

MARIE-CLAUDE PROULX

**IDENTIFICATION DE FACTEURS RÉGULANT LE
COMPLEXE γ -SÉCRÉTASE DANS LE CONTEXTE
DE 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 MÉDICALE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

SEPTEMBRE 2007

Résumé

La maladie d'Alzheimer est une maladie dégénérative du système nerveux central. Une des caractéristiques pathologiques de la maladie est la présence de plaques amyloïdes causées par l'agrégation du peptide β -amyloïde ($A\beta_{42}$) dans le cerveau. Ce peptide est produit à la suite de deux clivages protéolytiques de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP), par BACE (β -APP cleaving enzyme) et par le complexe γ -sécrétase. Le complexe γ -sécrétase est composé de 4 sous-unités connues : Préséniline-1 (PS1) ou 2 (PS2), Anterior pharynx defective 1 (APH-1), Presenilin enhancer 2 homolog (PEN-2) et Nicastrine (NCT). L'utilisation du complexe comme cible thérapeutique de la maladie d'Alzheimer est problématique car il est important dans de nombreux processus physiologiques. De plus, les mécanismes de régulation de l'activité du complexe γ -sécrétase ainsi que son affinité pour ses différents substrats sont peu connus. Le haut poids moléculaire du complexe suggère aussi la présence de protéines encore non identifiées. L'objectif de ce projet est d'identifier de nouveaux partenaires du complexe, transitoires ou permanents, ayant un rôle dans la régulation de ce dernier ou modulant son affinité pour ses substrats. Le système double hybride en levure a été utilisé pour identifier des partenaires protéiques des protéines appâts NCT, PEN-2 et APP, lors de criblages de banques d'ADNc de cerveau humain. Les protéines Ferritin L (polypeptide codant la chaîne légère de la Ferritin) et ISLR (immunoglobulin superfamily leucine rich repeat) ainsi que 4 protéines inconnues, ont été pêchés avec la protéine-appât PEN-2, une sous-unité du complexe γ -sécrétase. SNW1 (SNW domain containing 1) et WBP5 (WW domain binding protein 5) ont quant à eux été pêchés à l'aide d'APP. Des analyses en double hybride et en co-immunoprécipitation ont montré que l'interaction entre Ferritin et PEN-2 est négative, alors que ISLR interagit avec trois des sous-unités du complexe γ -sécrétase ce qui suggère sa présence probable dans le complexe. L'interaction entre APP et SNW1 suggère que APP par l'intermédiaire de sa partie C-terminale (AICD) pourrait être un facteur de transcription dont l'activité serait régulée par le corégulateur transcriptionnel SNW/SKIP. WBP5 pourrait quant à elle servir de lien entre APP et les partenaires du complexe. D'autres analyses sont nécessaires pour confirmer ces résultats préliminaires et définir le rôle des partenaires identifiés.

Avant-propos

Je souhaite tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Georges Lévesque, de m'avoir offert la possibilité de travailler sur un sujet d'étude captivant. Je le remercie pour sa patience et sa grande disponibilité, d'avoir eu confiance en mes compétences, de m'avoir guidé, encouragé et soutenu tout au long de ma maîtrise. Je remercie aussi le Dr Madeleine Carreau pour ses suggestions, explications et commentaires scientifiques qui m'ont aidés à m'orienter dans mon projet.

Je tiens à remercier particulièrement Marie Eve et Cédric pour les fous rires, les « commandos sucreries », les soirées de peinture, les « insides » et surtout pour leur soutien inébranlable dans les meilleurs moments tout comme dans les pires.

Je tiens à remercier Chantal qui m'a « coaché » durant mon stage et les débuts de ma maîtrise, Christian pour sa patience et ses réponses à mes questions parfois interminables. Je voudrais aussi remercier Manel, Rahima, Marie-Chantal, Valérie, Ouassila, Caroline, Marie-Pier et Marc-André et tous les membres de l'unité de Neurosciences et Pédiatrie du CHUL pour leur soutien autant professionnel que personnel.

Finalement merci à ma famille et mes amis qui sont toujours là, il faut un monde en dehors de la science pour réaliser que sans elle, ma vie serait beaucoup moins complète.

*À Marie Eve et Cédric
Un seul mot : MMC !*

Table des matières

Résumé.....	i
Avant-propos.....	ii
Table des matières.....	iv
Liste des abréviations.....	vii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xii
Chapitre 1 Introduction.....	1
1.1 La maladie d'Alzheimer.....	1
1.2 La forme sporadique de la maladie d'Alzheimer.....	2
1.3 La forme familiale de la maladie d'Alzheimer.....	3
1.4 L'hypothèse de la cascade amyloïde.....	4
1.5 La protéine précurseur de l'amyloïde.....	6
1.5.1 Le processus protéolytique d'APP.....	7
1.5.2 AICD.....	10
1.6 Les sécrétases (BACE-1 et γ -sécrétase).....	11
1.6.1 BACE-1.....	11
1.6.2 Le complexe γ -sécrétase.....	13
1.6.2.1 Les présénilines.....	16
1.6.2.2 Nicastrine.....	18
1.6.2.3 Anterior pharynx defective 1 homolog.....	19
1.6.2.4 Presenilin enhancer 2 homolog.....	19
1.6.2.5 Assemblage et maturation du complexe γ -sécrétase.....	20
1.7 – Objectifs de recherche.....	22
Chapitre 2 Matériel et méthodes.....	23
2.1 Construction de vecteurs d'expression.....	23
2.1.1 Amplification par PCR.....	24
2.1.2 Digestion d'ADN.....	26
2.1.3 Extraction d'ADN d'un gel d'agarose.....	27
2.1.4 Déphosphorylation d'un vecteur.....	28
2.1.5 Ligation d'ADN dans un vecteur.....	28
2.1.6 Transformation de cellules compétentes DH5 α	29
2.1.7 Préparation d'ADN plasmidique à petite échelle.....	29
2.1.8 Vérification des transformants.....	30
2.2 Le système de double hybride en levure.....	31
2.2.1 Criblage de banque d'ADNc.....	33
2.2.1.1 Titrages de la banque d'ADNc et calcul d'efficacité de fusion.....	35
2.2.1.2 Extraction d'ADN plasmidique de levure.....	36
2.2.1.3 Transformation de cellules compétentes DH10B.....	37
2.2.1.4 Profil de digestion des candidats.....	37
2.2.2 Extraction protéique de levure.....	38
2.2.3 Transformation de levure.....	39
2.2.3.1 Analyse des candidats sélectionnés lors des criblages.....	40

2.2.4	Vérification des séquences des candidats retenus	41
2.2.4.1	Préparation de l'ADN à séquencer.....	42
2.2.4.2	Préparation des amorces utilisées pour le séquençage	42
2.2.5	Vérification de l'interaction des gènes identifiés avec les sous-unités du complexe γ -sécrétase, APP et BACE-1.....	43
2.3	Technique de co-immunoprécipitation.....	44
2.3.1	Préparation d'ADN plasmidique	45
2.3.2	Mesure de la concentration de l'ADN plasmidique.....	46
2.3.3	Culture cellulaire.....	46
2.3.4	Transfection au CaCl_2	47
2.3.5	Extraction protéiques	48
2.3.6	Immunoprécipitation.....	48
2.3.7	Gel SDS-PAGE et Immunobuvardage.....	49
Chapitre 3	Résultats.....	51
3.1	Criblages avec Nicastrine	51
3.1.1	Titrages et efficacités de fusions.....	52
3.1.2	Premier criblage.....	53
3.1.2.1	Séquençage du candidat # 17.....	55
3.1.3	Deuxième criblage	55
3.1.3.1	Séquençage des candidats # 3 et 4	57
3.2	Criblage avec PEN-2	58
3.2.1	Titrage et efficacité de fusion.....	59
3.2.1.1	Séquençage des candidats ayant une interaction positive avec PEN-2.....	62
3.2.2	Analyse des candidats identifiés.....	63
3.2.3	Analyse des interactions par co-immunoprécipitation.....	65
3.2.3.1	ISLR	65
3.2.3.2	Ferritin L.....	66
3.3	Criblage avec APP.....	67
3.3.1.1	Séquençage des candidats ayant une interaction positive avec APP	71
3.3.2	Analyse des candidats identifiés.....	71
3.3.3	Analyse des interactions par co-immunoprécipitations	73
3.3.3.1	SNW1	73
3.3.3.2	WBP5	74
Chapitre 4	Discussion.....	77
4.1	Identification de nouveaux partenaires du complexe γ -sécrétase et d'APP	77
4.1.1	Criblages avec NCT.....	78
4.1.2	Criblage avec PEN-2.....	78
4.1.2.1	Ferritin L.....	79
4.1.2.2	ISLR : Un nouveau membre du complexe ?.....	81
4.1.3	Criblage avec APP	82
4.1.3.1	SNW1 : Corégulateur d'AICD ?.....	83
4.1.3.2	WBP5 : Le chaînon manquant ?	84
Chapitre 5	Conclusions et perspectives	86

Annexe A	87
Extraction d'ARN	87
Transcriptase inverse.....	88
Annexe B	89
Analyse de l'interaction entre NCT et APP.....	89
Bibliographie	90

Liste des abréviations

Unité de mesure

°C	degré Celsius
Ω	ohm : unité de mesure de la résistance
μg	microgramme
μF	microfarad
μL	microlitre
μM	micromolaire
g	gramme
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
L	litre
M	molaire
mA	milliampères
mg	milligramme
min	minute
nm	nanomètres
pb	paire de base
sec	seconde
rpm	rotation par minute
V	volts

Divers

α	alpha ou anti
β	bêta
γ	gamma
a.a.	acide aminé
A β	amyloïde bêta
AD	« activating domain »
ADAM-10	« a disintegrin and metalloproteinase domain 10 »
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire

AICD	« amyloid intracellular domain »
Amp	ampicilline
APH-1	« anterior pharynx defective-1 »
APLP	« amyloid precursor like protein »
ApoE	Apolipoprotéine E
APP	« amyloid precursor protein » protéine précurseur de l'amyloïde
APP- α	Fragment soluble-alpha d'APP
APP- β	Fragment soluble-bêta d'APP
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
BACE-1	« β -amyloid cleaving enzyme-1 »
BD	« binding domain »
C83	fragment d'APP C-terminal de 83 résidus
C99	fragment d'APP C-terminal de 99 résidus
C-ter	C-terminal (COOH-terminal)
CaCl ₂	chlorure de calcium
cfu	« colony-forming unit »
CTF	fragment C-terminal
DMEM	« Dulbecco's modified Eagle's medium »
DMSO	« dimethyl sulfoxide »
dNTPs	désoxy nucléotides triphosphates
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	« enhanced chemiluminescence »
EDTA	éthylènediaminetétraacétique
FBS	« foetal bovine serum »
Ferritin L	« ferritin light polypeptide »
FL	« full length » pleine longueur
HCl	chlorure d'hydrogène
HEBS	« HEPES buffered saline »
HEK293	« human embryonic kidney 293 »
HRP	« horseradish peroxidase »
I-CLIP	protéase de clivage intramembranaire

ICD	« intracellular domain »
ISLR	« immunoglobulin superfamily leucine rich »
Kan	kanamycine
LB	Luria Bertani
LiAc	acétate de lithium
LRP	« low density lipoprotein receptor-related protein »
MQ	MilliQ®
N-ter	N-terminal (NH ₂ -terminal)
NaOH	hydroxyde de sodium
NaCl	chlorure de sodium
NCT	« nicastrin »
NICD	« notch intracellular domain »
Notch Δ E+C	fragment de Notch dont le domaine extracellulaire est délété
NRG1	« neuregulin-1 »
NTF	fragment N-terminal
p/v	poids / volume
P3	peptide de 3 kDa
PBS	« phosphate buffered saline »
PCR	« polymerase chain reaction »
PEG	polyéthylène glycol
PEN-2	« presenilin enhancer-2 homolog »
pH	potentiel hydrogène
PMSF	phenylmethylsulfonylfluoride
PS1	« presenilin-1 »
PS2	« presenilin-2 »
PVDF	« polyvinylidene difluoride »
RIP	protéolyse intramembranaire régulée
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	« synthetic minimal medium »
SDS	« sodium dodecyl sulfate »
SDS-PAGE	« SDS-polyacrylamide gel electrophoresis »
SNW1	« SNW domain containing 1 »
ST6GalI	siatyltransférase 6 Gal-1

TACE	« tumor necrosis factor-alpha converting enzyme »
TBS	« Tris buffered saline »
TE	Tris-HCl EDTA
TH	température d'hybridation
Tm	« melting temperature »
v/v	volume / volume
WBP5	« WW domain binding protein 5 »
YPAD	« yeast extract peptone dextrose medium + adenine »
zeo	zeocine

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Substrats de la γ -sécrétase.	15
Tableau 2.1 : Descriptions des différents vecteurs d'expression construits	24
Tableau 2.2 : Description des amorces et températures d'hybridation utilisées pour chaque PCR.....	25
Tableau 2.3 : Composition des mélanges pour les réactions de digestion	26
Tableau 2.4 : Description des types de clonage et des digestions	27
Tableau 2.5 : Gène de résistance selon le vecteur d'expression	29
Tableau 2.6 : Compositions des solutions Drop-out pour levures.....	35
Tableau 2.7 : Transformation simple dans <i>S. cerevisiae</i> AH109 effectuées lors des criblages.....	39
Tableau 2.8 : Co-transformations pour analyse des candidats sélectionnés.....	41
Tableau 2.9 : Amorce utilisée pour le séquençage selon le vecteur	42
Tableau 2.10 : Co-transformations en double hybride en levure des candidats identifiés et des membres du complexe γ -sécrétase, APP ou BACE-1.....	43
Tableau 2.11 : Description des étiquette des vecteurs d'expression de cellule ainsi que l'anticorps monoclonal les reconnaissant.....	44
Tableau 2.12 : Anticorps utilisés pour chaque immunoprécipitation	48
Tableau 3.1 : Titrages et efficacités de fusions des criblages effectués avec NCT.	52
Tableau 3.2 : Titrages et efficacité de fusion du criblage réalisé avec PEN-2.....	59
Tableau 3.3 : Titrage et efficacité de fusion du criblage réalisé avec APP.....	68

Liste des figures

Figure 1.1: Hypothèse de la cascade amyloïde.....	5
Figure 1.2 : Voies protéolytiques d'APP.....	9
Figure 1.3 : Séquence en acide aminé d'APP représentant les sites de clivage des sécrétases α , β , et γ et BACE-1.....	9
Figure 1.4 : Représentation schématique de BACE-1.....	12
Figure 1.5 : Représentation schématique des quatre sous-unités essentielles à l'activité du complexe γ -sécrétase.....	14
Figure 1.6 : Représentation schématique de PS1.....	17
Figure 1.7 : Assemblage et maturation du complexe γ -sécrétase.....	21
Figure 2.1 Schéma des vecteurs d'expression de levure.....	32
Figure 2.2 Reconstitution du facteur de transcription Gal-4 par l'intermédiaire de l'interaction directe des protéines recombinantes BD-X et AD-Y.....	33
Figure 2.3 Schéma de la technique de co-immunoprécipitation.....	45
Figure 3.1 Immunobuvardage « anti-c-Myc » montrant la présence de BD-NCT après transformation de <i>S. cerevisiae</i> AH109.....	51
Figure 3.2 Profil de digestion EcoRI-XhoI de l'ADN plasmidique des transformants bactériens.....	53
Figure 3.3 : Vérification des candidats sélectionnés par double hybride en levure.....	54
Figure 3.4 : Profil de digestion EcoRI-XhoI de l'ADN plasmidique des transformants bactériens.....	56
Figure 3.5 : Vérification des candidats sélectionnés par double hybride en levure.....	57
Figure 3.6 Immunobuvardage « anti-c-Myc » montrant l'expression de BD-PEN-2 après transformation de <i>S. cerevisiae</i> AH109.....	58
Figure 3.7 : Vérification des candidats sélectionnés par double hybride en levure.....	61
Figure 3.8 : Analyse des interactions protéiques des candidats identifiés par le criblage avec PEN-2 avec les membres du complexe γ -sécrétase, BACE et APP en double hybride en levure.....	64

Figure 3.9 Co-immunoprécipitation de PS1.....	65
Figure 3.10 Ferritin L et PEN-2 ne co-immunoprécipitent pas.	66
Figure 3.11 Immunobuvardage « anti-c-Myc » montrant la présence de BD-APP après transformation de <i>S. cerevisiae</i> AH109	67
Figure 3.12 Profil de digestion EcoR1-Xho1 de l'ADN plasmidique des transformants bactériens.	69
Figure 3.13 : Vérification des candidats sélectionnés par double hybride en levure.....	70
Figure 3.14 : Analyse des interactions protéiques de SNW1 et WBP5 avec les membres du complexe γ -sécrétase en double hybride en levure.	72
Figure 3.15 Co-immunoprécipitation de SNW1.....	73
Figure 3.16 Co-immunoprécipitation de WBP5.....	74
Figure 3.17 Co-immunoprécipitation de Notch Δ E+C.....	76

Chapitre 1 Introduction

1.1 La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est la forme de maladie neurodégénérative la plus commune. Elle touche de 50 à 60 % des personnes souffrant de démence et, selon l'organisation mondiale de la santé, affecte actuellement plus de 18 millions de personnes à travers le monde. (Vas, Rajkumar et al. 2001). D'un point de vue clinique, la progression de la maladie d'Alzheimer est lente, ce qui s'observe par une perte de 3 à 4 points par année sur un standard d'évaluation tel que le « Mini-Mental State Exam », qui est utilisé dans le dessein d'évaluer les fonctions cognitives. Les patients présentent au début de la maladie une perte de la mémoire récente et démontrent parfois un changement de la personnalité et une augmentation de l'irritabilité. Après plusieurs années, ils développent des symptômes d'aphasie, apraxie et agnosie ainsi qu'une aggravation des pertes de mémoire et une dégénérescence cognitive sévère. (American Psychiatric Association. 1994).

La maladie d'Alzheimer fut décrite pour la première fois en 1906 par le Docteur Alois Alzheimer. Il exposa ses observations réalisées sur Auguste D., une patiente de 51 ans qui présentait entre autres des pertes progressives de mémoire, des désillusions et de la paranoïa, ainsi qu'un sévère déficit cognitif. L'autopsie du cerveau de la patiente révéla une importante neurodégénérescence ainsi que la présence de plaques amyloïdes et d'enchevêtrements neurofibrillaires (Alzheimer, Stelzmann et al. 1995). Les lésions décrites par Alzheimer en 1906 sont aujourd'hui reconnues comme les principales caractéristiques neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer. Elles sont le résultat de l'agrégation de deux protéines dans le cerveau, c'est-à-dire, le peptide amyloïde (A β 42) , qui forme les plaques amyloïdes (Masters, Multhaup et al. 1985) et la protéine Tau, qui sous forme hyperphosphorylée, cause les enchevêtrements neurofibrillaires (Mandelkow and Mandelkow 1998). L'accumulation de ces lésions entraîne une neurodégénérescence qui est la cause des symptômes cliniques de la maladie. En effet, les pertes synaptiques qui débutent dans les régions de l'hippocampe et du néocortex corrént avec les dysfonctions cognitives (Arendt 2004). Plus spécifiquement, la détérioration du système cholinergique

est responsable des pertes de mémoires (Blennow, de Leon et al. 2006). Cette observation est à l'origine du développement de nombreux inhibiteurs de la cholinestérase, une enzyme dégradant le neurotransmetteur acétylcholine. Les inhibiteurs sont utilisés afin d'inhiber la dégradation du neurotransmetteur dans le dessein de ralentir la progression des symptômes de la maladie d'Alzheimer (Birks 2006). Malgré ces traitements, la neurodégénérescence va affecter au cours des années les régions du cerveau contrôlant les fonctions vitales pour finalement causer la mort du patient.

La maladie d'Alzheimer se retrouve sous deux formes. La première est appelée « forme sporadique de la maladie d'Alzheimer ». Il s'agit de la forme la plus fréquente de la maladie et elle est associée à de nombreux facteurs de risques. La deuxième est appelée quant à elle « forme familiale de la maladie d'Alzheimer » et est associée à une composante génétique, transmise selon un mode autosomique dominant à l'intérieur des familles atteintes. Bien que les deux formes de la maladie aient des origines différentes, elles entraînent des caractéristiques neuropathologiques identiques.

1.2 La forme sporadique de la maladie d'Alzheimer

La forme sporadique de la maladie d'Alzheimer représente 90 % des cas. Elle survient généralement chez les personnes âgées de 65 ans et plus. L'âge est le principal facteur de risque associé à cette forme de la maladie. En effet, de 2 à 4 % de la population de 65 ans et plus est estimée atteinte d'une démence de type Alzheimer. De plus la prévalence de la maladie double tous les 5 ans dès l'âge de 65 ans (American Psychiatric Association. 1994). La forme sporadique de la maladie d'Alzheimer est cependant dite multifactorielle. En plus de l'âge, de nombreuses études ont relié la maladie à divers facteurs génétiques et environnementaux. L'un des facteurs génétiques est le variant allélique $\epsilon 4$ du gène ApoE (Strittmatter, Saunders et al. 1993). Ce dernier a été distinctement associé à la maladie d'Alzheimer à la suite d'études épidémiologiques sur différentes populations humaines. Ces études démontrent que le risque de développer la maladie d'Alzheimer triple chez les porteurs hétérozygotes de l'allèle ApoE- $\epsilon 4$ et est multiplié par 15 chez les homozygotes. (Farrer, Cupples et al. 1997). Toutefois, la présence de l'allèle ApoE- $\epsilon 4$ ne mène pas obligatoirement à la forme sporadique de la maladie d'Alzheimer et les personnes qui

souffrent de la forme sporadique de la maladie ne sont pas nécessairement porteuses de l'allèle. En effet, seulement 12 à 18 % de tous les cas de la maladie d'Alzheimer semblent associés à la présence de l'allèle ApoE- ϵ 4 (Evans, Beckett et al. 1997; Slioter, Cruts et al. 1998; Tol, Roks et al. 1999). L'apolipoprotéine E existe sous trois isoformes. L'ApoE- ϵ 2 et ApoE- ϵ 3 semblent jouer un rôle protecteur. Plus précisément, elles sont impliquées au niveau du transport du cholestérol dans le cerveau, du maintien de l'homéostasie lipidique du système nerveux central, de la plasticité synaptique et croissance neuronale ainsi que dans le métabolisme de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP), qui forme le peptide neurotoxique A β 42, et dans la dégradation d'A β . Le variant allélique ApoE- ϵ 4, quant à lui, montre une baisse d'efficacité dans la régulation de ces mécanismes (Martins, Hone et al. 2006). Ceci explique que les porteurs de l'allèle ApoE- ϵ 4 sont plus à risque de développer la forme sporadique de la maladie d'Alzheimer. Le syndrome de Down est aussi un facteur de risque génétique de la maladie d'Alzheimer, puisque les personnes atteintes de trisomie 21 présentent des plaques amyloïdes dans le cerveau, qui sont causées vraisemblablement par la présence d'une copie supplémentaire du gène codant APP, qui est situé sur le chromosome 21. (Teipel and Hampel 2006).

La forme sporadique de la maladie d'Alzheimer est aussi reliée à divers facteurs environnementaux. L'effet et la responsabilité de ces derniers dans la pathologie de la maladie est cependant moins clairement identifié que dans le cas de l'allèle ApoE- ϵ 4. De nombreuses études ont cependant établi qu'un faible niveau d'éducation ou d'activité mentale et physique, l'exposition à des métaux ou substances toxiques et les traumatismes cérébraux étaient associés à la forme sporadique de maladie d'Alzheimer. Les maladies cardiaques et les facteurs de risques reliés à ces dernières, c'est-à-dire, l'hypercholestérolémie, l'hypertension, les maladies coronariennes, le diabète et l'obésité, sont aussi des facteurs de risques importants (Mayeux 2003; Blennow, de Leon et al. 2006).

1.3 La forme familiale de la maladie d'Alzheimer

La forme familiale de la maladie d'Alzheimer bien que plus rare (10% des cas, seulement 0,1 % de prévalence (Harvey, Skelton-Robinson et al. 2003)) est une forme plus agressive de la maladie car elle se déclare avant l'âge de 65 ans, et parfois même dès l'âge de 30 ans

(Larner and Doran 2006). Elle se transmet de façon héréditaire, selon un mode autosomique dominant. Bien que le pourcentage de gens souffrant de cette forme de la maladie soit faible, il est intéressant de s'y attarder car elle est causée par une mutation présente dans un gène impliqué dans le métabolisme de l'APP. En effet, les premières mutations associées à la maladie d'Alzheimer ont été retrouvées dans les gènes codant pour APP (Goate, Chartier-Harlin et al. 1991), préséniline 1 (PS1) et préséniline 2 (PS2) (Rogaev, Sherrington et al. 1995; Sherrington, Rogaev et al. 1995). L'effet de ces mutations semble être de favoriser la production ou l'accumulation du peptide A β 42 dans le cerveau (Scheuner, Eckman et al. 1996). Aujourd'hui les mutations dans ces gènes sont dénombrées à plus de 27 mutations pathogéniques chez APP, 160 chez PS1 et 11 chez PS2. Elles sont présentées dans les bases de données suivantes : La Maladie d'Alzheimer et Démences Frontotemporales (www.molgen.ua.ac.be/Admutations) et le site Alzforum (www.alzforum.org/res/com/mut). Enfin, une nouvelle mutation a récemment été découverte dans un gène codant une protéine importante dans la formation d'A β 42 : la mutation faux sens D90N du gène Pen-2, qui a été identifiée chez une famille touchée par la forme familiale de la maladie d'Alzheimer. Le rôle de cette mutation dans la maladie n'est cependant pas encore clairement établi (Sala Frigerio, Piscopo et al. 2005).

1.4 L'hypothèse de la cascade amyloïde

L'une des hypothèses privilégiées dans la communauté scientifique est le rôle central du peptide hautement neurotoxique A β 42 dans le déclenchement de la cascade d'événements entraînant la maladie d'Alzheimer (Hardy and Selkoe 2002). L'hypothèse de la cascade amyloïde (figure 1.1) suggère que l'accumulation du peptide A β 42 entraîne une série d'événements conduisant à la formation de plaques amyloïdes, la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires, la réponse inflammatoire, les dysfonctions et dégénérescences neuronales et synaptiques et enfin la démence chez le patient.

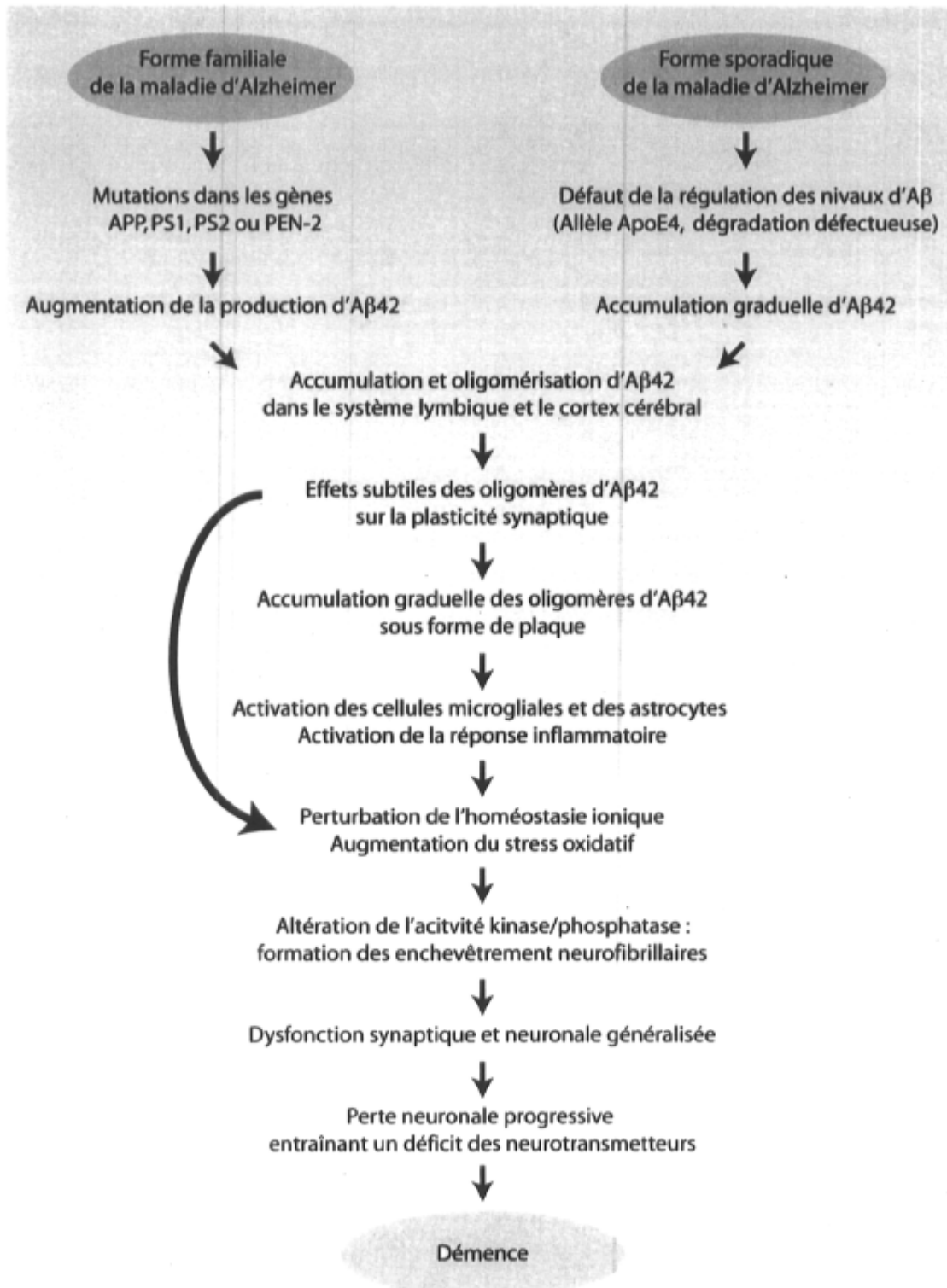


Figure 1.1: Hypothèse de la cascade amyloïde. Schéma tiré de (Hardy and Selkoe 2002), adapté par Marie-Claude Proulx (2007).

L'hypothèse de la cascade amyloïde est soutenue par le rôle des mutations retrouvées chez les gènes associés à la maladie d'Alzheimer (APP, PS1 et PS2), qui altèrent le métabolisme d'APP et favorisent la production ou l'accumulation du peptide A β 42 dans le cerveau. Elle est aussi soutenue par l'effet des mutations dans le gène codant pour la protéine Tau. Ces mutations entraînent une variété de maladie neurodégénérative, mais ne causent ni le dépôt de plaques amyloïdes, ni la maladie d'Alzheimer. Cette évidence suggère que dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, le défaut du métabolisme d'APP survient avant les altérations de la protéine Tau et entraîne la formation des enchevêtrements neurofibrillaires (Annaert and De Strooper 2002; Hardy and Selkoe 2002).

1.5 La protéine précurseur de l'amyloïde

Le peptide amyloïde et sa protéine précurseur (APP) jouent un rôle essentiel dans la pathologie de la maladie d'Alzheimer. L'intérêt des chercheurs pour APP s'est intensifié lorsqu'ils ont découvert qu'un fragment peptidique de 4 kDa, résultant d'un clivage protéolytique d'APP, était le principal élément des plaques amyloïdes (Glennner and Wong 1984; Masters, Multhaup et al. 1985; Kang, Lemaire et al. 1987; Weidemann, König et al. 1989; Haass, Schlossmacher et al. 1992). Les études génétiques qui ont lié les mutations faux-sens retrouvées chez le gène codant APP à la maladie d'Alzheimer ont aussi contribué à cet intérêt grandissant.

APP est membre d'une famille qui regroupe les protéines « APP-like » : APLP1 et APLP2 (Walsh, Minogue et al. 2007). APP est une protéine conservée dans l'évolution pour laquelle des homologues ont été retrouvés chez *Drosophila* (Luo, Tully et al. 1992), *C. elegans* (Daigle and Li 1993) et *Xenopus* (Okado and Okamoto 1992). Chez l'humain, le gène codant pour APP est situé sur le chromosome 21, (21q21.2,q21.3). Le gène précurseur de l'amyloïde code trois protéines de 695, 751 ou 770 acides aminés qui sont le résultat de l'épissage alternatif des exons 7, 8 et 15 respectivement. C'est la forme de 695 résidus qui est retrouvée majoritairement dans les neurones, alors que les plus longues isoformes sont exprimées principalement dans les autres types cellulaires et contiennent un domaine inhibiteur de protéase de type Kunitz (Annaert and De Strooper 2002). APP₍₆₉₅₎ est une protéine transmembranaire de type I qui est *N*- et *O*-glycosylée dans le réticulum

endoplasmique et l'appareil de Golgi. Elle possède un large domaine N-terminal extracellulaire et un court domaine C-terminal de 47 résidus situé dans le cytoplasme (Dyrks, Weidemann et al. 1988; Weidemann, König et al. 1989). Dans des conditions physiologiques normales APP subit un processus protéolytique qui peut être non-amyloïdogénique ou amyloïdogénique (section 1.5.1). Ce processus mène à la formation d'un peptide non-amyloïdogénique soluble (P3) ou amyloïdogénique (A β). C'est le peptide A β qui s'agrège sous forme de plaque dans la maladie d'Alzheimer (Haass, Schlossmacher et al. 1992; Seubert, Vigo-Pelfrey et al. 1992).

Malgré le rôle qu'elle joue dans la maladie d'Alzheimer, la véritable fonction d'APP demeure incertaine. La création de modèles biologiques a cependant permis de suggérer diverses fonctions pour la protéine. Ainsi, APP posséderait les rôles de récepteur de surface, molécule d'adhésion, molécule de signalisation, régulation de l'homéostasie du calcium et des métaux, régulateur de la survie/mort cellulaire. Elle serait aussi impliquée dans la régulation des processus neuronaux : croissance des neurites, arborisation des dendrites, plasticité synaptique, transport des vésicules dans les axones (par la liaison à la chaîne légère de la kinésine (Goldstein 2001)) (Reinhard, Hebert et al. 2005). Plusieurs de ces processus sont perturbés dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, ce qui soutient le rôle central de la protéine précurseur de l'amyloïde dans cette maladie.

1.5.1 Le processus protéolytique d'APP

Le processus protéolytique d'APP est un modèle du processus physiologique appelé « protéolyse intramembranaire régulée » ou RIP. La RIP est un processus conservé de la bactérie à l'humain qui implique deux clivages protéiques d'une protéine transmembranaire de type 1. Le premier clivage est réalisé par une protéase classique liée à la membrane et permet de relâcher la majeure partie de l'ectodomaine de la protéine. Il est suivi d'une protéolyse intramembranaire, effectuée par une « protéase de clivage intramembranaire » ou I-CLIP (Brown, Ye et al. 2000; Annaert and De Strooper 2002), qui relâche le domaine intracellulaire (ICD) dans le cytoplasme. Ce dernier peut alors exercer diverses fonctions physiologiques, par exemple, jouer un rôle de facteur de transcription. C'est le cas du

domaine intracellulaire de Notch (NICD) qui est un produit de la RIP et qui possède une fonction de régulateur transcriptionnel de gènes impliqués, entre autres, dans le développement (Mumm and Kopan 2000).

APP peut emprunter deux voies de protéolyse intramembranaire régulée : la voie non-amyloïdogénique et la voie amyloïdogénique (figure 1.2). La voie non-amyloïdogénique est amorcée par le clivage d'APP, entre ses résidus 612 et 613, par une α -sécrétase membre de la famille des métalloprotéases. Cette famille comprend ADAM-10 (a disintegrin and metalloprotease) et TACE (tumor necrosis factor- α converting enzyme) qui posséderait une activité α -sécrétase (Buxbaum, Liu et al. 1998). L' α -clivage intervient à l'intérieur de la séquence formant le peptide A β et empêche donc la production de ce dernier (De Strooper and Annaert 2000). Il produit cependant un fragment soluble APPs- α et laisse à la membrane un fragment C-terminal de 83 acides aminés (C83), qui est à son tour clivé par la γ -sécrétase. Ce deuxième clivage permet le relâchement dans le milieu extracellulaire du peptide P3, un fragment de 3 kDa non-amyloïdogénique qui est rapidement dégradé (Haass, Hung et al. 1993), alors que dans le cytoplasme est relâché le domaine intracellulaire d'APP, appelé AICD (APP intracellular domain). La voie amyloïdogénique quant à elle fait intervenir un premier clivage protéolytique par une β -sécrétase appelée BACE-1. Ce clivage produit un fragment soluble APPs- β ainsi qu'un fragment membranaire C-terminal de 99 résidus (C99). Le fragment C99 est à son tour clivé par la γ -sécrétase pour produire le fragment A β qui est relâché dans l'espace extracellulaire. Le γ -clivage amyloïdogène permet lui aussi la production du peptide intracellulaire AICD (Steiner and Haass 2000). Les différents sites de clivages d'APP sont illustrés à la figure 1.3.

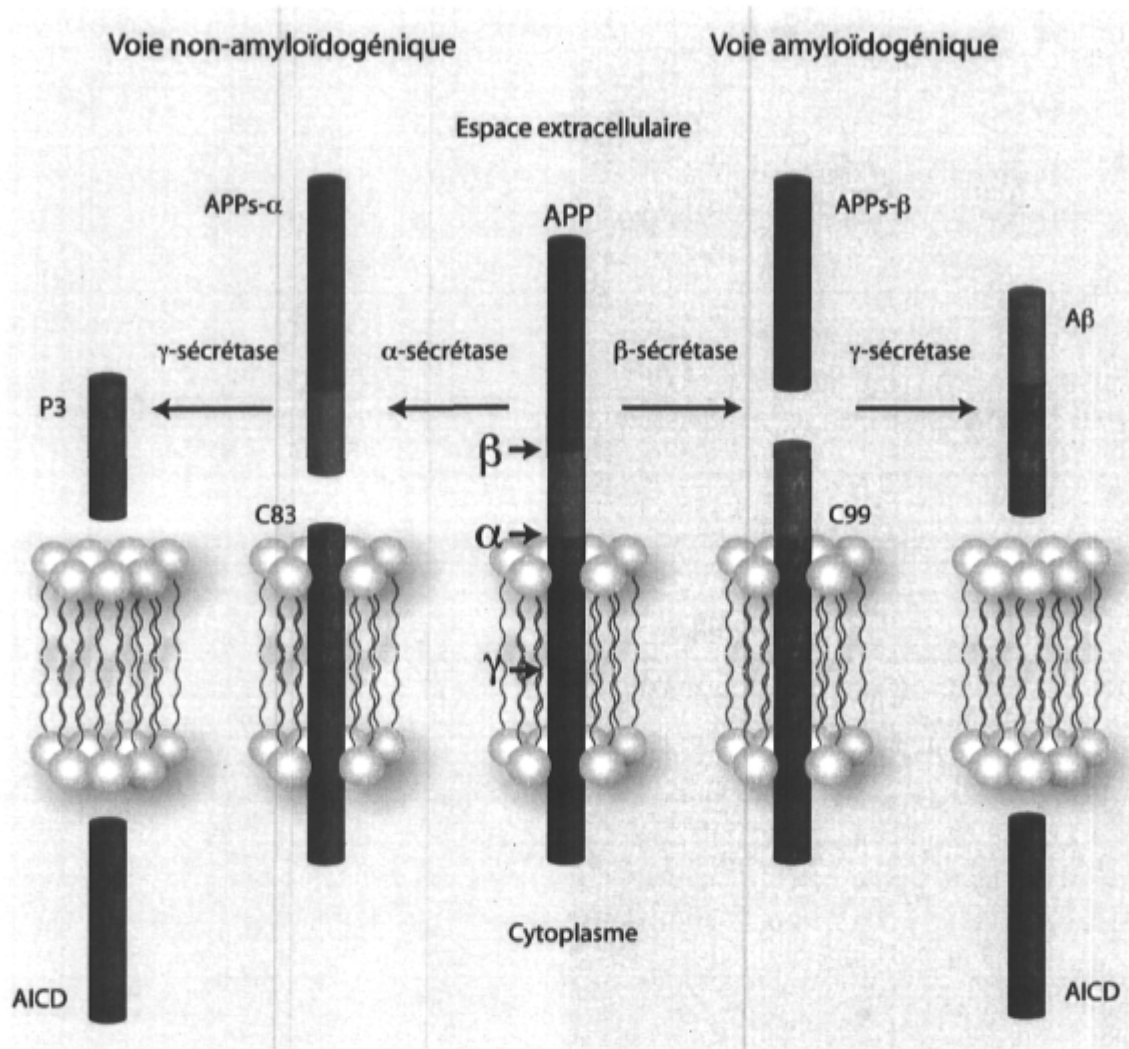


Figure 1.2 : Voies protéolytiques d'APP. En vert : voie non-amyloïdogénique, en bleu : voie amyloïdogénique.



Figure 1.3 : Séquence en acide aminé d'APP représentant les sites de clivage des sécrétases α , β , et γ et BACE-1. Les sécrétases α et β clivent APP dans son domaine extracellulaire alors que le clivage réalisé par la γ -sécrétase est intramembranaire et hétérogène. Le clivage réalisé par la sécrétase BACE-1 (β -APP cliving enzyme 1) est aussi réalisé dans le domaine extracellulaire d'APP.

Le γ -clivage d'APP C99 est hétérogène (figure 1.3). Il forme des fragments A β de 40 à 43 résidus, les formes les plus courantes étant A β 40 et A β 42 (Kowalska 2004). Le peptide A β est un peptide hautement hydrophobe qui a la capacité de s'agréger en oligomères, qui peuvent à leur tour s'associer et former des fibres et engendrer les plaques amyloïdes. Il a été suggéré qu'A β 42 est le principal constituant des plaques amyloïdes puisque qu'il est moins soluble que les autres formes. En effet, ce dernier s'agrège plus facilement qu'A β 40 *in vitro* (Jarrett, Berger et al. 1993). Une des caractéristiques des mutations retrouvées dans les gènes APP, PS1 et PS2, est d'ailleurs de favoriser la production de la forme neurotoxique A β 42 ou encore d'augmenter le ratio A β 42 : A β 40 et donc favoriser la formation de plaques.

1.5.2 AICD

Le domaine intracellulaire d'APP (AICD) est produit à la suite du clivage d'APP par la γ -sécrétase. La protéine Notch, quant à elle, subit aussi un clivage par la γ -sécrétase et produit le domaine intracellulaire NICD qui possède un rôle de facteur de transcription. Par analogie, il est séduisant de proposer un rôle homologue de signallement nucléaire pour AICD (Annaert and De Strooper 1999). AICD possède un motif « YENPTY », conservé de *C. elegans* à l'humain, qui est important dans l'endocytose dépendante des clathrines ainsi que dans la liaison de nombreuses protéines incluant Fe65, JIP et X11/Mint (Reinhard, Hebert et al. 2005). AICD formerait entre autres avec Fe65 un complexe permettant la régulation de différents processus neuronaux (Ikin, Sabo et al. 2007). De plus, en association avec Tip60, une acétyltransférase ayant un rôle dans la régulation transcriptionnelle, ce complexe régulerait la transcription de son propre promoteur (von Rotz, Kohli et al. 2004). Cependant le rôle d'AICD dans son contexte physiologique demeure inconnu.

1.6 Les sécrétases (BACE-1 et γ -sécrétase)

Les sécrétases responsables du clivage protéolytique amyloïdogène d'APP sont la β -sécrétase ou BACE-1 (β -site APP cleaving enzyme 1) et le complexe γ -sécrétase. Elles sont donc considérées dans la communauté scientifique comme des cibles thérapeutiques privilégiées dans la lutte contre la maladie d'Alzheimer. Il est cependant délicat de cibler les sécrétases, par exemple avec des inhibiteurs d'enzymes, car elles sont impliquées dans différentes voies physiologiques, autres que celle du métabolisme d'APP.

1.6.1 BACE-1

BACE-1 (figure 1.4) est une protéine transmembranaire de type I, hautement exprimée dans le cerveau, contenant un site d'activité aspartyl protéase (De Strooper and Annaert 2000). Elle a été découverte à l'aide de stratégies permettant d'identifier les gènes modulant la production du peptide A β (Vassar, Bennett et al. 1999). En effet, BACE-1 est impliquée dans le premier clivage amyloïdogénique d'APP, qui survient entre ses résidus 671 et 672. (Sinha, Anderson et al. 1999). Cette activité amyloïdogène est clairement démontrée par l'absence de production du peptide A β chez les modèles cellulaires et murins « knock-out » homozygote pour BACE-1 (Cai, Wang et al. 2001; Luo, Bolon et al. 2001). De plus, l'enzyme est ciblée à la membrane ou elle se retrouve préférentiellement dans les radeaux lipidiques qui seraient le lieu privilégié par BACE-1 pour le clivage protéolytique d'APP (Ehehalt, Keller et al. 2003). La β -sécrétase colocalise avec APP dans l'appareil de Golgi et les endosomes où elle est principalement active en raison du pH acide de ces compartiments. Enfin la présence de la mutation « swedish » dans le gène d'APP, c'est à dire la double mutation des codons 670 et 671 d'APP, substituant les acides aminés lysine et méthionine en asparagine et leucine, augmente de 60 fois la protéolyse d'APP par BACE-1 par rapport à la protéolyse d'APP sauvage (Lin, Koelsch et al. 2000).

BACE-1 possède un court domaine cytoplasmique et un large ectodomaine dans lequel la signature aspartyl protéase « DT/SGT/S », est retrouvée aux positions Asp93 et Asp289 (Esler and Wolfe 2001). La protéine subit une maturation complexe qui implique

l'homodimérisation de cette dernière et le clivage du prodomaine de l'enzyme par une convertase « furin-like » (Bennett, Denis et al. 2000; Westmeyer, Willem et al. 2004)

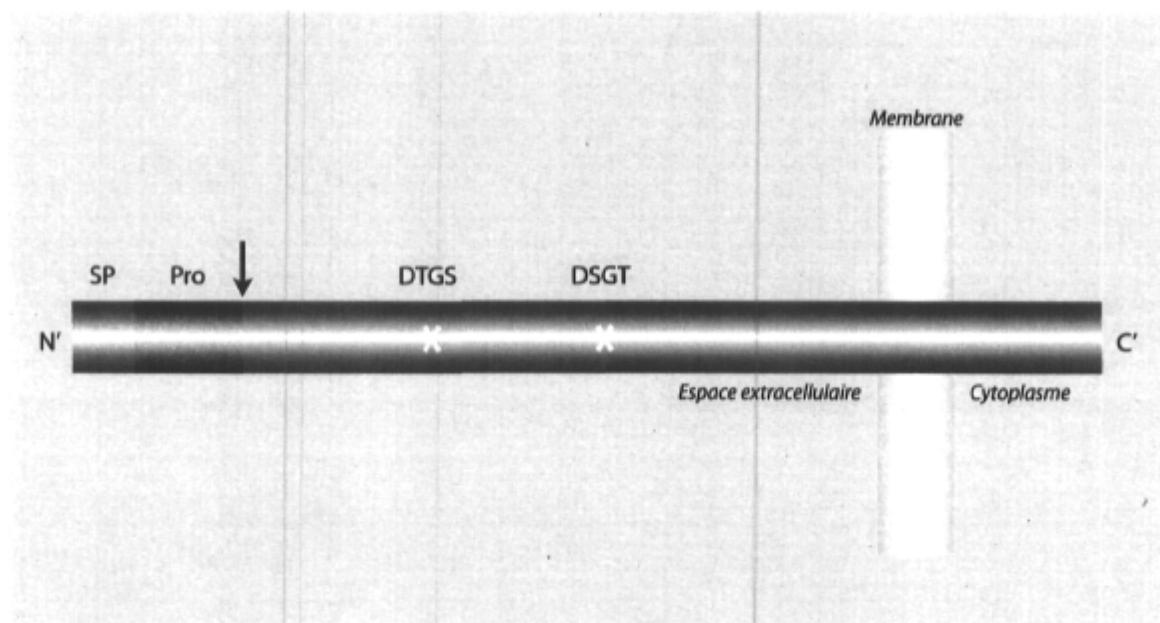


Figure 1.4 : Représentation schématique de BACE-1. Les sites d'activité aspartyl protéase sont indiqués en jaune et le site de clivage furine par une flèche. Le peptide signal (SP) et le prodomaine de la protéine (Pro) sont en rouge et bleu respectivement. Figure adaptée de (Walter, Kaether et al. 2001) par Marie-Claude Proulx 2007.

BACE-1 est une cible de choix dans le cadre de thérapies développées pour contrer la maladie d'Alzheimer. En effet, les modèles « knock-out » homozygotes murins pour BACE-1 n'ont démontré aucun phénotype sévère. De plus, une déficience de l'enzyme chez des souris modèles pour la maladie d'Alzheimer prévient leurs troubles de la mémoire (Dominguez, Hartmann et al. 2004).

Bien que les résultats mentionnés ci-dessus soient prometteurs, il est important de connaître les rôles de BACE-1 en dehors de son implication dans la maladie d'Alzheimer. En effet, APP n'est pas le substrat principal de BACE-1, malgré qu'aucune fonction physiologique pour l'enzyme ne soit encore identifiée. Plusieurs substrats de l'enzyme ont cependant été rapportés dans la littérature : les protéines « APP-like » APLP1 et APLP2 (Li and Sudhof 2004), la protéine LRP (low density lipoprotein receptor-related protein) qui permet l'internalisation d'APP et BACE dans les endosomes (von Arnim, Kinoshita et al. 2005), le

ligand-1 de la glycoprotéine P-sélectine qui est important dans la médiation de l'adhésion des leucocytes dans la réponse inflammatoire (Lichtenthaler, Dominguez et al. 2003) et la sialyl-transférase ST6Gal 1. Le clivage de cette dernière, par BACE dans l'appareil de Golgi, permet la sécrétion de l'enzyme (Kitazume, Tachida et al. 2001). Enfin, BACE est aussi impliquée dans le clivage des sous-unités β des canaux sodiques voltages-dépendant (Wong, Sakurai et al. 2005) et de la protéine neuregulin1 (NRG1) de type III, qui est impliquée dans le contrôle de la myélination des axones (Willem, Garratt et al. 2006).

1.6.2 Le complexe γ -sécrétase

Le complexe γ -sécrétase est responsable du second clivage protéolytique d'APP. Cette enzyme est un complexe multiprotéique hautement hydrophobe composé des protéines préséniline 1 ou 2 (PS1 ou PS2) (Li, Xu et al. 2000), Nicastrine (NCT) (Yu, Nishimura et al. 2000), Anterior pharynx defective 1 homolog (APH-1) et Presenilin enhancer 2 homolog (PEN-2) (Francis, McGrath et al. 2002; Goutte, Tsunozaki et al. 2002; Steiner, Winkler et al. 2002) (figure 1.5). La présence de ces quatre composantes est nécessaire à la reconstitution d'une activité γ -sécrétase chez la levure, un organisme ne possédant pas d'activité γ -sécrétase intrinsèque (Edbauer, Winkler et al. 2003). De plus, la perte de l'une des quatre sous-unité entraîne une perte d'activité γ -sécrétase et une diminution de l'expression et de la maturation des autres composantes de la γ -sécrétase (Edbauer, Winkler et al. 2002; Steiner, Winkler et al. 2002; Li, Ma et al. 2003; Ma, Li et al. 2005). Cependant, bien que la seule présence des quatre composantes reconstitue une activité γ -sécrétase la stœchiométrie des quatre sous-unités et la composition précise du complexe demeure inconnue. De nombreuses études démontrent en effet que le poids moléculaire total des quatre sous-unités (200-250 kDa) est inférieur au poids moléculaire du complexe, estimé entre 600 et 2000 kDa selon les auteurs (Li, Lai et al. 2000; Edbauer, Winkler et al. 2002; De Strooper 2003). La présence d'autres co-facteurs à l'intérieur du complexe est donc probable. Ainsi, TMP21, un membre de la famille cargo p24, a récemment été identifié comme étant un nouveau partenaire du complexe γ -sécrétase. TMP21 jouerait un rôle dans la régulation du γ -clivage, générant le fragment A β (Chen, Hasegawa et al. 2006).

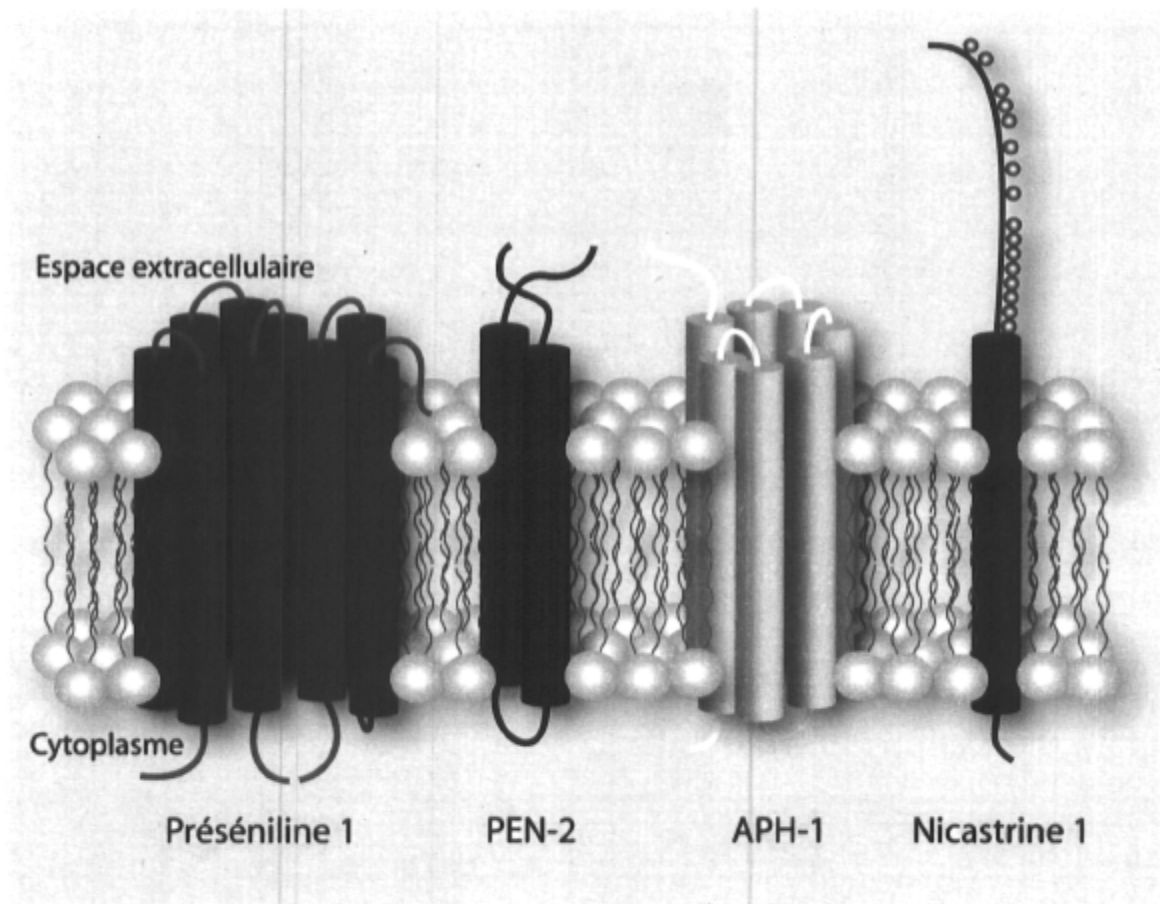


Figure 1.5 : Représentation schématique des quatre sous-unités essentielles à l'activité du complexe γ -sécrétase. Les protéines sont représentées selon leur conformation mature. PS1 : hétérodimère des fragments N et C-terminaux, NCT : forme glycosylée.

Le complexe γ -sécrétase est une aspartyl protéase (Wolfe, Xia et al. 1999), dont le site catalytique serait situé dans la sous-unité préséniline, bien que l'assemblage et la stabilisation du complexe avec les autres sous-unité soit nécessaire à la maturation et à l'activité γ -sécrétase. En plus de son implication dans la maladie d'Alzheimer, le complexe γ -sécrétase joue un rôle important dans de nombreuses voies physiologiques. Il est par exemple un élément essentiel à la voie de Notch et à son implication dans les processus du développement. La grande diversité des substrats du complexe γ -sécrétase (tableau 1.1) en font un candidat difficile à cibler dans le cadre de thérapies développées pour contrer la maladie d'Alzheimer.

Tableau 1.1 : Substrats de la γ -sécrétase^a.

Substrat ^b	Fonction du substrat	Produit du clivage	Localisation nucléaire	Fonction potentiel du clivage ou du produit résultant
APLP1 et APLP2	Membres de la famille d'APP	ALID	oui	Activité transcriptionnelle
APOER2	Membre de la famille des récepteurs des lipoprotéines, signalment	ND	oui	Régulation du signalment
APP	Fonctions synaptiques	AICD	oui	Activité transcriptionnelle
CD44	Adhésion cellulaire	CD44ICD	oui	Régulation de la transcription
CSF1	Récepteur tyrosine kinase, division cellulaire et différenciation	ND	oui	ND
DCC	Récepteur Netrin-1, orientation axonale et survie cellulaire	DCC-ICD	oui	Activité transcriptionnelle, atténuation du signalment
Delta	Ligand de la voie de Notch	DIICD	oui	Régulation de la prolifération cellulaire
E-cadherin	Adhésion cellulaire	Ecad/CTF2	non	Régulation de l'adhésion cellulaire, dégradation d'APP, localisation de la β -caténine
Ephrin-B1	Ligand du récepteur tyrosine kinase relié à l'Ephrin-B	ND	oui	Régulation de l'actine, polymérisation
Ephrin-B2	Ligand du récepteur tyrosine kinase relié à l'Ephrin-B	EphrinB2/CTF2	ND	Phosphorylation de Src
ERBB4	Récepteur tyrosine kinase	B4ICD, E4ICD, 4ICD	oui	Régulation de transcription, apoptose
γ -Protocadherin	Connections synaptiques	γ -ICD ou Pcdhg-CTF2	oui	Activité transcriptionnelle
GHR	Récepteur de cytokine	GHR stub	oui	ND
GluR3	Recepteur polytransmembranaire du glutamate, neurotransmission.	ND	non	Modulation de l'activité du récepteur
HLA-A2	Protéine de la classe MHC I	HLA-A2 ICD	ND	Dégradation de HLA-A2
Jagged	Ligand de la voie de Notch	JICD	oui	Activité transcriptionnelle
LRP1	Membre de la famille des récepteurs des lipoprotéines, endocytose, signalment.	LRP1 ICD	oui	Régulation de la transcription
N-cadherin	Adhésion cellulaire	Ncad/CTF2	oui	Régulation de l'adhésion cellulaire, dégradation de CBP, localisation de la β -caténine
Nectin 1a	Connections synaptiques	NE-ICD	non	Régulation de l'adhésion cellulaire
Notch	Récepteur de la voie de Notch	NICD	oui	Activité transcriptionnelle
NRADD	Apoptose	NRICD	oui	ND
p75 ^{NTR}	Récepteur de la neurotrophine	p75 ICD	non ?	Activation de Rho, survie cellulaire, régulation de la transcription
SCNB2	Sous-unité de canal sodique, adhésion cellulaire	β 2-ICD	non	Régulation de l'adhésion et de la migration cellulaire
Syndecan 3	Heparan sulfate proteoglycan	SICD	ND	Control de la localisation des protéines associées (ex. CASK)
Tyrosinase, TYRP1 et TYRP2	Synthèse de pigments	ND	ND	Régulation de la pigmentation, localisation de la tyrosinase

^a Source tirée de (Parks and Curtis 2007) et adapté par Marie-Claude Proulx (2007).

^b Abréviations : APLP (protéine semblable au précurseur de l'amyloïde), APOER2 (récepteur 2 de l'apolipoprotéine-E), CASK (calcium/calmodulin dépendant de serine protéine kinase), CSF1 (facteur 1 stimulant la colonie), GHR (récepteur d'hormone de croissance), GluR3 (sous-unité 3 du récepteur du glutamate), MHC (complexe majeur d'histocompatibilité), ND (non-déterminé), p75^{NTR} (récepteur de la neurotrophine p75), TYRP (protéine connexe à la tyrosinase).

1.6.2.1 Les présénilines

Les gènes codant pour PS1 et PS2 ont été associés à la maladie d'Alzheimer à la suite de l'identification, chez ces gènes, de mutations autosomiques dominantes causant la forme familiale de la maladie d'Alzheimer (Rogaev, Sherrington et al. 1995; Sherrington, Rogaev et al. 1995). PS1 est située sur le chromosome 14 (14q24.3) alors que PS2 est localisée sur le chromosome 1 (1q31-q42). PS1 et PS2 démontrent une très grande homologie de séquence (67%) et des similarités structurelles. Ceci suggère des rôles semblables pour les deux protéines. Toutefois, les phénotypes de souris « knock-out » des deux gènes sont différents. Le « knock-out » PS1 est fatal chez l'embryon alors que le « knock-out » PS2 développe une fibrose pulmonaire moyenne et hémorragique au cours du vieillissement. Il a été suggéré qu'il existe différents types de complexes γ -sécrétase, composés avec PS1 ou PS2, impliqués dans différents processus physiologiques (Lai, Chen et al. 2003). Toutefois, le complexe γ -sécrétase le plus commun contient PS1. Puisque les mutations causant la majorité des cas de la forme familiale de la maladie d'Alzheimer sont retrouvées chez PS1, il est considéré comme le principal gène responsable de la maladie.

PS1 est une protéine transmembranaire serpentine qui, selon les modèles récents, posséderait 9 domaines transmembranaires (Henricson, Kall et al. 2005; Laudon, Hansson et al. 2005; Oh and Turner 2005). Le modèle le plus récent, de la protéine est illustré à la figure 1.6.

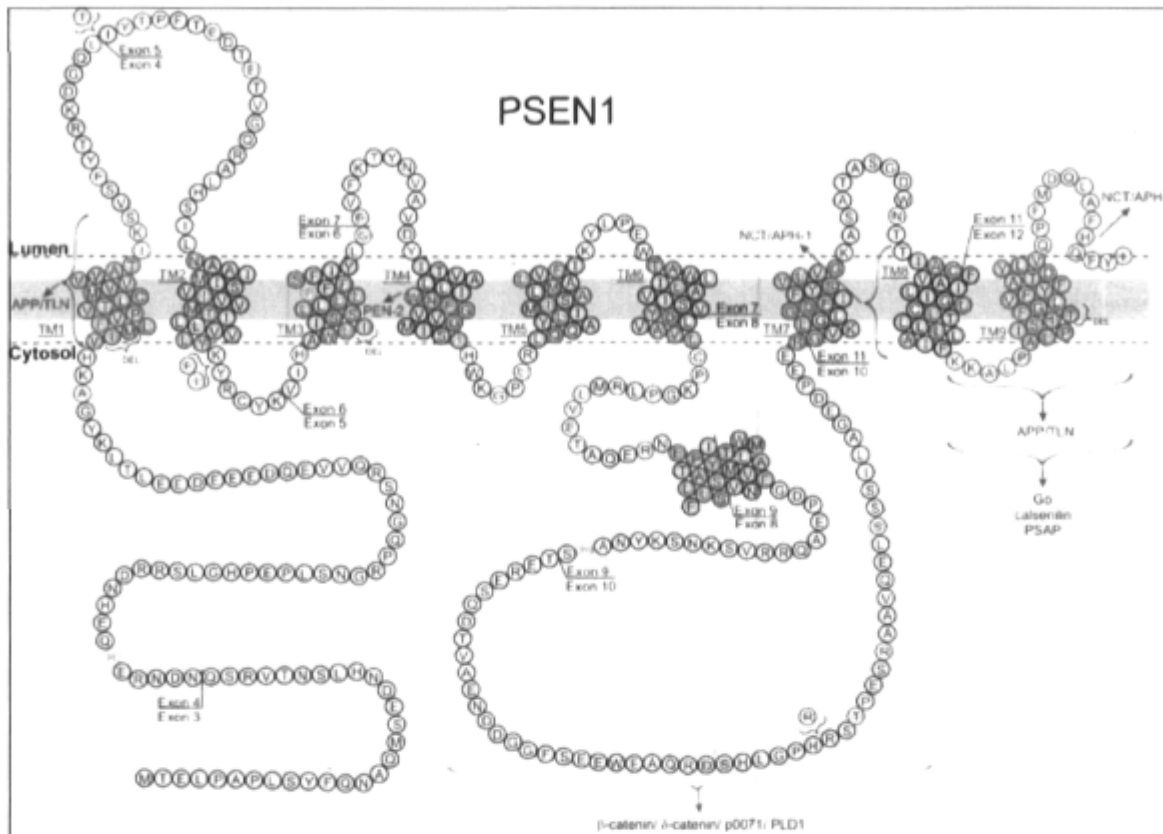


Figure 1.6 : Représentation schématique de PS1. Les mutations ponctuelles causant la forme familiale de la maladie d’Alzheimer sont indiquées en rouge (Dillen and Annaert 2006).

PS1 est la sous-unité catalytique du complexe γ -sécrétase. Elle ne possède pas la signature classique d’une aspartyl protéase « DT/SGT/S », mais elle est membre d’une nouvelle famille d’aspartyl protéases de type GxGD. En effet, PS1 possède ce motif hautement conservé, retrouvé chez d’autres aspartyl protéases (Haass and Steiner 2002). PS1 est exprimée initialement sous la forme d’une holoprotéine instable de ~ 50 kDa dont la demie vie est d’approximativement 1 heure (Zhang, Kang et al. 1998). Cette holoprotéine subit une endoprotéolyse, à l’intérieur de sa large boucle cytoplasmique, entre les résidus Thr291 et Ala299. Cette endoprotéolyse produit les fragments N et C-terminaux (NTF/CTF) de ~ 27 et ~ 17 kDa respectivement (Thinakaran, Borchelt et al. 1996; Podlisny, Citron et al. 1997) qui s’oligomérisent dans le complexe mature (Ratovitski, Slunt et al. 1997; Hebert, Godin et al. 2003). L’endoprotéolyse et l’oligomérisation de PS1 est nécessaire à l’activité catalytique du complexe γ -sécrétase (Levitan, Lee et al. 2001; Laudon, Mathews et al.

2004). La présence des résidus aspartates aux positions D275 (TM6) et D385 (TM7) est aussi nécessaire à l'endoprotéolyse et à la fonction γ -sécrétase. En effet, la délétion ou la mutagenèse de ces deux résidus hautement conservés cause une réduction du niveau A β (Wolfe, Xia et al. 1999). La maturation et translocation de PS1 est dépendante de son association aux autres sous-unités du complexe γ -sécrétase.

1.6.2.2 Nicastrine

Nicastrine est une glycoprotéine transmembranaire de type I, dont le gène est localisé sur le chromosome 1 près des marqueurs D1S1595 et D1S2844 qui sont associés au locus probable de l'Alzheimer (Zubenko, Hughes et al. 1998; Kehoe, Wavrant-De Vrieze et al. 1999). Elle a été identifiée comme une composante du complexe γ -sécrétase par des études de co-immunoprécipitations avec PS1 et PS2 (Yu, Nishimura et al. 2000; Capell, Kaether et al. 2003). Nicastrine possède un cadre de lecture ouvert de 709 acides aminés dont la majeure partie N-terminale (670 a.a.) contient différents motifs de glycosylation, *N*-mirystoylation et phosphorylation. Les gènes orthologues présents chez la souris, *D. melanogaster* et *C. elegans* montrent un motif « DYIGS », ainsi que 4 cystéines espacées de 16-17 acides aminés, hautement conservées (Yu, Nishimura et al. 2000). Nicastrine est une sous-unité essentielle du complexe γ -sécrétase, bien que le rôle de cette dernière ne soit pas clairement établi. La protéine mature forme un complexe stable avec PS1 et la diminution de l'expression de la protéine entraîne une réduction des niveaux d'A β (Edbauer, Winkler et al. 2002). L'absence du gène chez des souris nulle entraîne la déstabilisation des composantes du complexe γ -sécrétase ainsi qu'une perte d'activité γ -sécrétase (Li, Fici et al. 2003; Li, Ma et al. 2003).

La maturation de Nicastrine implique un processus complexe de glycosylation. Cette modification post-traductionnelle régule étroitement l'association de la protéine avec PS1 (Yang, Tandon et al. 2002). Dans le complexe actif, il a été démontré qu'en plus d'interagir avec PS1, NCT se lie avec les substrats de la γ -sécrétase ce qui suggère que NCT possède un rôle de récepteur des substrats du complexe γ -sécrétase (Shah, Lee et al. 2005).

1.6.2.3 Anterior pharynx defective 1 homolog

APH-1 a été associée à la γ -sécrétase par criblage génétique des composantes de la voie de Notch chez *C. elegans*. En effet, *C. elegans* mutant pour APH-1 ne possède pas de pharynx antérieur ce qui est une caractéristique d'un défaut de la voie de Notch dans cet organisme. Il existe trois homologues de cette protéine : APH-1a, 1b et 1c, et deux isoformes d'APH-1a qui résultent d'un épissage alternatif : APH-1aL et 1aS (pour forme longue et courte). APH-1a est la principale forme retrouvée dans le complexe γ -sécrétase, bien qu'il existe d'autres types de complexes γ -sécrétase contenant les divers variants d'APH-1. (Francis, McGrath et al. 2002; Goutte, Tsunozaki et al. 2002; Shirotani, Edbauer et al. 2004; Ma, Li et al. 2005).

APH-1 (~ 30 kDa) est une protéine serpentine formée de 7 domaines transmembranaires dont l'extrémité N-terminale se retrouve dans l'espace extracellulaire, et l'extrémité C-terminale, dans le cytoplasme. Cette sous-unité du complexe γ -sécrétase interagit avec la forme immature de NCT dans le réticulum endoplasmique. En effet, les deux sous-unités s'assemblent en un sous-complexe qui va à son tour se lier à l'holoprotéine PS1, la stabiliser et entraîner la translocation du complexe en formation dans l'appareil de Golgi, le réseau trans-Golgi, la membrane plasmique et les endosomes (LaVoie, Fraering et al. 2003; Takasugi, Tomita et al. 2003). Cette étape d'assemblage et de stabilisation est essentielle à l'activité γ -sécrétase et est dépendante du motif « GXXXG » d'APH-1. (Lee, Shah et al. 2004; Niimura, Isoo et al. 2005).

1.6.2.4 Presenilin enhancer 2 homolog

PEN-2 est la plus petite protéine du complexe γ -sécrétase (~ 12 kDa). Elle joue cependant un rôle essentiel dans la régulation de l'activité γ -sécrétase. De la même façon qu'APH-1, PEN-2 a été identifiée par criblage génétique des composantes de la voie de Notch chez *C. elegans* (Francis, McGrath et al. 2002; Steiner, Winkler et al. 2002). Son gène, situé sur le chromosome 19 (19q13.12), code pour une protéine possédant deux domaines transmembranaires. Ces derniers lui confèrent une conformation en tête d'épingle : les extrémités N et C-terminales de PEN-2 sont orientées dans l'espace extracellulaire (Crystal, Morais et al. 2003).

PEN-2 est la dernière sous-unité à s'assembler dans le complexe γ -sécrétase. Elle possède d'ailleurs une affinité plus grande pour la forme mature glycosylée de NCT associée à PS1 (LaVoie, Fraering et al. 2003). L'association de PEN-2 au trimère APH-1 : NCT : PS1 via le 4^e domaine transmembranaire de PS1 induit l'endoprotéolyse de l'holoprotéine (Kim and Sisodia 2005; Kim and Sisodia 2005) pour ensuite stabiliser l'hétérodimère NTF/CTF (Prokop, Shirotani et al. 2004). Cette dernière étape de formation du complexe γ -sécrétase lui confère son activité protéolytique (Takasugi, Tomita et al. 2003). L'association de PS1 avec PEN-2 stabilise cette dernière et régule l'expression de la protéine. En effet, en absence de PS1, PEN-2 ne peut quitter le réticulum endoplasmique et est rapidement dégradée par le protéasome (Bergman, Hansson et al. 2004; Crystal, Morais et al. 2004).

1.6.2.5 Assemblage et maturation du complexe γ -sécrétase

La figure 1.7 résume les étapes de la formation et de la maturation du complexe γ -sécrétase. 1) Les sous-unités APH-1 et iNCT (forme immature de NCT) s'assemblent pour former un sous-complexe qui sert d'échafaudage aux autres sous-unités. 2) La liaison de l'holoprotéine PS1 au sous-complexe APH-1 : NCT est régulé par la maturation de NCT. Le sous-complexe APH-1 : NCT stabilise l'holoprotéine PS1 et permet la translocation du complexe en formation dans la voie de sécrétion. 3) PEN-2 se lie finalement au trimère APH-1 : NCT : PS1. 4) Cette étape induit l'endoprotéolyse de PS1 et permet la formation d'un complexe γ -sécrétase mature et actif.

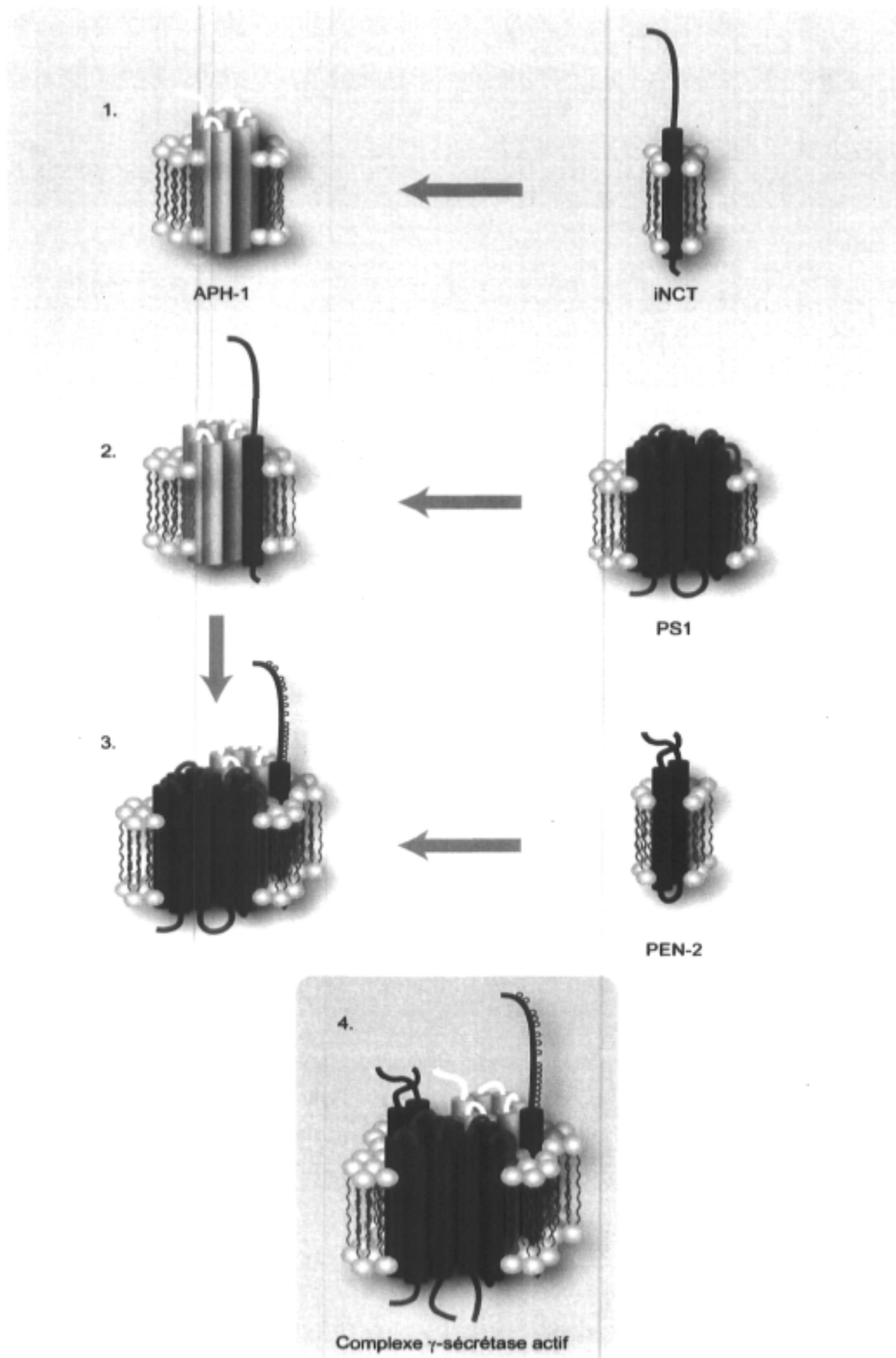


Figure 1.7 : Assemblage et maturation du complexe γ -sécrétase.

1.7 – Objectifs de recherche

Le complexe γ -sécrétase joue un rôle essentiel dans le métabolisme d'APP dans la maladie d'Alzheimer. Malheureusement, l'avantage de cibler cette enzyme d'un point de vue thérapeutique, dans le dessein de diminuer les niveaux d'A β , est affecté par l'implication du complexe γ -sécrétase dans de nombreux processus physiologiques.

Le principal objectif de ce projet est d'identifier un partenaire du complexe γ -sécrétase ou d'APP qui, idéalement, modulerait l'affinité du complexe γ -sécrétase pour ce substrat uniquement. Un tel partenaire pourrait être alors ciblé d'un point de vue thérapeutique.

La stratégie utilisée dans le cadre de ce projet est le criblage de banques d'ADNc de cerveau humain par la méthode du double hybride en levure. Cette méthode permet d'identifier de nouveaux partenaires des protéines utilisées comme appât, c'est-à-dire les protéines NCT, PEN-2 et APP.

L'objectif secondaire est lié à la composition du complexe γ -sécrétase qui demeure incertaine. L'utilisation du double hybride à l'aide des sous-unités du complexe comme protéines appâts amènes la possibilité d'identifier une nouvelle sous-unité du complexe, qu'elle soit transitoire ou permanente. L'identification d'un tel partenaire permettrait d'améliorer considérablement nos connaissances du fonctionnement et des rôles joués par la γ -sécrétase, ou encore des mécanismes régulant l'assemblage et la maturation du complexe.

Enfin, l'utilisation d'APP comme protéine-appât crée la possibilité d'identifier des partenaires protéiques régulant le métabolisme d'APP ou participant aux autres fonctions de la protéine et des peptides résultant des clivages de cette dernière, par exemple en régulant la fonction d'AICD.

Chapitre 2 Matériel et méthodes

2.1 Construction de vecteurs d'expression

Les systèmes qui ont été privilégiés pour la réalisation de ce projet sont le système de double hybride en levure et la technique de co-immunoprécipitation de protéines exprimées dans des lignées cellulaires humaines. L'étape préliminaire à l'utilisation de ces systèmes est la construction de vecteurs d'expressions propre à chaque système. Ces derniers sont utilisés pour exprimer diverses protéines dans les différents modèles ; entre autres, la souche de levure *S. cerevisiae* AH109, utilisée dans le système de double hybride en levure, ainsi que les lignées cellulaires humaines TsA201 (cellules embryonnaire de rein HEK293 modifiées) et SH-SY5Y (cellule de neuroblastome humain), utilisées pour la technique de co-immunoprécipitation.

Deux méthodes de construction des vecteurs sont utilisées :

1. Le clonage par méthode du « copier/coller ».
2. Le clonage par amplification par réaction de polymérase en chaîne (PCR).

La méthode du «copier/coller» indique que le gène cloné est simplement sorti d'un premier vecteur à l'aide des enzymes de restriction et inséré par ligation dans un autre (ouvert à l'aide des mêmes enzymes de restriction) sans passer par une étape d'amplification PCR. La méthode de clonage par amplification PCR est détaillée à la section 2.1.1.

Tous les vecteurs d'expressions qui ont été construits dans le cadre de ce projet sont décrit au tableau 2.1.

Tableau 2.1 : Descriptions des différents vecteurs d'expression construits

Vecteur d'expression de levure	Gène	Méthode de clonage	Source du gène
pGBKT7	Nicastrine FL	PCR	pcDNA6 V5 His / NCT
	PEN-2 FL	PCR	pDE2 ^a
	APH-1 FL	PCR	pDE2
	Ferritin L FL	copier/coller	pCMVzeo-HA / Ferritin L FL
pGADT7	Nicastrine FL	PCR	pcDNA6 V5 His / NCT
	PEN-2 FL	PCR	pDE2
	APH-1 FL	PCR	pDE2
	Ferritin L FL	copier/coller	pCMVzeo-HA / Ferritin L FL
Vecteur d'expression de cellule			
pCMVzeo-HA	Ferritin L FL	PCR	pACT2 / candidat # 23 (PEN-2)
	PEN-2 FL	copier/coller	pGADT7 / PEN-2 FL
pcDNA3.1-His	SNW1	PCR	pACT2 / candidat # 3 (APP)
	WBP5	copier/coller	pACT2 / candidat # 4 (APP)
	ISLR FL	PCR	Banque d'ADNc ^b
pcDNA6-V5	ISLR FL	copier/coller	pcDNA3.1-His / ISLR FL

^apDE2 : pBEVY-LpADHflagPEN-2,pGDHAph1aL

^bBanque d'ADNc préparée par transcription inverse d'ARN, extrait de cellules TsA201 (annexe A).

2.1.1 Amplification par PCR

Les gènes clonés par amplification PCR proviennent de vecteurs conservés au laboratoire dans un congélateur à une température de -80°C. Ces derniers se retrouvent sous la forme d'une culture bactérienne transformée avec le vecteur d'intérêt, resuspendue dans 1 mL de LB/15% (v/v) glycérol. L'ADN plasmidique de ces cultures est préalablement préparé selon la méthode de préparation d'ADN plasmidique (voir section 2.1.7). Les amorces utilisées pour l'amplification des gènes par PCR ainsi que leur température d'hybridation (TH) sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 2.2 : Description des amorces et températures d'hybridation utilisées pour chaque PCR.

Nom de l'amorce	Numéro de l'amorce	Séquence de l'amorce ^a	1 ^{ère} TH	2 ^e TH
Nicastrine-1F ^b (Sal1)	p139	GTCGAC CTATGGCTACGGCAGGGGGT	58°C	58°C
Nicastrine-2127R (Sal1)	p81	GTCGAC GTATGACACAGCTCCTGGCT		
PEN-2-205F (EcoR1)	p123	GAATTC ATGAACCTGGAGCGAGTGTC	60°C	60°C
PEN-2-510R (EcoR1)	p124	GAATTC TCAGGGGGTGCCCAGGGGTA		
APH-1-102F (EcoR1)	p121	GAATTC ATGGGGGCTGCGGTGTTTTTC	60°C	60°C
APH-1-838R (EcoR1)	p122	GAATTC TCAGTCCAGGTAGTCAGTCC		
Ferritin-1F (EcoR1)	p248	GAATTC ATGAGCTCCCAGATTCGTCAG	57°C	60°C
Ferritin-R (AD sequencing-R)	p84	AGATGGTGCACGATGCACAGT		
SNW1-1F (EcoR1)	p255	GAATTC ATGGCGCTCACCAGCTTTTTAC	56°C	60°C
SNW1-1611R (Xho1)	p256	CTCGAG CTATTCCTCCTCCTCTTCTTGC		
ISLR-99F (EcoR1)	p257	GAATTC ATGCAGGAGCTGCATCTGC	58°C	61°C
ISLR-1385R (Xho1)	p258	CTCGAG CTAGAAGGAGGTGAGGAAG		

^a Les sites de restriction des amorces sont indiqués en caractère gras.

^b « F » indique que l'amorce s'hybride au début du gène et est d'orientation « forward » alors que « R » indique que l'amorce s'hybride à la fin du gène et est d'orientation « reverse ».

La température d'hybridation optimale des amorces est calculée à partir des T_m des amorces, auxquelles sont enlevées 3-4°C. Le calcul de la T_m est le suivant :

$$T_m = 62,3 \text{ °C} + (0,41 \times (\% \text{ G+C})) - (500/\text{nb bases}).$$

La 1^{ère} température d'hybridation est calculée avec le site de restriction inclus dans l'amorce, alors que la deuxième est calculée sans le site de restriction de l'amorce.

Le mélange réactionnel de chaque PCR est le suivant :

- 1 µL de l'amorce «forward» (10 µM)
- 1 µL de l'amorce «reverse» (10 µM)
- 1 µL de dNTPs (100mM)
- 2 µL de DMSO 100%
- 10 µL de tampon Phusion HF 5X (7.5 mM MgCl₂)
- 0,5 µL d'enzyme polymérase haute fidélité Phusion (0,02 U/µL) (NEB[®])
- 1 µL d'ADN plasmidique (100 ng/µL) ou 5 µL d'ADNc
- Compléter à 50 µL avec de l'H₂O MQ.

Le mélange réactionnel est incubé dans l'appareil « PCR system 2700 » (GeneAmp[®]) selon le programme suivant :

Dénaturation initiale : 95°C x 30 sec

4 cycles :

Dénaturation : 95°C x 10 sec

Hybridation des amorces : 1^{ère} TH^a x 30 sec

Élongation : 72°C x 30 sec

35 cycles :

Dénaturation : 95°C x 10 sec

Hybridation des amorces : 2^e TH x 30 sec

Élongation : 72°C x 30 sec

Élongation finale : 72°C x 10 min

Conserver le produit PCR à 4°C

^aLorsque la première et la deuxième TH sont identiques (voir tableau 2.2), les quatre premiers cycles d'amplification sont facultatifs.

2.1.2 Digestion d'ADN

L'ADN amplifié par PCR ou provenant d'un autre vecteur (méthode de clonage par copier/coller) ainsi que les vecteurs d'expression dans lesquels les gènes sont clonés, doivent être digérés par la même enzyme de restriction (deux enzymes différentes si le clonage est directionnel), afin de présenter des extrémités cohésives. Les enzymes et tampons de restrictions utilisées proviennent de la compagnie Roche Molecular Biochemicals. La méthode standard s'applique à toutes les digestions effectuées.

Tableau 2.3 : Composition des mélanges pour les réactions de digestion

	Digestion d'ADN plasmidique	Digestion de produit PCR
Enzyme de restriction (10 U/μL)	1 μL	2 μL
Tampon de restriction 10 X	2 μL	3 μL
H ₂ O MQ	13 μL	0 μL
ADN	4 μL	20 μL

Le mélange est incubé 1 heure à 37°C (température optimale d'activité de l'enzyme). Les digestions réalisées selon chaque clonage sont décrites dans le tableau 2.4.

Tableau 2.4 : Description des types de clonage et des digestions

Vecteur d'expression de levure	Gène	Clonage directionnel	Enzyme(s) de restriction utilisée(s)	Tampon de restriction approprié
pGBKT7	Nicastrine FL	non	Sal1	H
	PEN-2 FL	non	EcoR1	H
	APH-1 FL	non	EcoR1	H
	Ferritin L FL	oui	EcoR1-Xho1	H
pGADT7	Nicastrine FL	non	Sal1 (gène) ^a Xho1 (vecteur)	H
	PEN-2 FL	non	EcoR1	H
	APH-1 FL	non	EcoR1	H
	Ferritin L FL	oui	EcoR1-Xho1	H
Vecteur d'expression de cellule				
pCMVzeo-HA	Ferritin L FL	oui	EcoR1-Xho1	H
	PEN-2 FL	non	EcoR1	H
pcDNA3.1-His	SNW1	oui	EcoR1-Xho1	H
	WBP5	oui	EcoR1-Xho1	H
	ISLR FL	oui	EcoR1-Xho1	H
pcDNA6-V5	ISLR FL	oui	EcoR1-Xho1	H

^a Lors de digestions multiples, chaque enzyme doit avoir une efficacité d'au moins 75 % dans le tampon de restriction sélectionné.

^b Le tampon de restriction H (concentration 10X) : Tris-HCl (50 mM), MgCl₂ (10 mM), NaCl (100 mM), dithioerythritol (1 mM), pH 7,5.

2.1.3 Extraction d'ADN d'un gel d'agarose

Afin d'isoler l'ADN digéré, qui sera utilisé lors les clonage, il est nécessaire de le purifier par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (J.T.Baker[®]) préparé dans le tampon TAE (40 mM Tris-acétate, 2 mM Na₂EDTA•2H₂O). L'ADN migre dans le gel avant d'être extrait à l'aide de la méthode « QIAquick[®] gel extraction » de la compagnie QIAGEN. Une bande du gel d'agarose, contenant le fragment d'ADN à extraire, est découpée et pesée. Un volume de 300 µL de tampon de dissolution QG est ajouté pour chaque 100 mg d'agarose. Le mélange est incubé à 55°C jusqu'à dissolution complète de l'agarose. Par la suite, 100 µL d'isopropanol (Fisher Scientific) est ajouté au mélange, pour chaque 100 mg d'agarose de départ. Le mélange est déposé sur colonne « QIAquick[®] spin column » et cette dernière est centrifugée 1 min à 13000 rpm, à l'aide de la centrifugeuse Beckman Coulter Allegra 21R centrifuge - rotor F2402H (toutes les centrifugations effectuées à 13000 rpm sont réalisées à l'aide de ce rotor). Le liquide résiduel est jeté et la colonne est lavée avec 500 µL de

tampon QG. Après une nouvelle centrifugation de 1 min à 13000 rpm, le liquide résiduel est jeté et la colonne lavée avec 750 μ L de tampon de lavage PE. La colonne est centrifugée 1 min à 13000 rpm et le liquide résiduel jeté. Finalement l'ADN est élué dans 30 μ L de tampon d'éluion EB par centrifugation de 1 min à 13000 rpm.

2.1.4 Déphosphorylation d'un vecteur

Dans le cas des clonages non-directionnels (voir tableau 2.4), il est nécessaire de déphosphoryler le vecteur linéarisé par la digestion afin d'éviter qu'il ne se referme sur lui-même. Le mélange suivant est préparé :

30 μ L d'ADN extrait
4 μ L de phosphatase alcaline (Roche)
4 μ L de tampon phosphatase alcaline 10X (Roche)
2 μ L d' H_2O MQ

Le mélange est incubé 1 heure à 37°C. L'ADN est extrait directement, sans passer sur gel d'agarose, sur colonne « QIAquick® spin » de QIAGEN (voir section 2.1.3).

2.1.5 Ligation d'ADN dans un vecteur

Les gènes et vecteur ont été adéquatement digérés. Il est maintenant nécessaire de les lier ensemble afin de reformer un nouveau vecteur d'expression contenant le gène désiré. Gène et vecteur sont liés ensemble par une réaction de ligation effectuée selon le protocole suivant :

1 μ L de vecteur préalablement digéré
1 μ L de T4 DNA ligase (Roche)
1 μ L de tampon de ligation 10X (Roche)
1 à 7 μ L d'ADN à insérer dans le vecteur (selon la concentration)
+ volume d' H_2O nécessaire pour compléter à 10 μ L

Les concentrations d'ADN vectoriel et d'insert dans la réaction doivent correspondre à un ratio molaire insert : vecteur de 1 : 1. Les concentrations sont estimées en les comparant l'une à l'autre, à l'œil nu, à la suite d'une migration des fragments d'ADN sur gel d'agarose 1 %. Le mélange réactionnel préparé ci-dessus est incubé dans l'appareil « PCR

system 2700 » (GeneAmp[®]), qui le soumet à une première incubation de 1 heure à 20°C, suivie de 30 cycles de 1 min à 16°C, 30 sec à 30°C.

2.1.6 Transformation de cellules compétentes DH5 α

Lorsque le vecteur d'expression est construit, ce dernier est transformé dans des cellules bactériennes compétentes *E. coli* DH5 α (GibcoBRL[®]) par choc thermique. Un volume de 3 μ L du produit de ligation, préalablement préparé, est incubé avec 50 μ L de cellules compétentes DH5 α , 30 min sur glace. Les cellules sont par la suite soumises à un choc thermique de 30 sec à 42°C, replacées sur glace de 1 à 2 min et resuspendues dans 950 μ L de milieu LB (10 g/L tryptone, 5g/L d'extrait de levure, 5 g/L NaCl). Le mélange est incubé 1 heure à 37°C avec agitation à 250 rpm. Après l'incubation, le mélange est centrifugé 1 min à 13000 rpm, et le culot est resuspendu dans 50 μ L de milieu LB avant d'être étalé sur un pétri de LB/agar contenant l'antibiotique approprié. Les pétris sont incubés 24 heures à 37°C. L'antibiotique approprié correspond au gène de résistance présent dans le vecteur d'expression utilisé. Il diffère selon le vecteur utilisé (tableau 2.5).

Tableau 2.5 : Gène de résistance selon le vecteur d'expression

Vecteur d'expression	Gène de résistance
pGBKT7	kan
pGADT7	amp
pCDNA3.1 His	amp
pCDNA6 V5	amp
pCMVzeo	zeo

2.1.7 Préparation d'ADN plasmidique à petite échelle

Afin de déterminer quelle colonie bactérienne contient le vecteur d'expression construit, il est nécessaire d'isoler l'ADN des colonies préalablement transformées. Une colonie de cellules compétentes DH5 α préalablement transformée et ayant poussé sur milieu solide est doncensemencée dans 5 mL de milieu LB contenant 5 μ L de l'antibiotique (1000X) approprié. La culture est incubée 24 heures à 37°C avec agitation à 250 rpm. Après croissance, 3 mL de culture est prélevé et centrifugé 1 min à 13000 rpm. Le surnageant est jeté et le culot de bactérie est resuspendu dans 200 μ L de tampon de resuspension P1 (50

mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/L RNase A) froid. Un volume de 200 µL de tampon de lyse P2 (200 mM NaOH, 1 % (p/v) SDS) est ajouté afin de lyser les cellules bactérienne et le mélange est inversé 5-10 fois avant d'être incubé 5 min à température pièce. Par la suite, 200 µL de tampon de neutralisation P3 (3 M acétate de potassium pH 5.5) froid est ajouté afin de neutraliser la lyse cellulaire. Le mélange est inversé 5-10 fois et incubé 5 min sur glace. Après cette incubation, le mélange est centrifugé 10 min à 13000 rpm, et le surnageant est transféré dans un nouvel eppendorf auquel est ajouté 650 µL d'isopropanol 100 % afin de précipiter l'ADN. Ce mélange est inversé et centrifugé 15 min à 13000 rpm dans une centrifugeuse réfrigérée (4°C). Le surnageant est jeté et le culot d'ADN est lavé avec 350 µL d'éthanol 70 % (v/v). Une dernière centrifugation de 10 min à 13000 rpm est effectuée, et le surnageant jeté. Le culot d'ADN est séché à l'air libre 5 min, avant d'être resuspendu dans 50 µL d'H₂O.

2.1.8 Vérification des transformants

Il est nécessaire de préparer l'ADN plasmidique de 5 à 10 transformants pour s'assurer que l'un d'eux contient le clone désiré. Après la préparation de l'ADN plasmidique, la présence de l'insert dans le vecteur est vérifiée par digestion ; à l'aide des mêmes enzymes ayant servies au clonage (tableau 2.4). La digestion est analysée par la suite à l'aide d'une électrophorèse sur gel d'agarose 1%. Dans le cas de clonages non-directionnels, il est aussi important de vérifier l'orientation de l'insert dans le vecteur, ce qui est réalisé à l'aide de digestions de deux sites de restriction, l'un se trouvant dans le vecteur, et l'autre dans l'insert. L'analyse de la longueur des fragments permet de vérifier si l'insert s'est lié dans la bonne orientation ou non.

Lorsque les vecteurs d'expression sont construits par amplification PCR, il est important de vérifier la séquence d'ADN par séquençage, afin de vérifier si la polymérase n'a pas commis d'erreurs. (voir sections 2.2.4.1 - 2)

2.2 Le système de double hybride en levure

Le système de double hybride en levure de la compagnie Clontech « MATCHMAKER GAL-4 TWO-HYBRID SYSTEM 3 » est utilisé afin de vérifier l'interaction directe de deux protéines, *in vivo* dans la levure. Le système permet aussi de cribler des banques d'ADN complémentaires de tissus humains, à la recherche de nouvelles protéines interagissant avec une protéine-appât connue.

Le système a été développé par Clontech, chez la souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* AH109. Cette souche de levure est auxotrophe pour les acides aminés tryptophane, leucine, adénine et histidine. Le système implique l'expression, à l'aide de vecteurs (figure 2.1), d'une protéine « X » clonée en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription Gal-4 (construction du vecteur pGBKT7 / X : protéine recombinante BD-X) ainsi que l'expression d'une protéine « Y » clonée en fusion avec le domaine d'activation du facteur de transcription Gal-4 (construction du vecteur pGADT7 / Y : protéine recombinante AD-Y). Dans le cas de criblage d'une banque d'ADNc de tissus humain, le gène codant une protéine-appât est cloné dans le vecteur pGBKT7, alors que les ADNc sont clonés dans le vecteur pACT2 (contient le domaine d'activation de Gal-4) et préalablement transformés dans la souche de levure *S. cerevisiae* Y187 (qui est auxotrophe pour le tryptophane et la leucine) par la compagnie Clontech. Les vecteurs pGBKT7 et pGADT7 (ou pACT2) expriment respectivement les gènes codant pour la synthèse du tryptophane (*TRP1*) et de la leucine (*LEU2*). Une transformation des vecteurs dans les souches de levure AH109 ou Y187 permet la synthèse des acides aminés manquant et donc croissance des levures sur milieu sélectif.

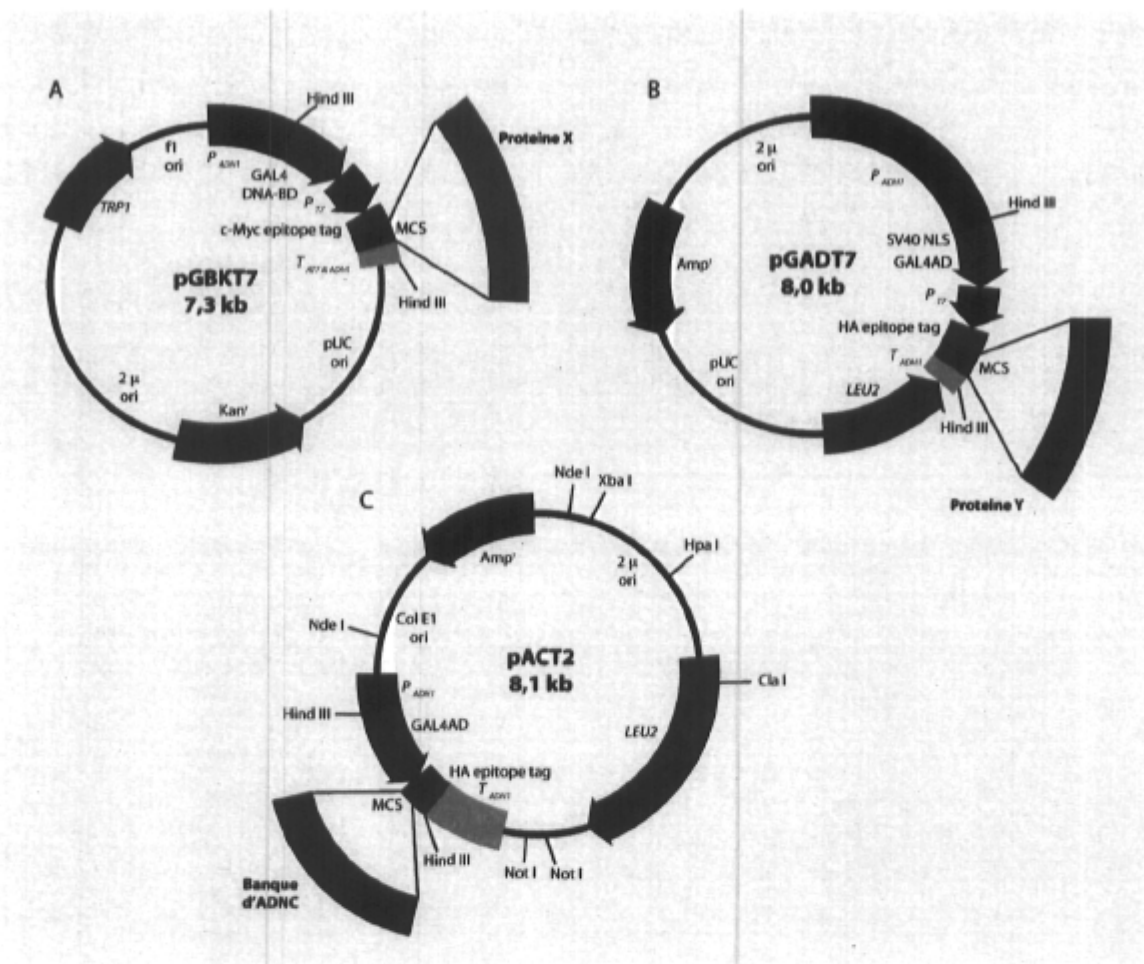


Figure 2.1 Schéma des vecteurs d'expression de levure. A) pGBKT7. B) pGADT7. C) pACT2. Les vecteurs sont commercialisés par la compagnie Clontech.

Lorsque les vecteurs pGBKT7/X et pGADT7/Y (ou pACT2/banque d'ADNc) sont co-transformés chez la levure, la présence d'une interaction directe entre les deux protéines recombinantes BD-X et AD-Y permet la reconstitution du facteur de transcription Gal4 (figure 2.2). Une fois le facteur de transcription reconstitué, il y a expression des gènes rapporteurs sous son contrôle, c'est-à-dire les gènes codant pour la synthèse de l'adénine (*ADE2*), l'histidine (*HIS3*) et la β -galactosidase (*LacZ*). L'expression des gènes *ADE2* et *HIS3* permet la croissance sur milieu sélectif pour ces acides aminés. L'expression du gène de la β -galactosidase est un outil supplémentaire pour vérifier l'interaction positive entre deux protéines. Elle n'a toutefois pas été utilisée dans le cadre de ce projet.

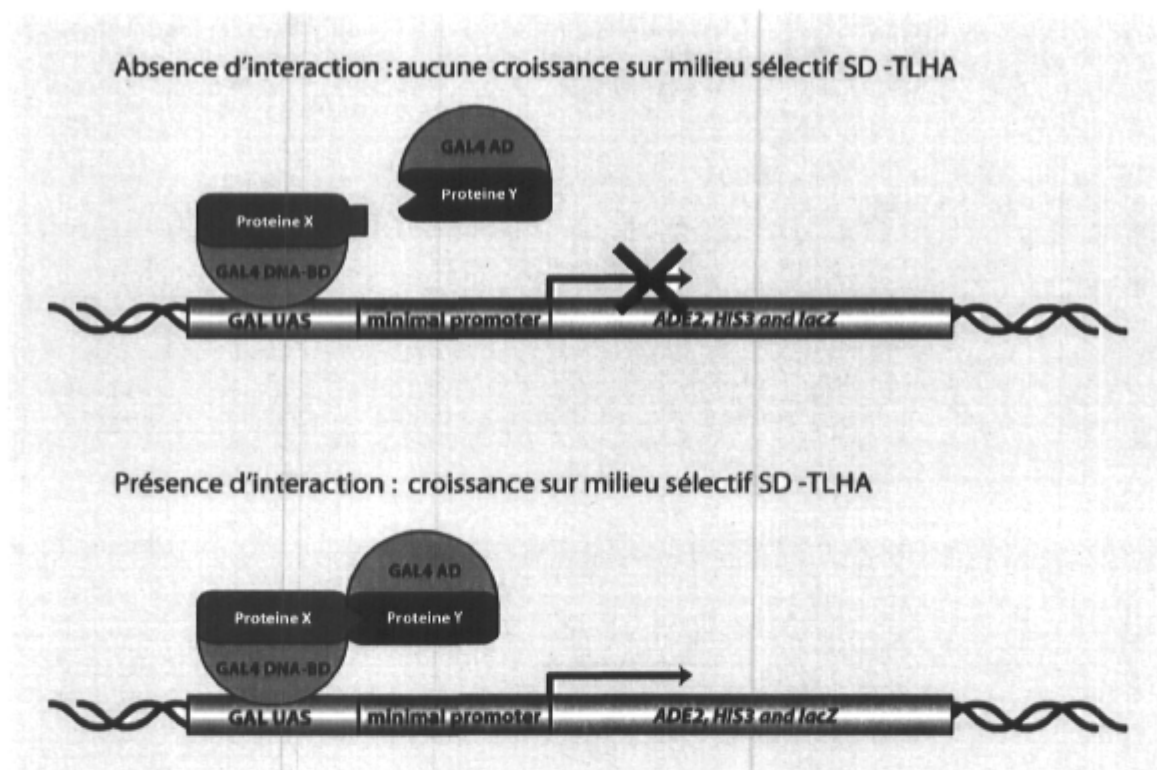


Figure 2.2 Reconstitution du facteur de transcription Gal-4 par l'intermédiaire de l'interaction directe des protéines recombinantes BD-X et AD-Y. La reconstitution de Gal-4 permet l'expression des gènes de sélection sous son contrôle et la croissance sur milieu sélectif (SD –TLHA). En absence d'interaction, le facteur de transcription Gal-4 ne peut être reconstitué.

2.2.1 Criblage de banque d'ADNc

Quatre criblages ont été réalisés dans le cadre de ce projet. Ils sont effectués par l'intermédiaire de la fusion de deux souches de levures haploïdes : AH109 (*MATa*) transformée avec le vecteur pGBKT7 exprimant la protéine-appât, et Y187 (*MAT α*) prétransformée par la compagnie Clontech avec une banque d'ADNc de cerveau humain (clonés dans le vecteur pACT2). Les protéines-appâts utilisées lors des criblages effectués sont les protéines recombinantes BD-NCT, BD-PEN-2 et BD-APP. L'expression de ces protéines dans la levure *S. cerevisiae* AH109 est vérifiée par extraction protéique de levure et immunobuvardage (section 2.2.2).

Le vecteur pGBKT7 fusionné à la protéine-appât appropriée, est préalablement transformé (voir section 2.3) dans la souche de levure AH109. Les levures sont incubées de 3 à 4 jours sur milieu solide sélectif SD -T (6,7 g/L « yeast nitrogen base » (Sigma[®]), 20 g/L D-glucose (Sigma[®]), 100 mL de la solution Drop-out appropriée (voir tableau 2.6)). Lorsque les colonies ont atteint 2-3 mm de diamètre, l'une d'entre elles est ensemencée dans 50 mL de milieu SD -T liquide. La culture « appât » est incubée 24 heures à 30°C avec agitation (250 rpm). Lorsque la culture atteint une densité optique de 0,8 à une longueur d'onde de 600 nm, elle est centrifugée 5 min à 3500 rpm (centrifugeuse Beckman Coulter Allegra 21R centrifuge - rotor F4180). Un volume de 45 mL de surnageant est jeté et les levures sont resuspendues dans 5 mL de liquide résiduel. Dans un erlenmeyer de 2 L, la culture « appât » (5 mL) est combinée avec la banque d'ADNc de cerveau humain, préalablement décongelée dans un bain-marie à température pièce. Un aliquot de 10 µL de la banque est conservé sur glace pour le titrage de la banque d'ADNc (section 2.2.1.1). Un volume de 50 mL de YPAD 2X liquide (1X : 20 g/L Peptone (Difco), 10 g/L extrait de levure (Difco), 10 g/L D-glucose (Sigma[®]), 50 mg/L Adénine « hemisulfate salt » (Sigma[®])), contenant de la kanamycine (50 µg/mL) est ajouté au mélange. Ce dernier est incubé 24 heures à 30°C, avec agitation lente (50 rpm). Après 20 heures d'incubation, la présence de levure diploïde est vérifiée au microscope. Si elles sont présentes, la culture est alors récupérée dans un tube de 50 mL sinon la culture est incubée 3-4 heures supplémentaires. Le tube de 50 mL contenant la culture est centrifugé 10 min à 3500 rpm. L'erlenmeyer est rincé 2 fois avec 50 mL de YPAD 2X/kan (50 µg/mL). Le culot de levure est resuspendu dans le milieu utilisé pour les lavages et la culture est centrifugée une fois de plus 10 min à 3500 rpm. Le surnageant est jeté et le culot resuspendu dans 10 mL de YPAD 0,5X/kan (50 µg/mL). Un aliquot de culture est conservé pour titrage et calcul de l'efficacité de fusion (section 2.2.1.1). La culture de levure diploïde est alors étalée sur milieu solide sélectif SD -TLHA (~ 200 µL/pétri ou ~ 2×10^4 à 2×10^5 cellules/pétris), et les pétris placés à 30°C de 15-20 jours.

Les colonies qui apparaissent sur les pétris du criblage sont repiquées sur milieu solide sélectif SD -TLHA frais et incubées à 30°C. S'il y a croissance les levures sont repiquées dans 5 mL de milieu SD -TLHA liquide et incubée 24 heures à 30°C avec agitation (250 rpm).

Tableau 2.6 : Compositions des solutions Drop-out pour levures.

Acides aminés	Quantité	Drop-out -TLHA	Drop-out -TL	Drop-out -T	Drop-out -L
Adénine	200 mg/L		X	X	X
Arginine	200 mg/L	X	X	X	X
Histidine	200 mg/L		X	X	X
Isoleucine	300 mg/L	X	X	X	X
Leucine	1 g/L			X	
Lysine	300 mg/L	X	X	X	X
Méthionine	200 mg/L	X	X	X	X
Phénylalanine	500 mg/L	X	X	X	X
Thréonine	2 g/L	X	X	X	X
Tryptophane	1 g/L				X
Tyrosine	300 mg/L	X	X	X	X
Valine	1,5 g/L	X	X	X	X

2.2.1.1 Titrages de la banque d'ADNc et calcul d'efficacité de fusion.

L'efficacité du criblage est vérifiée par le titrage de la banque d'ADNc et de la fusion des levures.

Titrage de la banque d'ADNc : L'aliquot de 10 µL de la banque d'ADNc précédemment conservé est resuspendu dans 990 µL de YPAD 1X (dilution 1/100) et les dilutions suivantes sont préparées : 1/1000, 1/10000, 1/100000, 1/1000000. Un volume de 100 µL de chaque dilution est étalé sur milieu solide sélectif SD -L, et les pétris sont incubés 2-3 jours à 30°C. Après croissance, les colonies sont comptées et le calcul suivant est réalisé :

$$\frac{\text{nombre de colonies}}{\text{volume de dilution étalé (mL)} \times \text{facteur de dilution}} = \text{cfu/mL}$$

Titrage de la fusion des levures: L'aliquot de 100 µL de la culture de la fusion est resuspendue dans 900 µL de YPAD 0,5X (dilution 1/10) et les dilutions suivantes sont préparées : 1/100, 1/1000, 1/10000. Un volume de 100 µL de chaque dilution est étalé sur 3 milieux solides sélectifs : SD -L, SD -T, SD -TL. Les pétris sont incubés 2-3 jours à 30°C. Après croissance, le nombre de colonies ayant poussés sur chaque milieu est compté et le calcul suivant effectué pour chaque type de milieu :

$$\frac{\text{nombre de colonies}}{\text{volume de dilution étalé (mL)} \times \text{facteur de dilution}} = \text{cfu viables/mL}$$

Les calculs des colonies de chaque milieu représentent la viabilité d'un des partenaires ou la viabilité des cellules diploïdes. Ainsi :

Le nombre de cfu/mL sur milieu SD-L = viabilité du partenaire Y187

Le nombre de cfu/mL sur milieu SD-T = viabilité du partenaire AH109

Le nombre de cfu/mL sur milieu SD-TL = viabilité des cellules diploïdes

La souche dont le partenaire est le moins viable, est considéré comme le partenaire limitant. Dans ce protocole, la souche Y187 / banque d'ADNc doit être le partenaire limitant, afin de s'assurer que le maximum de cellule de la banque trouve un partenaire de fusion.

L'efficacité de fusion (% de cellule diploïdes) est mesurée à l'aide du calcul suivant :

$$\frac{\text{nombre de cfu/mL de diploïdes}}{\text{nombre de cfu/mL de partenaire limitant}} \times 100 = \% \text{ cellule diploïdes}$$

2.2.1.2 Extraction d'ADN plasmidique de levure.

L'ADN plasmidique des colonies de levures sélectionnées sur les pétris de criblages et mises en culture dans le milieu SD -TLHA liquide, doit être extrait afin d'identifier le candidat « pêché » par la protéine-appât.

La culture est centrifugée 5 min à 3500 rpm, et le culot de levure est resuspendu dans 250 mL de tampon de resuspension P1 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/L RNase A) froid. Un volume de 100 µL de billes de verre est ajouté au mélange qui est ensuite vortexé vigoureusement 5 min afin de briser l'enveloppe cellulaire. Un volume de 250 µL de tampon de lyse P2 (200 mM NaOH, 1 % (p/v) SDS) est ajouté pour lyser la membrane cellulaire et le mélange est inversé 5-10 fois avant d'être incubé 5 min à température pièce. Par la suite 250 µL de tampon de neutralisation P3 (3 M acétate de potassium pH 5.5) froid est ajouté afin d'arrêter la lyse cellulaire et le mélange inversé 5-10 fois avant d'être incubé 5 min sur glace. Une centrifugation de 10 min à 13000 rpm, permet de récupérer le surnageant auquel est ajouté 650 µL d'isopropanol afin de précipiter l'ADN. Ce mélange est inversé et centrifugé 15 min à 13000 rpm dans une centrifugeuse réfrigérée (4°C). Le surnageant est jeté et le culot lavé avec 350 µL d'éthanol 70% (v/v) avant d'être

centrifugé 10 min à 13000 rpm. Le surnageant est jeté et le culot séché à l'air libre 5 min avant d'être resuspendu dans 100 μL d' H_2O .

2.2.1.3 Transformation de cellules compétentes DH10B

L'ADN plasmidique de levure extrait, doit ensuite être transformé par électroporation dans les cellules électrocompétentes *E. coli* DH10B (Invitrogen™). Cette étape est nécessaire car les levures ont la capacité d'intégrer plus d'un plasmide. La transformation d'ADN plasmidique de levure, dans des cellules bactériennes compétentes, permet d'assurer la présence d'un seul plasmide par transformant bactérien. Les cellules électrocompétentes, conservées à -80°C , sont lentement décongelées sur glace. Un volume de 15 μL de cellule est prélevé et ajouté à 3 μL d'ADN plasmidique de levure préalablement extrait. Le mélange est ensuite placé dans une cuvette d'électroporation de 1 mm (VWR) et la cuvette est placée dans l'électroporateur (Easyjct-Optima). Elle est alors soumise à un « pulse » établi selon les paramètres suivants :

Voltage : 1800 volts
Capacité : 15 μF
Résistance : 335 Ω

Les cellules compétentes sont resuspendues dans 950 μL de LB et incubées 1 heure à 37°C avec agitation de 250 rpm. Par la suite, la culture est centrifugée 1 min à 13000 rpm, resuspendue dans 80 μL de LB et étalée sur milieu solide LB contenant l'antibiotique approprié. Dans le cas présent ; l'ampicilline (75 mg/L) est utilisée pour la sélection des bactéries ayant intégré le plasmide de levure pACT2 (possède le gène de résistance à l'ampicilline). Les pétris sont incubés à 37°C , 24 heures.

2.2.1.4 Profil de digestion des candidats

Lorsque l'ADN plasmidique de la colonie de levure a été transformé dans les cellules compétentes, il est extrait selon le protocole de préparation d'ADN plasmidique (section 2.1.7). L'ADN de plusieurs transformants est extrait afin de vérifier la présence de plus d'un plasmide dans la colonie de levure. Les ADN plasmidiques sont digérés (section 2.1.2) à l'aide des enzymes de restrictions EcoR1 et Xho1, dans le tampon de restriction H. Ceci permet de vérifier le profil de l'ADNc, qui avait été cloné dans les sites EcoR1-Xho1

du site de clonage multiple (SCM) du vecteur pACT2, par la compagnie Clontech. Si tous les transformants bactériens d'une colonie de levure ont le même profil de digestion, un des ADN est sélectionné et utilisé pour confirmer les interactions avec la protéine-appât, par co-transformation dans la levure. Si plus d'un profil de digestion par colonie de levure est observé, tous les ADN ayant un profil différent sont sélectionnés.

Un glycérol stock des candidats retenus est préparé, dans un tube cryogénique, à partir de 500 μ L de culture bactérienne, mélangée à 500 μ L de LB/30% glycérol (v/v) et conservé à -80°C.

2.2.2 Extraction protéique de levure

Cette étape est réalisée afin de vérifier si les protéines recombinantes (BD-X) utilisées pour les criblages sont bien exprimées dans le modèle utilisé ; c'est-à-dire la souche de levure *S. cerevisiae* AH109. Une colonie de levure AH109, préalablement transformée avec la protéine-appât adéquate, estensemencée dans 15 mL de milieu SD -T liquide. La culture est incubée 15-20 heures à 30°C avec 250 rpm d'agitation. La croissance est poursuivie jusqu'à ce que la culture atteigne une densité optique située entre 0,5 et 2, à une longueur d'onde de 600 nm. Elle est ensuite centrifugée 5 min à 5500 rpm dans une centrifugeuse réfrigérée à 4°C. Le surnageant est jeté et le culot de levure est lavé 2 fois avec 1 mL d'H₂O. Entre les lavages les levures sont centrifugées 1 min à 13000 rpm (toujours à 4°C). Le culot est récupéré dans un eppendorf cryogénique, et il est plongé de 10 à 15 sec dans de l'azote liquide. Il est ensuite placé sur glace 5 min afin de le laisser décongeler tranquillement. Le culot de levure est resuspendu dans 300 μ L de tampon de « craquage » (8 M Urée, 5 % (p/v) SDS, 40 mM Tris-HCl pH 6.8, 0,1 mM EDTA, 0,4 mg/mL bleu de bromophénol, 1 % β -mercaptoéthanol, 5 mM PMSF, 1 pastille / mL d'inhibiteur de protéase « Complete Mini, EDTA-free » (Roche)). Le mélange est transféré dans un nouvel eppendorf auquel est ajouté 100 μ L de billes de verre (Sigma®). L'eppendorf est alors vortexé 5 fois 45 sec et placé 30 sec sur glace entre chaque vortex. Lorsque cette étape est terminée, le mélange est centrifugé 5 min à 7500 rpm à 4 °C et le surnageant contenant les protéines est récupéré. L'extrait peut alors être bouilli et chargé sur gel de polyacrylamide (voir section 2.3.7).

2.2.3 Transformation de levure

La transformation de la souche *S. cerevisiae* AH109 lui permet d'intégrer le ou les vecteurs d'expression de levure. Lors de criblage, une transformation simple permet à la souche de levure d'intégrer le vecteur pGBKT7 fusionné à la protéine-appât. Si l'interaction de deux protéines connues est testée, la co-transformation des vecteurs pGBKT7 / X et pGADT7 / Y est nécessaire. Les transformations simples effectuées préalablement aux criblages de ce projet, sont identifiées dans le tableau 2.7.

Tableau 2.7 : Transformation simple dans *S. cerevisiae* AH109 effectuées lors des criblages.

Vecteur pGBKT7	
Protéine-appât	Vide (contrôle négatif)
	NCT FL
	PEN-2 FL
	APP FL

Le protocole de transformation est le suivant : La souche de levure *S. cerevisiae* AH109 (Clontech), est préalablementensemencée sur milieu solide riche YPAD 1X et incubée à 30°C de 2 à 3 jours. Lorsque les colonies de levure ont atteint le diamètre de ~ 3 mm, 3-4 colonies sont prélevées et resuspendues dans 1 mL d'H₂O stérile. Le mélange est centrifugé 1 min à 13000 rpm, et le surnageant jeté. Les levures sont resuspendues une deuxième fois dans 1 mL d'H₂O stérile, centrifugées et le surnageant jeté. Pour le troisième lavage, les levures sont resuspendues dans 1 mL de LiAc 100 mM. Le mélange est centrifugé à 13000 rpm et le surnageant jeté. Les levures sont alors resuspendues dans 500 µL de LiAc 100 mM et le mélange incubé 30 min à 30°C, ce qui permet la perméabilisation de l'enveloppe cellulaire des levures. Après incubation, le mélange est centrifugé 1 min à 13000 rpm et le surnageant jeté. Le mélange suivant est alors ajouté au culot de levure :

- 70 µL d'H₂O stérile
- 240 µL de PEG 50 %
- 36 µL de LiAc 1 M
- 5 µL de solution d'ADN de sperme de Hareng 10 mg/mL (Invitrogen™)
- 2 µL du vecteur pGBKT7/X préalablement préparé
- 2 µL du vecteur pGADT7/Y préalablement préparé

Les levures sont resuspendues dans le mélange et incubées 1 heure à 30°C. Après cette incubation, le mélange est soumis à un choc thermique de 2 min à 42°C. Il est ensuite centrifugé 1 min à 13000 rpm et le surnageant jeté. Les levures sont resuspendues dans 1 mL de YPAD 1X liquide et incubées 1 heure à 30°C avec agitation. Cette étape augmente le degré d'efficacité de transformation en permettant aux levures de récupérer du choc thermique. À la suite de cette dernière incubation, les levures sont centrifugées 1 min à 13000 rpm et le surnageant jeté. Le culot est resuspendu dans 70 µL d'H₂O stérile et étalé sur milieu sélectif. Dans le cas d'une co-transformation des deux vecteurs pGBKT7 / X et pGADT7 / Y, le milieu sélectif utilisé ne contient pas les acides aminés tryptophane et leucine (SD -TL). S'il s'agit d'une transformation simple du vecteur pGBKT7 / X, le milieu sélectif ne contient pas de tryptophane seulement (SD -T). Les levures sont incubées de 3 à 4 jours à 30°C.

Après croissance des levures co-transformées sur milieu sélectif SD -TL, ces dernières sont repiquées sur milieu sélectif SD -TLHA et incubées de 3 à 4 jours à 30°C, afin de vérifier l'interaction positive ou négative des deux protéines recombinantes BD-X et AD-Y.

2.2.3.1 Analyse des candidats sélectionnés lors des criblages.

L'interaction de la protéine-appât avec la protéine inconnue codée par l'ADNc des candidats sélectionnés, doit être vérifiée par le système de double hybride en levure. Ceci est nécessaire afin de s'assurer que le candidat retenu n'est pas un faux-positif ou auto-activateur. Cette étape est effectuée par la co-transformation des vecteurs « pACT2 / candidat » et « pGBKT7 / protéine-appât » ou « pGBKT7 / vide » (voir tableau 2.8). La croissance sur milieu sélectif SD -TLHA du candidat retenu, co-transformé avec le vecteur vide indique que le candidat retenu est un faux-positif. Il est donc mis à l'écart.

Tableau 2.8 : Co-transformations pour analyse des candidats sélectionnés

	Vecteur pGBKT7	Vecteur pGADT7 ou pACT2
gène fusionné	<i>Co-transformations contrôles</i>	
	vide	vide
	p53	antigen T
	<i>Co-transformations des candidats des criblages NCT</i>	
	NCT	vide
	NCT	candidats NCT(1 ^a) #1 à 21
	vide	candidats NCT(1) #1 à 21
	NCT	candidats NCT(2) #1 à 4
	vide	candidats NCT(2) #1 à 4
	<i>Co-transformations des candidats du criblage Pen-2</i>	
	Pen-2	vide
	Pen-2	candidats Pen-2 #1 à 39
	vide	candidats Pen-2 #1 à 39
	<i>Co-transformations des candidates du criblage APP</i>	
	APP	vide
	APP	candidats APP #1 à 9
	vide	candidats APP #1 à 9

^a Le chiffre suivant NCT indique s'il s'agit du premier ou deuxième criblage réalisé avec NCT.

2.2.4 Vérification des séquences des candidats retenus

Lorsque l'interaction positive des candidats avec leur protéine-appât a été confirmée par double hybride en levure et qu'ils ne se sont pas révélés être des auto-activateurs, leur ADN est séquencé (Plateforme de séquençage et de génotypage des génomes du CRCHUL). Les séquences des candidats sont par la suite utilisées pour cribler les banques de données « nr » (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) à la recherche de séquences nucléotidique et protéique homologues. La recherche d'homologie s'effectue en copiant dans l'outil de recherche d'alignement de séquence « BLAST » la séquence nucléotidique ou peptidique du candidat d'intérêt et en la comparant le degré d'homologie avec les séquences nucléotidique ou peptidique de la banque de donnée. Il est important de vérifier les trois cadre de lecture des séquences. Il arrive que la polymérase de la levure *S. cerevisiae* réalise une erreur dans la lecture du cadre de lecture et traduise une protéine selon un cadre de lecture différent de celui donné par l'ADNc cloné dans le vecteur pACT2. De plus, les différents ADNc de la banque ne sont pas tous de pleine longueur et il se peut qu'ils ne soient pas en phase avec cadre de lecture de Gal-4.

2.2.4.1 Préparation de l'ADN à séquencer

L'ADN des candidats à séquencer est préparé à l'aide de la trousse commerciale « QIAprep spin mini-prep kit » de la compagnie QIAGEN. Une culture bactérienne est fraîchement ensemencée dans 5 mL de LB + 5 µl d'ampicilline (100 µg/µL) 24 heures à 37°C avec agitation de 250 rpm à partir de l'échantillon du candidat conservé à -80°C dans 30% de glycérol. Après croissance, 3 mL de culture est prélevé et centrifugé 1 min à 13000 rpm. Le surnageant est jeté et le culot de bactérie est resuspendu dans 250 µL de tampon de resuspension P1 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/L RNase A) froid. Un volume de 250 µL de tampon de lyse P2 (200 mM NaOH, 1 % (p/v) SDS) est ajouté afin de lyser les cellules et le mélange est inversé 5-10 fois avant d'être incubé 5 min à température pièce. Par la suite, 350 µL de tampon de neutralisation N3 (3.1 M acétate de potassium pH 5.0), est ajouté afin de neutraliser la lyse cellulaire. Le mélange est inversé 5-10 fois et centrifugé 10 min à 13000 rpm. Le surnageant est transféré dans une colonne « QIAprep spin » qui est ensuite centrifugée 1 min à 13000 rpm. Le liquide résiduel est jeté et 750 µL de tampon de lavage PE est ajouté. Une centrifugation de 1 min à 13000 rpm permet de laver la colonne. Le liquide résiduel est jeté et la colonne immédiatement recentrifugée 1 min à 13000 rpm pour se débarrasser du liquide restant. Finalement, un volume de 30 µL de tampon d'éluion EB est appliqué sur la colonne et l'éluat est récupéré dans un nouvel eppendorf par centrifugation de 1 min à 13000 rpm. La concentration de l'ADN est ensuite mesurée (voir section 2.3.2) à partir de la lecture de sa densité optique à une longueur d'onde de 260 nm. Une dilution de l'ADN est préparée afin d'obtenir une concentration finale de 50 ng/µL.

2.2.4.2 Préparation des amorces utilisées pour le séquençage

Le choix de l'amorce dépend du vecteur. Elles sont diluées à une concentration de 1,6 µM.

Tableau 2.9 : Amorce utilisée pour le séquençage selon le vecteur

Vecteur	amorce «forward»	amorce «reverse»
pGBKT7	T7	p39
pGADT7	T7	p84
pACT2	p97	p84
pCMVzeo	p159	
pCDNA3.1-His	T7	
pCDNA6-V5	T7	

2.2.5 Vérification de l'interaction des gènes identifiés avec les sous-unités du complexe γ -sécrétase, APP et BACE-1.

Le système de double hybride en levure permet l'analyse de l'interaction entre les gènes candidats identifiés par homologie de séquence avec les autres composantes du complexe γ -sécrétase, APP ou encore avec BACE-1. Les co-transformations suivantes sont réalisées dans la souche de levure *S. cerevisiae* AH109 (voir section 2.2.3).

Tableau 2.10 : Co-transformations en double hybride en levure des candidats identifiés et des membres du complexe γ -sécrétase, APP ou BACE-1.

	Vecteur pGBKT7	Vecteur pGADT7 ou pACT2	Vecteur pGBKT7	Vecteur pACT2
	<i>co-transformations contrôles.</i>		<i>co-transformation des gènes pêchés avec APP avec le complexe.</i>	
	vide	vide	vide	
	p53	antigen T	lamin	
	<i>co-transformation des gènes pêchés avec Pen-2 avec le complexe, BACE et APP.</i>		APP	
gène fusionné	vide		PS1 FL	
	lamin	Ferritin L	PS1 C-ter	SNW1
	PEN-2		PS1 N-ter	
	vide		PS1 loop	
	lamin		APH-1	
	PEN-2		NCT	
	PS1 N-ter	ISLR C-ter	PEN-2	
	APH-1		vide	
	NCT		lamin	
	BACE-1		APP	
	APP		PS1 FL	
	vide		PS1 C-ter	WBP5
	lamin		PS1 N-ter	
	PEN-2		PS1 loop	
	PS1 N-ter	candidats inconnus	APH-1	
	APH-1	# 9, 12, 19, 23	NCT	
	NCT		PEN-2	
BACE-1				
APP				

2.3 Technique de co-immunoprécipitation

La technique de co-immunoprécipitation est utilisée pour confirmer *in vitro* l'interaction entre deux protéines d'intérêt, dans une lignée cellulaire humaine, ce qui se rapproche du contexte physiologique.

Les protéines d'intérêt (X et Y), qui sont surexprimées transitoirement suite à la transfection des vecteur d'expression dans les lignées cellulaires, ont préalablement été fusionnées à une étiquette dans un vecteur d'expression de cellule (section 2.1). Cette étiquette est un épitope reconnu par un anticorps monoclonal :

Tableau 2.11 : Description des étiquette des vecteurs d'expression de cellule ainsi que l'anticorps monoclonal les reconnaissant.

Vecteur	Étiquette	Séquence de l'étiquette (a.a)	Anticorps monoclonal
pCDNA3.1-His	Xpress	DLYDDDDK	IgG de souris anti-Xpress (Invitrogen™)
pCDNA6-V5	V5	GKPIPPELLGLDST	IgG de souris anti-V5 (Invitrogen™)
pcMVzeo-HA	HA	YPYDVPDYA	IgG de souris anti-HA (Roche)

Le principe de la co-immunoprécipitation (illustré à la figure 2.3) est qu'un anticorps reconnaît l'étiquette fusionnée ou l'épitope d'une protéine d'intérêt (par exemple Y), qui interagit avec la protéine X. Cet anticorps est à son tour reconnu par une protéine G couplée à une bille d'agarose. Le complexe formé des protéines « X, Y, anticorps et protéine G-bille d'agarose », peut être centrifugé alors que les autres protéines qui n'interagissent pas avec la protéine Y sont lavées. L'interaction des protéines d'intérêts X et Y peut par la suite être visualisée par immunobuvardage.

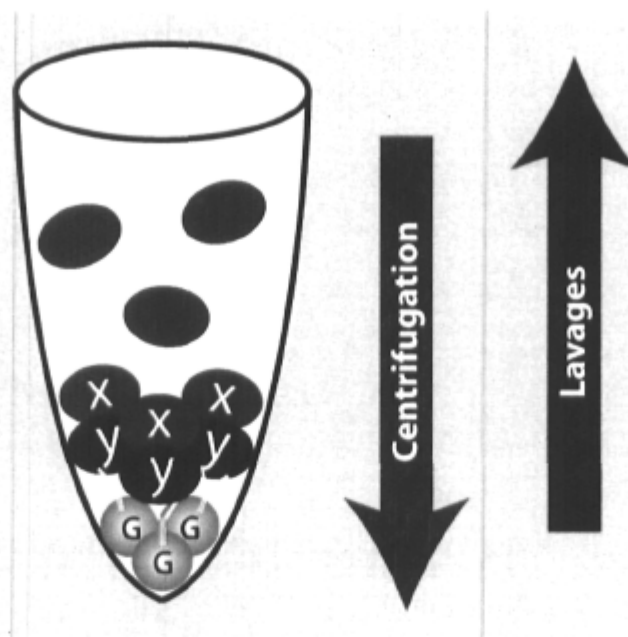


Figure 2.3 Schéma de la technique de co-immunoprécipitation.

2.3.1 Préparation d'ADN plasmidique

Il est tout d'abord nécessaire de préparer l'ADN qui sera transfecté dans les cellules. Une culture de 100 mL de milieu LB, contenant l'antibiotique approprié, estensemencée l'aide de la culture bactérienne contenant le vecteur adéquat, et conservée au laboratoire sous forme de stock glycérol. La culture est incubée 24 heures à 37°C, avec agitation de 250 rpm.

L'ADN plasmidique, utilisé pour la transfection de cellules TsA201 ou SH-SY5Y, est préparé à l'aide de la méthode « PureLink™ HiPure Plasmid Filter Purification » de la compagnie Invitrogen™. La culture préalablementensemencée est centrifugée 10 min à 5500 rpm. Le culot de cellule bactérienne est resuspendu dans 10 mL de tampon de resuspension R3 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 20 mg/mL RNase A) froid. Un volume de 10 mL de tampon de lyse L7 (200 mM NaOH, 1 % (p/v) SDS) est ajouté et le mélange est inversé jusqu'à ce qu'il devienne homogène. Le mélange est additionné de 10 mL de tampon de précipitation N3 (3,1 M acétate de potassium pH 5.0) et mélangé par inversion 5-10 fois. Il est alors versé dans la colonne « HiPure Filter » préalablement

équilibrée avec 15 mL de tampon d'équilibration EQ1 (600 mM NaCl, 100 mM acétate de sodium pH 5.0, 0,15 % (v/v) Triton X-100). Lorsque tout le liquide est écoulé, la colonne est lavée avec 20 mL de tampon de lavage W8 (800 mM NaCl, 100 mM acétate de sodium pH 5.0). L'ADN est ensuite élué dans un tube de 13 mL avec 5 mL de tampon d'élué E4 (1,25 M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.5) et précipité par l'ajout de 3,5 mL d'isopropanol 100 %. L'ADN précipité est par la suite centrifugé 30 min à 11000 rpm, dans une centrifugeuse réfrigérée (4°C). Le surnageant est jeté et le culot d'ADN est lavé dans 1,5 mL d'éthanol 70 %. L'ADN est centrifugé 10 min à 13000 rpm, et le surnageant jeté. Le culot d'ADN est alors séché à l'air libre 5 min et finalement resuspendu dans 150 µL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8.5, 0,1 mM EDTA).

2.3.2 Mesure de la concentration de l'ADN plasmidique

La concentration de l'ADN plasmidique préparé à la section précédente est vérifiée afin d'ajuster le volume d'ADN qui sera transfecté. Le calcul s'effectue par la mesure de la densité optique de l'ADN à la longueur d'onde de 260 nm (A260). Il est nécessaire de calibrer le spectrophotomètre GeneQuant *pro* (Biochrom) en utilisant de l'H₂O comme point de référence, avant d'effectuer la lecture. Lorsque l'appareil est calibré, un volume de 2 µL d'ADN est dilué dans 98 µL d'H₂O et placé dans la cuvette de quartz. La lecture de la densité optique de l'échantillon à 260 nm permet de connaître la concentration de l'ADN, selon la formule suivante :

$$\text{Concentration d'ADN (mg/mL)} = 50 \text{ mg/mL} * x \text{ A260} \times \text{facteur de dilution de l'ADN.}$$

*La concentration d'un échantillon d'ADN double brin pur, avec une densité optique de 1 à la longueur d'onde de 260 nm (A260), égale 50 mg/mL.

2.3.3 Culture cellulaire

Les lignées cellulaires humaines TsA201 (dérivées de la lignée de cellule de rein embryonnaire humain, HEK293, et transfectées de façon stable avec l'antigène T de SV40) et SH-SY5Y (cellules de neuroblastome humain) sont utilisées pour la surexpression de protéines à l'aide de vecteurs d'expression de cellule dans un modèle se rapprochant du contexte physiologique.

Les cellules TsA201 sont cultivées dans du milieu de culture HyQ[®]DMEM/high-glucose (Hyclone) supplémenté de 10 % de FBS (Hyclone) inactivé 30 min à 50°C. Cette étape permet d'inactiver les protéines du complément présentes dans le sérum bovin. Les cellules de neuroblastome SH-SY5Y sont quant à elles cultivées dans du milieu HyQ[®]DME/F-12 Ham's (1:1) (Hyclone). Les deux lignées cellulaires sont incubées à une température de 37°C et une concentration de CO₂ de 5%, jusqu'à ce qu'elles atteignent ~95 % de confluence. Les cellules sont alors lavées avec 2ml de HyQ[®]PBS (Hyclone) et incubées dans 1 mL de HyQ[®]trypsine 0,05 % (Hyclone) afin de les faire décoller de la surface du pétri. Une fois décollées, les cellules sont resuspendues dans 9 mL du milieu approprié, et comptées à l'aide d'un compteur de cellule (Coulter Z1). Un volume de milieu contenant 2x10⁶ cellules est alors resuspendu dans 10 mL total de milieu de culture et les cellules sont incubées à 37°C. Après 24 heures d'incubation, les cellules sont prêtes à être transfectées.

2.3.4 Transfection au CaCl₂

La transfection au CaCl₂ permet d'intégrer le vecteur désiré dans les lignées cellulaires TsA201 ou SH-SY5Y. Ces dernières exprimeront donc de façon transitoire les protéines fusionnées aux vecteurs d'expression de cellule préalablement construits (section 2.1). Les co-transfections suivantes sont effectuées dans le dessein de vérifier l'interaction entre les protéines surexprimées, par co-immunoprécipitation.

Vecteurs co-transfectés	
pcDNA3.1 His / PEN-2 FL	pCMVzeo HA / Ferritin L FL
pcDNA6 V5 / APP FL	pcDNA3.1 His / SNW1
pcDNA6 V5 / APP FL	pcDNA3.1 His / WBP5
pcDNA3 / Notch ΔE+C	pcDNA3.1 His / WBP5
pcDNA3 5'Myc / PS1 FL	pcDNA3.1 His / ISLR FL

L'ADN à transfecter (10 µg de chaque vecteur) est d'abord mélangé à 250 µL de CaCl₂ 0,5 M; 40 µL de Tris-HCl-EDTA pH 8,0, et au volume d'H₂O stérile nécessaire pour compléter à 500 µL. Ce premier mélange est ensuite déposé doucement goutte-à-goutte sur 500 µL de HEBS 2X. Le tout est mélangé par inversion 10-15 fois et incubé 30 min à température pièce. Lorsque le temps d'incubation est écoulé, le mélange de transfection est déposé goutte-à-goutte sur les cellules (TsA201 ou SH-SY5Y) préparées la veille, et le pétri de culture est incubé de 5 à 8 heures à 37°C. Après ce temps d'incubation, il est

nécessaire de laver les cellules au PBS (2 mL) et de changer le milieu de culture pour du milieu frais afin d'éviter que le CaCl_2 ne devienne trop toxique pour les cellules. Les pétris de culture sont de nouveau incubés à 37°C pour une période de 48 heures.

2.3.5 Extraction protéiques

Les protéines des cellules précédemment transfectées sont extraites avant de procéder aux étapes de la co-immunoprécipitation. Les pétris de cultures sont tout d'abord placés sur glace et le milieu de culture est jeté. Les cellules sont lavées avec 2 mL de PBS froid. Elles sont par la suite mises en contact avec 1 mL de tampon de lyse appelé « STEN 150 mM » et composé de : Tris-HCl 50 mM pH 7,6, NaCl 150 mM, EDTA 2mM, Nonidet-P 40 0,2 %, Triton X-100 0,5 % et d'une pastille d'inhibiteur de protéase « Complete Mini, EDTA-free » (Roche). Les cellules sont par la suite récoltées à l'aide d'un « cell lifter ». La lyse cellulaire est améliorée en soumettant l'agrégat des cellules récoltées à l'action d'un « dounce », et l'extrait est incubé 30 min sur glace. L'extrait protéique est ensuite centrifugé (15 min, 13000 rpm) à 4°C, afin de se débarrasser des débris cellulaires.

2.3.6 Immunoprécipitation

Dans le dessein de vérifier l'interaction protéine-protéine par co-immunoprécipitation, il est tout d'abord nécessaire d'immunoprécipiter une des deux protéines d'intérêt précédemment co-transfectées. L'extrait protéique est divisé en trois volumes égaux dans des eppendorfs et un aliquot de 50 μL (extrait total) est conservé à -20°C. Les anticorps suivants sont ajoutés aux 2 premiers tubes :

Tableau 2.12 : Anticorps utilisés pour chaque immunoprécipitation

Co-transfection	tube #1	tube #2
pcDNA3.1-His / PEN-2 et pCMVzeo-HA / Ferritin L anti-HA (2,0 ug)		anti-Xpress (2,25 ug)
pcDNA6-V5 / APP et pcDNA3.1-His / SNW1	anti-V5 (1,2 ug)	anti-Xpress (2,25 ug)
pcDNA6-V5 / APP et pcDNA3.1-His / WBP5	anti-V5 (1,2 ug)	anti-Xpress (2,25 ug)
pcDNA3 / Notch Δ E+C et pcDNA3.1-His / WBP5	anti-notch (2,0 ug)	anti-Xpress (2,25 ug)
pcDNA3-5'Myc / PS1 et pcDNA3.1-His / ISLR	anti-Myc (2,0 ug)	anti-Xpress (2,25 ug)

Le troisième tube sert quant à lui de contrôle négatif, et ne contient pas d'anticorps. Les extraits protéiques sont incubés 15-20 heures à 4°C avec agitation lente de 6 rpm sur l'Intelli-mixer (ELMI). Cette première incubation permet à l'anticorps de se lier à l'étiquette qu'il reconnaît. Un volume de 30 µL de billes d'agarose-protéine G est ensuite ajouté aux trois tubes. Une deuxième incubation de 2 heures (toujours à 4°C sur l'intelli-mixer) permet aux protéines G de se coupler aux anticorps. Une fois l'incubation terminée, les extraits protéiques sont centrifugés 2 min à 6000 rpm dans une centrifugeuse réfrigérée à 4°C. Le surnageant est jeté et 500 µL de tampon de lavage STEN (150 ou 350 mM) est ajouté.

STEN 150 mM : Tris-HCl 50 mM pH 7,6, NaCl 150 mM, EDTA 2mM, Nonidet-P 40 0,2 %, Triton X-100 0,5 % et d'une pastille d'inhibiteur de protéase « Complete Mini, EDTA-free » (Roche).

STEN 350 mM : Tris-HCl 50 mM pH 7,6, NaCl 350 mM, EDTA 2mM, Nonidet-P 40 0,2 %, Triton X-100 0,5 % et d'une pastille d'inhibiteur de protéase « Complete Mini, EDTA-free » (Roche).

La molarité du NaCl dans le tampon dépend de la stringence désirée pour les lavages. Lorsque le tampon frais est ajouté, les tubes sont agités par inversion sur l'intelli-mixer 5 min à 6 rpm. Cette étape est réalisée 3 fois. Après la dernière centrifugation, le surnageant est retiré sauf 10 µL et un volume de 30 µL de tampon de dénaturation 2X (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 20 % (v/v) glycérol, 0,1 % (v/v) SDS, 0,1 % bleu de bromophénol et 5 % β-mercaptoéthanol) est ajouté.

2.3.7 Gel SDS-PAGE et Immunobuvardage

La migration des extraits protéiques sur gel SDS-PAGE et l'immunobuvardage permet de visualiser la présence ou l'absence des protéines (présence ou absence d'interaction) dans les co-immunoprécipitations précédemment réalisées. Les extraits protéiques conservés dans le tampon de dénaturation sont chauffés à 100°C de 3 à 5 min (il y a exception si le poids moléculaire des protéines immunoprécipitées se rapproche trop du poids moléculaire des chaînes lourdes des immunoglobulines, i.e : ~ 50 kDa, parce que le signal de la chaîne lourde des immunoglobuline cache celui de la protéine à détecter). Un volume de 20 µL d'extrait est ensuite chargé sur gel de polyacrylamide concentré entre 6 et 12 %. Les

extraits sont migrés dans un tampon de migration (2,9 g/L Tris, 14,4 g/L glycine, 1 g/L SDS) dans un appareil à électrophorèse à 125 V pour environ 1h30. Un marqueur de poids moléculaire (BenchMark Prestained Protein Ladder, Invitrogen™) est migré sur le même gel pour servir de repère du poids moléculaire des protéines.

Lorsque la migration des protéines est terminée, celles-ci sont transférées sur une membrane de PVDF (membrane Immobilon™ de Millipore). La membrane de PVDF est préalablement humidifiée 30 sec dans du méthanol, et conservée dans du tampon de transfert (12 mM Tris, 96 mM glycine, 20 % méthanol). Le « sandwich » de transfert est ensuite préparé en plaçant sur le côté noir du de la cassette de transfert (BioRad) : une éponge, un premier papier filtre, le gel de polyacrylamide, la membrane de PVDF, un deuxième papier filtre, et enfin une dernière éponge. Le « sandwich » est ensuite placé dans une boîte de transfert avec du tampon de transfert et un bloc de glace. Le transfert s'effectue à 400 mA pendant 1 heure, à 4°C. Lorsqu'il est terminé, la membrane est placée dans une solution de TBS-tween (6,05 g/L Tris, pH 7.5, 8,76 g/L NaCl, 0,1 % Tween 20), contenant 5 % (p/v) de lait en poudre. Cette étape de blocage a une durée de 1 heure. Par la suite, le premier anticorps (qui reconnaît l'étiquette de la protéine d'intérêt) est dilué, selon les recommandations de la compagnie, dans 10 mL de TBS-tween-5% lait, et la membrane est incubée dans ce mélange 1 heure. Elle est ensuite soumise à 4 lavages de 5min dans du TBS-tween. Le deuxième anticorps couplé à la peroxydase (reconnaît la partie Fc du premier anticorps), est dilué selon les recommandations de la compagnie, dans 10 mL de TBS-tween-5% lait, et la membrane de PVDF est incubée 1 heure dans ce mélange. Après cette incubation, l'étape des lavages est répétée. Enfin, la présence des protéines sur la membrane est révélée à l'aide des réactifs d'électrochimiluminescence ECL de Millipore, qui réagissent à la présence de la peroxydase couplée à l'anticorps secondaire. Un mélange 1 : 1 des solutions A : B est déposé sur la membrane et incubé 5 min. La membrane est ensuite séchée, placée dans une cassette d'exposition et exposée à un film photosensible, le temps nécessaire pour visualiser les protéines et ce dernier est développé. Le temps d'exposition du film peut varier de 30 sec à 5 min.

Chapitre 3 Résultats

3.1 Criblages avec Nicastrine

Dans le dessein d'identifier un nouveau partenaire protéique du complexe γ -sécrétase, s'y liant par l'intermédiaire de la sous-unité Nicastrine, deux criblages de banque d'ADNc de cerveau humain ont été réalisés par la méthode du double hybride en levure, à l'aide de la protéine-appât NCT. La protéine recombinante BD-NCT est théoriquement exprimée par le vecteur d'expression de levure « pGBKT7 / NCT » préalablement construit par amplification PCR. Le vecteur est donc transformé dans la souche de levure *S. cerevisiae* AH109 et l'expression de la protéine recombinante dans le modèle est vérifiée par extraction protéique de levure et immunobuvardage (fig.3.1). NCT est reconnue à l'aide d'un anticorps « anti-c-Myc ». L'étiquette « c-Myc » est exprimée en fusion avec BD-NCT. L'immunobuvardage effectué sur les extraits protéiques de levures permet de visualiser l'expression de BD-NCT dans les levures transformées avec la protéine recombinante.

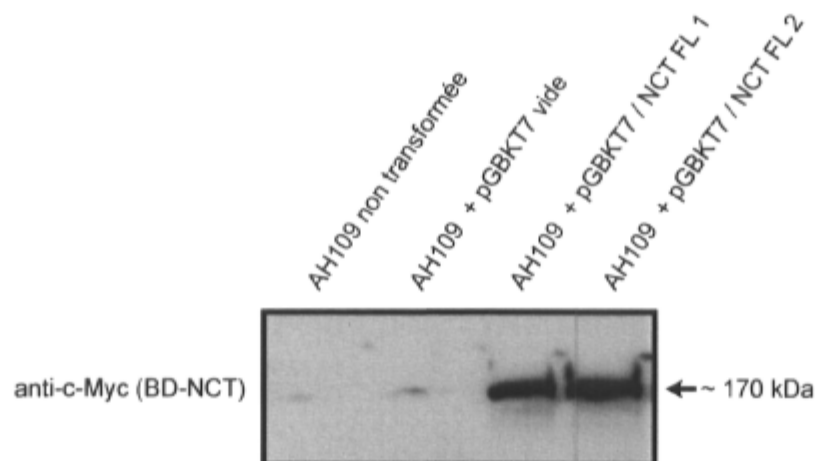


Figure 3.1 Immunobuvardage « anti-c-Myc » montrant la présence de BD-NCT après transformation de *S. cerevisiae* AH109. NCT (~ 150 kDa) est fusionnée au domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription Gal-4 (~ 20 kDa) ce qui lui confère un poids moléculaire de ~ 170 kDa. NCT FL 1 : premier criblage, NCT FL 2 deuxième criblage. La protéine est absente des contrôles négatifs « AH109 non-transformée » et « AH109 transformée avec pGBKT7 / vide ». L'immunobuvardage a été réalisé à l'aide de l'anticorps α -c-Myc sc40 (Santa Cruz Biotechnology) dilué selon un facteur 1 : 500. L'anticorps secondaire α -souris (Santa Cruz Biotechnology) est dilué selon un facteur 1 : 20000.

3.1.1 Titrages et efficacités de fusions

Lorsque l'expression de la protéine recombinante BD-NCT est confirmée, les criblages sont débutés. Le premier criblage a été réalisé sur une banque prétransformée d'ADNc de cerveau adulte humain, alors que le deuxième a été effectué sur une banque prétransformée d'ADNc de cerveau foetal humain. Il est important d'effectuer le titrage des banques d'ADNc, afin de connaître leur nombre de cfu/mL. De plus, le titrage de chacun des partenaires avant fusion et des cellules diploïdes après fusion permet de mesurer le pourcentage de cellules ayant fusionné. Ce résultat doit être supérieur à 2 % pour que la fusion soit considérée efficace.

Tableau 3.1 : Titrages et efficacités de fusions des criblages effectués avec NCT.

1er criblage			
Titrage librairie	9,5 x 10 ⁷ cfu/mL		
	viabilité du partenaire limitant (librairie) (cfu/mL)	9,0 x 10 ⁶	
Efficacité de fusion (%)	viabilité du partenaire AH109 (protéine-appât) (cfu/mL)	1,5 x 10 ⁸	3,3 %
	viabilité des cellules diploïdes (fusion) (cfu/mL)	3,0 x 10 ⁵	
2e criblage			
Titrage librairie	3,5 x 10 ⁷ cfu/mL		
	viabilité du partenaire limitant (librairie) (cfu/mL)	5,1 x 10 ⁶	
Efficacité de fusion (%)	viabilité du partenaire AH109 (protéine-appât) (cfu/mL)	8,0 x 10 ⁸	20,8 %
	viabilité des cellules diploïdes (fusion) (cfu/mL)	5,1 x 10 ⁵	

Les titrages des deux librairies permettent d'évaluer que le nombre de cfu/mL ($> 10^7$) des banques d'ADNc de cerveau, respecte les normes établies par la compagnie Clontech. Les efficacités de fusions calculées ($> 2\%$), confirment que la fusion des levures permet le criblage d'un nombre de clone suffisant.

3.1.2 Premier criblage

Les pétris sélectifs SD –TLHA du 1^{er} criblage avec NCT ont montré la croissance de 12 colonies de levures. Ces colonies (A à L) ont été repiquées sur milieu solide SD –TLHA pour confirmer qu’il ne s’agit pas d’artéfact. Par la suite leur ADN plasmidique a été extrait selon la méthode d’extraction d’ADN plasmidique de levure. L’ADN plasmidique a été transformé dans les bactéries électrocompétentes *E. coli* DH10B. Celles-ci ont été étalées sur pétris sélectif (LB/Amp) afin de sélectionner les transformants porteurs du vecteur pACT2. L’ADN plasmidique de 5-6 transformant est extrait et digéré EcoRI-XhoI, et le profil de digestion est analysé par électrophorèse sur gel d’agarose (fig.3.2).

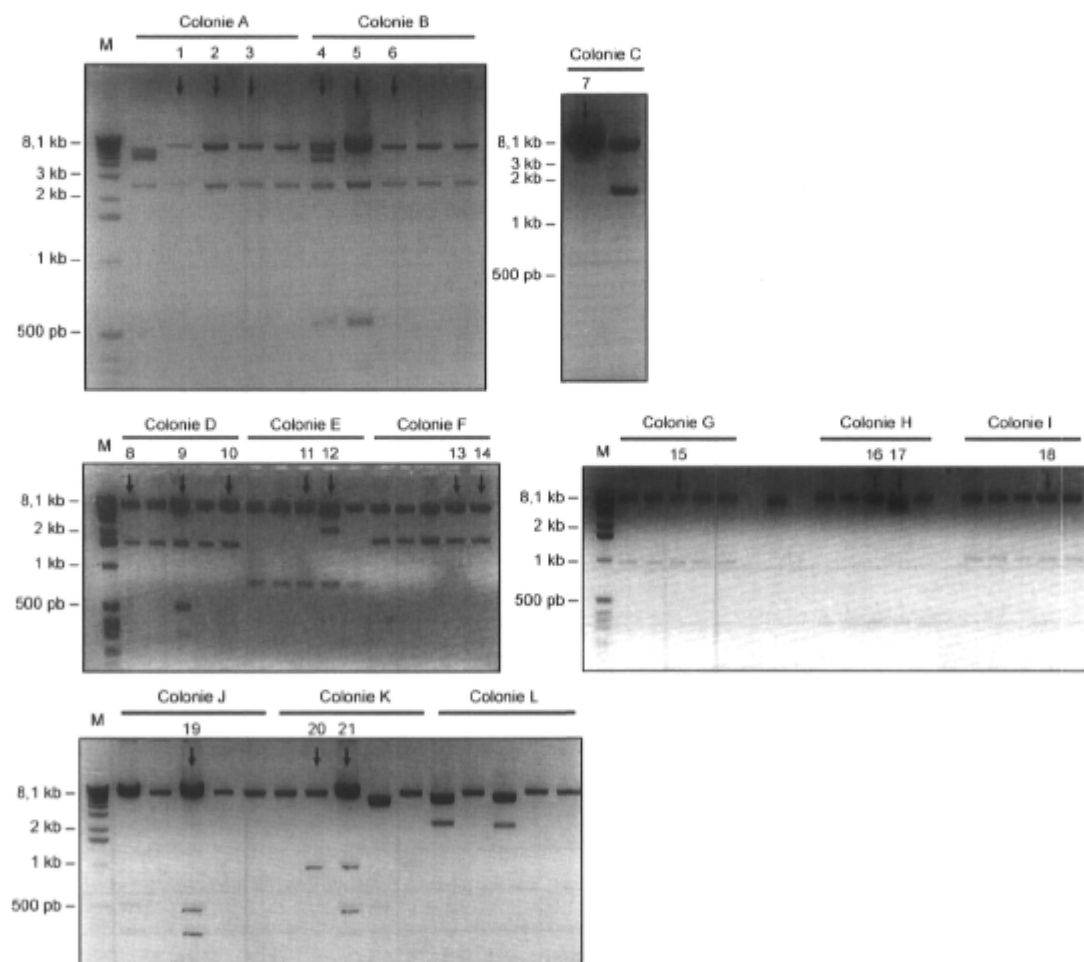


Figure 3.2 Profil de digestion EcoRI-XhoI de l’ADN plasmidique des transformants bactériens. Le plasmide pACT2 digéré EcoRI-XhoI migre à une taille apparente de 8,1 kb. Les profils des transformants bactériens des colonies de levures A à L sont illustrés. Les flèches désignent les candidats qui ont été sélectionnés. M : marqueur d’ADN de 1 kb.

L'analyse des profils de digestion a permis la sélection de 21 candidats. Les transformants de la colonie de levure « L » ne montrent pas de profils de digestion correspondant au vecteur « pACT2 / ADNc ». Aucun transformant bactérien pour cette colonie n'est donc sélectionné. Les candidats sélectionnés sont co-transformés dans la souche *S. cerevisiae* AH109 avec le vecteur « pGBKT7 / NCT » afin de confirmer l'interaction. Parallèlement, l'auto-activation des candidats est vérifiée en les co-transformants avec le vecteur « pGBKT7 / vide » (fig.3.3).

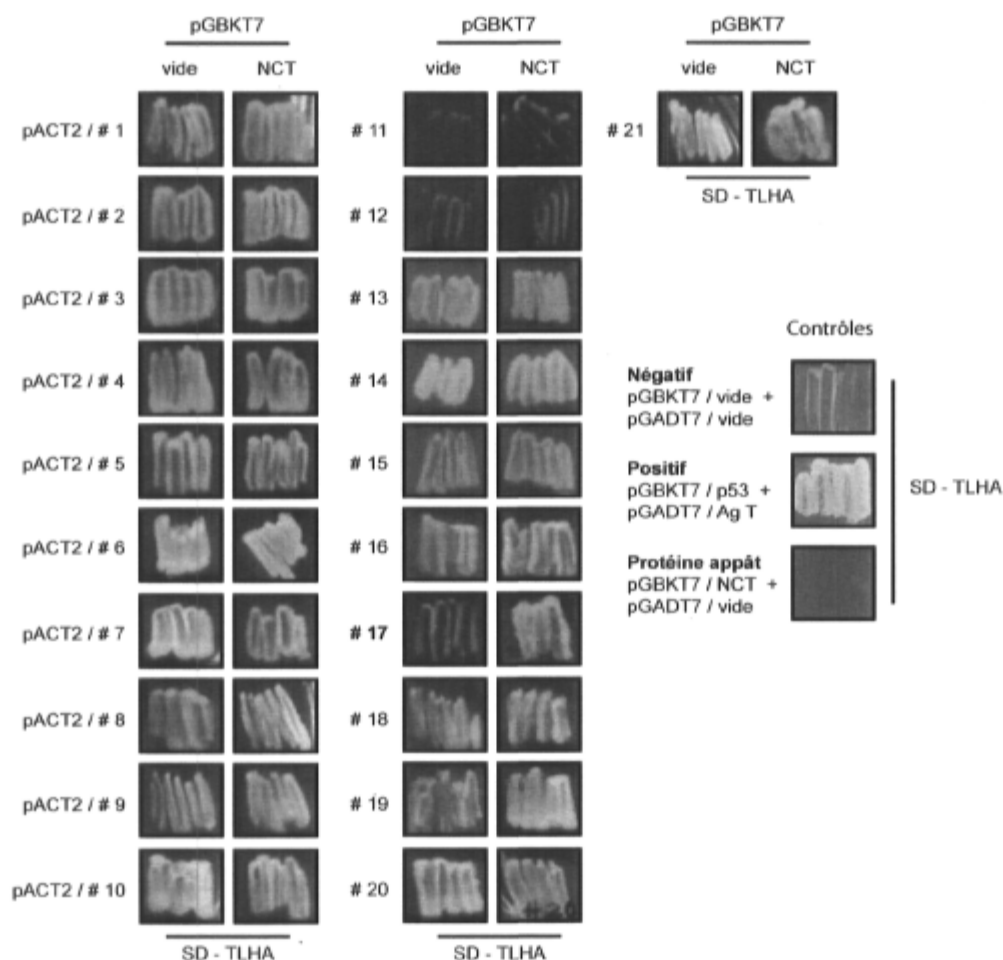


Figure 3.3 : Vérification des candidats sélectionnés par double hybride en levure. Les candidats présentant une croissance sur milieu sélectif SD-TLHA lorsqu'ils sont co-transformés avec le vecteur « pGBKT7 / vide » sont des auto-activateurs. Une interaction positive est présente lorsqu'il y a croissance seulement lorsque le candidat est co-transformé avec « pGBKT7 / NCT ». Contrôle négatif : vecteurs vides, contrôle positif : « pGBKT7 / p53 + pGADT7 / Ag T », contrôle d'autoactivation de la protéine-appât : « pGBKT7 / NCT + pGADT7 / vide ».

Sur les 21 candidats sélectionnés, 18 auto-activent l'expression des gènes rapporteurs permettant la synthèse de l'adénine et de l'histidine, puisqu'ils démontrent une croissance sur milieu sélectif SD –TLHA lorsqu'ils sont co-transformés avec « pGBKT7 / vide ». Il s'agit des candidats # 1 à 10, 13 à 16 et 18 à 21. Les candidats 11 et 12 ne reconstituent pas le facteur de transcription Gal-4, donc ne montrent aucune interaction avec la protéine NCT. Enfin, le seul candidat présentant une interaction positive avec NCT est le # 17. Il y a croissance des levures co-transformées avec les vecteurs « pGBKT7 / NCT » et « pACT2 / #17 », et étalées sur milieu sélectif SD –TLHA alors qu'il y a absence de croissance lorsque « pGBKT7 / vide » est co-transformé avec « pACT2 / #17 ».

3.1.2.1 Séquençage du candidat # 17

L'ADN de ce candidat a été préparé pour le séquençage. À l'aide de la séquence obtenue, les banques de données nucléotidiques et protéiques sont criblées afin d'identifier une homologie de séquence entre le candidat # 17 et une protéine connue. Le criblage des banques de données n'a cependant révélé aucune homologie au niveau peptidique avec la séquence d'une protéine connue.

3.1.3 Deuxième criblage

Malgré le haut taux d'efficacité de fusion (20,8 %) les pétris SD –TLHA du 2^e criblage ont montré la croissance de seulement 8 colonies de levures (A à H). Ces colonies ont été repiquées sur milieu solide SD –TLHA pour confirmer qu'il ne s'agit pas d'artéfact (c'est le cas des colonies E, F, G et H). Seulement 4 colonies ont démontré une croissance à cette étape. Leur ADN plasmidique a donc été extrait, transformés dans les bactéries électrocompétentes *E. coli* DH10B et étalées sur pétris sélectif (LB/Amp). Les profils de digestion EcoRI-XhoI de l'ADN d'au moins 5 transformants pour chaque colonie de levure ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose et 4 candidats ont été sélectionnés (voir fig 3.4).

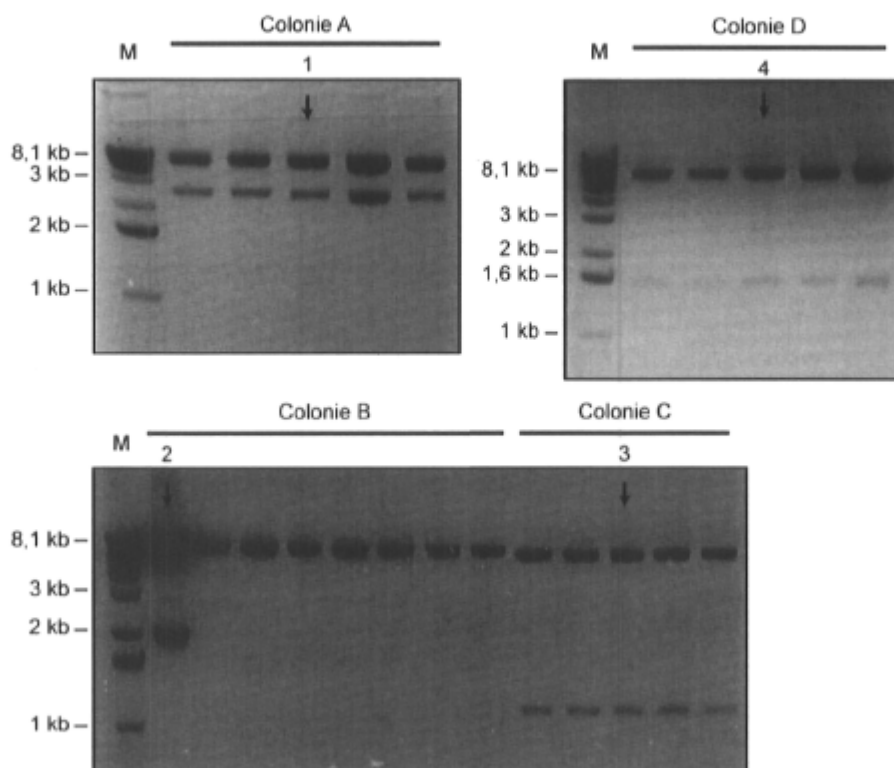


Figure 3.4 : Profil de digestion EcoRI-XhoI de l'ADN plasmidique des transformants bactériens. Le plasmide pACT2 digéré EcoRI-XhoI migre à une taille apparente de 8,1 kb. Les profils des transformants bactériens des colonies de levures A,B, C et D sont illustrés. Les flèches désignent les candidats qui sont été sélectionnés. M : marqueur d'ADN de 1 kb.

L'interaction entre NCT et les protéines codées par les candidats sélectionnés a été confirmée par la co-transformation des plasmides « pGBKT7 / NCT » et « pACT2 / candidat », dans *S. cerevisiae* AH109. Parallèlement, l'auto-activation du candidat est vérifiée en le co-transformant avec le vecteur « pGBKT7 / vide » (fig.3.5).

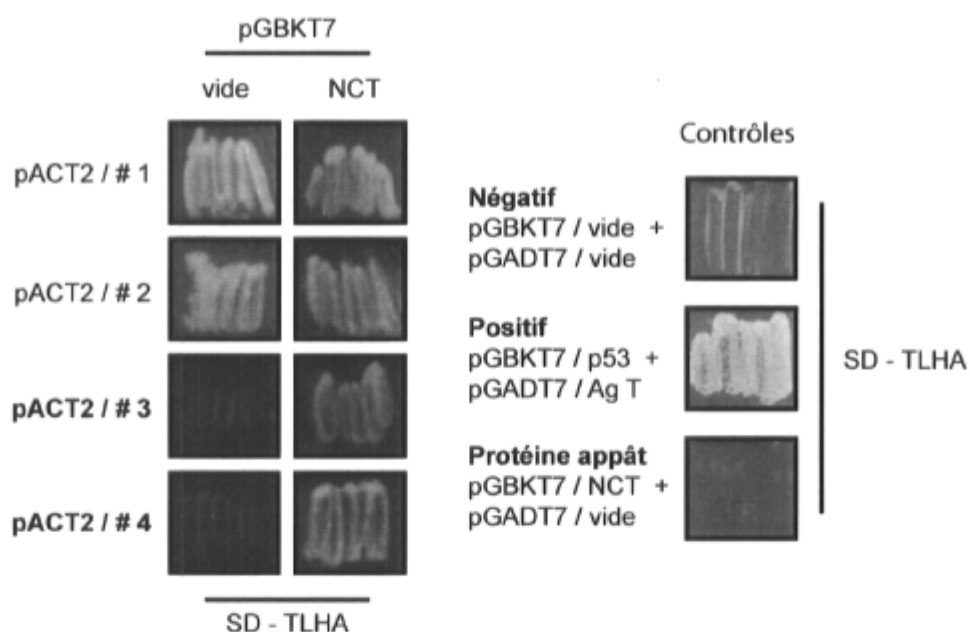


Figure 3.5 : Vérification des candidats sélectionnés par double hybride en levure. Les candidats présentant une croissance sur milieu sélectif SD-TLHA lorsqu'ils sont co-transformés avec le vecteur « pGBKT7 / vide » sont des auto-activateurs. Une interaction positive est présente lorsqu'il y a croissance seulement lorsque le candidat est co-transformé avec « pGBKT7 / NCT ». Contrôle négatif : vecteurs vides, contrôle positif : « pGBKT7 / p53 + pGADT7 / Ag T », contrôle d'autoactivation de la protéine-appât : « pGBKT7 / NCT + pGADT7 / vide ».

Sur les 4 candidats sélectionnés, 2 auto-activent l'expression des gènes rapporteurs, puisqu'ils démontrent une croissance sur milieu sélectif SD –TLHA lorsqu'ils sont co-transformés avec « pGBKT7 / vide ». Il s'agit des candidats # 1 et 2. Les candidats # 3 et 4 présentant quant à eux une interaction positive avec NCT. Il y a en effet croissance des levures co-transformées avec les vecteurs « pGBKT7 / NCT » et « pACT2 / #3 ou 4 », et étalées sur milieu sélectif SD –TLHA alors qu'il y a absence de croissance lorsque « pGBKT7 / vide » est co-transformé avec « pACT2 / #3 ou 4 ».

3.1.3.1 Séquençage des candidats # 3 et 4

L'ADN des candidats #3 et 4 est préparé pour le séquençage. Les criblages des banques de données nucléotidiques et protéiques n'ont révélé aucune homologie de séquence avec une protéine connue, au niveau peptidique, que ce soit pour le candidat # 3 ou # 4.

3.2 Criblage avec PEN-2

Un criblage de banque d'ADNc de cerveau fœtal humain est effectué à l'aide de la protéine recombinante BD-PEN-2. Le criblage est effectué avec le dessein d'identifier un nouveau partenaire protéique du complexe γ -sécrétase, mais cette fois-ci, se liant à ce dernier par l'intermédiaire de la sous-unité PEN-2. La protéine recombinante BD-PEN-2 est théoriquement exprimée par le vecteur d'expression de levure « pGBKT7 / PEN-2 » préalablement construit par amplification PCR. Le vecteur est transformé dans la souche de levure AH109 et l'expression de la protéine recombinante est vérifiée par extraction protéique de levure et immunobuvardage (fig.3.6). La protéine qui est fusionnée à l'étiquette c-Myc est reconnue à l'aide de l'anticorps α -c-Myc. L'immunobuvardage effectué sur les extraits protéiques de levures confirme l'expression de BD-PEN-2 dans les levures transformées avec la protéine recombinante.

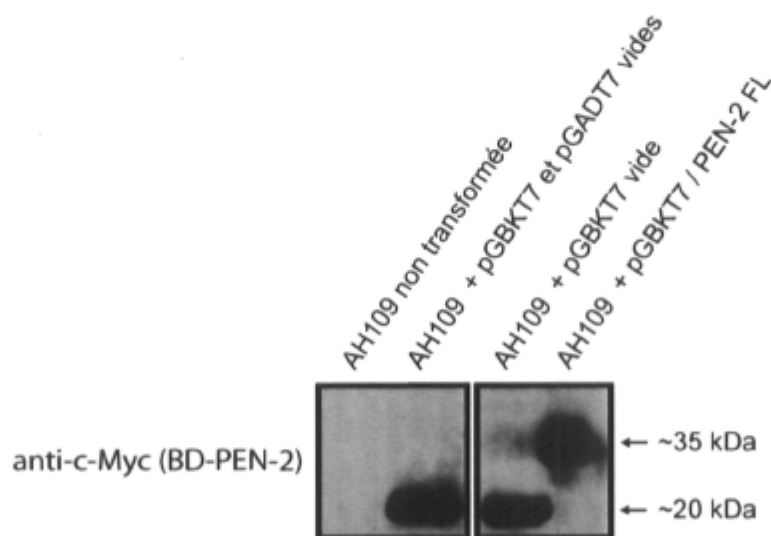


Figure 3.6 Immunobuvardage « anti-c-Myc » montrant l'expression de BD-PEN-2 après transformation de *S. cerevisiae* AH109. PEN-2 (~ 12 kDa) est fusionnée au domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription Gal-4 (~ 20 kDa) ce qui lui confère un poids moléculaire de ~ 35 kDa. La protéine est absente des contrôles négatifs « AH109 non-transformée », « AH109 transformée avec pGBKT7 vide + pGADT7 vide » et « AH109 transformée avec pGBKT7 vide seul ». L'immunobuvardage a été réalisé à l'aide de l'anticorps α -c-Myc sc40 (Santa Cruz Biotechnology) dilué selon un facteur 1 : 500. L'anticorps secondaire α -souris (Santa Cruz Biotechnology) est dilué selon un facteur 1 : 20000.

3.2.1 Titrage et efficacité de fusion

Lorsque l'expression de la protéine recombinante BD-PEN-2 est confirmée, le criblage est réalisé sur une banque prétransformée d'ADNc de cerveau fœtal humain. Le titrage de la librairie et l'efficacité de fusion sont calculés.

Tableau 3.2 : Titrages et efficacité de fusion du criblage réalisé avec PEN-2.

Criblage avec PEN-2			
Titrage librairie	3,5 x 10 ⁷ cfu/mL		
	viabilité du partenaire limitant (librairie) (cfu/mL)	3,4 x 10 ⁷	
Efficacité de mating (%)	viabilité du partenaire AH109 (protéine-appât) (cfu/mL)	2,0 x 10 ⁸	1,5 % ^a
	viabilité des cellules diploïdes (fusion) (cfu/mL)	5,1 x 10 ⁵	

^a Le criblage est poursuivi malgré le faible taux d'efficacité de fusion.

Le nombre de cfu/mL correspondant au titrage de la librairie respecte les normes de la compagnie Clontech. Cependant, l'efficacité de fusion du criblage est un peu faible (moins de 2 %). Ce taux d'efficacité indique que seulement un faible nombre de candidats de la banque d'ADNc sont criblés. Le criblage est tout de même poursuivi.

Les pétris SD –TLHA du criblage avec PEN-2 ont montré la croissance de 29 colonies de levures (A à Z, AA, BB et EE). Ces colonies ont été repiquées sur milieu solide SD –TLHA pour confirmer qu'il ne s'agit pas d'artéfact. Leur ADN plasmidique a été extrait, transformés dans les bactéries électrocompétentes *E. coli* DH10B qui ont été étalées sur pétris sélectif (LB/Amp). Les profils de digestion EcoR1-Xho1 de 5 candidats pour chaque colonie de levure ont été analysés. Au total 39 candidats ont été sélectionnés. Pour des fins de simplifications, les profils de digestion EcoR1-Xho1 des candidats sélectionnés sont indiqués au tableau 3.4.

Tableau 3.3 : Profil de digestion des candidats sélectionnés

Colonie de levure	Candidat retenu selon le profil de digestion	Profil de digestion ^a (longueur fragment EcoR1 – Xho1)
A	1	1,1 kb
B	2	520 + 430 pb
C	3	2,2 kb + 300 pb
	4	2,2 kb
D	5	520 + 430 pb
	6	520 + 430 pb
E	7	1,2 kb
	9	1,7 kb
F	10	1,4 kb
	11	1,7 + 2,5 + 5,0 + 6,0 kb
G	12	400 pb
H	13	1,8 kb
I	14	1,2 kb
J	15	1,0 kb + 300 + 400 pb
	16	1,0 kb
K	17	1,6 kb
	18	1,6 kb + 320 pb
L	19	800 pb
	20	1,2 kb + 320 pb
M	21	1,2 kb
	22	900 pb
N	23	850 pb
O	24	1,3 kb
P	25	1,6 kb
Q	26	1,4 kb
R	27	1,5 kb + 500 + 300 pb
S	28	510 pb
T	29	900 pb
	30	1,0 kb
U	31	900 pb
V		
W	32	1,3 kb
X	33	1,0 kb + 430 pb
Y	34	2,6 kb
Z	35	800 pb
	36	800 + 300 pb
EE	37	1,6 kb
AA	38	2,5 kb + 300 pb
BB	39	500 pb

L'interaction entre PEN-2 et les protéines codées par les candidats sélectionnés a été confirmée par co-transformation des plasmides « pGBKT7 / PEN-2 » et « pACT2 / candidat », dans *S. cerevisiae* AH109. Parallèlement, l'auto-activation des candidats est vérifiée en les co-transformants avec le vecteur « pGBKT7 / vide » (figure 3.7).

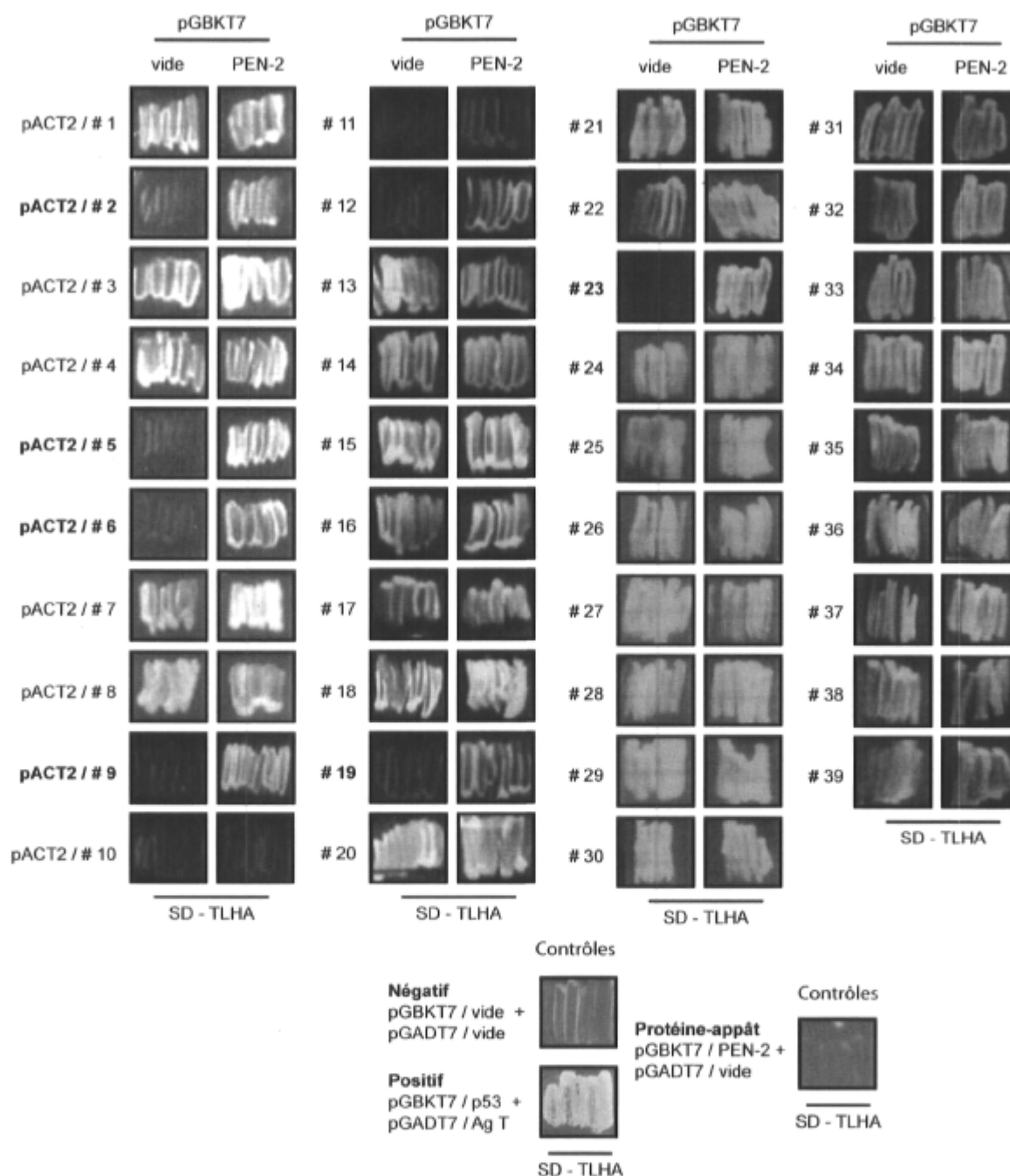


Figure 3.7 : Vérification des candidats sélectionnés par double hybride en levure. Les candidats présentant une croissance sur milieu sélectif SD-TLHA lorsqu'ils sont co-transformés avec le vecteur « pGBKT7 / vide » sont des auto-activateurs. Une interaction positive est présente lorsqu'il y a croissance seulement lorsque le candidat est co-transformé avec « pGBKT7 / PEN-2 ». Contrôle négatif : vecteurs vides, contrôle positif : « pGBKT7 / p53 + pGADT7 / Ag T », contrôle d'autoactivation de la protéine-appât : « pGBKT7 / PEN-2 + pGADT7 / vide ».

Sur les 39 candidats sélectionnés selon leur profil de digestion, 8 ne sont pas des auto-activateurs. Il y a croissance des levures co-transformées avec les vecteurs « pGBKT7 / PEN-2 » et « pACT2 / # 2, 5, 6, 9, 12, 19 ou 23 », et étalées sur milieu sélectif SD –TLHA, alors qu'il y a absence de croissance lorsque « pGBKT7 / vide » est co-transformé avec les mêmes candidats. Les candidats # 10 et 11 quant à eux ne montrent pas d'interaction avec PEN-2.

3.2.1.1 Séquençage des candidats ayant une interaction positive avec PEN-2

L'ADN des 7 candidats ayant une interaction positive avec PEN-2, a été préparé pour le séquençage. Les criblages des banques de données nucléotidiques et protéiques ont révélé des homologies de séquences identiques pour les candidats #2, 5 et 6 (ils ont le même profil de digestion EcoR1-Xho1), avec le fragment C-terminal du gène codant la protéine ISLR (immunoglobulin superfamily leucine rich repeat). Aucune homologie de séquence peptidique pour des protéines connues n'a été observée dans le cas des candidats # 9, 12, 13 et 23 (1^{er} cadre de lecture), cependant un criblage des banques de données avec la séquence en acide aminé du deuxième cadre de lecture du candidat # 23 donne une homologie de 100 % avec le polypeptide codant pour la chaîne légère de la Ferritin (Ferritin L).

Tableau 3.4 : Homologie de séquences des candidats identifiés lors du criblage avec PEN-2.

# candidat	Homologie de séquence
2	ISLR C-ter (a.a : 359 à 428)
5	ISLR C-ter (a.a : 359 à 428)
6	ISLR C-ter (a.a : 359 à 428)
9	Aucune homologie connue
12	Aucune homologie connue
19	Aucune homologie connue
23	Aucune homologie connue Ferritin L (2e cadre de lecture)

3.2.2 Analyse des candidats identifiés.

Les candidats sélectionnés lors du criblage avec PEN-2 sont analysés par double hybride en levure, afin de préciser leurs interactions avec le complexe γ -sécrétase, un des substrats du complexe (APP) et la β -sécrétase (BACE-1). Tous les candidats qui ont été envoyés au séquençage sont analysés, même si aucune homologie de séquence n'a été identifiée (figure 3.8). Les candidats # 2 (ISLR C-ter), 9, 12, 19 et 23 (dans pACT2) ont été co-transformés avec les vecteurs pGBKT7 exprimant les protéines PEN-2 (contrôle positif), APH-1, NCT, PS1 N-ter, BACE-1 et APP FL. La croissance sur milieu sélectif montre que ISLR interagit directement avec les protéines PEN-2, APH-1 et PS1 N-ter. Les candidats # 9, 12, 19 et 23 montrent quant à eux une interaction avec PEN-2 mais aussi la protéine BACE-1. Dans le cas de Ferritin L, la protéine est codée par le deuxième cadre de lecture du candidat « pACT2 / # 23 ». Le gène a donc été amplifié par PCR et cloné dans pGADT7 selon le cadre de lecture codant Ferritin L. L'interaction avec PEN-2 a été encore une fois vérifiée par double hybride en levure pour s'assurer que Ferritin L est responsable de la reconstitution du facteur de transcription Gal-4. Les résultats du double hybride montrent que Ferritin L n'interagit pas directement avec PEN-2.

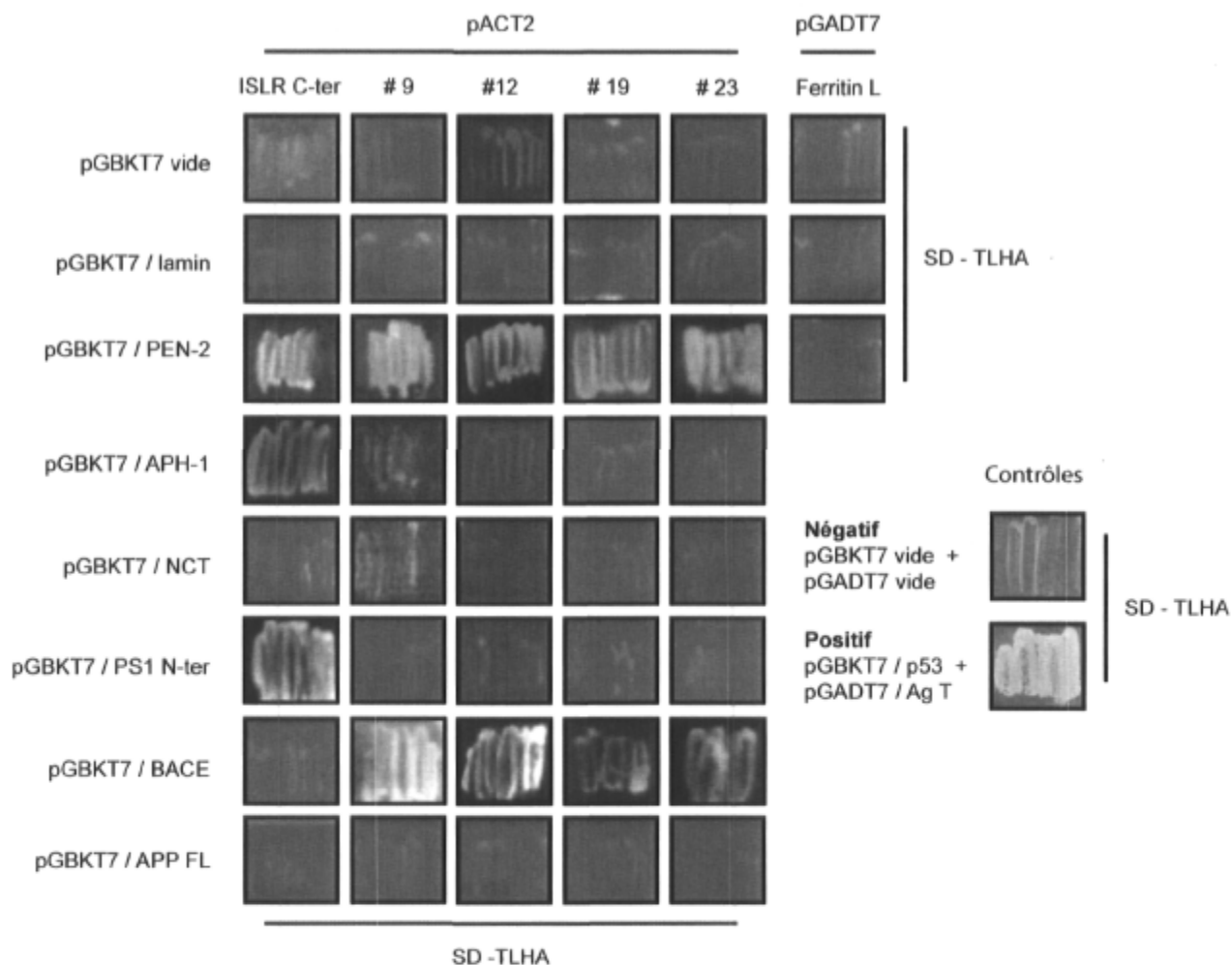


Figure 3.8 : Analyse des interactions protéiques des candidats identifiés par le criblage avec PEN-2 avec les membres du complexe γ -sécrétase, BACE et APP en double hybride en levure. La croissance sur milieu sélectif SD-TLHA indique la reconstitution du facteur de transcription Gal-4 par l'intermédiaire de l'interaction directe des protéines. Le contrôle d'interaction négative : « pGBKT7 / vide » et « pGADT7 / vide » et le contrôle d'interaction positive : « pGBKT7 / p53 » et « pGADT7 / AgT ». Les contrôles d'auto-activation sont la co-transformation des candidats dans pACT2 avec le vecteur « pGBKT7 / vide » et « pGBKT7 / lamin ».

3.2.3 Analyse des interactions par co-immunoprécipitation

Dans le dessein de confirmer les interactions protéines-protéines identifiées par le double hybride en levure et d'en analyser de nouvelles dans un contexte *in vitro* se rapprochant du contexte physiologique, les protéines ISLR, PS1, Ferritin et PEN-2 ont été surexprimées dans des lignées cellulaires, extraites, immunoprécipitées et immunobuwardées.

3.2.3.1 ISLR

Les protéines ISLR et PS1 (exprimées par les vecteurs pCDNA3.1 His / ISLR et pCDNA3 5' Myc / PS1) sont surexprimées transitoirement par les cellules TsA201 à la suite de leur transfection au CaCl₂. Elles sont par la suite extraites dans le tampon de lyse STEN 150 mM, immunoprécipitées et lavées dans le tampon STEN 350 mM. La détection de PS1 FL par l'immunobuwardage anti-c-Myc (figure 3.9) dans le puit de l'immunoprécipitation de ISLR (par V5) démontre que les protéines ISLR et PS1 co-immunoprécipitent, donc qu'elles interagissent ensemble. L'absence de bande dans l'extrait billes d'agarose + protéine G indique que PS1 n'interagit pas avec les billes d'agarose-protéine G, et donc interagit bien avec PS1.

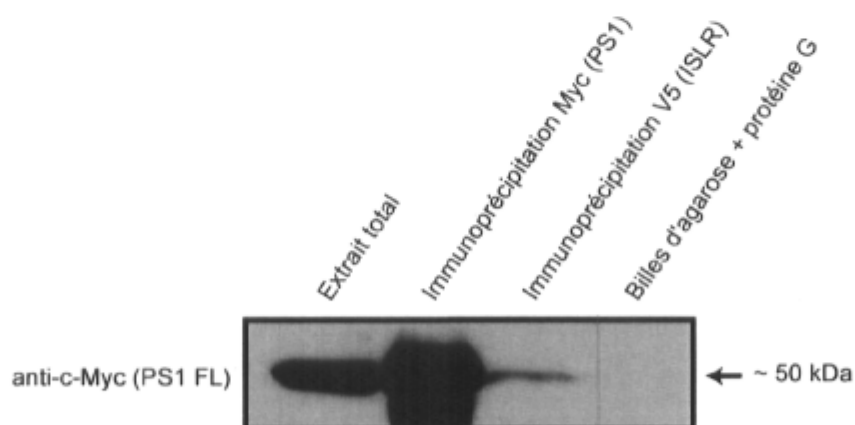


Figure 3.9 Co-immunoprécipitation de PS1. PS1 (~ 50 kDa), visualisée par l'immunobuwardage « anti-c-Myc » est présente dans l'extrait protéique total ainsi que dans l'extrait de sa propre immunoprécipitation (par c-myc). Elle est aussi présente dans l'extrait de l'immunoprécipitation de ISLR (par V5). Le contrôle négatif est l'extrait protéique avec les billes d'agaroses-protéine G mais sans anticorps. L'immunobuwardage a été réalisé à l'aide de l'anticorps α -c-Myc sc40 (Santa Cruz Biotechnology) dilué selon un facteur 1 : 500. L'anticorps secondaire α -souris (Santa Cruz Biotechnology) est dilué selon un facteur 1 : 20000.

Enfin, la co-immunoprécipitation de PS1 par ISLR, c'est-à-dire l'immunobuvardage inverse de celui présenté à la figure 3.9 a aussi été tenté dans des conditions similaires. Cependant aucun résultat concluant n'a encore été obtenu.

3.2.3.2 Ferritin L

Les interactions entre la protéine Ferritin L et PEN-2 ont été vérifiées par co-immunoprécipitation (fig. 3.10). Les protéines Ferritin L et PEN-2 (exprimées par les vecteurs « pCMVzeoHa / Ferritin L » et « pCDNA3.1 His / PEN-2 ») sont surexprimées transitoirement par les cellules SH-SY5Y à la suite de leur transfection au CaCl_2 . Elles sont par la suite extraites dans le tampon de lyse STEN 150 mM, immunoprécipitées et lavées dans le même tampon. Les immunobuvardages anti-HA et anti-Xpress présentés à la figure 3.10, montrent que Ferritin L ne co-immunoprécipite pas avec PEN-2.

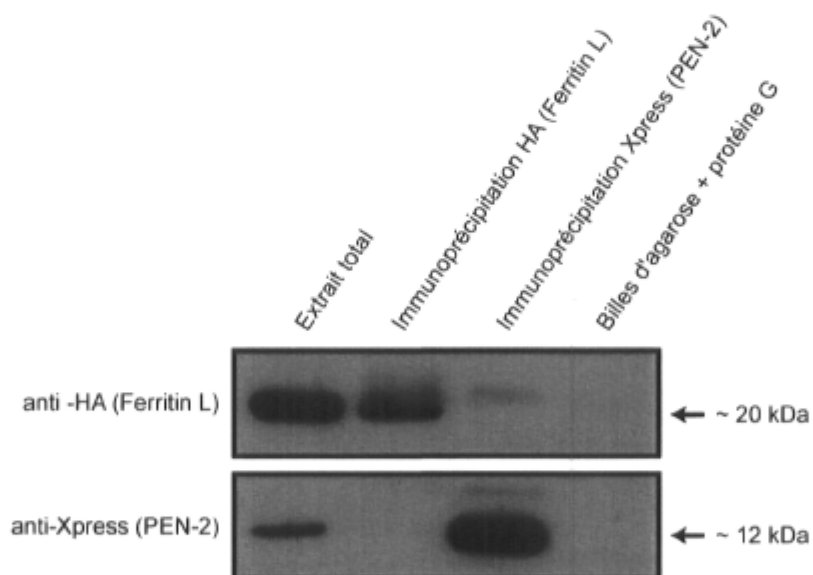


Figure 3.10 Ferritin L et PEN-2 ne co-immunoprécipitent pas. Ferritin L (~ 20 kDa), visualisée par l'immunobuvardage « anti-HA » est présente dans l'extrait protéique total ainsi que dans l'extrait de sa propre immunoprécipitation (par HA). Elle est absente dans l'extrait de l'immunoprécipitation de PEN-2 (par Xpress). Dans le sens inverse, PEN-2 (~ 12 kDa), visualisée par l'immunobuvardage « anti-Xpress » est présente dans l'extrait protéique total ainsi que dans l'extrait de sa propre immunoprécipitation (par Xpress). Elle est absente dans l'extrait de l'immunoprécipitation de Ferritin (par HA). Contrôle négatif : extrait protéique avec les billes d'agaroses-protéine G mais sans anticorps. Immunobuvardage anti-HA : 1^{er} anticorps α -HA (Roche) dilué selon un facteur 1 : 2000. Immunobuvardage anti-Xpress : 1^{er} anticorps α -Xpress (Invitrogen™) dilué selon un facteur 1 : 10000. L'anticorps secondaire pour les deux immunobuvardages est l' α -souris (Santa Cruz Biotechnology), dilué selon un facteur 1 : 20000.

Ferritin L est absente dans l'extrait de l'immunoprécipitation de PEN-2, et à l'inverse, PEN-2 n'est pas détectée par l'immunobuvardage de Xpress dans l'extrait de l'immunoprécipitation de Ferritin L, confirmant l'absence d'interaction.

3.3 Criblage avec APP

Un criblage de banque d'ADNc de cerveau fœtal humain est réalisé à l'aide de la protéine recombinante BD-APP. Le criblage est effectué afin d'identifier un nouveau partenaire protéique du substrat du complexe γ -sécrétase et qui pourrait faire le lien entre le complexe son substrat. L'expression d'APP fusionnée dans le vecteur pGBKT7 et transformée dans la souche de levure AH109 est vérifiée par extraction protéique de levure et immunobuvardage (fig. 3.11). Ce dernier confirme l'expression de BD-APP dans les levures transformées avec la protéine recombinante.

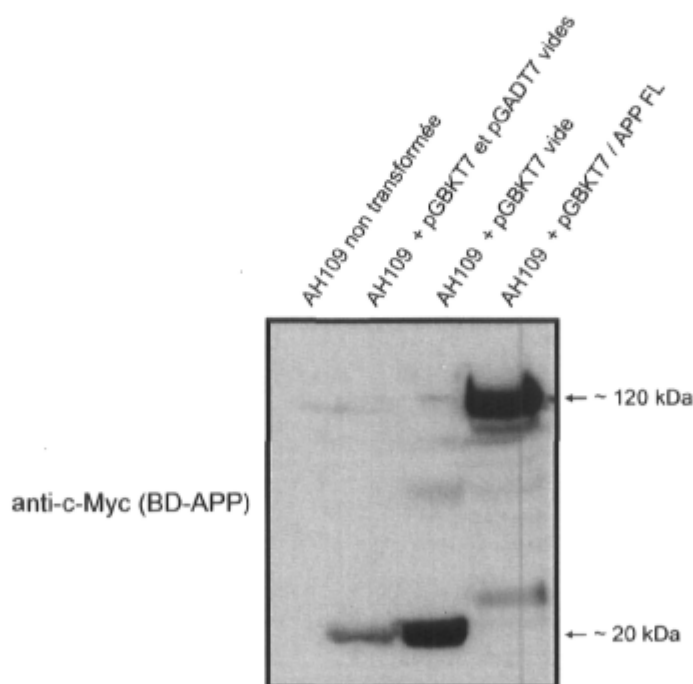


Figure 3.11 Immunobuvardage « anti-c-Myc » montrant la présence de BD-APP après transformation de *S. cerevisiae* AH109. APP (~ 100 kDa) est fusionnée au domaine de liaison à l'ADN de Gal-4 (~ 20 kDa) ce qui lui confère un poids moléculaire de ~ 120 kDa. La protéine est absente des contrôles négatifs « AH109 non-transformée », « pGBKT7 vide + pGADT7 vide » et « pGBKT7 vide ». L'anticorps primaire est l' α -c-Myc sc40 (Santa Cruz Biotechnology) dilué selon un facteur 1 : 500. L'anticorps secondaire α -souris (Santa Cruz Biotechnology) est dilué selon un facteur 1 : 20000.

Le criblage a été effectué sur une banque d'ADNc de cerveau fœtal humain. Le titrage de la banque ainsi que l'efficacité de fusion sont indiquées dans le tableau suivant :

Tableau 3.3 : Titrage et efficacité de fusion du criblage réalisé avec APP.

Criblage avec APP			
Titrage librairie	2,0 x 10 ⁸ cfu/mL		
	viabilité du partenaire limitant (librairie) (cfu/mL)	1,5 x 10 ⁶	
Efficacité de mating (%)	viabilité du partenaire AH109 (protéine-appât) (cfu/mL)	6,0 x 10 ⁷	6,3 %
	viabilité des cellules diploïdes (fusion) (cfu/mL)	9,4 x 10 ⁴	

Le titrage de la librairie permet d'évaluer que le nombre de cfu/mL de la banque d'ADNc de cerveau est légèrement plus faible que la norme de la compagnie ($> 10^7$). Cependant l'efficacité de fusion calculées ($> 6\%$), indique que la fusion des levures permet le criblage d'un nombre de clones suffisants.

Les pétris SD –TLHA du criblage avec APP ont montré la croissance de 4 colonies de levures (A à D). Ces colonies ont été repiquées sur milieu solide SD –TLHA pour confirmer qu'il ne s'agit pas d'artéfact ensuite leur ADN plasmidique a été extrait, transformés dans les bactéries électrocompétentes *E. coli* DH10B et étalées sur pétris sélectif (LB/Amp). Les profils de digestion EcoRI-XhoI de 6 candidats pour chaque colonie de levure ont été analysés. Au total 9 candidats ont été sélectionnés (fig. 3.12).

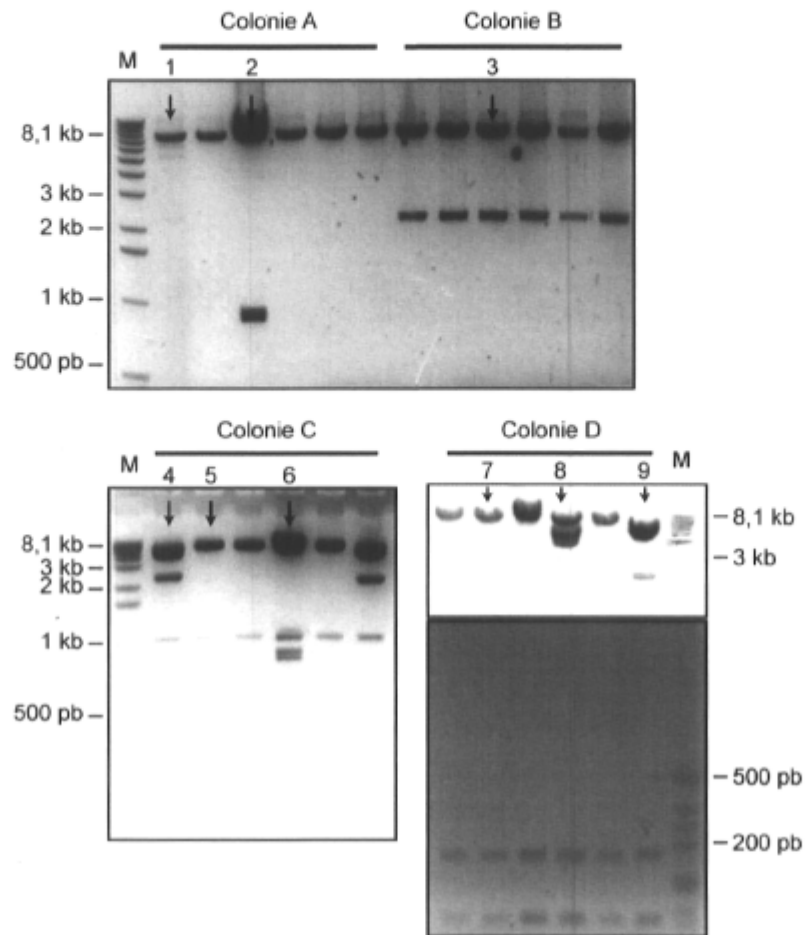


Figure 3.12 Profil de digestion EcoRI-XhoI de l'ADN plasmidique des transformants bactériens. Le plasmide pACT2 digéré EcoRI-XhoI migre à une taille apparente de 8,1 kb. Les profils des transformants bactériens des colonies de levures A,B, C et D sont illustrés. Les flèches désignent les candidats qui sont été sélectionnés. M : marqueur d'ADN de 1kb.

L'interaction entre APP et les protéines codées par les candidats sélectionnés a été confirmée par co-transformation des plasmides « pGBKT7 / APP » et « pACT2 / candidat », dans *S. cerevisiae* AH109. Parallèlement, l'auto-activation du candidat est vérifiée en le co-transformant avec le vecteur pGBKT7 vide.

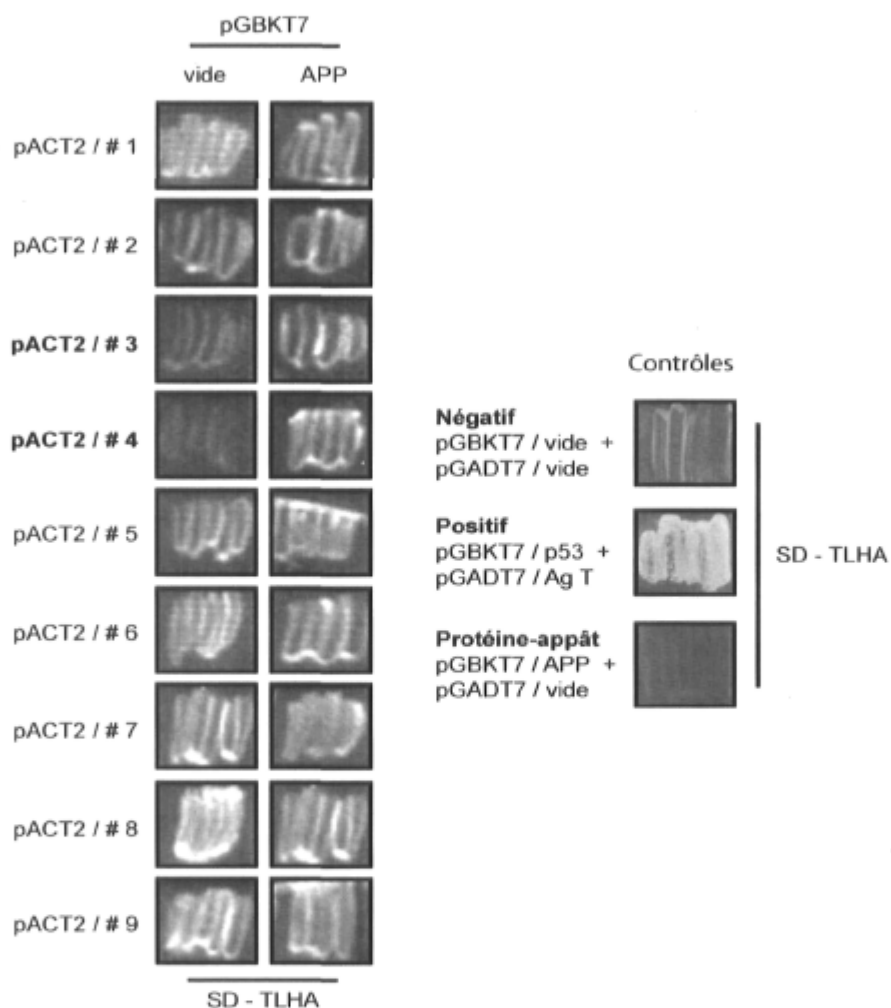


Figure 3.13 : Vérification des candidats sélectionnés par double hybride en levure. Les candidats présentant une croissance sur milieu sélectif SD-TLHA lorsqu'ils sont co-transformés avec le vecteur « pGBKT7 / vide » sont des auto-activateurs. Une interaction positive est présente lorsqu'il y a croissance seulement lorsque le candidat est co-transformé avec « pGBKT7 / APP ». Contrôle négatif : vecteurs vides, contrôle positif : « pGBKT7 / p53 + pGADT7 / Ag T », contrôle d'autoactivation de la protéine-appât : « pGBKT7 / APP + pGADT7 / vide ».

Sur les 9 candidats sélectionnés selon leur profil de digestion, 2 ne sont pas des auto-activateurs. Il y a croissance des levures co-transformées avec les vecteurs « pGBKT7 / APP » et « pACT2 / # 3 et 4 » et étalées sur milieu sélectif SD –TLHA, alors qu'il y a absence de croissance lorsque « pGBKT7 / vide » est co-transformé avec les mêmes candidats

3.3.1.1 Séquençage des candidats ayant une interaction positive avec APP

L'ADN des candidats # 3 et # 4 à été préparé pour le séquençage. Les criblages des banques de données nucléotidiques et protéiques ont révélé des homologies pour les deux candidats séquencés. Le candidat # 3 possède une homologie de séquence avec la protéine SNW1 (SNW domain containing 1) et le candidat # 4 quant à lui est homologue à la séquence codant pour WBP5 (WW binding protein 5).

3.3.2 Analyse des candidats identifiés.

SNW1 et WBP5, pêchés lors du criblage avec APP ont été analysés par double hybride en levure, afin de préciser leurs interactions avec le complexe γ -sécrétase (figure 3.14).

SNW1 et WBP5 ont été co-transformés avec les protéines APP (contrôle positif), APH-1, NCT, PS1 FL, PS1 N-ter, PS1 C-ter et la boucle cytoplasmique de PS1 (PS1 loop). La croissance sur milieu sélectif SD –TLHA montre que SNW1 et WBP5 interagissent directement avec les protéines APP et la boucle cytoplasmique de PS1.

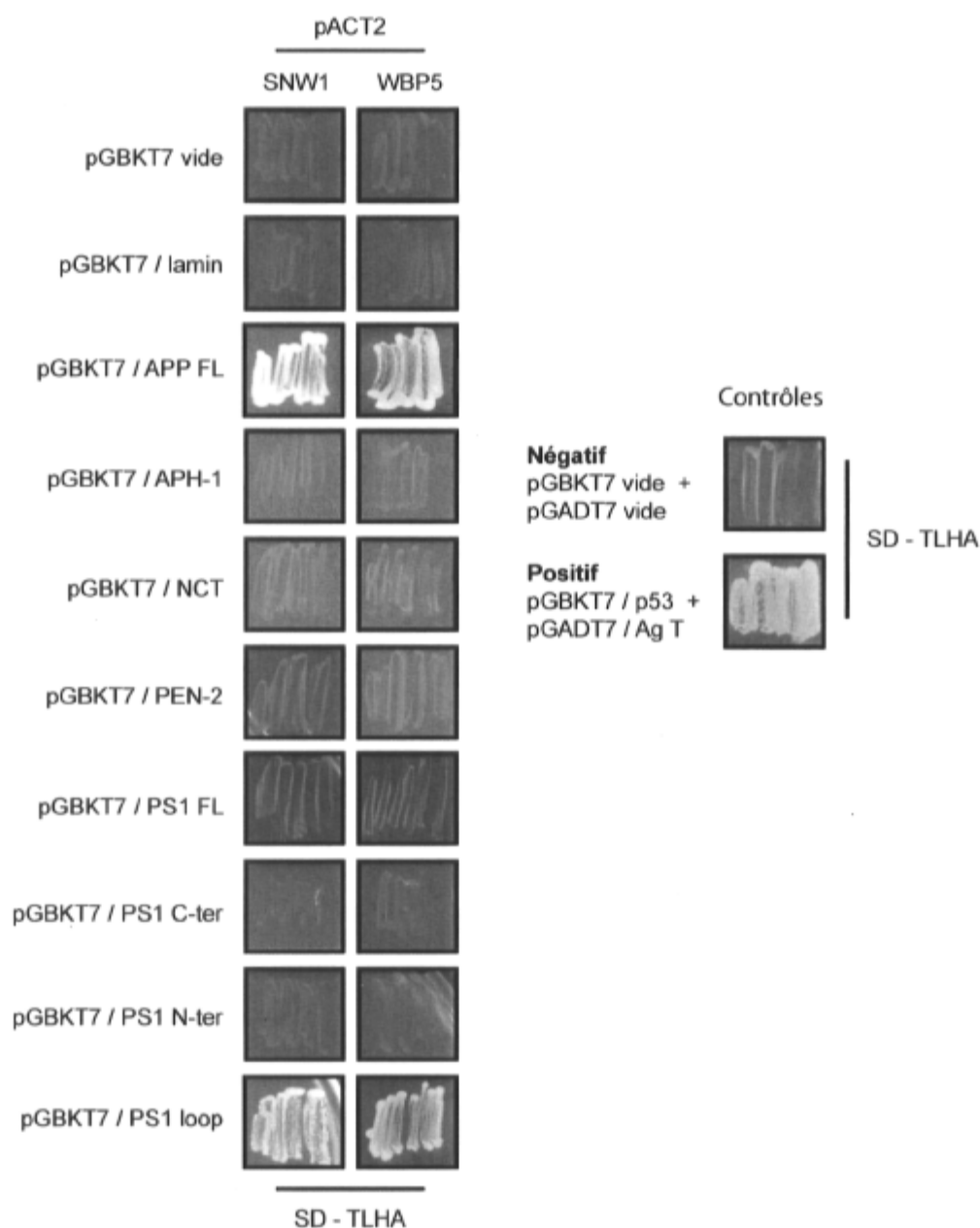


Figure 3.14 : Analyse des interactions protéiques de SNW1 et WBP5 avec les membres du complexe γ -sécrétase en double hybride en levure. La croissance sur milieu sélectif SD-TLHA indique la reconstitution du facteur de transcription Gal-4 par l'intermédiaire de l'interaction directe des protéines. Le contrôle d'interaction négative : pGBKT7 vide et pGADT7 vide et le contrôle d'interaction positive : « pGBKT7 / p53 » et « pGADT7 / Ag T ». Les contrôles d'auto-activation sont la co-transformation des candidats dans pACT2 avec le vecteur « pGBKT7 / vide » et « pGBKT7 / lamin ».

3.3.3 Analyse des interactions par co-immunoprécipitations

La technique de co-immunoprécipitation est utilisée dans le dessein de confirmer *in vitro* dans un contexte physiologique, les interactions protéines-protéines de SNW1 et WBP5 avec APP et PS1 identifiées par le système de double hybride. De plus, il est pertinent de vérifier parallèlement si les protéines interagissent aussi avec un autre substrat du complexe γ -sécrétase, c'est-à-dire Notch.

3.3.3.1 SNW1

Les protéines APP et SNW1 (exprimées par les vecteurs « pCDNA3 / APP » et « pCDNA3.1 His / SNW1 ») sont surexprimées transitoirement par les cellules TsA201 à la suite de leur transfection au CaCl_2 . Elles sont par la suite extraites dans le tampon de lyse STEN 150 mM, immunoprécipitées et lavées dans le même tampon. L'immunobuvardage anti-Xpress (figure 3.15) démontre que les protéines APP et SNW1 co-immunoprécipitent donc elles interagissent ensemble.

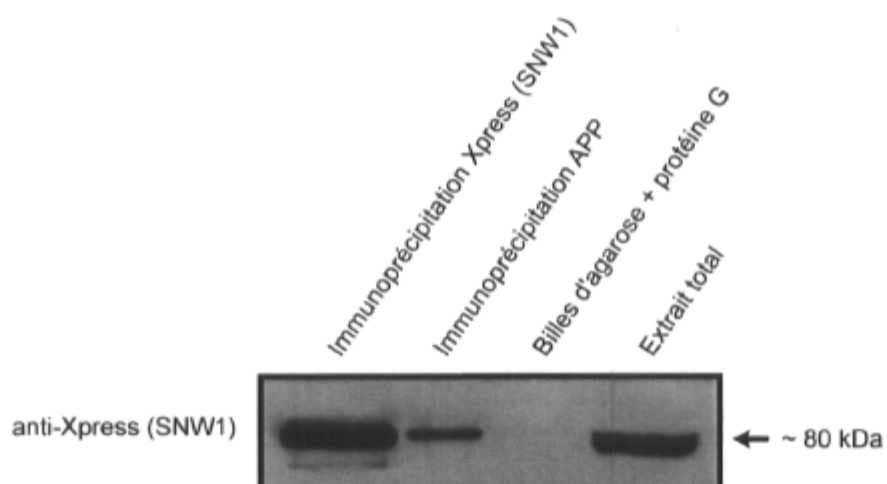


Figure 3.15 Co-immunoprécipitation de SNW1. SNW1 (~ 80 kDa), visualisée par l'immunobuvardage « anti-Xpress » est présente dans l'extrait protéique total ainsi que dans l'extrait de sa propre immunoprécipitation (par Xpress). Elle est aussi présente dans l'extrait de l'immunoprécipitation d'APP, ce qui indique qu'APP co-immunoprécipite SNW1. Le contrôle négatif est l'extrait protéique avec les billes d'agaroses-protéine G mais sans anticorps. L'absence de bande indique que SNW1 n'interagit pas avec billes. L'anticorps primaire est l' α -Xpress (Invitrogen™) dilué selon un facteur 1 : 10000. L'anticorps secondaire α -souris (Santa Cruz Biotechnology) est dilué selon un facteur 1 : 20000.

L'absence de bande dans l'extrait : billes d'agarose + protéine G indique que SNW1 n'interagit pas avec les billes d'agarose-protéine G, et donc interagit bien avec APP. Enfin, la co-immunoprécipitation de SNW1 et de Notch a aussi été tentée dans des conditions similaires à celle de SNW1 et d'APP, cependant aucun résultat concluant n'a encore été obtenu. Enfin, la co-immunoprécipitation d'APP par SNW1, c'est-à-dire l'immunobuvardage inverse de celui présenté à la figure 3.15 a aussi été tenté dans des conditions similaires. Cependant aucun résultat concluant n'a encore été obtenu.

3.3.3.2 WBP5

Les protéines APP et WBP5 (exprimées par les vecteurs « pCDNA6 V5 / APP » et « pCDNA3.1 His / WBP5 ») sont surexprimées transitoirement par transfection au CaCl₂ dans les cellules TsA201. Elles sont par la suite extraites dans le tampon de lyse STEN 150 mM, immunoprécipitées et lavées dans le même tampon. L'immunobuvardage anti-Xpress (figure 3.16) démontre que les protéines APP et WBP5 co-immunoprécipitent donc interagissent ensemble.

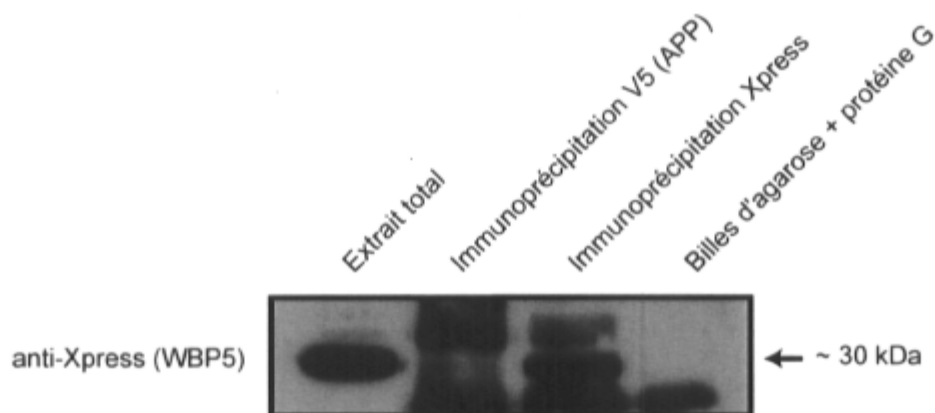


Figure 3.16 Co-immunoprécipitation de WBP5. WBP5 (~ 30 kDa), visualisée par l'immunobuvardage « anti-Xpress » est présente dans l'extrait protéique total ainsi que dans l'extrait de sa propre immunoprécipitation (par Xpress). Elle est aussi présente dans l'extrait de l'immunoprécipitation d'APP (par V5). Le contrôle négatif est l'extrait protéique avec les billes d'agaroses-protéine G mais sans anticorps. L'immunobuvardage a été réalisé à l'aide de l'anticorps α -Xpress (Invitrogen™) dilué selon un facteur 1 : 10000. L'anticorps secondaire α -souris (Santa Cruz Biotechnology) est dilué selon un facteur 1 : 20000.

Bien que la bande de la protéine WBP5 dans l'extrait de l'immunoprécipitation d'APP soit faible, elle est significative par rapport au contrôle négatif. L'absence de bande dans l'extrait billes d'agarose + protéine G indique que WBP5 n'interagit pas avec les billes d'agarose-protéine G, et donc interagit bien avec APP. Enfin, la co-immunoprécipitation d'APP par WBP5, c'est-à-dire l'immunobuvardage inverse de celui présenté à la figure 3.16 a aussi été tenté dans des conditions similaires. Cependant aucun résultat concluant n'a encore été obtenu.

Les protéines Notch Δ E+C et WBP5 (exprimées par les vecteurs « pCDNA3 / Notch Δ E+C » et « pCDNA3.1 His / WBP5 ») sont surexprimées transitoirement par transfection au CaCl_2 dans les cellules TsA201. Elles sont par la suite extraites dans le tampon de lyse STEN 150 mM, immunoprécipitées et lavées dans le tampon STEN 350 mM. L'immunobuvardage anti-Notch (figure 3.15) démontre que les protéines Notch Δ E+C et WBP5 co-immunoprécipitent donc interagissent ensemble. Dans le cas de l'immunoprécipitation de Notch Δ E+C (Notch avec la délétion de son domaine extracellulaire), le vecteur (pCDNA3) ne porte pas d'étiquette. L'anticorps utilisé est un anticorps « anti-notch » polyclonal de chèvre (Santa Cruz Biotechnology). Cet anticorps reconnaît directement un épitope de la protéine surexprimée.

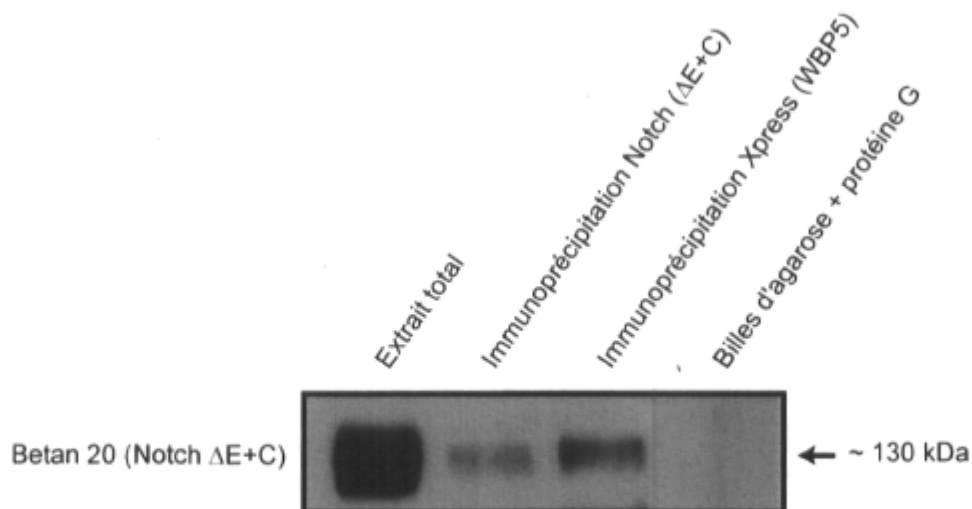


Figure 3.17 Co-immunoprécipitation de Notch Δ E+C. Notch Δ E+C (~ 130 kDa), visualisée par l'immunobuvardage bTan20 : « anti-Notch » est présente dans l'extrait protéique total ainsi que dans l'extrait de sa propre immunoprécipitation. Elle est aussi présente dans l'extrait de l'immunoprécipitation de WBP5 (par Xpress). Le contrôle négatif est l'extrait protéique avec les billes d'agaroses-protéine G mais sans anticorps. L'absence de bande indique Notch Δ E+C n'interagit pas avec les billes. L'immunobuvardage a été réalisé à l'aide de l'anticorps α -Notch (BTan20-20, DHSB) dilué selon un facteur 1 : 200. L'anticorps secondaire α -chèvre (Calbiochem) est dilué selon un facteur 1 : 10000.

La co-immunoprécipitation de WBP5 par Notch Δ E+C, c'est-à-dire l'immunobuvardage inverse de celui présenté à la figure 3.17 a aussi été tenté dans des conditions similaires. Cependant aucun résultat concluant n'a encore été obtenu.

Chapitre 4 Discussion

4.1 Identification de nouveaux partenaires du complexe γ -sécrétase et d'APP

La régulation du complexe γ -sécrétase ainsi que son affinité pour ses substrats tel qu'APP, sont des sujets d'études particulièrement intéressants. D'un point de vue fondamental, l'identification de nouveaux partenaires protéiques du complexe ainsi que d'APP nous permettent d'approfondir notre compréhension de ces mécanismes, ce qui peut avoir un impact important dans la découverte de nouvelles thérapies espérant guérir la maladie d'Alzheimer.

Au cours de ce projet de recherche, des interacteurs protéiques putatifs du complexe γ -sécrétase ou d'APP ont été identifiés. Le système double hybride en levure a été utilisé pour identifier des partenaires protéiques des protéines appâts PEN-2 et APP, lors de criblages de banques d'ADNc de cerveau humain. Les protéines Ferritin L (polypeptide codant la chaîne légère de la Ferritin) et ISLR (immunoglobulin superfamily leucine rich repeat), ainsi que 4 protéines inconnues ont été pêchés avec la protéine-appât PEN-2, une sous-unité du complexe γ -sécrétase. SNW1 (SNW domain containing 1) et WBP5 (WW domain binding protein 5) ont quant à eux été pêchés à l'aide d'APP. Enfin, des interacteurs inconnus ont aussi été isolés lors des criblages. Ces derniers ne démontrant pas d'homologie avec la séquence de protéines connues dans les banques de données criblées, ils ont été mis de côté dans le cadre de ce projet. Cependant, parce qu'ils ont démontré une interaction avec une des protéines-appâts utilisées lors des criblages, il ne faut pas minimiser leur potentiel. Il sera intéressant de cribler à nouveau les différentes bases de données, à intervalle régulier, afin de vérifier si les interacteur inconnus seraient homologues à de nouvelles protéines. Il serait aussi intéressant de vérifier parallèlement s'ils possèdent une interaction avec les autres protéines étudiées dans le cadre de ce projet, comme c'est le cas des quatre interacteurs inconnus de PEN-2 qui interagissent aussi avec BACE-1.

4.1.1 Criblages avec NCT

Les deux premiers criblages ont été réalisés à l'aide de la protéine-appât Nicastrine. Le choix de NCT est expliqué par le rôle qu'elle joue dans le complexe γ -sécrétase actif. En effet, NCT servirait de récepteur pour les substrats de la γ -sécrétase (Shah, Lee et al. 2005). Cependant, des résultats préliminaires obtenus lors d'un stage effectué au laboratoire montrent que NCT n'interagit pas directement avec APP en double hybride en levure (Annexe B). Ceci suggère que NCT pourrait servir de récepteur pour les substrats de la γ -sécrétase mais par l'intermédiaire d'un partenaire protéique. De plus, il serait possible que cet intermédiaire permette de moduler l'affinité du complexe γ -sécrétase pour ses substrats, par exemple en liant seulement un substrat du complexe, ce qui en ferait une cible de choix dans le développement d'une éventuelle thérapie. Les criblages ont donc été réalisés dans l'optique d'identifier un intermédiaire modulant cette affinité. De plus, puisque NCT est une sous-unité composant la γ -sécrétase (Yu, Nishimura et al. 2000), il est possible que le criblage nous permette d'identifier une nouvelle sous-unité qui serait membre du complexe. L'extraction protéique de levure nous a permis de constater que la protéine recombinante BD-NCT s'exprime très bien dans la souche de levure AH109. Les paramètres des criblages ont été contrôlés par les titrages des librairies et calculs d'efficacités de fusions. Malheureusement, les criblages de banques d'ADNc de cerveau humain, réalisés avec NCT, ne nous ont pas permis d'identifier de candidats ayant une homologie de séquence connue. Les interacteurs inconnus ont donc été conservés pour de futures études.

4.1.2 Criblage avec PEN-2

Nous avons par la suite effectué les criblages avec PEN-2 et APP parallèlement. Le choix de PEN-2 comme protéine-appât est expliqué par son rôle de régulateur de l'endoprotéolyse de PS1 (Kim and Sisodia 2005) et parce qu'elle est une sous-unité composant la γ -sécrétase (Francis, McGrath et al. 2002). Le criblage d'une banque d'ADNc de cerveau fœtal humain a été réalisé dans le dessein d'identifier des partenaires régulant cette activité endoprotéolytique ou encore, un nouveau membre du complexe γ -sécrétase. L'extraction protéique de levure nous a permis de constater que la protéine recombinante BD-PEN-2 s'exprime elle aussi très bien dans la souche de levure AH109. Les paramètres du criblage

ont été contrôlés par le titrage de la librairie, qui respecte les normes de la compagnie Clontech ($> 10^7$), ainsi que le calcul d'efficacité de fusion. Ce dernier était cependant insuffisant ($< 2\%$). Il est donc probable qu'un certain nombre d'interacteurs potentiels de PEN-2, n'aient pu être criblés. Quoi qu'il en soit, le criblage de la banque d'ADNc de cerveau fœtal humain a permis l'identification de deux partenaires potentiels du complexe γ -sécrétase : Ferritin L et ISLR (dont l'extrémité C-terminale a été pêchée avec PEN-2), ainsi que 4 protéines inconnues.

Les analyses de double hybride en levure, réalisées sur les candidats inconnus # 9, 12, 19 et 23 pêchés avec PEN-2, ont démontré que les candidats interagissaient directement avec BACE-1 en plus de PEN-2. Cependant, l'absence d'homologie de séquence avec des protéines connues ne nous permet pas de déduire la fonction jouée par ces candidats et le rôle probable de leur interaction avec PEN-2 et BACE-1. Malgré ce fait, et puisque les protéines interagissent directement avec une composante de la γ -sécrétase ainsi qu'avec BACE-1, mais pas avec APP ou les autres sous-unités du complexe γ -sécrétase, il est possible de déduire que les candidats identifiés pourraient être des substrats de ces sécrétases. Une identification plus poussée des protéines sera cependant nécessaire avant de poursuivre cette voie.

4.1.2.1 Ferritin L

La Ferritin est une protéine d'entreposage du fer intracellulaire. Elle est composée de 24 sous-unités, lourdes ou légères, qui forment une « nanocage ». Le gène Ferritin L code pour la chaîne légère de cette protéine (Harrison and Arosio 1996). Il est situé sur le chromosome 11q12-q13. Les sous-unités lourdes et légères de la Ferritin ont une structure semblable et montrent au-delà de 50 % d'homologie de séquence (Boyd, Vecoli et al. 1985). La chaîne lourde de la ferritin (FTH1) (~ 21 kDa), possède l'activité catalytique « ferroxidase » et est le principal régulateur de l'activité de la Ferritin, alors que la Ferritin L (~ 19 kDa), facilite la nucléation du fer à la surface de la cavité en exposant ses résidus acides (Harrison and Arosio 1996). Les modèles murins montrent que l'absence du gène codant FTH1 est létale (Ferreira, Bucchini et al. 2000). De plus, des mutations retrouvées dans les gènes codant les chaînes lourdes et légères de la Ferritin sont associées à plusieurs

maladies telle que l'hyperferritinémie, (Curtis, Fey et al. 2001; Roetto, Bosio et al. 2002) soulignant l'importance de cette protéine. Alors que les mutations associées au gène FTH1 ne causent pas de symptômes neurologiques, une des mutations dans le gène codant la Ferritin L a été associée aux ferritinopathies (Vidal, Ghetti et al. 2004), et à la maladie de Parkinson (Chen, Langston et al. 2002). Cette association implique donc la régulation du fer dans le maintien de l'homéostasie neuronale.

Le fer est le principal métal dans le cerveau. Il est impliqué dans plusieurs processus neuronaux dont la synthèse des neurotransmetteurs et la myélination des axones. Dans plusieurs maladies neurodégénératives, une accumulation de fer est observé dans les régions associées avec un perte de fonction et une perte cellulaire. Il a d'ailleurs été suggéré qu'une dysfonction de la Ferritin était associée à la maladie d'Alzheimer (Quintana, Bellefqih et al. 2006).

À première vue, l'identification de la chaîne légère de la Ferritin comme partenaire probable de PEN-2 est prometteuse. Tel que mentionné préalablement, cette protéine est une sous-unité de la protéine responsable de l'entreposage du fer intracellulaire. Un défaut de fonctionnement de cette sous-unité a été associé a diverses maladies, dont des ferritinopathies, la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer. La relation de cette protéine avec le complexe γ -sécrétase par l'intermédiaire de PEN-2 emmène donc à examiner plus attentivement le rôle du fer dans la maladie d'Alzheimer. Malheureusement l'interaction entre PEN-2 et Ferritin L s'est avérée négative, à la suite d'analyse en double hybride en levure et par co-immunoprécipitation des protéines exprimées dans une lignée cellulaire humaine. Ces analyses ont été réalisées à l'aide de vecteurs exprimant Ferritin L selon le bon cadre de lecture (2^e). La reconstitution du facteur de transcription Gal-4 lors des essais préliminaires de double hybride en levure, est donc vraisemblablement associée à la traduction de la protéine inconnue, codée par l'ADNc du candidat # 23 (1^{er} cadre de lecture) identifié lors du criblage avec PEN-2, et non à la traduction de la Ferritin L (2^e cadre de lecture).

4.1.2.2 ISLR : Un nouveau membre du complexe ?

ISLR (Immunoglobuline superfamily leucine rich repeat), identifiée en 1997, est un membre de la superfamille des immunoglobulines. Son gène situé sur le chromosome 15q23-q24, encode 2 transcrits alternatifs ayant des 1^{er} exons différents, mais puisque que le cadre de lecture ouvert se trouve à l'intérieur du second exon les deux transcrits codent la même protéine (Nagasawa, Kudoh et al. 1999). La protéine codée (~ 46 kDa) est une protéine transmembranaire de type 1 et possède des répétitions riches en leucines flanquées de séquences conservées, ainsi qu'un domaine de type C2 « immunoglobulin (Ig)-like ». Ces domaines sont importants pour l'interaction protéine-protéine et l'adhésion cellulaire. De plus, il a été suggéré que la protéine homologue de ISLR chez la Drosophile c'est-à-dire la protéine « slit » serait essentielle au développement du système nerveux central chez cet organisme (Nagasawa, Kubota et al. 1997).

Le peu de littérature disponible sur ISLR compromet la tâche de proposer un rôle putatif pour la protéine, relié à son interaction avec le complexe γ -sécrétase. Les propriétés structurales de ISLR permettent de suggérer à première vue que cette protéine pourrait être un substrat de la γ -sécrétase. Il serait alors pertinent de vérifier si ISLR est clivée en présence du complexe γ -sécrétase actif. Cependant, les analyses de double hybride en levure révèlent qu'ISLR interagit directement avec PEN-2, mais aussi avec APH-1, et PS1 N-terminal. La co-immunoprécipitation de PS1 avec ISLR, surexprimées dans une lignée cellulaire, confirme l'interaction de ces protéines. À la lumière de ces résultats, il est séduisant de proposer que ISLR est peut-être un membre du complexe γ -sécrétase et non un substrat. Hypothétiquement, ISLR serait présent dans le complexe γ -sécrétase mature puisqu'elle se lie avec 3 des sous-unités du complexe, dont PEN-2 qui est la dernière sous-unité à se joindre au complexe (LaVoie, Fraering et al. 2003). L'absence d'interaction directe avec NCT est peut-être expliquée par le fait que les deux protéines ne se retrouvent pas à proximité dans le complexe. Cependant, il demeure incertain si le complexe γ -sécrétase contenant ISLR est le complexe γ -sécrétase impliqué dans le métabolisme d'APP. Tel que mentionné précédemment, il existe différents types de complexes γ -sécrétase contenant différents variants des protéines PS1 et APH-1 (Lai, Chen et al. 2003; Shirotani, Edbauer et al. 2004). Ainsi, afin de s'assurer que le complexe γ -sécrétase contenant ISLR

est impliqué dans le métabolisme d'APP, il faut vérifier l'impact de la présence ou de l'absence de la protéine sur la production d'A β .

Le rôle putatif de ISLR dans l'adhésion cellulaire permettrait aussi d'associer un défaut de l'adhésion des cellules, à la mort neuronale et synaptique retrouvée dans la maladie d'Alzheimer. Les molécules d'adhésion neuronales, membre de la superfamilles des immunoglobuline, sont impliquées dans la croissance et maturation des cellules neuronales, la croissance des neurites, la guidance des axones et la plasticité synaptique (Dalva, McClelland et al. 2007).

4.1.3 Criblage avec APP

Le criblage avec APP est effectué dans le dessein d'identifier un partenaire protéique d'APP qui servirait de lien entre le complexe γ -sécrétase et son substrat. Puisque le criblage est réalisé avec APP comme protéine-appât, il est possible de découvrir un partenaire modulant l'affinité du complexe γ -sécrétase seulement pour APP et non les autres substrats de la γ -sécrétase. De plus, les partenaires potentiels d'APP, révélés par le criblage, peuvent nous en apprendre davantage sur la régulation du métabolisme d'APP ou sur les rôles putatifs d'AICD qui est relâché après le clivage protéolytique d'APP par le complexe γ -sécrétase (Steiner and Haass 2000). Le criblage avec APP à été réalisé sur une banque d'ADNc de cerveau fœtal humain. L'extraction protéique de levure nous a permis de constater que la protéine recombinante BD-APP s'exprime très bien dans la souche de levure AH109. Les paramètres du criblage ont été contrôlés premièrement par le titrage de la librairie. Même si ce dernier est légèrement inférieur à la norme spécifiée par la compagnie Clontech ($< 10^7$), la possibilité de cribler un interacteur potentiel est élevée. De plus, le calcul d'efficacité de fusion, qui lui est supérieur au pourcentage recommandé, nous assure qu'un grand nombre de clones est criblé. Le criblage de la banque d'ADNc de cerveau fœtal humain avec APP a permis l'identification de deux partenaires potentiels d'APP : SNW1 et WBP5.

4.1.3.1 SNW1 : Corégulateur d'AICD ?

Le gène codant SNW1 (SNW domain containing 1) est membre de la famille des gènes SNW et code un co-activateur de la transcription de certain promoteur de type pol II. La protéine codée par SNW1 (~ 62 kDa) est aussi appelée SKIP (ski-interacting protein) ou NCoA62 (nuclear co-activator-62). Elle possède un motif SNWKN hautement conservé, de la levure à l'humain (Folk, Puta et al. 1996; Baudino, Kraichely et al. 1998; Dahl, Wani et al. 1998), et des sites de phosphorylation.

SNW/SKIP est membre de complexes de régulation nucléaire, et interagit avec des facteurs impliqués dans la préinitiation, l'épissage et la polyadénylation. Il a été montré qu'elle interagissait directement avec certains types de facteurs de transcription et modulerait leur activité (Folk, Puta et al. 2004). SNW/SKIP interagit entre autres avec le domaine intracellulaire de Notch (NICD) via les répétitions ankyrines de ce dernier (Zhou, Fujimuro et al. 2000).

L'analyse des interactions de SNW1 avec APP mais aussi avec les composantes du complexe γ -sécrétase à l'aide du système de double hybride en levure montre que SNW1 interagit directement avec APP. La co-immunoprécipitation de SNW1 par APP confirme cette interaction, dans un modèle se rapprochant du contexte physiologique. Cependant contrairement au poids moléculaire attendu de ~ 62 kDa, SNW1 migre sur gel de polyacrylamide à une taille apparente de ~ 80 kDa, ce qui indique la présence probable de modifications post-traductionnelles. Il est aussi possible que la charge nette de la protéine influence son degré de liaison au SDS et altère ainsi la migration de la protéine dans un gel SDS-PAGE (Matagne, Joris et al. 1991).

L'identification de SNW1 comme partenaire potentiel d'APP ouvre la porte à de nombreuses hypothèses. Premièrement, SNW1 code une protéine impliquée dans la régulation nucléaire, et modulerait l'activité de certains facteurs de transcription. Puisqu'il a été suggéré dans la littérature que le domaine intracellulaire d'APP, AICD, jouerait ce rôle, la présence d'une interaction directe entre les deux protéines nous permet de soutenir cette hypothèse, et donc suggérer un rôle de facteur de transcription pour AICD, dont l'activité serait régulée par SNW1. De plus, cette hypothèse est supportée par l'analogie

existant entre AICD et le domaine intracellulaire de Notch, puisque NICD, qui est un facteur de transcription connu, interagit avec SNW1 qui facilite l'activité de ce dernier (Zhou, Fujimuro et al. 2000).

D'un autre point de vue, les analyses de double hybride en levure montrent qu'en plus d'interagir avec APP, SNW1 se lie directement avec le complexe γ -sécrétase par l'intermédiaire de la boucle cytoplasmique de PS1. Cette interaction signifie peut-être que SNW1 est un intermédiaire reliant la γ -sécrétase à son substrat et module l'affinité de l'enzyme. L'affinité du complexe γ -sécrétase pour APP, modulée par SNW1, pourrait avoir un impact sur les niveaux de A β 42.

4.1.3.2 WBP5 : Le chaînon manquant ?

WBP5 (WW domain binding protein 5) code une protéine de ~ 10 kDa possédant un domaine formé de 38 à 40 acides aminés impliqué dans l'interaction protéine-protéine via la liaison de ligands riche en proline (Bedford, Chan et al. 1997). Elle possède aussi un domaine ayant des similarités avec le facteur d'élongation de la transcription A de la famille SII. Le gène, situé sur le chromosome Xq22.1-q22.2 est transcrit en 4 variants, résultants d'épissages alternatifs. Ces derniers codent cependant une seule isoforme de la protéine (Strausberg, Feingold et al. 2002).

L'analyse des interactions de WBP5 avec APP ainsi qu'avec les composantes du complexe γ -sécrétase à l'aide du système de double hybride en levure montre que WBP5 interagit directement avec APP et avec la boucle cytoplasmique de PS1. La co-immunoprécipitation de WBP5 par APP confirme cette interaction dans un modèle se rapprochant du contexte physiologique. Cependant contrairement au poids moléculaire attendu de ~ 10 kDa, WBP5 migre sur gel de polyacrylamide à une taille apparente de ~ 30 kDa, ce qui indique vraisemblablement la présence de modifications post-traductionnelles.

Tel que mentionné précédemment, WBP5 possède un domaine de 38 à 40 acides aminés impliqué dans l'interaction protéine-protéine. Cette fonction fait de WBP5 un candidat idéal pour moduler l'affinité du complexe γ -sécrétase envers APP. Cependant, des essais de co-immunoprécipitation de WBP5 par Notch Δ E+C montrent que WBP5 interagit aussi

avec Notch. Ainsi, si WBP5 possède la fonction de moduler l'affinité du complexe γ -sécrétase pour ses substrats, cette modulation n'est pas unique à APP, comme le suggère l'interaction avec Notch. WBP5 pourrait donc avoir un impact sur les niveaux de A β 42, mais aussi sur la voie de Notch.

Chapitre 5 Conclusions et perspectives

Le principal objectif de ce projet était d'identifier un partenaire protéique du complexe γ -sécrétase ou d'APP qui modulerait l'affinité du complexe γ -sécrétase pour ce substrat uniquement. Les objectifs secondaires étaient d'identifier un nouveau membre du complexe γ -sécrétase ou un partenaire d'APP qui régulerait l'action de cette dernière ou de ces dérivés.

Les criblages de banques d'ADNc de cerveau humain par la méthode du double hybride en levure ont permis l'identification de trois partenaires prometteurs. ISLR pourrait être un membre du complexe γ -sécrétase. SNW1 serait quant à lui un co-régulateur de la fonction de facteur de transcription d'AICD ou une protéine responsable de l'interaction protéine-protéine entre le complexe γ -sécrétase et ses substrats. Finalement, WBP5 pourrait être un partenaire modulant l'affinité du complexe γ -sécrétase pour ses substrats.

Bien que les résultats obtenus lors de ce projet soient préliminaires, ils permettent de suggérer de nombreuses hypothèses, intéressantes à approfondir. La présence d'ISLR dans le complexe pourra être confirmée à l'aide d'essai de co-immunoprécipitation avec les autres sous-unités du complexe, ainsi que des études de co-localisations. Le rôle de la protéine à l'intérieur du complexe pourra être vérifié en observant son effet sur la production d'A β par des tests ELISA, lors d'essai d'inhibition (interférence à l'ARN) ou de surexpression de cette protéine. Il serait aussi intéressant d'explorer les conséquences de la mutation faux-sens D90N de PEN-2 sur l'interaction entre ISLR et PEN-2.

Les rôles des protéines SNW1 et WBP5 pourront aussi être étudiés en observant l'effet sur la production d'A β lors d'essai d'inhibition ou de surexpression des protéines. Finalement, l'étude de gènes dont la littérature rapporte qu'ils sont affectés par SNW1 ou AICD permettrait d'analyser l'effet de SNW1 sur l'activité d'AICD, par exemple lors d'essais luciférase, et de confirmer le rôle de facteur de transcription d'AICD dont l'activité serait régulée par SNW1. La luciférase est un gène rapporteur couramment utilisé grâce auquel l'effet de SNW1, sur AICD est ses cibles peut être visualisé par bioluminescence.

Annexe A

Extraction d'ARN

L'amplification du gène complet ISLR est réalisée sur une banque d'ADNc préparée à partir d'ARNm extrait de cellules TsA201. Cette étape est nécessaire car le clone pêché lors du criblage avec PEN-2 ne représente qu'un fragment C-terminal d'environ 200 paires de base du gène ISLR.

Les cellules TsA201 sont incubées dans du DMEM contenant 10 % de FBS inactivé, jusqu'à ce qu'elles atteignent 100 % de confluence. Elles sont resuspendues dans 1 mL de trizol (Invitrogen™), transférées dans un eppendorf et incubées à température pièce 5 min, ce qui permet la dissociation des nucléoprotéines. Un volume de 200 µL de chloroforme (Laboratoire MAT) est ajouté et le mélange agité vigoureusement 15 sec avant d'être incubé 2-3 min à température pièce. Une centrifugation de 15 min à 13000 rpm à 4°C permet de séparer la phase aqueuse, qui est transférée dans un nouvel eppendorf et mélangée à 500 µL d'isopropanol. L'isopropanol précipite l'ARN qui est centrifugé 10 min 13000 rpm. Le culot d'ARN est lavé avec 350 µL d'éthanol 70 % et centrifugé de nouveau 10 min à 13000 rpm. L'ARN est séché à l'air libre et resuspendu dans 50 µL d'H₂O et conservé à -20°C.

Transcriptase inverse

La réaction de transcriptase inverse transforme l'ARN extrait des cellules TsA201 en ADNc, sur lequel sera performé le PCR permettant d'amplifier le gène ISLR. La densité optique de l'ARN est mesurée à une longueur d'onde de 260 nm afin de connaître la concentration de l'échantillon. Un volume représentant 2 µg d'ARN est prélevé et ajouté à 2 µL d'oligos dT 0,1 µg/µL (Amersham), dans un volume total de 29 µL (compléter avec de l'H₂O). Le mélange est incubé 10 min à 70°C dans l'appareil « PCR system 2700 » (GeneAmp®). Lorsque l'incubation est terminée, les réactifs suivants sont ajoutés :

10 µL de tampon 5X
5 µL de DTT 0,1 M
2,5 µL de dNTPs 10 mM

Le mélange réactionnel est alors incubé 2 min à 42°C et 1 µL d'enzyme reverse transcriptase SuperScript® III (Invitrogen™) y est ajouté par la suite. L'incubation à 42°C se poursuit pour 50 min. Finalement, une incubation de 15 min à 70°C est nécessaire pour inactiver l'enzyme. L'amplification PCR peut alors être réalisée. (section 2.1.1)

Annexe B

Analyse de l'interaction entre NCT et APP

Au cours d'un stage réalisé au laboratoire à l'été 2004, des co-transformations de levures impliquant les protéines NCT et APP ont été réalisées dans le dessein de vérifier si elles interagissaient directement ; et ce à l'aide du système de double hybride.

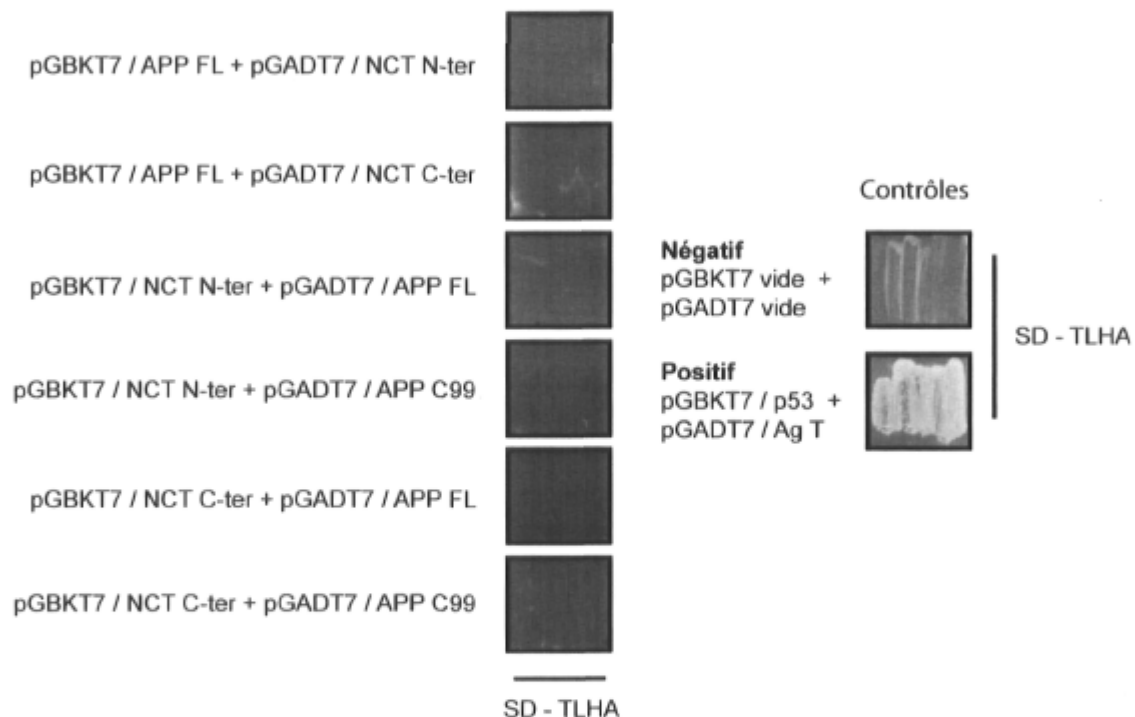


Figure A : Analyse des interactions protéiques entre NCT (N et C-terminal) et APP (FL et C99). NCT N-ter inclut les paires de bases 1-492, alors que NCT C-ter représente les paires de bases 499-2127 (fin) de l'ADNc de NCT. APP C99 est le fragment C-terminal de 99 résidus produit par le clivage de BACE-1. L'absence de croissance sur milieu sélectif SD -TLHA indique que le facteur de transcription Gal-4 n'est pas reconstitué par l'interaction des protéines NCT et APP. Le contrôle d'interaction négative : pGBKT7 vide et pGADT7 vide et le contrôle d'interaction positive : « pGBKT7 / p53 » + « pGADT7 / Ag T ».

Cette expérience de double hybride nous a permis de conclure que les protéines NCT et APP n'interagissent pas directement.

Bibliographie

- American Psychiatric Association. "Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders", Fourth Edition. Washington, DC. American Psychiatric Association.
- Alzheimer, A., R. A. Stelzmann, et al. (1995). "An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde"." Clin Anat **8**(6): 429-31.
- Annaert, W. and B. De Strooper (1999). "Presenilins: molecular switches between proteolysis and signal transduction." Trends Neurosci **22**(10): 439-43.
- Annaert, W. and B. De Strooper (2002). "A cell biological perspective on Alzheimer's disease." Annu Rev Cell Dev Biol **18**: 25-51.
- Arendt, T. (2004). "Neurodegeneration and plasticity." Int J Dev Neurosci **22**(7): 507-14.
- Baudino, T. A., D. M. Kraichely, et al. (1998). "Isolation and characterization of a novel coactivator protein, NCoA-62, involved in vitamin D-mediated transcription." J Biol Chem **273**(26): 16434-41.
- Bedford, M. T., D. C. Chan, et al. (1997). "FBP WW domains and the Abl SH3 domain bind to a specific class of proline-rich ligands." Embo J **16**(9): 2376-83.
- 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.
- Bergman, A., E. M. Hansson, et al. (2004). "Pen-2 is sequestered in the endoplasmic reticulum and subjected to ubiquitylation and proteasome-mediated degradation in the absence of presenilin." J Biol Chem **279**(16): 16744-53.
- Birks, J. (2006). "Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease." Cochrane Database Syst Rev(1): CD005593.
- Blennow, K., M. J. de Leon, et al. (2006). "Alzheimer's disease." Lancet **368**(9533): 387-403.
- Boyd, D., C. Vecoli, et al. (1985). "Structural and functional relationships of human ferritin H and L chains deduced from cDNA clones." J Biol Chem **260**(21): 11755-61.
- Brown, M. S., J. Ye, et al. (2000). "Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans." Cell **100**(4): 391-8.
- Buxbaum, J. D., K. N. Liu, et al. (1998). "Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor." J Biol Chem **273**(43): 27765-7.

- 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.
- Capell, A., C. Kaether, et al. (2003). "Nicastrin interacts with gamma-secretase complex components via the N-terminal part of its transmembrane domain." J Biol Chem **278**(52): 52519-23.
- Chen, F., H. Hasegawa, et al. (2006). "TMP21 is a presenilin complex component that modulates gamma-secretase but not epsilon-secretase activity." Nature **440**(7088): 1208-12.
- Chen, R., J. W. Langston, et al. (2002). "Screening of ferritin light polypeptide 460-461InsA mutation in Parkinson's disease patients in North America." Neurosci Lett **335**(2): 144-6.
- Crystal, A. S., V. A. Morais, et al. (2004). "Presenilin modulates Pen-2 levels posttranslationally by protecting it from proteasomal degradation." Biochemistry **43**(12): 3555-63.
- Crystal, A. S., V. A. Morais, et al. (2003). "Membrane topology of gamma-secretase component PEN-2." J Biol Chem **278**(22): 20117-23.
- Curtis, A. R., C. Fey, et al. (2001). "Mutation in the gene encoding ferritin light polypeptide causes dominant adult-onset basal ganglia disease." Nat Genet **28**(4): 350-4.
- Dahl, R., B. Wani, et al. (1998). "The Ski oncoprotein interacts with Skip, the human homolog of Drosophila Bx42." Oncogene **16**(12): 1579-86.
- Daigle, I. and C. Li (1993). "apl-1, a Caenorhabditis elegans gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(24): 12045-9.
- Dalva, M. B., A. C. McClelland, et al. (2007). "Cell adhesion molecules: signalling functions at the synapse." Nat Rev Neurosci **8**(3): 206-20.
- De Strooper, B. (2003). "Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex." Neuron **38**(1): 9-12.
- De Strooper, B. and W. Annaert (2000). "Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein." J Cell Sci **113** (Pt 11): 1857-70.
- Dillen, K. and W. Annaert (2006). "A two decade contribution of molecular cell biology to the centennial of Alzheimer's disease: are we progressing toward therapy?" Int Rev Cytol **254**: 215-300.
- Dominguez, D. I., D. Hartmann, et al. (2004). "BACE1 and presenilin: two unusual aspartyl proteases involved in Alzheimer's disease." Neurodegener Dis **1**(4-5): 168-74.

- Dyrks, T., A. Weidemann, et al. (1988). "Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease." Embo J **7**(4): 949-57.
- 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.
- Edbauer, D., E. Winkler, et al. (2003). "Reconstitution of gamma-secretase activity." Nat Cell Biol **5**(5): 486-8.
- Ehehalt, R., P. Keller, et al. (2003). "Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts." J Cell Biol **160**(1): 113-23.
- Esler, W. P. and M. S. Wolfe (2001). "A portrait of Alzheimer secretases--new features and familiar faces." Science **293**(5534): 1449-54.
- Evans, D. A., L. A. Beckett, et al. (1997). "Apolipoprotein E epsilon4 and incidence of Alzheimer disease in a community population of older persons." Jama **277**(10): 822-4.
- Farrer, L. A., L. A. Cupples, et al. (1997). "Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium." Jama **278**(16): 1349-56.
- Ferreira, C., D. Bucchini, et al. (2000). "Early embryonic lethality of H ferritin gene deletion in mice." J Biol Chem **275**(5): 3021-4.
- Folk, P., F. Puta, et al. (1996). "The homolog of chromatin binding protein Bx42 identified in Dictyostelium." Gene **181**(1-2): 229-31.
- Folk, P., F. Puta, et al. (2004). "Transcriptional coregulator SNW/SKIP: the concealed tie of dissimilar pathways." Cell Mol Life Sci **61**(6): 629-40.
- 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.
- 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.
- Goate, A., M. C. Chartier-Harlin, et al. (1991). "Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease." Nature **349**(6311): 704-6.

- Goldstein, L. S. (2001). "Kinesin molecular motors: transport pathways, receptors, and human disease." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 6999-7003.
- Goutte, C., M. Tsunozaki, et al. (2002). "APH-1 is a multipass membrane protein essential for the Notch signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* embryos." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(2): 775-9.
- 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.
- Haass, C., M. G. Schlossmacher, et al. (1992). "Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism." Nature **359**(6393): 322-5.
- Haass, C. and H. Steiner (2002). "Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases." Trends Cell Biol **12**(12): 556-62.
- Hardy, J. and D. J. Selkoe (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics." Science **297**(5580): 353-6.
- Harrison, P. M. and P. Arosio (1996). "The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation." Biochim Biophys Acta **1275**(3): 161-203.
- Harvey, R. J., M. Skelton-Robinson, et al. (2003). "The prevalence and causes of dementia in people under the age of 65 years." J Neurol Neurosurg Psychiatry **74**(9): 1206-9.
- Hebert, S. S., C. Godin, et al. (2003). "Oligomerization of human presenilin-1 fragments." FEBS Lett **550**(1-3): 30-4.
- Henricson, A., L. Kall, et al. (2005). "A novel transmembrane topology of presenilin based on reconciling experimental and computational evidence." Febs J **272**(11): 2727-33.
- Ikin, A. F., S. L. Sabo, et al. (2007). "A macromolecular complex involving the amyloid precursor protein (APP) and the cytosolic adapter FE65 is a negative regulator of axon branching." Mol Cell Neurosci.
- Jarrett, J. T., E. P. Berger, et al. (1993). "The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease." Biochemistry **32**(18): 4693-7.
- 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.
- Kehoe, P., F. Wavrant-De Vrieze, et al. (1999). "A full genome scan for late onset Alzheimer's disease." Hum Mol Genet **8**(2): 237-45.

- Kim, S. H. and S. S. Sisodia (2005). "A sequence within the first transmembrane domain of PEN-2 is critical for PEN-2-mediated endoproteolysis of presenilin 1." J Biol Chem **280**(3): 1992-2001.
- Kim, S. H. and S. S. Sisodia (2005). "Evidence that the "NF" motif in transmembrane domain 4 of presenilin 1 is critical for binding with PEN-2." J Biol Chem **280**(51): 41953-66.
- 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.
- Kowalska, A. (2004). "Genetic basis of neurodegeneration in familial Alzheimer's disease." Pol J Pharmacol **56**(2): 171-8.
- Lai, M. T., E. Chen, et al. (2003). "Presenilin-1 and presenilin-2 exhibit distinct yet overlapping gamma-secretase activities." J Biol Chem **278**(25): 22475-81.
- Larner, A. J. and M. Doran (2006). "Clinical phenotypic heterogeneity of Alzheimer's disease associated with mutations of the presenilin-1 gene." J Neurol **253**(2): 139-58.
- Laudon, H., E. M. Hansson, et al. (2005). "A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1." J Biol Chem **280**(42): 35352-60.
- Laudon, H., P. M. Mathews, et al. (2004). "Co-expressed presenilin 1 NTF and CTF form functional gamma-secretase complexes in cells devoid of full-length protein." J Neurochem **89**(1): 44-53.
- LaVoie, M. J., P. C. Fraering, et al. (2003). "Assembly of the gamma-secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin." J Biol Chem **278**(39): 37213-22.
- Lee, S. F., S. Shah, et al. (2004). "A conserved GXXXG motif in APH-1 is critical for assembly and activity of the gamma-secretase complex." J Biol Chem **279**(6): 4144-52.
- Levitan, D., J. Lee, et al. (2001). "PS1 N- and C-terminal fragments form a complex that functions in APP processing and Notch signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(21): 12186-90.
- Li, J., G. J. Fici, et al. (2003). "Positive and negative regulation of the gamma-secretase activity by nicastrin in a murine model." J Biol Chem **278**(35): 33445-9.
- 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, T., G. Ma, et al. (2003). "Nicastrin is required for assembly of presenilin/gamma-secretase complexes to mediate Notch signaling and for processing and trafficking of beta-amyloid precursor protein in mammals." *J Neurosci* **23**(8): 3272-7.
- Li, Y. M., M. T. Lai, et al. (2000). "Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(11): 6138-43.
- 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, L., T. Tully, et al. (1992). "Human amyloid precursor protein ameliorates behavioral deficit of flies deleted for *App* gene." *Neuron* **9**(4): 595-605.
- 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.
- Ma, G., T. Li, et al. (2005). "APH-1a is the principal mammalian APH-1 isoform present in gamma-secretase complexes during embryonic development." *J Neurosci* **25**(1): 192-8.
- Mandelkow, E. M. and E. Mandelkow (1998). "Tau in Alzheimer's disease." *Trends Cell Biol* **8**(11): 425-7.
- Martins, I. J., E. Hone, et al. (2006). "Apolipoprotein E, cholesterol metabolism, diabetes, and the convergence of risk factors for Alzheimer's disease and cardiovascular disease." *Mol Psychiatry* **11**(8): 721-36.
- Masters, C. L., G. Multhaup, et al. (1985). "Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels." *Embo J* **4**(11): 2757-63.
- Matagne, A., B. Joris, et al. (1991). "Anomalous behaviour of a protein during SDS/PAGE corrected by chemical modification of carboxylic groups." *Biochem J* **280** (Pt 2): 553-6.
- Mayeux, R. (2003). "Epidemiology of neurodegeneration." *Annu Rev Neurosci* **26**: 81-104.

- Mumm, J. S. and R. Kopan (2000). "Notch signaling: from the outside in." Dev Biol **228**(2): 151-65.
- Nagasawa, A., R. Kubota, et al. (1997). "Cloning of the cDNA for a new member of the immunoglobulin superfamily (ISLR) containing leucine-rich repeat (LRR)." Genomics **44**(3): 273-9.
- Nagasawa, A., J. Kudoh, et al. (1999). "Human and mouse ISLR (immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat) genes: genomic structure and tissue expression." Genomics **61**(1): 37-43.
- Niimura, M., N. Isoo, et al. (2005). "Aph-1 contributes to the stabilization and trafficking of the gamma-secretase complex through mechanisms involving intermolecular and intramolecular interactions." J Biol Chem **280**(13): 12967-75.
- Oh, Y. S. and R. J. Turner (2005). "Evidence that the COOH terminus of human presenilin 1 is located in extracytoplasmic space." Am J Physiol Cell Physiol **289**(3): C576-81.
- Okado, H. and H. Okamoto (1992). "A *Xenopus* homologue of the human beta-amyloid precursor protein: developmental regulation of its gene expression." Biochem Biophys Res Commun **189**(3): 1561-8.
- Parks, A. L. and D. Curtis (2007). "Presenilin diversifies its portfolio." Trends Genet **23**(3): 140-50.
- Podlisny, M. B., M. Citron, et al. (1997). "Presenilin proteins undergo heterogeneous endoproteolysis between Thr291 and Ala299 and occur as stable N- and C-terminal fragments in normal and Alzheimer brain tissue." Neurobiol Dis **3**(4): 325-37.
- Prokop, S., K. Shirotani, et al. (2004). "Requirement of PEN-2 for stabilization of the presenilin N-/C-terminal fragment heterodimer within the gamma-secretase complex." J Biol Chem **279**(22): 23255-61.
- Quintana, C., S. Bellefqih, et al. (2006). "Study of the localization of iron, ferritin, and hemosiderin in Alzheimer's disease hippocampus by analytical microscopy at the subcellular level." J Struct Biol **153**(1): 42-54.
- Ratovitski, T., H. H. Slunt, et al. (1997). "Endoproteolytic processing and stabilization of wild-type and mutant presenilin." J Biol Chem **272**(39): 24536-41.
- Reinhard, C., S. S. Hebert, et al. (2005). "The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function." Embo J **24**(23): 3996-4006.
- Roetto, A., S. Bosio, et al. (2002). "Pathogenesis of hyperferritinemia cataract syndrome." Blood Cells Mol Dis **29**(3): 532-5.

- Rogaev, E. I., R. Sherrington, et al. (1995). "Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene." Nature **376**(6543): 775-8.
- 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.
- Scheuner, D., C. Eckman, et al. (1996). "Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease." Nat Med **2**(8): 864-70.
- Seubert, P., C. Vigo-Pelfrey, et al. (1992). "Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids." Nature **359**(6393): 325-7.
- Shah, S., S. F. Lee, et al. (2005). "Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor." Cell **122**(3): 435-47.
- 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.
- Shirotani, K., D. Edbauer, et al. (2004). "Identification of distinct gamma-secretase complexes with different APH-1 variants." J Biol Chem **279**(40): 41340-5.
- 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.
- Slooter, A. J., M. Cruts, et al. (1998). "Risk estimates of dementia by apolipoprotein E genotypes from a population-based incidence study: the Rotterdam Study." Arch Neurol **55**(7): 964-8.
- Steiner, H. and C. Haass (2000). "Intramembrane proteolysis by presenilins." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(3): 217-24.
- Steiner, H., E. Winkler, et al. (2002). "PEN-2 is an integral component of the gamma-secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin." J Biol Chem **277**(42): 39062-5.
- Strausberg, R. L., E. A. Feingold, et al. (2002). "Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(26): 16899-903.
- 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.
- Takasugi, N., T. Tomita, et al. (2003). "The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex." Nature **422**(6930): 438-41.

- Teipel, S. J. and H. Hampel (2006). "Neuroanatomy of Down syndrome in vivo: a model of preclinical Alzheimer's disease." Behav Genet **36**(3): 405-15.
- Thinakaran, G., D. R. Borchelt, et al. (1996). "Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo." Neuron **17**(1): 181-90.
- Tol, J., G. Roks, et al. (1999). "Genetic and environmental factors in Alzheimer's disease." Rev Neurol (Paris) **155 Suppl 4**: S10-6.
- Vas, C. J., S. Rajkumar, et al. (2001). Alzheimer's Disease : The Brain Killer. World Health organization.
- 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.
- Vidal, R., B. Ghetti, et al. (2004). "Intracellular ferritin accumulation in neural and extraneural tissue characterizes a neurodegenerative disease associated with a mutation in the ferritin light polypeptide gene." J Neuropathol Exp Neurol **63**(4): 363-80.
- 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 Rotz, R. C., B. M. Kohli, et al. (2004). "The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor." J Cell Sci **117**(Pt 19): 4435-48.
- Walsh, D. M., A. M. Minogue, et al. (2007). "The APP family of proteins: similarities and differences." Biochem Soc Trans **35**(Pt 2): 416-20.
- Walter, J., C. Kaether, et al. (2001). "The cell biology of Alzheimer's disease: uncovering the secrets of secretases." Curr Opin Neurobiol **11**(5): 585-90.
- Weidemann, A., G. König, et al. (1989). "Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein." Cell **57**(1): 115-26.
- 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.
- Wolfe, M. S., W. Xia, et al. (1999). "Peptidomimetic probes and molecular modeling suggest that Alzheimer's gamma-secretase is an intramembrane-cleaving aspartyl protease." Biochemistry **38**(15): 4720-7.

- 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.
- 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.
- Yang, D. S., A. Tandon, et al. (2002). "Mature glycosylation and trafficking of nicastrin modulate its binding to presenilins." J Biol Chem **277**(31): 28135-42.
- Yu, G., M. Nishimura, et al. (2000). "Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing." Nature **407**(6800): 48-54.
- Zhang, J., D. E. Kang, et al. (1998). "Subcellular distribution and turnover of presenilins in transfected cells." J Biol Chem **273**(20): 12436-42.
- Zhou, S., M. Fujimuro, et al. (2000). "SKIP, a CBF1-associated protein, interacts with the ankyrin repeat domain of Notch1C To facilitate Notch1C function." Mol Cell Biol **20**(7): 2400-10.
- Zubenko, G. S., H. B. Hughes, et al. (1998). "A genome survey for novel Alzheimer disease risk loci: results at 10-cM resolution." Genomics **50**(2): 121-8.