

La maladie d'Alzheimer et les pathologies à prion : dénominateurs communs et différences

Bruno Vincent

► **To cite this version:**

Bruno Vincent. La maladie d'Alzheimer et les pathologies à prion : dénominateurs communs et différences. Biologie cellulaire. Université Nice Sophia Antipolis, 2007. tel-00170285

HAL Id: tel-00170285

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00170285>

Submitted on 10 Sep 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Nice-Sophia Antipolis
Faculté des Sciences et Techniques
Ecole Doctorale de Biologie et Pharmacologie Moléculaires

Habilitation à diriger des recherches

Bruno VINCENT

**La maladie d'Alzheimer et les pathologies à prion :
dénominateurs communs et différences**

soutenue le 9 février devant le jury :

Dr Frédéric CHECLER	Président
Dr Florence BERANGER	Rapporteur
Pr Jean-Noël OCTAVE	Rapporteur
Dr Didier VILETTE	Rapporteur
Pr Michel LAZDUNSKI	Examineur
Dr Patrick AUBERGER	Examineur

SOMMAIRE

Curriculum vitae	p.1
Situation actuelle	p.1
Titres universitaires	p.1
Parcours scientifique	p.1
Encadrement	p.2
Activité d'enseignement	p.2
Liste de publications pendant la thèse	p.3
Liste de publications après la thèse	p.4
Collaborations	p.8
Synthèse des travaux de recherche	p.9
Résumé des travaux réalisés durant la thèse	p.9
Résumé des travaux réalisés durant le stage post-doctoral	p.10
Résumé de l'activité de recherche sur la thématique actuelle	p.12
Préambule	p.12
Introduction	p.13
Principaux résultats obtenus	p.16
Conclusion	p.23
Perspectives	p.24
Littérature citée	p.29
Annexes	p.33

CURRICULUM VITAE

Bruno VINCENT

Né le 17 décembre 1966 à Marseille (Bouches du Rhône)

Nationalité : Française

Marié, un enfant

16 rue Paganini, 06000 Nice

Adresse professionnelle: Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 6097
CNRS/UNSA, 660 route des Lucioles, 06560, Valbonne

Tel: 04 93 95 77 59

Fax : 04 93 95 77 08

email: vincentb@ipmc.cnrs.fr

Situation actuelle

Chargé de recherche de 1^{ère} classe au CNRS (section du comité national n°30 : Thérapeutiques, médicaments et bio-ingénieries : concepts et moyens) dans le laboratoire dirigé par le docteur Frédéric CHECLER à l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR6097 CNRS/UNSA.

Titres universitaires

- Thèse de doctorat (mention très honorable avec félicitations du jury), Université de Nice-Sophia-Antipolis, 1996.
- DEA de Pharmacologie et Biologie Cellulaires et Moléculaires (mention très bien, classé 4^{ème}), Université de Nice-Sophia-Antipolis, 1992.
- Maîtrise de Biochimie (mention assez bien), Université de Nice-Sophia-Antipolis, 1990.
- Licence de Biochimie, Université de Nice-Sophia-Antipolis, 1989.

Parcours scientifique

Octobre 1991-Octobre 1992 : DEA de Pharmacologie et Biologie Cellulaires et Moléculaires de l'Université de Nice-Sophia-Antipolis à l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UPR 411 sous la direction du docteur Frédéric CHECLER dans le laboratoire du professeur Jean-Pierre VINCENT. Travail intitulé « Les peptidases astrocytaires et leur implication dans le métabolisme de la neurotensine. Etude de l'expression de l'endopeptidase 24.16 au cours du développement astrocytaire et neuronal ».

Octobre 1992-Octobre 1996: Doctorat de l'Université de Nice-Sophia-Antipolis à l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UPR 411 sous la direction du docteur Frédéric CHECLER dans le laboratoire du professeur Jean-Pierre VINCENT.
Financement: bourse du Ministère (3 ans) puis bourse de l'ARC (1 an).

Thèse soutenue le 25 Octobre 1996 intitulée “Biologie cellulaire et pharmacologie de l’endopeptidase 3.4.24.16”.

Décembre 1996-Mai 1999: Stage post-doctoral à l’Université Rockefeller dans le laboratoire du professeur Paul GREENGARD à New York.

Financement: INSERM (1an) puis financement par le laboratoire d’accueil (NIH, 18 mois).

Thème de recherche: Etude du rôle des oestrogènes et de l’apolipoprotéine E dans la maladie d’Alzheimer.

Juillet 1999-Juin 2001: Stage post-doctoral à l’Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 6097 CNRS/UNSA dans le laboratoire du docteur Frédéric CHECLER.

Financement: bourse de la Communauté européenne (2 ans).

Thème de recherche: “Caractérisation et régulation du métabolisme normal de la protéine prion cellulaire”.

Depuis octobre 2001: Chargé de recherche de 1^{ère} classe au CNRS à l’Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 6097 CNRS/UNSA dans le laboratoire du docteur Frédéric CHECLER.

Encadrement

Encadrement de stage

M. Mart LOOG (étudiant estonien, stage de trois mois), 1995

Mlle Agnès FAURE (stage IUT, deux mois), 1996

Mlle Nadège LAY (stage de 6 mois dans le cadre du Master 1^{ère} année) à compter de janvier 2007

Encadrement en DEA et thèse

M. Moustapha ALFA CISSE (cisse@ipmc.cnrs.fr) a effectué son DEA entre septembre 2002 et juillet 2003 sous ma direction scientifique dans le laboratoire du Dr Frédéric CHECLER (Intitulé du mémoire: “Implication de la désintégrine ADAM9 dans le métabolisme de la protéine prion: régulation par la protéine kinase C, les agonistes muscariniques et comparaison avec la maturation du précurseur de la protéine β -amyloïde”).

Il a été classé 1^{er} et a obtenu une bourse du Ministère pour effectuer une thèse de doctorat au laboratoire. La soutenance de celle-ci aura lieu le 21 mars 2007.

Activité d’enseignement

- Examineur dans le jury de thèse de M. Mathieu Marella (« La protéine prion associée à la pathologie: accumulation cellulaire et implication dans la migration des cellules microgliales ») le 1^{er} octobre 2004.

- Membre de jury de Masters 1^{ère} et 2^{ème} années (UNSA) pour l’année universitaire 2005/2006.

Liste des articles ou revues publiés pendant la thèse

Publications à comité de lecture

- 1- Barelli H., Mao Y.K., **Vincent B.**, Daniel E.E., Vincent J.P. and Checler F. (1993). Differential catabolic fate of neuromedin N and neurotensin in the canine intestinal mucosa. *Peptides*. 14, 457-463.
- 2- Checler F., Barelli H., Dauch P., **Vincent B.**, Dive V., Beaudet A., Daniel E.E., Fox-Threkeld J.E.T., Masuo Y. and Vincent J.P. (1993). Recent advances on endopeptidase 3.4.24.16. *Biochem. Soc. Trans.* 21, 692-698.
- 3- **Vincent B.**, Vincent J.P. and Checler F. (1994). Neurotensin and neuromedin N undergo distinct catabolic processes in murine astrocytes and primary cultured neurons. *Eur. J. Biochem.* 221, 297-306.
- 4- **Vincent B.**, Dive V., Yiotakis A., Smadja C., Maldonado R., Vincent J.P. and Checler F. (1995). Phosphorus-containing peptides as mixed inhibitors of endopeptidase 3.4.24.15 and 3.4.24.16: effect on neurotensin degradation in vitro and in vivo. *Br. J. Pharm.*, 115, 1053-1063.
- 5- Jiracek J., Yiotakis A., **Vincent B.**, Lecoq A., Nicolaou A., Checler F. and Dive V. (1995). Development of highly potent and selective phosphinic peptide inhibitors of the zinc endopeptidase 24-15 using combinatorial chemistry. *J. Biol. Chem.*, 270, 21701-21706.
- 6- **Vincent B.**, Vincent J.P. and Checler F. (1995). Purification and characterization of human endopeptidase 3.4.24.16. Comparison with the porcine counterpart indicates a unique cleavage site on neurotensin. *Brain Res.*, 709, 51-58.
- 7- Jiracek J., Yiotakis A., **Vincent B.**, Checler F. and Dive V. (1996). Development of the first potent and selective inhibitor of the zinc endopeptidase neurolysin using a systematic approach based on combinatorial chemistry of phosphinic peptides. *J. Biol. Chem.*, 271, 19606-19611.
- 8- **Vincent B.**, Beaudet A., Dauch P., Vincent J.P. and Checler F. (1996). Distinct properties of neuronal and astrocytic endopeptidase 3.4.24.16: a study on differentiation, subcellular distribution and secretion processes. *J. Neurosci.*, 16, 5049-5059.
- 9- **Vincent B.**, Dauch P., Vincent J.P. and Checler F. (1997). Stably transfected human cells expressing rat brain endopeptidase 3.4.24.16: biochemical characterization of the activity and expression of a membrane-bound counterpart. *J. Neurochem.*, 68, 837-845.
- 10- Chevallier N., Jiracek J., **Vincent B.**, Ichai C., Vincent J.P. and Checler F. (1997). Examination of the role of endopeptidase 3.4.24.15 in A β formation by human transfected cells. *Br. J. Pharm.* 121, 556-562.

- 11- **Vincent B.**, Jiracek J., Noble F., Loog M., Roques B., Dive V., Vincent J.P. and Checler F. (1997). A novel selective and potent phosphinic peptide inhibitor of endopeptidase 3.4.24.16: effect on neurotensin-induced analgesia and neuronal inactivation. *Br. J. Pharm.* 121, 705-710.
- 12- **Vincent B.**, Jiracek J., Noble F., Loog M., Roques B., Dive V., Vincent J.P. and Checler F. (1997). Contribution of endopeptidase 3.4.24.15 to central neurotensin inactivation. *Eur. J. Pharmacol.* 334, 49-53.
- 13- Rioli V., Kato A., Portaro F.C.V., Cury G.K., Te Kaat K., **Vincent B.**, Checler F., Camargo A.C.M., Glucksman M.J., Roberts J.L., Hirose S. and Ferro E.S. (1998). Neuropeptide specificity and inhibition of recombinant isoforms of the endopeptidase 3.4.24.16 family: comparison with the related recombinant endopeptidase 3.4.24.15. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250, 5-11.
- 14- Garrido P.A.G, Vandenbulcke F., Ramjaun A.R., **Vincent B.**, Checler F., Ferro E. and Beaudet A. (1999). Confocal microscopy reveals thimet olipgopeptidase (EC 3.4.24.15) and neurolysin (EC 3.4.24.16) in the classical secretory pathway. *DNA and Cell Biology* 18, 323-331.

Chapitres d'ouvrages

- 1- Checler F., Dauch P., Barelli H., Dive V., Masuo Y., **Vincent B.** and Vincent J.P. (1995). Identification and distribution of endopeptidase EC 3.4.24.16 in the central nervous system. In *Methods in neuroscience*, Vol. 23, pp. 363-382.
- 2- Checler F., Barelli H., Dauch P., Dive V., **Vincent B.** and Vincent J.P. (1995). Endopeptidase 3.4.24.16 (Neurolysin): Purification and assays. In *Methods in enzymology* Vol 248, pp. 593-614.

Liste des articles ou revues publiés après la thèse

Publications à comité de lecture

- 1- Xu H., Gouras G.K., Greenfield J.P., **Vincent B.**, Naslund J., Mazzarelli L., Fried G., Jovanovic J.N., Seeger M., Relkin N.R., Liao F., Checler F., Buxbaum J.D., Chait B.T., Thinakaran G., Sisodia S.S., Wang R., Greengard P. and Gandy S. (1998). Estrogen reduces neuronal generation of Alzheimer β -amyloid peptides. *Nature Med.* 4, 447-451.
- 2- Gouras G.K., Tsai J., Naslund J., **Vincent B.**, Edgar M., Checler F., Greenfield J.P., Haroutunian V., Buxbaum J.D., Xu H., Greengard P. and Relkin N.R. (2000) Intraneuronal A β 42 accumulation in human brain. *Am. J. Pathol.*, 156, 15-20.
- 3- **Vincent B.** and Smith J.D. (2000). Effect of estradiol on neuronal Swedish-mutated β -amyloid precursor protein metabolism: reversal by astrocytic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271, 82-85.

4- **Vincent B.**, Paitel E., Frobert Y., Lehmann S., Grassi J. and Checler F. (2000). Phorbol ester-regulated cleavage of normal prion protein in HEK293 human cells and murine neurons. *J. Biol. Chem.*, 275, 35612-35616.

5- **Vincent B.** and Smith J.D. (2001). Astrocytes regulate neuronal β -amyloid precursor protein expression and modify its processing in an apolipoprotein E isoform-specific manner. *Eur.J. Neurosci.*, 14, 256-266.

6- **Vincent B.**, Paitel E., Saftig P., Frobert Y., Hartmann D., De Strooper B., Grassi J., Lopez-Perez E. and Checler F. (2001). The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol-ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. *J. Biol. Chem.*, 276, 37743-37746.

7- Armogida M., Petit A., **Vincent B.**, Scarzello S., Alves da Costa C. and Checler F. (2001). Endogenous β -amyloid production in presenilin-deficient embryonic mouse fibroblasts. *Nature Cell Biol.*, 3, 1030-1033.

8- Petit A., **Vincent B.**, Scarzello S., Armogida M., Alves da Costa C. and Checler F. (2002). Endogenous A β production is not affected by presenilins deficiency in fibroblasts. *Nature Cell Biol.*, 4, E165-E166.

9- Checler F., Alves da Costa C., Ancolio K., Chevallier N., Dumanchin-Njock C., Lopez-Perez E., Marambaud P., Paitel E., Petit A. and **Vincent B.** (2002). Métabolisme du précurseur du peptide amyloïde et présénilines. *Médecine/Science*, 18, 717-724.

10- Checler F and **Vincent B.** (2002). Alzheimer's and prion diseases: distinct pathologies, common proteolytic denominators. *Trends Neurosci.*, 25, 616-620.

11- Alves da Costa C., Paitel E., **Vincent B.** and Checler F. (2002). α -synuclein lowers p53-dependent apoptotic response of neuronal cells. *J. Biol. Chem.*, 277, 50980-50984.

12- Paitel E., Sunyach C., Alves da Costa C., Bourdon J.C., **Vincent B.** and Checler F. (2004). Primary cultured neurons devoid of cellular prion display lower responsiveness to staurosporine through the control of p53 at both transcriptional and post-transcriptional levels. *J. Biol. Chem.*, 279, 612-618.

13- **Vincent B.** (2004). ADAM proteases: protective role in Alzheimer's and prion diseases ? *Curr. Alz. Res.*, 1, 165-174.

14- Pardossi-Piquard R., Petit A., Kawarai T., Sunyach C., Alves da Costa C., **Vincent B.**, Ring S., D'Adamio L., Shen J., Müller U., St. Georges Hyslop P. and Checler F. (2005). Presenilin-dependent transcriptional control of the A β -degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of β APP and APLP. *Neuron*, 46, 541-554.

15- Alfa Cissé M., Sunyach C., Lefranc-Jullien S., Postina R., **Vincent B.*** and Checler F.* (2005). The disintegrin ADAM9 indirectly contributes to the physiological processing of cellular prion by modulating ADAM10 activity. *J. Biol. Chem.* 280, 40624-40631.

16- Alves da Costa C., Sunyach C., Pardossi-Piquard R., Sévalle J., **Vincent B.**, Boyer N., Kawarai T., Girardot N., St. Georges Hyslop P. and Checler F. (2006). Presenilin-dependent γ -secretase-mediated control of p53-associated cell death in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 26, 6377-6385.

17- Alfa Cissé M., Gandreuil C., Hernandez J.F., Martinez J., Checler F.* and **Vincent B.*** (2006). Design and characterization of a novel cellular prion-derived quenched fluorimetric substrate of α -secretase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347, 254-260.

18- Checler F., Sunyach C., Pardossi-Piquard R., Sévalle J., **Vincent B.**, Kawarai T., Girardot N., St. Georges-Hyslop P. and Alves da Costa C. (2006). The γ/ϵ -secretase-derived APP intracellular domain fragments regulate p53. *Curr. Alz. Res* (sous presse).

19- Sunyach C., Alfa-Cissé M., Alves da Costa C., **Vincent B.** and Checler F. (2007). The C-terminal products of cellular prion protein, C1 and C2, exert distinct influence on p53-dependent staurosporine-induced caspase-3 activation. *J. Biol. Chem.* (sous presse).

20- Pardossi-Piquard R., Dunys J., Kawarai T., Sunyach C., Alves da Costa C., **Vincent B.**, Sévalle J., Pimplikar S., St. Georges-Hyslop P. and Checler F. (2007). The γ/ϵ -secretase-derived products of β APP regulate neprilysin, *in vivo*. *Neuron* (sous presse).

* : co-dernier auteur

Les références encadrées sont celles qui sont discutées et qui apparaissent en annexe à la fin du manuscrit.

Chapitres d'ouvrages

1- Buxbaum J.D., Ikin A., Luo Y., Naslund J., Sabo S., **Vincent B.**, Watanabe T. and Greengard P. (1998). Regulation of APP metabolism by protein phosphorylation *Progress in Alzheimer's and Parkinson's diseases* 133-140.

2- Buxbaum J.D., Ikin A., Luo Y., Naslund J., Sabo S., **Vincent B.**, Watanabe T. and Greengard P. (1998). APP localization and trafficking in the central nervous system. *Progress in Alzheimer's and Parkinson's diseases* 487-494.

3- **Vincent B.**, Alfa Cissé M. and Checler F. (2006). Physiological processing of the cellular prion protein and β APP: enzymes and regulation. *Proceedings Sorrento* (sous presse).

Communications affichées

- 1- **Vincent B.**, Beaudet A., Vincent J.P. and Checler F. (1993). Endopeptidase 24.16 in astrocytes and neurons: immunohistochemical characterization, subcellular localization and participation to neurotensin inactivation. IIIrd Forum on Peptides and Proteins, Biarritz (France).
- 2- **Vincent B.**, Beaudet A., Vincent J.P. and Checler F. (1994). Endopeptidase 3.4.24.16 in neurons and astrocytes. First European Meeting on Glial Cell Function in Health and Disease, Heidelberg (Allemagne).
- 3- **Vincent B.**, Beaudet A., Vincent J.P. and Checler F. (1994). L'endopeptidase 24.16 dans les neurones et les astrocytes. XXIIIeme Colloque de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, Valbonne (France).
- 4- **Vincent B.**, Paitel E., Saftig P., Frobert Y., Hartmann D., De Strooper B., Grassi J., Lopez-Perez E. and Checler F. (2002). Physiological processing of the prion protein: regulation by protein kinase C agonists and involvement of disintegrins. 8th International Conference on Alzheimer's Disease. Stockholm (Suède).
- 5- **Vincent B.** and Checler F. (2003). Physiological processing of the prion protein by disintegrins: a link between Alzheimer's and prion diseases. Keystone symposia, Breckenridge, Colorado (Etats-Unis).
- 6- **Vincent B.**, Alfa Cissé M. and Checler F. (2006). α -secretase processing of the cellular prion protein and the amyloid precursor protein. 10th International Conference on Alzheimer's Disease, Madrid (Espagne).

Communications orales

- 1- **Vincent B.** (2006). Processing of the cellular prion protein by disintegrins. APOPIs ancillary meeting, 10th International Conference on Alzheimer's Disease, Madrid (Espagne).
- 2- **Vincent B.** (2006). Les sécrétases. Journées Internationales de la Société Française de Neurologie, Institut Pasteur, Paris (France).

Séminaires

- 1- Septembre 2000: TROPHOS, Marseille (France)
- 2- Septembre 2000: SERONO Pharmaceutical Research Institute, Genève (Suisse)
- 3- Septembre 2000 : AVENTIS PHARMA, Vitry/Seine (France)
- 4- Février 2001: EUROSCREEN, Bruxelles (Belgique)
- 5- Mai 2001: ROCHE , Bâle (Suisse)

Collaborations passées ou actuelles

Vincent DIVE, Département d'Ingénierie et d'Etudes des Protéines, CEA, Gif-sur-Yvette, France

Florence NOBLE et Bernard ROQUES, Département de Chimie Organique, INSERM U266, Paris, France

Alain BEAUDET, Laboratory of Neuroanatomy, McGill University, Montréal, Québec, Canada

Jonathan SMITH, Laboratory of Biochemical Genetics and Metabolism, The Rockefeller University, New York, USA

Jacques GRASSI, Service de Pharmacologie et d'Immunologie, CEA, Gif-sur-Yvette, France

Paul SAFTIG, University of Göttingen, Göttingen, Germany

Bart DE STROOPER, Center for Human Genetics, Louvain, Belgium

Rolf POSTINA, Institute of Biochemistry, Mainz, Germany

Jean-François HERNANDEZ, LAPP, CNRS UMR5710, Montpellier, France

Abraham FISHER, Israël Institute for Biological Research, Ness-Ziona, Israël

Patrick AUBERGER, Faculté de Médecine, INSERM U526, Nice, France

Bernard MARI, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/UNSA UMR6097, Valbonne, France

Sanjay PIMPLIKAR, Department of Pathology and Cell Biology Program, Case Western Reserve University, Cleveland, USA

Mickael LEITGES, Max Planck Institute of Experimental Endocrinology, Hanover, Germany

Autre

Membre de l'éditorial board du journal «Recent Patents in CNS Drug Discovery »

Membre du comité d'organisation de la 9^{ème} Réunion Francophone sur la maladie d'Alzheimer et les syndromes apparentés qui se tiendra à Nice du 20 au 23 novembre 2007

Synthèse des travaux de recherche

Le contenu de ce manuscrit fait part d'une synthèse des travaux effectués au cours de ces sept dernières années ainsi que des projets en cours et des principales perspectives envisagées. Il me paraît toutefois nécessaire de rappeler brièvement ici le parcours scientifique qui m'a amené à étudier successivement au cours de ces quinze dernières années le métabolisme de trois protéines aussi distinctes que la neurotensine, la protéine précurseur du peptide β -amyloïde et la protéine prion cellulaire.

Résumé des travaux réalisés durant la thèse

Mon activité de recherche a débuté en octobre 1991 lors de mon arrivée en tant qu'étudiant en DEA dans le laboratoire des neuropeptides dirigé par le professeur Jean-Pierre Vincent. A cette époque, le laboratoire s'intéressait de concert aux trois grandes étapes de la brève existence d'un neuropeptide : sa maturation à partir de son précurseur par les enzymes de type pro-hormone convertase, sa liaison à son récepteur spécifique ainsi que le message généré par cette interaction, et enfin l'abolition de son activité biologique par des enzymes de dégradation. C'est à cette dernière étape que s'intéressait alors le docteur Frédéric Checler et son équipe lors de mon arrivée. Ainsi, lors de mon stage de DEA puis au cours de la thèse de doctorat qui s'ensuivit, j'ai étudié les mécanismes protéolytiques responsables de l'inactivation de la neurotensine, peptide modèle du laboratoire, et plus particulièrement la caractérisation d'un enzyme purifié au laboratoire cinq ans auparavant, l'endopeptidase 3.4.24.16 (aussi appelée neurolysine). L'essentiel de mes travaux s'est alors articulé autour de deux grands axes : 1) la pharmacologie de cette activité protéolytique originale ainsi que d'un enzyme apparenté, l'endopeptidase 3.4.24.15 ; 2) les propriétés physico-chimiques de cette peptidase dans différents types de cellules du système nerveux central.

Brièvement, nous avons pu, grâce au développement d'inhibiteurs mixtes ou spécifiques des endopeptidases 24-15 et 24-16 (en collaboration avec le laboratoire de chimie du Dr Vincent Dive à Gif-sur-Yvette) mettre en évidence les propriétés analgésiques de la neurotensine *in vivo* chez la souris ainsi que le rôle joué par ce peptide dans la contraction du muscle lisse isolé de cobaye. Parallèlement, nous avons établi que l'endopeptidase 24.16 pouvait présenter des propriétés physico-chimiques très différentes selon que l'on considère sa forme neuronale ou astrocytaire. Ainsi, tandis que l'endopeptidase 24.16 membranaire est exclusivement localisée à la surface des neurones, seuls les astrocytes sont capables de sécréter l'enzyme. Ces observations peuvent ouvrir la voie à une recherche des mécanismes

de routage d'un même enzyme dans deux populations cellulaires différentes. Elles posent également le problème du rôle respectif de l'enzyme membranaire et soluble dans le métabolisme des neuropeptides dans différentes aires cérébrales.

Dans le même temps où je réalisais mes travaux de thèse, l'équipe réorienta son activité de recherche pour s'intéresser au métabolisme d'une protéine appelée β APP (pour β -Amyloid Precursor Protein). Cette protéine trans-membranaire de type I, clonée en 1987, n'est autre que le précurseur du peptide amyloïde qui se trouve être le composé majeur de la plaque sénile, marque histopathologique caractéristique de la maladie d'Alzheimer. La transition d'une thématique à l'autre fut matérialisée par une étude réalisée par Carole Ichai et publiée en 1994, qui établissait la cartographie cérébrale comparée de onze neuropeptidases et le catabolisme de certains neuropeptides dans des cerveaux sains et ceux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Dès lors, l'étude de plusieurs protéines impliquées dans la maladie d'Alzheimer (β APP, présénilines), la maladie de Parkinson (synucléine, synphiline) ou les maladies à prion (PrP^c) allait devenir la thématique centrale de l'équipe dirigée par Frédéric Checler intitulée « Biologie Cellulaire et Moléculaire du vieillissement cérébral normal et pathologique » et qui vit le jour en 1998.

Résumé des travaux réalisés durant le stage post-doctoral

C'est dans le contexte précédemment cité, et avec en tête l'idée d'un possible retour au sein du groupe, que j'ai effectué, à partir de décembre 1996, un stage post-doctoral dans le laboratoire (« Molecular and Cellular Neurosciences ») dirigé par le professeur Paul Greengard au sein de l'Université Rockefeller à New York. L'une des thématiques qui y étaient développées alors concernait la régulation du métabolisme de la protéine β APP.

A cette époque, de nombreux efforts avaient déjà été déployés au cours de la décennie précédente afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires responsables de la maladie d'Alzheimer (AD), forme la plus courante de démence sénile chez les personnes âgées. En effet, l'accroissement de l'espérance de vie dans les pays développés faisait et fait toujours de cette maladie un problème de santé publique. Ainsi, tandis que l'on estime aujourd'hui à environ 25 millions le nombre de personnes qui sont atteintes à travers le monde, ce chiffre devrait être d'environ 80 millions en 2040.

La marque histopathologique principale de la maladie est la plaque sénile dont le composé protéique majeur est le peptide β -amyloïde ($A\beta$). Ce peptide de 4 kDa est produit à partir d'un

précurseur trans-membranaire de type I, la protéine précurseur du peptide β -amyloïd (β APP), par deux activités protéolytiques distinctes, la β - et la γ -sécrétase, responsables de la voie dite « amyloïdogénique ». Tandis que la grande majorité de peptide $A\beta$ produite est composée de 40 acides aminés ($A\beta_{40}$), environ 10% présentent une forme plus longue de 2 acides aminés supplémentaires ($A\beta_{42}$). De manière intéressante, cette dernière possède des propriétés d'agrégation accrues et induit les processus d'apoptose. Une troisième activité, l' α -sécrétase, prévient la formation de $A\beta$ par une coupure au milieu de sa séquence et libération dans le milieu extracellulaire d'un fragment soluble $sAPP\alpha$. On parle alors de voie « non-amyloïdogénique ». Ce que l'on appellera alors « l'hypothèse amyloïde » (en opposition avec les partisans de la protéine Tau et qui soutient que le dépôt de peptide $A\beta$ dans le cerveau est la principale cause de la dégénérescence neuronale ainsi que de la démence qui l'accompagne au cours de la maladie) s'appuie sur plusieurs observations dont la plus convaincante est sans conteste que plusieurs mutations portées par le gène codant pour la β APP elle-même ainsi que pour deux autres protéines, les présénilines 1 et 2, sont responsables de formes familiales précoces de la maladie et sont systématiquement associées à une production accrue du peptide amyloïdogénique $A\beta_{42}$.

La β -sécrétase sera clonée en 1999 et les α -sécrétases seront montrées comme étant des membres de la famille des désintégrines entre 1998 et 1999. En ce qui concerne la γ -sécrétase, la nature exacte de l'entité responsable de l'activité enzymatique au sein du complexe présénilines/nicastrine/Aph-1/Pen-2/Trp21 est encore débattue aujourd'hui. A mon arrivée à l'Université Rockefeller en 1996, l'identité des sécrétases n'était donc pas encore établie. Si de très nombreuses équipes à travers le monde s'attachaient à caractériser ces protéases, la thématique du laboratoire du professeur Paul Greengard était plutôt centrée sur la régulation du métabolisme de la β APP. Il avait notamment été démontré que la voie non-amyloïdogénique était régulée positivement par activation de la protéine kinase C ainsi que par les processus de phosphorylation qui en découlaient. Ce mécanisme régulateur sera par la suite largement disséqué et s'appliquera au métabolisme d'autres protéines dont la protéine prion cellulaire comme discuté plus loin.

Pour en revenir à mes travaux, j'ai dans un premier temps contribué à la mise en évidence du rôle protecteur des œstrogènes, via un effet sur le métabolisme de la β APP. Ce projet avait à l'origine été initié sur la base d'une analyse épidémiologique montrant que les femmes qui suivaient une thérapie de remplacement aux œstrogènes à la ménopause étaient moins sujettes à développer la maladie d'Alzheimer que celles recevant un traitement placebo. Nous avons

montré que le traitement de neurones primaires ou de modèles cellulaires sur-exprimant la β APP avec des concentrations physiologiques d'œstradiol (de l'ordre du micro-molaire) conduisait à la fois à une baisse de la production de $A\beta$ mais également à une augmentation de la sécrétion du fragment sAPP α dont des propriétés neuroprotectrices et neurotrophiques sont bien connues.

Dans un deuxième temps, en étroite collaboration avec le docteur Jonathan Smith travaillant alors dans le laboratoire (« Biochemical Genetics and Metabolism ») dirigé par le professeur Jan Breslow à l'Université Rockefeller, je me suis intéressé à l'influence que pouvait avoir l'apolipoprotéine E sur le métabolisme et l'expression de la β APP. Il existe trois formes de cette protéine impliquée dans le transport du cholestérol (E2, E3 et E4) et l'isoforme E4 est, à ce jour et si l'on excepte l'âge, le seul facteur à risque unanimement reconnu de la maladie d'Alzheimer. Cette étude a été réalisée à l'aide de cultures primaires de neurones et d'astrocytes préparées à partir d'embryons de souris transgéniques soit sur-exprimant l'un ou l'autre des isoformes de l'apolipoprotéine E, soit invalidées pour cette protéine. J'ai pu, grâce à ces modèles cellulaires, montrer que les astrocytes qui synthétisent spécifiquement l'isoforme E4 de l'apolipoprotéine E présentent une capacité accrue à promouvoir le métabolisme amyloïdogénique de la β APP.

Plus surprenante et d'autant plus originale fut l'observation selon laquelle les cellules astrocytaires étaient capables de réguler négativement l'expression de la β APP neuronale. Cette régulation n'est dépendante ni de l'isoforme d'apolipoprotéine E considéré ni même de la présence de la protéine puisque les astrocytes préparés à partir de souris invalidées pour l'apolipoprotéine E présentent les mêmes propriétés inhibitrices. Il semble donc que les astrocytes, par le biais de facteurs non encore identifiés mais qui requièrent un contact avec les cellules neuronales, peuvent jouer un rôle bénéfique dans la maladie d'Alzheimer en régulant négativement les taux de précurseur du peptide amyloïde.

Résumé de l'activité de recherche sur la thématique actuelle

Préambule

Le laboratoire s'intéresse depuis une dizaine d'années à trois pathologies du système nerveux central (maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson et maladies à prion). Ces maladies neurodégénératives, bien que distinctes par certains aspects (incidence, caractère infectieux de certaines maladies à prions), sont invariablement fatales et se caractérisent

toutes par une agrégation anormale de protéines pourtant produites de manière physiologique par l'organisme. Ainsi, le peptide amyloïde (maladie d'Alzheimer), l' α -synucléine (maladie de Parkinson) et la protéine prion (maladies à prion) sont, en condition pathologique, les composés protéiques majeurs de dépôts insolubles (plaques séniles, corps de Lewy) responsables d'une dégénérescence neuronale. Puisque ces atteintes cérébrales sont par certains points identiques (marques histopathologiques, marqueurs biochimiques ou signes cliniques communs), l'une des hypothèses de travail du laboratoire est qu'il existe, au niveau moléculaire, plusieurs dénominateurs communs à toutes ces maladies, avec en filigrane l'idée de pouvoir envisager des stratégies thérapeutiques similaires capables de ralentir ou de prévenir plusieurs de ces pathologies.

Ainsi, de retour à l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire en juillet 1999, à la suite de mon stage post-doctoral aux Etats Unis, j'ai débuté un projet de recherche portant sur l'étude du métabolisme dit « normal » (coupure au site 111/112) de la protéine prion cellulaire (PrP^c) avant d'intégrer le CNRS comme chargé de recherche de 1^{ère} classe en octobre 2001. Les travaux réalisés au cours de ces sept dernières années nous ont permis, d'une part d'identifier les activités protéolytiques responsables de ce clivage, et d'autre part de mettre à jour et disséquer une voie de régulation de ce métabolisme mettant en jeu la protéine kinase C et certains récepteurs muscariniques. L'ensemble de ces résultats nous a confortés dans l'idée qu'il existait de fortes similitudes entre le métabolisme de la PrP^c et celui de la β APP, élément central impliqué dans la maladie d'Alzheimer. C'est l'ensemble de ces résultats que je me propose de décrire et de discuter ici. Je tiens à mentionner que les travaux réalisés sur la thématique prion ont été le fruit d'un effort collectif auquel ont participé activement Claire Sunyach, Erwan Paitel, plusieurs collaborateurs externes et bien entendu Frédéric Checler. Enfin, une partie importante des travaux présentés dans ce manuscrit a été réalisée par Moustapha Alfa Cissé lors de la thèse qu'il soutiendra très prochainement.

Introduction

Les syndromes neurodégénératifs associés à la protéine prion

Les prions sont des agents pathogènes infectieux d'une nature toute particulière qui sont à l'origine de plusieurs syndromes neurodégénératifs mortels parmi lesquelles la maladie de Creutzfeldt-Jakob (CJD), le Kuru, le syndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (GSS) et l'insomnie familiale fatale (FFI) chez l'homme, la scrapie chez le mouton, et l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) chez les bovins (**Table 1**). Ces maladies se

caractérisent cliniquement par une démence et divers troubles moteurs et, d'un point de vue neuropathologique, par une dégénérescence spongiforme du cerveau associée à une accumulation protéique extracellulaire au niveau neuronal et accompagnée d'une gliose réactionnelle (**Figure 1**). Dans certains cas, la présence de plaques amyloïdes et de dégénérescences neurofibrillaires est observée comme c'est le cas dans la maladie d'Alzheimer. Le composant majeur de ces dépôts protéiques a été isolé et caractérisé (Bolton et al., 1982). Il s'agit d'une protéine ubiquitaire nommée protéine prion ou PrP. Les individus atteints de maladie présentent une isoforme structurellement modifiée de la PrP^c, nommée scrapie ou PrP^{sc} (Prusiner, 1982). Cette forme altérée présente un taux élevé de feuillets plissés β , une grande résistance aux agents protéolytiques ainsi qu'une hydrophobicité accrue entraînant une susceptibilité exacerbée à l'agrégation.

Les maladies à prion peuvent se classer en trois grandes catégories: familiales, sporadiques et infectieuses. La forme sporadique de CJD n'est associée à aucune mutation et est répandue à travers le monde avec une incidence de 1 pour 2 millions. L'origine et la source de cette forme de la maladie sont inconnues. En ce qui concerne les formes familiales, plusieurs dizaines de mutations différentes ont été identifiées pour l'heure sur le gène codant pour la PrP humaine qui sont associées à des formes héréditaires de maladies à prions (CJD, GSS, FFI). La mutation P102L fut la première mutation sur le gène de la PrP^c à être associée à une maladie à prion (GSS) (Hsiao et al., 1989) et de nombreuses autres ont depuis été identifiées. Il faut noter que nombre de ces mutations sont localisées dans la région 106-126 supposée porter la toxicité de la protéine (A113V, A115V, et A118V). Enfin, les formes infectieuses de maladies à prion comprennent le Kuru (qui se propagea via les rituels cannibales de certaines tribus de Papouasie-Nouvelle Guinée), les formes de CJD qui se transmettent par transplantation ou inoculation de tissu cérébral de personnes atteintes sans qu'on le sache par la maladie, ainsi qu'une variante de CJD (vCJD) probablement transmise par ingestion de chaire de bovins atteints d'encéphalopathie spongiforme bovine.

La protéine prion cellulaire

La forme normale de la PrP (protéine prion cellulaire ou PrP^c) est une glycoprotéine de 30 à 35 kiloDaltons riche en domaines α -hélices qui est synthétisée dans presque tous les types cellulaires avec une prépondérance pour les neurones du système nerveux central. La PrP^c humaine est codée par un gène unique (PRNP) situé sur le chromosome 20 et la forme mature de la protéine possède deux sites de glycosylation, un pont disulfure et une ancre glypiée (**Figure 2**). Si la genèse de souris invalidées pour la PrP^c a permis de démontrer que la

présence de la protéine était indispensable au développement de la maladie (Büeler et al, 1993), elle n'a pas été très aidante en ce qui concerne ses fonctions physiologiques qui ne sont à ce jour pas clairement établies. En effet, ces animaux ne présentent pas de dysfonctionnement notoire (Büeler et al., 1992). Il semblerait donc que la PrP^c ne participe pas de façon prépondérante à une quelconque fonction vitale même si l'on ne peut exclure la mise en place de phénomènes compensatoires. Plusieurs fonctions lui ont toutefois été attribuées qui ont trait à des événements aussi variés que l'activation lymphocytaire, la transmission synaptique, l'activité circadienne, l'adhésion cellulaire ou encore les processus de signalisation ou l'apoptose (Cashman et al., 1990 ; Collinge et al., 1994 ; Tobler et al., 1996 ; Rieger et al., 1997 ; Mouillet-Richard et al., 2000 ; Kuwahara et al. 1999).

Etat des connaissances sur le métabolisme de la PrP^c au début du projet

La PrP^c est exprimée majoritairement à la surface cellulaire où elle subit une endocytose vers les compartiments endosomaux. L'utilisation de cellules en culture, de tissu cérébral et de liquide céphalo-rachidien a permis d'établir que la PrP^c subissait deux clivages au cours de son métabolisme normal. Une première coupure intervient au niveau de l'ancre glypiée et permet de libérer la chaîne polypeptidique dans le milieu extracellulaire. Une seconde coupure endoprotéolytique intervient au niveau d'une séquence de 16 acides aminés hydrophobes conservés dans toutes les espèces (coupure majeure au niveau de la liaison 111-112). De manière intéressante, l'analyse de tissus nerveux issus de patients atteints de la maladie de Creutzfeldt-Jakob ou du syndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker, montre des fragments de PrP délévés de la partie amino terminale ayant des poids moléculaires de 8, 19 ou 21 kDa, suivant la nature du résidu au codon 129 et suivant le degré de glycosylation de la PrP substrat (Tagliavini et al., 1991 ; Jimenez-Huete et al., 1998). Il a d'autre part été montré que ces formes tronquées étaient de natures différentes dans des cerveaux sains et des cerveaux de patients atteints de la forme sporadique de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (Chen et al., 1995). En conditions normales, la PrP^c n'est hydrolysée qu'au site 111/112 pour générer un fragment sécrété d'environ 11 kDa appelé N1 ainsi que sa contre-partie C-terminale C1 (18 kDa) associée à la membrane plasmique. En revanche, la coupure en position 92/93 qui s'opère spécifiquement dans les cerveaux malades, induit d'une part la sécrétion du produit N2 de 7 kDa et d'autre part l'apparition à la membrane plasmique du fragment C2 (21 kDa) (**Figure 3**).

Il faut noter ici que des études portant sur la toxicité associée à différents fragments de la PrP^c ont montré que le peptide 106-126 avait un effet toxique sur des cultures primaires de

neurones (Forloni et al., 1993) mais pas sur des cultures provenant de souris transgéniques dépourvues de PrP^c (Brown et al., 1994). Ceci démontre une fois de plus si nécessaire, que la présence de PrP^c endogène est essentielle quant à la manifestation d'évènements liés à la pathologie. Le clivage de la PrP qui survient spécifiquement dans les cerveaux atteints de CJD pourrait donc promouvoir le développement de la maladie puisque la coupure après le résidu 92 de la PrP^{sc} préserve l'intégrité de la région 106-126 tandis que la coupure au site 111/112 est sensée prévenir l'occurrence d'une telle séquence. Ce métabolisme différentiel de la PrP nous a immédiatement interpellé, sachant que le composé protéique majeur que l'on retrouve dans les plaques séniles associées à la maladie d'Alzheimer est un fragment de 39 à 43 acides aminés (A β) produit à partir d'un précurseur transmembranaire (β APP) et que deux activités protéolytiques, la β - et la γ -sécrétase sont responsables de la production du peptide A β tandis qu'une troisième enzyme, l' α -sécrétase prévient quant à elle sa formation en intervenant au milieu de sa séquence (pour revue voir Racchi and Govoni, 2003). La question que nous nous sommes alors immédiatement posée était la suivante: l'hydrolyse de la PrP^c au milieu de la séquence 106-126 est elle opérée par les mêmes enzymes et régulée de la même manière que l'activité α -sécrétase clivant la β APP au milieu de la séquence A β ? Le fait que les acides aminés situés de part et d'autre du site de clivage des deux protéines soient différents (Histidine/Méthionine pour PrP^c ; Lysine/Leucine pour β APP) n'altéra en rien notre hypothèse puisque la coupure α -sécrétase ne dépend pas de la nature des acides aminés mais plutôt de la distance du site de clivage par rapport à la membrane plasmique. L'ensemble de nos études visèrent donc à caractériser les différentes étapes du métabolisme de la protéine prion cellulaire et peut être synthétisé comme illustré dans la **figure 4**.

Principaux résultats obtenus

Mise en place des outils nécessaires à l'étude du métabolisme de la PrP^c

Au cours de l'année précédent mon retour des Etats-Unis, Erwan Paitel qui effectuait alors son DEA au laboratoire, avait établi deux lignées cellulaires surexprimant de manière stable la protéine prion cellulaire. Ainsi, nous disposions d'une part de cellules immortalisées de souris présentant toutes les caractéristiques biochimiques neuronales (lignées TSM1) (Chun and Jaenisch, 1996) surexprimant la PrP^c murine (MoPrP^c), et d'autre part de cellules humaines HEK293 synthétisant des quantités importantes de PrP^c de souris portant l'épitope humain 3F4 (Mo3F4PrP^c). Cette « humanisation » de la protéine de souris consistant à remplacer par des résidus méthionine les acides aminés en position 108 et 111 de la PrP^c de souris.

Un anticorps monoclonal (SAF32) dirigé contre l'extrémité N-terminale de la protéine (produit par le laboratoire du Dr Jacques Grassi au CEA de Saclay) (Demart et al, 1999) permet de détecter la MoPrP^c et la 3F4MoPrP^c par immunoempreinte des lysats cellulaires. L'existence de trois bandes de poids moléculaire allant de 29 à 34 kDa traduit l'existence des formes di-, mono- et non glycosylées. Par ailleurs et de manière très intéressante, nous visualisons grâce au même anticorps et par immunoprécipitation, un fragment d'environ 11 kDa majoritairement sécrété. La caractérisation immunologique de ce métabolite à l'aide de différents anticorps monoclonaux nous a permis d'établir formellement qu'il s'agissait là du produit de maturation N-terminal (N1) résultant de la coupure "physiologique" au niveau de la liaison 111-112 de la PrP^c. Afin de se placer dans des conditions optimales de détection du fragment N1 dans le milieu extracellulaire, nous avons réalisé des cinétiques de sécrétion et montré que la quantité maximale de N1 était obtenue après 8 heures pour décroître ensuite au cours du temps, et ce dans les cellules TSM1 comme dans la lignée HEK293 (Vincent et al., 2000).

Le métabolisme normal de la PrP^c est régulé positivement par les esters de phorbol

Comme mentionné plus haut dans l'introduction, l'hydrolyse de la PrP^c en position 111/112 présente un intérêt tout particulier puisqu'il prévient l'intégrité de la région neurotoxique 106-126. Nous avons donc mis à profit nos systèmes cellulaires pour essayer d'identifier des voies de signalisation capables de potentialiser cette coupure (Vincent et al., 2000). C'est alors que notre approche « transversale » de l'étude de plusieurs maladies neurodégénératives prendra tout son sens, dans la mesure où le métabolisme normal de la PrP^c ressemble par certains aspects à la coupure α -sécrétase de la β APP. En effet, la régulation de cette dernière par certaines kinases fut l'objet de nombreux travaux (Racchi and Govoni, 2003). Nous avons donc voulu savoir s'il était possible, en stimulant certaines kinases par voie pharmacologique, de promouvoir la production de N1. En présence d'agonistes de la PKC, tels que le PDBu ou le PMA, la sécrétion du fragment N1 par les cellules HEK293 et les neurones TSM1, surexprimant la 3F4MoPrP^c et la MoPrP^c respectivement, est augmentée d'un facteur 2,5. Ces résultats valent également pour des cellules qui ne surexpriment pas la PrP^c, cela indique que la PKC exerce un contrôle positif sur le métabolisme de la PrP^c endogène. Nous avons par ailleurs montré que des agonistes de la protéine kinase A (8BrcAMP, forskoline) ne modifient en rien la sécrétion de N1. Enfin, il est important de noter que le traitement des cellules par les esters de phorbol n'affecte pas l'expression de la PrP^c. Ceci semble indiquer que les cibles de la PKC ne sont pas impliquées dans une

quelconque régulation transcriptionnelle de la PrP^c mais correspondent plus vraisemblablement à des éléments responsables du métabolisme de la protéine.

Les désintégrines ADAM10 et ADAM17 sont respectivement responsables du métabolisme constitutif et régulé de la PrP^c en position 111/112

Dans le but d'identifier les activités enzymatiques effectrices du clivage normal de la PrP^c, nous avons dans un premier temps examiné l'effet de différents inhibiteurs de protéases à spectre large sur la production du fragment N1 par les HEK293 et les cellules TSM1 surexprimant la protéine. Il est ressorti de ces expériences que seuls les inhibiteurs de métalloprotéases étaient capables d'induire une diminution significative de la sécrétion du fragment N1, et ce de manière dose-dépendante, sans modification de l'expression de la PrP^c. Toujours en relation avec ce que l'on sait du métabolisme de la β APP et au regard de la littérature, deux protéases nous sont apparues comme des candidats à une telle fonction. Il s'agissait de membres de la famille des désintégrines (Vincent 2004), l'enzyme de conversion du TNF α (TACE ou ADAM17) et ADAM10, ces deux enzymes ayant été montrés comme étant responsables respectivement de la sécrétion régulée et constitutive de sAPP α à partir de la β APP (Buxbaum et al., 1998 ; Lammich et al., 1999). L'utilisation d'inhibiteurs relativement spécifiques de ces deux activités, Tap-I (inhibiteur de TACE, Dr Roy Black, Immunex, Seattle, Etats-Unis) et BB3103 (inhibiteur d'ADAM10, British Biotech) nous a conforté dans notre hypothèse de départ puisque l'une comme l'autre de ces molécules étaient capables de réduire efficacement la sécrétion de N1 à la fois par les cellules HEK293 et par les neurones TSM1.

Afin d'apporter une preuve définitive quant à l'implication de ces enzymes, nous avons transfecté de façon stable l'ADNc codant soit pour TACE (Dr Roy Black, Immunex, Seattle) soit pour ADAM10 (Dr C. Lunn, Sherring-Plough), dans la lignée cellulaire humaine HEK293. L'utilisation concomitante de ces cellules et de lignées fibroblastiques issues de souris dont le gène codant pour TACE (Dr Roy Black, Immunex, Seattle) ou pour ADAM10 (Dr Paul Saftig, Göttingen) a été délété, nous a permis d'établir formellement que l'une et l'autre de ces deux protéases étaient responsables, du moins partiellement, de la production du fragment N1. Ainsi, ADAM10 semble exclusivement impliquée dans le métabolisme constitutif de la PrP^c tandis que TACE est majoritairement responsable de la production de fragment N1 induite par les agonistes de la PKC (Vincent et al., 2001). Au-delà de l'implication de TACE et ADAM10 dans le métabolisme de la PrP^c, ces résultats nous ont

permis d'énoncer un nouveau concept plus général selon lequel les désintégrines ne clivent pas exclusivement des protéines transmembranaires mais aussi des protéines associées à la membrane plasmique par une ancre glypiée (GPI).

La désintégrine ADAM9 participe indirectement au métabolisme constitutif de la PrP^c en activant ADAM10

Les désintégrines impliquées dans l'hydrolyse de la PrP^c au site 111/112 étant de la même nature que celles impliquées dans le clivage α -sécrétase de la β APP, nous avons poursuivi notre investigation avec en tête l'idée qu'il puisse exister d'autres dénominateurs communs au métabolisme des deux protéines. Ainsi, au sein de la grande famille des désintégrines qui compte à ce jour plus de trente membres, ADAM9 avait été suggérée comme étant capable de participer au métabolisme non-amyloïdogénique de la β APP (Koike et al., 1999). Des travaux réalisés récemment au laboratoire par Moustapha Alfa Cissé ont d'une part appuyé cette hypothèse et d'autre part établi que celle-ci valait également pour l'hydrolyse de la PrP^c (Alfa Cissé et al., 2005). Ainsi, la surexpression transitoire ou stable de l'ADNc codant pour ADAM9 (Dr Blobel, New York) dans des cellules d'origines variées (HEK293, neurones TSM1, fibroblastes) conduit toujours à une augmentation substantielle de la sécrétion constitutive du fragment N1. Inversement, la réduction d'ADAM9 endogène par une approche anti-sens dans les cellules HEK293 mène à une baisse significative de la quantité de N1 sécrétée dans le milieu extracellulaire.

Cependant, à l'inverse d'ADAM10 et TACE, ADAM9 ne semble pas agir de manière directe sur le métabolisme de la PrP^c comme de la β APP. En effet, ADAM9 n'est capable d'induire le métabolisme de la PrP^c ou d'un substrat fluorimétrique de l' α -sécrétase qu'en présence d'ADAM10. Ainsi, la surexpression transitoire d'ADAM9 dans des fibroblastes embryonnaires de souris invalidées pour ADAM10 (ADAM10^{-/-}) ne modifie en rien le taux de N1 sécrété. De manière intéressante, ces mêmes cellules ADAM10^{-/-} en culture (ce qui permet la mesure de l'activité présente sur la face extérieure de la membrane plasmique des cellules) produisent plus de N1 après co-surexpression d'ADAM9 et ADAM10 qu'après simple surexpression d'ADAM10. Enfin, dans le même système cellulaire, seul le milieu conditionné de cellules doublement transfectées avec ADAM9 et ADAM10 démontre une aptitude accrue à cliver le substrat fluorimétrique de l' α -sécrétase. L'ensemble de ces résultats permet donc de conclure, sans ambiguïté aucune, que la désintégrine ADAM9 est un élément régulateur prépondérant du métabolisme de la protéine prion cellulaire, et ce bien que cet enzyme agisse

indirectement, probablement via le clivage d'ADAM10 et son re-largage dans le milieu extracellulaire. De façon plus conceptuelle, ce mécanisme pourrait permettre (dans le cadre des maladies à prion comme pour la maladie d'Alzheimer) d'induire le taux circulant d' α -sécrétase et d'augmenter ainsi le clivage à distance des substrats membranaires ciblés (β APP ou PrP^c).

L'ensemble des données recueillies jusque là met en exergue une très forte homologie entre le métabolisme de la β APP et celui de la PrP^c, tant en ce qui concerne les activités protéolytiques impliquées que les voies de signalisation qui les régulent (Checler and Vincent, 2002) (**Figure 5**).

Développement d'un dosage fluorimétrique de l' α -sécrétase à partir d'une séquence mimant la PrP

Si de nombreuses techniques ont été développées au cours des dernières années dans le but de détecter de manière rapide et fiable la production de peptide A β via la voie amyloïdogénique, rares sont celles actuellement disponibles en ce qui concerne la voie α -sécrétase. Nous avons donc entrepris, en collaboration avec le laboratoire de chimie LAPP de Montpellier (dirigé par le Dr Jean Martinez) de mettre au point un dosage fluorimétrique original permettant de mesurer en routine cette activité (Alfa-Cissé et al., 2006). Pour cela, un substrat fluorimétrique quenché englobant le site de coupure α -sécrétase sur la PrP^c a été synthétisé. La caractérisation complète de ce dosage à l'aide de systèmes cellulaires adéquats a permis de valider ce nouvel outil. Ainsi, l'activité d'hydrolyse du substrat (JMV2770) par des homogénats de cerveau de souris est optimale à pH neutre et n'est affectée que par des inhibiteurs de métalloprotéases. D'autre part, le JMV2770 est hydrolysé par différents types de cellules intactes en culture, ce qui est en accord avec le caractère « ectoprotéasique » (site catalytique exposé sur la face externe de la membrane plasmique) de l'activité α -sécrétase. Par ailleurs, la surexpression des désintégrines ADAM9, ADAM10 ou TACE (ADAM17) dans les cellules humaines HEK293 promeut l'hydrolyse du JMV2770 sensible aux inhibiteurs de métalloprotéases. En corollaire, les cellules invalidées pour ADAM10 ou TACE ainsi que celles présentant une expression réduite d'ADAM9 (approche anti-sens) perdent une partie de leur capacité à cliver le substrat JMV2770. L'ensemble de ces résultats renforce, si nécessaire, le postulat selon lequel le clivage par les activités de type α -sécrétases est totalement indépendant de la séquence en acides aminés du substrat et dépend plus

vraisemblablement de la conformation de ce dernier. Il faut souligner ici l'incrément apporté par ce nouvel outil par rapport aux méthodes de dosage de l'activité α -sécrétase existantes. En effet, à l'inverse d'un substrat commercial utilisé en parallèle lors de notre étude, la sensibilité de notre dosage permet de mesurer l'activité endogène relarguée dans le milieu conditionné après complémentation de cellules ADAM10^{-/-} avec l'ADNc d'ADAM10.

Les récepteurs muscariniques de type M1 et M3 contrôlent le métabolisme de la PrP^c en activant TACE via la phosphorylation du résidu Thr735 par la PKC

La démonstration de la régulation positive du métabolisme de la protéine prion cellulaire par la protéine kinase C pose une double interrogation : qui active la PKC de manière physiologique et quelle est la cible de celle-ci ? Dans le but de répondre à la première question, et en se rapportant à la fois à ce que l'on sait du métabolisme de la PrP^c et aux données de la littérature, plusieurs arguments laissaient supposer que les récepteurs muscariniques de type M1 et M3 pouvaient être les entités responsables de l'activation de la PKC menant à un incrément dans la production du fragment N1, l'argument majeur étant sans conteste le fait que les mêmes récepteurs modulent le métabolisme α -sécrétase de la β APP menant à la libération du produit sAPP α (Nitsch et al., 1992). Nous avons dans un premier temps établi, dans des cultures primaires de neurones de souris, que l'activation des récepteurs muscariniques endogènes par le carbachol (agoniste muscarinique) et le AF267B (agoniste spécifique des récepteurs M1 développé dans le laboratoire du Dr Abraham Fisher en Israël) induisait une sécrétion de N1 réversée par l'atropine (antagoniste muscarinique). Nous avons ensuite transfecté stablement les récepteurs M1, M2, M3 et M4 dans les cellules HEK293 et montré que le carbachol et l'AF267B stimulaient à la fois la sécrétion de N1 et l'hydrolyse du substrat JMV2770 dans les cellules surexprimant les récepteurs M1 et M3 (couplés à la PKC) mais pas dans celles surexprimant les récepteurs M2 et M4 (couplés à la PKA). Cette activation est par ailleurs complètement réversée par le GF109203X (inhibiteur de PKC) ce qui confirme l'implication du couplage DAG/PKC au détriment de la voie IP₃/Ca²⁺.

Concernant l'identité de la cible de la PKC suite à son activation par les récepteurs muscariniques M1 et M3, deux possibilités nous semblaient envisageables : soit la PKC favorisait le clivage en relocalisant l'enzyme (en l'occurrence TACE) et/ou du substrat (PrP^c) par phosphorylation de l'un et/ou l'autre partenaire, soit la PKC agissait spécifiquement sur l'activité de TACE. Nous avons montré que la seconde hypothèse était la bonne puisque le carbachol induit la phosphorylation de TACE sur les résidus Tyr702 et Thr735 dans les

cellules HEK293 surexprimant le récepteur M1 sans modifier l'état de phosphorylation de ADAM9 ni la distribution subcellulaire de la PrP^c et des désintégrines. La phosphorylation de la tyrosine 702 émane sans aucun doute d'un effet indirect de la PKC via l'activation d'une tyrosine kinase puisque la PKC ne phosphoryle que sur résidus sérine et thréonine. De plus, restait à établir la preuve définitive d'un lien de cause à effet entre la phosphorylation de TACE et une augmentation de son activité d'une part, et l'activation par le carbachol du métabolisme de la PrP^c dans les cellules surexprimant les récepteurs M1 ou M3 d'autre part. Des expériences de mutagenèse dirigée réalisées sur les deux résidus phosphorylés par le carbachol (Y702F et T735A) nous ont tout d'abord permis d'affirmer que la tyrosine 702 n'était pas partie prenante dans le métabolisme de la PrP^c induit par le carbachol puisque la mutation supprime la phosphorylation de TACE sur ce résidu sans modifier la production de N1 dépendante de l'agoniste. En revanche, le remplacement du résidu Thr735 par une alanine abolit la phosphorylation en position 735, mais aussi la sécrétion de N1 et l'hydrolyse du substrat JMV2770 dépendantes du carbachol.

En résumé, cette étude a permis de reconstituer la cascade des événements moléculaires qui va de la liaison de l'agoniste muscarinique sur son récepteur M1/M3 jusqu'à la libération du fragment N1 issu de la PrP^c dans l'espace extracellulaire (Alfa Cissé et al., soumis à publication). Dans une perspective thérapeutique visant à réduire les taux de PrP^c, indispensable à la PrP^{sc} pour se propager, il n'est pas utopique de penser que l'utilisation d'agonistes des récepteurs M1 et M3 pourra ralentir ou stopper la propagation et la transmission des maladies à prions. L'observation selon laquelle la scrapie est associée à des déficits dans la transmission cholinergique (Rubenstein et al., 1991) va dans ce sens même s'il reste à déterminer si les syndromes sont la conséquence directe d'un défaut du métabolisme de la PrP^c causé par ces déficits.

Identification des isoformes de PKC impliquées dans le métabolisme régulé de la PrP^c

Afin d'analyser un peu plus en détail la machinerie moléculaire qui régent le métabolisme régulé de la PrP^c, nous avons entrepris d'identifier la ou les isoforme(s) de PKC impliquée(s) (Alfa Cissé et al., manuscrit en préparation). Nous avons pour cela utilisé différents systèmes cellulaires et diverses constructions. Pour ce projet, nous avons tout d'abord reçu l'aide précieuse du laboratoire du Dr Patrick Auberger à Nice où les Drs Krystel Louis et Bernard Mari ont sous-cloné dans des vecteurs d'expression les ADNc codant pour des formes soit constitutivement actives (CA) soit dominantes négatives (DN) des isoformes α , δ et ϵ de la PKC (Louis et al., 2005). Dans le premier cas, l'inhibition de contact par le

domaine pseudo-substrat a été levée par mutations ponctuelles des alanines en glutamates rendant ainsi l'enzyme constitutivement active tandis que pour les formes dominantes négatives, les lysines du site catalytique ont été mutées en arginines.

Ainsi, la surexpression transitoire dans les cellules HEK293 des ADNc codant pour les formes constitutivement actives de PKC α , δ ou ϵ conduit toujours à une augmentation de la production du fragment N1. Inversement, les cellules transfectées avec les ADNc codant cette fois-ci pour les formes dominantes négatives de ces trois isoformes perdent leur capacité à accroître la sécrétion de N1 en réponse au PDBu. Des résultats similaires ont été obtenus avec les cellules d'origine humaine RD (rhabdomyosarcoma) dans lesquelles l'expression des isoformes CA ou DN de la PKC α , δ ou ϵ est inductible par la tétracycline et qui ont également été établies dans le laboratoire des Drs Patrick Auberger et Bernard Mari à Nice (Louis et al., 2005). Nous avons par ailleurs obtenu du Dr Michael Leitges à Hanovre, des fibroblastes invalidés pour les isoformes α ou β de la PKC. Ces cellules nous ont permis d'une part de confirmer l'implication de l'isoforme α mais également de mettre en évidence une contribution significative de l'isoforme β dans le métabolisme de la PrP^c régulé par les esters de phorbol. Dans le but de finaliser ce travail, nous nous attachons actuellement à déterminer quelles sont, parmi les isoformes de PKC impliqués, celles qui sont capables de phosphoryler TACE sur la thréonine 735 comme c'est le cas lorsque l'on active les récepteurs muscariniques de type 1.

Lors de la réalisation de ces travaux, nous avons toujours à l'esprit le souci de l'analyse comparée du métabolisme régulé de la PrP^c et de la β APP. En d'autres termes, jusqu'à quel point cette ressemblance allait-elle tourner au mimétisme ? Dans ce contexte, ces travaux nous ont permis de mettre l'accent sur le fait que la PKC δ était capable de réguler sans ambiguïté aucune le métabolisme de la PrP^c sans affecter le moins du monde celui de la β APP.

Conclusion

L'ensemble des données dont nous disposons à l'heure actuelle concernant le métabolisme de la PrP^c au site 111/112 est schématisé dans la **Figure 6**. Si l'on se replace à présent dans un contexte pathologique, et si l'on considère d'une part que le clivage en position 111/112 prévient l'intégrité de la séquence toxique 106-126 de la PrP^c, et d'autre part que ce clivage réduit le taux de PrP^c et par la même la quantité de matrice indispensable à la PrP^{sc} pour se propager, toute activation de cette voie pourrait représenter une stratégie thérapeutique

élégante. Il est intéressant de noter à ce propos qu'il est possible, dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, de réduire la production du peptide amyloïde A β en traitant des souris transgéniques modèles de maladie d'Alzheimer, soit avec des activateurs de la PKC (Savage et al., 1998 ; Etcheberrigaray et al., 2004), soit avec l'agoniste muscarinique AF267B utilisé dans nos expériences *in vitro* (Caccamo et al., 2006). L'effet de ces molécules est-il également bénéfique sur des modèles animaux de maladies à prion ? La question reste entière et mérite que l'on s'y attarde.

Perspectives

Peut-on prévenir ou ralentir la conversion PrP^c/PrP^{sc} en activant le métabolisme de la PrP^c en position 111/112 dans des cellules infectées ?

Etudes *in vitro*

L'ensemble des travaux présentés jusqu'ici avait pour but de caractériser au mieux les différents acteurs responsables du métabolisme dit « normal » de la protéine prion cellulaire. Au jour d'aujourd'hui, et en l'état actuel de nos connaissances, deux axes de recherche sont initiés au laboratoire: le premier, sous la responsabilité de Claire Sunyach, vise actuellement à établir le rôle physiologique des différents produits (N1, N2, C1, C2) issus du métabolisme normal ou pathologique de la PrP. Le second, dont j'aurai la charge, aura pour but d'établir, en revenant vers la pathologie, s'il est possible de moduler négativement la conversion PrP^c→PrP^{sc} suite à l'induction de la machinerie responsable du métabolisme de la protéine prion cellulaire en position 111/112. Nous utiliserons comme modèle les cellules infectées inductibles rov9 (système établi par le Dr Didier Vilette) (Vilette et al., 2001) qui permettent, par induction permanente à la doxycycline, de maintenir des taux de PrP^{sc} quantifiables par simple technique d'immunoempreinte (anticorps monoclonal SHA31 fournit par le Dr Jacques Grassi qui reconnaît la PrP^{sc} après digestion à la protéinase K). Il s'agira d'évaluer si :

- la surexpression transitoire des désintégrines ADAM9, ADAM10 ou TACE
- la surexpression transitoire des formes constitutivement actives de PKC α , β , δ ou ϵ
- le traitement par divers activateurs de PKC (PDBu, PMA, benzolactam, bryostatin 1)
- le traitement par des agonistes muscariniques (carbachol, AF267B)

peuvent réduire de manière significative les taux de PrP^{sc}.

Etudes *in vivo*

Dans l'hypothèse où des résultats prometteurs sont obtenus sur ces modèles cellulaires *in vitro*, il sera alors nécessaire d'évaluer les différents traitements pharmacologiques énumérés ci-dessus dans des modèles animaux de maladies à prion. Comme je l'ai mentionné un peu plus haut, de telles approches se sont montrées concluantes sur des souris transgéniques mimant la maladie d'Alzheimer. Les tous premiers travaux dans ce domaine avaient montré que les cerveaux de souris traitées avec des esters de phorbol produisaient moins de peptide A β que ceux des animaux contrôles (Savage et al., 1998). Toutefois, cette approche n'est pas envisageable si l'on projette de développer une thérapie chez l'homme puisque ces agents sont de puissants promoteurs de tumeurs.

Dans un article publié en 2006 (Etcheberrigaray et al., 2006), il est décrit que la bryostatine 1, une molécule naturelle produite par des symbiotes bactériens et activatrice de PKC à de très faibles concentrations (0,1 nM), est capable d'augmenter la sécrétion de sAPP α et de réduire à la fois la production de A β 40 et de A β 42. De façon primordiale, la bryostatine 1 n'est pas promotrice de tumeurs tout en étant capable de passer la barrière hémato-méningée après injection intra-veineuse ou intra-péritonéale. Si pour l'heure aucun effet de cette molécule n'a été mis en évidence concernant la formation de plaques amyloïdes ou les déficits cognitifs associés à la maladie d'Alzheimer, elle n'en reste pas moins une base prometteuse pour le développement de drogues médicamenteuses. De par la forte homologie qui existe entre le métabolisme de la β APP et de la PrP^c, nous pouvons raisonnablement supposer que la bryostatine 1 peut avoir un effet bénéfique sur des modèles animaux de maladies à prions.

Une seconde voie thérapeutique a été entre-ouverte suite à la très récente publication montrant que l'agoniste muscarinique AF267B pouvait réduire, via l'activation sélective d'ADAM17, la production du peptide A β ainsi que les déficits de mémoire observés dans des souris transgéniques mimant la maladie d'Alzheimer (Caccamo et al., 2006). Par rapport à la bryostatine, cette molécule présente l'avantage d'activer la PKC de façon plus sélective puisque exclusivement via le sous-type de récepteurs M1. Ces observations étant en parfait accord avec les résultats que nous avons obtenus sur cellules en culture, il reste à présent à établir si l'AF267B est capable de ralentir la conversion PrP^c→PrP^{sc} ainsi que les déficits neurologiques qui en découlent.

Quelles sont les activités responsables du métabolisme pathologique de la PrP ?

Un autre volet relatif au métabolisme de la protéine prion fait partie des projets à cours terme du laboratoire. Il s'agira de l'identification et la caractérisation (dans le cas d'activités originales) des activités protéolytiques responsables du clivage «pathologique» de la protéine prion au site 92/93. Le suivi de ces activités sera réalisé par immunoempreinte du fragment N2 sécrété. Le problème majeur qui risque de se poser alors résidera dans la capacité des systèmes cellulaires utilisés de produire en quantités suffisantes les produits N2 et C2 issus du clivage en position 92-93 de la PrP^c. Nous espérons que les cellules infectées inductibles rov9 mentionnées plus haut démontreront la capacité de produire en quantités suffisantes ces fragments. Une approche complémentaire pourra être le développement d'un dosage fluorimétrique selon le même principe que celui décrit plus haut, et ce en collaboration avec l'équipe du Dr Jean Martinez à Montpellier.

Parmi les protéases connues susceptibles de produire le fragment N2, et pour en revenir aux dénominateurs communs régissant le métabolisme de la β APP et la PrP^c, l'hypothèse d'une implication de la β -sécrétase (BACE) n'est pas à exclure. BACE (β -site APP-cleaving enzyme) est une protéase à aspartates qui libère l'extrémité N-terminale du peptide A β et qui a été clonée et caractérisée en 1999 (Vassar et al., 1999). L'alignement des séquences de la β APP et de la PrP^c sur le site de clivage α -sécrétase (**Figure 7**) montre que les deux protéines sont sujettes, en condition pathologique, à un métabolisme alternatif en amont des séquences toxiques A β et PrP106-126, préservant ainsi leur intégrité. L'implication ou pas de BACE dans le métabolisme pathologique de PrP^c est une question à laquelle Mlle Nadège Lay (étudiante en Master 1^{ère} année sous ma responsabilité scientifique) tente de répondre actuellement. Nous disposons au laboratoire de cellules HEK293 qui surexpriment BACE ou la PrP^c. Des expériences de transfection transitoire dans ces lignées à l'aide des ADNc codant pour ces deux protéines permettront de surexprimer les deux protéines simultanément. Dès lors, nous établiront si ces cellules HEK BACE/PrP^c sont capables d'une part de libérer le fragment N2 dans le milieu extracellulaire et d'autre part d'accumuler la contrepartie C2 à la membrane plasmique. En parallèle, nous testerons la capacité des cellules surexprimant BACE à hydrolyser un substrat fluorimétrique englobant le site de coupure 92/93 de la PrP^c (voir plus haut). Il sera enfin primordial de déterminer si l'activation de la voie pathologique du métabolisme de la PrP^c peut accélérer ou amplifier la conversion PrP^c/PrP^{sc} dans des modèles cellulaires infectés.

Existe-t'il d'autres activités enzymatiques responsables du métabolisme physiologique de la PrP^c ?

Afin de déterminer s'il existe d'autres activités enzymatiques responsables du métabolisme « normal » de la PrP^c, nous ciblerons ces activités protéolytiques putatives à l'aide du dosage fluorimétrique mis au point au laboratoire et décrit plus haut. De manière intéressante, l'hydrolyse du JMV2770 (comme la production du fragment N1) n'est que partiellement inhibée (environ 50%) par les inhibiteurs de métalloprotéases (*o*-phénanthroline, BB3103 ou TapI). Il est donc hautement probable que d'autres protéases n'appartenant pas à cette classe d'enzymes sont impliquées dans le métabolisme physiologique de la PrP^c. Ainsi, l'une des perspectives relatives à ces travaux, serait de mener, grâce à ce dosage, un criblage à grande échelle dans le but d'identifier d'autres activités protéolytiques (connues ou originales) capables de cliver spécifiquement la PrP^c au site 111/112. La dégradation du substrat JMV2770 par des enzymes purifiés ou par des homogénats cellulaires ou de cerveau sera analysée en routine. La mise en évidence éventuelle de toute activité protéolytique originale sera suivie d'une étape de purification et de caractérisation de l'enzyme. Nous disposons d'autre part au laboratoire d'ADNc codant pour plusieurs activités potentiellement intéressantes (puisque décrites dans la littérature comme α -sécrétases putatives) telles que la prohormone convertase de type 7 (PC7) (Lopez-Perez et al, 1999 ; Lopez-Perez et al., 2001) ou la MKC7 (protéase glypiée de levure) (Komano et al., 1999).

Il n'est par ailleurs pas utopique de penser que cet outil de mesure fiable, simple et rapide des activités de type α -sécrétase pourra permettre de faire un pas en avant significatif dans la recherche de molécules capables d'activer cette voie du métabolisme de la PrP^c comme de la β APP.

Métabolisme de la PrP^c et apoptose

La détermination et la caractérisation du rôle de la protéine PrP^c dans les processus apoptotiques est un autre grand sujet d'intérêt du laboratoire. Des travaux réalisés par Claire Sunyach et Erwan Paitel ont montré que la PrP^c était capable de moduler les processus de mort cellulaire programmée. Ainsi, la PrP^c sensibilise les cellules neuronales à divers stimuli apoptotiques, et ce via une activation de la caspase 3 dépendante de p53 (Paitel et al. 2002 ; Paitel et al. 2003 ; Paitel et al. 2004). Nous nous attachons depuis quelques temps à établir un lien entre le métabolisme de la PrP^c et la mort cellulaire programmée. La modulation du métabolisme physiologique (ou pathologique) est-elle par exemple capable d'influer sur la

réponse des cellules à divers stimuli apoptotiques? Plusieurs approches peuvent être envisagées qui permettront de répondre à cette question. La première consistera à définir si l'on est capable, soit en surexprimant les désintégrines soit en modulant le métabolisme de la PrP^c par le biais d'outils pharmacologiques (inhibiteurs de métalloprotéases, esters de phorbol), de bouleverser de quelque manière que ce soit la capacité de cellules en culture à répondre à un stimulus apoptotique donné. Une alternative sera de court-circuiter la machinerie enzymatique et d'évaluer directement l'effet propre à chacun des produits du métabolisme de la PrP^c. Le phénotype pro- ou anti-apoptotique des fragments sécrétés N1 (extrémité N-terminal qui résulte de la coupure physiologique 111-112) et N2 (fragment N-terminal produit par la coupure pathologique en position 92-93) sera ainsi déterminé par ajout de l'un ou l'autre fragment sur différents types cellulaires (HEK293, TSM1, fibroblastes ou neurones primaires de souris), les deux peptides recombinants N1 et N2 ayant été produits au laboratoire par Claire Sunyach. Pour ce qui est de l'influence des contre-parties C-terminales C1 et C2 sur les mécanismes liés à l'apoptose, Claire Sunyach a établi des cellules HEK293 qui surexpriment de manière stable (et selon la topologie attendue) ces deux fragments, et a montré tout récemment grâce à ces outils que le fragment C1 se comportait de façon similaire à la PrP^c puisqu'il est capable, contrairement au métabolite C2, de potentialiser l'activation de la caspase 3 induite par la staurosporine et dépendante de p53 (Sunyach et al., 2007).

Etude du métabolisme de la protéine Doppel

En 1999, le gène (PRND) codant pour une protéine homologue à la PrP a été identifié sur le chromosome 20 humain (Moore et al., 1999). Cette protéine, nommée Doppel (Dpl) est composée de 176 acides aminés chez l'homme et possède 25% d'identité de séquence avec la partie C-terminale de la PrP^c. De manière intéressante, la surexpression de Doppel chez des souris PrP^{-/-} induit une perte massive des cellules de Purkinje qui est réversible par réintroduction d'un transgène codant pour la PrP^c. Tout semble donc indiquer que la PrP^c contrôle la viabilité des cellules de Purkinje via une interaction avec Doppel. L'étude du métabolisme de Doppel sera l'objet d'un projet à part entière au laboratoire. Des cellules TSM1 surexprimant de manière stable la protéine Doppel (cDNA fourni par le Dr David Westaway, Toronto) permettront de déterminer d'une part si Doppel est hydrolysée de façon similaire à la PrP^c, et d'autre part si ce métabolisme est également sous le contrôle de la PKC et des récepteurs muscariniques de type M1 et M3. Nous disposons par ailleurs de toute une batterie d'anticorps monoclonaux dirigés contre plusieurs régions la protéine, qu'il faudra tester et qui nous permettront de détecter en routine les métabolites engendrés.

Littérature citée

Alfa Cissé, M., Sunyach, C., Lefranc-Jullien, S., Postina, R., Vincent, B. and Checler, F. (2005) The disintegrin ADAM9 indirectly contributes to the physiological processing of cellular prion by modulating ADAM10 activity. *J. Biol. Chem.*, 280, 40624-40631.

Alfa-Cissé, M., Gandreuil, C., Hernandez, J.F., Martinez, J., Checler, F. and Vincent, B. (2006) Design and characterization of a novel cellular prion-derived quenched fluorimetric substrate of α -secretase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347, 254-260.

Bolton, D.C., McKinley, M.P., and Prusiner, S.B. (1982) Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218, 1309-1311.

Brown, D.R., Herms, J., and Kretzschmar, H.A. (1994) Mouse cortical cells lacking cellular PrP survive in culture with a neurotoxic PrP fragment. *Neuropeptides* 5, 2057-2060.

Büeler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H., DeArmond, S., Prusiner, S.B., Aguet, M. and Weissmann, C. (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356, 577-582.

Büeler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.A., Autenried, P., Aguet, M., and Weissmann, C. (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73, 1339-1347.

Buxbaum, J.D., Liu, K.N., Luo, Y., Slack, J.L., Stocking, K.L., Peshon, J.J., Johnson, R.S., Castner, B.J., Cerretti, D.P., and Black, R.A. (1998) Evidence that tumor necrosis factor α converting enzyme is involved in regulated α -secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid protein precursor. *J. Biol. Chem.*, 273, 27765-27767.

Caccamo, A., Oddo, S., Billings, L.M., Green, K.N., Martinez-Coria, H., Fisher, A. and La Ferla, F.M. (2006) M1 receptors play a central role in modulating AD-like pathology in transgenic mice. *Neuron* 49, 671-682.

Cashman, N.R., Loertscher, R., Nalbantoglu, J., Shaw, I., Kascsak, R.J., Bolton, D.C. and Bendheim, P.E. (1990) Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocytes activation. *Cell* 61, 185-192.

Checler, F. and Vincent, B. (2002) Alzheimer's and prion diseases: distinct pathologies, common proteolytic denominators. *Trends in Neurosci.* 25, 616-620.

Chen, S.G., Teplow, D.B., Parchi, P., Teller, J.K., Gambetti, P., and Autilio-Gambetti, L. (1995) Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases. *J. Biol. Chem.*, 270, 19173-19180.

Chun, J. and Jaenisch, R. (1996) Clonal cell lines produced by infection of neocortical neuroblasts using multiple oncogenes transduced by retroviruses. *Mol. Cell. Neurosci.* 7, 304-321.

- Collinge, J., Whittington, M.A., Sidle, K.C.L., Smith, C.J., Palmer, M.S., Clarke, A.R. and Jefferys, J.G.R. (1994) Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 370, 295-297.
- Demart, S., Fournier, J.G., Cremignon, C., Frobert, J., Lamoury, F., Marce, D., Lasmézas, C., Dormont, D., Grassi, J. and Deslys, J.P. (1999) New insight into abnormal prion protein using monoclonal antibodies. *Biochem. Cell Biol.* 265, 652-657.
- Etcheberrigaray, R., Tan, M., Dewachter, I., Kuiperi, C., Van der Auwera, I., Wera, S., Qiao, L., Bank, B., Nelson, T.J., Kozikowski, A.P., Van Leuven, F. and Alkon, D.L. (2004) Therapeutic effects of PKC activators in Alzheimer's disease transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 11141-11146.
- Forloni, G., Angeretti, N., Chiesa, R., Monzani, E., Salmona, M., Bugiani, O., and Tagliavini, F. (1993) Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 362, 543-546.
- Hsiao, K., Baker, H.F., Crow, T.J., Poulter, M., Owen, F., Terwilliger, J.D., Westaway, D., Ott, J., and Prusiner, S.B. (1989) Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Sträussler syndrome. *Nature* 338, 342-345.
- Koike, H., Tomioka, S., Sorimachi, H., Saido, T.C. Maruyama, K., Okuyama, A., Fujisawa-Sehara, A., Ohno, S., Suzuki, K. and Ishiura, S. (1999) Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an α -secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem. J.* 343, 371-375.
- Komano, H., Seeger, M., Gandy, S., Wang, G.T., Krafft, G.A. and Fuller, R.S. (1998) Involvement of cell surface glycosyl-phosphatidylinositol-linked aspartyl proteases in α -secretase-type cleavage and ectodomain solubilization of human Alzheimer β -amyloid precursor protein in yeast. *J. Biol. Chem.* 273, 31648-31651.
- Kuwahara, C., Takeuchi, A.M., Nishimura, T., Haraguchi, K., Kubosaki, A., Matsumoto, Y., Saeki, K., Yokoyama, T., Itoharu, S., and Onodera, T. (1999) Prions prevents neuronal cell-line death. *Nature* 400, 225-226.
- Jimenez-Huete, A., Lievens, P.M., Vidal, R., Piccardo, P., Ghetti, B., Tagliavini, F., Frangione, B., and Prelli, F. (1998) Endogenous proteolytic cleavage of normal and disease-associated isoforms of the human prion protein in neural and non-neural tissues. *Am. J. Pathol.*, 153, 1561-1572.
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., and Fahrenholz, F. (1999) Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96, 3922-3927.
- Lopez-Perez, E., Seidah, N.G. and Checler, F. (1999) Proprotein convertase activity contributes to the processing of the Alzheimer's β -amyloid precursor protein in human cells: evidence for a role of the prohormone convertase PC7 in the constitutive α -secretase pathway. *J. Neurochem.* 73, 2056-2062.
- Lopez-Perez, E., Zhang, Y., Franck, S.J., Creemers, J., Seidah, N.G. and Checler, F. (2001) Constitutive α -secretase cleavage of the β -amyloid precursor protein in the furin-deficient

LoVo cell line: involvement of the pro-hormone convertase 7 and the disintegrin metalloprotease ADAM10. *J. Neurochem.* 76, 1532-1539.

Louis, K., Guérineau, N., Fromiguet, O., Defamie, V., Collazos, A., Anglard, P., Shipp, M.A., Auberger, P., Joubert, D. and Mari, B. (2005) Tumor cell-mediated induction of the stromal factor stromelysin-3 requires heterotypic cell contact-dependent activation of specific protein kinase C isoforms. *J. Biol. Chem.* 280, 1272-1283.

Mabbott, N.A. and MacPherson, G.G. (2006) Prions and their lethal journey to the brain. *Nature Rev. Microbiol.* 4, 201-211.

Moore, R.C., Lee, I.Y., Silverman, G.L., Harrison, P.M., Strome, R., Heinrich, C., Karunaratne, A., Pasternak, S.H., Chishti, M.A., Liang, Y., Mastrangelo, P., Wang, K., Smit, A.F.A., Katamine, S., Carlson, G.A., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Melton, D.W., Tremblay, P., Hood, L.E. and Westaway, D. (1999) Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein Doppel. *J. Mol. Biol.* 292, 797-817.

Mouillet-Richard, S., Ermonval, M., Chebassier, C., Laplanche, J.L., Lehmann, S., Launay, J.M. and Kellermann, O. (2000) Signal transduction through prion protein. *Science* 289, 1925-1928.

Nitsch, R.M., Slack, B.E., Wurtman, R.J. and Growdon, J.H. (1992) Release of the Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* 258, 304-307.

Paitel, E., Alves da Costa, C., Vilette, D., Grassi, J., and Checler, F. (2002) Overexpression of PrP^C triggers caspase 3 activation : potentiation by proteasome inhibitors and blockade by anti-PrP antibodies. *J. Neurochem.* 83, 1208-1214.

Paitel, E., Fahraeus, R., and Checler, F. (2003) Cellular prion protein sensitizes neurons to apoptotic stimuli through Mdm2-regulated and p53-dependent caspase 3-like activation. *J. Biol. Chem.* 278, 10061-10066.

Paitel, E., Sunyach, C., Alves da Costa, C., Bourdon, J.C., Vincent, B., and Checler, F. (2004) Primary cultured neurons devoid of cellular prion display lower responsiveness to staurosporine through the control of p53 at both transcriptional and post-transcriptional levels. *J. Biol. Chem.* 279, 612-618.

Prusiner, S.B. (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216, 136-144.

Racchi, M. and Govoni, S. (2003) The pharmacology of amyloid precursor protein processing. *Exp. Gerontol.* 38, 145-157.

Rieger, R., Edenhofer, F., Lasmezas, C.I. and Weiss, S. (1997) The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nat. Med.* 3, 1383-1388.

Rubenstein, R., Deng, H., Scalici, C. And Papini, M. (1991) Alterations in neurotransmitter-related enzyme activity in scrapie-infected PC12 cells. *J. Gen. Virol.* 72, 1279-1285.

Savage, M.J., Trusko, S.P., Howland, D.S., Pinsky, L.R., Mistretta, S., Reame, A.G., Greenberg, B.D., Siman, R., and Scott, R.W. (1998) Turnover of amyloid β -protein in mouse brain and acute reduction of its level by phorbol ester. *J. Neurosci.*, 18, 1743-1752.

Sunyach, C., Alfa-Cissé, M., Alves da Costa, C., Vincent, B. and Checler, F. (2007) The c-terminal products of cellular prion protein processing, C1 and C2, exert distinct influence on p53-dependent staurosporine-induced caspase-3 activation. *J. Biol. Chem.* (in press)

Tagliavini, F., Prelli, F., Ghiso, J., Bugiani, O., Serban, D., Prusiner, S.B., Farlow, M., Ghetti, B., and Frangione, B. (1991) Amyloid protein of Gerstmann-Straüssler-Scheinker disease (Indiana kindred) is an 11 kd fragment of prion protein with an N-terminal glycine at codon 58. *EMBO J.*, 10, 513-519.

Tobler, I., Gaus, S.E., Deboer, T., Achermann, P., Fisher, M., Rülicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P.A. and Manson, J.C. (1996) Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 380, 639-642.

Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Khan, S., Mendiaz, E.A. Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M.A., Biere, A.L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J.C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G. and Citron, M. (1999) β -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735-741.

Vilette, D., Andreoletti, O., Archer, F., Madelaine, M.F. Vilotte, J.L., Lehmann, S. and Laude, H. (2001) *Ex vivo* propagation of infectious sheep scrapie agent in heterologous epithelial cells expressing ovine prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 4055-4059.

Vincent, B., Paitel, E., Frobert, Y., Lehmann, S., Grassi, J. and Checler, F. (2000) Phorbol ester-regulated cleavage of normal prion protein in HEK293 human cells and murine neurons. *J. Biol. Chem.*, 275, 35612-35616.

Vincent, B., Paitel, E., Saftig, P., Frobert, Y., Hartmann, D., De Strooper, B., Grassi, J., Lopez-Perez, E. and Checler, F. (2001) The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. *J. Biol. Chem.* 276, 37743-37746.

Vincent, B. (2004) ADAM proteases : protective role in Alzheimer's and prion diseases ? *Curr. Alz. Res* 1, 165-174.