. Les amorces P167 « forward » et P168 « reverse » contenait chacune un site de restriction EcoRI en 5' (voir séquences soulignées ci-dessous). L'amorce P168 permettait d'introduire une mutation silencieuse TTC→TTT à la position F599 d'APP afin d'éliminer le site de restriction naturel EcoRI. L'élimination du site naturel EcoRI et l'introduction subséquente d'un nouveau site EcoRI en aval du site initial à l'aide de l'amorce P168 a permis de générer un fragment d'APP légèrement plus long que pour la construction précédente dite courte. Cette deuxième construction, dite longue, a été générée à des fins de vérification, afin de s'assurer que la séquence en aval du site β dans la construction courte n'était pas nécessaire pour le clivage efficace de BACE1 au site β . Les séquences des amorces synthétisées (Service de Synthèse de Peptides de l'Est) sont les suivantes : P167 5'-TTTTGAAATTCGTTGATGCCCGCCCTGCT-3' et P168 5'-TTTTGAAATTCCTCCTGAGTCATGTCGAAATTCTG-3'. Le fragment d'APP amplifié par ces deux amorces est représenté dans la figure 2-2. Finalement, le fragment a été inséré au site EcoRI en amont du gène H-Notch, à partir du plasmide pCDNA3/N-Notch construit dans la première partie du clonage. L'orientation de l'insert a été vérifiée par digestion avec BglII et confirmée par PCR avec les amorces P159 et P46. Le plasmide final a été vérifié par séquençage (Service de Synthèse de Peptides de l'Est).

Amorces	Séquence	Application
P167F	5'-TTTTGAATTCGTTGATGCCCCGCCCTGCT-3'	Amplification de β - cleavage site long
P168R	5'-TTTTGAATTCTCCTGAGTCATGTCGAAATTCTG-3'	
P167F	5'-TTTTGAATTCGTTGATGCCCCGCCCTGCT-3'	Vérification de l'orientation
P22R	5'-TTTTCTCGAGCACGTCTGCCTGGCTCG-3'	
P159F	5'-TCGTAACAACCTCCGCCCAT-3'	Séquençage
P99R	5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'	

Tableau 2-2 : Amorces utilisées lors du clonage du plasmide pCDNA3/ β -site long/H-Notch.

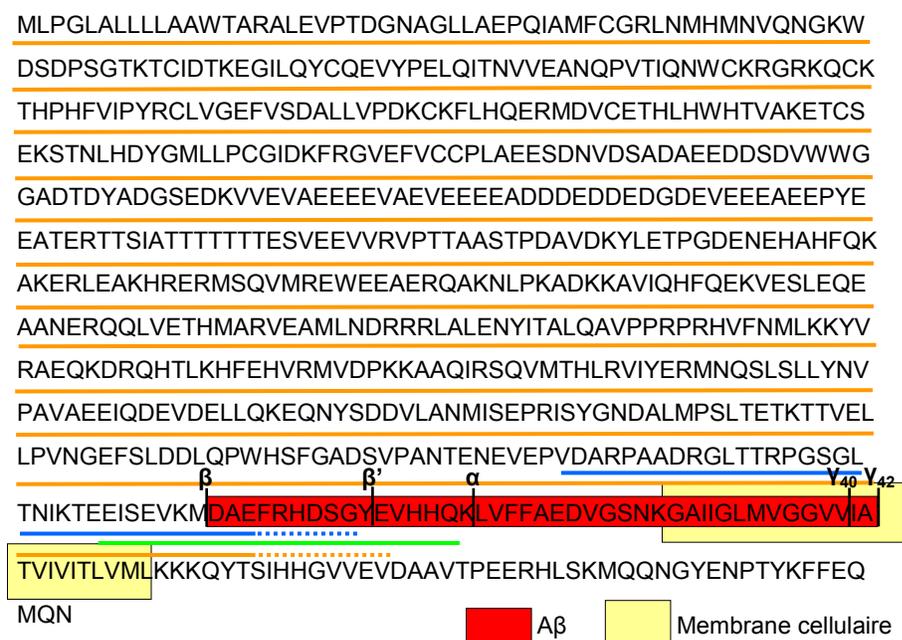


Figure 2-2 : Sommaire des régions d'APPwt amplifiées pour le clonage des différentes constructions chimériques. Les acides aminés amplifiés pour chacune des constructions sont soulignés d'un trait. β -site short (trait bleu plein) ; β -site long (trait bleu plein et pointillé) ; $\beta\beta'$ (trait vert) ; APP5' \rightarrow β (trait orange plein) ; APP5' \rightarrow $\beta\beta'$ (trait orange plein et pointillé). Les sites de clivage, le domaine A β et la membrane cellulaire sont représentés pour permettre de situer les différentes régions amplifiées.

2.3.2.3 Clonage du plasmide pCDNA3/actine/ $\beta\beta'$ /NICD

La construction pCDNA3/actine/ $\beta\beta'$ /NICD a été imaginée de façon à empêcher la libération de NICD en l'absence de clivage par BACE au site $\beta\beta'$. En effet, la protéine de fusion contient le gène de l'actine pour permettre à la protéine chimérique d'être retenue à la membrane cellulaire. Suite au clivage de BACE au site $\beta\beta'$, la portion NICD est relâchée pour se lier au promoteur pHES et activer la transcription du gène de la luciférase. L'actine a tout d'abord été amplifiée à partir d'ADN total extrait de cellules HEK293 en utilisant les amorces P199 5'-TTTTAAGCTTATGGATGATGATATCG-3' et P200 5'-TTTAGATCTTGAAGCATTGCGGTGGACG-3'. Les amorces contenaient en 5' les sites de restriction HindIII et BglII respectivement. Le fragment d'APP contenant le site β ainsi que le site β' , les sites de clivage de BACE et site de clivage alternatif de BACE, a été amplifié à partir du plasmide pCDNA3/APPwt avec les amorces P45 5'-CGCGCAGAACAGAAGGACAG-3' et P201 5'-TTTATCGATTTGATGATGAACTTC-3'. L'amorce P201 a été dessinée afin de contenir le site de restriction ClaI à son extrémité 5'. Enfin, le domaine intracellulaire de Notch, NICD, a été amplifié à partir de pSP72/NotchN1 avec les amorces P202 5'-TTTATCGATGGCTTCAAAGTGTCTG-3' et P203 5'-TTTTCTCGAGCACGTCTGCCTGGCTCGG-3'. Les amorces contenaient en 5' les sites de restriction ClaI et XhoI, respectivement. Nous avons ensuite employé diverses stratégies de clonage afin de cloner les 3 fragments en fusion dans le vecteur pCDNA3 provenant du plasmide pCDNA3/PS1 5'myc digéré aux sites HindIII et XhoI pour retirer l'insert PS1 5'myc. Tout d'abord, nous avons tenté de lier les 4 fragments ensemble dans les mêmes rapports équimolaires dans une seule réaction de ligation. Ensuite, nous avons tenté de lier les 3 inserts ensemble dans des rapports équimolaires pour ensuite les lier dans le vecteur pCDNA3.

Amorces	Séquence	Application
P199F	5'-TTTAAAGCTTATGGATGATGATATCG-3'	Amplification de
P200R	5'-TTTATAGATCTTGAAGCATTGCGGTGGACG	l'actine à partir d'ADNc
P45	5'-CGCGCAGAACAGAAGGACAG-3'	Amplification de $\beta\beta'$
P201	5'-TTTTATCGATTTGATGATGAACTTC-3'	site à partir de pCDNA3/APPwt
P202F	5'-TTTTATCGATGGCTTCAAAGTGTCTG-3'	Amplification de
P203R	5'-TTTTCTCGAGCACGTCTGCCTGGCTCGG-3'	NICD à partir pSP72/NotchN1

Tableau 2-3 : Amorces utilisées lors du clonage du plasmide pCDNA3/actine/ $\beta\beta'$ /NICD.



Figure 2-3 : Sommaire des différentes régions de Notch-1 amplifiées pour le clonage des différentes constructions chimériques. La portion H-Notch (bleu pâle et foncé) contient une extension de 24 acides aminés, situés en amont du site de clivage γ , par rapport à la portion NICD. Neuf acides aminés compris dans cette extension sont situés dans l'espace intracellulaire.

2.3.2.4 Clonage du plasmide pCMVzeo/APP5' \rightarrow β /H-Notch

Le plasmide pCMVzeo/APP/H-Notch a été cloné dans le même but que le plasmide pCDNA3/actine/ $\beta\beta'$ /NICD, c'est-à-dire pour retenir la protéine chimérique à la membrane et permettre la libération du fragment H-Notch seulement lors du clivage de BACE au site β . Le fragment d'APP qui a été cloné s'étend de l'extrémité 5' du gène jusqu'au site β ,

sans inclure le site β et α et est représenté dans la figure 2-2. Nous avons utilisé le plasmide pCMVzeo/H-Notch qui a été digéré et linéarisé avec l'enzyme de restriction EcoRI. Le fragment d'APP a été isolé du plasmide pCDNA3/APPwt par digestion avec EcoRI. L'insert a été ligué dans le vecteur linéarisé et son orientation a été vérifiée par digestion au site BglII.

2.3.2.5 Clonage du plasmide pCMVzeo/APP5'→ $\beta\beta'$ /H-Notch

Le plasmide pCMVzeo/APP5'→ $\beta\beta'$ /H-Notch a été construit avec la même stratégie que le plasmide pCMVzeo/APP5'→ β /H-Notch (cf.2.3.2.4) mais afin de contenir le site β' en plus du site β . Le fragment d'APP a été amplifié avec les amorces P43F 5'-TTTTGAATTCATGCTGCCCGGTTTGGCA-3' et P209R 5'-TTTTGAATTCTTCATATCCTGAGTCATGTCGAAATTCTG-3'. Les amorces P43 et P209 ont été dessinées de façon à contenir le site de restriction EcoRI à leur extrémité 5'. L'amorce P209 permettait d'introduire une mutation silencieuse TTC→TTT à la position F599 d'APP afin d'éliminer le site de restriction naturel EcoRI. Cette mutation et la création d'un nouveau site EcoRI a permis d'introduire le site β' , situé en aval du site de restriction original EcoRI. Le fragment d'APP amplifié par ces deux amorces est représenté dans la figure 2-2.

Amorces	Séquence	Application
P43F	5'-TTT <u>TGAATTC</u> ATGCTGCCCGGTTTGGCA-3'	Amplification de
P209R	5'-TTT <u>TGAATTC</u> TTCATATCCTGAGTCATGTCGAAATTCTG-3'	APP5'→ $\beta\beta'$

Tableau 2-4 : Amorces utilisées lors du clonage du plasmide pCMVzeo/APP5'→ $\beta\beta'$ /H-Notch.

2.3.2.6 Clonage du plasmide pCMVzeo/swe β site/H-Notch

Dans ce plasmide, le site β a aussi été amplifié à partir de la séquence APP portant la mutation swedish (cf.1.6.7). Le fragment contenant le site β a été amplifié avec les amorces P167 et P168 selon la même approche que pour le plasmide pCDNA3/ β -site long/H-Notch (cf.2.3.2.2). La seule différence entre les deux constructions est la substitution des acides aminés KM pour NL. Le fragment d'APP amplifié par ces deux amorces est représenté à la figure 2-2.

Amorces	Séquence	Application
P167F	5'-TTTTGAATTCGTTGATGCCCCGCCCTGCT-3'	β -cleavage site long
P168R	5'-TTTTGAATTCTCCTGAGTCATGTCGAAATTCTG-3'	
P167F	5'-TTTTGAATTCGTTGATGCCCCGCCCTGCT-3'	Vérification de
P22R	5'-TTTTCTCGAGCACGTCTGCCTGGCTCG-3'	l'orientation
P159F	5'-TCGTAACAACCTCCGCCCAT-3'	Séquençage
P99R	5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'	

Tableau 2-5 : Amorces utilisées lors du clonage du plasmide pCMVzeo/swedish/H-Notch

2.3.2.7 Clonage du plasmide pCMVzeo/APPswe5' → $\beta\beta'$ /H-Notch

Nous avons aussi généré une deuxième construction à partir de la séquence d'APP portant la mutation swedish KM → NL. Le plasmide pCMVzeo/APPswe5' → $\beta\beta'$ /H-Notch a été construit avec la même stratégie que le plasmide pCMVzeo/APP5' → β /H-Notch (cf.2.3.x) afin de contenir le site β' en plus du site β . Le fragment d'APPswe a été amplifié avec les amorces P43F 5'-TTTTGAATTCATGCTGCCCCGTTTGGCA-3' et P209R 5'-TTTTGAATTCTTCATATCCTGAGTCATGTCGAAATTCTG-3'. Les amorces P43 et P209 ont été dessinées de façon à contenir le site de restriction EcoRI à leur extrémité 5'. L'amorce P209 permettait d'introduire une mutation silencieuse TTC → TTT à la position F599 d'APP afin d'éliminer le site de restriction naturel EcoRI. Cette mutation et la création d'un nouveau site EcoRI a permis d'introduire le site β' , situé en aval du site de restriction original EcoRI.

Amorces	Séquence	Application
P43F	5'-TTTTGAATTCATGCTGCCCCGTTTGGCA-3'	Amplification
P209R	5'-TTTTGAATTCTTCATATCCTGAGTCATGTCGAAATTCTG-3'	de APPswe5' → $\beta\beta'$

Tableau 2-6 : Amorces utilisées lors du clonage du plasmide pCMVzeo/APPswe5' → $\beta\beta'$ /H-Notch

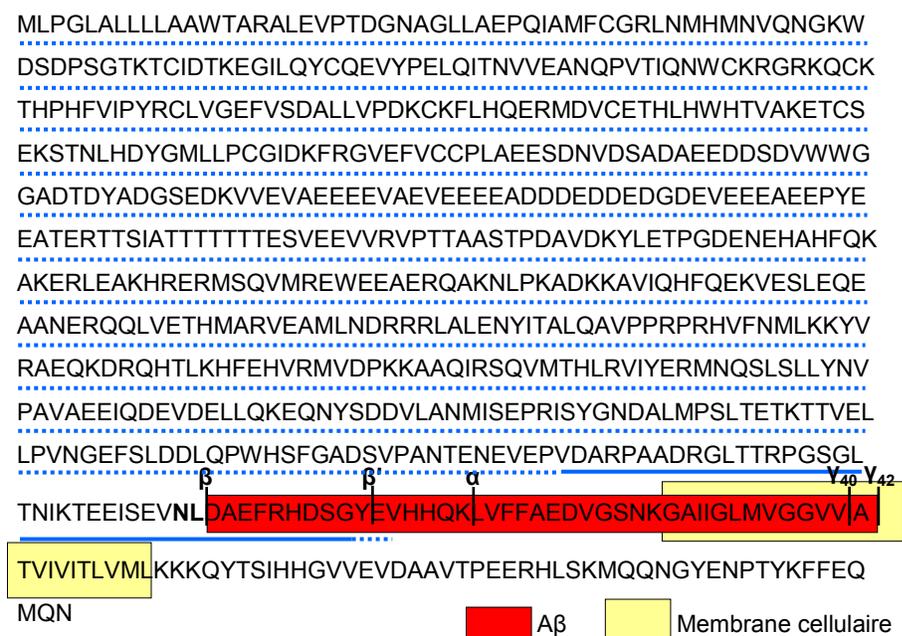


Figure 2-4 : Sommaire des régions d'APP_{swe} amplifiées pour le clonage des différentes constructions chimériques. Les acides aminés amplifiés pour chacune des constructions sont soulignés d'un trait. sweβ-site (trait bleue plein) ; APP_{swe}5' → ββ'/H-Notch (trait bleu plein et pointillé). Les sites de clivage, le domaine Aβ et la membrane cellulaire sont représentés pour permettre de situer les différentes régions amplifiées.

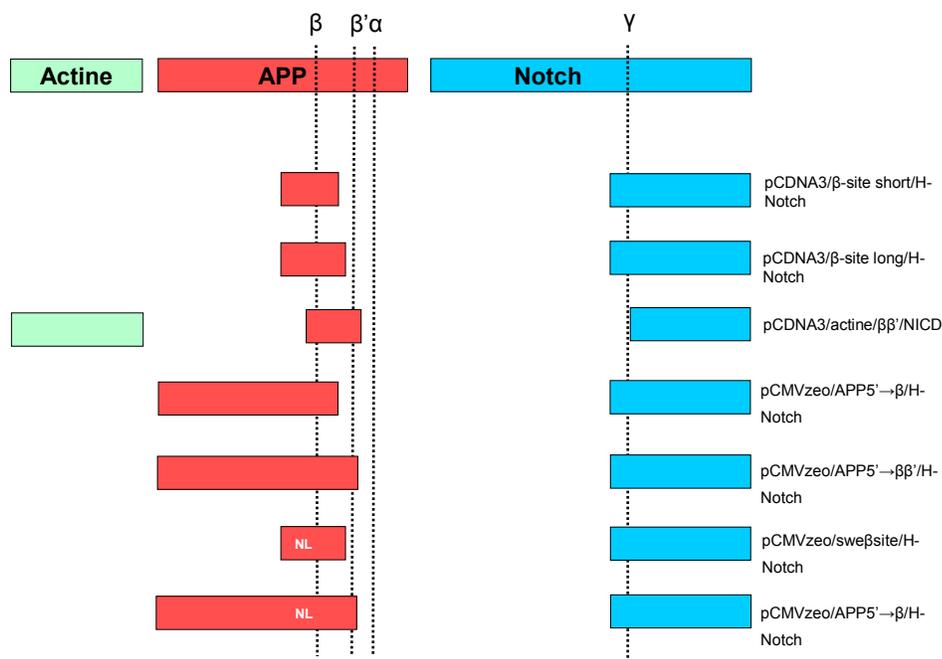


Figure 2-5 : Représentation schématique des différentes protéines chimériques créées pour le projet luciférase.

2.3.3 Clonage de BACE et des variants de BACE

Pour vérifier l'activité de BACE sur les protéines chimériques décrites ci-dessus (cf.2.3.2) nous avons généré différents variants de BACE. Les caractéristiques de la protéase BACE ont été décrites plus en détails au point 1.6. Certains variants inactifs de la protéine BACE ont été créés dans des études précédentes. Dans une des études originales qui a identifié que BACE était la β -sécrétase, deux mutants de BACE ont été créés par mutation de résidus aspartate D93 et D289. La production d'APPs- β a été abolie avec ces deux mutants comparativement à BACEwt, suggérant que BACE était une protéase de type aspartyl protéase (Hussain, Powell et al. 1999). Le mutant BACE D93A a été généré par une simple substitution A \rightarrow G à la position 278 de l'ADNc de BACE, créant un changement d'acide aminé D \rightarrow A dans le site actif N-terminal de la protéine. Quant à lui, le mutant BACE D289A a été généré par une simple substitution A \rightarrow G à la position 866 de l'ADNc de BACE, créant un changement d'acide aminé D \rightarrow A dans le site actif C-terminal de la protéine. Il a été démontré que ces mutations diminuent la production d'amyloïde- β par rapport à la protéine sauvage lorsque surexprimées (Hussain, Powell et al. 1999; Bennett,

Denis et al. 2000; Benjannet, Elagöz et al. 2001; Huse, Byant et al. 2003). Le double-mutant BACE D93AD289A possède les deux mutations décrites ci-dessous et son inactivité a aussi été confirmée (von Arnim, Tangredi et al. 2004). Notre laboratoire possède tous ces variants de BACE clonés à l'intérieur du vecteur pCDNA3.1zeo. Pour notre étude, nous avons cependant re-clonés ces variants dans le vecteur pCMVzeo.

2.3.3.1 Clonage de pCMVzeo/BACE

L'insert BACE a été obtenu à partir du plasmide pCDNA3.1zeo/BACE digéré EcoRI/XhoI. L'insert a ensuite été cloné à l'intérieur du plasmide pCMVzeo digéré et linéarisé aux sites EcoRI et XhoI. Le plasmide final a été vérifié par digestion.

2.3.3.2 Clonage de pCMVzeo/BACED93A, pCMVzeo/BACED289A et pCMVzeo/BACED93AD289A

Les plasmides ont été clonés de la même façon que le plasmide pCMVzeo/BACE (cf.2.3.3.1) à partir de plasmides pCDNA3 existants.

2.3.4 Expression des gènes chimériques

Les gènes chimériques ont ensuite été exprimés par co-transfection avec les plasmides codant pour BACE ou les variants de BACE par transfection transitoire dans des cellules normales ou dans une lignée cellulaire stable que nous avons établie et qui exprime pHES-luciférase.

2.3.5 Culture cellulaire

Toutes les cellules ont été mises en culture à 37° dans un incubateur en présence de 5% de CO₂. Les cellules embryonnaires rénales humaines HEK293 et HEK293T ont été cultivées dans du milieu DMEM (GIBCO) en présence de 10% FBS. Les cellules rénales de singe vert africain (AGM) COS-1 ont aussi été maintenues dans du milieu DMEM (GIBCO) en présence de 10% FBS.

2.3.6 Transfection transitoire

Les différents plasmides ont été transfectés de façon transitoire par la méthode au chlorure de calcium (cf. 2.2.1).

2.3.7 Établissement d'une lignée cellulaire stable

Une lignée cellulaire HEK293 exprimant le plasmide pHES-luciférase de façon stable a été établie par sélection à la néomycine.

2.3.8 Clonage de pHES/luciférase/neomycine

Pour permettre la sélection du plasmide pHES-luciférase, nous avons choisi de cloner le gène de la néomycine directement à l'intérieur du plasmide pHES-luciférase. Le gène de la néomycine a été amplifié à partir du plasmide pCDNA3 avec les amorces P185 et P186. L'amorce P185 « forward » contenait un site de restriction Sall en 5' (voir séquence soulignée ci-dessous). Les séquences des amorces synthétisées (Service de Synthèse de Peptides de l'Est) sont les suivantes : P185 5'-TTTGTGTCGACCCAGGCAGGCAGAAGTATG-3' et P186 5'-TGCTTCCGGCTCGATTGTTG-3'. Le fragment amplifié a été inséré au site Sall en aval du gène luciférase à partir du plasmide pHES-luciférase. L'orientation du fragment a été vérifiée par digestion EcoRI/XmaI. Le plasmide final a été vérifié par séquençage (Service de Synthèse de Peptides de l'Est).

2.3.9 Sélection au G418-sulfate

Le plasmide pHES-luciférase/neomycine a été transfecté dans des cellules HEK293 par la méthode au chlorure de calcium (cf. 2.2.1). La sélection a été initiée avec 1.5mg/ml de G418-sulfate (GIBCO), un analogue de la néomycine. La concentration optimale de G418-sulfate a été déterminée avant l'expérience en établissant une courbe de survie avec des cellules HEK293 non transfectées. Ces cellules contrôles ont été traitées avec des concentrations croissantes de G418, de 0 à 2mg/ml, et la concentration optimale choisie pour la sélection correspondait à la concentration minimale nécessaire pour provoquer la mort des cellules contrôles. Deux semaines après le début de la sélection, les clones ont été

isolés et remis en culture dans des puits d'une plaque 96 puits, en continuant la sélection avec 1.5mg/ml de G418. Les populations clonales ont ensuite été transférées des plaques 96 puits aux plaques 24 puits, 6 puits et pétris 100mm à chaque fois qu'elles atteignaient confluence, en maintenant toujours la sélection avec 1.5mg/ml de G418. L'intégration du plasmide pHES-luciférase/neomycine à l'intérieur du génome des cellules hôtes a été vérifiée par extraction de l'ARN et amplification du gène de la néomycine par PCR avec les amorces P189 et P190.

Amorces	Séquence	
P189F	5'-GCTGCTCTGATGCCGCCGTG-3'	Amplification du gène de la néomycine après RT
P190R	5'-GCACGAGGAAGCGGTCAGCC-3'	

Figure 2-6 : Amorces utilisées pour la vérification de l'expression du plasmide pHES-luciférase dans les cellules HEK293 stables.

2.3.10 Dosage de l'activité luciférase

L'activité de BACE1 sur les constructions chimériques a ensuite été mesurée avec l'essai rapporteur luciférase. Brièvement, le clivage de la protéine chimérique au site β par BACE1 devait permettre la libération des portions contenant NICD, qui par la suite pouvaient se lier à la région promotrice hes pour activer la transcription de la luciférase. Le système décrit devait ensuite permettre l'ajout de différentes protéines et leur capacité à modifier l'activité de BACE1 devait être mesurée en comparant les variations de luminescence dans les essais rapporteurs luciférase.

2.3.10.1 Extraits cellulaires

Le dosage de l'activité luciférase est une méthode *in vitro* qui requiert une lyse préalable des cellules. Quarante-huit heures après transfection, les cellules ont été lavées deux fois avec 5ml de PBS1X et resuspendues dans 900 μ l de tampon de lyse RLB 1X (Promega) pour des pétris 100mm ou alternativement 200 μ l de tampon de lyse RLB 1X pour des puits de plaque 6 puits. Les cellules ont été récoltées, vortexées de 10 à 15 secondes et centrifugées à 13 000 rpm 5 minutes à 4°C afin de retirer les débris. Les surnageants, contenant les extraits cytosoliques, ont été transférés dans des tubes frais et conservés à -70°C pour le dosage de l'activité luciférase.

2.3.10.2 Dosage de l'activité

Un total de 20 μ l d'extrait a été utilisé pour l'essai rapporteur luciférase (Promega). 22 μ l d'extrait ont été transférés dans un tube de 5ml à fond rond. À partir de ce 22 μ l, 2 μ l ont été transférés dans un second tube à fond rond, ce dernier tube servant pour le dosage de l'activité β -galactosidase. Le dosage de l'activité β -galactosidase sert de contrôle pour normaliser l'efficacité de transfection d'une transfection à l'autre. Pour le dosage de l'activité β -galactosidase, 50 μ l de mélange de réaction β -galactosidase 1 :50 a été ajouté à l'extrait et incubé 30 minutes à l'abri de la lumière. Pendant l'incubation, 100 μ l de réactif luciférase (Promega) conservé à l'abri de la lumière a été ajouté au premier extrait de 20 μ l et l'activité luciférase a été mesurée au luminomètre (Lumat) avec un temps de lecture de 30 secondes. L'activité luciférase a été normalisée en divisant les valeurs d'activité luciférase par la valeur de l'activité β -galactosidase obtenue.

2.4 Le système BRET2

Les résultats que nous avons obtenus avec l'essai luciférase se sont avérés très variables malgré l'utilisation d'une lignée cellulaire exprimant le plasmide rapporteur de façon stable. Nous avons donc imaginé un second système basé sur le principe de BRET2 (Bioluminescence Resonance Energy Transfer 2).

2.4.1 Principe du BRET2

La technique BRET2 (Bioluminescence Resonance Energy Transfer 2) a été utilisée pour la seconde partie du projet. Cette technique développée au cours des dernières années est utilisée pour étudier les interactions protéine-protéine ou leur dimérisation *in vivo* (Angers, Salahpour et al. 2000; Bertrand, Parent et al. 2002). Cette technique possède plusieurs avantages par rapport aux essais *in vitro* qui sont présentement utilisés. Les essais peuvent être réalisés sur des cellules vivantes car le substrat utilisé est non-toxique et traverse facilement la membrane plasmique. Par ailleurs, l'étude des interactions se fait dans le contexte physiologique de la cellule et elle est réalisée en temps réel.

La « bioluminescence resonance energy transfer » repose sur le transfert d'énergie entre une protéine bioluminescente « donneuse », la *Renilla* luciférase (RLuc), et une seconde

molécule fluorescente « acceptrice », la Green Fluorescent Protein (GFP²). Ce transfert d'énergie n'est réalisable que lorsque les deux protéines sont à proximité, soit à une distance inférieure à 100Å. Le BRET est un phénomène naturel qui a lieu dans plusieurs coelentérés marins (Wilson and Hastings 1998). En laboratoire, ce transfert d'énergie peut être initié dans des cellules par l'ajout de DeepBlue C, un substrat de la luciférase dérivé de la coelenterazine. En présence d'O₂, l'hydrolyse du DeepBlueC par la luciférase isolée de *Renilla reniformis* conduit à la production de coelenteramide et à une émission de lumière à 395nm. Le spectre d'émission de la luciférase chevauche le spectre d'excitation de la GFP², un variant de la GFP créé spécialement pour absorber le maximum d'énergie générée par la luciférase, et permet ainsi un transfert d'énergie appelé BRET lorsque les deux molécules sont à proximité (Figure 2-7). L'excitation de la GFP² par ce transfert d'énergie résulte en une émission de lumière à 510nm.

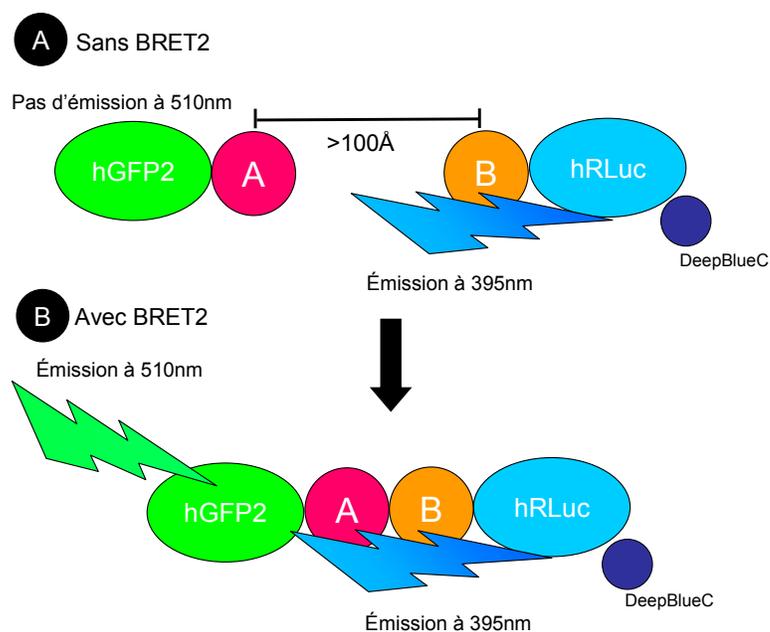


Figure 2-7 : Principe du BRET2

Le principe de BRET a été mis à contribution pour mettre en évidence certaines interactions protéiques (Scaffidi, Petrovic et al. 2004; Blanquart, Boute et al. 2005). Deux partenaires protéiques peuvent être fusionnés avec la GFP et la RLuc, respectivement, et leur interaction peut être mise en évidence par le transfert d'énergie de la RLuc vers la GFP. Dans ce cas, le transfert d'énergie est dépendant de l'orientation et de la proximité des deux protéines, et décroît en fonction inverse de la puissance 6 de leur distance (Wallrabe and Periasamy 2005) ce qui permet d'éliminer rapidement les faux-positifs qui seraient détectés par la seule colocalisation de deux protéines, et non leur interaction. Une nouvelle application de la technologie BRET2 a récemment été mise en évidence par Hu et al. (Hu, Clement et al. 2005). Dans ces travaux, l'essai BRET2 a été modifié de façon à mesurer l'activité d'une protéase sur son substrat. Dans cet essai, la RLuc est directement fusionnée à la GFP par un peptide « biosenseur ». Ce peptide est généré de façon à contenir la séquence clivable reconnue par la protéase étudiée. Le clivage de la séquence par la protéase se traduit par l'éloignement des deux protéines et donc une diminution du signal BRET2 (Figure 2-8).

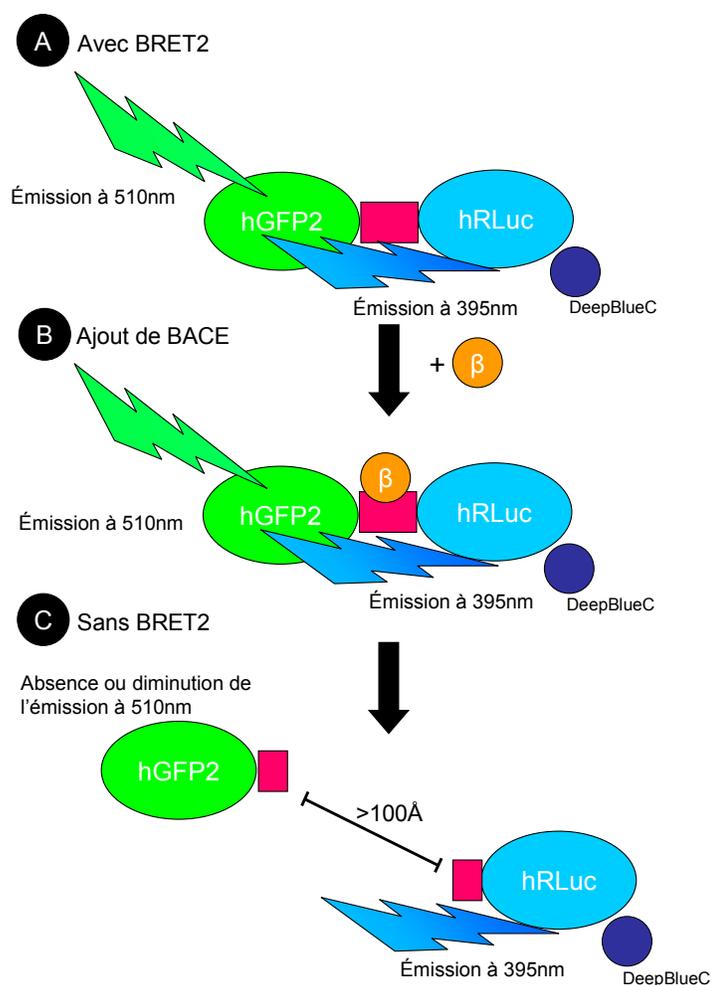


Figure 2-8 : Principe de l'essai biosenseur BRET2

2.4.2 Clonage des plasmides biosenseurs

Nous avons généré différents peptides biosenseurs en utilisant des paires d'oligonucléotides codant pour des variants du site β (Figure 2-9 et tableau 2-7). Chaque paire d'oligonucléotides a été dessinée de façon à être introduite dans le plasmide pCMV-hGFP2-MCS-hRLuc (PerkinElmer Inc.) de façon directionnelle entre les sites de restriction BamHI et HindIII. Un premier peptide biosenseur APPwt exprimant le site de clivage β de type sauvage a été inséré dans le plasmide pCMV-hGFP2-MCS-hRLuc. Un second peptide APPswe contenant le site de clivage β contenant la mutation swedish KM \rightarrow NL a été généré. Un troisième peptide APP Δ KM a été généré en supprimant les acides aminés lysine et méthionine de façon à empêcher son clivage par BACE1 et donc pour servir de

contrôle négatif. Un quatrième peptide biosenseur APPwtRAC exprimant le site de clivage β de type sauvage mais plus court de 5 acides aminés par rapport au peptide APPwt a été créé et inséré dans le plasmide pCMV-hGFP2-MCS-hRLuc. Chacun des peptides biosenseurs a ensuite été cloné dans le plasmide pCMV-hGFP2-MCS-hRLuc préalablement linéarisé à l'intérieur des sites BamHI et HindIII. Chacun des plasmides finaux a été vérifié par PCR avec les amorces P220 5'-CCTGCTGGAGTTCGTGACCGCC-3' et P221 5'-CCTCTTCCTCTGCTCGGGGTCG-3' avant d'être vérifié par séquençage avec l'amorce P220 (Synthèse de Peptides de l'Est). L'expression des protéines de fusion a été vérifiée par transfection suivie d'un immunobuvardage.

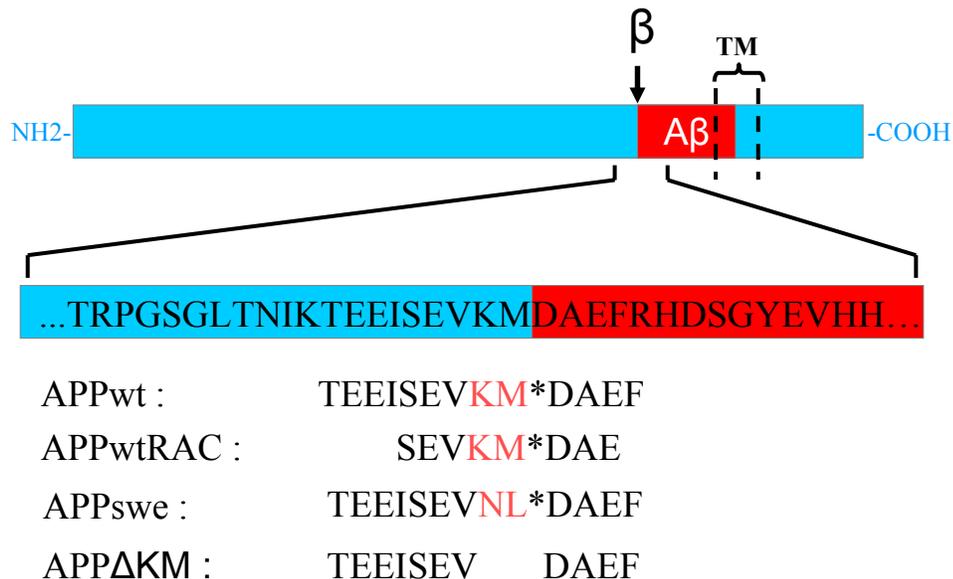


Figure 2-9 : Représentation schématique des différents peptides biosenseurs générés. La région d'APP qui a été amplifiée correspond au site de clivage de BACE. Les variations entre les constructions sont représentées en rouge.

Amorces	Oligonucléotide sens, oligonucléotide antisens	Site de clivage β
P214	5'-AGCTTGACGGAGGAGATCTCTGAAGTGAAGATGGATGCAGAATTCA-3'	APPwt
P215	5'-GATCTGAATTCTGCATCCATCTTCACTTCAGAGATCTCCTCCGTCA-3'	
P236	5'-AGCTTGTCTGAAGTGAAGATGGATGCAGAAA-3'	APPwtRAC
P237	5'-GATCTTTCTGCATCCATCTTCACTTCAGACA-3'	
P216	5'-AGCTTGACGGAGGAGATCTCTGAAGTGAATCTGGATGCAGAATTCA-3'	APPswe
P217	5'-GATCTGAATTCTGCATCCAGATTCCTTCAGAGATCTCCTCCGTCA-3'	
P218	5'-AGCTTGACGGAGGAGATCTCTGAAGTGGATGCAGAATTCA-3'	APP Δ KM
P219	5'-GATCTGAATTCTGCATCCACTTCAGAGATCTCCTCCGTCA-3'	

Tableau 2-7 : Paires d'oligonucléotides utilisées pour le clonage des substrats de BACE aux sites HindIII et BglII du plasmide parental pCMV-hGFP2-MCS-hRLuc.

Amorce	Séquence	Utilisation
P220	5'-CCTGCTGGAGTTCGTGACCGCC-3'	Vérification des clones
P221	5'-CCTCTCCTCTGCTCGGGGTCG-3'	pCMV-hGFP2-X-hRLuc par PCR

Tableau 2-8 : Amorces utilisées pour la vérification des plasmides biosenseurs.

2.4.3 Optimisation des conditions

Pour permettre de valider l'essai, différentes conditions ont été optimisées avec le plasmide parental pCMV-hGFP2-MCS-hRLuc. Les conditions qui ont choisies étaient celles qui permettaient d'obtenir le signal BRET2 le plus élevé avec ce plasmide parental. L'ensemble des conditions testées sont décrites ci-dessous.

2.4.4 Type cellulaire

Quatre différents types cellulaires ont été testés. Toutes les cellules ont été mises en culture à 37° dans un incubateur en présence de 5% de CO₂. Les cellules embryonnaires rénales humaines HEK293 et HEK293T ont été cultivées dans du milieu DMEM (GIBCO) en

présence de 10% FBS. Les cellules de carcinome humain HeLa ont aussi été maintenues dans du milieu DMEM (GIBCO) en présence de 10% FBS.

2.4.5 Transfection

Les différents types de cellules ont étéensemencées dans des plaques 6-puits à une densité de 100 000 cellules/puits ou 150 000 cellules/puits et incubées pendant une période de 16 heures. Les cellules ont ensuite été transfectées selon deux méthodes différentes, au chlorure de calcium (cf.2.2.1) et à la lipofectamine 2000 (cf.2.2.2). Pour la méthode au chlorure de calcium, un maximum de 4µg/puits a été utilisé. Les cellules ont été incubées pour une période de 16 heures après la transfection, lavées avec du PBS1X et remplacées par du milieu frais. Elles ont été incubées pour une période supplémentaire de 24 heures avant d'être récoltées pour l'analyse par BRET2. Pour la méthode à la Lipofectamine 2000, un maximum de 4µg/puits a été utilisé avec 8µl de lipofectamine (ratio ADN : Lipofectamine 2000 de 1:2). Six heures après la transfection, le milieu a été lavé avec du PBS1X et remplacé par du milieu frais. Les cellules ont été incubées pour une période supplémentaire de 40 heures et récoltées pour les analyses par BRET2.

2.4.6 Dosage BRET2

2.4.6.1 Préparation des échantillons pour le dosage BRET2

Les cellules ont été lavées avec 1ml de PBS1X 48 heures après la transfection et récoltées dans 1.3ml de PBS1X. 300µl ont été utilisés pour compter les cellules (Coulter, Beckman) et le 1ml restant a été centrifugé à 500g pour 10 minutes à 4°C. Le culot de cellules a été resuspendu dans du tampon BRET2 à une concentration de 2.22×10^6 cellules/ml.

2.4.6.2 Dosage BRET2

Les lectures de luminescence de la RLuc et de fluorescence de la GFP ont été réalisées tel décrit précédemment (Hu, Clement et al. 2005) en apportant quelques modifications. 45µl d'extrait cellulaire a été déposé dans une plaque 96-puits blanche opaque à fond plat (PerkinElmer Inc.) afin d'obtenir une quantité de 100 000 cellules par puits. Cinq

microlitres de substrat de la luciférase DeepBlueC (PerkinElmer Inc.) à une concentration de 50 μ M a été ajouté à chacun des puits pour une concentration finale de 5 μ M. Une heure après l'ajout du substrat ou immédiatement après l'ajout de substrat, les lectures de luminescence et fluorescence ont été réalisées (appareil Victor3 ou Fusion α , PerkinElmer/Packard). Avec l'appareil Victor3, l'émission de la RLuc à 395nm suite à la dégradation du DeepBlueC a été mesurée en utilisant un filtre de 410nm de largeur 80nm (No. Cat. 3400410, PerkinElmer Inc.) selon les paramètres de lecture suivants : gain : 25, PMT : 1100.00V, temps : 1.0 seconde. L'émission de la GFP à 505nm a été mesurée en utilisant un filtre de 515nm de largeur 30nm (No. Cat. 3401515, PerkinElmer Inc.), selon les mêmes paramètres que précédemment. Les lectures de RLuc et GFP ont été effectuées consécutivement pour chacun des puits. Avec l'appareil Fusion α , les filtres utilisés étaient de 410nm de largeur 80nm (No. Cat.1420-5720, PerkinElmer Inc.) et de 515nm de largeur 30nm (No. Cat. 1420-5730, PerkinElmer Inc.) avec les paramètres décrits précédemment.

2.4.6.3 Calcul du ratio BRET2

Les signaux de luminescence et de fluorescence totaux sont donnés en cps (comptes par seconde) en fonction du nombre de photons émis par seconde. Les valeurs de BRET2 sont toutefois obtenues en calculant l'émission (en cps) émise par la GFP suite au transfert d'énergie/l'émission émise par la RLuc (en cps). L'expression des valeurs BRET2 selon un ratio permet de normaliser les valeurs BRET2 dans les différents essais. Le plasmide parental pCMV-hGFP2-MCS-hRLuc permet d'exprimer la RLuc et la GFP en fusion, le ratio BRET2 attendu est donc de 1, étant donné que pour chaque molécule de RLuc émettant de la lumière à 395nm il y a une molécule de GFP à proximité pour recevoir le transfert d'énergie. Lorsqu'un peptide biosenseur est inséré au site de clonage multiple entre la RLuc et la GFP et que ce dernier est clivé, il y a éloignement de la RLuc et la GFP. On s'attend donc à une diminution du ratio BRET2 en-dessous de 1, étant donné qu'il y a moins de molécule de GFP excitées pour les molécules de RLuc qui émettent à 395nm. Par ailleurs, le signal BRET2 non spécifique est mesuré sur des cellules non transfectées et déduit des valeurs obtenues. Le ratio BRET2 a donc été calculé de la façon suivante :

$$\left[\frac{\text{émission à 505nm des cellules transfectées}}{\text{émission à 505nm des cellules non}} \right]$$

transfectées)/(émission à 410nm des cellules transfectées /émission à 410nm des cellules non transfectées)] (PerkinElmer Inc.).

2.4.7 Extraits cellulaires et analyse par immunobuvardage

La technique de BRET2 possède l'avantage que les extraits utilisés pour le dosage BRET2 peuvent par la suite être utilisés directement pour analyse par immunobuvardage. Les extraits ont été centrifugés à 500g pour 10 minutes et le culot a été resuspendu dans un tampon de lyse NP-40 [(100 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40 et cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete, Roche Applied Science)] et incubé sur glace pour 30 minutes. Les extraits ont ensuite été centrifugés à 14 000g 30 minutes et les surnageants contenant les extraits cytosoliques ont été transférés dans de nouveaux tubes. Environ 30µg d'extraits ont été mis sur gel SDS-PAGE (cf.2.2.5) et l'analyse de l'expression des protéines a été fait par immunobuvardage (cf.2.2.6) après transfert sur une membrane de PVDF (Amersham).

2.4.8 Essais avec inhibiteur

Un inhibiteur de β -sécrétase (Z-VLL-CHO, Calbiochem) a été ajouté à des concentrations variant de 0 à 5µM directement aux cellules transfectées, 24 heures avant la récolte des extraits. Parfois, l'inhibiteur de β -sécrétase a aussi été ajouté aux cellules à des concentrations variant de 0 à 5µM directement dans la plaque de 96-puits. La plaque a ensuite été incubée une heure avant d'effectuer la lecture du signal BRET2.

3 Résultats

3.1 Essais rapporteurs luciférase

3.1.1 Génération de protéines chimériques

Nous avons voulu développer un essai qui permettrait de mesurer l'activité de BACE à partir d'extraits cellulaires. Pour ce faire, nous avons généré différentes protéines chimériques comprenant le site β , le site de clivage de BACE sur APP, fusionné à différentes portions de Notch. La construction β -site short/H-Notch a été générée de façon à contenir le site de clivage β d'APP fusionné à H-Notch. La construction β -site long/H-Notch contenait 6 acides aminés supplémentaires en 3'. La construction APP5'→ β a été générée de façon à contenir la majeure partie de la protéine APP, de son extrémité 5' au site de clivage β , fusionnée à H-Notch. La construction APP5'→ $\beta\beta'$ contenait 8 acides aminés supplémentaires en 3', de façon à inclure le site β' . La construction swe β -site était identique à la construction β -site long à l'exception du changement d'acides aminés KM→NL. La construction APPswe5'→ $\beta\beta'$ était identique à la construction APP5'→ $\beta\beta'$ à l'exception du changement d'acides aminés KM→NL. L'expression cellulaire des protéines de fusion a pu être vérifiée par immunobuvardage avec un anticorps anti-HA (Roche Diagnostic) dirigé contre le « tag » HA de H-Notch. Nous n'avons pas terminé le clonage de la construction pCDNA3/actine/ $\beta\beta'$ /NICD. Nous avons plutôt choisi de cloner les constructions pCMVzeo/APP5'→ β et pCMVzeo/APP5'→ $\beta\beta'$ que nous avons jugées plus appropriées pour notre étude. Il est à noter qu'aucune analyse statistique n'a été réalisée lors de la mise au point des essais. Étant donné que plusieurs paramètres étaient modifiés pour la mise au point, la variabilité des résultats devait être mesurée seulement après avoir déterminé les paramètres finaux de l'essai.

3.1.2 Essai luciférase avec pCDNA3/ β -site short/H-Notch et pCDNA3/ β -site long/H-Notch

Les plasmides pCDNA3/ β -site short/H-Notch et pCDNA3/ β -site long/H-Notch ont été transfectés de façon transitoire dans des cellules HEK293. Cinq microgrammes de l'un ou l'autre des plasmides a été transfecté avec ou sans 5 μ g de BACE dans un pétri de 100mm (Fig.3-1). Les valeurs ont été normalisées avec la valeur obtenue avec le vecteur vide.

Nous avons observé une légère augmentation de l'activité luciférase avec la construction β -site long en présence de BACE. Toutefois, cette augmentation de l'activité luciférase ne représentait que 0,21 UL par rapport à la construction sans BACE. Par ailleurs, nous n'avons noté aucune augmentation de l'activité luciférase avec la construction β -site short en présence de BACE. Nous avons donc repris l'expérience en utilisant 2,5 μ g des constructions et 5 μ g de BACE (Figure 3-2). Nous avons observé une augmentation de l'activité luciférase de 10,3 et 10,1 UL par rapport au vecteur vide, avec les constructions β -site short et β -site long seules sans l'ajout de BACE. L'expérience a été reprise plusieurs fois et nous avons obtenu des résultats très variables d'une expérience à l'autre. Nous avons donc décidé d'établir une lignée cellulaire stable exprimant pHES-luciférase afin de réduire la variabilité des résultats.

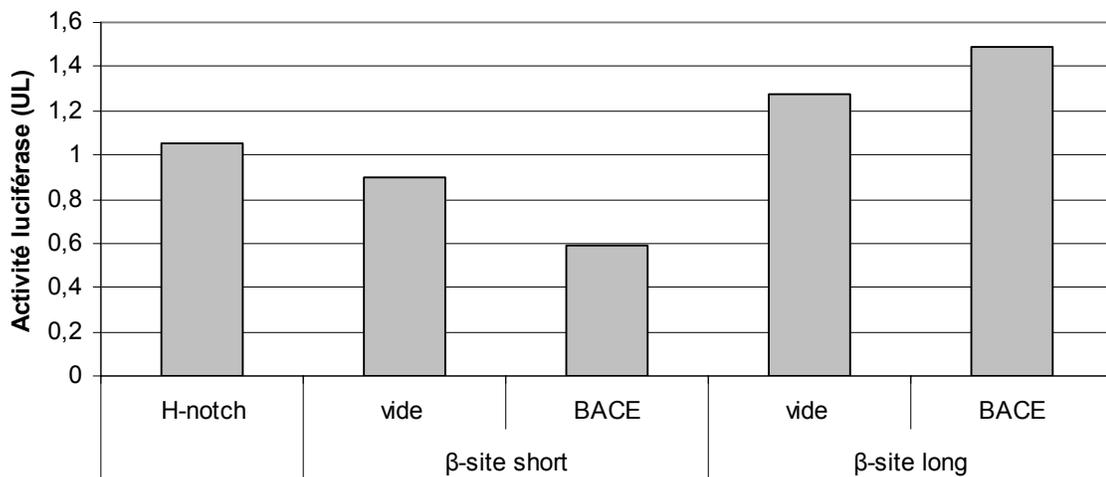


Figure 3-1 : Dosage de l'activité luciférase avec cellules HEK293. 5 μ g de constructions chimériques β -site short ou β -site long a été transfecté avec ou sans 5 μ g de BACE.

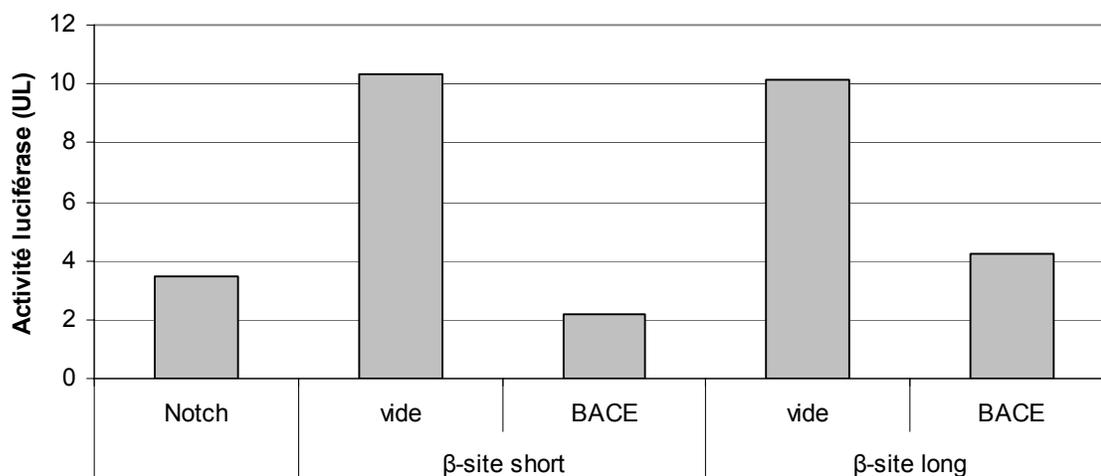


Figure 3-2 : Dosage de l'activité luciférase avec cellules HEK293. 2.5 μ g de constructions chimériques β -site short ou β -site long a été transfecté avec ou sans 5 μ g de BACE.

3.1.3 Établissement d'une lignée cellulaire stable exprimant pHES-luciférase

Nous avons établi une lignée cellulaire stable de cellules HEK293 exprimant pHES-luciférase. Pour ce faire, nous avons cloné la cassette du gène de résistance à la néomycine à l'intérieur du plasmide pHES-luciférase. La cassette néomycine a été clonée au site Sall, en aval de la portion pHES-luciférase. Le plasmide final a ensuite été transfecté dans des cellules HEK293. Nous avons établi une courbe de survie sur des cellules HEK293 non transfectées afin de déterminer la quantité optimale d'agent de sélection G418 à utiliser. Nous avons observé 100% de mortalité cellulaire des cellules contrôles avec une concentration de 1.5mg/ml de G418 (GIBCO). Cette concentration a donc été utilisée pour mettre les cellules transfectées avec le plasmide pHES-luciférase en sélection. La détermination de la concentration d'agent de sélection à utiliser à l'aide d'une courbe de survie sur des cellules contrôles est nécessaire. Une concentration trop faible de l'agent de sélection permettrait la survie des cellules non-transformées tandis qu'une concentration trop élevée pourrait entraîner le développement d'une résistance des cellules mise en sélection. Onze jours après la mise en sélection des cellules, une extraction totale d'ARN a été effectuée sur une population polyclonale afin de vérifier la présence du plasmide. Suite à la réaction de transcription inverse, l'ADN complémentaire a été utilisé dans une réaction

de PCR pour vérifier la présence du gène de la némycine. Les résultats du PCR ont confirmé que les cellules HEK293 ont intégré le plasmide pHES-luciférase.

Les cellules ont été remises en sélection et différents clones ont été isolés et remis en culture. Vingt-quatre clones ont ensuite été testés pour leur activité luciférase en utilisant 300ng de pCDNA3/ICN (augmentation de l'activité luciférase) ou 300ng de pCMVzeo/HES-1 (répression de l'activité luciférase) par puits de plaque 6 puits. Il a en effet été démontré que HES-1 est capable de se lier sur son propre promoteur afin de réprimer sa propre expression (Takebayashi, Sasai et al. 1994). Le signal luciférase obtenu avec pCDNA3/ICN et pCMVzeo/HES-1 a été exprimé sous forme de ratio par rapport au signal obtenu avec le vecteur vide. Le clone démontrant la plus grande augmentation de signal avec l'ajout de pCDNA3/ICN et la plus grande diminution de signal avec l'ajout de pCMVzeo/HES-1 a été choisi pour la suite de l'expérience. Le clone 24 a démontré une augmentation de l'expression de la luciférase de 201% et une répression de l'expression de la luciférase correspondant à 78.5% de l'expression avec le vecteur vide.

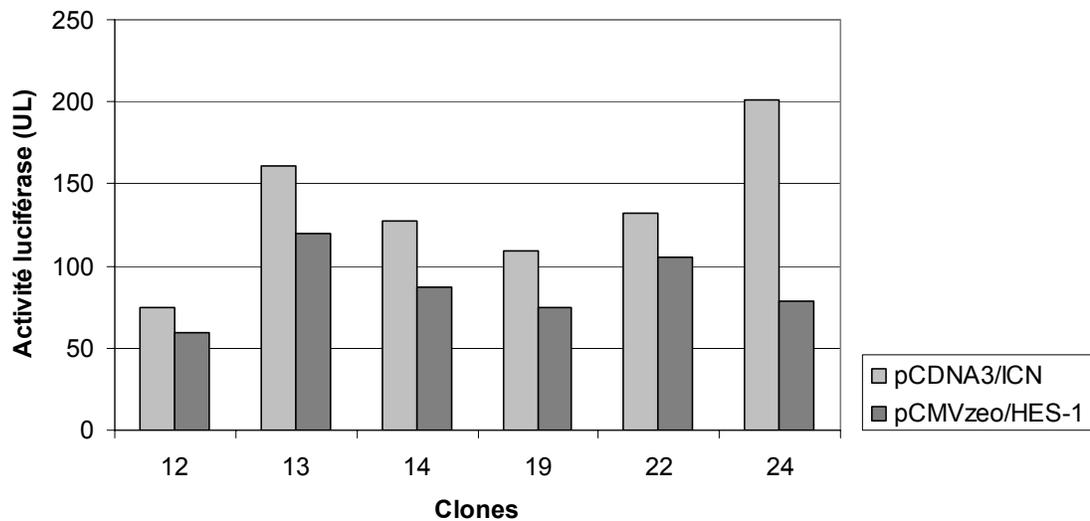


Figure 3-3 : Vérification des clones exprimant pHES-luciférase de façon stable. Les différents clones ont été testés pour l'activation de l'expression de la luciférase par l'ajout de pCDNA3/ICN et la répression de l'expression de la luciférase par l'ajout de pCMVzeo/HES-1.

3.1.4 Essai luciférase avec le clone 24

Les plasmides chimériques pCMVzeo/APP5'→β/H-Notch et pCMVzeo/APP5'→ββ'/H-Notch ont ensuite été testés dans les cellules HEK293 pHES-luciférase stables, clone 24. Quatre cent cinquante nanogrammes de chacune des constructions a été transfecté avec ou sans 450ng de BACE ou variants de BACE dans des puits de plaque 6-puits. Pour chaque essai, 100ng de plasmide codant pour la β-galactosidase a aussi été ajouté pour servir de contrôle de transfection, pour une quantité totale d'ADN de 1μg par essai. Nous avons observé une augmentation de l'activité luciférase relative de 164,4 ULR avec le contrôle positif H-Notch. Par contre, nous n'avons pas observé d'augmentation nette de l'activité luciférase avec nos constructions en ajoutant BACE. Nous avons noté une augmentation d'activité luciférase relative de 9,2 à 17,7 ULR en ajoutant BACE à la construction APP5'→β/H-Notch mais une augmentation semblable, de 14,5 à 20,0 ULR, a été notée lorsque BACE était ajouté au vecteur vide pCMVzeo. Par ailleurs, nous avons observé une importante augmentation de l'activité luciférase relative en ajoutant les variants de BACE D93A, D289A et D93AD289A aux deux constructions APP5'→β/H-Notch et APP5'→ββ'/H-Notch. Pourtant, les différents variants de BACE, catalytiquement inactifs, ne devraient pas cliver les constructions et devraient donc générer un signal luciférase semblable au vecteur vide. Finalement, nous avons noté une augmentation de l'activité luciférase relative de 1449,8 ULR dans les cellules stables non-transfectées. Nous avons effectué cette expérience plusieurs fois avec différentes quantités totales d'ADN et à chaque fois nous avons obtenu la plus grande activité luciférase avec les cellules stables non-transfectées. Ces résultats suggèrent une autoactivation de l'expression de la luciférase dans les cellules stables exprimant pHES-luciférase.

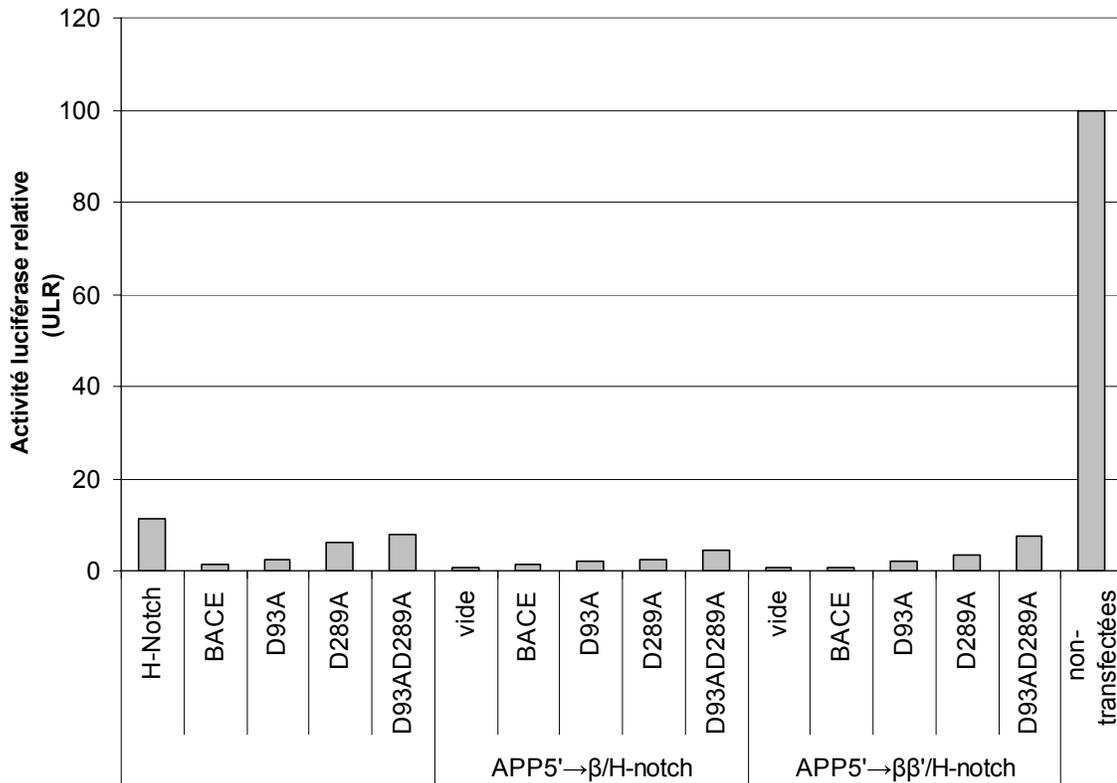


Figure 3-4 : Dosage de l'activité luciférase avec le clone 24. Les constructions chimériques $APP5' \rightarrow \beta/H\text{-Notch}$ et $APP5' \rightarrow \beta\beta'/H\text{-Notch}$ ont été co-transfectées avec ou sans BACE ou les variants catalytiquement inactifs de BACE.

3.1.5 Essai luciférase avec cellules HEK293

Étant donné que l'expression de la luciférase était auto-activée dans les cellules stables HEK293, nous avons testé nos constructions dans un système d'expression transitoire dans le même type de cellules. Quatre cent cinquante nanogrammes de chacune des constructions a été transfecté avec ou sans 450ng de BACE ou variants de BACE. Dans chaque essai, 100ng de pHES-luciférase et 100ng de β -galactosidase ont aussi été transfectés. Contrairement aux résultats obtenus avec les cellules HEK293 stables, nous n'avons noté aucune autoactivation de l'activité luciférase dans les cellules transfectées avec le plasmide rapporteur seulement. Nous avons pu vérifier la fonctionnalité de l'essai par la transfection du contrôle positif pCMVzeo/H-Notch qui a généré une activité

luciférase relative de 154,0 ULR. Par contre, nous n'avons pas observé d'augmentation de l'activité luciférase en utilisant nos constructions en présence de BACE.

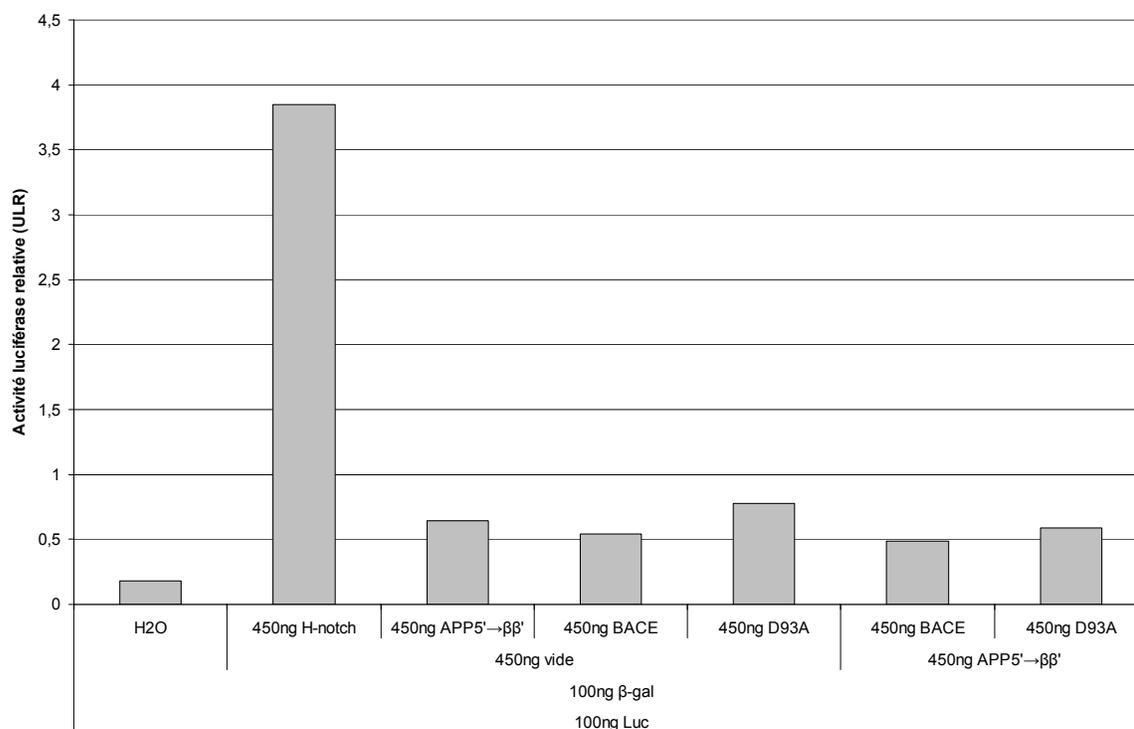


Figure 3-5 : Dosage de l'activité luciférase avec cellules HEK293. Les constructions chimériques APP5'→β/H-Notch et APP5'→ββ'/H-Notch ont été co-transfectées avec ou sans BACE ou les variants catalytiquement inactifs de BACE. Les plasmides codant pour pHES-luciférase et la β-galactosidase ont été transfectés pour chaque essai.

3.1.6 Essai luciférase avec cellules COS-1

Nous avons ensuite vérifié si nous pouvions obtenir une augmentation de l'activité luciférase avec nos constructions dans des cellules COS-1. Un microgramme des constructions chimériques APP5'→β/H-Notch ou APP5'→ββ'/H-Notch a été transfecté de façon transitoire avec ou sans 0.6μg de BACE ou de variant catalytiquement inactif de BACE, BACED93AD289A. Dans chaque essai, 300ng de pHES-luciférase et 100ng de β-galactosidase ont aussi été transfectés. Nous avons obtenu des résultats semblables à ceux obtenus dans l'essai précédent avec les cellules HEK293. Nous avons obtenu une activité luciférase relative de 12,2 ULR avec le contrôle positif H-Notch ce qui a permis de valider

l'essai. Par contre, nous n'avons obtenu aucune augmentation d'activité luciférase avec nos constructions en présence de BACE.

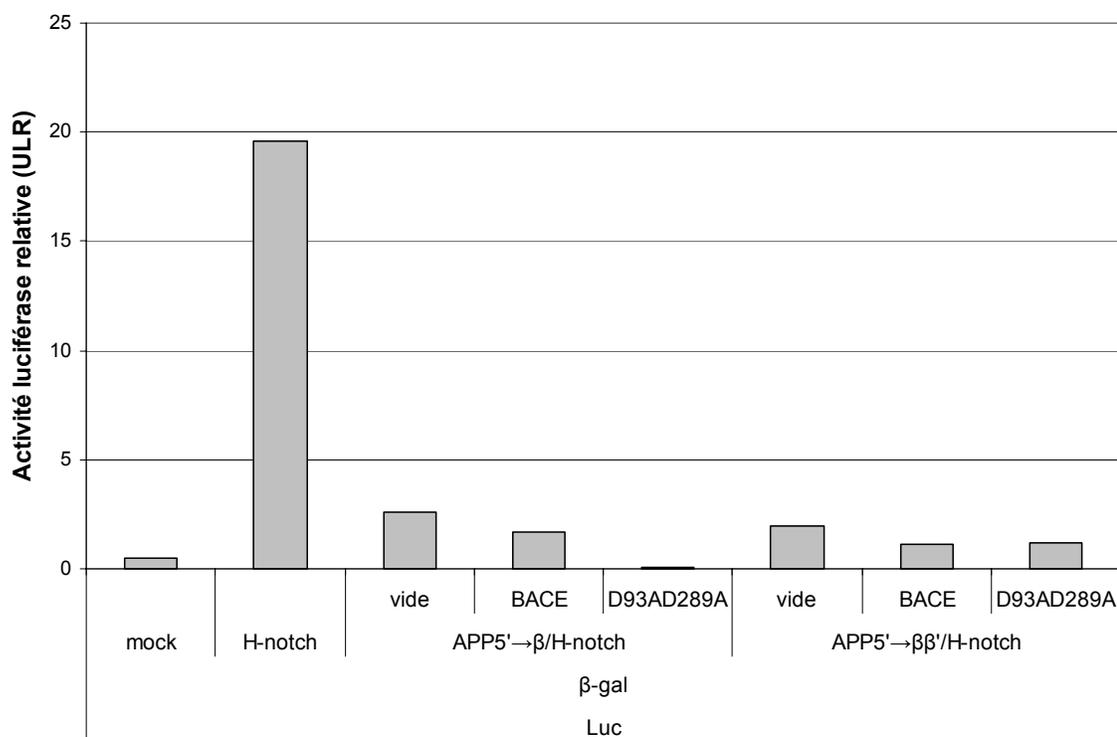


Figure 3-6 : Dosage de l'activité luciférase avec cellules COS-1. Les constructions chimériques APP5'→β/H-Notch et APP5'→ββ'/H-Notch ont été co-transfectées avec ou sans BACE ou BACE_{D93AD289A}. Les plasmides codant pour pHES-luciférase et la β-galactosidase ont été transfectés pour chaque essai.

3.1.7 Essai luciférase avec pCMVzeo/sweβsite/H-Notch et pCMVzeo/APP_{swe}5'→β/H-Notch

Étant donné que nous n'avons pas réussi à mettre au point un essai efficace pour mesurer l'activité de BACE avec les constructions APP5'→β/H-Notch et APP5'→ββ'/H-Notch, nous avons utilisé de nouvelles constructions. Les constructions sweβsite/H-Notch et APP_{swe}5'→β/H-Notch ont été générées afin de comprendre la mutation swedish KM→NL. Nous avons utilisé ces nouvelles constructions afin de vérifier si la mutation swedish pouvait induire un clivage par BACE plus efficace et donc activer l'expression de la luciférase, à l'inverse des essais précédents. Un microgramme de chacun des plasmides

pCMVzeo/swe β site/H-Notch ou pCMVzeo/APPswe5' $\rightarrow\beta$ /H-Notch a été transfecté dans des cellules COS-1 avec ou sans 600ng de BACE ou variants catalytiquement inactif de BACE, BACED93AD289A. Dans chaque essai, 300ng de pHES-luciférase et 100ng de β -galactosidase ont aussi été transfectés. Nous avons obtenu une activité luciférase relative de 6,5 ULR avec le contrôle positif H-Notch. Nous avons obtenu une augmentation de l'activité luciférase avec la construction swe β site/H-Notch en présence du vecteur vide, BACE ou de BACED93AD289A. Ces résultats suggèrent que cette construction était active sans nécessiter de clivage par BACE. Nous n'avons pas obtenu d'augmentation d'activité luciférase avec la construction APPswe5' $\rightarrow\beta\beta'$ en présence de BACE.

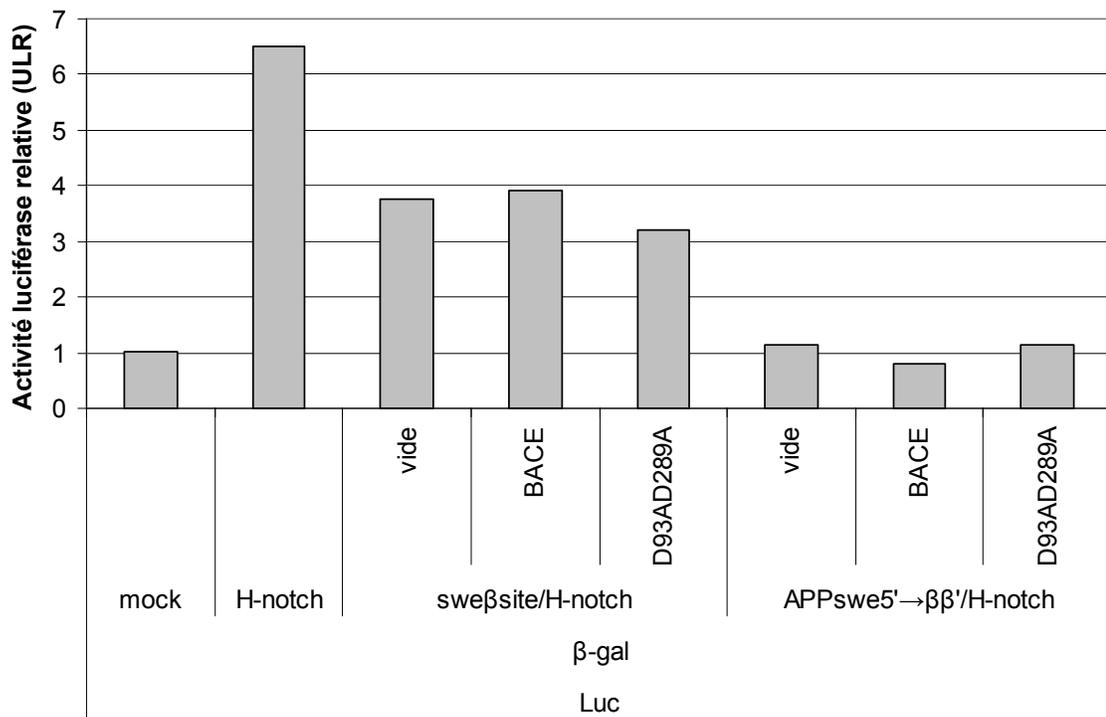


Figure 3-7 : Dosage de l'activité luciférase avec cellules COS-1. Les constructions chimériques pCMVzeo/swe β site/H-Notch ou pCMVzeo/APPswe5' $\rightarrow\beta$ /H-Notch ont été co-transfectées avec ou sans BACE ou BACED93AD289A. Les plasmides codant pour pHES-luciférase et la β -galactosidase ont été transfectés pour chaque essai.

3.2 Essais BRET2

3.2.1 Génération des protéines de fusion

Nous avons voulu développer un essai qui permettrait de mesurer l'activité de BACE *in vivo*. Cet essai devait par la suite permettre de réaliser un criblage à grande échelle de protéines pouvant modifier l'activité de BACE de façon à éventuellement cibler ces protéines pour empêcher la production d'amyloïde. Pour ce faire, nous avons généré quatre différents peptides biosenseurs contenant le site de clivage β . Les séquences peptidiques ont été insérées dans le vecteur pCMV-hGFP2-MCS-hRLuc aux sites HindIII et BamHI et les plasmides finaux ont été exprimés dans différents types cellulaires. L'expression des protéines de fusions a été confirmée par immunobuvardage avec un anticorps anti-GFP (Santa Cruz).

3.2.2 Optimisation des paramètres BRET2 avec le plasmide parental pCMV-hGFP2-MCS-hRLuc

Avant de tester les différents variants du site β , nous avons optimisé les paramètres de l'essai avec le plasmide parental pCMV-hGFP2-MCS-hRLuc seul. Le plasmide parental sert de contrôle positif dans les essais car il permet d'obtenir un ratio BRET2 de 1.0. Toutefois, dans les étapes d'optimisation, le signal total de luminescence et de fluorescence étaient davantage pris en compte. Nous voulions en effet seulement identifier les paramètres de l'essai qui nous permettraient d'obtenir le maximum de détection de signal avec l'appareil. Le ratio BRET2 a aussi été calculé comme contrôle. L'appareil qui a été utilisé pour les lectures est le Victor3 Multilabel Counter (PerkinElmer/Wallac).

3.2.2.1 Optimisation du type cellulaire et quantité d'ADN transfecté

Des cellules HeLa, HEK293 et HEK29T ont été ensemencées à 150 000 cellules/puits dans des plaques 6-puits. Le lendemain, les cellules ont été transfectées par la méthode au chlorure de calcium avec des quantités croissantes (0, 0.5 μ g, 1.0 μ g à 2.0 μ g) de pCMV-hGFP2-MCS-hRLuc. Le signal total a été mesuré pour chacune des transfections dans une plaque 96-puits blanche opaque en utilisant un total de 100 000 cellules par puits. Le signal le plus élevé a été obtenu avec les cellules HeLa (Tableau 3-1). La transfection de 1.0 μ g et

2.0 μ g de plasmide a donné un signal comparable. Par contre, le signal obtenu était plus faible en utilisant 0.5 μ g de plasmide.

Type cellulaire	Quantité d'ADN (μ g)	Signal BRET2 (CPS)		Ratio BRET2
		410nm	550nm	550nm/410nm
HeLa	0.5	146	840	5,75
	1.0	626	3438	5,49
	2.0	629	3545	5,64
HEK293	0.5	53	281	5,30
	1.0	52	245	4,71
	2.0	69	361	5,23
HEK293T	0.5	184	947	5,15
	1.0	110	638	5,80
	2.0	35	193	5,51

Tableau 3-1 : Analyse BRET2. Des cellules HeLa, HEK293 et HEK293T ont été co-transfectées avec des quantités croissantes de plasmide parental pCMV-hGFP2-MCS-hRLuc.

3.2.3 Ajout de BACE1 dans les essais BRET2

En utilisant les résultats obtenus à l'étape précédente, nous avons ensuite co-transfecté des cellules HeLa avec 1 μ g des différents plasmides biosenseurs pCMV-hGFP2-APPwt-hRLuc, pCMV-hGFP2-APPswe-hRLuc ou pCMV-hGFP2-APP Δ KM-hRLuc avec ou sans la protéase BACE en utilisant 1 μ g de plasmide pCMVzeo/BACE. Les puits sans BACE ont été complétés avec le vecteur vide pCMVzeo. Comme contrôle, le plasmide pCMVzeo/BACED93AD289A exprimant un variant de BACE catalytiquement inactif (von Arnim, Tangredi et al. 2004) a aussi été co-transfecté. Nous avons obtenu un ratio BRET2 de 1,21 pour la construction parentale en absence de BACE. Tel qu'attendu, le ratio BRET2 de la construction parentale, ne portant pas de site de clivage, n'a pas été affecté par l'ajout de BACE. Nous avons obtenu un ratio BRET2 de 0,74 pour la protéine de fusion APPwt en absence et en présence de BACE. Nous n'avons donc pas pu déterminer s'il y avait clivage ou non de la protéine APPwt en présence de BACE. Pour la protéine de fusion APP Δ KM, le ratio BRET2 obtenu est de 0,82 en absence de BACE1 et de 0,80 en présence de BACE. Nous aurions dû observer un ratio BRET2 de 1.0 pour cette construction, qui ne devait pas être reconnue ni clivée par BACE. Ces résultats nous ont démontré que la protéine de fusion APPswe n'était pas exprimée correctement, car nous

n'avons obtenu aucun signal pour cette construction. Nous avons donc testé d'autres clones de cette construction afin d'identifier un clone s'exprimant correctement.

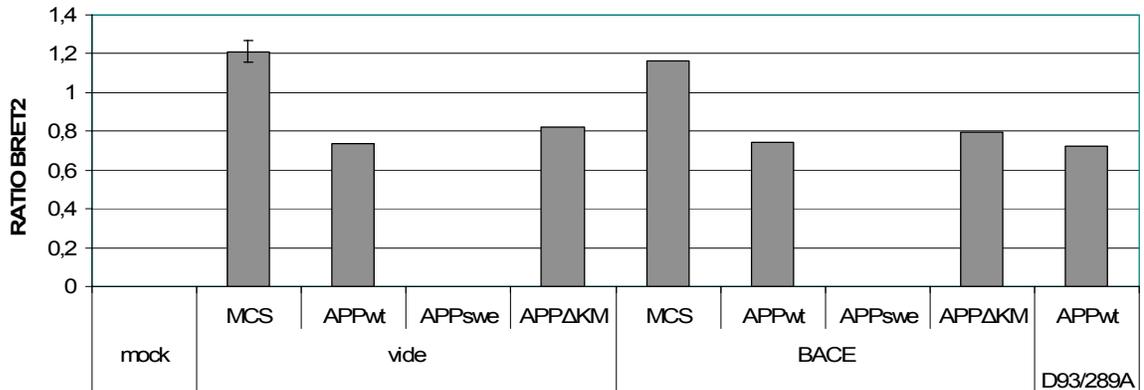


Figure 3-8 : Analyse BRET2. Des cellules HeLa ont été co-transfectées avec 1µg de plasmides biosenseurs et 1µg de BACE, de mutant inactif de BACE ou de vecteur vide.

3.2.3.1 Vérification de l'expression de BACE

Nous avons ensuite vérifié l'expression de BACE dans l'essai précédent par immunobuvardage. Il a été démontré que l'ARNm de BACE est exprimé à de hauts niveaux non seulement dans les cellules neuronales mais aussi dans certaines cellules non-neuronales à des plus faibles niveaux, dont les cellules HeLa (Sato and Kuroda 2000). Nous avons donc voulu vérifier si l'absence de diminution du signal BRET2 avec BACE par rapport à l'absence de BACE pouvait être expliquée par une expression endogène de BACE suffisante pour cliver la protéine de fusion APPwt, sans surexpression. Nous avons réalisé des extraits cellulaires directement à partir des échantillons utilisés pour le BRET2, en lavant les cellules et en les resuspendant dans du tampon de lyse STEN. Les résultats de l'immunobuvardage montrent une expression de BACE seulement lorsque le plasmide pCMVzeo/BACE est transfecté. Par contre, nous avons déjà remarqué dans le laboratoire que la forme endogène de BACE était très difficilement détectable avec l'anticorps utilisé, contrairement à la forme surexprimée.

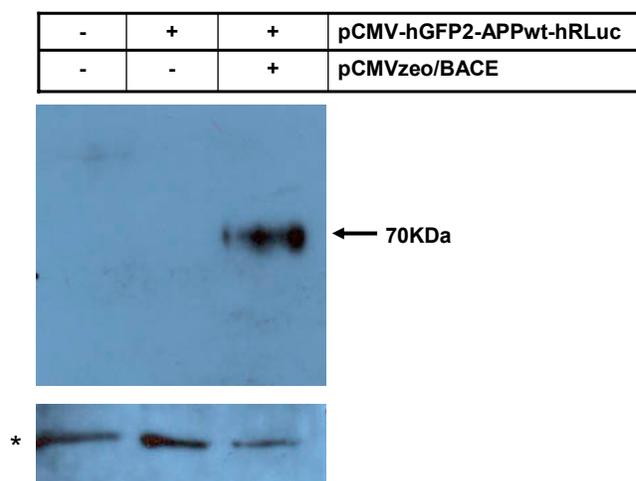


Figure 3-9 : Vérification de l'expression de BACE dans les essais BRET2 par immunobuvardage sur des cellules HeLa. L'anticorps Ab-1 reconnaît la forme surexprimée de BACE (bande à 70KDa). Aucune forme endogène de BACE n'est détectée (anticorps Ab-1 : 1/10 000, α -lapin : 1/10 000).

3.2.3.2 Optimisation de la concentration de BACE utilisée

Nous avons ajouté des quantités croissantes du plasmide pCMVzeo/BACE, de 0 à 4.0 μ g, aux cellules transfectées avec pCMV-hGFP2-APPwt-hRLuc pour s'assurer que la quantité de BACE utilisée n'était pas limitante. Nous avons réalisé la même courbe de concentrations avec le plasmide pCDNA3.1zeo/BACE, afin de vérifier si l'expression de BACE par le vecteur pCDNA3.1zeo pouvait être plus élevée. Nous n'avons pas observé de diminution du ratio BRET2 avec la protéine de fusion APPwt, en utilisant jusqu'à 4 μ g de pCMVzeo/BACE ou pCDNA3.1zeo/BACE.

3.2.4 Vérification de l'expression des protéines de fusion

Nous avons ensuite réalisé un immunobuvardage en utilisant un anticorps anti-GFP (Santa Cruz), qui permet de vérifier les formes matures et clivées des protéines de fusion. Nous voulions aussi vérifier si les résultats BRET2 observés étaient dus à un clivage des

protéines de fusion sans BACE. Nous avons donc vérifié le patron de clivage de la protéine de fusion APPwt en absence ou en présence de BACE. Cette analyse montre qu'il y a une expression de la protéine de fusion APPwt mature et qu'elle subit un faible clivage en absence ou en présence de 2.0 μ g de BACE, et très faiblement en présence de 4.0 μ g de BACE. Ces résultats nous ont permis de supposer qu'une expression endogène de BACE suffit à cliver la protéine de fusion APPwt, bien que nous n'ayons pas réussi à détecter la forme endogène de BACE avec l'anticorps Ab-1 par immunobuvardage (Fig.3-9). Par ailleurs, ces résultats ont démontré qu'une surexpression de BACE ne permet pas d'augmenter le clivage de la protéine de fusion APPwt.

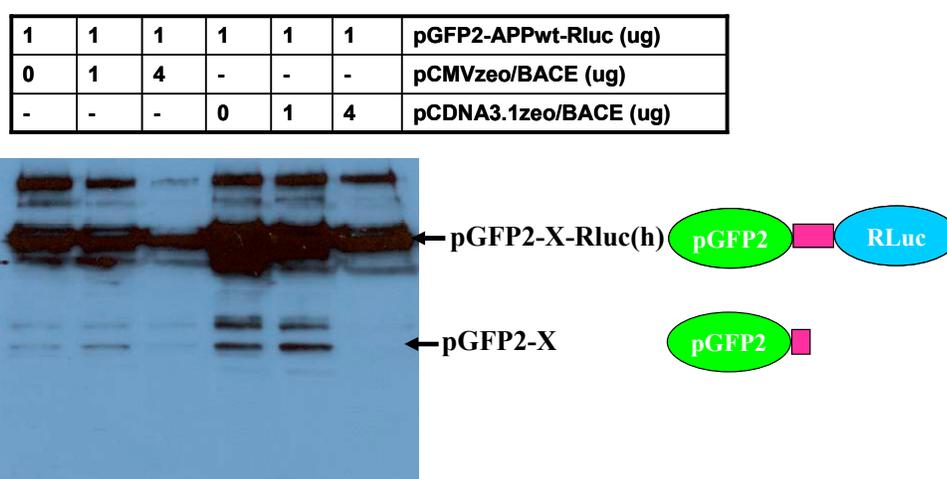


Figure 3-10 : Vérification de l'expression de la protéine de fusion pGFP2-APPwt-RLuc dans des cellules HeLa. La protéine de fusion intacte est détectée par une bande à 82KDa. Le résidu pGFP2-X détecté par une bande à 28KDa est généré à la suite du clivage de la protéine de fusion. Le résidu pGFP-X est généré en absence et en présence de 1 μ g de BACE, peu importe le plasmide utilisé pour l'expression de BACE (α -GFP : 1/500, α -mouse : 1/10 000).

3.2.5 Localisation cellulaire

En se basant sur les résultats obtenus lors de l'essai précédent, nous avons voulu vérifier si le faible clivage des protéines de fusion par BACE pouvait être dû à une limitation de l'accès à ces protéines de fusion, en raison d'une localisation cellulaire différente du substrat et de la protéase. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons effectué une lyse cellulaire et nous avons incubé ces lysats dans la plaque une heure avant de réaliser les lectures de BRET2, pour permettre une interaction entre des protéines qui dans l'essai

normal n'auraient pas interagit entre elles. Nous avons comparé les ratios BRET2 obtenus sur ces lysats cellulaires avec les ratios BRET2 obtenus sur des cellules vivantes non-lysées utilisées normalement lors des essais BRET2. Nous n'avons observé aucune différence significative entre les cellules lysées et vivantes. Aucune diminution du ratio BRET2 en présence de BACE n'a été observée dans chacun des deux cas.

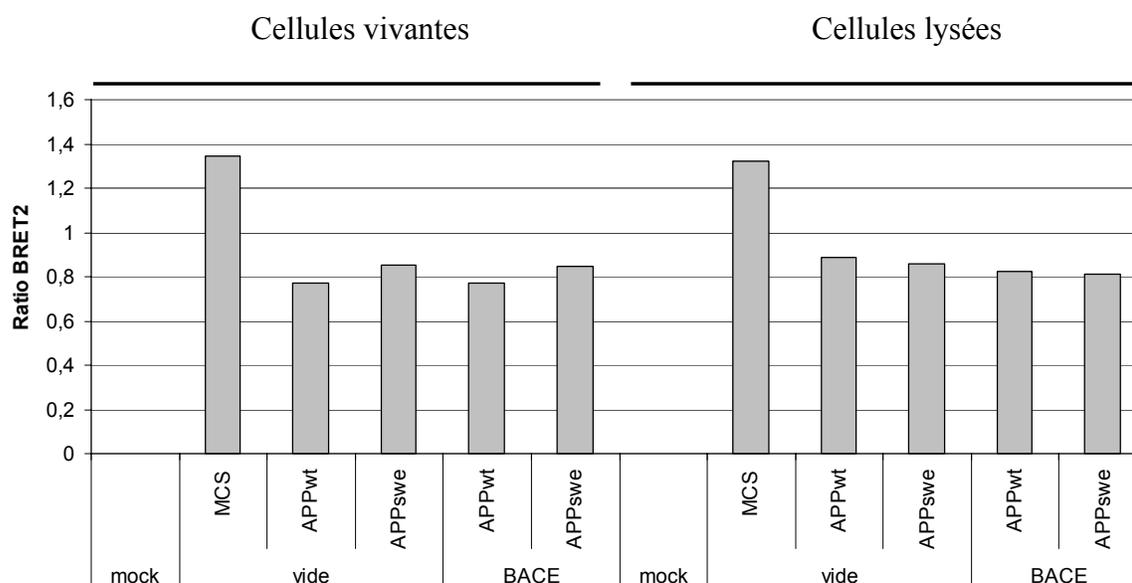


Figure 3-11 : Vérification de l'importance du contexte cellulaire pour l'essai BRET2. L'activité BRET2 de cellules HeLa transfectées avec 2 μ g de plasmide biosenseurs et 1 μ g de BACE est mesurée sur des cellules vivantes (gauche) et sur des cellules qui ont été lysées dans du STEN buffer (droite).

3.2.6 Longueur du peptide biosenseur

À partir de l'ensemble des résultats obtenus, nous avons envisagé la possibilité que les séquences des peptides de fusion choisies soient trop longues pour pouvoir observer un clivage par BACE. Nous avons donc créé un variant de la construction pCMV-hGFP2-APPwt-hRLuc en y soustrayant 5 acides aminés pour générer un peptide biosenseur de 8 acides aminés au lieu de 13 acides aminés. Cette construction a été utilisée dans les essais subséquents.

3.2.7 Lecteur de plaque

Le choix d'un lecteur de plaque adapté pour la lecture du signal BRET2 est nécessaire pour l'essai. L'appareil choisi doit pouvoir lire à la fois la luminescence et la fluorescence. Ces lectures doivent être prises à partir du haut de la plaque et non du bas. Il doit aussi permettre la lecture simultanée ou consécutive de ces deux signaux pour chacun des puits. Pour les premiers essais, nous avons utilisé le lecteur de plaque Victor3 (PerkinElmer/Wallac) qui rencontrait toutes les caractéristiques recherchées. Lors des essais, les comptes BRET2 totaux maximum que nous avons obtenu avec cet appareil était de moins de 9000cps avec un bruit de fond d'environ 40cps. Généralement, pour être significatives les valeurs obtenues avec cet appareil doivent être au moins 5 fois supérieures au bruit de fond (communication personnelle de la compagnie). Par contre, nous avons obtenu beaucoup de variations dans les comptes totaux d'un essai à l'autre et comme le démontrent les résultats précédents, nous ne sommes pas parvenu à mesurer le clivage de nos constructions. Nous avons donc expérimenté un lecteur différent pour la suite de nos travaux : le lecteur Fusion α .

3.2.8 Optimisation des paramètres de l'essai avec le lecteur de plaque Fusion α

Pour la mise au point des conditions avec le lecteur Fusion α , nous avons réalisé un essai en modifiant plusieurs paramètres de l'essai et en utilisant le plasmide parental pCMV-hGFP2-MCS-hRLuc. Dans cet essai, nous avons utilisé deux méthodes de transfection différentes, soit à la lipofectamine 2000 et au chlorure de calcium pour transférer trois types cellulaires différents : HEK293T, HeLa et SH-SY5Y. Nous avons fait varier la quantité initiale de cellules transfectées de 150 000 à 300 000 cellules/puits de plaque 6-puits. Nous avons aussi fait varier la quantité de cellules utilisées en plaque 96-puits pour le dosage BRET2, en utilisant 60 000, 80 000 et 100 000 cellules/puits. Nous avons obtenu les meilleurs comptes totaux en utilisant 150 000 cellules HEK293T transfectées à la lipofectamine 2000 avec 2 μ g de plasmide en utilisant 100 000 de cellules pour le dosage BRET2 (voir figure 3-12). Nous avons donc conservé ces conditions pour les essais suivants.

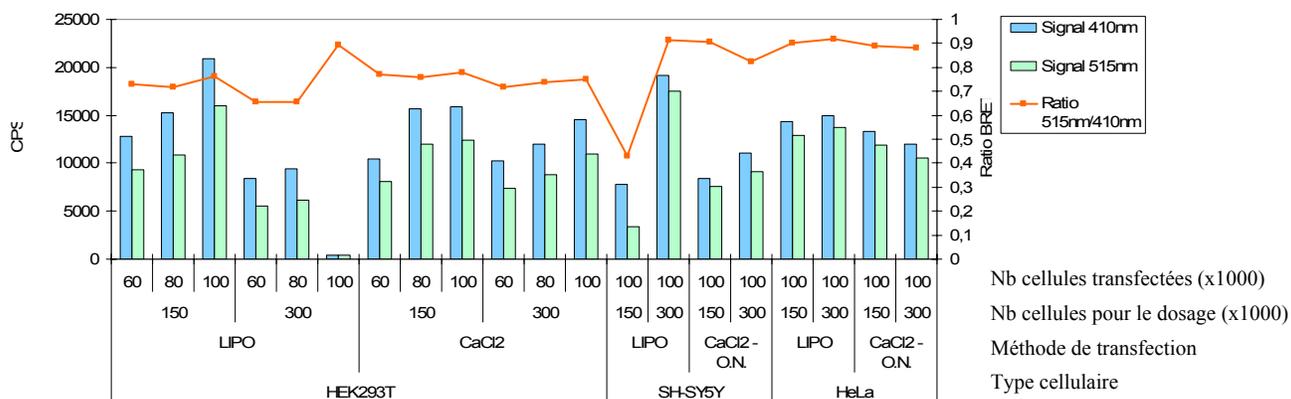


Figure 3-12 : Mise au point des conditions de l'essai BRET2 avec l'appareil Fusiona. Trois types cellulaires différents (HEK293T, SH-SY5Y et HeLa) ont été transfectées par la méthode au chlorure de calcium ou à la lipofectamine 2000 avec 2 μ g de plasmide parental pCMV-hGFP2-MCS-hRLuc. Les cellules ont étéensemencées à 150 000 cellules ou 300 000 cellules/puits avant la transfection. 60 000, 80 000 et 100 000 cellules ont été utilisées pour le dosage BRET2.

3.2.9 Essais avec les protéines de fusion et BACE

Nous avons ensuite utilisé les conditions déterminées précédemment avec le plasmide parental pCMV-hGFP2-MCS-hRLuc. Nous avons co-transfecté des cellules HEK293T à la lipofectamine avec 2 μ g des différents plasmides biosenseurs avec ou sans 0.5 μ g de pCDNA3.1zeo/BACE et nous avons utilisé le lecteur de microplaque Fusiona pour les lectures. Nous avons obtenu signal de 0,63 pour APPwtRAC avec ou sans BACE, représentant une diminution par rapport à la construction parentale. Nous avons observé une diminution plus importante avec APPswe avec ou sans BACE, avec des ratios de 0,49 et 0,47 respectivement. Enfin, nous n'avons pas observé de diminution avec APP Δ KM par rapport à la construction parentale mais nous n'avons obtenu qu'environ 500 comptes par rapport à un bruit de fond de 450, indiquant que la transfection de APP Δ KM n'a pas fonctionné lors de cet essai. La diminution de signal avec APPwtRAC et la diminution encore plus importante avec APPswe en présence de BACE étaient conformes aux résultats attendus, indiquant un clivage des deux protéines de fusion et un clivage plus important pour le mutant swedish, tel qu'observé dans les familles qui portent la mutation. Par contre, nous avons obtenu les mêmes résultats sans ajout de BACE. Nous avons donc réalisé un essai en ajoutant un inhibiteur de β -sécrétase pour vérifier l'implication de la forme endogène de BACE dans le clivage des protéines de fusion.

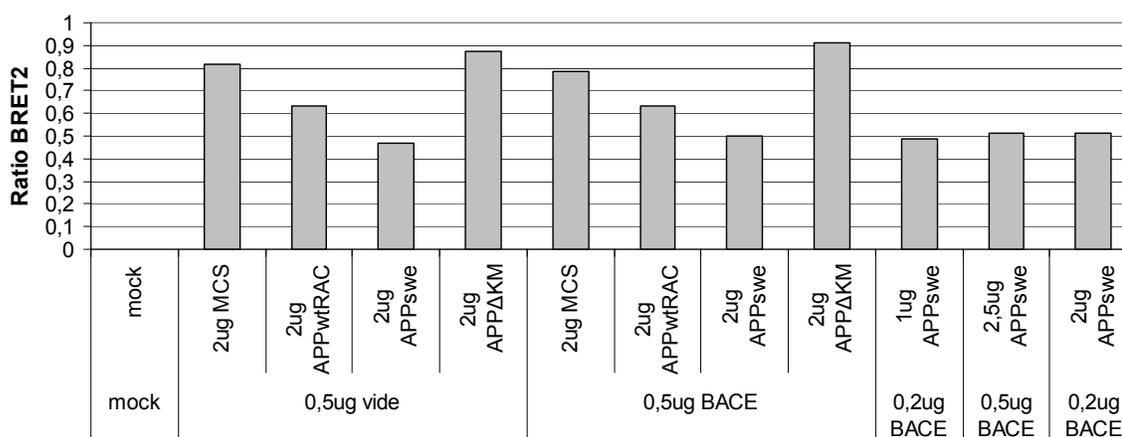


Figure 3-13 : Essai BRET2 avec l'appareil Fusion. Des cellules HEK293T ont été co-transfectées avec 1,2 ou 2.5 μ g de plasmides biosenseurs et 0,2 ou 0,5 μ g de pCDNA3.1zeo/BACE.

3.2.10 Essai avec inhibiteur de β -sécrétase

Pour ces essais, nous avons utilisé un inhibiteur de β -sécrétase nommé Z-VLL-CHO (Calbiochem) ou N-benzyloxycarbonyl-valine-leucine-leucinal, un inhibiteur perméable hautement efficace (Abbenante, Kovacs et al. 2000).

3.2.10.1 Essai avec inhibiteur de β -sécrétase Z-VLL-CHO

La concentration de Z-VLL-CHO utilisée a été déterminée à 1 μ M d'après les résultats d'études précédentes (Abbenante, Kovacs et al. 2000; Paris, Quadros et al. 2005). Des cellules HEK293T ont été co-transfectées à la lipofectamine 2000 avec 2 μ g des différents plasmides biosenseurs avec ou sans 0.5 μ g de BACE. En ajoutant 1 μ M de Z-VLL-CHO aux cellules contenant les plasmides biosenseurs sans BACE 24 heures avant le dosage BRET2, nous n'avons observé aucune augmentation de signal résultant de l'inhibition de BACE endogène.

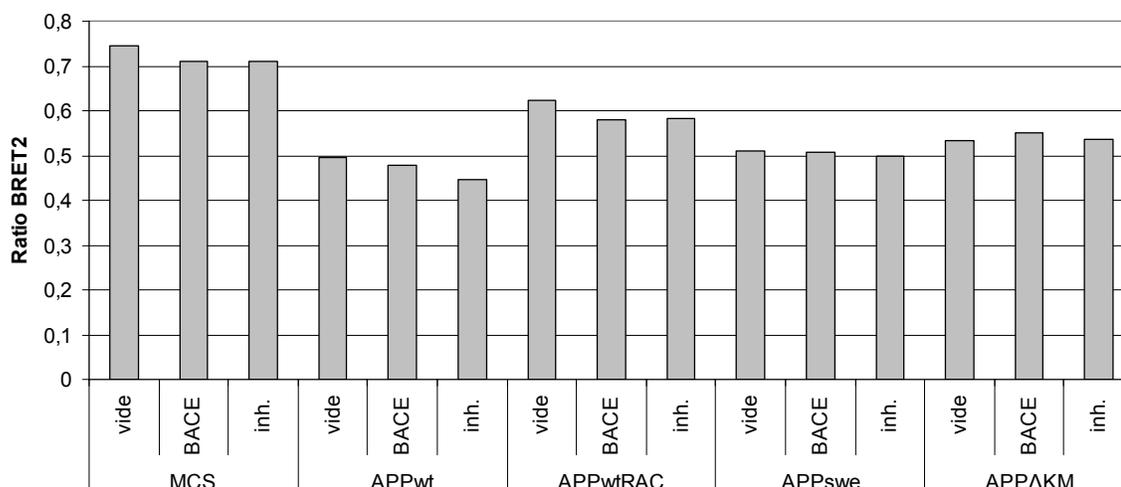


Figure 3-14 : Essai BRET2 avec inhibiteur de β -sécrétase (Z-VLL-CHO). Des cellules HEK293T ont été co-transfectées avec $2\mu\text{g}$ de plasmides biosenseurs avec ou sans $0,5\mu\text{g}$ de pCDNA3.1zeo/BACE. $1\mu\text{M}$ de Z-VLL-CHO a été ajouté aux cellules sans BACE 24 heures avant le dosage BRET2.

3.2.10.2 Optimisation de la concentration de l'inhibiteur de β -sécrétase Z-VLL-CHO

Puisque nous n'avons observé aucun effet avec $1\mu\text{M}$ de Z-VLL-CHO dans l'essai précédent, nous avons augmenté la concentration de l'inhibiteur à $5\mu\text{M}$ et $10\mu\text{M}$, qui a été ajouté aux cellules 12 heures avant d'effectuer les dosages BRET2. Pour certains puits, nous avons aussi ajouté l'inhibiteur directement dans la plaque de dosage, une heure avant d'effectuer les lectures. Les essais ont été réalisés sur des cellules HEK293T et SH-SY5Y. En plus des cellules HEK293T nous avons choisi d'utiliser des cellules SH-SY5Y, des cellules humaines dérivées d'un neuroblastome, pour se rapprocher davantage des conditions physiologiques retrouvées lors du clivage d'APP par BACE. Nous n'avons pas observé d'augmentation de signal dans la majorité des cellules transfectées avec l'ajout de Z-VLL-CHO. Nous avons observé une légère augmentation du signal dans les cellules SH-SY5Y transfectées avec $2\mu\text{g}$ de pCMV-hGFP2-APPswe-hRLuc en ajoutant $5\mu\text{M}$ de Z-VLL-CHO directement dans la plaque d'essai une heure avant les lectures. Ces résultats suggéraient un rôle de BACE endogène dans le clivage des protéines de fusion.

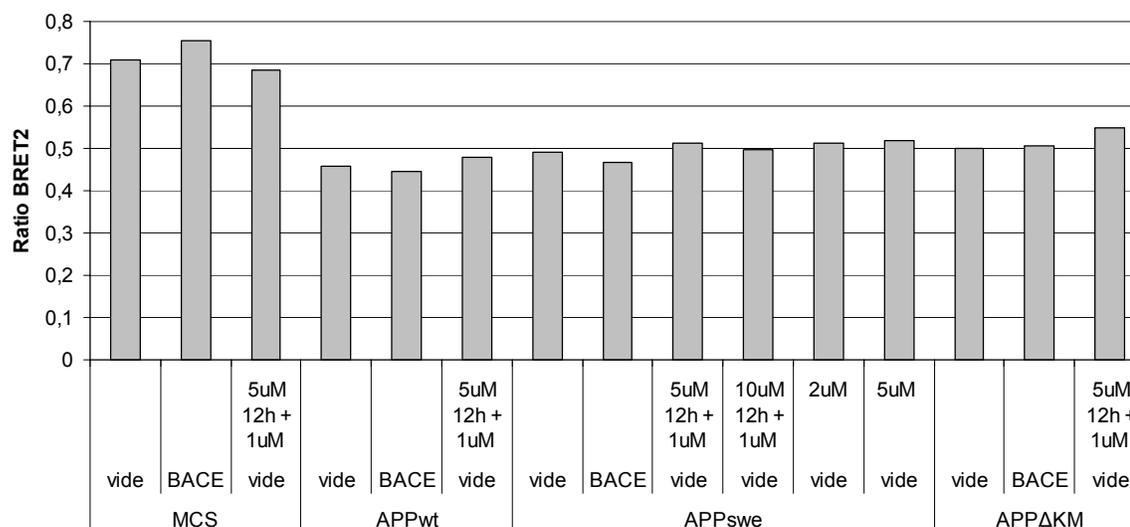


Figure 3-15 : Essai BRET2 avec concentration élevée d'inhibiteur de β -sécrétase (Z-VLL-CHO). Des cellules HEK293T ont été transfectées avec 2 μ g de plasmides biosenseurs avec ou sans 0,5 μ g de pCDNA3.1zeo/BACE. 5 μ M ou 10 μ M de Z-VLL-CHO a été ajouté aux cellules 12 heures avant l'essai et 1 μ M de Z-VLL-CHO a été ajouté directement dans la plaque de dosage et incubé une heure avant d'effectuer la lecture de la plaque. Alternativement, 2 μ M ou 5 μ M de Z-VLL-CHO a été ajouté directement dans la plaque de dosage et incubé une heure avant d'effectuer la lecture de la plaque.

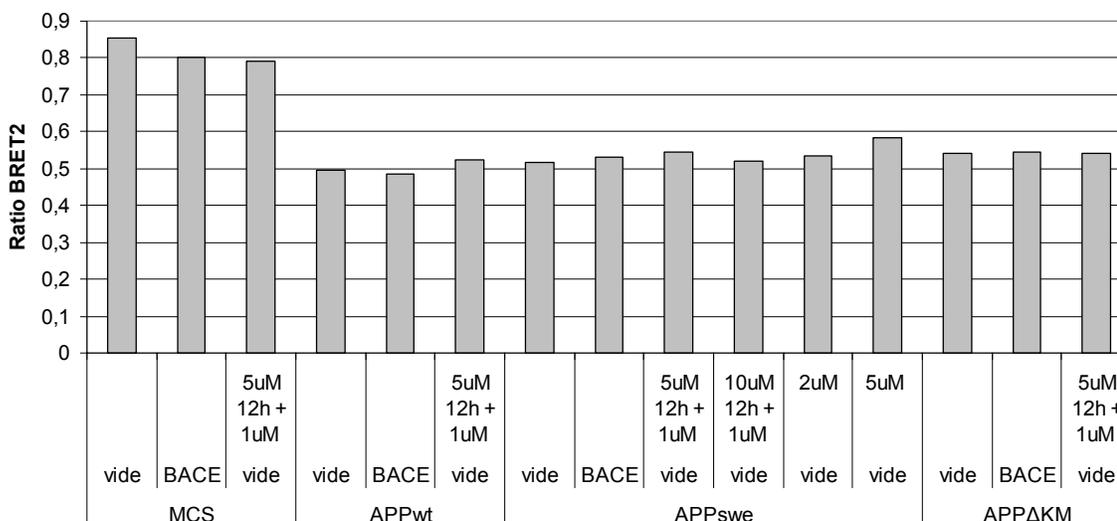


Figure 3-16 : Essai BRET2 avec concentration élevée d'inhibiteur de β -sécrétase (Z-VLL-CHO). Des cellules SH-SY5Y ont été transfectées avec 2 μ g de plasmides biosenseurs avec ou sans 0,5 μ g de pCDNA3.1zeo/BACE. 5 μ M ou 10 μ M de Z-VLL-CHO a été ajouté aux cellules 12 heures avant l'essai et 1 μ M de Z-VLL-CHO a été ajouté directement dans la plaque de dosage et incubé une heure avant d'effectuer la lecture de la plaque. Alternativement, 2 μ M ou 5 μ M de Z-VLL-CHO a été ajouté directement dans la plaque de dosage et incubé une heure avant d'effectuer la lecture de la plaque.

3.2.10.3 Contrôle de l'ajout d'inhibiteur de β -sécrétase Z-VLL-CHO

Pour vérifier les résultats obtenus lors de l'essai précédent, nous avons réalisé un second essai en ajoutant le Z-VLL-CHO directement dans la plaque d'essai avant le dosage. Nous avons aussi effectué certains contrôles qui n'avaient pas été faits lors de l'essai précédent avec le plasmide parental pCMV-hGFP2-MCS-hRLuc. En ajoutant 5 μ M ou 10 μ M de Z-VLL-CHO aux protéines de fusion, nous avons pu observer une augmentation significative du ratio BRET2 pour chacune des constructions. Par contre, cette même augmentation a été observée aussi pour les protéines de fusion avec le site de clonage multiple ou avec APP Δ KM, des constructions qui ne devraient pas être clivées par BACE (Fig 3-17). En regardant les comptes totaux et non les ratios BRET2, nous avons pu constater que l'ajout de Z-VLL-CHO a fait chuter les comptes totaux en dessous du bruit de fond (Tableau 3-2). Ces résultats suggèrent que l'ajout de 5 μ M et 10 μ M de Z-VLL-CHO directement dans les puits une heure avant l'essai interfère avec les lectures de luminescence et d'absorbance. Les ratios BRET2 calculés ne peuvent donc pas être représentatifs, expliquant pourquoi

l'augmentation de ratio a été observée autant avec les protéines de fusion MCS et APP Δ KM qu'avec les protéines de fusion APPwt et APPswe.

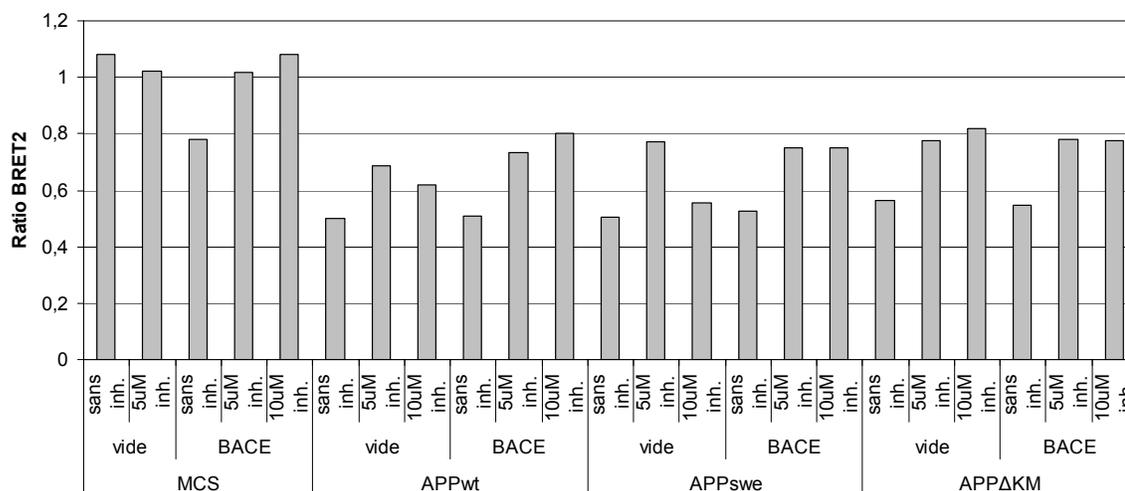


Figure 3-17 : Essai BRET2 avec ajout d'inhibiteur de β -secrétase (Z-VLL-CHO) directement dans la plaque de dosage. Des cellules SH-SY5Y ont été co-transfectées avec 2 μ g de plasmides biosenseurs avec ou sans 4 μ g de pCDNA3.1zeo/BACE. 5 μ M et 10 μ M de Z-VLL-CHO a été ajouté directement dans la plaque de dosage aux puits avec ou sans BACE et incubé une heure avant d'effectuer la lecture de la plaque.

Biosenseur (2 μ g)	Protéase	Z-VLL-CHO	Signal 410nm	Signal 515nm	Ratio 515nm/410nm
pCMV-hGFP2-MCS-hRLuc	pCDNA3	0	531	574	1,08097928
pCMV-hGFP2-MCS-hRLuc	pCDNA3	5uM	555	568	1,02342342
pCMV-hGFP2-MCS-hRLuc	pCDNA3.1zeo/BACE	0	4998	3906	0,78151261
pCMV-hGFP2-MCS-hRLuc	pCDNA3.1zeo/BACE	5uM	1386	1411	1,01803752
pCMV-hGFP2-MCS-hRLuc	pCDNA3.1zeo/BACE	10uM	1224	1324	1,08169935
pCMV-hGFP2-APPwt-hRLuc	pCDNA3	0	10147	5056	0,49827535
pCMV-hGFP2-APPwt-hRLuc	pCDNA3	5uM	1800	1239	0,68833333
pCMV-hGFP2-APPwt-hRLuc	pCDNA3	10uM	1799	1110	0,61700945
pCMV-hGFP2-APPwt-hRLuc	pCDNA3.1zeo/BACE	0	8170	4158	0,50893513
pCMV-hGFP2-APPwt-hRLuc	pCDNA3.1zeo/BACE	5uM	1446	1062	0,73443983
pCMV-hGFP2-APPwt-hRLuc	pCDNA3.1zeo/BACE	10uM	1483	1187	0,80040459
pCMV-hGFP2-APPswe-hRLuc	pCDNA3	0	9127	4603	0,50432782
pCMV-hGFP2-APPswe-hRLuc	pCDNA3	5uM	1591	1231	0,77372722
pCMV-hGFP2-APPswe-hRLuc	pCDNA3	10uM	1461	810	0,55441478
pCMV-hGFP2-APPswe-hRLuc	pCDNA3.1zeo/BACE	0	7358	3854	0,52378364
pCMV-hGFP2-APPswe-hRLuc	pCDNA3.1zeo/BACE	5uM	1219	917	0,75225595
pCMV-hGFP2-APPswe-hRLuc	pCDNA3.1zeo/BACE	10uM	1218	912	0,74876847
pCMV-hGFP2-APP Δ KM-hRLuc	pCDNA3	0	6186	3493	0,56466214
pCMV-hGFP2-APP Δ KM-hRLuc	pCDNA3	5uM	1407	1089	0,77398721
pCMV-hGFP2-APP Δ KM-hRLuc	pCDNA3	10uM	1293	1059	0,81902552
pCMV-hGFP2-APP Δ KM-hRLuc	pCDNA3.1zeo/BACE	0	9885	5419	0,54820435
pCMV-hGFP2-APP Δ KM-hRLuc	pCDNA3.1zeo/BACE	5uM	1724	1344	0,77958237
pCMV-hGFP2-APP Δ KM-hRLuc	pCDNA3.1zeo/BACE	10uM	2060	1595	0,77427184

Tableau 3-2 : Essai BRET2 avec ajout d'inhibiteur de β -secrétase (Z-VLL-CHO) directement dans la plaque de dosage. Les comptes totaux de luminescence (410nm) et de fluorescence (515nm) sont représentés de même que le ratio BRET2 obtenu (515nm/410nm).

3.2.10.4 Inhibition de l'activité endogène de BACE par APP

Comme l'ajout d'inhibiteur de Z-VLL-CHO interférerait avec les lectures de luminescence et de bioluminescence, nous avons tenté d'inhiber l'activité endogène de BACE d'une autre façon. Nous avons ajouté le substrat de BACE, la protéine APP FL (pleine longueur), pour qu'elle agisse comme compétiteur aux protéines de fusion pour l'accessibilité à BACE. Les différents plasmides biosenseurs ont été co-transfectés avec des quantités croissantes du plasmide pCDNA3/APPwt dans des cellules HEK293T et SH-SY5Y. Nous n'avons pas

observé d'augmentation du ratio BRET2 dans les deux types cellulaires avec l'ajout d'APP FL.

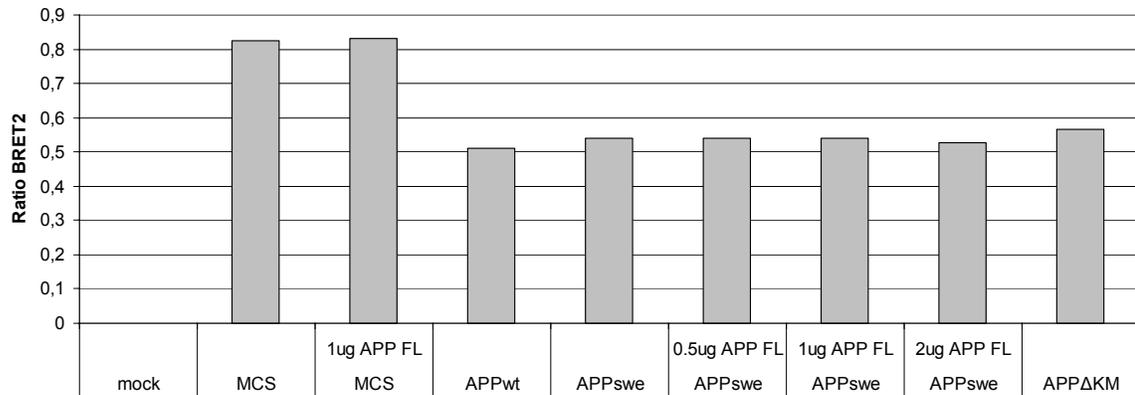


Figure 3-18 : Essai BRET2 avec quantité croissante d'APP FL. Des cellules SH-SY5Y ont été co-transfectées avec 2 μ g de plasmides biosenseurs et des quantités croissantes du substrat de BACE, APP FL.

4 Discussion

4.1 Le système rapporteur luciférase

Dans la première partie de cette étude, nous avons tenté de mettre au point un essai pour mesurer l'activité de BACE à partir d'extraits cellulaires. Nous avons utilisé le système rapporteur luciférase pour développer notre essai. Ce système est largement utilisé pour étudier l'expression de gènes eucaryotes ou certains événements cellulaires. Nous avons généré différents plasmides de fusion de façon à ce qu'ils contiennent le site de clivage de BACE sur APP, le site β , fusionné à une portion C-terminale du gène notch, h-notch. Le clivage des protéines chimériques par BACE devait ensuite permettre la libération du domaine H-Notch, sa liaison au promoteur pHES et l'activation subséquente de la transcription du gène *LUC*. L'activité de la protéase BACE au site de clivage β pouvait ainsi être mesurée par le dosage de l'activité luciférase.

Au départ, les différents plasmides ont été transfectés par la méthode au chlorure de calcium de façon transitoire. Le type de transfection transitoire permet une expression rapide des protéines à l'étude et le niveau d'expression obtenu est beaucoup plus élevé que lors d'une expression stable. Nous avons utilisé la technique au chlorure de calcium pour transfecter les plasmides pCDNA3/ β -site short/H-Notch et pCDNA3/ β -site long/H-Notch dans des cellules HEK293. Les résultats que nous avons obtenus étaient très variables. Cette variabilité peut être expliquée par deux facteurs principaux. Premièrement, nous avons omis d'utiliser un contrôle de normalisation de la transfection. Un contrôle de normalisation a donc été ajouté aux expériences subséquentes. Ce genre de contrôle est essentiel pour comparer les résultats obtenus d'un puits à l'autre et d'un essai à l'autre, après avoir normalisé ces résultats selon l'efficacité de transfection obtenue pour chaque transfection. Le plasmide codant pour la β -galactosidase est largement utilisé comme contrôle de transfection dans les essais luciférase (Gould and Subramani 1988). Le gène LacZ codant pour la β -galactosidase est placé sous le contrôle du promoteur SV40. Le plasmide est co-transfecté en présence du plasmide codant pour la luciférase et l'activité β -galactosidase est mesurée séparément de l'activité luciférase pour chaque essai. La valeur de l'activité luciférase est ensuite rapportée sur la valeur de l'activité β -galactosidase pour

obtenir une valeur d'activité luciférase relative, normalisée selon l'efficacité de transfection. Deuxièmement, la variabilité de nos résultats peut être expliquée par le type de transfection utilisé. Lors d'une transfection transitoire, l'expression des plasmides est temporaire et habituellement perdue après une période de 72 heures; les nucléases et divisions cellulaires dégradent et divisent l'ADN étranger (Alam and Cook 1990). Les plasmides utilisés doivent donc être transfectés pour chaque expérience, ce qui réduit la reproductibilité et la fiabilité de l'essai. De plus, l'essai que nous avons tenté de développer nécessitait la transfection de cinq plasmides différents : un plasmide contrôle codant pour la β -galactosidase, un plasmide codant pour pHES-luciférase, un plasmide codant pour la protéine chimérique, un plasmide codant pour BACE et finalement un plasmide codant pour une protéine d'intérêt pouvant modifier l'activité de BACE. La cotransfection transitoire de cinq plasmides est susceptible d'entraîner une grande variabilité des résultats si les différents plasmides influencent leur expression entre eux (Bergeron, Barbeau et al. 1995). Pour réduire la variabilité de notre essai, nous avons décidé d'établir une lignée cellulaire stable de cellules HEK293 exprimant pHES-luciférase et d'utiliser le contrôle β -galactosidase pour normaliser les transfections. L'expression stable de pHES-luciférase devait aussi permettre de réduire le nombre de plasmides transfectés et aussi de réduire la variabilité en exprimant le plasmide rapporteur de façon stable.

La lignée cellulaire stable a été créée par sélection avec 1.5mg/ml de G418-sulfate, un analogue de la néomycine. Vingt-quatre clones différents ont été testés pour la plus grande augmentation d'activité luciférase après transfection de l'activateur de transcription ICN et la plus grande diminution d'activité luciférase après transfection du répresseur de transcription HES-1. Le clone 24 est celui qui présentait le meilleur profil pour la suite des essais.

Nous avons utilisé le clone 24 pour mesurer l'activité luciférase des constructions pCMVzeo/APP5'→ β /H-Notch et pCMVzeo/APP5'→ $\beta\beta$ '/H-Notch. Nous avons choisi d'utiliser ces constructions, plus longues que les constructions pCDNA3/ β -site short/H-Notch et pCDNA3/ β -site long/H-Notch, pour s'assurer que le domaine H-Notch ne soit pas libéré sans clivage par BACE. Pourtant, nous n'avons pas réussi à tester ces constructions

dans des cellules stables pHES-luciférase. En effet, pour chaque expérience réalisée avec le clone 24 nous avons observé l'activité luciférase la plus élevée avec les cellules seules, non-transfectées. Nous pensons que cette autoactivation de l'expression de la luciférase dans les cellules pHES-luciférase stable peut être due au site d'intégration du gène pHES-luciférase dans le génome de la cellule. Le gène pHES-luciférase a en effet pu être intégré à proximité d'éléments régulateurs pouvant activer l'expression de la luciférase.

Nous avons décidé de revenir au type de transfection transitoire pour la suite de l'étude. Nous n'avons pas observé d'autoactivation de l'activité luciférase en transfectant seulement le plasmide pHES-luciférase dans les cellules HEK293. En utilisant les mêmes constructions, pCMVzeo/APP5'→β/H-Notch et pCMVzeo/APP5'→ββ'/H-Notch, nous n'avons pas réussi à observer une augmentation de l'activité luciférase en présence de BACE. Nous avons utilisé les cellules COS-1 pour tester les mêmes constructions dans un type cellulaire différent. Nous n'avons pas obtenu d'augmentation de l'activité luciférase dans ce type cellulaire non plus. Nous pensons que cette absence d'augmentation de l'activité luciférase peut être expliquée par une trop faible affinité de substrat entre BACE et son substrat APPwt.

Nous avons décidé de modifier les constructions de façon à augmenter les chances de clivage par BACE. Pour ce faire, nous avons généré des constructions à partir de la protéine APP portant la mutation swedish qui, tel que décrit au point 1.6.7, représente un meilleur substrat pour BACE que la protéine APP de type sauvage. Les deux constructions pCMVzeo/sweβsite/H-Notch ou pCMVzeo/APPswe5'→β/H-Notch ont été testées dans des cellules COS-1. L'augmentation de l'activité luciférase que nous avons observée avec la construction pCMVzeo/sweβsite/H-Notch avec et sans BACE et avec le mutant catalytiquement inactif BACED93AD289A suggère que H-Notch était libéré sans clivage dans cette construction.

Malgré les nombreuses constructions testées, nous n'avons pas réussi à trouver une construction qui permettrait de mesurer l'activité de BACE dans un système luciférase. Certaines protéines chimériques n'étaient pas clivées alors qu'une protéine chimérique semblait clivée sans l'ajout de BACE. Le clone exprimant pHES-luciférase de façon stable que nous avons utilisé a démontré une grande activité luciférase de base, lorsque non-

transfecté, ce qui a rendu son utilisation impossible pour mesurer l'activité des protéines chimériques. Nous aurions pu tester d'autres clones, mais en raison de la grande variabilité de résultats obtenus avec le système rapporteur luciférase, nous avons préféré développer un essai basé sur une autre technologie. En effet, nous croyons qu'en raison du nombre et de la nature des plasmides utilisés dans notre essai, le système luciférase n'était pas adapté pour notre essai. Certaines études ont démontré que la coexpression de plusieurs plasmides dans un système rapporteur luciférase peut engendrer des résultats faussés parce que l'expression des différents plasmides est influencée par les autres plasmides (Bergeron, Barbeau et al. 1995). Ces études remettent même en question l'utilisation du contrôle β -galactosidase dans la normalisation des essais luciférase et dans certains cas, l'expression de la β -galactosidase a été affectée par les plasmides étudiés (Huszar, Mucsi et al. 2001). L'utilisation d'un second plasmide rapporteur pour contrôler l'efficacité de transfection dans un essai rapporteur luciférase peut donc, dans certains types d'expériences, conduire à des résultats faussés. Malgré les différentes sources de biais possibles, le système rapporteur luciférase est couramment utilisé aujourd'hui. De plus, l'utilisation d'un second plasmide rapporteur pour normaliser les résultats par rapport à l'efficacité de transfection est essentielle afin d'obtenir des résultats fiables et reproductibles. Nous avons donc utilisé initialement le système rapporteur luciférase pour mettre au point notre essai. Pourtant, il est possible que cette approche ne soit pas adaptée au genre d'essai que nous cherchions à développer.

Par ailleurs, un système de criblage de modulateurs de l'activité de BACE1 idéal devrait se rapprocher le plus possible des conditions physiologiques retrouvées dans la cellule. Pourtant, la majorité des essais servant à mesurer l'activité de BACE1, tout comme l'essai qui a été développé dans cette première partie du projet, sont des essais réalisés *in vitro*. Dans la deuxième partie du projet, nous avons donc tenté de développer un essai pour permettre une analyse *in vivo* de l'activité de BACE1 et qui pourrait être réalisés sur des cellules humaines.

4.2 Le système BRET2

Les premiers essais qui ont été développés utilisaient des substrats synthétiques contenant le site de clivage β (Sinha, Anderson et al. 1999; Vassar, Bennett et al. 1999; Li, Liu et al. 2001; Mallender, Yager et al. 2001). Par la suite, d'autres essais utilisant aussi un substrat synthétique (Stockley, Ravid et al. 2006) ou une enzyme synthétique (Sano, Tomizaki et al. 2006) ont été développés. Enfin, il existe un essai permettant de mesurer l'activité de BACE1 *in vivo* mais cet essai est réalisé dans un modèle de levures (Luthi, Schaerer-Brodbeck et al. 2003). Le système que nous avons imaginé aurait été le premier système permettant de mesurer l'activité de BACE *in vivo* sur des cellules humaines vivantes.

Nous avons utilisé un système basé sur le principe de BRET2 (Bioluminescence Resonance Energy Transfer 2) pour mesurer l'activité de BACE *in vivo*. Ce système possède l'avantage d'être réalisé sur des cellules vivantes, éliminant le besoin de réaliser des extraits cellulaires ou purification de protéines qui éloignent les conditions de l'étude des conditions réelles retrouvées dans la cellule. Cette technique permet aussi une normalisation simple et rapide des résultats obtenus. L'expression des résultats sous la forme de ratio fluorescence/ luminescence permet de normaliser les valeurs peu importe l'efficacité de transfection et permet aussi de comparer les valeurs obtenues d'un essai à l'autre.

Le système BRET2 a été utilisé pour mettre en évidence de nombreuses interactions protéiques. L'interaction la plus étudiée avec le système BRET2 demeure sans doute celle des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) entre eux (Kroeger, Hanyaloglu et al. 2001; Ramsay, Kellett et al. 2002; Gales, Rebois et al. 2005). Le système a aussi été utilisé pour mettre en évidence plusieurs autres interactions impliquant des récepteurs, tels les récepteurs à l'insuline (Issad, Boute et al. 2003; Nouaille, Blanquart et al. 2006), de la leptine (Couturier and Jockers 2003) ou des opioïdes (Wang, Sun et al. 2005). La technologie BRET2 peut aussi être utilisée pour mettre en évidence certains événements cellulaires qui n'impliquent pas nécessairement une interaction entre deux protéines, mais plutôt certains événements comme la protéolyse. La première application de cette version « biosenseur » de l'essai BRET2 a été commercialisée par la compagnie PerkinElmer par un essai impliquant le clivage de la caspase-3 sur son substrat (Angers, Salahpour et al.

2000). Récemment, un second groupe a utilisé l'essai biosenseur BRET2 pour mesurer l'activité d'une protéase du HIV-1 (Hu, Clement et al. 2005). Nous nous sommes donc basé sur ces dernières études pour développer un essai permettant de mesurer l'activité de BACE *in vivo*.

Le développement d'un nouvel essai utilisant la technologie BRET2 requiert plusieurs étapes d'optimisation dépendamment des protéines étudiées et du type cellulaire utilisé. Dans notre cas, nous avons utilisé la protéase BACE et son substrat APP, des protéines qui n'ont jamais été utilisées dans un système BRET2. L'optimisation de l'essai nécessitait donc plusieurs mises au point.

Nous avons tout d'abord vérifié les paramètres de détection de l'essai avec l'appareil Victor3 en utilisant le plasmide parental pCMV-hGFP2-MCS-hRLuc. Ce plasmide sert de contrôle positif dans les essais en permettant l'expression d'une protéine de fusion contenant la RLuc fusionnée à la GFP par une séquence peptidique de 18 acides aminés, le site de clonage multiple. Le site de clonage multiple, non clivable, maintient les deux protéines à proximité permettant un transfert résonant d'énergie (RET) de la RLuc vers la GFP et permet donc d'obtenir un ratio de fluorescence/luminescence de 1.0. Lors de notre premier essai nous avons utilisé différents types cellulaires et transfecté des concentrations croissantes du plasmide parental. Nous avons obtenu des comptes plus élevés en utilisant 1.0 et 2.0 μ g de plasmide dans des cellules HeLa. Nous avons donc utilisé ces paramètres pour la suite de l'expérience.

Le but de notre étude était de mesurer l'activité de BACE sur son substrat APP. Nous avons donc généré différents plasmides biosenseurs contenant le site de clivage β sur APP et transfecté ces plasmides en présence ou non de BACE pour ensuite effectuer des dosages BRET2. Malgré les nombreuses mises au point que nous avons réalisées, nous n'avons pas réussi à développer un système *in vivo* pour BACE.

Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence l'importance de l'appareil de détection utilisé dans les essais BRET2. Dans les premiers essais, nous avons utilisé l'appareil Victor3 (PerkinElmer Inc.) qui s'est avéré être peu performant pour détecter les signaux de luminescence et de fluorescence. Bien que l'appareil Victor3 rencontrait toutes les

caractéristiques nécessaires à la détection du BRET2 : lectures de luminescence et de fluorescence consécutives, lecture à partir du haut de la plaque, filtres d'émission à 410nm et à 515nm, l'appareil s'est révélé très peu sensible pour mesurer le BRET2. Nous avons obtenu une grande variabilité de résultats avec cet appareil et les faibles comptes totaux que nous avons obtenus ont démontré la faible sensibilité de cet appareil pour notre essai. Cette faible sensibilité de l'appareil pour notre essai pourrait être expliquée par l'utilisation du DeepBlueC comme substrat de la Renilla luciférase. La première génération du système BRET (BRET et non BRET2) utilisait la RLuc comme molécule donneuse, la coelenterazine h comme substrat et la eYFP (enhanced Yellow Fluorescence Protein), un variant génétique de la GFP, comme molécule acceptrice (Xu, Piston et al. 1999). Dans cet essai, le pic maximum d'émission de la RLuc était de 475nm et celui de la eYFP de 515nm, résultant en une faible différence spectrale (environ 40nm) entre les deux molécules. Le pic d'émission produit par la RLuc étant très large, il y avait chevauchement des deux pics d'émissions et donc faible résolution de l'essai. Dans la seconde génération BRET2, un dérivé de la coelenterazine h a été créé : le DeepBlueC. L'oxydation du DeepBlueC par la RLuc produit un pic d'émission particulier à 395nm. La GFP2 possède un pic d'excitation à 400nm, ce qui en fait une molécule parfaitement adaptée au DeepBlueC. Le pic maximum d'émission de la GFP2 de 510nm permet alors une grande différence spectrale entre les deux molécules (environ 115nm). Les deux pics sont ainsi plus facilement distingués ce qui a pour effet d'entraîner un faible bruit de fond et donc une meilleure résolution de l'essai (Hamdan, Audet et al. 2005). Le BRET2 possède toutefois un désavantage important par rapport au BRET original : l'utilisation du DeepBlueC génère plus de 100 fois moins de photons que l'utilisation de la coelenterazine h. Dans une étude récente, il a été démontré que la luminescence émise par la RLuc en utilisant le substrat DeepBlueC était plus de 300 fois moins élevée que la luminescence émise en utilisant la coelenterazine h (Hamdan, Audet et al. 2005). Dans cette même étude, il a aussi été observé que la luminescence émise suite à l'utilisation du DeepBlueC décroît beaucoup plus rapidement (demi-vie de 1 minute) comparativement à la coelenterazine (demi-vie de 3 minutes). Les lectures de BRET2 exigent donc un appareil de détection plus sensible et un plus grand nombre de cellules que le BRET. Par ailleurs, comme le signal décroît très rapidement, il est parfois nécessaire d'utiliser un injecteur automatique pour ajouter le

substrat à intervalle régulier dans chaque puits avant leur lecture, surtout lorsque plusieurs puits doivent être analysés. Nous pensons que l'appareil Victor3 utilisé dans la première partie du projet n'était pas assez sensible pour détecter les faibles valeurs de luminescence obtenue en utilisant le DeepBlueC. Nous avons ensuite contacté la compagnie PerkinElmer pour obtenir du support concernant l'appareil utilisé. Ces derniers nous ont suggéré d'utiliser le lecteur multiplaque Fusion α , un lecteur plus sensible que le Victor3 pour le BRET2. Nous avons refait les expériences de mise au point avec cet appareil en utilisant le plasmide parental pCMV-hGFP2-MCS-hRLuc et l'appareil Fusion α s'est en effet révélé plus de 10 fois plus sensible que le Victor3.

Nous avons observé de meilleurs signaux BRET2 en transfectant les différents plasmides avec la lipofectamine 2000 comparativement au chlorure de calcium. Nous avons obtenu de meilleurs signaux en utilisant 100 000 cellules HEK293 et ensuite en utilisant 100 000 cellules SH-SY5Y. Nous avons décidé de conserver les deux types de cellules, les cellules HEK293 parce qu'elles avaient généré les meilleurs signaux BRET2 et qu'elles sont efficacement transfectées avec la lipofectamine 2000 (Invitrogen) et les cellules SH-SY5Y parce qu'elles représentaient le meilleur modèle pour nous pour reproduire les conditions physiologiques retrouvées dans les cellules neuronales.

Pour chaque expérience, il était possible de confirmer l'expression des protéines de fusion et de BACE par immunobuvardage avec les mêmes extraits que ceux utilisés pour le dosage BRET2. En effet, le système BRET2 a l'avantage d'utiliser un substrat non toxique et non invasif; après les dosages BRET2, les cellules n'ont qu'à être lavées avec du PBS et resuspendues dans du tampon de lyse pour être analysées par immunobuvardage. Cette particularité permet une comparaison précise entre le signal BRET2 obtenu et l'expression des protéines. Nous avons donc confirmé l'expression des protéines de fusion et de BACE par immunobuvardage. L'expression de chaque protéine de fusion et de BACE était suffisante pour permettre l'analyse par BRET2.

En effectuant les analyses BRET2, nous n'avons pas réussi à mesurer le clivage des protéines de fusion par BACE. Nous avons obtenu une diminution du ratio BRET2 avec les constructions APPwt, APPswe et APP Δ KM mais cette diminution a été observée autant avec l'ajout de vecteur vide qu'avec l'ajout de BACE. Nous avons voulu vérifier si ces

résultats étaient dus à une absence de clivage malgré l'ajout de BACE ou plutôt à un clivage sans surexpression de BACE en raison de la présence d'une forme endogène de BACE. La protéine BACE est fortement exprimée dans les cellules neuronales, il aurait donc été probable que les cellules SH-SY5Y, dérivées de neuroblastomes humains, expriment un niveau suffisant de BACE pour cliver les protéines de fusion. Par contre, nous avons obtenu les mêmes résultats avec des cellules HEK293, des cellules embryonnaires rénales humaines. Il a toutefois été démontré que BACE est exprimé à de plus faibles niveaux dans le rein (Rossner, Apelt et al. 2001) et nous pensons qu'une faible quantité de BACE endogène pouvait suffire pour cliver les protéines de fusion. Nous avons voulu vérifier si en inhibant la protéine BACE exprimée de façon endogène, nous pouvions empêcher le clivage des protéines de fusion. L'implication d'une forme endogène de BACE ne représentait pas un obstacle au développement de l'essai mais plutôt un avantage en enlevant le besoin de surexprimer BACE pour mesurer son activité. Par contre, il était nécessaire de s'assurer que les protéines de fusion étaient bel et bien clivées par la forme endogène de BACE. Pour analyser l'inhibition de BACE, nous avons effectué des essais BRET2 en regardant s'il y avait augmentation du ratio BRET2, signifiant une diminution du clivage des protéines de fusion et donc une inhibition efficace de BACE. Nous n'avons pas vérifié la diminution de l'expression de BACE par immunobuvardage étant donné qu'à ce moment, dans le laboratoire, nous n'étions pas parvenu à détecter la forme endogène de BACE par immunobuvardage avec les anticorps disponibles.

Les essais que nous avons réalisés pour inhiber la forme endogène de BACE se sont révélés peu concluants. Tout d'abord, en ajoutant 2 μ M ou 5 μ M d'inhibiteur spécifique de β -sécrétase Z-VLL-CHO, nous n'avons pas noté d'augmentation du ratio BRET2 pour prouver qu'il y avait eu inhibition de BACE. En utilisant de plus hautes concentrations de Z-VLL-CHO, nous avons observé une augmentation du ratio BRET2. Par contre, nous avons aussi observé une chute importante des signaux totaux de luminescence et de fluorescence, en dessous des valeurs de bruit de fond, empêchant une analyse correcte des résultats. Cette chute des valeurs de luminescence et de fluorescence a été observée à chaque utilisation du Z-VLL-CHO. Nous n'avons donc pas pu vérifier l'inhibition de la forme endogène de BACE avec cet inhibiteur par essai BRET2, qui semble interférer avec la luminescence et la fluorescence. Nous avons donc tenté de détourner l'action de BACE

des protéines de fusion en utilisant le substrat physiologique de BACE, la protéine APP pleine longueur, pour compétitionner avec ces derniers pour l'accès à BACE. Une fois de plus, nous n'avons pas observé d'augmentation du ratio BRET2 en exprimant APP pleine longueur.

Au départ, avec les résultats obtenus à la figure 3.12, nous avons émis l'hypothèse que les protéines de fusion étaient 1) non clivées malgré l'ajout de BACE ou 2) clivées sans surexpression de BACE en raison de la présence d'une forme endogène de BACE. Nous n'avons pas réussi à démontrer la présence d'une activité endogène de BACE et son effet sur les résultats BRET2 dans les cellules HEK293 et SH-SY5Y. Même si d'autres analyses seraient nécessaires pour confirmer l'absence d'implication d'une forme endogène de BACE dans les résultats obtenus, nous croyons que les protéines de fusion pouvaient être très difficilement clivées par BACE. Nous croyons que les diminutions de ratio BRET2 que nous avons obtenues aux figures 3.12 et 3.13 ne reflètent que la longueur des peptides biosenseurs utilisés. En effet, lorsque la longueur des peptides biosenseurs en acides aminés est comparée au ratio BRET2 obtenu, nous pouvons observer une relation inversement proportionnelle entre la longueur du peptide biosenseur et le ratio BRET2 obtenu. La différence de ratio BRET2 obtenu avec les diverses protéines de fusion MCS, APPwt, APPwtRAC, APPswe et APPΔKM a toujours été constante au cours des expériences. Le peptide biosenseur MCS séparait la GFP et la RLuc de 18 acides aminés, APPwtRAC de 20 acides aminés, APPΔKM de 23 acides aminés et APPwt et APPswe de 25 acides aminés. À partir des résultats obtenus à la figure 3.13, on observe la plus grande diminution de ratio BRET2 par rapport au contrôle MCS pour APPwt et swe, ensuite pour APPΔKM et finalement pour APPwtRAC. Comme le transfert d'énergie entre la RLuc et la GFP décroît en fonction inverse de la puissance 6 de leur distance, il est fort possible que les diminutions de ratio BRET2 observées ne soient dues qu'à la longueur du peptide biosenseur plutôt qu'au clivage. Il serait intéressant de refaire les plasmides biosenseurs de façon à remplacer la séquence peptidique du MCS retirée lors du clonage par une séquence exactement de la même longueur. Des séquences peptidiques de longueurs croissantes contenant le même site de clivage pourraient aussi être générées pour permettre d'évaluer l'importance de la longueur du peptide biosenseur dans l'essai.

Malgré cette diminution de base du ratio BRET2, nous aurions pu mesurer le clivage par BACE par une diminution encore plus marquée du ratio BRET2, se rapprochant davantage de la valeur 0. Toutefois, il est aussi possible que le système développé ne permette tout simplement pas de mesurer le clivage d'APP par BACE. Les peptides biosenseurs que nous avons insérés entre la RLuc et la GFP ont pu, par exemple, prendre une conformation particulière ayant comme résultat de rapprocher les deux protéines pour augmenter l'encombrement stérique et empêcher l'accès de BACE au site de clivage.

Par ailleurs, le système BRET2 possède le désavantage de ne pas tenir compte de la structure secondaire du substrat étant donné que seule une courte séquence du site de clivage du substrat est inséré entre la RLuc et la GFP. Pourtant, certaines évidences suggèrent que le clivage d'APP par BACE serait autant régulé par la localisation et l'accessibilité du substrat que par sa séquence. En effet, plusieurs études ont démontré que BACE possède une spécificité de substrat très large et qu'il ne présente que très peu d'affinité envers ses substrats naturels, APPwt et APPswe. Par des études de cinétique où ils ont analysé une librairie de peptides synthétiques générés de façon aléatoire, Turner et al. ont identifié la séquence du substrat idéal pour BACE comme étant : EIDL*MVMD. Cette séquence était clivée 14 fois mieux que la séquence APPswe EVNL*DAEF (Turner, Koelsch et al. 2001). Cette faible spécificité de substrat de BACE envers APP suggère qu'APP n'est pas le seul substrat de BACE et qu'il existe un meilleur substrat physiologique pour BACE. Confirmant cette hypothèse, sept autres substrats de BACE ont été identifiés jusqu'à maintenant (cf.1.6.7). Curieusement, les sites de clivage de ces substrats possèdent très peu ou pas d'homologie entre elles, suggérant que le clivage de ces substrats par BACE ne serait pas essentiellement séquence-spécifique. Certains groupes ont suggéré que le clivage de APP par BACE pourrait être régulé par une protéine modulant l'accessibilité d'APP ou induisant un changement conformationnel pour exposer ou masquer le site- β envers BACE (Li and Sudhof 2004). Il est impossible que la protéine de fusion que nous avons générée puisse subir les mêmes changements conformationnelles que la protéine APP pleine longueur. L'exposition ou masquage du site- β pourrait aussi nécessiter certaines modifications post-traductionnelles d'APP, des modifications qui, une fois de plus, risquent peu d'avoir lieu sur la protéine de fusion générée pour l'essai.

Enfin, plusieurs études ont souligné l'importance de la colocalisation de BACE et d'APP à la membrane pour permettre le clivage d'APP (Wolozin 2001; Yan, Han et al. 2001). Il est probable que la protéine de fusion générée pour l'essai BRET2 n'ait pas été ciblée à la membrane cellulaire et à la membrane du Golgi comme la protéine APP normale. Cette différence de colocalisation a pu empêcher l'interaction de BACE avec la protéine de fusion, ne permettant pas le clivage de cette dernière.

5 Conclusion

L'objectif de cette étude était de développer un essai pour mesurer l'activité de BACE dans des cellules humaines. Cet essai devait par la suite permettre le criblage à grande échelle de différentes protéines afin d'identifier des protéines pouvant modifier l'activité de BACE.

Deux systèmes différents ont été utilisés pour le développement de l'essai. Dans la première partie du projet, un essai basé sur le système rapporteur luciférase a été développé. Différentes protéines chimériques portant le site de clivage de BACE ont été testées pour leur capacité à activer l'expression de la luciférase lorsque clivée par BACE. Malgré l'établissement d'une lignée cellulaire stable exprimant le plasmide rapporteur, les résultats que nous avons obtenus étaient très variables. En raison du manque de contrôles adéquats pour normaliser nos résultats et parce que nous avons préféré un système qui permettrait une analyse *in vivo* de l'activité de BACE plutôt qu'*in vitro*, nous avons développé un second système.

Dans la deuxième partie de notre étude, nous avons développé un essai basé sur le principe de Bioluminescence Resonance Energy Transfer 2 (BRET2). Cet essai avait l'avantage d'être un système rapide, non-toxique permettant l'analyse *in vivo* de cellules humaines vivantes. En raison de la grande complexité des événements moléculaires, l'utilisation de systèmes qui se rapprochent le plus près possible des conditions physiologiques retrouvées dans la cellule est devenu presque essentiel dans la recherche de partenaires protéiques. Malgré les nombreuses optimisations que nous avons effectuées, nous n'avons pas réussi à développer un système qui permette de mesurer l'activité de BACE sur son substrat APP.

Les résultats de notre étude sont un exemple d'un des plus grands obstacles de la recherche en biologie cellulaire et moléculaire d'aujourd'hui : l'énorme complexité cellulaire. Malgré les nombreux outils et techniques qui ont été développés jusqu'à ce jour et malgré les nombreuses connaissances que nous avons acquises, il est encore extrêmement difficile d'étudier des événements cellulaires isolés tout en maintenant l'intégrité du contexte dans lequel ces événements ont lieu.

Bibliographie

- Abbenante, G., D. M. Kovacs, et al. (2000). "Inhibitors of beta-amyloid formation based on the beta-secretase cleavage site." Biochem Biophys Res Commun **268**(1): 133-5.
- Alam, J. and J. L. Cook (1990). "Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription." Anal Biochem **188**(2): 245-54.
- Angers, S., A. Salahpour, et al. (2000). "Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3684-9.
- Benjannet, S., A. Elagoz, et al. (2001). "Post-translational processing of beta-secretase (beta-amyloid-converting enzyme) and its ectodomain shedding. The pro- and transmembrane/cytosolic domains affect its cellular activity and amyloid-beta production." J Biol Chem **276**(14): 10879-87.
- Bennett, B. D., P. Denis, et al. (2000). "A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's beta -secretase." J Biol Chem **275**(48): 37712-7.
- Bergeron, D., B. Barbeau, et al. (1995). "Experimental bias in the evaluation of the cellular transient expression in DNA co-transfection experiments." Cell Mol Biol Res **41**(3): 155-9.
- Bertrand, L., S. Parent, et al. (2002). "The BRET2/arrestin assay in stable recombinant cells: a platform to screen for compounds that interact with G protein-coupled receptors (GPCRS)." J Recept Signal Transduct Res **22**(1-4): 533-41.
- Bird, T. D. (2005). "Genetic factors in Alzheimer's disease." N Engl J Med **352**(9): 862-4.
- Blanquart, C., N. Boute, et al. (2005). "Monitoring the activation state of the insulin-like growth factor-1 receptor and its interaction with protein tyrosine phosphatase 1B using bioluminescence resonance energy transfer." Mol Pharmacol **68**(3): 885-94.
- Blennow, K., M. J. de Leon, et al. (2006). "Alzheimer's disease." Lancet **368**(9533): 387-403.
- Bodendorf, U., F. Fischer, et al. (2001). "A splice variant of beta-secretase deficient in the amyloidogenic processing of the amyloid precursor protein." J Biol Chem **276**(15): 12019-23.
- Brown, M. S., J. Ye, et al. (2000). "Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans." Cell **100**(4): 391-8.
- Cai, H., Y. Wang, et al. (2001). "BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons." Nat Neurosci **4**(3): 233-4.
- Cai, X. D., T. E. Golde, et al. (1993). "Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor." Science **259**(5094): 514-6.
- Christensen, M. A., W. Zhou, et al. (2004). "Transcriptional regulation of BACE1, the beta-amyloid precursor protein beta-secretase, by Sp1." Mol Cell Biol **24**(2): 865-74.
- Citron, M., D. Westaway, et al. (1997). "Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice." Nat Med **3**(1): 67-72.
- Couturier, C. and R. Jockers (2003). "Activation of the leptin receptor by a ligand-induced conformational change of constitutive receptor dimers." J Biol Chem **278**(29): 26604-11.

- Creemers, J. W., D. Ines Dominguez, et al. (2001). "Processing of beta-secretase by furin and other members of the proprotein convertase family." J Biol Chem **276**(6): 4211-7.
- De Strooper, B., P. Saftig, et al. (1998). "Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein." Nature **391**(6665): 387-90.
- Edbauer, D., E. Winkler, et al. (2002). "Presenilin and nicastrin regulate each other and determine amyloid beta-peptide production via complex formation." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(13): 8666-71.
- Francis, R., G. McGrath, et al. (2002). "aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation." Dev Cell **3**(1): 85-97.
- Fukumoto, H., B. S. Cheung, et al. (2002). "Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease." Arch Neurol **59**(9): 1381-9.
- Gales, C., R. V. Rebois, et al. (2005). "Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells." Nat Methods **2**(3): 177-84.
- Glenner, G. G. and C. W. Wong (1984). "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein." Biochem Biophys Res Commun **120**(3): 885-90.
- Goldgaber, D., M. I. Lerman, et al. (1987). "Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease." Science **235**(4791): 877-80.
- Gould, S. J. and S. Subramani (1988). "Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology." Anal Biochem **175**(1): 5-13.
- Gouras, G. K., H. Xu, et al. (1998). "Generation and regulation of beta-amyloid peptide variants by neurons." J Neurochem **71**(5): 1920-5.
- Goutte, C. (2002). "Genetics leads the way to the accomplices of presenilins." Dev Cell **3**(1): 6-7.
- Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, et al. (1986). "Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(13): 4913-7.
- Haass, C., A. Y. Hung, et al. (1993). "beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms." J Biol Chem **268**(5): 3021-4.
- Hamdan, F. F., M. Audet, et al. (2005). "High-throughput screening of G protein-coupled receptor antagonists using a bioluminescence resonance energy transfer 1-based beta-arrestin2 recruitment assay." J Biomol Screen **10**(5): 463-75.
- Hardy, J. and D. Allsop (1991). "Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease." Trends Pharmacol Sci **12**(10): 383-8.
- He, W., Y. Lu, et al. (2004). "Reticulon family members modulate BACE1 activity and amyloid-beta peptide generation." Nat Med **10**(9): 959-65.
- He, X., F. Li, et al. (2005). "GGA proteins mediate the recycling pathway of memapsin 2 (BACE)." J Biol Chem **280**(12): 11696-703.
- Holsinger, R. M., C. A. McLean, et al. (2002). "Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease." Ann Neurol **51**(6): 783-6.
- Hong, L., G. Koelsch, et al. (2000). "Structure of the protease domain of memapsin 2 (beta-secretase) complexed with inhibitor." Science **290**(5489): 150-3.

- Hu, K., J. F. Clement, et al. (2005). "A human immunodeficiency virus type 1 protease biosensor assay using bioluminescence resonance energy transfer." J Virol Methods **128**(1-2): 93-103.
- Huse, J. T., D. Byant, et al. (2003). "Endoproteolysis of beta-secretase (beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme) within its catalytic domain. A potential mechanism for regulation." J Biol Chem **278**(19): 17141-9.
- Huse, J. T. and R. W. Doms (2000). "Closing in on the amyloid cascade: recent insights into the cell biology of Alzheimer's disease." Mol Neurobiol **22**(1-3): 81-98.
- Huse, J. T., D. S. Pijak, et al. (2000). "Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase." J Biol Chem **275**(43): 33729-37.
- Hussain, I., D. Powell, et al. (1999). "Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase." Mol Cell Neurosci **14**(6): 419-27.
- Huszar, T., I. Mucsi, et al. (2001). "The use of a second reporter plasmid as an internal standard to normalize luciferase activity in transient transfection experiments may lead to a systematic error." J Biotechnol **88**(3): 251-8.
- Issad, T., N. Boute, et al. (2003). "Looking for an insulin pill? Use the BRET methodology!" Diabetes Metab **29**(2 Pt 1): 111-7.
- Jarriault, S., C. Brou, et al. (1995). "Signalling downstream of activated mammalian Notch." Nature **377**(6547): 355-8.
- Kang, J., H. G. Lemaire, et al. (1987). "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor." Nature **325**(6106): 733-6.
- Kitazume, S., Y. Tachida, et al. (2001). "Alzheimer's beta-secretase, beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a Golgi-resident sialyltransferase." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(24): 13554-9.
- Kojro, E., G. Gimpl, et al. (2001). "Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(10): 5815-20.
- Kroeger, K. M., A. C. Hanyaloglu, et al. (2001). "Constitutive and agonist-dependent homo-oligomerization of the thyrotropin-releasing hormone receptor. Detection in living cells using bioluminescence resonance energy transfer." J Biol Chem **276**(16): 12736-43.
- Kuo, Y. M., M. R. Emmerling, et al. (1998). "Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain abeta 1-42 levels." Biochem Biophys Res Commun **252**(3): 711-5.
- Li, Q. and T. C. Sudhof (2004). "Cleavage of amyloid-beta precursor protein and amyloid-beta precursor-like protein by BACE 1." J Biol Chem **279**(11): 10542-50.
- Li, R., K. Lindholm, et al. (2004). "Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(10): 3632-7.
- Li, Y., Y. W. Liu, et al. (2001). "Novel functional assay for proteases and modulators. Application in beta-secretase studies." Mol Biotechnol **18**(1): 1-10.
- Li, Y. M., M. Xu, et al. (2000). "Photoactivated gamma-secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1." Nature **405**(6787): 689-94.
- Lichtenthaler, S. F., D. I. Dominguez, et al. (2003). "The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE1." J Biol Chem **278**(49): 48713-9.

- Lin, X., G. Koelsch, et al. (2000). "Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(4): 1456-60.
- Luo, Y., B. Bolon, et al. (2001). "Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation." Nat Neurosci **4**(3): 231-2.
- Luthi, U., C. Schaerer-Brodbeck, et al. (2003). "Human beta-secretase activity in yeast detected by a novel cellular growth selection system." Biochim Biophys Acta **1620**(1-3): 167-78.
- Mallender, W. D., D. Yager, et al. (2001). "Characterization of recombinant, soluble beta-secretase from an insect cell expression system." Mol Pharmacol **59**(3): 619-26.
- Merchant, C., M. X. Tang, et al. (1999). "The influence of smoking on the risk of Alzheimer's disease." Neurology **52**(7): 1408-12.
- Michailov, G. V., M. W. Sereda, et al. (2004). "Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness." Science **304**(5671): 700-3.
- Morris, J. C. (1999). "Is Alzheimer's disease inevitable with age?: Lessons from clinicopathologic studies of healthy aging and very mild alzheimer's disease." J Clin Invest **104**(9): 1171-3.
- Nouaille, S., C. Blanquart, et al. (2006). "Interaction between the insulin receptor and Grb14: a dynamic study in living cells using BRET." Biochem Pharmacol **72**(11): 1355-66.
- Paris, D., A. Quadros, et al. (2005). "Inhibition of angiogenesis and tumor growth by beta and gamma-secretase inhibitors." Eur J Pharmacol **514**(1): 1-15.
- Pastorino, L., A. F. Ikin, et al. (2004). "BACE (beta-secretase) modulates the processing of APLP2 in vivo." Mol Cell Neurosci **25**(4): 642-9.
- Portet, F., Y. Dauvilliers, et al. (2003). "Very early onset AD with a de novo mutation in the presenilin 1 gene (Met 233 Leu)." Neurology **61**(8): 1136-7.
- Puglielli, L., B. C. Ellis, et al. (2003). "Ceramide stabilizes beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and promotes amyloid beta-peptide biogenesis." J Biol Chem **278**(22): 19777-83.
- Qing, H., W. Zhou, et al. (2004). "Degradation of BACE by the ubiquitin-proteasome pathway." Faseb J **18**(13): 1571-3.
- Ramsay, D., E. Kellett, et al. (2002). "Homo- and hetero-oligomeric interactions between G-protein-coupled receptors in living cells monitored by two variants of bioluminescence resonance energy transfer (BRET): hetero-oligomers between receptor subtypes form more efficiently than between less closely related sequences." Biochem J **365**(Pt 2): 429-40.
- Ray, W. J., M. Yao, et al. (1999). "Cell surface presenilin-1 participates in the gamma-secretase-like proteolysis of Notch." J Biol Chem **274**(51): 36801-7.
- Refolo, L. M., B. Malester, et al. (2000). "Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model." Neurobiol Dis **7**(4): 321-31.
- Roberds, S. L., J. Anderson, et al. (2001). "BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics." Hum Mol Genet **10**(12): 1317-24.

- Rossner, S., J. Apelt, et al. (2001). "Neuronal and glial beta-secretase (BACE) protein expression in transgenic Tg2576 mice with amyloid plaque pathology." J Neurosci Res **64**(5): 437-46.
- Sala Frigerio, C., P. Piscopo, et al. (2005). "PEN-2 gene mutation in a familial Alzheimer's disease case." J Neurol **252**(9): 1033-6.
- Sano, S., K. Y. Tomizaki, et al. (2006). "A PNA-DNA hybridization chip approach for the detection of beta-secretase activity." Bioorg Med Chem Lett **16**(3): 503-6.
- Satoh, J. and Y. Kuroda (2000). "Amyloid precursor protein beta-secretase (BACE) mRNA expression in human neural cell lines following induction of neuronal differentiation and exposure to cytokines and growth factors." Neuropathology **20**(4): 289-96.
- Sauder, J. M., J. W. Arthur, et al. (2000). "Modeling of substrate specificity of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein beta-secretase." J Mol Biol **300**(2): 241-8.
- Scaffidi, A. K., N. Petrovic, et al. (2004). "alpha(v)beta(3) Integrin interacts with the transforming growth factor beta (TGFbeta) type II receptor to potentiate the proliferative effects of TGFbeta1 in living human lung fibroblasts." J Biol Chem **279**(36): 37726-33.
- Schroeter, E. H., J. A. Kisslinger, et al. (1998). "Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain." Nature **393**(6683): 382-6.
- Selkoe, D. J. (1997). "Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments." Science **275**(5300): 630-1.
- Sherrington, R., E. I. Rogaev, et al. (1995). "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease." Nature **375**(6534): 754-60.
- Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." Nature **387**(6633): 569-72.
- Sinha, S., J. P. Anderson, et al. (1999). "Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain." Nature **402**(6761): 537-40.
- Smale, G., N. R. Nichols, et al. (1995). "Evidence for apoptotic cell death in Alzheimer's disease." Exp Neurol **133**(2): 225-30.
- Smith, J. D. (2002). "Apolipoproteins and aging: emerging mechanisms." Ageing Res Rev **1**(3): 345-65.
- Sparks, D. L., S. W. Scheff, et al. (1994). "Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol." Exp Neurol **126**(1): 88-94.
- Spoelgen, R., C. A. von Arnim, et al. (2006). "Interaction of the cytosolic domains of sorLA/LR11 with the amyloid precursor protein (APP) and beta-secretase beta-site APP-cleaving enzyme." J Neurosci **26**(2): 418-28.
- Stockley, J. H., R. Ravid, et al. (2006). "Altered beta-secretase enzyme kinetics and levels of both BACE1 and BACE2 in the Alzheimer's disease brain." FEBS Lett **580**(28-29): 6550-60.
- Strittmatter, W. J., A. M. Saunders, et al. (1993). "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 **90**(5): 1977-81.
- Suay Llopis, L. and F. Ballester Diez (2002). "[Review of studies on exposure to aluminum and Alzheimer's disease]." Rev Esp Salud Publica **76**(6): 645-58.

- Takasugi, N., T. Tomita, et al. (2003). "The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex." *Nature* **422**(6930): 438-41.
- Takebayashi, K., Y. Sasai, et al. (1994). "Structure, chromosomal locus, and promoter analysis of the gene encoding the mouse helix-loop-helix factor HES-1. Negative autoregulation through the multiple N box elements." *J Biol Chem* **269**(7): 5150-6.
- Tang, J. and R. N. Wong (1987). "Evolution in the structure and function of aspartic proteases." *J Cell Biochem* **33**(1): 53-63.
- Teri, L., S. M. McCurry, et al. (1998). "Exercise and activity level in Alzheimer's disease: a potential treatment focus." *J Rehabil Res Dev* **35**(4): 411-9.
- Turner, R. T., 3rd, G. Koelsch, et al. (2001). "Subsite specificity of memapsin 2 (beta-secretase): implications for inhibitor design." *Biochemistry* **40**(34): 10001-6.
- Vassar, R. (2004). "BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease." *J Mol Neurosci* **23**(1-2): 105-14.
- Vassar, R., B. D. Bennett, et al. (1999). "Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE." *Science* **286**(5440): 735-41.
- von Arnim, C. A., A. Kinoshita, et al. (2005). "The low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a novel beta-secretase (BACE1) substrate." *J Biol Chem* **280**(18): 17777-85.
- von Arnim, C. A., M. M. Tangredi, et al. (2004). "Demonstration of BACE (beta-secretase) phosphorylation and its interaction with GGA1 in cells by fluorescence-lifetime imaging microscopy." *J Cell Sci* **117**(Pt 22): 5437-45.
- Wahle, T., K. Prager, et al. (2005). "GGA proteins regulate retrograde transport of BACE1 from endosomes to the trans-Golgi network." *Mol Cell Neurosci* **29**(3): 453-61.
- Wallrabe, H. and A. Periasamy (2005). "Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy." *Curr Opin Biotechnol* **16**(1): 19-27.
- Wang, D., X. Sun, et al. (2005). "Opioid receptor homo- and heterodimerization in living cells by quantitative bioluminescence resonance energy transfer." *Mol Pharmacol* **67**(6): 2173-84.
- Westmeyer, G. G., M. Willem, et al. (2004). "Dimerization of beta-site beta-amyloid precursor protein-cleaving enzyme." *J Biol Chem* **279**(51): 53205-12.
- Willem, M., A. N. Garratt, et al. (2006). "Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1." *Science* **314**(5799): 664-6.
- Wilson, T. and J. W. Hastings (1998). "Bioluminescence." *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**: 197-230.
- Wolfe, M. S., W. Xia, et al. (1999). "Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity." *Nature* **398**(6727): 513-7.
- Wolozin, B. (2001). "A fluid connection: cholesterol and A β ." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(10): 5371-3.
- Wong, H. K., T. Sakurai, et al. (2005). "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* **280**(24): 23009-17.
- Xu, Y., D. W. Piston, et al. (1999). "A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(1): 151-6.

- Yan, R., M. J. Bienkowski, et al. (1999). "Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity." Nature **402**(6761): 533-7.
- Yan, R., P. Han, et al. (2001). "The transmembrane domain of the Alzheimer's beta-secretase (BACE1) determines its late Golgi localization and access to beta - amyloid precursor protein (APP) substrate." J Biol Chem **276**(39): 36788-96.
- Yu, G., M. Nishimura, et al. (2000). "Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing." Nature **407**(6800): 48-54.