

Université de Sherbrooke

**LES MUTANTS DE LA PRÉSÉNILINE 2 CAUSANT LA MALADIE
D'ALZHEIMER DIMINUENT L'ACTIVITÉ DU RÉCEPTEUR À L'IP3 DANS LES
CELLULES SH-SY5Y**

par

MAXIME PARADIS

Département de pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M. Sc.)

Juillet 2007



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-37918-9
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-37918-9

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

À ma famille,
Pierre, Pierrette, Francis
et à mon petit rayon de soleil.

«Le contraire d'une vérité triviale est une erreur stupide,
mais le contraire d'une vérité profonde
est toujours une autre vérité profonde.»

Niels Bohr

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
1.1 Le récepteur de l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP ₃ R)	2
1.1.1 Structure des IP ₃ Rs	4
1.1.2 Modèle d'activation de l'IP ₃ R	6
1.2 Entrée capacitative de Ca ²⁺	9
1.3 La maladie d'Alzheimer	11
1.4 La préséniline.....	12
1.4.1 Les mutants de la PS et la MA.....	17
1.4.2 Le rôle du calcium dans la MA.....	17
1.5 But de l'étude	19
MATÉRIEL ET MÉTHODE	21
2.1 Insertion d'un épitope FLAG en N-terminal de la PS2	22
2.2 Isolement et purification d'ADN	23
2.3 Sous-clonage des produits du PCR.....	24
2.4 Purification du plasmide (mini-prep).....	25
2.5 Séquençage à double brin des mini-preps.....	25
2.6 Digestion enzymatique.....	27
2.7 Amplification des mutants et de la PS2 par Maxi-preps.....	28
2.8 Culture cellulaire.....	29
2.9 Établissement de population stables de cellules SH-SY5Y exprimant PS2 et ses mutants.....	30
2.10 Transfection des cellules HEK-239T avec la lipofectamine.....	30

2.11	Mesure du Ca^{2+} intracellulaire avec des cellules en suspension.....	31
2.12	Mesure du Ca^{2+} libéré par des cellules perméabilisées à la saponine	32
2.13	Immunobuvardage	33
2.14	Immunoprécipitation.....	35
2.15	Analyse statistique	35
RÉSULTATS		37
3.1	Insertion d'un épitope FLAG dans PS2	37
3.2	Expression de FLAGPS2	37
3.3	Expression stable de FLAGPS2wt et de ses mutants dans les cellules SH-SY5Y ...	40
3.4	Effet de la PS2 sur la signalisation calcique induite par la voie G_q	42
3.5	Niveau d'expression de l' $\text{IP}_3\text{R1}$ dans les cellules SH-SY5Y	51
DISCUSSION		54
CONCLUSIONS		61
PERSPECTIVES		62
REMERCIEMENTS		63
RÉFÉRENCES		64

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Oligonucléotides utilisés pour introduire un épitope FLAG dans la PS2.....	22
Tableau 2: Relâche maximale de Ca ²⁺ induite avec 10 µM d'IP3 et affinité apparente pour la relâche de Ca ²⁺ induite par l'IP3 dans les diverses populations stables de cellules perméabilisées à la saponine.....	50

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Composantes impliquées dans la signalisation calcique dans une cellule non excitable suite à la stimulation d'un GqPCR.....	3
Figure 2: Structure de l'IP ₃ R1.	5
Figure 3: Mécanisme d'activation théorique des IP ₃ Rs.	8
Figure 4: Représentation schématique de la PS2.....	14
Figure 5: Le complexe γ -secretase.....	15
Figure 6: Séquençage des constructions d'ADNc de PS2 et ses mutants après l'insertion d'un épitope FLAG	38
Figure 7: Immunobuvardage de la protéine FLAGPS2wt surexprimée dans les cellules HEK-293T.....	39
Figure 8: Expression et maturation de la PS2 et de ses mutants dans les populations stables de cellules SH-SY5Y.	41
Figure 9: Réponse calcique des cellules SH-SY5Y exprimant PS2 ou ses mutants.....	44
Figure 10: Contenu des réserves de Ca ²⁺ du RE dans les cellules SH-SY5Y exprimant PS2 ou ses mutants.	46
Figure 11: Relâche de Ca ²⁺ induite par l'IP ₃ dans des cellules perméabilisées.	48
Figure 12: Diminution du récepteur IP ₃ R1 chez les populations stables de SH-SY5Y exprimant PS2FLAGM239V.....	52
Figure 13: Essai de co-immunoprécipitation entre l'IP ₃ R1 et PS2	53

LISTE DES ABRÉVIATIONS

APP : protéine précurseure de l'amyloïde

ATP : adénosine triphosphate

AICD : amyloïd intracellular domain

$[Ca^{2+}]_i$: concentration du calcium intracellulaire

CaM : calmoduline

CCE : l'entrée capacitative de calcium

CCh : carbachol

DAG : diacylglycérol

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMEM / F12 : Dulbecco's Modified Eagle Medium / Ham's F12

DMSO : dimethyl sulfoxide

EC₅₀: concentration efficace pour obtenir 50% de la réponse maximale

EDTA ; acide ethylenediaminetetraacétique

EGTA : acide tetraacetic éthylene glycol

FBS : Fetal Bovine Serum

FURA-2-AM ; 1-[6-Amino-2-(5-carboxy-2-oxazolyl)-5-benzofuranyloxy]- 2-(2-amino-5-methylphenoxy)éthane-N,N,N',N'-tétraacétique, pentaacetoxyméthyl ester

GDP: guanosine diphosphate

GqPCR: récepteur couplée à une protéine Gq

GTP: guanosine triphosphate

HBSS : Hanks' balanced salt solution

HEK : cellules humaines de rein (« human embryonic kidney »)

HEPES : (N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonique acide])

IP₃ : inositol 1,4,5-trisphosphate

IP₃R : récepteur à l'inositol 1,4,5-trisphosphate

LF2000 : lipofectamine 2000

MA : maladie d'Alzheimer

MAF: maladie d'Alzheimer familiale

NICD : notch intracellular domain

PBS : solution phosphate salin

PIP₂ : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PLC : phospholipase C

PMCA: plasmic membrane calcium ATPase

PMSF : inhibiteur de sérine protéase

PCR : réaction de polymérisation en chaîne

PS : préséniline

PS1 : préséniline 1

PS2 : préséniline 2

RE : Réticulum endoplasmique

RTK : récepteur tyrosine kinase

SERCA: sarcoplasmic endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump

SDS : Dodécylsulfate de sodium

SH-SY5Y : neuroblastome humain

TBS : solution tris-HCl salin

TRP : transient receptor potential

TRPC : transient receptor potential canonical

Tween : Polyoxyethylene sorbitane monolaureate

RÉSUMÉ**LES MUTANTS DE LA PRÉSÉNILINE 2 CAUSANT LA MALADIE D'ALZHEIMER DIMINUENT L'ACTIVITÉ DU RÉCEPTEUR À L'IP₃ DANS LES CELLULES SH-SY5Y**

Par

Maxime Paradis

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M. Sc.)

Le Ca²⁺ est un important second messenger régulant une grande variété de fonctions cellulaires incluant des réponses à court terme telles que la contraction et la sécrétion, et des réponses à long terme telles que la transcription de gènes, la division cellulaire et même l'apoptose. Chez les cellules non-excitables, les protéines responsables de l'élévation de Ca²⁺ intracellulaire sont les récepteurs à l'IP₃, des canaux calciques situés sur le réticulum endoplasmique, et les TRPs, des canaux calciques situés sur la membrane plasmique. Il a été rapporté que les mutations dans les présénilines causant la maladie d'Alzheimer provoquaient un dysfonctionnement de la signalisation calcique dans plusieurs types de cellules. Les mécanismes précis par lesquels les présénilines mutantes associées à la maladie d'Alzheimer influencent l'activité des principales composantes de la signalisation calcique n'ont jamais été vérifiés. Le but de mon projet de maîtrise était donc de vérifier si la préséniline 2 peut altérer l'activité de l'IP₃R1, un élément important impliqué dans la relâche calcique neuronale. Pour ce faire, nous avons produit des lignées stables de cellules SH-SY5Y exprimant la préséniline 2 ou ses mutants. Les cellules SH-SY5Y expriment exclusivement l'IP₃R1. L'activité de l'IP₃R1 fut déterminée en mesurant la relâche de Ca²⁺ par spectrofluorimétrie et l'intégrité de la protéine a été évaluée par immunoprécipitation et immunobuvardage. Nos résultats montrent que les mutants de la préséniline 2 causent une diminution de la relâche calcique dans les cellules SH-SY5Y stimulées au carbachol. Dans des cellules SH-SY5Y perméabilisées à la saponine, nous avons observé que cette diminution de la relâche calcique implique une diminution de l'affinité apparente de l'IP₃ et aussi une diminution de la relâche maximale de Ca²⁺ induite par l'IP₃. Nos études d'immunobuvardage ont montré que les mutants de la préséniline 2 diminuent l'expression de l'IP₃R1 chez les cellules SH-SY5Y. L'activité γ -secrétase de ces mutants semble impliquée dans le phénomène, puisque ni le dominant négatif de la préséniline 2 ni la préséniline 2 de type sauvage ne causent un changement dans l'expression de l'IP₃R1. Nos résultats suggèrent que les mutants de la préséniline 2 causant la maladie d'Alzheimer diminuent l'affinité et aussi le niveau d'expression du récepteur à l'IP₃. Ces résultats supportent la notion qu'un dérèglement de l'homéostasie calcique pourrait être un événement primaire dans le développement de la maladie d'Alzheimer.

INTRODUCTION

Le Ca^{2+} est bien connu pour son rôle dans la formation des os. Le Ca^{2+} est aussi un second messager intracellulaire jouant un rôle important dans une grande variété de fonctions cellulaires incluant des réponses à court terme, telles la contraction et la sécrétion, et des réponses à long terme, telles la transcription, la division cellulaire et même l'apoptose (Berridge *et al.*, 2000). La régulation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} est un processus complexe. Dans le cytosol des cellules au repos, la concentration de Ca^{2+} libre est de l'ordre de 100 nM et lors d'une forte stimulation hormonale, elle peut monter jusqu'à 1 μM . La concentration de Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire est de l'ordre de 2 mM. Il existe donc une très grande différence (de l'ordre de 10 000 fois) entre la concentration extracellulaire et la concentration cytosolique de Ca^{2+} . Le réticulum endoplasmique (RE) est une organite intracellulaire contenant aussi une forte concentration de Ca^{2+} , de l'ordre de 2 mM (Evenas *et al.*, 1998). Le milieu extracellulaire et le RE constituent donc les deux principaux réservoirs d'où provient le Ca^{2+} lors de stimulations hormonales. Le gradient de Ca^{2+} entre le cytosol et le RE est maintenu par la pompe SERCA (Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase) qui utilise l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP pour transporter le Ca^{2+} du cytosol vers la lumière du RE. De même, le gradient de Ca^{2+} entre le cytosol et le milieu extracellulaire est maintenu par la pompe PMCA (Plasma Membrane Ca²⁺ ATPase) qui utilise l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP pour transporter le Ca^{2+} du cytosol vers l'extérieur de la cellule. Le Ca^{2+} utilise l'énergie des deux gradients pour entrer dans le cytosol via des canaux calciques situés sur le RE ou sur la membrane plasmique. Le Ca^{2+} des réserves calciques peut être mobilisé par l'activation d'un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à une protéine Gq (GqPCR) ou d'un récepteur tyrosine kinase (RTK). Dans le cas

de la stimulation d'un GqPCR (figure 1), le récepteur active la G protéine Gq qui active la phospholipase C β (PLC β). Dans le cas de l'activation d'un RTK, le récepteur s'autophosphoryle et phosphoryle par la suite la PLC γ , ce qui l'active. Une fois activées, la PLC β et la PLC γ hydrolysent le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) en diacylglycérol (DAG) et en inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃). Le DAG est un activateur de la protéine kinase C. L'IP₃ quant à lui active un récepteur (IP₃R) situé sur le RE. L'IP₃R est un canal calcique dont l'activation entraîne son ouverture, libérant le Ca²⁺ contenu dans le RE vers le cytosol. La stimulation hormonale provoque aussi une entrée de Ca²⁺ provenant du milieu extracellulaire. Cette entrée de Ca²⁺ se fait via divers types de canaux calciques situés sur la membrane plasmique. Les TRPCs (Transient Receptor Potential Canonical) représentent une famille importante de canaux calciques impliqués dans l'entrée de Ca²⁺.

1.1 Le récepteur de l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃R)

Chez les mammifères, il existe 3 types distincts d'IP₃R (Furuichi *et al.*, 1994). Les canaux calciques fonctionnels sont formés à partir d'arrangement homo- ou hétérotétramériques des différents types d'IP₃R (Patel *et al.*, 1999). L'IP₃R le plus largement étudié est le type 1 (IP₃R-1) que l'on retrouve en abondance dans les cellules de Purkinje et dans le système nerveux central (Furuichi *et al.*, 1994; Worley *et al.*, 1987). Au niveau de la cellule, les IP₃Rs ont été localisés sur de nombreuses membranes cellulaires. Premièrement identifiés sur le RE, les IP₃Rs résident aussi sur les membranes de l'appareil de Golgi où ils colocalisent avec la protéine liant le Ca²⁺, nucléobindin, et où ils relâchent du Ca²⁺ suite à une stimulation par l'IP₃ (Lin *et al.*, 1999). Les IP₃Rs se retrouvent aussi à

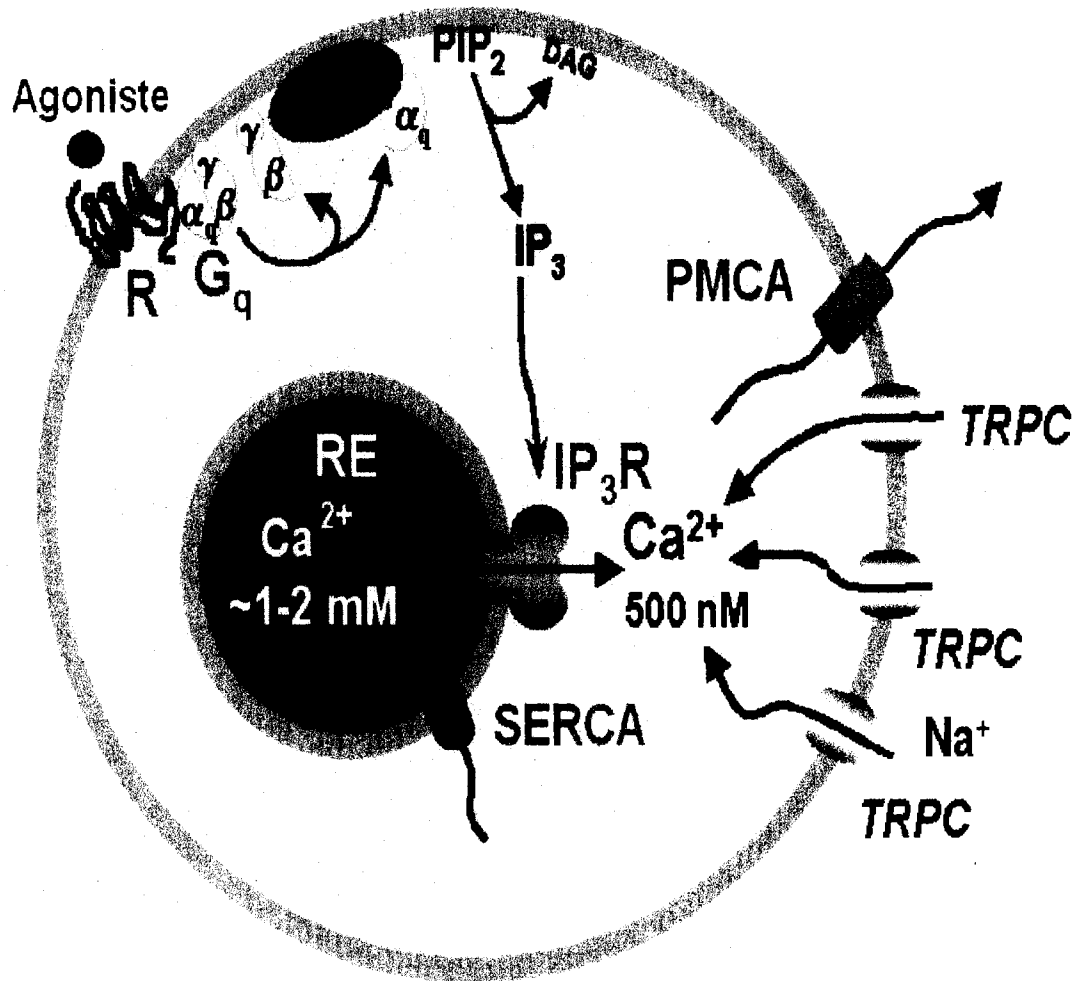


Figure 1. Composantes impliquées dans la signalisation calcique dans une cellule non excitable suite à la stimulation d'un GqPCR.

la surface des granules de sécrétion, sur la membrane plasmique (Khan *et al.*, 1992) et dans le réticulum nucléoplasmique, organite constituée de réseaux d'embranchements provenant d'invaginations de l'enveloppe nucléaire. (Leite *et al.*, 2003; Echevarria *et al.*, 2003). Les IP₃Rs montrent une sélectivité négligeable pour le Ca²⁺ par rapport à d'autres cations divalents (Mg²⁺, Sr²⁺ et Ba²⁺) et ils sont aussi capables de transporter des ions monovalents tels le Na⁺, le K⁺, le Li⁺, le Cs⁺ et le Rb⁺ (Williams *et al.*, 2001). Il semble donc que la raison pour laquelle ce canal transporte majoritairement le Ca²⁺ réside dans le fait qu'il y a une concentration élevée de Ca²⁺ dans le RE.

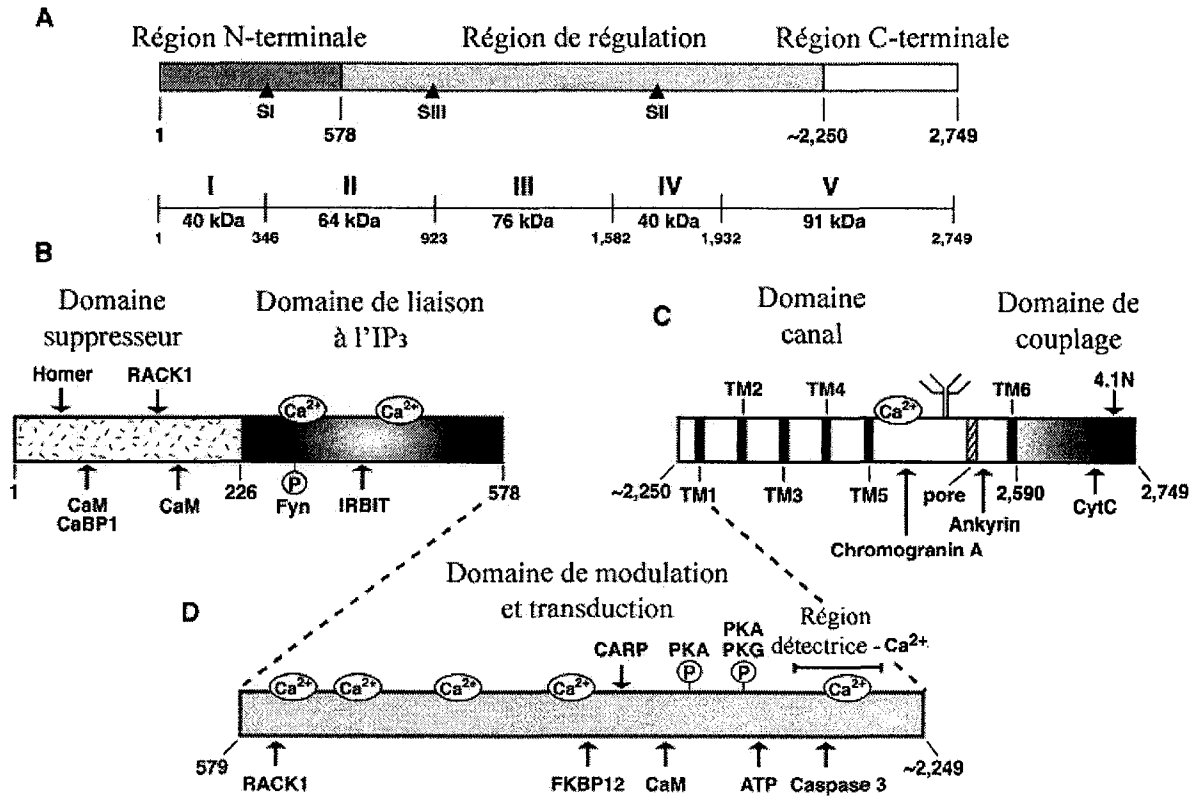
1.1.1 Structure des IP₃Rs

Il existe 3 régions fonctionnelles dans la structure de l'IP₃R-1 de souris, une protéine de 2749 acides aminés (Furuichi *et al.*, 1989). La portion N-terminale du récepteur est responsable de la liaison de l'IP₃. La région formant le canal est localisée sur la portion C-terminale de la protéine. Un très grand domaine de régulation relie les portions N- et C-terminales (Figure 2A).

En utilisant une approche de délétion par mutagenèse sur la portion N-terminale de la protéine, la région minimale requise pour la liaison de l'IP₃ sur l'IP₃R-1 fut réduite aux résidus 226-578. Le domaine comprenant les 223 premiers acides aminés fut identifié comme inhibiteur de la liaison de l'IP₃, d'où son nom de domaine supprimeur (Figure 2B) (Yoshikawa *et al.*, 1996). Les six domaines transmembranaires responsables de la formation du canal calcique se retrouvent entre les résidus 2276 et 2589 (Figure 2C) (Yoshikawa *et al.*, 1992). Les 160 résidus à l'extrémité du C-terminal forment le domaine

Figure 2: Structure de l'IP₃R1.

(A) Représentation des trois domaines fonctionnels de l'IP₃R-1 de souris ainsi que la localisation des sites d'épissage alternatif. (B) Localisation du domaine suppresseur et du domaine de liaison à l'IP₃ situé dans la région N-terminale de l'IP₃R-1. (C) La portion C-terminale du récepteur qui est constituée du domaine canal et du domaine de couplage. Les six domaines transmembranaires (ligne verticales noires), la région formant le pore (lignes diagonales) ainsi que les deux sites de glycosylation (structures branchées) sont indiqués. (D) Le domaine de modulation et de transduction. Plusieurs partenaires d'interaction se lient aux différents domaines, tel qu'indiqué. Il existe d'autres partenaires d'interaction tels la myosine, CaMKII, BANK, IRAG, le récepteur sigma-1, la calcineurine, mais leurs sites d'interaction avec l'IP₃R-1 ne sont pas encore bien définis. Adapté de la revue de Bosanac *et al.* (2004).



de couplage. Dans la partie centrale du récepteur on retrouve les domaines de régulation et de transduction (Figure 2D). Ces domaines sont impliqués dans la liaison de petites molécules et autres protéines. De plus, ces domaines sont responsables du transfert du signal du domaine de liaison vers le domaine canal (Uchida *et al.*, 2003).

Il existe plusieurs petites molécules et protéines pouvant interagir avec l'IP₃R-1 (Figure 2). Certains partenaires d'interaction tels le Ca²⁺, la calmoduline (CaM) (Sipma *et al.*, 1999; Patel *et al.*, 1997; Cardy *et al.*, 1998) et RACK1 (Patterson *et al.*, 2004) diminuent l'affinité du récepteur pour l'IP₃ en interagissant au niveau des 600 premiers résidus. La CaM interagit sans l'action du Ca²⁺ avec deux segments indépendants situés parmi les 160 premiers résidus du récepteur (Sienaert *et al.*, 2002). Il a été proposé que la liaison de la CaM sur le N-terminal des IP₃Rs menait à l'inhibition de la relâche de Ca²⁺ induite par l'IP₃ (Kasri *et al.*, 2004a). Il est aussi intéressant de noter que la protéine CaBP1 (neuronal Ca²⁺-binding protein 1) peut se lier sur un des sites de liaison de la CaM (Kasri *et al.*, 2004b). Bien que le groupe de Yang *et al.* (2002) ait proposé que la liaison de CaBP1 aux IP₃Rs menait à leur activation en absence d'IP₃, plusieurs autres groupes ont plutôt montré une activité antagoniste de CaBP1 sur les IP₃Rs (Kasri *et al.*, 2004a; Haynes *et al.*, 2004; Kasri *et al.*, 2003). La liaison de protéines sur le domaine suppresseur de l'IP₃R peut donc avoir un effet très important sur son activité.

1.1.2 Modèle d'activation de l'IP₃R

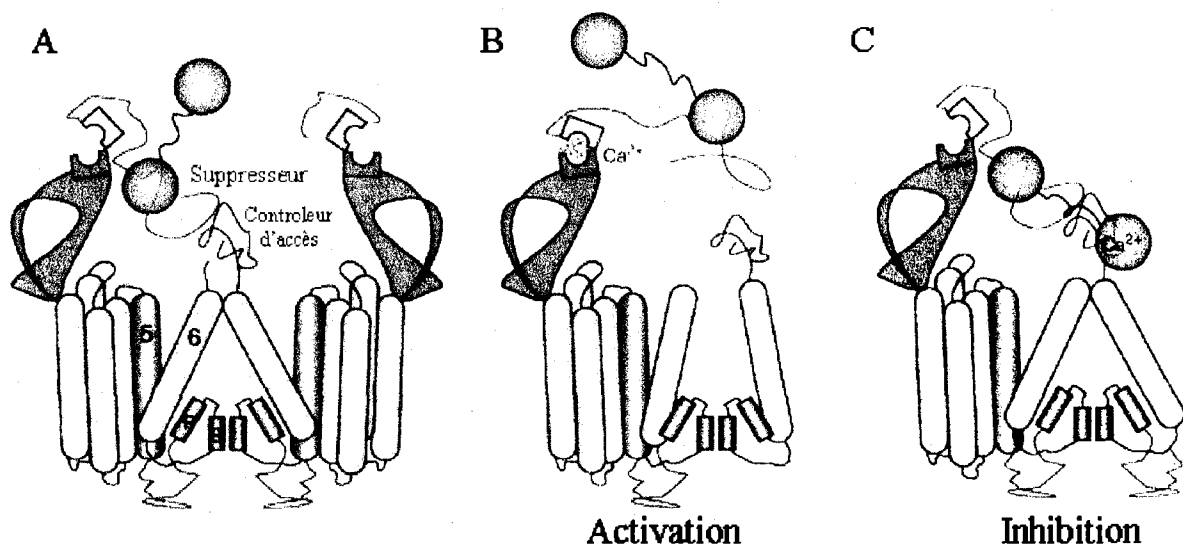
La figure 3 montre des modèles complémentaires expliquant différentes étapes de l'activation de l'IP₃R. Le premier modèle se base sur l'étude du domaine de liaison de l'IP₃.

Lors de la liaison de l'IP₃, il se produit un changement conformationnel causant un redressement du domaine de liaison. Ce changement conformationnel rapproche certains acides aminés qui forment un site de liaison du Ca²⁺. Ce site de liaison du Ca²⁺ est à l'intérieur d'une surface conservée (P-II) qui est responsable d'interactions protéine-protéine (Bosanac *et al.*, 2002). La liaison du Ca²⁺ à ce site interrompt l'interaction entre le P-II et le domaine supprimeur. Il a été suggéré qu'une interaction Cys-Cys entre le domaine supprimeur dans le N-terminal d'une sous-unité et le domaine contrôleur d'accès dans le C-terminal d'une autre sous-unité garde le canal fermé. En le libérant de son interaction avec le domaine de liaison de l'IP₃, le domaine supprimeur se déplacerait et permettrait l'ouverture du canal (Figure 3B). La dernière partie de ce modèle suggère que l'inhibition de l'IP₃R serait probablement due à la calmoduline (Taylor *et al.*, 2002) et qu'elle est atténuée par la liaison de l'IP₃ (Adkins *et al.*, 1999). Il est proposé qu'un des deux lobes de la calmoduline serait lié à des résidus dans le N-terminal de l'IP₃R, et ce, indépendamment de sa liaison au Ca²⁺ (Figure 3A) (Sienaert *et al.*, 2002). La liaison du Ca²⁺ sur le second lobe de la calmoduline provoquerait une nouvelle interaction avec la portion C-terminale de l'IP₃R, ce qui renforcerait l'inhibition du canal (Figure 3C).

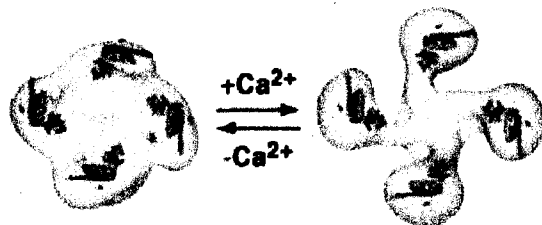
Le deuxième modèle se base sur l'étude de Hamada *et al.* qui examinait l'effet du Ca²⁺ sur la structure de l'IP₃R par microscopie électronique tridimensionnelle. En absence de Ca²⁺ le récepteur présente une structure compacte de forme carrée (Figure 3D). En présence de Ca²⁺, le récepteur présente une structure ressemblant à une roue de moulin à vent, avec un domaine elliptique cytoplasmique s'éloignant du canal qui est considéré comme la partie centrale. Le modèle propose une activation du canal en deux étapes (Figure 3E). La première étape implique la liaison de l'IP₃ qui causerait un changement

Figure 3: Mécanisme d'activation théorique des IP₃Rs.

(A) Représentation de l'assemblage de 2 sous-unités IP₃Rs. En absence de stimulation, le domaine suppresseur d'une sous-unité interagit avec le domaine contrôleur d'accès de l'autre sous-unité, ce qui garde le canal fermé. Les cercles gris représentent les deux lobes de la CaM qui est liée au domaine suppresseur. P et S correspondent respectivement à l'hélice du pore et au filtre de sélectivité. Les domaines transmembranaires 5 et 6 sont aussi identifiés. (B) La liaison de l'IP₃ dans le domaine de liaison et du Ca²⁺ à l'intérieur de la surface conservée P-II entraîne le déplacement du domaine suppresseur, ce qui permet l'ouverture du canal. (C) En absence de stimulation, la liaison du Ca²⁺ sur le second lobe de la calmodulin entraîne la liaison de ce lobe avec le C-terminal du récepteur, ce qui maintient le canal fermé (Taylor *et al.*, 2006). (D) Représentation tridimensionnelle de l'IP₃R suggérée par Hamada *et al.* (2003). En absence de Ca²⁺ le récepteur adopte une forme compacte alors qu'en présence de Ca²⁺, il adopte une forme de roue de moulin à vent. (E) Modèle d'activation de l'IP₃R proposé par Bosanac *et al.* (2004). Le canal fermé doit tout d'abord lier l'IP₃ pour adopter une conformation intermédiaire ouvrant des sites de liaison au Ca²⁺. La liaison du Ca²⁺ permet ensuite l'ouverture du canal en déplaçant les domaines de liaison vers l'extérieur.



D



E

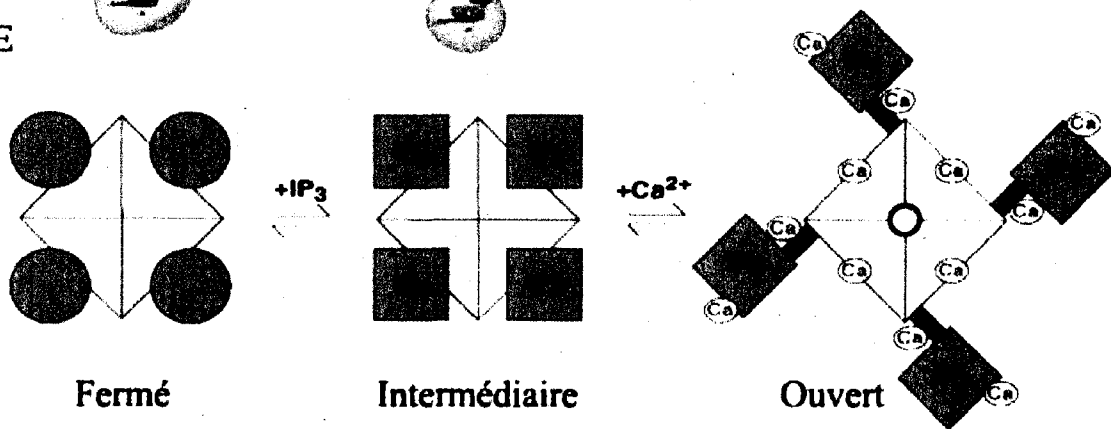


Figure 5: Le complexe γ -secrétase

A) Représentation des constituants du complexe γ -secrétase comprenant la préséniline, nicastrine, pen-2 et Aph-1 (Henricson *et al.*, 2005). B) Représentation du clivage de l'APP et Notch par le complexe γ -secretase. Le clivage de l'APP va libérer le peptide amyloïde et l'AICD, amyloid intracellular domain, tandis que le clivage de Notch va libérer le facteur de transcription NICD, notch intracellular domain (Periz *et al.*, 2004). Le schéma représente les sites de clivage de Notch1 (S1, S2 et S3) qui sont homologues aux sites de clivage de l'APP par les α -, β - et γ -secretase. Les sites de clivages indiqués sont pour l'APP₇₇₀.

conformationnel localisé dans la région N-terminale et possiblement dans les régions avoisinantes. Ce changement de structure pourrait exposer quelques sites de liaison du Ca^{2+} (Bosanac et al., 2002). La deuxième étape serait initiée par la liaison du Ca^{2+} sur ces sites, ce qui entraînerait un changement drastique de conformation qui éloignerait les domaines de liaison de l' IP_3 du centre du canal et permettrait son ouverture.

1.2 Entrée capacitative de Ca^{2+}

L'entrée capacitative de Ca^{2+} (CCE) fut initialement décrite par James Putney (1990). Elle consiste à une entrée de Ca^{2+} à travers la membrane plasmique via les SOCs (store operated channels), suite à une relâche de Ca^{2+} du RE. Le CCE a pour effet de prolonger la réponse calcique et aussi de reconstituer les réserves calciques du RE. Le mécanisme précis d'activation de CCE n'est pas encore élucidé. Toutefois, trois hypothèses ont été émises.

La première hypothèse suggère qu'à la suite de la diminution de la concentration calcique du RE, le « Ca^{2+} -influx factor » (CIF) serait libéré. Ce messager diffusible serait libéré du RE et activerait les canaux calciques SOCs à la membrane plasmique. Les premières évidences expérimentales de l'existence du CIF furent obtenues par Randriamampita et Tsien (1993). Ils démontrèrent que des extraits de lymphocytes de Jurkat, dont le RE avait été déplété en Ca^{2+} par un traitement à la thapsigargine, induisaient une CCE chez des astrocytes, des fibroblastes et des macrophages non stimulés. Depuis, d'autres travaux ont appuyé l'hypothèse du CIF et de son activité sur le CCE (Thomas et

Hanley, 1995; Csutora *et al.*, 1999; Trepakova *et al.*, 2000), mais la structure exacte du CIF n'est toujours pas élucidée.

La seconde hypothèse pour expliquer le mécanisme du CCE a été proposée par Fasolato *et al.* (1993). Elle suggère que les canaux SOCs seraient contenus dans des vésicules intracellulaires. Suite à la relâche de Ca^{2+} du RE, ces vésicules fusionnerait à la membrane plasmique par un mécanisme d'exocytose, ce qui localiserait les SOCs à la surface de la cellule et permettrait le CCE. En accord avec ce mécanisme, Yao *et al.* (1999) ont montré que la surexpression d'un dominant négatif de SNAP-25, une protéine responsable de la fusion de vésicules à la membrane plasmique, inhibait le CCE chez les oocytes de Xéopus. Une étude provenant de notre laboratoire (Cayouette *et al.*, 2004) a aussi montré que le canal calcique TRPC6 s'insérait à la membrane plasmique suite à la stimulation d'un récepteur couplé à G_q . La concentration d'agoniste nécessaire pour permettre l'insertion de TRPC6 à la membrane plasmique était inférieure à la concentration requise pour activer TRPC6. De plus, cette étude a montré que la quantité d' IP_3Rs retrouvés dans les microdomaines cavéolaires augmentait proportionnellement avec la surexpression de TRPC6. Ces résultats suggérant une interaction fonctionnelle entre l' IP_3R et TRPC6 sont en accord avec la troisième hypothèse pour expliquer le mécanisme du CCE: le couplage conformationnel.

Le couplage conformationnel fut initialement proposé par Robin Irvine (1990). Il était connu que le récepteur à la ryanodine, un canal calcique intracellulaire exprimé sur le reticulum sarcoplasmique (dans les cellules musculaires), est activé via une interaction directe avec le canal calcique dépendant du voltage de type-L situé sur la membrane

plasmique des cellules musculaires. Parce que le récepteur à la ryanodine et les IP₃Rs possèdent plusieurs caractéristiques structurelles et fonctionnelles communes (pour revue voir Fill et Copello, 2002), Irvine a suggéré que les IP₃Rs pourraient établir des contacts directs avec des canaux calciques à la surface de la cellule. L'hypothèse propose que la déplétion des réserves de Ca²⁺ du RE induirait un changement de conformation de l'IP₃R, ce qui lui permettrait d'interagir avec les canaux SOC et de déclencher la CCE (Putney, 2001; Berridge *et al.*, 2003). En appui à cette hypothèse, Kiselyov *et al.* (1998) ont identifié la séquence d'un segment dans la portion N-terminale de l'IP₃R qui interagit avec TRPC3. En utilisant la technique de GST-pulldown, Boulay *et al.* (1999) ont aussi montré que le fragment contenant les résidus 777-797 de TRPC3 et le fragment contenant les résidus 669-834 de l'IP₃R sont essentiels à l'interaction entre TRPC3 et l'IP₃R. De plus, la surexpression de courts peptides issus de l'un ou l'autre de ces fragments produisait une diminution de la CCE. Ces résultats suggèrent donc une interaction fonctionnelle entre les IP₃Rs et les canaux calciques membranaires de type TRPC.

1.3 La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative progressive et irréversible menant à une déficience cognitive, à des problèmes de mémoire et à des troubles de comportement (Sisodia *et al.*, 2002). La MA se caractérise par une perte synaptique et une dégénérescence neuronale considérable dans les régions impliquées dans la mémoire et l'apprentissage (e.g. le cortex temporal, entorhinal et frontal, l'hippocampe). La mort cellulaire survient probablement plusieurs années avant l'apparition des

symptômes cliniques. C'est le 3 novembre 1906 qu'Alois Alzheimer caractérisait les signes cliniques de cette maladie pour la première fois par la présence de lésions cérébrales chez Auguste D., une patiente qui présentait des symptômes de perte progressive de la mémoire, d'illusions et d'hallucinations. Ces lésions cérébrales impliquaient la formation de plaques séniles et d'enchevêtrements neurofibrillaires (Alzheimer, 1907). La composition des plaques séniles fut découverte en 1927 par Diviry. Il démontra qu'elles étaient composées du peptide β -amyloïde (A β).

La majorité des cas de MA sont sporadiques (de cause indéterminée), mais environ 10% des cas sont héréditaires. Cette forme de MA est dite familiale (MAF) et des mutations dans trois différents gènes ont été associés à la MAF : les gènes de la préséniline-1 (PS1), de la préséniline-2 (PS2) et du peptide précurseur de l'amyloïde (APP) (Drouet *et al.*, 2000)

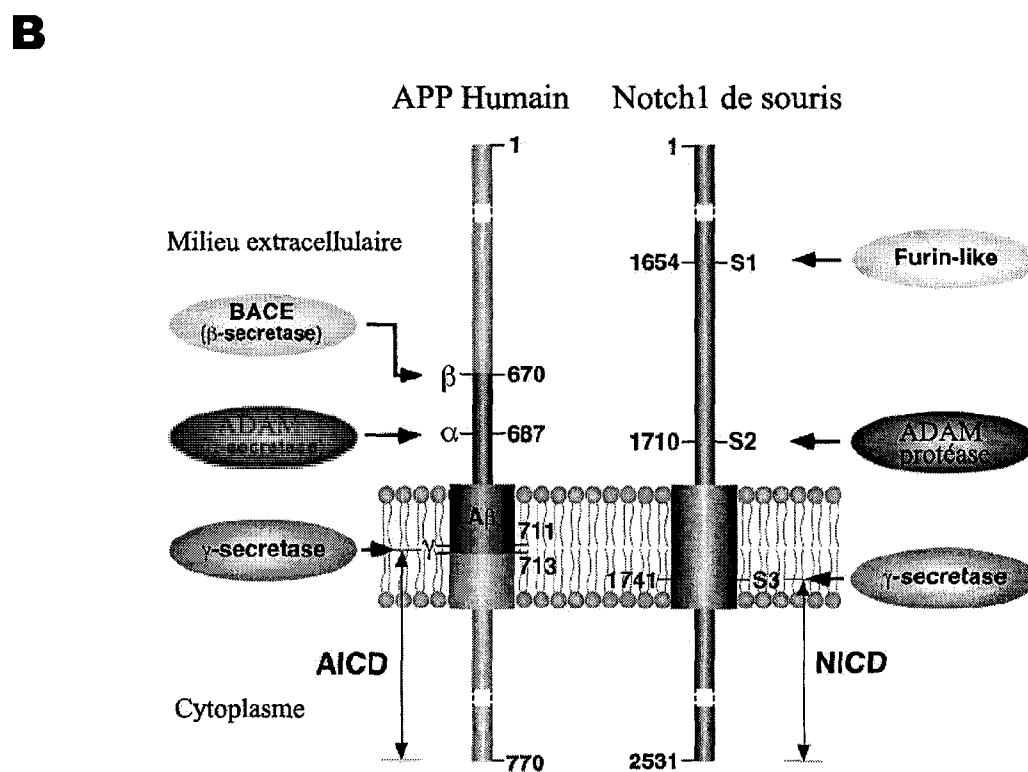
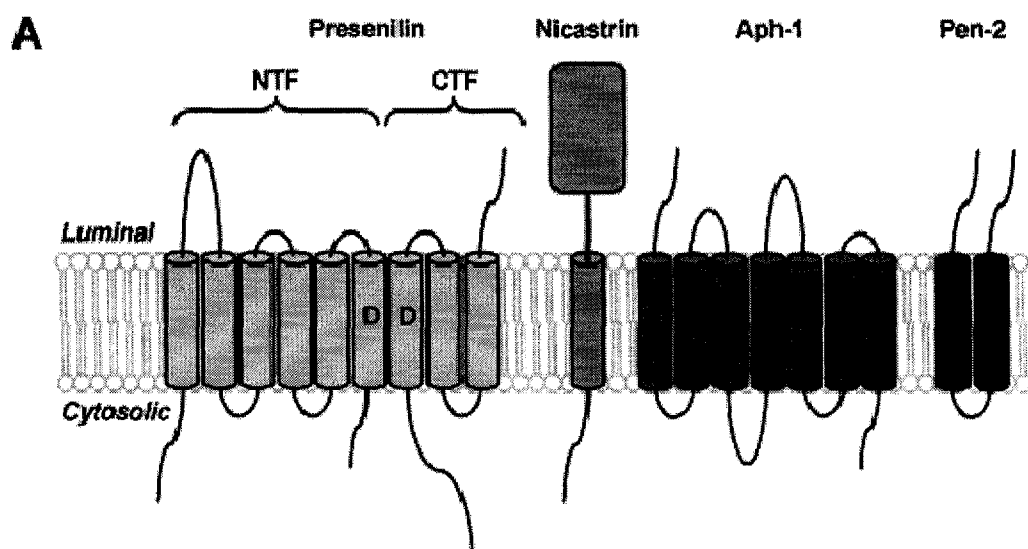
1.4 La préséniline

Les mutations dans les gènes codant pour les présénilines (PS) font partie des facteurs de risque pour le développement précoce de la MA, c'est-à-dire avant l'âge de 60 ans (Levy-Lahad *et al.*, 1995). La famille des PS est constituée de deux membres très semblables, soit la PS1 et la PS2, et d'un homologue présentant plus de différences, la « Signal Peptide Peptidase » (Weihofen *et al.*, 2002). La PS1 comporte 467 acides aminés (Suh et Checler, 2002) et son gène se retrouve sur le chromosome 14 (Sherrington *et al.*, 1995). La PS2 quant à elle comporte 448 acides aminés (Suh et Checler, 2002) et son gène se retrouve sur le chromosome 1 (Levy-Lahad, *et al.*, 1995. Rogaev *et al.*, 1995). Les PSs

sont abondamment exprimées dans le RE, l'appareil de Golgi et dans les vésicules d'endocytose et d'exocytose. Seulement une petite fraction est présente au niveau de la membrane plasmique (Annaert *et al.*, 1999; Vetrivel *et al.*, 2004). Les PSs comportent 8 domaines transmembranaires (figure 4) avec les parties C-terminale et N-terminale du côté cytosolique et elles constituent la sous-unité catalytique du complexe γ -sécrétase (Haass et De Strooper, 1999). Henricson *et al.* (2005) ont récemment obtenu des évidences expérimentales leur permettant d'élaborer un modèle de la PS à 9 domaines transmembranaires, mais ce modèle n'est pas encore très utilisé (voir figure 5). Les PS ont deux résidus aspartate conservés situés sur les transmembranes 6 et 7. Ces résidus aspartate sont essentiels à l'activité aspartyl protéase des PS (Wolfe *et al.*, 1999). La PS est initialement synthétisée comme un monomère de 50 kDa qui subit des clivages protéolytiques pour générer des fragments N-terminaux et C-terminaux qui se combinent pour former un hétérodimère enzymatiquement actif (Thinakaran G. *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1997; Seeger *et al.*, 1997). Pour être actif, le complexe γ -sécrétase doit être composé au minimum de la PS, de la nicastrine, de Pen-2 et de Aph-1 (figure 5A). Si la stoechiométrie entre les sous-unités individuelles est de 1 :1 :1 :1, le poids moléculaire prédit pour le complexe devrait être de 200-250 KDa. Cependant, le complexe extrait du cerveau humain migre sur un gel non dénaturant avec une masse estimée à environ 500 kDa (Farmery *et al.*, 2003). Ce résultat suggère donc une stoechiométrie différente ou la présence d'autres protéines dans le complexe. Récemment, il fut suggéré que la protéine TMP21 ferait partie du complexe et pourrait affecter préférentiellement l'activité γ -sécrétase (Chen *et al.*, 2006). L'activité protéolytique associée à la PS est responsable du clivage de certaines protéines transmembranaires de type 1 telles que Notch (De Strooper *et al.*, 1999), l'APP

Figure 5: Le complexe γ -secrétase

A) Représentation des constituants du complexe γ -secrétase comprenant la préséniline, nicastrine, pen-2 et Aph-1 (Henricson *et al.*, 2005). B) Représentation du clivage de l'APP et Notch par le complexe γ -secretase. Le clivage de l'APP va libérer le peptide amyloïde et l'AICD, amyloid intracellular domain, tandis que le clivage de Notch va libérer le facteur de transcription NICD, notch intracellular domain (Periz *et al.*, 2004). Le schéma représente les sites de clivage de Notch1 (S1, S2 et S3) qui sont homologues aux sites de clivage de l'APP par les α -, β - et γ -secretase. Les sites de clivages indiqués sont pour l'APP₇₇₀.



(De Strooper *et al.*, 1998) et les cadherins (Marambaud *et al.*, 2002). Notch fait partie d'une famille de récepteurs transmembranaires impliqués dans le développement et la différenciation cellulaire. Sa voie de signalisation est plutôt particulière. Après la liaison de son ligand, Delta ou Jagged, le récepteur est clivé une première fois par une protéase de la famille métalloprotéase ADAM pour enlever l'ectodomaine de Notch. Ce clivage cause un changement conformationnel qui permet un second clivage dans le domaine transmembranaire, par la γ -sécrétase, pour libérer le fragment intracellulaire, NICD. Le NICD transloque ensuite au noyau (figure 5B), où il interagit avec le facteur de transcription CSL et active la transcription de plusieurs gènes (Selkoe et Kopan, 2003).

Une autre protéine transmembranaire de type 1 pouvant être clivée par la PS est l'APP. L'APP est une protéine transmembranaire dont le rôle physiologique n'est pas encore bien défini. Le clivage et la maturation de l'APP peuvent utiliser deux voies distinctes : la voie non-amyloïdogénique et la voie amyloïdogénique. Chacune de ces voies comprend deux clivages distincts. Dans la voie non-amyloïdogénique, une protéase de la famille ADAM effectue le premier clivage entre la position 612 et 613 de l'APP₆₉₅ (figure 5B). Cette activité α -sécrétase produit un fragment extracellulaire APP $_{\alpha}$ ainsi qu'un fragment qui demeure associé à la membrane, le C83. Un deuxième clivage entre les acides aminés 639 et 640 du fragment C83 est effectué par la γ -sécrétase et permet de libérer le fragment P3 à l'intérieur de la cellule. Dans la voie amyloïdogénique, l'enzyme β ACE1 (β -site APP-cleaving enzyme), une protéase ayant une activité β -sécrétase, clive l'APP entre les positions 596 et 597, ce qui produit un fragment extracellulaire APP $_{\beta}$ ainsi qu'un fragment associé à la membrane, le C99. Le fragment C99 est ensuite clivé par la γ -

sécrétase entre les positions 639 et 640. Ce clivage au site- γ produit le fragment AICD (amyloid intracellular domain) et les peptides β -amyloïdes ($A\beta$) (Suh et Checler, 2002; LaFerla, 2002). La majorité des peptides β -amyloïdes sont composés de 40 résidus ($A\beta_{1-40}$), alors qu'une faible proportion (environ 10 %) sont des variants de 42 résidus ($A\beta_{1-42}$) (Jarrett *et al.*, 1993).

1.4.1 Les mutants de la PS et la MA.

Bien que les mutations dans le gène de l'APP sont associées avec le développement de la MA, elles ne comptent que pour un faible pourcentage des cas familiaux. Les mutations dans le gène de la PS sont associées à la majorité des cas de MAF. Jusqu'à maintenant, on a découvert environ 135 mutations de la PS1 et 10 mutations de la PS2 causant la MA. Ces mutations causent une augmentation de l'activité de la protéase et favorisent le clivage du fragment C99 entre les acides aminés 641 et 642, ce qui augmente la production de peptide $A\beta_{1-42}$. Le peptide $A\beta_{1-40}$ est toujours produit mais le ratio de la quantité $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ est augmenté par les PS mutantes (Citron *et al.*, 1997). Le peptide $A\beta_{1-42}$ est plus hydrophobe et il est plus favorable à la formation d'agrégats que le peptide $A\beta_{1-40}$. Cette propriété explique bien le fait que le peptide $A\beta_{1-42}$ est retrouvé de façon prédominante dans les plaques séniles caractéristiques de la MA (Jarrett *et al.*, 1993).

1.4.2 Le rôle du calcium dans la MA.

Khachaturian (1989) a été le premier à suggérer un rôle pour le Ca^{2+} dans la MA. Il avait suggéré que des perturbations soutenues dans l'homéostasie du Ca^{2+} cellulaire pourraient être la cause première de la neurodégénérescence observée dans la MA. À cette époque, aucune donnée expérimentale ne pouvait supporter cette hypothèse. Depuis, des études effectuées avec des cellules en cultures ou avec des modèles animaux reliés à la MA ont démontré une relation cause-effet entre le Ca^{2+} intracellulaire et la dysfonction neuronale. Par exemple, des conditions qui induisent une élévation forte et soutenue de Ca^{2+} intracellulaire causent des changements du cytosquelette neuronal similaires à ceux observés dans la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires (Mattson, 1990). De plus, une dérégulation du niveau intracellulaire de Ca^{2+} peut augmenter la formation de peptides β -amyloïdes et l'hyperphosphorylation Tau (Mattson, 1990; Mattson *et al.*, 1992; Mattson *et al.*, 1993a; Mattson *et al.*, 1993b) causant la déstabilisation des microtubules en empêchant sa liaison avec la tubuline (Drechsel *et al.*, 1992).

Les premières études démontrant l'implication de la PS dans la signalisation calcique ont été faites sur des fibroblastes prélevés de patients ayant la MA liée à une mutation sur le chromosome 14. Les fibroblastes ont démontré une augmentation de la relâche calcique suite à une stimulation à la bombésine et la bradikinine, lesquels sont médiés par l'activation des IP_3Rs (Ito *et al.*, 1994). Une autre étude faite chez des membres d'une famille touchée par la MA et qui subséquemment développaient la maladie a montré un résultat similaire, et ce, avant même l'apparition des symptômes (Etcheberrigaray *et al.*, 1998). Ces études furent importantes pour mettre en évidence l'altération de la signalisation calcique dans les cas de MA sporadique et familiale et surtout pour montrer que les

dérégulations du Ca^{2+} précèdent de longtemps les marqueurs classiques de la MA. Lorsque des mutants de PS1 furent exprimés dans des cellules non neuronales, la réponse calcique stimulée par un récepteur activant la voie de l' IP_3 a été significativement augmentée. De plus, ces cellules démontraient une tendance accrue pour l'apoptose (Guo *et al.*, 1996; Leissring *et al.*, 2000). Des études additionnelles ont montré que l'expression des mutants de PS1 chez les cellules neuronales provoquait une dérégulation de l'homéostasie du Ca^{2+} et que ces cellules étaient plus sensibles à l'excitotoxicité et au stress oxydatif (Guo *et al.*, 1997, 1999). Leissring *et al.* (1999a et 1999b) ont démontré que l'expression des PS1 M146V, PS2 N141I ou PS2 M239V dans des oocytes de Xénopus augmentait la relâche de Ca^{2+} induite par l'injection d' IP_3 . L'expression du mutant ΔE9 de PS1 a augmenté la relâche calcique et diminué la CCE chez les neuroblastomes humains SH-SY5Y (Smith *et al.*, 2002). En ce qui concerne les mutations de PS2, elles semblent produire chez les cellules humaines un effet opposé à celui reporté chez les oocytes de Xénopus. En effet, Zatti *et al.* (2004) et Giacomello *et al.* (2005) ont observé une diminution de la relâche calcique chez des fibroblastes isolés de patients ayant les mutations familiales M239I et T122R de PS2. Il s'agit donc d'une controverse qui n'est pas encore élucidée.

1.5 But de l'étude

On ne connaît pas les mécanismes exacts par lesquels les PS mutantes associées à la MA influencent l'activité des principales composantes de la signalisation calcique, telles que les IP_3Rs ou les TRPCs. Récemment, une étude provenant de notre laboratoire a montré que l'entrée capacitative de Ca^{2+} médiée par TRPC6 était influencée par les mutants de PS2 exprimés dans les cellules HEK293 (Lessard *et al.*, 2005). Le but de ce projet de

maîtrise était donc d'examiner si PS2 peut altérer l'activité de l'IP₃R1, un élément important impliqué dans la relâche calcique neuronale. Pour ce faire, nous avons utilisé les cellules SH-SY5Y qui sont des neuroblastomes exprimant majoritairement (99%) le récepteur IP₃R1 (Wojcikiewicz *et al.*, 1995). De plus, ces cellules expriment de manière endogène la PS2 ainsi que les récepteurs muscariniques M3 et M5 qui sont couplés à G_q. Dans le but de faire la distinction entre la PS2 endogène et la PS2 surexprimée, un épitope FLAG fut inséré après la première méthionine de la PS2 de type sauvage (PS2wt) et de ses mutants, soit N141I, M239V, D263A. Cet épitope a donc permis de sélectionner les populations de cellules SH-SY5Y exprimant de façon stable FLAGPS2wt, FLAGPS2N141I, FLAGPS2M239V et FLAGPS2D263A. L'activité de l'IP₃R1 fut déterminée en mesurant la relâche de Ca²⁺ par spectrofluorimétrie et l'intégrité de la protéine par immunoprécipitation et immunobuvardage.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

L'ADNc de la PS2 provenant de l'American Type Culture Collection (Manassas, VA) a été séquencé et sous-cloné dans pcDNA-3.1 par Geneviève Bourque, stagiaire dans le laboratoire à l'hiver 2001. Les solutions utilisées pour le PCR et la trousse Expand High Fidelity PCR System proviennent de Roche Diagnostics Corp. (Indianapolis, IN). Les oligonucléotides proviennent de IDT (Coralville, Iowa). Les standards de poids moléculaire pour l'ADN ou pour les protéines et le Tween-20 proviennent de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). Les vecteurs d'ADN pcDNA3 et pCR-Blunt II-TOPO, la ligase, la lipofectamine2000, le DMEM/F12 et le tampon HEPES proviennent de Invitrogen Corporation (Burlington, Ontario). La trousse de purification et d'amplification de plasmides d'ADN pour les préparations maxi et midi provient de Qiagen (Mississauga, Ontario). La trousse pour le séquençage d'ADN comprenant la séquenase, une ADN polymérase modifiée, et toutes les autres composantes nécessaires à la réaction provient de USB Corporation (Cleveland, Ohio). Le ^{35}S -dATP ainsi que l'ensemble de révélation ECL proviennent de PerkinElmer Life Sciences Inc (Boston, MA). Les enzymes de restriction furent obtenus de New England Biolabs Ltd (Pickering, Ontario). L'anticorps contre le fragment C-terminal de la PS2 provient de Cell Signaling (Beverly, MA). L'anticorps contre l'actine provient de la Chemicon (Temecula, CA). Le FURA-2-AM provient de Calbiochem (San Diego, CA). Les anticorps secondaires (anti- IgG de lapin et anti-IgG de souris, couplés à la peroxydase de raifort) et la protéine A-sépharose proviennent de GE Healthcare (Baie d'Urfé, QC). Tous les autres produits qui ne sont pas mentionnés

proviennent soit de Sigma-Aldrich Co (Oakville, Ontario) ou de Fisher Scientific (Nepean, Ontario).

2.1 Insertion d'un épitope FLAG en N-terminal de la PS2

Pour introduire un épitope FLAG après la première méthionine de la PS2, nous avons utilisé l'approche de mutagenèse dirigée par PCR, en amplifiant une partie de la séquence de la PS2. Pour ce faire, nous avons ajouté une séquence de 12 acides aminés codant pour l'épitope FLAG après la première méthionine de PS2.

Tableau 1 : Oligonucléotides utilisés pour introduire un épitope FLAG dans la PS2

réaction	oligonucléotide sens	oligonucléotide antisens
PCR A	5'-gattacaaggatgacgacgataagctc acattcatggcctctg-3'	Oligo commun antisens
PCR B	Oligo commun sens	5'-cttatcgtcgtcatccttgaatccatagcc ctgcctctggaag-3'

Oligo commun sens : 5'-CCCTATAGTGAGTCGTATTA-3' (T7)

Oligo commun antisens : 5'-GTCCTCAGTGAATGTCGTG-3' (1026-PSEN2)

Un premier PCR a été fait à partir de 100 ng d'ADNc codant pour la PS2, 1 μ M d'oligonucléotide sens et antisens, 500 μ M d'NTP, 2.5 unités de Expand High Fidelity, le tampon à PCR de Roche Expand HF numéro 2 à une concentration de 1X avec 1.5 mM MgCl₂. Les conditions du PCR sont les suivantes : 1 cycle de dénaturation à 95°C d'une durée de 5 minutes, 40 cycles (dénaturation à 95 °C d'une durée de 45 secondes, hybridation à 28 °C pendant 45 secondes (augmentation de 1 °C aux 5 cycles), élongation à

72 °C pendant 2 minutes), 1 cycle d'élongation pendant 10 minutes à 72 °C. Les échantillons sont ensuite conservés à 4 °C.

Après avoir isolé et purifié les fragments du premier PCR, nous procédons au deuxième PCR, qui est fait en 2 étapes. La première étape consiste à mélanger 200 ng des fragments obtenus des réactions A et B avec 500 µM dNTP et 2.5 unités de Expand High Fidelity. Les conditions du PCR sont les suivantes : 1 cycle de dénaturation à 95°C pendant 5 min, 5 cycles (dénaturation à 95 °C pendant 45 s, hybridation à 40 °C pendant 45 s, élongation à 72 °C pendant 2 min), 1 cycle pendant 10 min à 72 °C et on conserve à 4 °C, jusqu'à la prochaine étape. Par la suite, on procède à la deuxième étape en ajoutant les oligonucléotides communs sens (5'-CCCTATAGTGAGTCGTATTA-3') antisens (5'-GTCCTCAGTGAATGTCGTG-3') à une concentration de 1 µM dans du tampon à PCR numéro 2. Les conditions de la deuxième étape sont les suivantes : 1 cycle de dénaturation à 95°C pendant 5 min, 40 cycles (dénaturation à 95 °C pendant 45 s, hybridation à 28 °C pendant 45 s (augmentation de 1 °C aux 5 cycles), élongation à 72 °C pendant 2 min), 1 cycle de 10 minutes à 72 °C et on conserve à 4 °C.

2.2 Isolement et purification d'ADN

Les produits de PCR ou de digestion enzymatique sont mélangés avec du « DNA loading buffer 6X» (60 % glycérol, 60 mM EDTA, 0.25% bleu de bromophénol) afin d'avoir une concentration finale de 1X. L'agarose est dissout dans 50 ml de tampon de TAE (40 mM trizma base, 0.1% acide acétique, 0.1 mM EDTA pH 8.0) et 50 µg/ml de bromure d'étidium est ajouté au gel. Les fragments d'ADN sont séparés sur le gel

d'agarose en appliquant un voltage de 60 V pendant 45 min. Le fragment d'ADN correspondant au fragment du PCR ou la bande d'ADN désirée est découpé sous U.V. et déposée dans un Eppendorf de 500 µl dans lequel des fibres de polyester avaient été déposées. Le tube Eppendorf de 500 µl est perforé et déposé dans un autre tube Eppendorf de 1.5 ml. L'ADN est élué de l'agarose par une centrifugation à 2000 rpm durant 4 min. L'ADN recueilli dans l'éluat est précipité par l'ajout de 2.5 fois le volume d'éthanol 100% à -20 °C et 0.25 fois le volume d'acétate d'ammonium 7.5 M et incubé au moins 2 h à -20 °C. Après une centrifugation à 13000 rpm pendant 20 min, le culot d'ADN est rincé 2 fois avec de l'éthanol 70% à -20 °C et par la suite séché au SpeedVac. Le culot est resuspendu dans 15 µl d'eau. Pour en déterminer la concentration, un échantillon d'ADN est séparé sur un gel d'agarose et l'intensité des bandes est comparée à celle des bandes d'un standard approprié (Molecular Mass Ruler de Bio-Rad).

2.3 Sous-clonage des produits du PCR

Les fragments obtenus par PCR sont insérés dans le vecteur pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen) par une ligation. La réaction se fait dans un volume total de 6 µl contenant: 4 µl du produit de PCR, 1 µl de solution saline (1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl₂) et 1 µl de vecteur pCR -Blunt II-TOPO (10 ng/µl de vecteur, 50 % glycérol, 50 mM Tris-HCl pH 7.4 à 25 °C, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0.1% Triton X-100, BSA 100 µg/ml et 30 µM de bleu de bromophénol) et incubée pendant 5 min à la température de la pièce. Le vecteur est ensuite transformé par choc thermique à 42 °C pendant 45 s dans des *E.Coli* TOPO F1. La culture des bactéries se fait sur des pétris de 10 cm sur un milieu de LB-agar (1 % Tryptone, 0.5 % d'extrait de levure, 1 % NaCl, kanamycine 75 µg/ml, 1.5 % d'agar).

2.4 Purification du plasmide (mini-prep)

5 ml de milieu LB contenant 75 µg/ml d'ampicilline est inoculé avec une colonie bactérienne isolée. Le mélange est incubé pendant 16 h à 37 °C sous agitation constante (200 rpm). Un échantillon de la culture est prélevé (200 µl) et le reste de la culture bactérienne est centrifugé à 3000 rpm pendant 15 min à 4 °C. Le culot est resuspendu dans 200 µl de tampon A (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA) et transféré dans un tube de 1.5 ml. On procède à la lyse des bactéries en y ajoutant 400 µl du tampon B (0.2 M NaOH, 1% SDS) puis on incube pendant 5 min à la température de la pièce. Le matériel insoluble est précipité avec 300 µl de tampon C (3 M acétate de potassium, 11.5% acide acétique glacial) puis on incube pendant 10 min dans la glace. On enlève le précipité par centrifugation à 13000 rpm pendant 15 min à 4 °C. Le surnageant est récupéré et l'ADN plasmidique est précipité avec 550 µl d'isopropanol et centrifugation à 13000 rpm pour au moins 10 min. Le culot d'ADN est ensuite lavé avec 1 ml d'éthanol 70% et séché au SpeedVac. Le culot d'ADN est ensuite dissout dans 75 µl d'eau contenant 75 µg/ml d'ARNase et incubé à 37 °C pendant 30 min afin d'éliminer toute trace d'ARN et de bien dissoudre l'ADN. Un échantillon (1µl) de chaque mini-prep est digéré avec une enzyme de restriction afin de s'assurer de l'identité de l'insert.

2.5 Séquençage à double brin des mini-preps

Les fragments d'ADN provenant d'une réaction de séquence sont séparés sur un gel de 5.7 % d'acrylamide, 0.2 % bis-acrylamide dissoute dans du TBE (89 mM Trizma base,

89 mM acide borique, 2 mM EDTA pH 8) contenant 8 M d'urée pour un volume total de 50 ml. La solution est passée à travers un filtre millipore 0.45 micron. Le gel de 0.4 mm d'épaisseur est coulé entre deux plaques de verre mesurant 21 cm de largeur et 51 cm de longueur. Pour sceller le bas du gel, nous utilisons 5 ml de la solution d'acrylamide en présence de 0.4 % d'ammonium persulfate et 0.4 % de TEMED. Au 45 ml restant de la solution d'acrylamide est ajouté 0.04 % d'ammonium persulfate et 0.04 % de TEMED.

Les réactions de séquençage sont faites selon la méthode de Sanger et *al* (1977) avec la trousse de séquençage Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing. La séparation des brins d'ADN est effectuée en incubant un volume de 10 µl de mini-prep pendant 10 min à la température de la pièce dans une solution aqueuse de 0.2 N de NaOH (volume total de 30 µl). L'ADN est ensuite précipité avec 3 µl d'acétate d'ammonium (2 M acétate d'ammonium, 37% acide acétique glacial) et 70 µl d'éthanol 70 % et incubé pendant 20 min à -20 °C. Le mélange est centrifugé pendant 10 min à 13000 rpm et le culot d'ADN est rincé avec de l'éthanol 70 %. On centrifuge encore à 13000 rpm durant 5 min puis on assèche le culot au SpeedVac. Le culot d'ADN est dissout dans 11 µl de tampon Sequenase (40 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM MgCl₂, 50 mM NaCl) avec 15 ng de l'oligonucléotide voulu et le tout est incubé pendant 30 min à 37 °C.

L'ADN polymérase modifiée, la Séquenase, est utilisée pour synthétiser les fragments d'ADN. Le mélange de l'enzyme est préparé par échantillon à séquencer, de la façon suivante : 1 µl de 100 nM DTT, 0.8 µl de Labelling Mix (USB Sequenase kit (7.5 µM de dGTP, dCTP, dTTP)), 0.5 µl ³⁵S-dATP, 3.25 unités/µl Sequenase, 0.13 µl Pyrophosphatase (4 U/µl) et 2 µl 10 mM Tris-HCl pH 8). Le ³⁵S-dATP permet de visualiser

les brins par autoradiographie. Un volume de 5 μ l du mélange d'enzymes est ajouté au mélange d'ADN oligo puis incubé pendant 5 min à la température de la pièce. De cette réaction, on transfère 3.35 μ l dans des tubes différents contenant 2.5 μ l de didéoxynucléotides spécifiques, à une concentration optimale pour arrêter la réaction de séquençage et on laisse incuber à 37 °C pendant 5 à 10 min. La réaction est terminée par l'addition de 4 μ l de solution STOP (95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05 % bleu de bromophénol). Les échantillons sont chauffés à 95 °C avant d'être déposés sur un gel d'acrylamide. La migration se fait à 50 Watts afin de garder la température du gel à 50-55 °C, pour une durée variant entre 3 et 6 h. Le gel est transféré sur du papier buvard, séché et révélé par autoradiographie. À partir des résultats du séquençage, nous choisissons un clone provenant des mini-preps comportant la mutation voulue pour la sous-cloner dans la PS sauvage. Il est à noter que toutes les mutations effectuées sur la PS2 ont été séquencées de cette façon, puis par un service de séquençage automatisé afin de vérifier la totalité de l'ADN synthétisé par PCR.

2.6 Digestion enzymatique

Pour les sous-clonages, nous utilisons les enzymes de restrictions provenant de New England BioLabs Inc et les digestions sont faites selon les recommandations de la compagnie. La procédure est la même pour toutes les digestions. On digère 10 μ g d'ADN avec l'enzyme de restriction dans les conditions optimales dans un volume variant de 50 μ l à 100 μ l. Le temps d'incubation varie entre 2 h et 16 h. La réaction est terminée par l'ajout du « DNA loading buffer ». L'ADN digéré est ensuite séparé sur un gel d'agarose et le

fragment voulu est récupéré après identification en fonction de sa taille moléculaire relative au standard de poids moléculaire. La bande d'ADN sur le gel d'agarose est extraite et purifiée tel que décrit pour les produits du premier PCR (section 2.2). La ligation des fragments d'ADN est faite en incubant 0.1 pmol de vecteur avec 0.5 pmol d'insert dans un volume de 15 µl contenant du tampon de ligation (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol, 1 mM ATP, 25 µg/ml BSA) avec 200 unités de T4 DNA ligase. La réaction est incubée pendant 16 h à 16 °C.

2.7 Amplification des mutants et de la PS2 par Maxi-preps

Les échantillons de culture bactérienne prélevés de la mini-prep sontensemencés à raison de 50 µl dans 250 ml de LB. Les maxi-preps sont faites avec une trousse provenant de Qiagen. Les bactéries sont centrifugées à 3000 rpm puis suspendues dans 10 ml de tampon P1 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase). On lyse les bactéries en y ajoutant 10 ml de tampon P2 (200 mM NaOH, 1 % SDS) puis en incubant pendant 5 min à la température de la pièce. On procède à la précipitation du matériel bactérien en ajoutant 10 ml de tampon P3 (3 M acétate de potassium pH 5.5) et est incubé 20 min sur glace. Toute la solution est centrifugée pendant 30 min à 17 000 rpm. La solution d'ADN est ensuite filtrée à l'aide d'un gaze pour enlever les traces restantes de précipités. Une colonne Qiagen-Tip 500 est équilibrée avec 10 ml de tampon QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7.7, 15 % isopropanol) pour ensuite y ajouter la solution d'ADN. La colonne est lavée deux fois avec 30 ml de tampon QC (1 M NaCl, 50 mM MOPS pH 8.5, 15 % isopropanol) avant d'éluer avec 15 ml de tampon QN (1.6 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15 % isopropanol). L'ADN est précipité avec de l'isopropanol et il est

centrifugé une heure après pendant 30 min à 3000 rpm. Le culot est rincé avec 5 ml d'éthanol 70 %, centrifugé pendant 10 min à 3000 rpm et séché au SpeedVac. Le culot d'ADN est resuspendu dans l'eau et la concentration en ADN est calculée à partir de la densité optique à 260 nm après dilution de la solution 200 fois. La concentration de l'ADN se mesure en ng/ μ l et se calcule de la façon suivante; DO260 x facteur de dilution x 50.

2.8 Culture cellulaire

Les cellules SH-SY5Y sont cultivées dans du milieu DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium / Ham F12, GIBCO/BRL, Burlington, ON) en présence de 10 % FBS (Fetal Bovine Serum, GIBCO/BRL, Burlington, ON) et 5 % pénicilline / streptomycine. Les populations stables exprimant la PS2 de type sauvage ainsi que ses mutants sont cultivées avec 200 μ g/ml de généticine (Invitrogen). Les cellules sont cultivées dans un incubateur à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂. Le milieu de culture est changé à tous les 3 jours. Lorsque rendues à confluence, les cellules sont trypsinisées, centrifugées et diluées. Cette étape se fait à tous les 7 jours.

Les cellules HEK-293T sont cultivées dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO/BRL, Burlington, ON) supplémenté de 10 % FBS et 5 % streptomycine/pénicilline. La culture des cellules se fait dans un incubateur à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂. Les cellules sont trypsinisées et diluées lorsque rendues à confluence, c'est-à-dire 3 fois par semaine.

2.9 Établissement de populations stables de cellules SH-SY5Y exprimant PS2 et ses mutants

La transfection des cellules SH-SY5Y se fait avec la lipofectamine LF 2000 dans des plaques à 6 puits. Les cellules sontensemencées à une densité de 1.5×10^6 cellules/puits et incubées pendant environ 16 h, ce qui leur permet de bien adhérer aux puits. Pour chacun des puits, on prépare deux éprouvettes de polystyrène (5 ml, Falcon); l'une contenant 6 μ l de LF 2000 dilué dans 250 μ l d'OPTI-MEM et l'autre contenant 2 μ g d'ADN dilué dans 250 μ l d'OPTI-MEM. Les deux tubes sont incubés pendant 5 min à la température de la pièce avant d'être réunis dans un même tube. Le mélange LF 2000 et ADN est ensuite incubé pendant 20 min à la température de la pièce, avant d'être déposé directement sur les cellules adhérentes au fond du puits. Après une incubation d'une durée de 6 h dans un incubateur, les cellules sont lavées avec du milieu de culture et elles sont retournées dans l'incubateur pour 48 h pendant lesquelles elles vont exprimer les protéines désirées. Les cellules sont sélectionnées pour leur résistance à la généticine (400 μ g/ml), en les cultivant pendant 4 semaines. La concentration de généticine est ensuite abaissée à 200 μ g/ml dans le but de maintenir la sélection.

2.10 Transfection des cellules HEK-239T avec la lipofectamine

La transfection des cellules HEK-239T se fait également avec la LF 2000 dans des plaques à 6 puits. Les puits sont préalablement traités avec une solution de 0.1 mg/ml poly-L-lysine dissoute dans du PBS (137 mM NaCl, 27 mM KCl, 4.3 mM Na_2HPO_4 , 1.4 mM KN_2PO_4) puis ils sont incubés durant 30 min à la température de la pièce. Les puits sont par

la suite lavés avec 2 ml de PBS et séchés à la température de la pièce. Pour chaque puits, on prépare un mélange contenant 2 μ l de LF 2000 avec 250 μ l d'OPTI-MEM qu'on laisse incuber pendant 5 min à la température de la pièce avant de l'ajouter dans un puits contenant déjà 1 μ g d'ADN dilué dans 250 μ l d'OPTI-MEM. Le mélange LF 2000 et d'ADN est incubé pendant 20 min à la température de la pièce, avant d'ajouter les cellules HEK-239T (7.5×10^5 cellules/puits) dans 2 ml de DMEM en présence de 10 % FBS sans antibiotique. Les cellules sont cultivées dans l'incubateur durant 24 h pour ensuite être lavées avec du milieu de culture. L'expression des protéines désirées est vérifiée après 48 h.

2.11 Mesure du Ca^{2+} intracellulaire avec des cellules en suspension

Les populations stables de cellules SH-SY5Y sontensemencées à une densité de 8×10^6 cellules/pétri de 10cm et cultivées pendant 24-40h dans le milieu de culture. Les cellules sont lavées avec 5 ml de PBS et traitées avec une solution de 0.25 % de trypsine et 1 mM EDTA durant 2 min. Le traitement tryptique est arrêté avec 5 ml de milieu de culture et l'échantillon est centrifugé à 700 rpm durant 2 min. Le culot est resuspendu dans 0.5ml de milieu extracellulaire (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1.8 mM CaCl_2 , 10 mM dextrose, 0.1 % BSA, 15 mM HEPES, pH 7.4) et incubé avec 5 μ M de Fura-2AM. L'échantillon est incubé durant 30 min à 37 °C pour permettre à la sonde de pénétrer dans les cellules. Les cellules sont ensuite centrifugées et resuspendues dans 0.5 ml de milieu extracellulaire pour une période de 30 min durant laquelle la désestérification complète de la sonde est effectuée. Les cellules sont ensuite centrifugées et resuspendues dans 2 ml de milieu extracellulaire (avec ou sans Ca^{2+}) et déposées dans une cuvette de quartz de 10 mm (Hellma ltd, Concord, ON). La cuvette est placée dans la chambre tempérée à 37°C d'un

spectrofluorimètre Hitachi F-2000 (Hitachi Ltd., Tokyo, Japon). La mesure intracellulaire de Ca^{2+} fut évaluée en excitant les cellules alternativement aux longueurs d'ondes de 340 nm et 380 nm et en mesurant la fluorescence émise à 510 nm. Lorsqu'il lie le Ca^{2+} , le fura-2 subit un shift dans son spectre d'absorbance vers une longueur d'onde plus petite, et ce, avec peu de changement dans le spectre d'émission. Le ratio entre le Fura-2 lié au Ca^{2+} (340 nm) et le Fura libre (380 nm) permet de calculer la concentration de calcium indépendamment de la concentration de la sonde fluorophore, le volume de l'échantillon et la sensibilité des appareils. Les variations de Ca^{2+} furent calculées en utilisant la formule de Grynkiewicz (Grynkiewicz et al, 1985) : $[\text{Ca}^{2+}] = 224 \text{ nM} \times (\text{R} - \text{R}_{\text{min}}) / (\text{R}_{\text{max}} - \text{R}) \times \text{F}_{\text{min}}(380) / \text{F}_{\text{max}}(380)$ ou R indique le ratio des fluorescences émises aux différentes longueurs d'ondes d'excitation ($\lambda_{340} / \lambda_{380}$) et 224 nM est l'affinité du Fura2 pour le Ca^{2+} . Les fluorescences maximale (F_{max}) et minimale (F_{min}) ainsi que les ratios maximal (R_{max}) et minimal (R_{min}) furent déterminés par l'ajout de 0.1% de triton X-100 et de 35 mM EGTA respectivement.

2.12 Mesure du Ca^{2+} libéré par des cellules perméabilisées à la saponine

Les populations stables de cellules exprimant la PS2 et ses mutants sont cultivées dans des pétris de 15 cm à une densité de 5×10^7 cellules. Les cellules sont lavées avec 5 ml de PBS et traitées pendant 2 min avec une solution de 0.25 % trypsine et 1 mM EDTA. La trypsine est ensuite neutralisée en ajoutant 10 ml de milieu DMEM/F12 complet et les cellules sont centrifugées pendant 2 min à 700 rpm à 25°C. Le culot de cellules est resuspendu dans 5 ml de milieu intracellulaire (20 mM tris-HCl, pH 7.2, 110 mM KCl, 10 mM NaCl, 5 mM KH_2PO_4 et 2 mM MgCl_2) puis recentrifugé. Les cellules sont

resuspendues dans un volume total de 2 ml de milieu intracellulaire contenant 50 µg/ml de saponine, le système régénérateur d'ATP (20 mM de phosphocréatine, 40 unité/ ml de créatine kinase) et 0.5 µM de Fura-2 acide. Le Ca^{2+} ambiant est séquestré dans le réticulum endoplasmique des cellules perméabilisées lors de l'ajout de 1 mM ATP qui active les pompes SERCA. La relâche de Ca^{2+} est induite par l'ajout d' IP_3 (à différentes concentrations). La quantité de Ca^{2+} relâché est calibrée en ajoutant une quantité saturante de Ca^{2+} (F_{\max} et R_{\max}) et puis par l'ajout de 35 mM EGTA (F_{\min} et R_{\min}). La formule de Grynkiewicz (Grynkiewicz et al, 1985) est utilisée pour évaluer les niveaux ambiants de Ca^{2+} .

2.13 Immunobuvardage

Les populations stables de cellules exprimant la PS2 sont lysées dans 500 µl de milieu RIPA (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % NP40, 0.5 % acide déoxycholique, 0.1 % SDS, 0.1 mM PMSF, 1 µg/ml Soybean trypsin inhibitor, 0.5 mg/ml leupeptin) pendant 30 min à 4 °C avec agitation. La lyse cellulaire est ensuite complétée par 20 passages du lysat à travers une aiguille de calibre 20 et 10 passages à travers une aiguille de calibre 10. Les lysats sont ensuite centrifugés à 13 000 rpm durant 10 min à 4 °C. La concentration de protéine des lysats est quantifiée par la méthode de Bradford (Bio-Rad) selon le protocole du manufacturier. Une concentration égale de protéines pour chaque lysat est mélangée avec une partie égale de Laemmli 2X (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 20 % glycérol, 4 % SDS, 0.1 % bleu de bromophénol, 10 % beta-mercaptoéthanol). Le mélange est ensuite déposé sur un gel d'acrylamide (SDS PAGE) pour subir une électrophorèse. La concentration d'acrylamide utilisée pour l'électrophorèse

de l'IP₃R-1 est de 7 % et pour l'électrophorèse de la PS2 de 12%. La migration des protéines se fait à 20 mA/gel pendant 50-60 min.

Suite à leur migration sur gel SDS-PAGE, les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose Bio-Rad pour une période de 2.5 h à 400 mA dans du tampon de transfert (150 mM glycine, 20 mM Tris-base, 20 % méthanol). À la fin du transfert, la membrane est colorée avec le Ponceau S 0.1 % (dans 5 % acide acétique) pour permettre d'identifier les bandes du standard et de nous assurer du transfert des protéines sur la membrane. Pour enlever le Ponceau S, la membrane est lavée 3 fois durant 5 min avec le tampon TBS-Tween (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.3 % Tween).

Pour diminuer la liaison non spécifique des anticorps, la membrane est pré-incubée pendant une heure à la température de la pièce dans du tampon TBS-Tween contenant 5 % de lait écrémé. La membrane est par la suite incubée pendant 2 h à la température de la pièce avec l'anticorps de lapin anti-IP₃R-1 dilué 1000 fois dans le tampon TBS-Tween. Elle est ensuite lavée 3 fois pendant 10 minutes avec le TBS-Tween. L'anticorps secondaire (anti-IgG d'âne reconnaissant l'IgG de lapin) couplé à une peroxydase est lié à la membrane, à une dilution de 1/30 000 dans le TBS-Tween, pour une période de 2 h à la température de la pièce. La membrane subit ensuite 3 lavages d'une durée de 10 min avec du TBS-Tween avant d'être révélée avec le système de détection Western Lightning (Perkin) et autoradiographiée sur un film Kodak (Biomax ML) durant 5 min à la température de la pièce. L'immunobuvardage de l'actine se fait dans des conditions similaires.

L'immunobuvardage de la PS2 est fait dans des conditions légèrement différentes. La liaison non spécifique des anticorps est diminuée par une étape d'incubation de la membrane dans du TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 137 mM NaCl) contenant 0.05% Tween en présence de 5 % de lait écrémé. La membrane est incubée avec l'igG de lapin anti-PS2 (contre le fragment C-terminal de la PS2) dilué 1000 fois dans le tampon TBS-Tween en présence de 5 % de lait écrémé pendant 16 h à 4 °C.

2.14 Immunoprécipitation

Les billes de protéine-A-Sépharose sont lavées cinq fois avec du RIPA. Pour chaque échantillon, nous utilisons une quantité de 50 µl d'une solution de 50 % de billes dans du RIPA. La lyse cellulaire est similaire à celle effectuée pour l'immunobuvardage et les protéines sont dosées à l'aide du réactif de Bradford. Une quantité de 1 mg de protéines par échantillon est ajouté aux billes avec 5 µl d'anticorps de souris anti-FLAG et le mélange est agité durant 16 h à 4 °C. Les billes sont lavées cinq fois avec 500 µl de RIPA, puis chauffées pendant 5 min à 95 °C dans 50 µl de Leammi 2X. Après centrifugation pendant 5 min à 2000 rpm, le surnageant est séparé par SDS-PAGE et la protéine FLAGPS2 est détectée par immunobuvardage.

2.15 Analyse statistique

Tous les résultats présentés dans ce mémoire découlent d'expériences qui ont été répétées au moins trois fois. Les valeurs représentent la moyenne plus ou moins la déviation standard (SD) du nombre de données indiquées. La significativité des résultats a

été évaluée avec le test de student et les valeurs de P inférieures à 0.05 ont été considérées significativement différentes (*) de la valeur contrôle.

RÉSULTATS

3.1 Insertion d'un épitope FLAG dans PS2

Dans le but d'insérer un épitope FLAG après la première méthionine de PS2 et ses mutants causant la MA, nous avons utilisé la mutagenèse dirigée par PCR comme décrite dans la section matériel et méthodes. Pour vérifier l'insertion des nucléotides désirés, le fragment d'ADN amplifié par PCR fut cloné, isolé et séquencé par la méthode de Sanger *et al.* (1977). Les gels de séquence obtenus pour PS2 et ses mutants sont montrés à la Figure 6. On voit l'insertion de 24 nucléotides (5'-gattacaaggatgacgacgataag-3') codant pour l'épitope FLAG en aval du codon de la première méthionine de PS2 et ses mutants.

3.2 Expression de FLAGPS2

Afin de s'assurer que la protéine FLAGPS2wt est bien exprimée, nous avons procédé à une transfection transitoire dans les cellules HEK-293T. Après la lyse des cellules, les protéines ont été immunoprécipitées avec un anticorps spécifique reconnaissant l'épitope FLAG. La présence de FLAGPS2 fut ensuite révélée par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps spécifique reconnaissant le fragment C-terminal de la PS2 (Figure 7). Parce que l'immunoprécipitation a été effectuée avec l'anticorps reconnaissant l'épitope FLAG, il est logique de n'entraîner aucune protéine des cellules transfectées Mock ou transfectées avec PS2wt. Seulement les cellules transfectées avec FLAGPS2wt présentent des bandes immunoréactives à l'anticorps

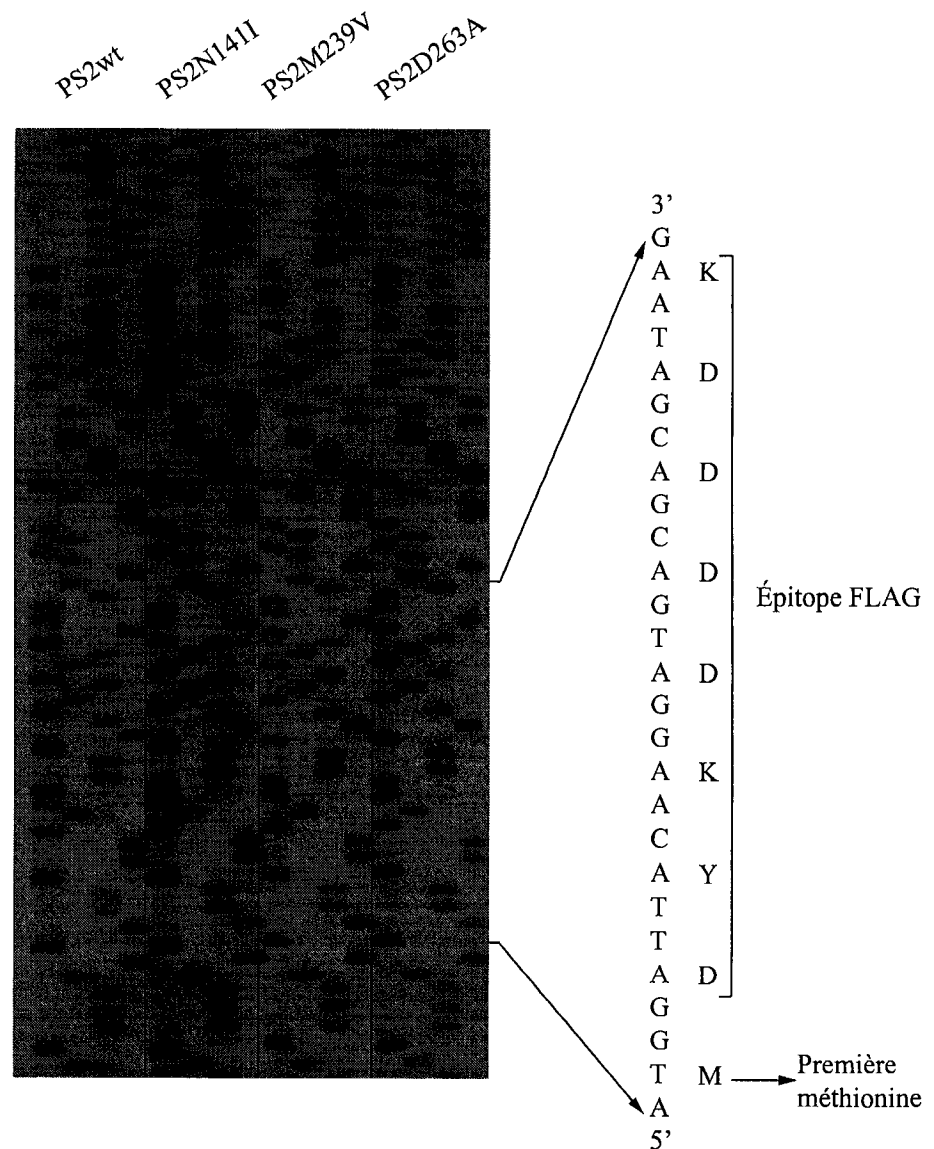


Figure 6: Séquençage des constructions d'ADNc de PS2 et ses mutants après l'insertion d'un épitope FLAG

Autoradiogramme du gel de séquence obtenu après l'électrophorèse des fragments d'ADN produits par la méthode de Sanger et al.(1977). L'ordre des nucléotides est A, C, G, T. La séquence codant pour l'épitope FLAG est retrouvée dans les séquences de la PS2 et de ses mutants.

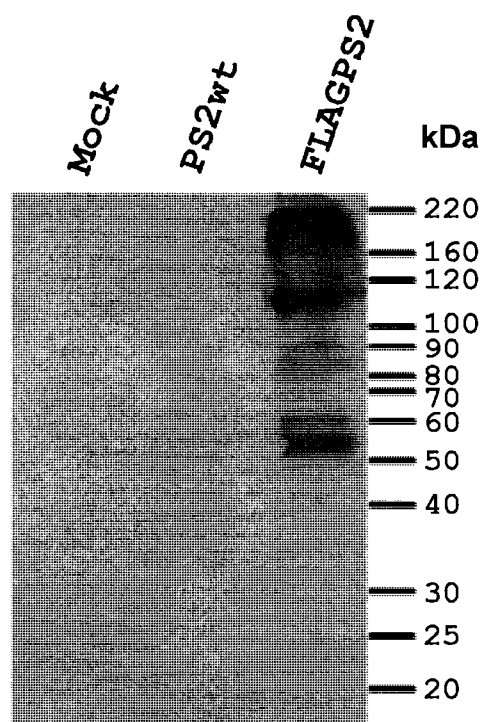


Figure 7: Immunobuvardage de la protéine FLAGPS2wt surexprimée dans les cellules HEK-293T.

Immunobuvardage de la protéine FLAGPS2wt surexprimée dans les cellules HEK-293T. Les cellules HEK-293T ont été transfectées avec l'ADNc de FLAGPS2wt, PS2wt ou Mock et incubées pendant 48h. Après la lyse des cellules, les protéines ont été immunoprécipitées avec un anticorps anti-FLAG, séparées par électrophorèse SDS-PAGE, transférées sur une membrane de nitrocellulose et révélées avec un anticorps reconnaissant un épitope situé dans la portion C-terminale de la PS2.

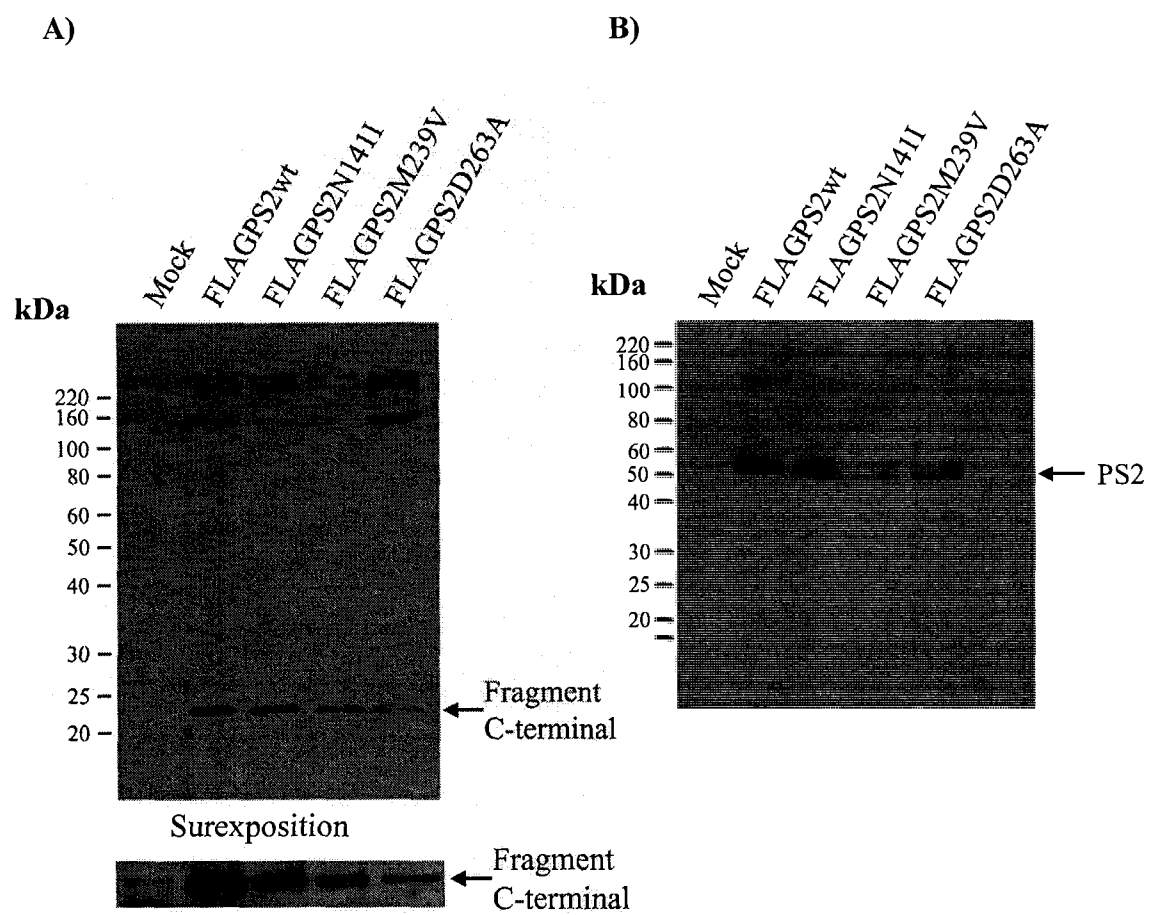
dirigé contre un épitope en C-terminal de la PS2. On note une bande caractéristique correspondant à la PS2 intacte et migrant avec un poids moléculaire d'environ 50 kDa. Les bandes migrant au dessus de la PS2 correspondent à des agrégats de cette dernière. Il est connu que la PS2 a une forte tendance à former des agrégats d'une masse de 100-250 kDa dans des gels SDS-PAGE (De Strooper, 1997). Ces résultats montrent que la FLAGPS2wt est bien exprimée dans les cellules HEK-293T.

3.3 Expression stable de FLAGPS2wt et de ses mutants dans les cellules SH-SY5Y

Les cellules SH-SY5Y ont été transfectées avec l'ADNc de FLAGPS2wt ou de ses mutants. Diverses populations stables furent sélectionnées pour leur capacité à croître dans un milieu contenant 400 µg/mL de G418. La Figure 8A montre que les diverses populations stables expriment de façon stable la FLAGPS2wt ou ses mutants qui migrent de façon caractéristique avec un poids moléculaire aux alentours de 25 kDa. Il faut mentionner que lors de son processus de maturation, la PS2 est clivée en deux fragments qui se dissocient dans les conditions d'électrophorèse SDS-PAGE. La bande observée à la Figure 8A correspond au fragment C-terminal qui contient l'épitope reconnu par l'anticorps anti-PS2. Lorsque l'autoradiogramme est surexposé (partie inférieure de la figure 8A), on note la présence de la bande de 25 kDa dans les cellules transfectées Mock. Il s'agit de la préséniline endogène qui est exprimée de façon ubiquiste dans toutes les cellules. Tel que mentionné pour la Figure 7, les bandes migrant au dessus du fragment de 25 kDa correspondent aux complexes de haut poids moléculaire incluant le fragment C-terminal de la PS2 et les diverses protéines du complexe γ -secrétase. La forme PS2 complète de 50 kDa est très peu abondante et ne peut pas être détectée à partir d'un simple extrait de lysat

Figure 8: Expression et maturation de la PS2 et de ses mutants dans les populations stables de cellules SH-SY5Y.

Panel A: Après la lyse des cellules SH-SY5Y, les protéines ont été séparées par électrophorèse SDS-PAGE, transférées sur une membrane de nitrocellulose et révélées avec un anticorps reconnaissant un épitope situé dans la portion C-terminale de la PS2. Le fragment C-terminal (CTF) de la PS2 est détecté à 25 kDa. La partie inférieure du panel A est une surexposition de l'autoradiogramme qui montre un faible niveau d'expression de fragment C-terminal dans les cellules transfectées Mock. Panel B: Après la lyse des cellules SH-SY5Y, les protéines ont été immunoprécipitées avec un anticorps anti-FLAG, puis séparées par électrophorèse SDS-PAGE, transférées et détectées avec l'anticorps anti-PS2. La PS2 de pleine longueur est détectée à 52 kDa.



cellulaire. Par contre lors d'une immunoprécipitation avec un anticorps anti-FLAG, la forme complète est suffisamment enrichie et concentrée pour être détectable par immunobuvardage avec l'anticorps anti-PS2 (Figure 8B). Dans ces conditions, le fragment C-terminal n'est pas immunoprécipité puisqu'il ne contient pas l'épitope FLAG. Ces résultats démontrent non seulement que la FLAGPS2wt et les mutants sont bien exprimés dans les diverses populations stables de SH-SY5Y mais en plus que les protéines sont clivées pour former le fragment C-terminal caractéristique du processus normal de maturation. Ces résultats suggèrent que les processus de maturation nécessaires à la bonne fonctionnalité des présénilines ont été effectués.

3.4 Effet de la PS2 sur la signalisation calcique induite par la voie G_q

Dans le but d'évaluer l'influence de la PS2 sur la signalisation calcique endogène, les cellules SH-SY5Y ont été stimulées avec du carbachol, un agoniste des récepteurs muscariniques M1 et M5. Ces récepteurs muscariniques qui activent la voie de signalisation G_q/phospholipase C, sont exprimés de façon endogène à la surface des cellules SH-SY5Y. La concentration intracellulaire de Ca²⁺ a été mesurée par spectrofluorométrie avec la sonde fluorescente Fura-2. Dans la réponse calcique, afin de distinguer la composante intracellulaire de la composante extracellulaire, on enlève le Ca²⁺ extracellulaire. En effet, lorsque l'expérience est effectuée dans un milieu extracellulaire ne contenant pas de Ca²⁺, on élimine toute possibilité d'entrée de Ca²⁺ via des canaux calciques à la surface des cellules. Dans ces conditions, une élévation de Ca²⁺ ne peut être reliée qu'à une relâche de Ca²⁺ provenant des réserves calciques du RE. La figure 9A montre qu'en absence de Ca²⁺ extracellulaire, 100 μM carbachol cause une importante augmentation de Ca²⁺

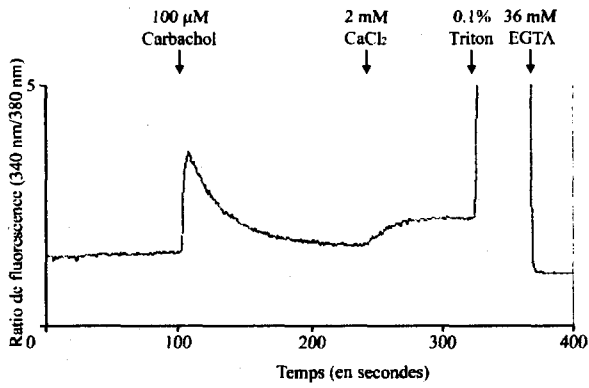
intracellulaire dans les cellules SH-SY5Y contrôles, les cellules transfectées Mock. La concentration de Ca^{2+} monte rapidement, pour ensuite redescendre lentement et se stabiliser à un niveau semblable au niveau basal. À ce moment, l'ajout de 2 mM Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire cause une légère augmentation de Ca^{2+} intracellulaire, illustrant ainsi l'entrée capacitive via les canaux calciques membranaires. La figure 9B montre le même type d'expérience effectuée avec des cellules SH-SY5Y exprimant le mutant PS2M239V. Dans ces cellules, on remarque que 100 μM de carbachol cause une élévation intracellulaire de Ca^{2+} moins importante que dans les cellules contrôles. De plus la figure 9B montre que l'entrée capacitive de Ca^{2+} est diminuée dans des cellules exprimant le mutant PS2M239V.

La figure 9C montre les élévations intracellulaires de Ca^{2+} obtenues dans les différentes populations stables de cellules SH-SY5Y, en réponse à 100 μM carbachol. Les cellules contrôles, c'est-à-dire les cellules transfectées avec pcDNA3 seulement, ont montré une élévation de 116.4 ± 33.0 nM Ca^{2+} (6 expériences indépendantes). Les cellules exprimant FLAGPS2wt n'ont pas montré une réponse significativement différente de celle des cellules Mock avec une valeur de 84.2 ± 7.5 nM (5 expériences indépendantes). Les cellules exprimant le dominant négatif FLAGPS2D263A ont montré une élévation de Ca^{2+} de 193.9 ± 13.9 nM (4 expériences indépendantes), ce qui est une réponse significativement supérieure à celle des cellules Mock. Par contre, les mutants de PS2 causant la maladie d'Alzheimer ont provoqué des réponses calciques significativement inférieures à celle des cellules contrôles. En effet, les cellules exprimant FLAGPS2N141I et FLAGPS2M239V ont montré des relâches de 52.1 ± 11.0 nM (5 expériences indépendantes) et 50.3 ± 5.2 nM

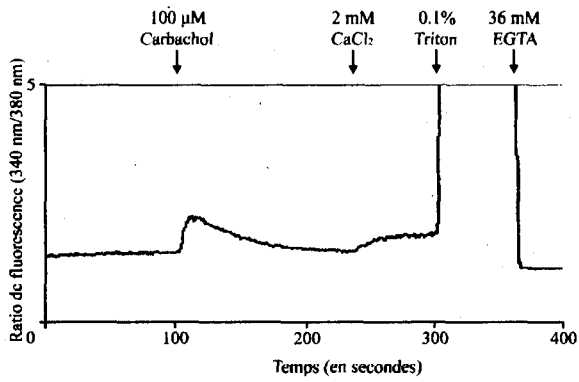
Figure 9 : Réponse calcique des cellules SH-SY5Y exprimant PS2 ou ses mutants.

Après avoir été chargées en Fura-2, les cellules ont été incubées dans un milieu ne contenant pas de Ca^{2+} et leur concentration calcique intracellulaire a été mesurée par spectrofluorométrie. Panel A : Tracé typique montrant la réponse des cellules transfectées Mock lors d'une stimulation avec 100 μM carbachol. Le tracé montre aussi l'entrée capacitative de Ca^{2+} qui se produit lors de l'ajout de 2 mM de Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire. La fluorescence est ensuite calibrée en perméabilisant les cellules avec du Triton X-100 qui permet au Ca^{2+} extracellulaire de pénétrer dans les cellules (fluorescence maximale) et en ajoutant un excès d'EGTA qui chélate tout le Ca^{2+} libre (fluorescence minimale). Panel B : Tracé typique montrant la réponse des cellules exprimant le mutant PS2M239V. Panel C : Relâches calciques induites par 100 μM carbachol, en absence de Ca^{2+} externe, dans les cellules SH-SY5Y transfectées avec la PS2 ou ses mutants. Panel D : Entrée capacitative de Ca^{2+} dans les cellules SH-SY5Y transfectées avec la PS2 ou ses mutants, suite à l'ajout de Ca^{2+} externe.

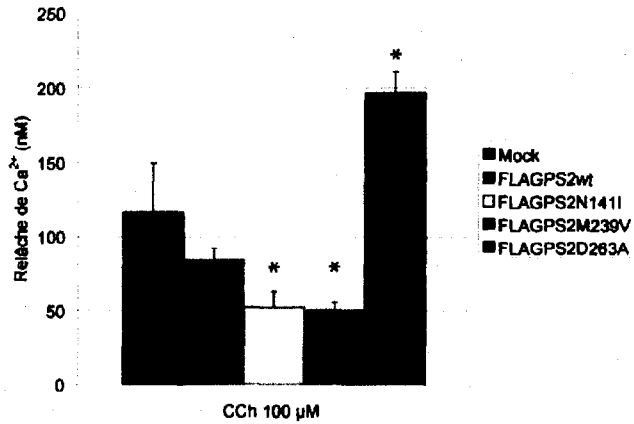
A) Mock



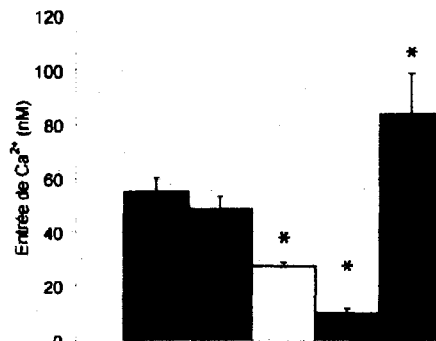
B) M239V



C)



D)



(4 expériences indépendantes), respectivement. Pour ce qui est de l'entrée capacitative, les cellules transfectées Mock ont montré une élévation de Ca^{2+} de 55.3 ± 5.2 nM (Figure 9D, 6 expériences indépendantes). Les cellules exprimant FLAGPS2wt n'ont pas montré une réponse significativement différente de celle des cellules Mock avec une entrée de Ca^{2+} de 48.7 ± 4.9 nM (5 expériences indépendantes). Les cellules exprimant le dominant négatif FLAGPS2D263A ont montré une entrée de Ca^{2+} correspondant à 83.8 ± 14.9 nM (4 expériences indépendantes), ce qui est une réponse significativement supérieure à celle des cellules Mock. À l'opposé, les mutants de PS2 causant la maladie d'Alzheimer ont provoqué des entrées capacitives de Ca^{2+} significativement inférieures à celle des cellules transfectées Mock. En effet, les cellules exprimant FLAGPS2N141I et FLAGPS2M239V ont montré des entrées de Ca^{2+} correspondant à 27.5 ± 1.6 nM (5 expériences indépendantes) et 10.1 ± 1.6 nM (4 expériences indépendantes), respectivement.

La relâche de Ca^{2+} intracellulaire est directement reliée au contenu des réserves de Ca^{2+} du RE. Il est donc important de vérifier si les différents mutants de la PS2 peuvent influencer le contenu des réserves de Ca^{2+} du RE. La figure 10 montre que l'ionomycine, un ionophore pour le Ca^{2+} , libère la même quantité de Ca^{2+} dans toutes les populations stables de cellules SH-SY5Y. Ainsi les différentes relâches de Ca^{2+} obtenues en réponse à 100 μM de carbachol ne seraient pas dues à des réserves de Ca^{2+} différentes mais plutôt à une modulation différente des mécanismes de relâche.

La relâche calcique intracellulaire est médiée majoritairement par les IP_3Rs . Dans le but de vérifier si la diminution de la relâche calcique observée dans les cellules exprimant

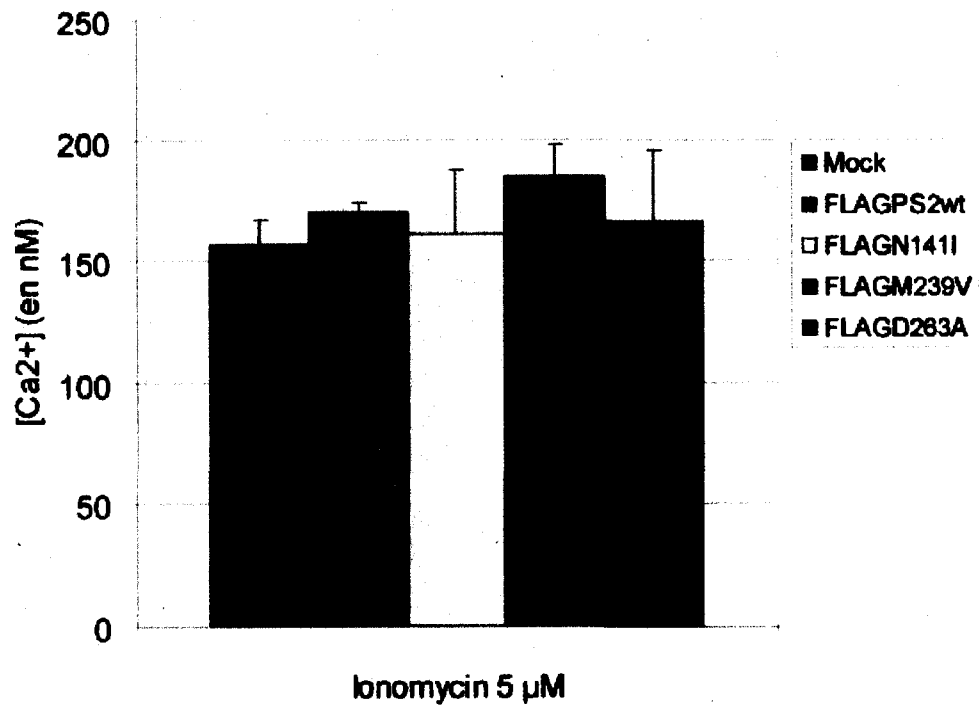


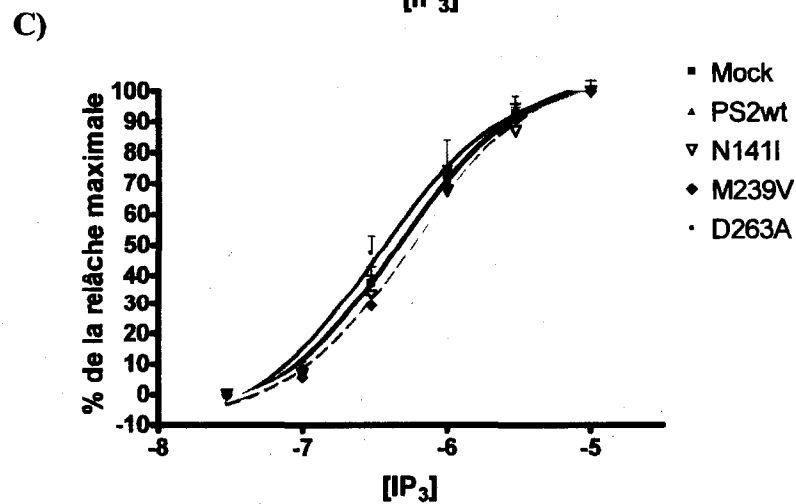
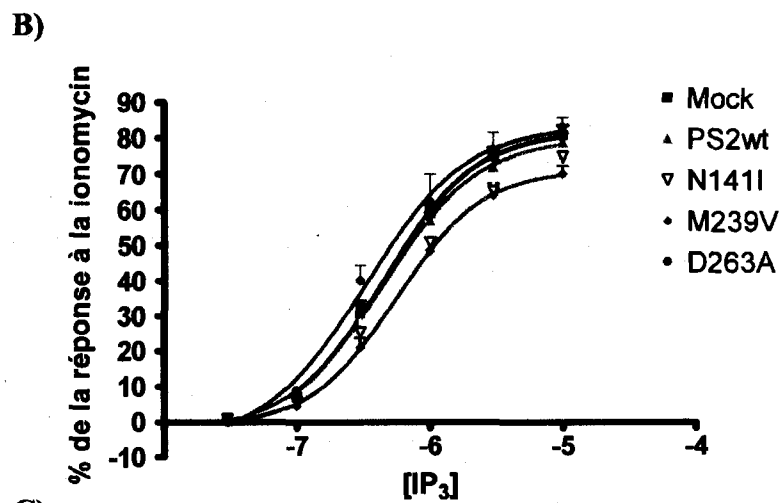
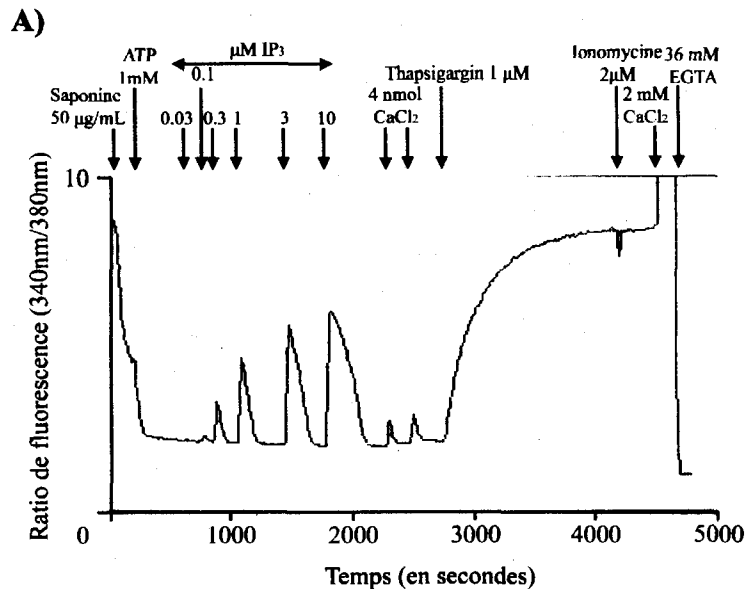
Figure 10: Contenu des réserves de Ca²⁺ du RE dans les cellules SH-SY5Y exprimant PS2 ou ses mutants.

Après avoir été chargées en Fura-2, les cellules ont été incubées dans un milieu ne contenant pas de Ca²⁺ et leur concentration calcique intracellulaire a été mesurée par spectrofluorométrie. Les réserves de Ca²⁺ du RE ont été vidangées avec 5 μM d'ionomycine.

les mutants de PS2 causant la maladie d'Alzheimer était due à un changement de propriété des IP₃Rs, nous avons effectué des mesures de relâche calcique sur les cellules perméabilisées à la saponine (50 µg/ml). La saponine est un détergent doux qui, à faible concentration, perméabilise la membrane plasmique tout en n'affectant pas la membrane du RE. Ainsi, en présence de saponine, les réserves de Ca²⁺ du RE demeurent intactes et l'IP₃ a facilement accès à son récepteur. Le tracé typique montré à la figure 11A montre qu'après perméabilisation à la saponine, l'ajout d'ATP active les pompes calciques SERCA qui transportent le Ca²⁺ à l'intérieur du RE et abaissent ainsi la concentration ambiante de Ca²⁺, ce qui se traduit par une baisse de la fluorescence du Fura-2. L'ajout subséquent de concentrations croissantes d'IP₃ cause des relâches plus ou moins importantes de Ca²⁺. A noter que dans nos conditions expérimentales, l'IP₃ est rapidement dégradé par des phosphatases endogènes, ce qui explique pourquoi la fluorescence du Fura-2 revient à son niveau basal entre chacune des doses d'IP₃. Cette activité phosphatase est très intéressante puisqu'elle nous permet d'effectuer plusieurs mesures de relâche calcique avec la même préparation de cellules perméabilisées. Les relâches calciques obtenues avec l'IP₃ sont calibrées avec un standard de Ca²⁺ (4 nmol CaCl₂) qui est ajouté de façon exogène. Le Ca²⁺ du RE est ensuite libéré avec la thapsigargine (1 µM), un inhibiteur des pompes SERCA. L'ajout de l'ionophore calcique ionomycine ne libère aucun Ca²⁺ supplémentaire, ce qui démontre que la thapsigargine a vidé efficacement les réserves de Ca²⁺ du RE. La calibration de la fluorescence est ensuite effectuée en ajoutant un excès de Ca²⁺ (fluorescence maximale) suivi d'un excès du chélateur de Ca²⁺ EGTA (fluorescence minimale). Cette approche expérimentale nous permet donc d'obtenir les courbes concentration-réponse complètes (Figure 11B) et les contenus des réserves de Ca²⁺ du RE

Figure 11 : Relâche de Ca^{2+} induite par l' IP_3 dans des cellules perméabilisées.

Panel A : Tracé typique montrant la fluorescence du Fura-2 dans 2 ml de milieu contenant 45×10^6 cellules SH-SY5Y perméabilisées à la saponine. Les divers agents ont été ajoutés aux moments indiqués par les flèches. Panel B : Courbes concentration-réponse pour la relâche de Ca^{2+} induite par l' IP_3 dans les cellules SH-SY5Y exprimant la PS2 ou ses mutants tel qu'indiqué par le code de couleurs. Panel C : Courbes concentration-réponse où la réponse est exprimée en % de la réponse maximale.



pour toutes les populations stables de l'étude. Les résultats montrent qu'il n'y a aucun changement d'affinité apparente pour la relâche de Ca^{2+} induite par l' IP_3 entre les cellules transfectées Mock (EC_{50} de $4.6 \pm 1.2 \times 10^{-7}$ M, 11 expériences indépendantes) et les cellules exprimant PS2wt (EC_{50} de $4.4 \pm 1.0 \times 10^{-7}$ M, 7 expériences indépendantes) (voir tableau 2). Il n'y a pas non plus de différence dans la quantité maximale de Ca^{2+} relâché par l' IP_3 dans les cellules transfectées Mock (80.6 ± 8.7 % du contenu des réserves de Ca^{2+} du RE sensible à l'ionomycine) et dans les cellules exprimant PS2wt (79.0 ± 4.8 % du contenu des réserves de Ca^{2+} du RE sensible à l'ionomycine). Par contre, les cellules exprimant le mutant PS2M239V ont montré une diminution significative de l'affinité apparente (EC_{50} de $6.0 \pm 0.8 \times 10^{-7}$ M, 7 expériences indépendantes) et de la capacité maximale de relâche de Ca^{2+} induite avec $10 \mu\text{M}$ IP_3 (69.9 ± 5.7 % du contenu des réserves de Ca^{2+} du RE sensible à l'ionomycine). Un EC_{50} de $5.8 \pm 0.2 \times 10^{-7}$ M (7 expériences indépendantes) et une relâche maximale de 74.7 ± 5.5 % du contenu des réserves de Ca^{2+} du RE sensible à l'ionomycine ont été obtenus avec les cellules exprimant le mutant PS2N141I. Bien que ces valeurs expérimentales tendent à montrer que les réponses calciques sont diminuées dans les cellules exprimant le mutant PS2N141I, ces valeurs ne se sont pas avérées significatives en utilisant le test de Student. Ces résultats suggèrent une diminution de l'affinité apparente des IP_3Rs et aussi une diminution du nombre d' IP_3Rs dans les cellules exprimant le mutant PS2M239V. Par ailleurs, les cellules exprimant le dominant négatif PS2D263A ont montré une augmentation significative de l'affinité apparente (EC_{50} de $3.5 \pm 0.1 \times 10^{-7}$ M, 4 expériences indépendantes) que les cellules contrôles, sans toutefois montrer de changement dans la relâche maximale induite par l' IP_3 . Il semblerait donc que l'activité γ -secrétase pourrait influencer l'activité des IP_3Rs dans les cellules SH-SY5Y.

Tableau 2: Relâche maximale de Ca²⁺ induite avec 10 µM d'IP3 et affinité apparente pour la relâche de Ca²⁺ induite par l'IP3 dans les diverses populations stables de cellules perméabilisées à la saponine.

La relâche maximale est exprimée en pourcentage de la relâche obtenue avec l'ionomycine.

	Relâche maximale de Ca ²⁺ (%)	EC ₅₀
Mock	80.6 ± 8.7	4.6 ± 1.2 × 10 ⁻⁷ M
FLAGPS2wt	78.9 ± 4.8	4,4 ± 1,0 × 10 ⁻⁷ M
FLAGN141I	74.7 ± 5.5	5,8 ± 2,0 × 10 ⁻⁷ M
FLAGM239V	69.9 ± 5.7 *	6,0 ± 0.8 × 10 ⁻⁷ M *
FLAGD263A	82.8 ± 4.7	3.5 ± 0.8 × 10 ⁻⁷ M *

3.5 Niveau d'expression de l'IP₃R1 dans les cellules SH-SY5Y

Puisque la PS2 fait partie du complexe γ -secrétase ayant une activité protéolytique, nous avons vérifié si elle pouvait cliver l'IP₃R-1, le seul sous-type d'IP₃R exprimé dans les cellules SH-SY5Y. La figure 12 montre que l'IP₃R-1 est facilement détecté par immunobuvardage avec un anticorps spécifique. Le niveau d'expression de l'IP₃R-1 dans les cellules exprimant PS2 ou le dominant négatif PS2D263A est assez semblable au niveau d'expression dans les cellules transfectées Mock. Par contre le niveau d'expression de l'IP₃R-1 est fortement réduit dans les cellules exprimant le mutant causant la maladie d'Alzheimer PS2M239V. Les cellules exprimant l'autre mutant causant la maladie d'Alzheimer, PS2N141I, ont montré une diminution plus faible, et même dans certaines expériences une diminution à peine perceptible de leur niveau d'IP₃R-1. Ces résultats suggèrent que l'IP₃R-1 pourrait être clivé par l'activité γ -secrétase des PS2 mutantes causant la maladie d'Alzheimer. Afin de vérifier si la PS2 peut interagir avec l'IP₃R-1, nous avons immunoprécipiter PS2 à partir des extraits cellulaires des différentes populations stables de cellules SH-SY5Y. Ensuite nous avons vérifié sur gel SDS-PAGE si l'IP₃R1 était entraîné par l'immunoprécipitation de PS2. À noter que le clone exprimant PS2M239V n'a pas été utilisé parce qu'il exprime un niveau trop faible d'IP₃R-1. La figure 13 montre que l'IP₃R-1 est présent dans les lysats cellulaires des différentes populations stables de cellules SH-SY5Y. Par contre l'immunoprécipitation de PS2 ou ses mutants (avec un anticorps anti-FLAG) n'entraîne aucune quantité détectable d'IP₃R-1. Donc une interaction entre l'IP₃R1 et la PS2 n'a pu être démontrée avec notre approche de co-immunoprécipitation

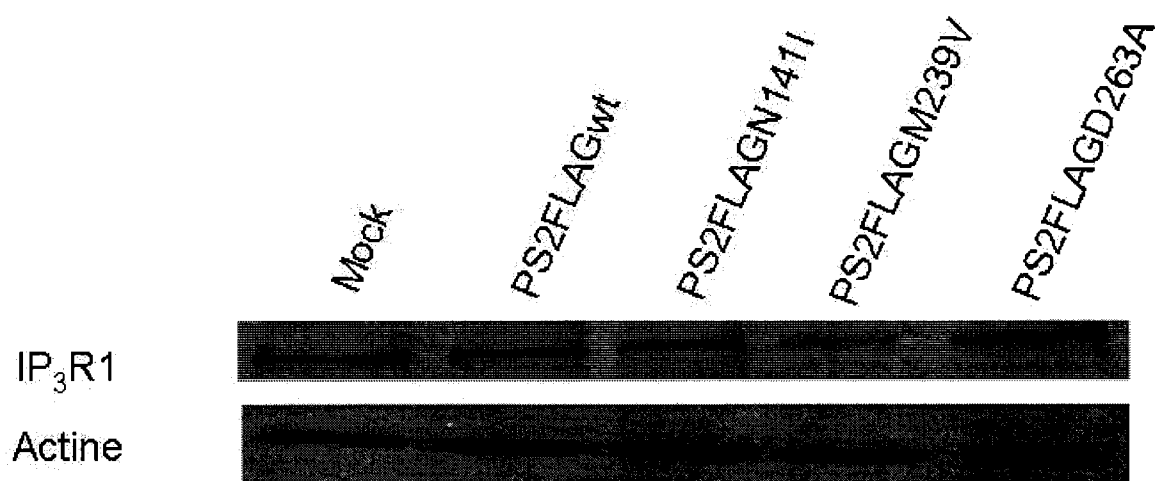


Figure 12: Diminution du récepteur IP₃R1 chez les populations stable de SH-SY5Y exprimant PS2FLAGM239V.

Une concentration de 50 µg de protéines par puits a été séparée par gel SDS-PAGE de 7%. Les populations stable exprimant les mutant de PS2 causant la MA, soit PS2N141I et PS2M239V, présentent une diminution du nombre d'IP₃R1 comparativement à la population stable transfectée avec le vecteur vide. Les populations stables exprimant PS2wt et PS2D263A n'avaient aucune différence dans la quantité d'IP₃R1.

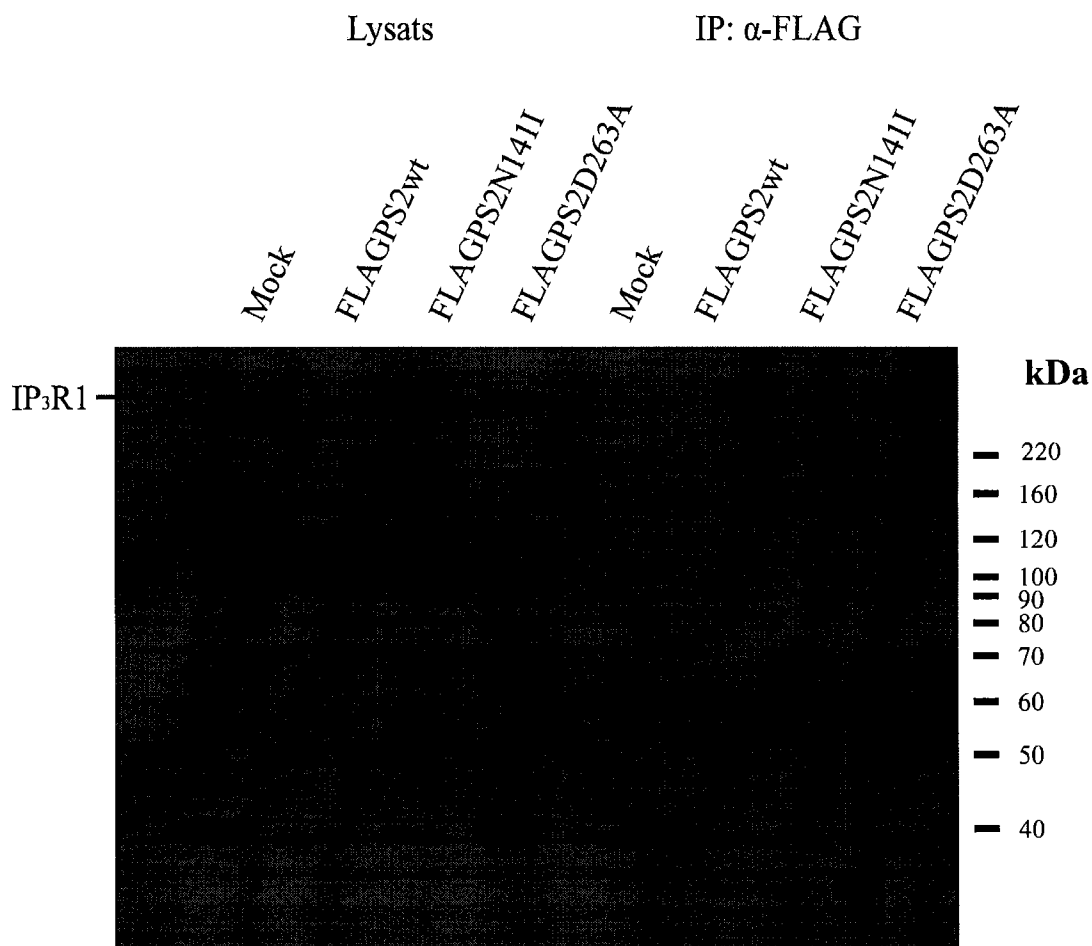


Figure 13: Essai de co-immunoprécipitation entre l'IP₃R1 et PS2

L'IP₃R1 ne semble pas co-immunoprécipiter avec la PS2. Les lysats cellulaires ont été immunoprécipités (IP) avec un anticorps dirigé contre l'épitope FLAG comme décrit dans la section matériel et méthodes. Les protéines provenant des lysats cellulaires et des immunoprécipités ont ensuite été séparées sur un gel SDS-PAGE, puis transférées sur une membrane de nitrocellulose pour y être incubées avec un anticorps dirigé contre les acides aminés 1829-1848 de l'IP₃R1. L'IP₃R1 a une masse moléculaire apparente de 260 kDa.

DISCUSSION

Un dysfonctionnement de la signalisation calcique cellulaire a été associé au vieillissement et à plusieurs maladies neurodégénératives, incluant la maladie d'Alzheimer (Hartmann *et al.*, 1994; Mattson *et al.*, 2000). Il a été suggéré que la surcharge des réserves intracellulaires de Ca^{2+} ainsi que la réduction de la CCE pourraient avoir un rôle prépondérant dans la pathogénèse de la forme familiale de la maladie (LaFerla *et al.*, 2002).

Les résultats que nous avons décrits dans ce mémoire suggèrent un rôle de PS2 dans la régulation du Ca^{2+} intracellulaire chez les neuroblastomes humains SH-SY5Y. Les cellules exprimant les mutants de PS2 causant la MA présentait une diminution significative de la relâche calcique stimulée par le carbachol. De plus, les cellules exprimant le dominant négatif de PS2 (D263A) présentait une augmentation significative de la relâche calcique dans les mêmes conditions. Par contre, les cellules exprimant la PS2 de type sauvage semblaient présenter une diminution de la relâche de Ca^{2+} stimulée par le carbachol, mais cette diminution ne s'est toutefois pas avérée significative. Nos résultats montrent aussi que le fragment C-terminal de la PS2 a été retrouvé à un niveau plus élevé chez les populations stables exprimant PS2 ou ses mutants. Il a été démontré que la génération de ce fragment C-terminal est essentielle pour l'assemblage de la PS2 avec les autres protéines du complexe γ -sécrétase et pour permettre son activité catalytique (Edbauer *et al.*, 2003; Kimberley et Wolf, 2003; Takasugi *et al.*, 2003). Aussi nos résultats suggèrent que le niveau d'expression et la maturation de PS2 et ses mutants sont adéquats dans nos différentes populations stables. Les CCE ont elles aussi été diminuées chez les cellules

exprimant les mutants de PS2 causant la MA, ce à quoi l'on pouvait s'attendre puisqu'il existe une relation claire entre la relâche intracellulaire de Ca^{2+} et la CCE. En effet, la CCE est directement reliée à la vidange des réserves de Ca^{2+} du RE (Kwan *et al.*, 1990, Putney, 1990).

Les résultats obtenus avec les SH-SY5Y exprimant les mutants de PS2 causant la MA sont différents de ceux obtenus par Leissring *et al.* (1999). Ces auteurs ont démontré que l'expression des mutants de PS2 (N141I, M239V) chez les oocytes de Xénope potentie significativement la relâche calcique induite par l' IP_3 . Nos résultats suggèrent le contraire. Comment expliquer cette différence? Les deux types cellulaires sont différents et proviennent d'espèces différentes, ce qui ouvre la possibilité que les complexes γ -sécrétase puissent être distincts. En effet, en plus d'avoir 2 PSs homologues (PS1 et PS2), il existe trois homologues murins de Aph-1 (Aph-1a, Aph-1b, et Aph-1c) (Steiner *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2005), et même deux isoformes d'épissage alternatif de Aph-1a (Aph-1aL et Aph-1aS) (Steiner *et al.*, 2002; Gu *et al.*, 2003; Luo *et al.*, 2003). Donc, plusieurs complexes avec des combinaisons différentes peuvent être extrapolés et certaines études ont caractérisé des combinaisons spécifiques (Hever *et al.*, 2000; Shirotani *et al.*, 2004). Quelques évidences laissent croire que ces différences physiques pourraient mener à des activités biologiques distinctes (Hong *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2003; Gu *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2005). Donc tel que suggéré précédemment, il est possible que dans le cas de la PS, des résultats contradictoires puissent être obtenus avec des cellules provenant de différentes espèces. De plus, la différence pourrait s'expliquer par le fait que les oocytes de Xénope expriment un seul isoforme d' IP_3R « closely related » à l' $\text{IP}_3\text{R}1$ (Kume *et al.*,

1993). Ainsi, les modulations de ce récepteur pourraient être différentes de celles de l'IP₃R1. D'autres études effectuées sur des cellules humaines ont fourni des résultats plus semblables aux nôtres. Une étude du groupe de Zatti *et al.* (2004) a démontré que des fibroblastes humains présentant la mutation M239I de PS2 associée à la MAF montraient une diminution des relâches calciques induites par le CCh et par l'acide cyclopiazonique (un inhibiteur de la pompe SERCA) et ce sans affecter la CCE. De plus, ils ont fait les mêmes observations chez les cellules HeLa et chez les cellules HEK293 transfectées transitoirement avec le mutant M239I. En 2005, le même groupe a publié une étude montrant que les réserves de Ca²⁺ ainsi que la CCE étaient diminuées chez des fibroblastes isolées de patients ayant la mutation T122R dans PS2 et aussi chez des cellules HeLa et HEK293 exprimant transitoirement la mutation T122R dans PS2 (Giacomello *et al.*, 2005). Ceci suggère que les différentes mutations de PS2 pourraient causer certains effets communs à tous les mutants de PS2 (tel que la diminution de la relâche calcique) et aussi certains effets plus spécifiques à chacun des mutants (tel que la diminution du contenu des réserves de Ca²⁺ du RE ou encore la diminution de la CCE). Ceci pourrait expliquer la divergence entre nos résultats montrant que les réserves de Ca²⁺ libérées avec 5µM ionomycin étaient inchangées chez les cellules SH-SY5Y exprimant les mutants de PS2, et les résultats de Zatti *et al.* (2006) montrant une diminution des relâches de Ca²⁺ chez des cellules SH-SY5Y exprimant le mutant T122R de PS2 et stimulées à la bradykinine (100nM) et à l'acide cyclopiazonique. Dans cette dernière étude, le mutant T122R n'affectait toutefois pas la CCE. En fait, il faut considérer que les changements dans les niveaux de Ca²⁺ causés par l'acide cyclopiazonique ou par un agoniste générant de l'IP₃ ne reflètent pas uniquement les contenus des réserves intracellulaires de Ca²⁺. En effet ces changements sont fortement affectés par d'autres facteurs tels les protéines chélatrices de

Ca^{2+} , les PMCA et certains autres canaux ioniques qui pourraient être des cibles potentielles des PSs.

Dans cette étude, nous avons aussi tenté d'élucider le mécanisme par lequel la PS2 et ses différents mutants pourraient moduler l'activité de l' $\text{IP}_3\text{R1}$. Nous avons observé que les mutants de PS2 causent une diminution de l'affinité apparente ainsi qu'une diminution de la relâche maximale de Ca^{2+} induite par l' IP_3 . À notre connaissance, nous sommes les premiers à rapporter de tels effets des mutants de PS2 sur l'activité d'un IP_3R . La diminution de l'affinité de l' $\text{IP}_3\text{R1}$ pourrait être due à un effet direct de la PS2 mutante sur l' $\text{IP}_3\text{R1}$, c'est-à-dire que la PS2 mutante cliverait l' $\text{IP}_3\text{R1}$ et modifierait ainsi sa conformation, ce qui diminuerait sa capacité de reconnaissance de l' IP_3 . La diminution de l'affinité apparente ne pourrait pas être due à une diminution du nombre de récepteurs, puisque selon la loi d'action de masse, pour une même concentration de ligand, il y aurait un même pourcentage de récepteurs ouvert. Une diminution du nombre total d' $\text{IP}_3\text{R1}$ entraînerait l'ouverture d'un plus grand nombre de récepteur à l' EC_{50} d' IP_3 , ce qui entraînerait une augmentation de l'affinité. La diminution de la relâche maximale pourrait être reliée à deux phénomènes : soit à une diminution de la capacitance de l' $\text{IP}_3\text{R1}$, soit à une diminution de son temps d'ouverture. Dans les deux cas, la diminution de la relâche maximale pourrait aussi découler d'un effet direct de la PS2 mutante sur l' $\text{IP}_3\text{R1}$. Par contre, nous ne pouvons écarter la possibilité que les PS2 mutantes auraient comme substrat une ou des protéine(s) dont le rôle est de réguler l'activité de l' $\text{IP}_3\text{R1}$.

Les relâches calciques mesurées avec les cellules perméabilisées à la saponine peuvent nous informer sur l'affinité apparente de l' $\text{IP}_3\text{R1}$ et aussi nous fournir un indice sur

la quantité totale de récepteurs reflétée par l'importance de la relâche maximale. Ainsi la diminution des relâches maximales observées chez les cellules exprimant les mutants de PS2 pourrait suggérer une diminution de la quantité de récepteurs. Avec l'approche d'immunobuvardage, nous avons effectivement observé une diminution des niveaux d'IP₃R1 dans les cellules SH-SY5Y exprimant les mutants de PS2 associés à MA. En accord avec cette observation, une autre équipe de chercheurs a observé une augmentation de l'expression de l'IP₃R1 chez des fibroblastes embryonnaires de souris où l'expression des PSs avait été supprimée (Kasri *et al.*, 2006). Ceci suggère que l'IP₃R1 pourrait être un substrat de la PS2. Par contre, avec une approche de co-immunoprécipitation, nous n'avons pas été en mesure de montrer une interaction directe entre PS2 et le récepteur à l'IP₃. Ceci n'exclue pas la possibilité que l'IP₃R1 puisse être un substrat de la PS2, car l'interaction entre l'IP₃R1 et la PS2 pourrait-être de trop courte durée ou de trop faible affinité pour permettre la formation d'un complexe suffisamment stable pour être co-immunoprécipité. Par contre, puisque nous n'avons pas été capables de co-immunoprécipiter les deux protéines, il faut aussi considérer la possibilité que la PS2 pourrait affecter des partenaires de régulation de l'IP₃R1. Un exemple de ces partenaires est la calmyrine, une protéine myristoylée liant le Ca²⁺ et qui interagit à la fois avec la PS2 (Stabler *et al.*, 2004) et l'IP₃R (White *et al.*, 2006). L'étude de White *et al.* (2006) a démontré que l'expression de la calmyrine chez les cellules PC12 provoquait une diminution de la relâche de Ca²⁺ induite par l'ATP. Par ailleurs, dans une étude d'électrophysiologie sur des noyaux d'oocytes de Xéopus, la calmyrine seule (sans l'IP₃) a augmenté la probabilité d'ouverture de l'IP₃R. Bien que sa relation avec la PS2 soit encore inexpliquée, une étude de Bernstein *et al.* (2005) suggérait que la calmyrine serait impliquée dans la pathologie de la MA. Ils ont montré une perte substantielle des neurones immunopositifs à la calmyrine dans toutes les

régions du cerveau de personnes décédées de la MA. Les neurones immunoréactifs restantes montraient une coloration plus forte concentrée dans la région périnucléaire. De plus, la calmyrine était en partie associée avec les plaques séniles.

Le mécanisme par lequel la PS2 régule les niveaux d'expression des canaux impliqués dans la relâche calcique n'est pas clair. Nos résultats suggèrent que l'activité γ -secrétase de la PS2 pourrait être impliquée puisque le dominant négatif de PS2 ne présente pas la diminution de l'IP₃R1. L'activité γ -secrétase de la PS2 pourrait affecter directement l'expression du gène de l'IP₃R suite au clivage de l'APP en AICD. Il fut démontré que l'AICD joue un rôle dans la transcription de gènes (Cao & Sudhof, 2001). Toutefois, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que d'autres cibles reconnues pour être clivées par la γ -secrétase, comme Notch, pourraient aussi être impliquées dans l'expression de l'IP₃R1. Enfin nos résultats laissent aussi ouverte la possibilité que l'IP₃R1 soit un substrat de la PS2. De plus, nos résultats n'excluent pas la possibilité que les mutants de PS2 causant la MA pourrait augmenter la dégradation de l'IP₃R1.

La régulation du Ca²⁺ semble être un élément important impliqué dans la pathologie de la MA. En diminuant les relâches de Ca²⁺ dans la cellule, les mutants de la PS2 empêcheraient l'activation normale des effecteurs du Ca²⁺, ce qui mènerait progressivement à un déséquilibre de l'homéostasie cellulaire, et éventuellement à la mort cellulaire. Nos résultats suggèrent qu'un changement dans l'expression des canaux impliqués dans la relâche calcique pourrait être un événement primaire dans l'altération de la réponse calcique impliqué dans la MA. Les mécanismes fins de régulation du Ca²⁺ intracellulaire

pourraient donc être des cibles thérapeutiques de choix pour le traitement de la MAF liée à PS2.

CONCLUSIONS

Nous avons démontré que l'expression des mutants de la PS2 causant la MA produit une diminution de la relâche calcique et de la CCE chez les cellules SH-SY5Y stimulées au CCh.

Nous avons montré que les mutants de PS2 provoquent une diminution de l'affinité apparente et de la relâche calcique maximale chez les cellules SH-SY5Y perméabilisées à la saponine.

Les mutants de la PS2 diminuent l'expression de l'IP₃R1 chez les cellules SH-SY5Y. L'activité γ -secrétase des mutants de la PS2 semble impliquée dans ce phénomène, puisque le dominant négatif de la PS2 ainsi que la PS2 de type sauvage ne causent aucun changement dans l'expression de l'IP₃R1.

Puisque l'approche de co-immunoprécipitation n'a pas démontré la formation d'un complexe stable entre la PS2 et l'IP₃R1, des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si les mutants de la PS2 agissent directement ou indirectement sur l'IP₃R1.

PERSPECTIVES

Déterminer si la PS2 a pour substrat l'IP₃R1 puisque l'activité γ -secrétase semble impliquée.

Déterminer s'il y a une diminution de la transcription de l'IP₃R1 chez les populations stables exprimant les mutants de PS2.

Déterminer si d'autres partenaires d'interactions sont impliqués dans l'effet de la PS2 sur l'IP₃R1.

Déterminer si la PS2 ou ses mutants peuvent avoir un effet sur d'autres canaux calciques.

Déterminer si des patients atteints de la MA présentent une diminution des niveaux d'IP₃Rs.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier particulièrement mes directeurs de recherche, le Dr. Guylain Boulay et le Dr. Gaétan Guillemette pour leur support ainsi que leur patience pendant tout le déroulement de ma maîtrise. Leurs conseils m'ont permis à la fois de devenir un meilleur scientifique ainsi qu'une meilleure personne.

Je tiens aussi à remercier sincèrement les membres du jury qui ont participé à la correction de mon mémoire : Le Dr. Guylain Boulay, le Dr. Gaétan Guillemette, le Dre Christine Lavoie et le Dr. Guylain Boissonneault.

Je tiens aussi à accorder un remerciement spécial à tous les membres de mes laboratoires d'accueil : Marc Lussier, Pascale Lepage, Simon Bousquet, Sylvie Cayouette, Cynthia Bernier, Nancy Francoeur, Alexandre P. Blanchard, Nathalie Nguyen, Eric Turgeon, Annabelle Caron, Guillaume Arguin, Yannik Régimbald-Dumas, Benoît Chaloux, Éric Béliveau, Ivana Domazet et Simon Tran Drouin. Je les remercie pour leurs conseils et pour le chaleureux accueil qu'ils m'ont accordé lorsque j'ai joint le laboratoire.

De plus, je tiens à remercier généreusement tous les membres du département qui ont contribué de près et de loin à l'achèvement de mon projet de maîtrise.

RÉFÉRENCES

ADKINS CE, TAYLOR CW., (1999) Lateral inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by cytosolic Ca(2+). *Curr Biol.* **9**:1115-8.

ALZHEIMER A., (1907) About a peculiar disease of the cerebral cortex. *Allg. Z. Psychiatr.* **64**, 146

ANNAERT W. G., LEVESUE L., CRAESSAERTS K., DIERINCK I., SNELLINGS G., WESTAWAR D., GEORGE-HYSLOP P.S., CORDELL B., FRASER P. et DE STROOPER B., (1999) Presenilin 1 controls gamma-secretase processing of amyloid precursor protein in pre-golgi compartments of hippocampal neurons. *J Cell Biol.* **147**:277-94.

BERNSTEIN HG, BLAZEJCZYK M, RUDKA T, GUNDELFINGER ED, DOBROWOLNY H, BOGERTS B, KREUTZ MR, KUZNICKI J, WOJDA U. (2005) The Alzheimer disease-related calcium-binding protein Calmyrin is present in human forebrain with an altered distribution in Alzheimer's as compared to normal ageing brains. *Neuropathol Appl Neurobiol.* **31**: 314-24.

BERRIDGE, M.J., LIPP, P. et BOOTMAN, M.D. (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **1**: 11-21.

BERRIDGE MJ, BOOTMAN MD, RODERICK HL. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **4**: 517-29.

BOSANAC I, ALATTIA JR, MAL TK, CHAN J, TALARICO S, TONG FK, TONG KI, YOSHIKAWA F, FURUICHI T, IWAI M, MICHIKAWA T, MIKOSHIBA K, IKURA M. (2002) Structure of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor binding core in complex with its ligand. *Nature* **420**: 696-700.

BOULAY, G., BROWN, D.M., QIN, N., JIANG, M., DIETRICH, A., ZHU, M.X., CHEN, Z, BIRNBAUMER, M., MIKOSHIBA, K. et BIRNBAUMER, L. (1999) Modulation of Ca(2+) entry by polypeptides of the inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor (IP3R) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP3R in store depletion-activated Ca(2+) entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 14955-60.

CAO X. & SUDHOF T.C., (2001) A transcriptively active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60, *Science* **293**: 115–120.

CARDY TJ, TAYLOR CW. (1998) A novel role for calmodulin: Ca²⁺-independent inhibition of type-1 inositol trisphosphate receptors. *Biochem J.* **334**: 447-55.

CAYOUILLE S., LUSSIER M.P., MATHIEU E.L., BOUSQUET S.M. et BOULAY G. (2003) Exocytotic insertion of TRPC6 channel into the plasma membrane upon Gq-protein-coupled receptor activation. *J. Biol. Chem.* **279**:7241-6.

CHAN, M. MAYNE S.L., HOLDEN C.P., GEIGER J.D. AND MATTSON M.P., (2000) Presenilin-1 mutations increase levels of ryanodine receptors and calcium release in PC12 cells and cortical neurons, *J. Biol. Chem.* **275**: 18195–18200.

CHEN F, TANDON A, SANJO N, GU YJ, HASEGAWA H, ARAWAKA S, LEE FJ, RUAN X, MASTRANGELO P, ERDEBIL S, WANG L, WESTAWAY D, MOUNT HT, YANKNER B, FRASER PE, ST GEORGE-HYSLOP P., (2003) Presenilin 1 and presenilin 2 have differential effects on the stability and maturation of nicastrin in Mammalian brain. *J Biol Chem.* **278**: 19974-9.

CHEN F, HASEGAWA H, SCHMITT-ULMS G, KAWARAI T, BOHM C, KATAYAMA T, GU Y, SANJO N, GLISTA M, ROGAEVA E, WAKUTANI Y, PARDOSSI-PIQUARD R, RUAN X, TANDON A, CHECLER F, MARAMBAUD P, HANSEN K, WESTAWAY D, ST GEORGE-HYSLOP P, FRASER P. (2006) TMP21 is a presenilin complex component that modulates gamma-secretase but not epsilon-secretase activity. *Nature.* **440**: 1208-12.

CITRON, M., WESTAWAY, D., XIA, W., CARLSON, G., DIEHL, T., LEVESQUE, G., JOHNSON-WOOD, K., LEE, M., SEUBERT, P., DAVIS, A., KHOLODENKO, D., MOTTER, R., SHERRINGTON, R., PERRY, B., YAO H., STROME, R., LIEBERBURG, I., ROMMENS, J., KIM, S., SCHENK, D., FRASER, P., ST GEORGE HYSLOP, P. et SELKOE, D.J. (1997) Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-

residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat. Med.* **3** : 67-72

CSUTORA P, SU Z, KIM HY, BUGRIM A, CUNNINGHAM KW, NUCCITELLI R, KEIZER JE, HANLEY MR, BLALOCK JE, MARCHASE RB., (1999) Calcium influx factor is synthesized by yeast and mammalian cells depleted of organellar calcium stores. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**: 121-6.

DE STROOPER B, BEULLENS M, CONTRERAS B, LEVESQUE L, CRAESSAERTS K, CORDELL B, MOECHARS D, BOLLEN M, FRASER P, GEORGE-HYSLOP PS, VAN LEUVEN F. (1997) Phosphorylation, subcellular localization, and membrane orientation of the Alzheimer's disease-associated presenilins. *J Biol Chem.* **272**: 3590-8.

DE STROOPER B, SAFTIG P, CRAESSAERTS K, VANDERSTICHELE H, GUHDE G, ANNAERT W, VON FIGURA K, VAN LEUVEN F. (1998) Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* **391**: 387-90.

DE STROOPER B, ANNAERT W, CUPERS P, SAFTIG P, CRAESSAERTS K, MUMM JS, SCHROETER EH, SCHRIJVERS V, WOLFE MS, RAY WJ, GOATE A, KOPAN R. (1999) A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* **398**: 518-22.

DRECHSEL DN, HYMAN AA, COBB MH, KIRSCHNER MW., (1992) Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell.* **3**:1141-54.

DROUET B., PINCON-RAYMOND M., CHAMBAZ J. et PILLOT T. (2000) Molecular basis of Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci.* **57**: 705-15

ECHEVARRIA W, LEITE MF, GUERRA MT, ZIPFEL WR, NATHANSON MH. (2003) Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol.* **5**: 440-6.

ECKERT A., HARTMANN H., FORSTL H., MULLER W.E., (1994) Alterations of intracellular calcium regulation during aging and Alzheimer's disease in nonneuronal cells. *Life Sci.* **55**: 2019-29.

ETCHEBERRIGARAY R, HIRASHIMA N, NEE L, PRINCE J, GOVONI S, RACCHI M, TANZI RE, ALKON DL. (1998) Calcium responses in fibroblasts from asymptomatic members of Alzheimer's disease families. *Neurobiol Dis* **5**: 37-45.

EVENAS J., MALMENDAL A., FORSEN S. (1998), Calcium. *Curr Opin Chem Biol* **2**: 293-302

FARMERY M.R., TJERNBERG L.O., PURSGLOVE S.E., BERGMAN A., WINBLAD B., NASLUND J. (2003) Partial purification and characterization of gamma-secretase from post-mortem human brain. *J Biol Chem.* **278**: 24277-84.

FASOLATO, C., HOTH, M., et PENNER, R. (1993) A GTP-dependent step in the activation mechanism of capacitative calcium influx. *J. Biol. Chem.* **268**: 20737-40.

FILL M. AND COPELLO J.A., (2002) Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol. Rev.* **82**: 893–922.

FURUICHI T., YOSHIKAWA S., MIYAWAKI A., WADA K., MAEDA N., MIKOSHIBA K. (1989) Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P400. *Nature* **342**: 32-8.

FURUICHI T, SIMON-CHAZOTTES D, FUJINO I, YAMADA N, HASEGAWA M, MIYAWAKI A, YOSHIKAWA S, GUENET JL, MIKOSHIBA K. (1993) Widespread expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 gene (*Insp3r1*) in the mouse central nervous system. *Receptors Channels.* **1**: 11-24.

GIACOMELLO M, BARBIERO L, ZATTI G, SQUITTI R, BINETTI G, POZZAN T, FASOLATO C, GHIDONI R, PIZZO P. (2005) Reduction of Ca²⁺ stores and capacitative Ca²⁺ entry is associated with the familial Alzheimer's disease presenilin-2 T122R mutation and anticipates the onset of dementia. *Neurobiol Dis.* **18**: 638-48.

GRYNKIEWICZ G., M. POENIE M. et TSIEN R.Y. (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* **260**(6):3440-50.

GU Y, CHEN F, SANJO N, KAWARAI T, HASEGAWA H, DUTHIE M, LI W, RUAN X, LUTHRA A, MOUNT HT, TANDON A, FRASER PE, ST GEORGE-HYSLOP P., (2003) APH-1 interacts with mature and immature forms of presenilins and nicastrin and may play a role in maturation of presenilin.nicastrin complexes. *J Biol Chem.* **278**: 7374-80.

GU Y, SANJO N, CHEN F, HASEGAWA H, PETIT A, RUAN X, LI W, SHIER C, KAWARAI T, SCHMITT-ULMS G, WESTAWAY D, ST GEORGE-HYSLOP P, FRASER PE., (2004)The presenilin proteins are components of multiple membrane-bound complexes that have different biological activities. *J Biol Chem.* **279**: 31329-36.

GUO, Q., FURUKAWA, K., SOPHER, B.L., PHAM, D.G., XIE, J., ROBINSON, N., MARTIN, G.M. et MATTSON, M.P. (1996) Alzheimer's PS-1 mutation perturbs calcium homeostasis and sensitizes PC12 cells to death induced by amyloid beta-peptide. *Neuroreport* **8**: 379-83.

GUO Q, SOPHER BL, FURUKAWA K, PHAM DG, ROBINSON N, MARTIN GM, MATTSON MP. (1997) Alzheimer's presenilin mutation sensitizes neural cells to apoptosis induced by trophic factor withdrawal and amyloid beta-peptide: involvement of calcium and oxyradicals. *J Neurosci.* **17**: 4212-22.

GUO Q, FU W, SOPHER BL, MILLER MW, WARE CB, MARTIN GM, MATTSON MP. (1999) Increased vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic necrosis in presenilin-1 mutant knock-in mice. *Nat Med.* **5**: 101-6.

HAASS, C., et DE STROOPER, B. (1999) The presenilins in Alzheimer's disease--proteolysis holds the key. *Science* **286**: 916-9.

HAMADA K, TERAUCHI A, MIKOSHIBA K. (2003) Three-dimensional rearrangements within inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by calcium. *J Biol Chem.* **278**: 52881-9.

HAYNES LP, TEPIKIN AV, BURGOYNE RD. (2004) Calcium-binding protein 1 is an inhibitor of agonist-evoked, inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated calcium signaling. *J Biol Chem.* **279**: 547-55.

HEBER S, HERMS J, GAJIC V, HAINFELLNER J, AGUZZI A, RULICKE T, VON KRETZSCHMAR H, VON KOCH C, SISODIA S, TREMML P, LIPP HP, WOLFER DP, MULLER U., (2000) Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci.* **20**: 7951-63.

HENRICSON A., KALL L. et SONNHAMMER E. L. (2005) A novel transmembrane topology of presenilin based on reconciling experimental and computational evidence. *FEBS J.* **272**: 2727-33.

HONG CS, CAROMILE L, NOMATA Y, MORI H, BREDESEN DE, KOO EH., (1999) Contrasting role of presenilin-1 and presenilin-2 in neuronal differentiation in vitro. *J Neurosci.* **19**: 637-43.

IRVINE RF., (1990) 'Quantal' Ca²⁺ release and the control of Ca²⁺ entry by inositol phosphates--a possible mechanism. *FEBS Lett.* **263**: 5-9.

ITO, E., OKA, K., ETCHEBERRIGARAY, R., NELSON, T.J., MCPHIE, D.L., TOFELGREHL, B., GIBSON, G.E. et ALKON, D.L. (1994) Internal Ca²⁺ mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 534-8.

JARRETT J.T., BERGER E. P., LANSBURY P. T., (1993) The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of the amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* **32**: 4693-7.

KANG DE, YOON IS, REPETTO E, BUSSE T, YERMIAN N, IE L, KOO EH., (2005) Presenilins mediate phosphatidylinositol 3-kinase/AKT and ERK activation via select signaling receptors. Selectivity of PS2 in platelet-derived growth factor signaling. *J Biol Chem.* **280**: 31537-47.

KASRI NN, SIENAERT I, PARYS JB, CALLEWAERT G, MISSIAEN L, JEROMIN A, DE SMEDT H. (2003) A novel Ca²⁺-induced Ca²⁺ release mechanism in A7r5 cells regulated by calmodulin-like proteins. *J Biol Chem.* **278**: 27548-55.

KASRI NN, BULTYNCK G, SMYTH J, SZLUFCHIK K, PARYS JB, CALLEWAERT G, MISSIAEN L, FISSORE RA, MIKOSHIBA K, DE SMEDT H. (2004A) The N-terminal Ca²⁺-independent calmodulin-binding site on the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is responsible for calmodulin inhibition, even though this inhibition requires Ca²⁺. *Mol Pharmacol.* **66**: 276-84.

KASRI NN, HOLMES AM, BULTYNCK G, PARYS JB, BOOTMAN MD, RIETDORF K, MISSIAEN L, MCDONALD F, DE SMEDT H, CONWAY SJ, HOLMES AB, BERRIDGE MJ, RODERICK HL. (2004B) Regulation of InsP₃ receptor activity by neuronal Ca²⁺-binding proteins. *EMBO J.* **23**: 312-21.

KASRI NN, KOCKS SL, VERBERT L, HEBERT SS, CALLEWAERT G, PARYS JB, MISSIAEN L, DE SMEDT H., (2006) Up-regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 is responsible for a decreased endoplasmic-reticulum Ca²⁺ content in presenilin double knock-out cells. *Cell Calcium.* **40**: 41-51.

KHACHATURIAN Z. S. (1989) Calcium, membranes, aging, and Alzheimer's disease. Introduction and overview. *Ann N Y Acad Sci.* **568**: 1-4.

KHAN AA, STEINER JP, SNYDER SH. (1992) Plasma membrane inositol 1,4,5-trisphosphate receptor of lymphocytes: selective enrichment in sialic acid and unique binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**: 2849-53.

KIM T.W., PETTINGELL W.H., HALLMARK O. G., MOIR R. D., WASCO W. ET TANZI R.E. (1997) Endoproteolytic cleavage and proteasomal degradation of presenilin 2 in transfected cells. *J Biol Chem.* **272**: 11006-10.

KISELYOV, K., XU, X., MOZHAYEVA, G., KUO, T., PESSAH, I., MIGNERY, G., ZHU, X., BIRNBAUMER, L. et MUALLEM, S. (1998) Functional interaction between InsP3 receptors and store-operated Htrp3 channels. *Nature* **396**: 478-82.

KUME, S., MUTO, A., ARUGA, J., NAKAGAWA, T., MICHIKAWA, T., FURUICHI, T., NAKADE, S., OKANO, H. AND MIKOSHIBA, K. (1993). The *Xenopus* IP3 receptor: structure, function, and localization in oocytes and eggs. *Cell* **73**,555 -570.

KWAN CY, TAKEMURA H, OBIE JF, THASTRUP O, PUTNEY JW JR. (1990) Effects of MeCh, thapsigargin, and La³⁺ on plasmalemmal and intracellular Ca²⁺ transport in lacrimal acinar cells. *Am J Physiol.* **258**: 1006-15.

LAFERLA F.M. (2002) Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* **3**: 862-72.

LEE SY, HWANG DY, KIM YK, LEE JW, SHIN IC, OH KW, LEE MK, LIM JS, YOON DY, HWANG SJ, HONG JT., (2006) PS2 mutation increases neuronal cell vulnerability to neurotoxicants through activation of caspase-3 by enhancing of ryanodine receptor-mediated calcium release, *FASEB J.* **20**: 151–153.

LEISSRING, M.A., PARKER, I. et LAFERLA, F.M. (1999A) Presenilin-2 mutations modulate amplitude and kinetics of inositol 1, 4,5-trisphosphate-mediated calcium signals. *J. Biol. Chem.* **274**: 32535-8.

LEISSRING, M.A., PAUL, B.A., PARKER, I., COTMAN, C.W., et LAFERLA, F.M. (1999B) Alzheimer's presenilin-1 mutation potentiates inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated calcium signaling in *Xenopus* oocytes. *J. Neurochem.* **72**: 1061-8.

LEISSRING, M.A., AKBARI, Y., FANGER, C.M., CAHALAN, M.D., MATTSON, M.P. et LAFERLA, F.M. (2000) Capacitative calcium entry deficits and elevated luminal calcium content in mutant presenilin-1 knockin mice. *J. Cell. Biol.* **149**: 793-8.

LEITE MF, THROWER EC, ECHEVARRIA W, KOULEN P, HIRATA K, BENNETT AM, EHRLICH BE, NATHANSON MH.(2003) Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**: 2975-80.

LESSARD C.B., LUSSIER M.P., CAYOUILLE S., BOURQUE G., BOULAY G. (2005) The overexpression of presenilin2 and Alzheimer's-disease-linked presenilin2 variants influences TRPC6-enhanced Ca²⁺ entry into HEK293 cells. *Cell Signal.* **17**: 437-45.

LEVY-LAHAD, E., WASCO, W., POORKAJ, P., ROMANO, D.M., OSHIMA, J., PETTINGELL, W.H., YU, C.E., JONDRO, P.D., SCHMIDT, S.D., WANG, K. *et al.* (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* **269**: 973-7.

LIN P, YAO Y, HOFMEISTER R, TSIEN RY, FARQUHAR MG. (1999) Overexpression of CALNUC (nucleobindin) increases agonist and thapsigargin releasable Ca²⁺ storage in the Golgi. *J Cell Biol.* **145**: 279-89.

LUO WJ, WANG H, LI H, KIM BS, SHAH S, LEE HJ, THINAKARAN G, KIM TW, YU G, XU H., (2003) PEN-2 and APH-1 coordinately regulate proteolytic processing of presenilin 1. *J Biol Chem.* **278**: 7850-4.

MA G, LI T, PRICE DL, WONG PC., (2005) APH-1a is the principal mammalian APH-1 isoform present in gamma-secretase complexes during embryonic development. *J Neurosci.* **25**: 192-8.

MARAMBAUD P, SHIOI J, SERBAN G, GEORGAKOPOULOS A, SARNER S, NAGY V, BAKI L, WEN P, EFTHIMIOPOULOS S, SHAO Z, WISNIEWSKI T, ROBAKIS NK. (2002) A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *EMBO J.* **21**: 1948-56.

MATTSON, M.P. (1990) Antigenic changes similar to those seen in neurofibrillary tangles are elicited by glutamate and Ca²⁺ influx in cultured hippocampal neurons. *Neuron* **4**: 105-17.

MATTSON, M.P., CHENG, B., DAVIS, D., BRYANT, K., LIEBERBURG, I., et RYDEL, R.E. (1992) Beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J. Neurosci.* **12**: 376-89.

MATTSON, M.P., LOVELL, M.A., EHMANN, W.D. et MARKESBERY, W.R. (1993B) Comparison of the effects of elevated intracellular aluminum and calcium levels on neuronal survival and tau immunoreactivity. *Brain. Res.* **602**: 21-31.

MATTSON, M.P., TOMASELLI, K.J. et RYDEL, R.E. (1993B) Calcium-destabilizing and neurodegenerative effects of aggregated beta-amyloid peptide are attenuated by basic FGF. *Brain. Res.* **621**: 35-49.

MATTSON, M.P. et CHAN, S.L. (2001) Dysregulation of cellular calcium homeostasis in Alzheimer's disease: bad genes and bad habits. *J. Mol. Neurosci.* **17**: 205-24.

PATEL S, MORRIS SA, ADKINS CE, O'BEIRNE G, TAYLOR CW (1997) Ca²⁺-independent inhibition of inositol trisphosphate receptors by calmodulin: redistribution of calmodulin as a possible means of regulating Ca²⁺ mobilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**: 11627-32.

PATTERSON RL, VAN ROSSUM DB, BARROW RK, SNYDER SH. (2004) RACK1 binds to inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and mediates Ca²⁺ release. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**: 2328-32.

PERIZ G, FORTINI ME. (2004) Functional reconstitution of gamma-secretase through coordinated expression of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *J Neurosci Res.* **77**: 309-22.

PUTNEY JW Jr. (1990) Receptor-regulated calcium entry. *Pharmacol Ther.* **48**: 427-34.
Review.

PUTNEY JW Jr., (2001) Pharmacology of capacitative calcium entry. *Mol Interv.* **1**: 84-94.

RANDRIAMAMPITA, C. et TSIEN, R.Y. (1993) Emptying of intracellular Ca²⁺ stores releases a novel small messenger that stimulates Ca²⁺ influx. *Nature* **364**: 809-14

ROGAEV, E. I., SHERRINGTON, R., ROGAEVA, E. A., LEVESQUE, G., IKEDA, M., LIANG, Y., CHI, H., LIN, C., HOLMAN, K., TSUDA, T., MAR, L., SORBI, S., NACMIAS, B., PIACENTINI, S., AMADUCCI, L., CHUMAKOV, I., COHEN, D., LANNFELT, L., FRASER, P. E., ROMMENS, J. M., et ST GEORGE-HYSLOP, P. H. (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**: 775-778

SANGER, F., NICKLEN, S. et COULSON, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**: 5463.

SEEGER M., NORDSTEDT C., PETANCESKA S., KOVACS D.M., GOURAS G.K., HAHNE S., FRASER P., LEVESQUE L., CZERNIK A.J., GEORGE-HYSLOP P.S.,

SISODIA S.S., THINAKARAN G., TANZI R.E., GREENGARD P. et GANDY S. (1997) Evidence for phosphorylation and oligomeric assembly of presenilin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**: 5090-4.

SELKOE, D. et KOPAN, R. (2003) Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* **26**: 565-97.

SHERRINGTON R, ROGAEV EI, LIANG Y, ROGAEVA EA, LEVESQUE G, IKEDA M, CHI H, LIN C, LI G, HOLMAN K, et al. (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* **375**: 754-60.

SHIROTANI K, EDBAUER D, PROKOP S, HAASS C, STEINER H., (2004) Identification of distinct gamma-secretase complexes with different APH-1 variants. *J Biol Chem.* **279**: 41340-5.

SIENAERT I, NADIF KASRI N, VANLINGEN S, PARYS JB, CALLEWAERT G, MISSIAEN L, DE SMEDT H. (2002) Localization and function of a calmodulin-apocalmodulin-binding domain in the N-terminal part of the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Biochem J.* **365**: 269-77.

SIPMA H, DE SMET P, SIENAERT I, VANLINGEN S, MISSIAEN L, PARYS JB, DE SMEDT H. (1999) Modulation of inositol 1,4,5-trisphosphate binding to the recombinant ligand-binding site of the type-1 inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor by Ca²⁺ and calmodulin. *J Biol Chem.* **274**: 12157-62.

SISODIA SS, ST GEORGE-HYSLOP PH. (2002) gamma-Secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in? *Nat Rev Neurosci.* **3**: 281-90

SMITH, I.F., BOYLE, J.P., VAUGHAN, P.F., PEARSON, H.A., COWBURN, R.F. et PEERS, C.S. (2002) Ca(2+) stores and capacitative Ca(2+) entry in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells expressing a familial Alzheimer's disease presenilin-1 mutation. *Brain. Res.* **949**: 105-11.

STABLER SM, OSTROWSKI LL, JANICKI SM, MONTEIRO MJ., (1999) A myristoylated calcium-binding protein that preferentially interacts with the Alzheimer's disease presenilin 2 protein. *J Cell Biol.* **145**: 1277-92.

STEINER H, WINKLER E, EDBAUER D, PROKOP S, BASSET G, YAMASAKI A, KOSTKA M, HAASS C., (2002) PEN-2 is an integral component of the gamma-secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. *J Biol Chem.* **277**: 39062-5.

STUTZMANN G.E., CACCAMO A., LAFERLA F.M. & PARKER I., (2004) Dysregulated IP3 signaling in cortical neurons of knock-in mice expressing an Alzheimer's-linked mutation in presenilin1 results in exaggerated Ca²⁺ signals and altered membrane excitability, *J. Neurosci.* **24**: 508–513.

SUH, Y.H. et CHECLER, F. (2002) Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol. Rev.* **54**: 469-525.

TAYLOR CW, LAUDE AJ. (2002) IP₃ receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic Ca²⁺. *Cell Calcium.* **32**: 321-34.

TAYLOR CW, DA FONSECA PC, MORRIS EP. (2004) IP₃ receptors: the search for structure. *Trends Biochem Sci.* **29**: 210-9.

THINAKARAN G., BORCHELT D.R., LEE M.K., SLUNT H.H., SPITZER L., KIM G., RATOVITSKY T., DAVENPORT F., NORDSTEDT C., SEEGER M., HARDY J., LEVEY A.I., GANDY S.E., JENKINS N.A., COPELAND N.G., PRICE D.L., SISODIA S.S. (1996) Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron.* **17**: 181-90.

THOMAS D, HANLEY MR., (1995) Evaluation of calcium influx factors from stimulated Jurkat T-lymphocytes by microinjection into *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem.* **270**: 6429-32.

TREPAKOVA ES, CSUTORA P, HUNTON DL, MARCHASE RB, COHEN RA, BOLOTINA VM., (2000) Calcium influx factor directly activates store-operated cation channels in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* **275**: 26158-63.

UCHIDA K, MIYAUCHI H, FURUICHI T, MICHIKAWA T, MIKOSHIBA K. (2003) Critical regions for activation gating of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem.* **278**: 16551-60.

VETRIVEL K.S., CHENG H., LIN W., SAKURAI T., LI T., NUKINA N., WONG P.C., XU H., et THINAKARAN G. (2004) Association of gamma-secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes. *J Biol Chem.* **279**: 44945-54.

WEIHOFEN A., BINNS K., LEMBERG M. K., ASHMAN K. et MARTOGLIO B., 2002 Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease. *Science.* **296**: 2215-8.

WHITE C, YANG J, MONTEIRO MJ, FOSKETT JK., (2006) CIB1, a ubiquitously expressed Ca²⁺-binding protein ligand of the InsP3 receptor Ca²⁺ release channel. *J Biol Chem.* **281**: 20825-33.

WILLIAMS AJ, WEST DJ, SITSAPESAN R. (2001) Light at the end of the Ca(2+)-release channel tunnel: structures and mechanisms involved in ion translocation in ryanodine receptor channels. *Q Rev Biophys.* **34**: 61-104.

WOLFE M.S., XIA W., OSTASZEWSKI B.L., DIEHL T.S., KIMBERLY W.T., SELKOE D.J. (1999) Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature.* **398**: 513-7.

WOJCIKIEWICZ RJ. (1995) Type I, II, and III inositol 1,4,5-trisphosphate receptors are unequally susceptible to down-regulation and are expressed in markedly different proportions in different cell types. *J Biol Chem.* **270**: 11678-83.

WORLEY PF, BARABAN JM, COLVIN JS, SNYDER SH. (1987) Inositol trisphosphate receptor localization in brain: variable stoichiometry with protein kinase C. *Nature.* **325**: 159-61.

YANG J, MCBRIDE S, MAK DO, VARDI N, PALCZEWSKI K, HAESELEER F, FOSKETT JK., (2002) Identification of a family of calcium sensors as protein ligands of inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} release channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**: 7711-6.

YAO, Y., FERRER-MONTIEL ,A.V., MONTAL, M. et TSIEN, R.Y. (1999) Activation of store-operated Ca^{2+} current in *Xenopus* oocytes requires SNAP-25 but not a diffusible messenger. *Cell* **98**: 475-85.

YOSHIKAWA S, TANIMURA T, MIYAWAKI A, NAKAMURA M, YUZAKI M, FURUICHI T, MIKOSHIBA K., (1992) Molecular cloning and characterization of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem.* **267**: 16613-9.

YOSHIKAWA F, MORITA M, MONKAWA T, MICHIKAWA T, FURUICHI T, MIKOSHIBA K., (1996) Mutational analysis of the ligand binding site of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem.* **271**: 18277-84.

ZATTI G, GHIDONI R, BARBIERO L, BINETTI G, POZZAN T, FASOLATO C, PIZZO P., (2004) The presenilin 2 M239I mutation associated with familial Alzheimer's disease reduces Ca²⁺ release from intracellular stores. *Neurobiol Dis.* **15**: 269-78.

ZATTI G, BURGO A, GIACOMELLO M, BARBIERO L, GHIDONI R, SINIGAGLIA G, FLOREAN C, BAGNOLI S, BINETTI G, SORBI S, PIZZO P, FASOLATO C., (2006) Presenilin mutations linked to familial Alzheimer's disease reduce endoplasmic reticulum and Golgi apparatus calcium levels. *Cell Calcium.* **39**: 539-50.