



Étude du lien fonctionnel entre *Neural Plakophilin-Related Armadillo Protein*, Préséniline 1, Synaptophysine et Butyrylcholinestérase dans le contexte de la maladie d'Alzheimer

Mémoire

Anne Mendonça Marchini Blois

Maître en Biologie Cellulaire et Moléculaire

Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© Anne Mendonça Marchini Blois, 2018

Étude du lien fonctionnel entre *Neural Plakophilin-Related Armadillo Protein*, Préséniline 1, Synaptophysine et Butyrylcholinestérase dans le contexte de la maladie d'Alzheimer

Mémoire

Anne Mendonça Marchini Blois

Sous la direction de :

Dr Georges Lévesque, directeur de recherche

Résumé

La maladie d'Alzheimer (MA) est caractérisée par une perte synaptique et neuronale. La présence de mutations dans le gène codant pour la Préséniline 1 (PS1) conduit à une forme très agressive de la MA et les mutants PS1 pourraient amplifier la perte synaptique et neuronale. La MA est aussi marquée par une augmentation de la protéine Butyrylcholinestérase (BuChE) qui joue un rôle dans la dégradation de l'Acétylcholine (ACh). De plus, l'ACh est diminuée dans la MA. La Synaptophysine (Syn), marqueur de la synaptogenèse est aussi diminuée dans la MA. Des études antérieures au laboratoire ont démontré une interaction de PS1 avec la *Neural-Plakophilin-Related Armadillo Protein* (NPRAP), une protéine neuronale dont la délétion du gène entraîne des déficits cognitifs importants. De précédents travaux au sein du laboratoire ont mis en évidence que NPRAP module l'expression du gène de BuChE et semble également intervenir dans l'expression de Syn. De plus, nous avons identifié une mutation dans le gène NPRAP qui serait associée au développement de la MA. L'hypothèse de mon projet de maîtrise est que PS1 et NPRAP sont importants pour le maintien de l'intégrité neuronale, *via* Syn et BuChE. Mon objectif est d'étudier l'effet de PS1 et NPRAP sauvages et mutantes (PS1 L392V / PS1 M146L / NPRAP G810R) sur la modulation des niveaux protéiques et de l'ARNm de Syn et BuChE. Le niveau protéique et d'ARNm de Syn et BuChE ont été analysés dans les cellules HEK-293 et SH-SY5Y. Nous avons également vérifié l'expression de Syn et BuChE au niveau cellulaire par l'immunofluorescence. Les résultats obtenus mettent en évidence une augmentation du niveau de BuChE dans les cellules SH-SY5Y transfectées par PS1-M146L et NPRAP sauvage. Aucune modulation du niveau protéique ou de l'ARNm de synaptophysine n'a été détecté et les analyses d'immunofluorescence ne sont pas concluantes. Des analyses supplémentaires permettront de valider l'impact de PS1 M146L et NPRAP sauvage sur l'expression de BuChE.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is characterized by synaptic and neuronal loss. The presence of mutations on the Presenilin 1 (PS1) gene are associated with a very aggressive form of AD and these mutations could amplify the synaptic and neuronal loss. AD is also characterized by the increase in Butyrylcholinestérase protein (BuChE) which plays a role in acetylcholine (ACh) degradation. Moreover, ACh is decreased in AD. Synaptophysin protein (Syn), a marker of synaptogenesis has also been shown to be decreased in AD. Prior studies in the laboratory demonstrated an interaction between PS1 and Neural-Plakophilin-Related Armadillo Protein (NPRAP), a neuronal protein whose gene deletion causes important cognitive dysfunctions. Previous work has shown that NPRAP modulates expression of BuChE gene and seems to be involved in Syn expression. Furthermore, we identified a mutation in NPRAP's gene that could be associated with the development of AD. My hypothesis is that PS1 and NPRAP are important for the maintenance of neuronal integrity, via Syn and BuChE. My objective was to study the effect of the wild-type and mutated form of PS1 and NPRAP (PS1 L392V / PS1 M146L / NPRAP G810R) on the modulation of Syn and BuChE's levels. Syn and BuChE's expression were analysed at the protein level and ARNm level in HEK-293 and SH-SY5Y cells. We also verified Syn and BuChE expression at the cellular level by Immunofluorescence. The results obtained seems to indicate an increase of the level of BuChE in SH-SY5Y transfected cells by PS1-M146L and NPRAP sauvage. There is no significant variation of Syn level and immunofluorescence analysis were not conclusive. Other experiments will be necessary to verify the impact of PS1 M146L and NPRAP sauvage on the expression of BuChE's.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations	x
Remerciements	xiv
Introduction.....	1
1.0 Historique de la maladie d'Alzheimer	1
1.1 Statistiques de la maladie d'Alzheimer	2
1.2 Manifestations cliniques	3
1.3 Diagnostic clinique.....	5
1.4 Traitements.....	7
1.5 Origines moléculaires.....	8
1.6 Neuropathologie.....	9
1.6.1 Les plaques amyloïdes	10
1.6.2 Les sécrétases d'APP	11
1.6.3 Enchevêtrements neurofibrillaires.....	14
1.6.4 Déficit Cholinergique	15
1.7 Préséniline 1	16
1.7.1 Les Mutations L392V et M146L.....	19
1.8 Neural-Plakophilin-Related Armadillo Protein.....	20
1.8.1 Mutation G810R	25
1.9 Butyrylcholinestérase	26
1.10 Synaptophysine.....	29
1.11 Hypothèse et Objectifs.....	33
Chapitre 1 : Matériel et Méthodes	34
2.0 Plasmides	34
2.1 Transformation bactérienne.....	34

2.2 Extraction de l'ADN plasmidique	35
2.3 Vérification des vecteurs	37
2.4 Culture Cellulaire	39
2.5 Conditions de culture.....	39
2.6 Transfection des vecteurs.....	40
2.7 Extraction protéique	41
2.8 Immunobuvardage du type Western Blot.....	42
2.9 Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR).....	46
2.9.1 Extraction de l'ARN au TRizol®Reagent.....	47
2.9.2 Gel d'agarose, électrophorèse.....	47
2.9.3 Transcription inverse (RT).....	48
2.9.4 Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)	48
2.10 Immunofluorescence	51
2.11 Analyses statistiques.....	52
Chapitre 2 : Résultats.....	53
3.0 Analyse protéique	53
3.0.1 Synaptophysine.....	56
3.0.2 Butyrylcholinestérase	58
3.1 Analyse des ARNm.....	61
3.2 Analyse à niveau cellulaire.....	65
Chapitre 3 : Discussion	70
4.0 Étude du lien fonctionnel entre NPRAP, PS1 et Syn.....	71
4.1 Étude du lien fonctionnel entre NPRAP, PS1 et BuChE	73
Conclusions et perspectives.....	75
Bibliographies	76

Liste des tableaux

Tableau 1 : Modifications post-traductionnelles de la NPRAP (δ -Caténine)	21
Tableau 2 : Liste des antibiotiques pour la préparation des cultures bactériennes.....	36
Tableau 3 : Composition des techniques de QIAprep®Spin Miniprep Kit (250) et QIAfilter™ Plasmid Midi Kit (25)	37
Tableau 4 : Liste des enzymes de restriction utilisées pour la digestion des plasmides	38
Tableau 5 : Composants utilisés pour la transfection au CaCl ₂ dans des pétris 10 cm et dans des plaques 6 puits	41
Tableau 6 : Recette des gels de polyacrylamide SDS-PAGE 10%.....	43
Tableau 7 : Liste des anticorps utilisée en Western Blot.....	46
Tableau 8 : Séquences des amorces utilisés pour la PCR.....	49
Tableau 9 : Températures d'hybridation des amorces utilisés en PCR	50
Tableau 10 : Liste des anticorps utilisé en Immunofluorescence	52

Liste des figures

Figure 1 : Le Dr Alois Alzheimer et sa patiente Auguste Deter.	2
Figure 2 : Évolution des autoportraits réalisés entre les années 1967 et 2000 par le peintre américain William Utermohlen atteint de la MA.....	4
Figure 3 : Atrophie Cérébrale dans la Maladie d'Alzheimer.	6
Figure 4 : IRM Cérébrale.	7
Figure 5 : Plaques amyloïdes et Enchevêtrements Neurofibrillaires.	10
Figure 6 : Schéma représentant la voie non-amyloïdogénique (α -secretase) et la voie amyloïdogénique (β -secretase).	12
Figure 7 : Le complexe γ -sécrétase.	14
Figure 8 : Structure de la protéine Préséniline 1.....	16
Figure 9 : Séquence d'acides aminés de la protéine Préséniline 1 et la distribution des mutations de la forme familiale de la maladie d'Alzheimer.....	20
Figure 10 : Structure des protéines membres de la sous-famille p120ctn.....	21
Figure 11 : Maladie du cri du Chat.	24
Figure 12 : Position de la mutation dans la séquence de NPRAP.	25
Figure 13 : Production du peptide A β 42 par NPRAP (δ -caténine).....	26
Figure 14 : Marquage de Butyrylcholinestérase et plaques amyloïdes dans le cortex orbitofrontal non pathologique et pathologique.....	28
Figure 15 : Diminution de Synaptophysine dans la maladie d'Alzheimer.	31
Figure 16 : Immunofluorescence de NPRAP, PS1 et Syn dans des cellules SH-SY5Y.....	32
Figure 17 : Schémas des plasmides utilisés lors des transfections.	34
Figure 18 : Schéma représentatif des transfections effectués entre les plasmides de PS1 sauvage, PS1 M146L, PS1 L392V, NPRAP sauvage et NPRAP G810R.....	40
Figure 19 : Étape de migration en Western Blot.....	43
Figure 20 : Étape de transfert en Western Blot.....	44
Figure 21 : Détection des protéines.	45
Figure 22 : Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR).....	46
Figure 23 : Marquage en immunofluorescence.	51
Figure 24 : Cellules HEK-293 transfectées avec vecteur avec le gène de GFP.....	54
Figure 25 : Cellules SH-SY5Y transfectées avec vecteur avec le gène de GFP.	54
Figure 26 : Vérification de l'expression protéique de NPRAP et PS1 par Western Blot après transfection de NPRAP et PS1 sauvages dans les cellules HEK-293 et SH-SY5Y.....	55
Figure 27 : Vérification de l'expression protéique de Synaptophysine par Western Blot après transfection de NPRAP et PS1 sauvages et mutantes dans les cellules HEK-293.	57
Figure 28 : Vérification de l'expression protéique de Synaptophysine par Western Blot après transfection de NPRAP et PS1 sauvages et mutantes dans les cellules SH-SY5Y.....	58
Figure 29 : Vérification de l'expression protéique de Butyrylcholinestérase par Western Blot après transfection de NPRAP et PS1 sauvages et mutantes dans les cellules HEK-293.....	60
Figure 30 : Vérification de l'expression protéique de Butyrylcholinestérase par Western Blot après transfection de NPRAP et PS1 sauvages et mutantes dans les cellules SH-SY5Y.....	61
Figure 31 : Vérification du niveau d'ARNm de Synaptophysine suite à une RT-PCR après transfection de NPRAP et PS1 sauvages et mutantes dans les cellules SH-SY5Y.....	63

Figure 32 : Vérification du niveau d'ARNm de Butyrylcholinestrase suite à une RT-PCR après transfection de NPRAP et PS1 sauvages et mutantes dans les cellules SH-SY5Y.....	64
Figure 33 : Immunofluorescence montrant le marquage des protéines NPRAP (rouge), PS1 (vert) et Syn (bleu) dans les cellules SH-SY5Y non transfectées (niveau endogène des protéines).	66
Figure 34 : Immunofluorescence montrant le marquage des protéines NPRAP (rouge), PS1 (vert) et BuChE (bleu) dans les cellules SH-SY5Y non transfectées (niveau endogène des protéines).....	66
Figure 35 : Immunofluorescence montrant le marquage des protéines NPRAP (rouge), PS1 (vert) et Syn (bleu) dans les cellules SH-SY5Y transfectées.....	67
Figure 36 : Immunofluorescence montrant le marquage des protéines NPRAP (rouge), PS1 (vert) et Syn (bleu) dans les cellules SH-SY5Y transfectées.....	67
Figure 37 : Immunofluorescence montrant le marquage des protéines NPRAP (rouge), PS1 (vert) et BuChE (bleu) dans les cellules SH-SY5Y transfectées.....	68
Figure 38 : Immunofluorescence montrant le marquage des protéines NPRAP (rouge), PS1 (vert) et BuChE (bleu) dans les cellules SH-SY5Y transfectées.....	68
Figure 39 : Immunofluorescence montrant le marquage des protéines BuChE (bleu) dans les cellules SH-SY5Y transfectées.	69
Figure 40 : Immunofluorescence montrant le marquage des protéines Syn (bleu) dans les cellules SH-SY5Y transfectées.....	69

Liste des abréviations

α	Alpha
A β	Amyloïde β
ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
ADAM	<i>desintegrin and metalloproteinase domain-containing protein</i>
ADN	acide déoxyribonucléique
ADNc	acide déoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARVCF	<i>Armadillo Repeat gene deleted in Velo-Cardio-Facial syndrome</i> (protéine)
<i>Amp</i>	Ampicilline
APOE	apolipoprotéine E (gène)
ApoE	apolipoprotéine E (protéine)
<i>APP</i>	<i>amyloid precursor protein</i> / protéine précurseur de l'amyloïde (gène)
APP	<i>amyloid precursor protein</i> / protéine précurseur de l'amyloïde (protéine)
APS	<i>ammonium persulfate</i>
APP α/β	<i>Soluble Amyloid Precursor Protein</i>
<i>arm</i>	<i>armadillo</i>
β	Bêta
BACE1	<i>β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1</i>
BCHE	Butyrylcholinestérase (gène)
BCHE-K	variante K de BCHE
BuChE	Butyrylcholinestérase (protéine)
CaCl ₂	chlorure de calcium
CAT	<i>choline acetyltransferase</i>
CLU	<i>clusterin gene</i>
CO ₂	dioxyde de carbone
CR1	<i>complement receptor type 1 gene</i>
©	Copyright
CTNND2	NPRAP (gène)
δ	Delta
δ -caténine	nom alternatif pour NPRAP (protéine)
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	<i>Diméthylsulfoxyde</i>
ϵ	Epsilon
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylene diamine tetra-acetic acid
FAD	<i>Familial Alzheimer's Disease</i>
γ	gamma
G	Glycine
<i>g</i>	unité de force gravitationnelle
g	gramme
GAP-43	<i>Growth Associated Protein 43</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
H ₂ O	formule de l'eau

HCl	acide chloridrique
HEBS	HEPES-buffered saline solution
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
I-CLiPs	<i>intramembranously-cleaving proteases</i>
IFI16	<i>Gamma-Interferon-Inducible Protein 16</i>
IgG	Immunoglobuline G
INESSS	Comité scientifique permanent de l'Institut national d'excellence en santé et en services sociaux
IRM	imagerie par résonance magnétique
K	Lysine
<i>Kan</i>	kanamycine
kDa	kilo Dalton
Kb	kilobase
L	Leucine ; litre
LB	Luria Bertoni
M	Mol/litre
mA	milliampère
MA	Maladie d'Alzheimer
MAP	microtubule-associated protein
MeOH	Méthanol
M/Met	Méthionine
mg	microgramme
MgCl ₂	chlorure de magnésium
min	minute
mL	millilitre
mm	millimètres
mM	millimolaire
MMSE	<i>mini-mental state examination</i>
MoCA	<i>Montreal Cognitive Assessment</i>
MOPS	3-(N-morpholino)propanosulfonic acid
MQ	milliQ®
Na	sodium
MAP	microtubule-associated protein
MeOH	Méthanol
NaCl	chlorure de sodium
NaOH	hydroxide de sodium
nm	nanomètre
NMDA	N-méthyl D-aspartate
NPRAP	<i>neural-plakophilin-related armadillo protein</i>
PAPIN	plakophilin related armadillo repeat protein-interacting PDZ protein
Pb	paire de bases
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDZ	[post synaptic density protein (PSD95), <i>Drosophila</i> disc large tumor suppressor (DlgA), and zonula occludens-1 protein (zo-1)]
Pen-2	<i>presenilin enhancer-2</i>
PKP4	<i>plakophilin-4</i> (gène)

PICALM	<i>phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein gene</i>
PS1	Préséniline 1 (protéine)
PS2	Préséniline 2 (protéine)
PSEN1	Préséniline 1 gène
PSEN2	Préséniline 2 gène
P120 ^{ctn}	p120 caténine
PSD-95	<i>postsynaptic density protein 95</i>
PVDF	<i>polyvinylidene fluoride</i>
qs	quantité suffisante
rpm	rotation par minute
RNASEL	Ribonuclease L (gène)
s	seconde
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SLN	signal de localisation nucléaire
SNAP25	<i>Synaptosomal-associated protein 25</i>
SORL1	<i>sortilin-related receptor 1</i>
Syn	Synaptophysine (protéine)
S-SCAM	<i>Synaptic scaffolding molecule</i>
TAE	tris acétate EDTA
Tau	<i>Tubulin Associated Unit</i>
TBS-T	tris buffered saline-Tween 20
TEMED	Tetramethylethylenediamine
Tm	Température d'hydratation
TrisHCl	Tris Hydrochloride
U	Unité
V	Valine
wt	wild-type
ζ	Zêta
®	<i>registered trademark</i>
%	pourcent
°C	degré celcius
>	plus de
µg	microgramme
µl	microlitre

À mon grand-père et ma grand-mère,

Farewell

Eat glitter for breakfast and shine all day!

(L.E.J.)

Remerciements

J'adresse un grand remerciement à mon directeur de recherche, Dr Georges Lévesque, de m'avoir accueillie dans son équipe. Je remercie sa gentillesse, son soutien, sa disponibilité et ses conseils riches en informations, tout au long de ces deux années qui resteront ancrés dans ma mémoire. Un grand merci est adressé au Dr Madeleine Carreau, je suis très reconnaissante de ses conseils et aides tout au long de ce projet. J'exprime toute ma gratitude à Chantal Godin et Pascal Smith pour le temps qu'ils ont consacré à m'aider pendant ces deux ans au laboratoire.

Un remerciement ému à une personne très spéciale dans ma vie, Laura Eyoum Jong (MF). Je suis extrêmement heureuse de l'avoir connue. Un grand merci pour son aide, son soutien, sa patience, ses conseils et surtout pour la complicité que nous avons eue ensemble. Je n'oublierai jamais tous les moments de tristesse et de bonheur partagés pendant ces deux ans (et certainement pour le reste de notre vie).

Je remercie très chaleureusement Mélody Mazon pour son soutien, sa patience avec moi (incroyable !) et mes questions et surtout ses précieux conseils sur les techniques de laboratoire qui ont grandement facilité mon travail. Encore une fois merci! À tantôt jeune fille!

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers les amis Nicolas (merci de m'avoir supporté pendant deux ans et j'espère plus), Mathilde (Métrobus), Manue (merci d'avoir lu mon mémoire), Baya (merci pour mon abstract) et Andréanne (finalement le spa !) qui m'ont apporté leur support moral et intellectuel tout au long de ma démarche.

Un grand merci à mon grand-père pour sa confiance en moi. Je suis sûre qu'il est fier de moi en ce moment ! Un merci à mes parents ! Je désire remercier de tout mon cœur le soutien de mon cousin Ivaldo.

Merci à mes évaluateurs : les Dr. Emmanuel Planel et Vincent Pernet.

Enfin, j'adresse mon remerciement à Mme Lavoie, la directrice du programme en Biologie Cellulaire et Moléculaire pour m'avoir donné la force nécessaire pour poursuivre mes études en maîtrise.

Introduction

1.0 Historique de la maladie d'Alzheimer

L'intérêt pour l'étude de la démence chez les personnes âgées a débuté durant la période gréco-romaine. Le philosophe grec Hippocrate, considéré comme le Père de la Médecine fut le premier à nommer la démence 'paranoïa'. Par la suite, Galen (150–200 A.D) reconnut cette démence comme une maladie mentale. Pourtant, c'est seulement au XIXe siècle que Philippe Pinel, médecin français considéré comme le père de la psychiatrie moderne, et son étudiant Jean-Étienne Esquirol établirent pour la première fois une classification des maladies mentales. Pour eux, les maladies mentales se caractérisent comme une perte des facultés mentales. Esquirol décrivit aussi la maladie sénile comme une conséquence de la progression de l'âge avec une perte de la mémoire, en particulier de la mémoire des impressions récentes. A la fin du XIXe siècle, le Dr Samuel Wilks, un médecin britannique, présenta une définition de l'atrophie du cerveau, d'abord comme une caractéristique de l'alcoolisme chronique et la syphilis et plus tard, comme une caractéristique de la démence (Berchtold & Cotman, 1998).

Finalement, c'est au XXe siècle, que le Dr Alois Alzheimer (Figure 1, gauche), un neuropsychiatre allemand, présenta à la conférence '*About a remarkable illness of the cerebral cortex*' du 3 novembre 1906 pour la première fois le cas de sa patiente Auguste Deter (Figure 1, droite).

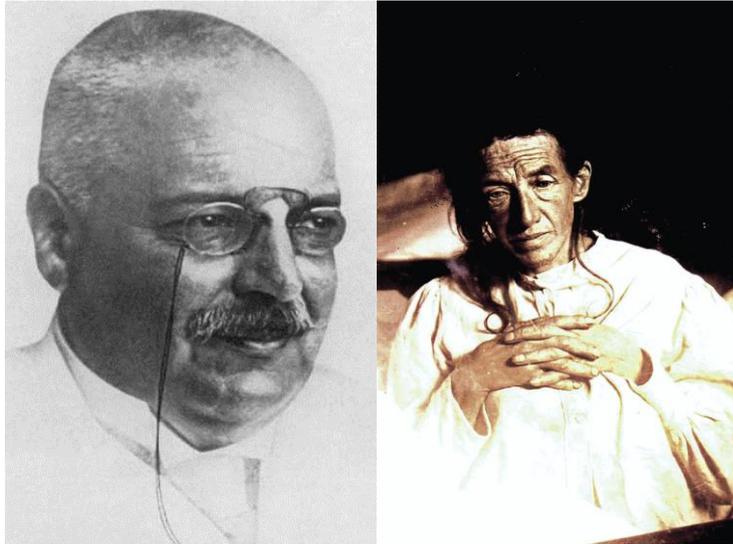


Figure 1 : **Le Dr Alois Alzheimer et sa patiente Auguste Deter.**

A gauche, le Dr. Alois Alzheimer, le premier à avoir décrit la maladie d'Alzheimer (Verhey, 2009). A droite, Auguste Deter, patiente de 51 ans, du Dr. Alois Alzheimer (Toodayan, 2016).

Auguste Deter était une jeune femme de 51 ans admise le 25 novembre 1901 à l'asile de Frankfurt, où travaillait le Dr Alois Alzheimer. Cette patiente présentait des symptômes comme une perte de la mémoire, de la désorientation spatiale et temporelles ainsi que des hallucinations. Au cours des 4 années suivant son internement, son état se détériora jusqu'à présenter de l'apathie et du mutisme, avant décéder en 1906 (Verhey, 2009). Le cas d'Auguste Deter était similaire aux cas de démence, mais son apparition précoce rendit son cas unique aux yeux du Dr Alzheimer. De ce fait, il demanda la permission de pratiquer une autopsie du cerveau de cette patiente. Grâce à la méthode 'argentique' de Bielschowsky, il observa la présence d'enchevêtrements fibrillaires dans le cytoplasme des neurones, des dépôts importants de protéines et une perte neuronale (Stelzma, Schnitzlein, & Murlagh, 1995). Il attribua ces caractéristiques à la maladie qui portera son nom 'Alzheimersche Krankheit' (maladie d'Alzheimer) (Verhey, 2009).

1.1 Statistiques de la maladie d'Alzheimer

L'espérance de vie a progressivement augmentée au cours des dernières années. Le nombre de personnes âgées dans le monde (+ de 65 ans) était de environ 420 million en 2000 et sera d'environ 1 milliard de personnes d'ici 2030 (Qiu, Kivipelto, & Von Strauss, 2009). Le vieillissement de la population mondiale entraîne donc une augmentation des problèmes de santé publique liées à l'âge, tel que les démences (Carrillo, Thies, & Bain, 2012).

Le nombre de personnes atteintes par la démence dans le monde était de 46.8 millions de personnes en 2015 et, ce nombre pourrait doubler tous les 20 ans (74.7 millions en 2030 et 131.5 millions en 2050) (<https://www.alz.co.uk>). Le coût global de la prise en charge et du traitement des patients atteints de démence est passé de 604 milliards en 2010 à 808 milliards en 2015 et ce nombre pourrait arriver à 1 trillions en 2018.

Au Canada, la maladie d'Alzheimer (MA) est la 8^e cause de décès chez les personnes âgées (+ de 65ans) (<https://www.statcan.gc.ca>), avec 25 000 nouveaux cas chaque année (<http://www.alzheimer.ca>). D'ici 2038, ce nombre pourrait augmenter de 250 000 nouveaux cas par année (Société Alzheimer du Canada, 2010). En 2016, il y a eu environ 564 000 canadiens atteints de la MA ou d'une maladie apparentée, comme la dégénérescence fronto-temporale (<http://www.alzheimer.ca>). D'ici 2038, environ 1,1 millions de canadiens seront atteints de la MA ou d'une démence apparentée, soit 2,8 % de la population canadienne (Société Alzheimer du Canada, 2010). Les coûts totaux du système de santé canadienne sont estimés à plus de 10 milliards de dollars par année, et d'ici 2031, une augmentation de 60% est attendue (<http://www.alzheimer.ca>).

L'augmentation du nombre de personnes atteintes par la démence au Canada et dans le reste du monde génère un impact économique important (coûts des soins médicaux et du personnels soignants), mais également social, sur la qualité de vie des familles des patients atteints par la maladie d'Alzheimer.

En 2013, le G7 (États-Unis, Japon, Allemagne, France, Angleterre, Italie, Canada) a lancé un programme nommé 'Global Action Against Dementia' afin de diminuer cet impact économique et social dans le monde entier (<https://www.alz.co.uk>).

1.2 Manifestations cliniques

La MA est une maladie neurodégénérative à progression lente qui aboutit au décès de l'individu, cependant aucun traitement n'est actuellement curatif. Elle est caractérisée par un déclin progressif important des fonctions cognitives, comme par exemple une perte de la mémoire et des problèmes de langage et de comportement, comme par exemple des changements dans la personnalité qui conduit une perte d'autonomie du patient (<http://www.alzheimer.ca>). Le *National Institute on Aging* a classé la MA en 3 grands stades :

léger (*early-stage*), moyen et grave (*late-stage*) (National Institute on Aging, 2017). Le stade léger, se caractérise, entre autres par un déclin de la mémoire récente, des changements de personnalité, des difficultés à résoudre des opérations simples. Ces signes sont souvent observés par le patient lui-même ou sa famille proche, seulement. La maladie évolue ensuite vers un stade moyen où le patient présente des troubles de mémoire plus évidents, comme reconnaître un membre de sa famille, mais aussi d'organisation et de planification (Caring for a Person with Alzheimer's Disease, 2017), (Ray, Ashall, & Goate, 1998). Au stade le plus grave de la maladie, le patient montre des changements de personnalité plus accentués, un déclin de la parole, de la compréhension et des difficultés à prendre des décisions. Dans les stades finaux de la maladie, le patient perd toute capacité d'interaction avec l'environnement ainsi que son autonomie (Caring for a Person with Alzheimer's Disease, 2017), (Carrillo et al., 2012). Le décès du patient survient généralement entre 3 et 9 ans après le diagnostic (Querfurth & LaFerla, 2010).

Pour mieux visualiser l'impact de la MA chez les patients, le peintre américain William Utermohlen, atteint par cette pathologie à l'âge de 62 ans, a dessiné son autoportrait tout au long de sa MA (Figure 2). Le déclin de sa santé mentale pu ainsi être observé par les distorsions faciales, l'utilisation de couleur et le manque d'organisation spatiale retrouvé progressivement dans ses autoportraits (Harrison, 2013).

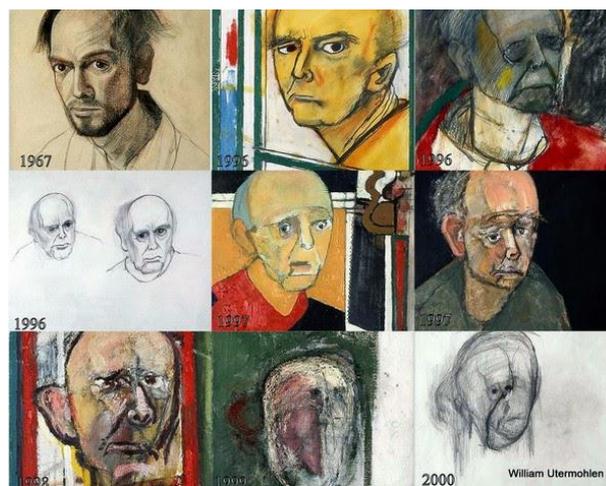


Figure 2 : Évolution des autoportraits réalisés entre les années 1967 et 2000 par le peintre américain William Utermohlen atteint de la MA.
 Déclin de la santé mentale observée par les distorsions faciales, l'utilisation de couleurs et le manque d'organisation sur les peintures (<http://www.jenx67.com>).

1.3 Diagnostic clinique

L'approche clinique pour le diagnostic de la MA est basée sur l'identification d'altérations cognitives spécifiques et permet de déterminer le stade de la maladie. L'examen physique et neurobiologique permet d'identifier des troubles de mémoire, de langage et spatio-visuel. Pour cela, le *National Institute of Neurologic and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Diseases and Related Disorders Association – Criteria for Alzheimer Disease* (NINCDS – ADRDA) a divisé le diagnostic des patients en trois critères : probable, possible ou définitif de la MA (McKhann et al., 1984).

Les critères pour un **diagnostic probable** sont :

- Une démence confirmée par un examen clinique, tel que le *Mini-Mental State* (Folstein, Folstein, & McHugh, 1975) et des preuves neuropsychologiques. Ce test analyse les aspects cognitifs de la démence en 11 questions
- Des déficits de plusieurs fonctions cognitives.
- Début entre 30 et 90 ans.
- Absence de maladie systémique pouvant causer la démence.

Ce diagnostic est renforcé lors d'altérations cognitives telles que l'aphasie, l'apraxie, l'agnosie progressive, une perturbation dans les activités quotidiennes et comportementales, un historique familiale positif ou encore la présence d'atrophies cérébrales, entre autres.

Le **diagnostic possible** se base sur la présence de syndrômes démentiels même en l'absence d'autres troubles neurologiques, psychiatriques ou maladies systémiques pouvant entraîner une démence. Il peut également être combiné à une deuxième maladie systémique ou cérébrale non démentielle.

Le **diagnostic définitif** de la MA est seulement possible par une confirmation histopathologique post-mortem ou par biopsie, chez un patient avec les critères cliniques d'une MA probable.

Les critères décrits par l'étude de McKhann, Drachman, Folstein, *et al* (1984) sont ceux utilisés jusqu'à présent. Cependant, d'autres outils de diagnostic ont été développés pour approfondir le diagnostic de la MA, par exemples : Le Test cognitif *Clock Drawing Test* se base sur le *Mini-Mental State Exam* (MMSE) pour évaluer les capacités mentales et les perceptions

visuo-spatiales du patient. Le test *Montreal Cognitive Assessment* (MoCA), comprend 30 questions qui permettent de détecter un début de démence (Nasreddine et al., 2005), (Peters & Pinto, 2008). Lorsque le patient ne peut pas réaliser ces tests cognitifs, le médecin (ou le responsable des tests) peut demander au patient :

- D'apprendre une adresse et la lui faire répéter après un intervalle de temps choisi.
- Lui demander de cacher des objets puis lui demander l'endroit et le nom des objets qu'il a cachés, après un certain intervalle de temps.

Ces approches sont faciles à réaliser mais elles permettent d'évaluer la mémoire (Albert et al., 2011).

L'atrophie cérébrale est une autre caractéristique de la MA (figure 3). Les tests comportementaux peuvent être couplés à des analyses d'imagerie par résonance magnétique (IRM). L'IRM est une technique utilisée pour mesurer directement le volume cérébral dont la diminution progressive est observée dans la MA (Pini et al., 2016). L'atrophie de l'hippocampe (figure 4) est un marqueur important de la progression de cette pathologie (Shi, Liu, Zhou, Yu, & Jiang, 2009) (Barnes et al., 2010).

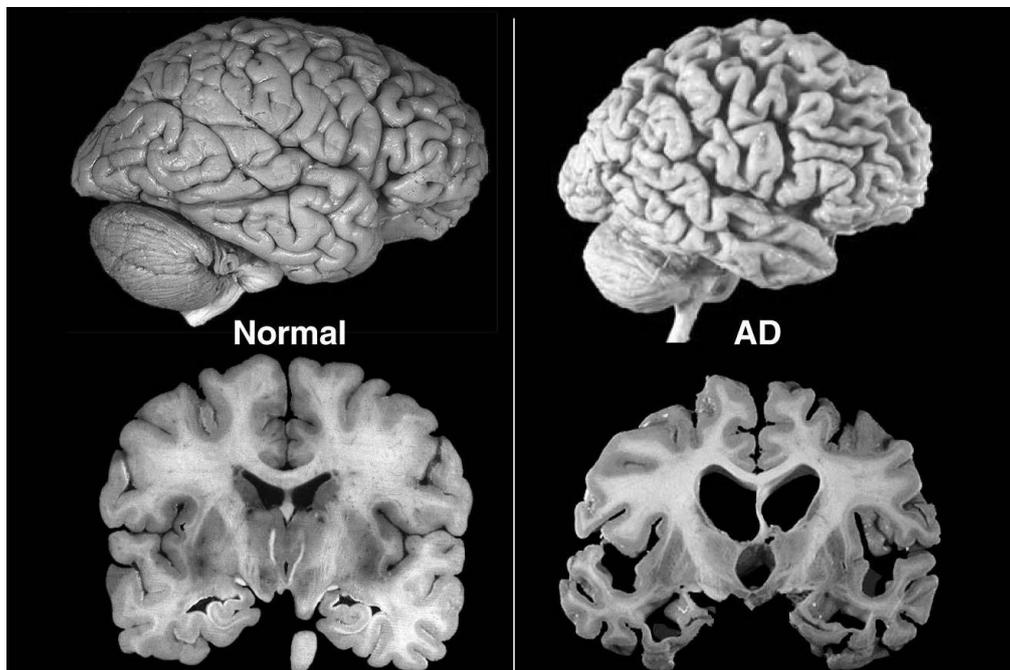


Figure 3 : **Atrophie Cérébrale dans la Maladie d'Alzheimer.**

L'atrophie cérébrale sévère observée chez les patients à un stade très avancé de la maladie d'Alzheimer, comparé à un cerveau non pathologique (Bagad & Khan, 2013).

Silbert et al a démontré que l'atrophie cérébrale dans la MA augmentait de 2% chaque année par rapport aux individus de référence qui montraient une augmentation de seulement 0,4% (Silbert et al., 2003). L'atrophie du cortex, de la matière blanche, du striatum et le cerveau basal antérieur sont aussi observés (Pini et al., 2016).

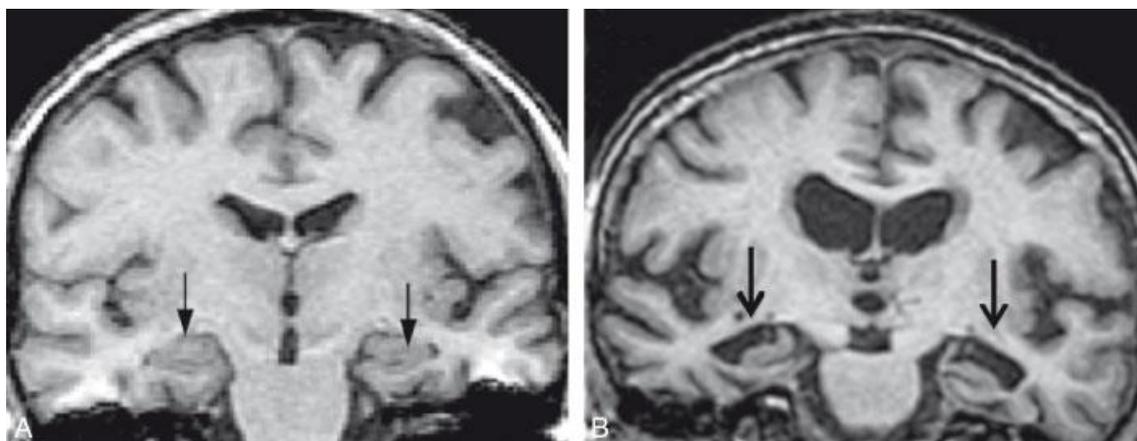


Figure 4 : **IRM Cérébrale.**

Les flèches représentent l'hippocampe dans le cerveau. À gauche : un cerveau non pathologique qui ne présente pas d'atrophie de l'hippocampe. À droite : un cerveau Alzheimer présentant une atrophie de l'hippocampe (www.miloo.org).

1.4 Traitements

Depuis sa découverte au début du XX^e siècle, la MA est encore incurable. Certains médicaments permettant d'atténuer les symptômes de la maladie sont toutefois disponibles. Selon le Comité scientifique permanent de l'Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS), ceux-ci sont regroupés en deux classes de médicaments: les anticholinestérases et les antagonistes des récepteurs glutamatergiques NMDA (Breton, Turgeon, & Tremblay, 2015).

Les médicaments inhibiteurs de l'Acétylcholinestérase sont utilisés pour diminuer la dégradation de l'Acétylcholine (ACh) au niveau des fentes synaptiques. Ainsi, ils permettent de prolonger les effets de l'acétylcholine, un neurotransmetteur impliqué dans la régulation de la mémoire et de l'apprentissage (Klinkenberg, Sambeth, & Blokland, 2011) (Ng, Or, & Ip, 2015) (Mesulam, Guillozet, Shaw, & Quinn, 2002). Actuellement, trois médicaments ayant pour cible thérapeutique l'ACh sont commercialisés au Canada : le Donépézil, un inhibiteur réversible de Acétylcholinestérase (le seul approuvé pour tous les stades de la

maladie); le Rivastigmine, un inhibiteur pseudoirréversible de l'Acétylcholinestérase et de la Butyrylcholinestérase et le Galantamine, un inhibiteur réversible de l'Acétylcholinestérase, mais qui a une affinité inférieure à la Butyrylcholinestérase (Breton et al., 2015).

La mémantine est un médicament antagoniste des récepteurs glutamatergiques NMDA. Dans la MA, l'excès de glutamate, un neurotransmetteur fortement impliqué dans la mémoire et l'apprentissage *via* ces récepteurs NMDA, cause une excitotoxicité et une mort cellulaire. Ainsi l'administration de ce médicament peut permettre une neuroprotection face à l'effet glutamatergique dépendant des récepteurs NMDA chez des patients atteints de la MA (Ng et al., 2015).

Toutefois, ces inhibiteurs sont seulement palliatifs et ne permettent pas de guérir la MA. Ils permettent de soulager les symptômes au début de la maladie. De nombreuses études cliniques sont actuellement en cours afin de chercher un médicament curatif et/ou qui atténue les symptômes de la MA (<https://www.nia.nih.gov/alzheimers/clinical-trials>).

1.5 Origines moléculaires

La MA se définit par une grave perte neuronale, l'agrégation de β -amyloïde ($A\beta$) dans les plaques amyloïdes et la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires induits par l'hyperphosphorylation de la protéine Tau (Giri, Shah, Upreti, & Rai, 2017) (Chai, 2007) (Van Cauwenberghe, Van Broeckhoven, & Sleegers, 2016). Selon l'âge du patient, la MA peut être classée sous deux formes : familiale ou sporadique.

La forme familiale de la MA est caractérisée par un développement précoce de la maladie chez les individus âgés moins de 65 ans. Elle représente 5% des cas de la MA (Wu et al., 2012). Cette forme familiale est autosomique et dominante. Elle apparaît suite à la mutation de l'un des trois gènes suivants: l'*APP* (protéine précurseur de l'amyloïde) dans le chromosome 21 et la présénile 1 (PSEN1) dans le chromosome 14 et présénile 2 (PSEN2) dans le chromosome 1 (Sherrington et al., 1995) (Rogaev et al., 1995). Environ 50% des individus atteints par la MA familiale possèdent une mutation dans l'un de ces trois gènes (Wu et al., 2017). Jusqu'à présent plus de 300 mutations ont été reportées dans ces trois gènes (<https://www.alzforum.org/mutations>).

La forme sporadique de la maladie d'Alzheimer est caractérisée par une apparition tardive. En effet, elle affecte des individus ayant plus de 65 ans. C'est la forme la plus commune de la maladie et elle présente un modèle d'hérédité non mendélienne (Van Cauwenberghe et al., 2016). Cette forme n'est pas directement liée aux mutations observées dans la forme familiale de la MA (Mayeux et al., 2012). Cependant, un facteur de susceptibilité génétique a été identifié : la présence de l'allèle $\epsilon 4$ dans le chromosome 19 du gène (*APOE*) codant pour la protéine apolipoprotéine E (ApoE), une protéine impliquée dans le transport du cholestérol (Rogaeva, 2002).

D'autres gènes ont également été associés à la forme sporadique : sortilin-related receptor 1 (SORL1), clusterin gene (CLU), phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein gene (PICALM) et complement receptor type 1 gene (CR1) (Mayeux et al., 2012). De plus, des facteurs de risques tels que le sexe, syndrome de Down, traumatisme crânien, athérosclérose, accident vasculaire cérébrale, hypertension, hypotension, diabète, hyperlipidémie, obésité, consommation de tabac, facteurs immunologiques, facteurs inflammatoires, maladies systémiques ont été reportés (Panpalli Ates, Karaman, Guntekin, & Ergun, 2016).

1.6 Neuropathologie

Parmi les caractéristiques pathologiques d'un patient atteint par la MA on retrouve des dépôts extracellulaires du peptide $A\beta$ qui composent les plaques amyloïdes, des enchevêtrements neurofibrillaires (figure 5) ainsi qu'une perte neuronale et synaptique dans le cortex cérébral et hippocampe (Hardy et al., 1992); (Selkoe, 2001).

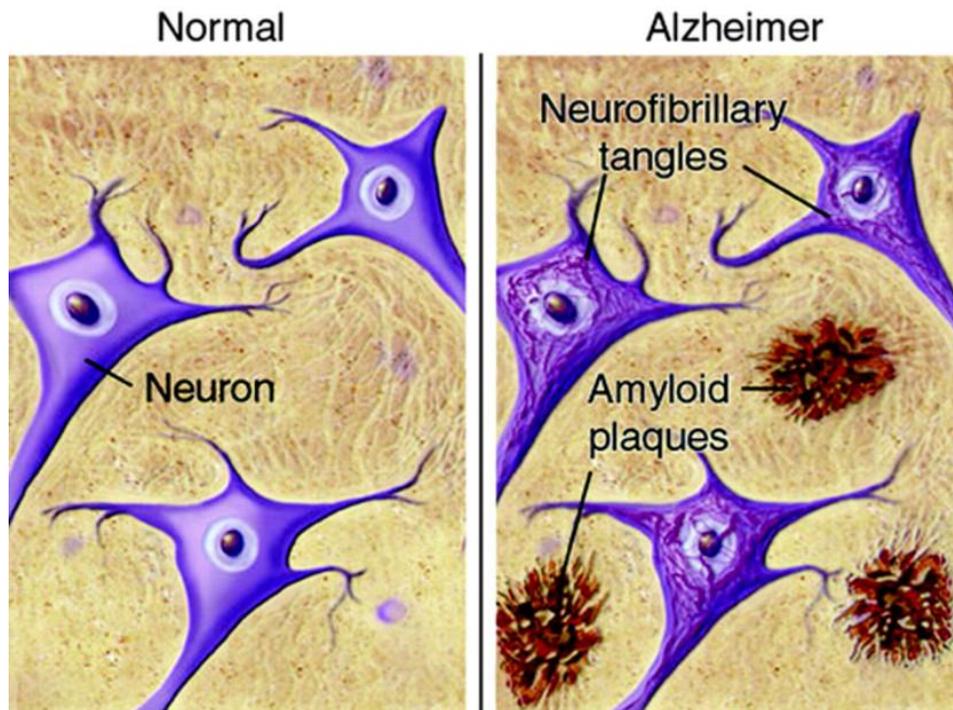


Figure 5 : **Plaques amyloïdes et Enchevêtrements Neurofibrillaires.**

Formation des plaques amyloïdes extracellulaires et les enchevêtrements neurofibrillaires intracellulaires dans la maladie d'Alzheimer comparée à une situation non pathologique (<https://www.brightfocus.org>).

1.6.1 Les plaques amyloïdes

Les plaques amyloïdes sont composées d'une agrégation excessive du peptide β -amyloïde dans le cerveau par un clivage anormal de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) par des protéases : β -secretase, α -secretase et γ -secretase (Kang et al., 1987) ; (Esch et al., 1990) (J. Hardy & Allsop, 1991). Ce clivage conduit à la production de peptides $A\beta$, constitué de 38-42 acides aminés hydrophobes.

Dans la MA de type familial, une duplication sur le gène de APP a été découverte dans le chromosome 21. Cette mutation retrouvée chez des patients atteints par le syndrome de Down développe également la MA dû à l'excès de peptide $A\beta$ formant les plaques amyloïdes. Cet excès pourrait être dû à la présence de la copie supplémentaire du gène codant la protéine APP, entraînant une augmentation du niveau d'APP (Goate et al., 1991) (Teipel & Hampel, 2006).

Le processus pathologique le mieux décrit dans la MA est l'hypothèse de la cascade amyloïde. Cette hypothèse suggère que les plaques amyloïdes extracellulaires, constituées de l'agrégation des peptides A β , sont les éléments déclencheurs de la MA (J. A. Hardy et al., 1992) (Lichtenthaler, 2011).

APP est une glycoprotéine transmembranaire de type 1 localisée dans le chromosome 21, contenant un large domaine extracellulaire N-terminal, un domaine transmembranaire, et un domaine C-terminal cytoplasmique de 59 résidus d'acides-aminés (Di Luca et al., 2000) (; (Pernecky et al 2014). L'APP peut subir plusieurs modifications post-traductionnelles au sein du complexe de golgi et avant d'être amenée vers la membrane cellulaire (Caporaso et al., 1994).

APP est localisée dans la zone pré-synaptique et post-synaptique des neurones de l'hippocampe et du cortex (Musardo & Marcello, 2017). L'APP possède des rôles physiologiques importants pour l'homéostasie neuronale (van der Kant & Goldstein, 2015), la neuroprotection (Hefter & Draguhn, 2017), le développement de cellules souches neuronales (Thinakaran & Koo, 2008), la survie neuronale, la régulation des cellules souches neuronales et la neuroréparation (Dawkins & Small, 2014).

1.6.2 Les sécrétases d'APP

APP est impliquée dans 2 processus de clivage différents (figure 6) : la voie non-amyloïdogénique (90%) qui implique la protéase α -secretase et γ -secretase et la voie amyloïdogénique (10%), qui implique le clivage séquentiel de β -secretase et γ -secretase et production des peptides amyloïdes (Penke, Bogár, & Fülöp, 2017). Les mutations sur le gène de l'APP, trouvées dans la séquence de A β , altèrent la production du peptide amyloïde (40 et 42) et cause une forme familiale de la MA (Michael S. Wolfe, 2012).

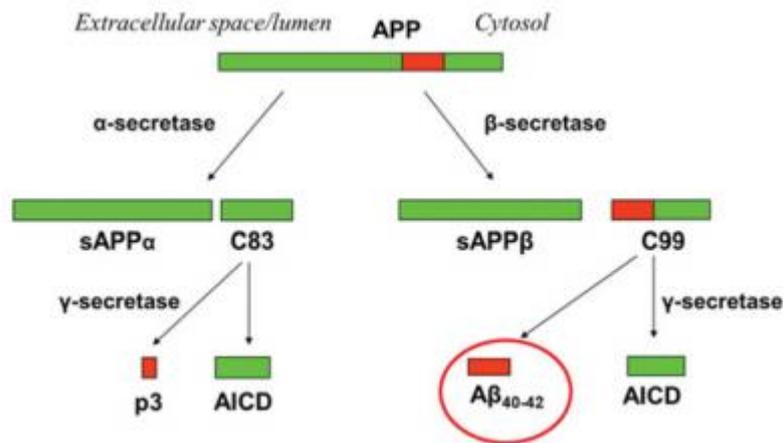


Figure 6 : Schéma représentant la voie non-amyloïdogénique (α -secretase) et la voie amyloïdogénique (β -secretase).

La voie non-amyloïdogénique implique un premier clivage de APP libérant sAPP α et le fragment C83. Ce dernier est clivé par γ -secretase et libère le fragment p3 et AICD. La voie amyloïdogénique implique le clivage de APP β -secretase et formation de sAPP β et du fragment C99. Ce dernier est également clivé par γ -secretase qui libère AICD et le peptide β -amyloïde (Teich & Arancio, 2012).

La α -secretase ou ADAM10 (*A Disintegrin And Metalloproteinase domain-containing protein10*) ou ADAM17 (*A Disintegrin And Metalloproteinase domain-containing protein17*) clive APP et génère sAPP α et le fragment C-terminal C83. Le C83 est par la suite clivé par la γ -secretase ce qui libère les fragments non toxiques p3 et AICD (APP intracellular domain). Cette voie ne produit pas de peptide A β (Cole & Vassar, 2007); (Pernecky et al 2014); (Lane, Shineman, Steele, Lee, & Fillit, 2012); (Musardo & Marcello, 2017).

L'activité β -secretase est portée principalement par BACE 1 dans le cerveau (β -site APP cleaving enzyme-1) (Wolfe et al., 1999). Cette protéine est une aspartil protéase transmembranaire localisée aux extrémités synaptiques (Cole & Vassar, 2007); (Pernecky et al 2014). Le complexe γ -secretase est responsable du clivage de protéines de membranes de type I, tels que APP et Notch (De Strooper, Iwatsubo, & Wolfe, 2012), ainsi que des protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire, comme N-Cadhérine, E-cadhérine et CD-44 (R. Kopan & Ilagan, 2004). Le clivage de l'APP libère l'ectodomaine APP β et un fragment C-terminal de 99 acides aminés. Le C99 est ensuite clivé par la protéase γ -secretase dans son domaine C-terminal ce qui permet la production d'AICD et des peptides A β ₄₀/A β ₄₂ (Evin, 2003); (Lichtenthaler, 2011).

Le fragment du peptide amyloïde 40 (A β ₄₀) est le plus fréquemment produit par la voie amyloïdogénique. Le fragment peptide amyloïde 42 (A β ₄₂) est quant à lui, un fragment

plus hydrophobe et plus enclin à l'agrégation. Ce fragment A β 42 serait également plus neurotoxique et est celui qui est le plus souvent trouvé dans les plaques amyloïdes. (Pernecky et al 2014). La majorité des mutations identifiées semblent favoriser la production de A β 42 ou réduire celle de A β 40 augmentant le ratio A β 42/A β 40 (Randall, Witton, Booth, Hynes-Allen, & Brown, 2010) (Sheng, Sabatini, & Su, 2012).

Le complexe γ -secretase (figure 7) est mis en jeu dans les deux voies de clivage de APP. C'est un large complexe de protéase hetero-tétramériques composé de quatre sous-unités (De Strooper, 2003): préséniline 1 (PS1), préséniline 2 (PS2) (Sherrington et al., 1995), protéine transmembranaire qui contient l'activité catalytique (Spasic & Annaert, 2008); Nicastrine, une glycoprotéine transmembranaire de type I (Yu et al. 2000) (Spasic & Annaert, 2008) ; Aph-1 (anterior pharynx-defective1), une protéine avec 7 domaines transmembranaires de type I (Goutte et al. 2002) (Spasic & Annaert, 2008) et Pen-2 (presenilin enhancer 2), une protéine à 2 domaines transmembranaires de type I (Francis et al. 2002) (Spasic & Annaert, 2008). Les trois dernières sont très importantes pour la maturation et le transport du complexe (R. Kopan & Ilagan, 2004). La formation du complexe nécessite l'interaction des 4 protéines du complexe (De Strooper et al., 2012). Il a été démontré que les quatre composants du complexe existent en une stœchiométrie de 1 :1 :1 :1 (Sato et al., 2007). Nicastrine et Aph-1 vont former un sous-complexe stable au sein du réticulum endoplasmique grâce aux domaines transmembranaires de Aph-1 (LaVoie et al., 2003) (Chiang et al., 2012). Ce sous-complexe va ensuite interagir avec un le sous-complexe composé de Pen-2 et préséniline 1 (Luo et al., 2003) (Fraering et al, 2004) *via* le domaine C-terminal de préséniline (Kaether et al., 2004) (Steiner, Winkler, & Haass, 2008). Pen-2 et Aph-1 sont essentielles pour le clivage protéolytique de PS1 sur son N- et C-terminal (Luo et al., 2003). La présence de Aph-1 joue un rôle très important dans la maturation du complexe PS1-Nicastrine. L'absence de préséniline peut déstabiliser Nicastrine et Aph-1. Par contre, l'absence de Aph-1 peut déstabiliser PS1, Nicastrine, Pen-2 et les voies de signalisation Notch et APP (Y. Gu et al., 2003).

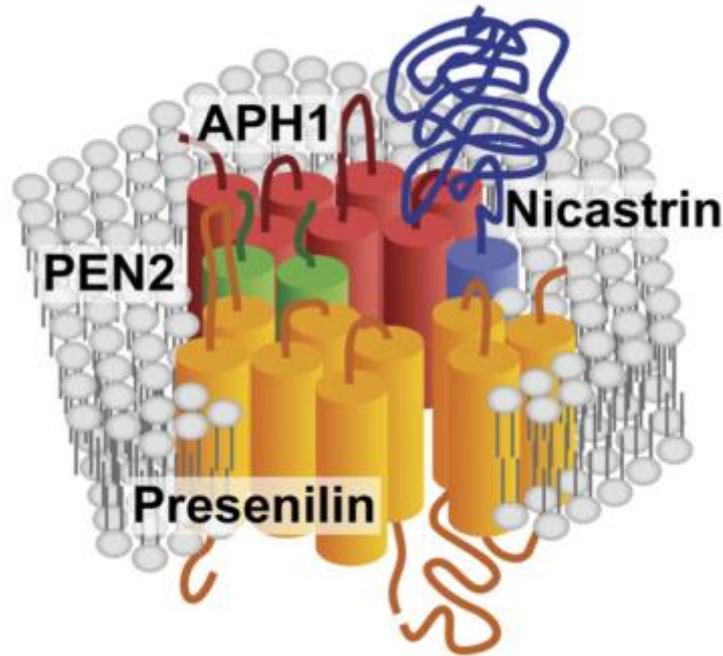


Figure 7 : **Le complexe γ -sécrétase.**

Le complexe γ -sécrétase est un complexe composé de quatre protéines : Préséniline 1 et 2, Nicastrine, Pen-2 (presenilin enhancer 2) et Aph-1 (anterior pharynx-defective1) impliqué dans le clivage de APP (Parks & Curtis, 2007).

Comme le complexe γ -secretase joue un rôle très important dans la production de peptide $A\beta$, l'inhibition de cette γ -secretase est une cible thérapeutique importante pour le traitement de la MA. Cependant, ce complexe clive d'autres protéines de membranes de type I, les effets secondaires sont donc importants. Notch, par exemple, est l'une de ces cibles or c'est une protéine impliquée dans la différenciation et développement (De Strooper, 2003) ; (De Strooper et al., 2012) ; (Liu, Sato, Cerletti, & Wagers, 2010) ; (Bray, 2006).

1.6.3 Enchevêtrements neurofibrillaires

Les enchevêtrements neurofibrillaires sont associés à l'hyperphosphorylation anormale de la protéine Tau (Y. Wang & Mandelkow, 2016). On observe ces structures dans le cerveau de patients atteints par la MA, mais également dans d'autres maladies neurodégénératives comme les tauopathies (Y. Wang & Mandelkow, 2016). La protéine Tau appartient à la famille de protéines associées aux microtubules (MAP, microtubule-associated proteins). Elle permet la polymérisation et la stabilisation des microtubules (Naini & Soussi-yanicostas 2015). Cette protéine est également importante pour le maintien structurel et fonctionnel du cytosquelette des axones neuronaux (Lichtenthaler, 2011). Dans la MA, on

observe une hyperphosphorylation de la protéine Tau ce qui entraîne son détachement des microtubules. Ces derniers vont alors être destabilisés et se dépolymériser. La protéine tau va quant à elle s'agréger et former les enchevêtrements neurofibrillaires (Y. Wang & Mandelkow, 2016).

1.6.4 Déficit Cholinergique

La MA est aussi marquée par un déclin cholinergique dans le cortex cérébral et dans l'hippocampe (Bowen et al., 1976) (Whitehouse et al., 1982). L'hypothèse cholinergique de la MA suggère que cette maladie est marquée par un dysfonctionnement de la transmission cholinergique dans le cortex cérébral et l'hippocampe. Ce dysfonctionnement serait suite à une perte de neurones cholinergiques mais aussi à une diminution de la synthèse et de la dégradation de l'ACh (Bartus, Li, Beer, & Lippa, 1982) (Mesulam et al., 2002). L'ACh est un neurotransmetteur impliqué dans la régulation de la mémoire et de l'apprentissage (Klinkenberg et al., 2011). Le système cholinergique fonctionne par la libération de l'ACh dans la fente synaptique et sera hydrolysée par les cholinestérases, Acétylcholinestérase et Butyrylcholinestérase (Mesulam et al., 2002). Ainsi, l'augmentation du niveau d'ACh par l'inhibition des cholinestérases pourrait théoriquement prolonger l'action de l'ACh ce qui pourrait réduire les troubles de mémoires et améliorer les fonctions cognitives chez les patients de MA.

La choline acetyltransferase (CAT) permet la synthèse de l'ACh. Cependant, son niveau d'expression est réduit dans les neurones cholinergiques, et est fortement relié au déclin cognitif chez les patients atteints par la MA (Bowen et al., 1976) ; (Brice et al., 1992) ; (Wilcock et al., 1982). Il a été observé que les neurones cholinergiques localisés dans le nucleus basalis de Meynert, source majeure de l'innervation cholinergique du cortex cérébral, sont les plus affectés (> 80%) dans la MA. Ces données suggèrent que des changements pathologiques dans le nucleus basalis de Meynert joue un rôle important dans le déclin cholinergique de la MA (Whitehouse et al., 1981) (Whitehouse et al., 1982). Cependant certains patients présentent un niveau normal de neurones cholinergiques dans le nucleus basalis de Meynert (Perry et al., 1982) (Pearson et al., 1983). La perte synaptique dans le cortex cérébral et l'hippocampe joue également un rôle très important dans la maladie d'Alzheimer puisqu'elle conduit au déclin cognitif caractéristique de la maladie (DeKosky and Scheff, 1990) (Scheff, Price, Schmitt, & Mufson, 2006). Un déclin de 25% de la

transmission synaptique a été observée dans l'hippocampe et le cortex cérébral de patients atteints par la maladie d'Alzheimer légère. Ce déclin est possiblement due à une altération de la protéine vésiculaire pré-synaptique Synaptophysine (Dennis J. Selkoe, 2002).

Ces expériences ont permis d'élaborer l'hypothèse cholinergique de la MA. Cette hypothèse suggère que la dégénérescence des neurones et la transmission cholinergique dans le cortex cérébral et dans l'hippocampe contribuent au déclin des fonctions cognitives chez les patients atteints par la MA (Bartus et al., 1982). Cette hypothèse a permis le développement de plusieurs médicaments capable d'inhiber l'hydrolyse de l'acétylcholine (voir la section 1.4).

1.7 Préséniline 1

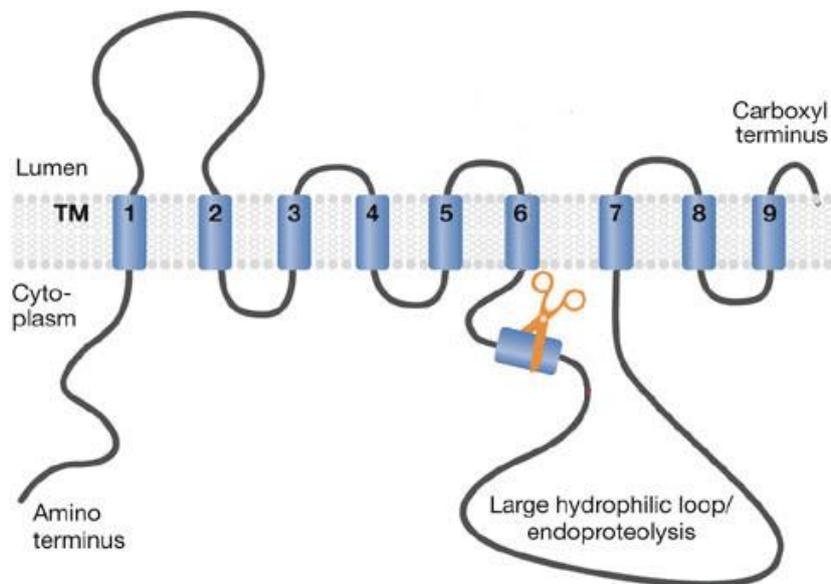


Figure 8 : **Structure de la protéine Préséniline 1.**

La protéine est composée de 9 domaines transmembranaires. Elle subit une coupure endoprotéolytique entre les domaines 6 et 7 transmembranaires qui permet la libération d'un fragment N et C-terminal (Adapté de Zhang et al., 2013).

PS1, localisée dans le chromosome 14 et PS2 localisées dans le chromosome 1 ont chacune 10 exons codants. Les Présénilines ont une homologie de 67%. Des mutations sur ces protéines causent des formes précoces de la MA (Selkoe, 2001) (Cruts & Van

Broeckhoven, 1998) (Sherrington et al., 1995) (Rogaev et al., 1995) (Levy-lahad & Bird, 1996).

PS1 et PS2 sont exprimées à de niveaux comparable dans tous les tissus humains et murins (Lee et al., 1996). Mais PS2 ne sera pas discutée dans ce mémoire, en raison de la prévalence majeure des mutations de PS1 associées à la forme familiale de la MA en comparaison à celle de PS2 (Levesque et al., 1999).

PS1 (Figure 8) est une protéine d'environ 50kDa multi-transmembranaire composée de neuf domaines transmembranaires (Laudon et al., 2005) (Spasic et al., 2006). Ses mutations représentent 50% des cas de la forme familiale de la MA (Gomez-Isla et al., 1999). À ce jour, 241 mutations ont été identifiées dans le gène PSEN1 de PS1 (<https://www.alzforum.org/mutations>). PS1 est localisée dans le réticulum endoplasmique, complexe de Golgi et en petite quantité dans la membrane plasmique, précisément dans les compartiments pré-synaptique et post-synaptique des neurones (Kovacs et al., 1996) (Kim et al., 2000) (Shen, 2011). PS1 est exprimée dans tous les types cellulaires et est conservée dans l'évolution (Coates, 2003).

Pendant la maturation de PS1, la protéine subit un clivage endoprotéolytique dans la large boucle hydrophobe cytoplasmique qui génère les fragments N-terminal, de 27/28 kDa et C-terminal, de 16/17 kDa (Thinakaran et al., 1996). Ce clivage s'effectue sur des sites hétérogènes entre les acides aminés 291 et 298, proche du résidu Met298, codé dans l'exon 9 dans la boucle cytoplasmique (Podlisny et al., 1997). Il n'est pas encore clair si le clivage est nécessaire à son activité enzymatique. En effet, certaines mutations de la protéine sont enzymatiquement actives en absence de clivage, comme par exemple, FAD-PS1 Δ E9 (Knappenberger et al., 2004).

PS1 est une *aspartyl intramembrane cleaving proteases* (I-CLiPs) (Wolfe & Kopan, 2004). Les deux résidus aspartate catalytiques, Asp257 dans le domaine transmembranaire 6 et Asp385 dans le 7 sont localisés dans le N-terminal et C-terminal, respectivement (M S Wolfe et al., 1999). Préséniline 1 fait partie du complexe γ -sécrétase et l'équipe De Strooper et al., décrit un rôle direct de PS1 dans le processus de clivage de la protéine APP par γ -sécrétase (De Strooper et al., 1998). PS1 endogène murine, est fortement impliqué dans la coupure protéolytique de APP et Notch et l'inactivation de son gène provoque une réduction drastique du clivage de APP et Notch (Stanga et al., 2017). Des études dans le plasma et le

milieu de culture de fibroblastes de peau humaines ont mis en évidence une augmentation du niveau du peptide A β 42 par les Présénilines mutantes (Scheuner et al., 1996). De même, la capacité des mutations de PS1 de spécifiquement augmenter le dépôt du peptide A β 42 a été démontré dans le cerveau sur des patients atteints par la MA et chez les souris exprimant PS1 mutante. Ces résultats souligneraient un rôle important de PS1 dans la production des peptides A β issus du clivage de la protéine APP (Lemere et al., 1996) (Borchelt et al., 1996) (Citron et al., 1997). Cependant, une étude a démontré que certaines mutations de PS1 retrouvées dans la forme familiale de la MA ne causent pas l'augmentation du peptide A β . Dans ces formes, la neurodégénérescence serait causée par un processus indépendant des effets de la production des peptides A β (Shioi et al., 2007).

L'inactivation du gène de PS1 dans des souris entraîne une létalité après naissance. Ces souris présentent des déformations du squelette, des déficiences de la neurogenèse et une perte neuronale, indiquant que PS1 joue un rôle essentiel dans le développement (Jie Shen et al., 1997). Des études ont décrit que l'inactivation du gène de PS1 dans le cerveau (cortex cérébral) de souris cause une perte synaptique et neuronale ainsi qu'une perte de la mémoire, indiquant aussi un rôle essentiel de PS1 dans la neurodégénérescence dépendant de l'âge (Saura et al., 2004) (Wines-Samuelson et al., 2010).

PS1 joue également un rôle dans l'apoptose, l'homéostasie du calcium, la plasticité synaptique, la croissance neuritique, l'adhésion cellulaire et dans la régulation du trafic de protéines, précisément avec la GTPase Rab11, impliqué dans le transport de vésicule (Thinakaran & Parent, 2004) (Parks & Curtis, 2007) (Walter, 2015) (Dumanchin et al., 1999).

Des études ont démontré l'interaction entre la protéine Préséniline 1 et des membres de la famille contenant le domaine Armadillo, comme la β -caténine, la p0071 et la *neural plakophilin-related armadillo protein* (NPRAP) (J. Zhou et al., 1997) (Levesque et al., 1999) (Tanahashi & Tabira, 1999). Pour mieux comprendre le rôle de la protéine PS1, le Dr Georges Lévesque a identifié une large boucle cytoplasmique localisée dans le domaine C-terminal de PS1 qui interagit fortement avec NPRAP (Levesque et al., 1999) (Koutras & Lévesque, 2011). Cette interaction se produit entre les résidus 372-399 de la boucle cytoplasmique de PS1 et les domaine *Armadillo* de NPRAP (Levesque et al., 1999). De plus, la mutation pathologique L392V (voir section 1.8.1) de PS1 est associée à une moindre force

d'interaction entre les deux protéines, ce qui peut affecter l'expression génique régulée par NPRAP (Koutras & Lévesque, 2011).

1.7.1 Les Mutations L392V et M146L

La mutation de PS1, L392V (figure 9), est décrite pour la première fois en 1995 par le groupe Campion et al, chez des patients entre 39 et 52 ans. C'est une mutation associée à la maladie agressive d'Alzheimer de type familiale à début précoce (avant 65 ans). La mutation représente une leucine (CTG) qui est remplacée par une valine (GTC) dans le domaine hydrophile C-terminal ou le domaine 7 transmembranaire de la protéine (Campion et al., 1995). C'est une mutation qui change la structure secondaire de la boucle hydrophyle de PS1, donc une mutation qui pourrait modifier l'interaction de PS1 avec d'autres protéines par la rupture de la structure secondaire de celle-ci (Gantier et al., 1999), comme l'interaction entre PS1 et NPRAP, ce qui a été démontré par l'équipe du Dr Georges Lévesque (Koutras, Lessard, & Lévesque, 2011). Récemment, il a été démontré que cette mutation augmente le niveau du peptide A β 42, en diminuant le clivage de A β 42 en A β 38 (N. Li et al., 2016).

La mutation de PS1, M146L (figure 9), est une mutation associée à la maladie agressive d'Alzheimer de type familial à début précoce (avant 65 ans) et est localisée dans le N-terminal de PS1. Cette mutation décrite pour la première fois en 1995 remplace une méthionine par une leucine (Sherrington et al., 1995). La mutation est aussi impliquée dans l'augmentation de la formation du peptide A β 42 (Komano et al., 1999).

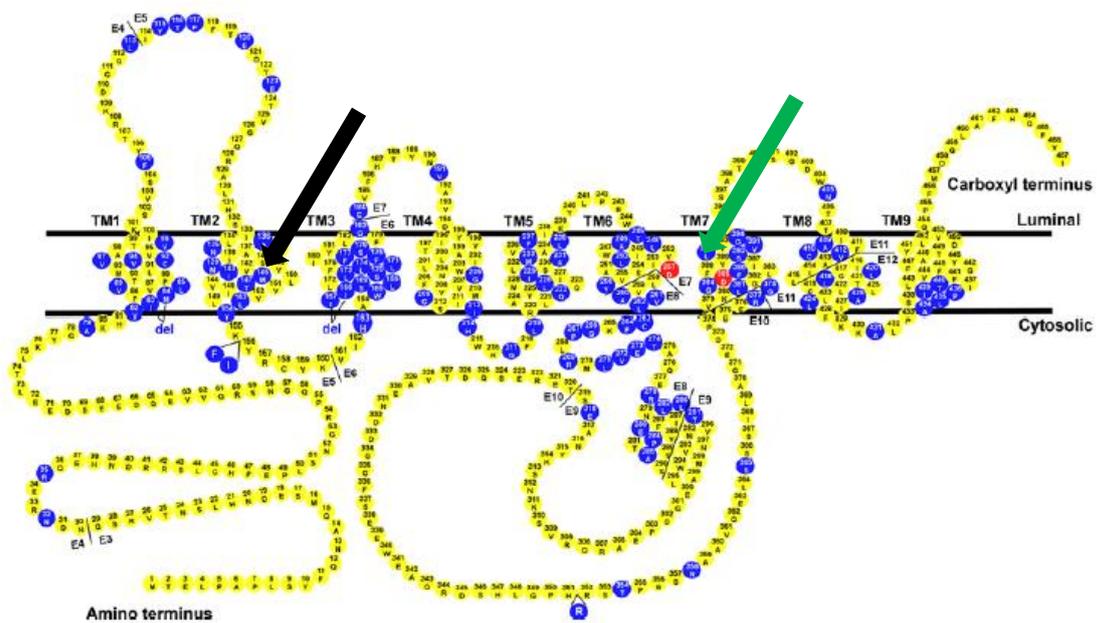


Figure 9 : Séquence d'acides aminés de la protéine Préséniline 1 et la distribution des mutations de la forme familiale de la maladie d'Alzheimer.

Les cercles bleus représentent les mutations de la forme familiale de la pathologie et les deux cercles en rouge représentent les deux résidus aspartate qui portent l'activité catalytique. La flèche noire localise la mutation M146L et la flèche verte la mutation L392V (Zhang, Zhang, Cai, & Song, 2013).

1.8 Neural-Plakophilin-Related Armadillo Protein

Neural-Plakophilin-Related Armadillo Protein (NPRAP) ou δ -caténine une protéine de 1247 acides aminés (Lu et al., 1999) est exprimée dans des tissus neuronaux et neuroendocriniens (Paffenholz & Franke, 1997). La protéine est aussi nommée Neurojungin après qu'une étude démontre que la protéine est exprimée et localisée dans la membrane limitante externe de la rétine (Paffenholz et al., 1999). L'expression de δ -Caténine commence pendant le début de l'embryogenèse (Ho et al. 2000) et atteint son plus haut niveau d'expression au 7ème jour post-natal (Lu et al. 1999). NPRAP subit plusieurs modifications post-traductionnelles, comme des phosphorylations et des palmitoylations (voir tableau 1).

Tableau 1 : Modifications post-traductionnelles de la NPRAP (δ -Caténine)

Modification	Acide aminé	Enzyme
Phosphorylation (Kim et al., 2008)	T454	Akt
Phosphorylation (Poore et al., 2010)	S300, S357	CDK5
Phosphorylation (Edbauer et al., 2009)	S447	JNK
Phosphorylation (Abu-Elneel et al., 2008)	S693, S1063, T1064, S1098, S1242	-
Phosphorylation (Oh et al., 2009)	T1078	GSK-3
Phosphorylation (Mackie et al., 2005) (Toyo-oka et al., 2014)	S1094	PKA
Palmitoylation (Brigidi et al., 2014)	C960, C961	DHHC5
Palmitoylation (Brigidi et al., 2014)	C960, C961	DHHC20

NPRAP possède une très importante homologie avec les protéines contenant un domaine Armadillo (Paffenholz & Franke, 1997). Ces protéines ensemble font parties de la sous-famille p120ctn composée de quatre protéines indépendantes (figure 10): p120ctn (codé par CTNND1) (Reynolds et al., 1992), NPRAP (codé par CTNND2), p0071 (codé par PKP4) (Hatzfeld & Nachtshiem, 1996) et ARVCF (*Armadillo Repeat gene deleted in Velo-Cardio-Facial syndrome*, codé par ARVCF) (Sirotkin et al., 1997).

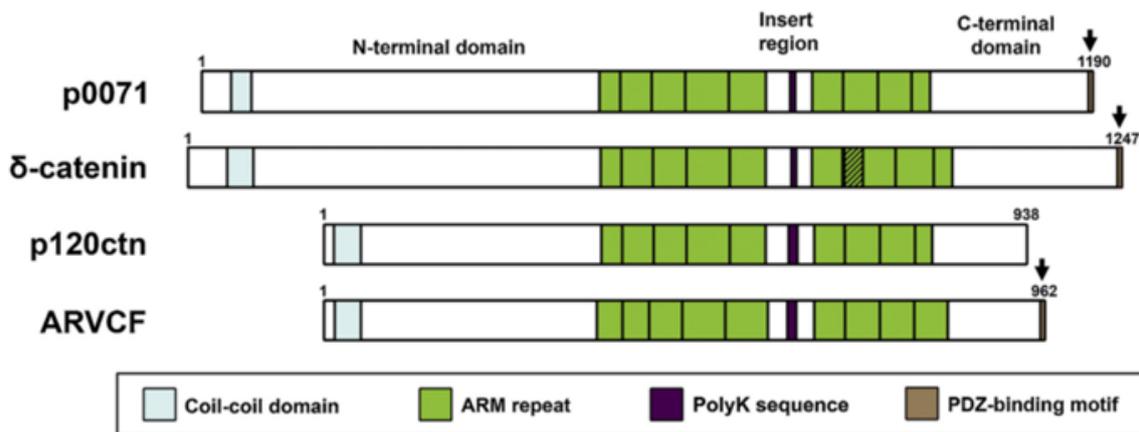


Figure 10 : Structure des protéines membres de la sous-famille p120ctn.

La sous-famille p120ctn est composée des protéines p0071, δ -caténine (ou NPRAP), p120ctn et ARVCF. Les protéines sont caractérisées par la présence d'un domaine N-terminal, composé d'un domaine superhélice, des motifs *armadillo* (*arm*) et d'un domaine C-terminal, composé d'un motif PDZ (flèche : p0071, δ -caténin et ARVCF). La séquence polyK est localisé dans une région d'insertion entre les motifs *arm*. δ -caténine possède une insertion de

25 acides aminés dans le motif *arm 7*. Le nombre d'acides aminés de chaque protéine est décrit sur chaque structure (Yuan & Arikath, 2017).

La structure protéique de cette famille de protéine est caractérisée par la présence d'un N-terminal, un C-terminal et une série imparfaite de 9 domaines *Armadillo (arm)* répétés (Paffenholz & Franke, 1997) (Yuan & Arikath, 2017). *Armadillo* est une série 7 à 12 copies de motifs imparfaits de 42 acides aminés en tandem retrouvés chez la *Drosophila*, conservé pendant l'évolution et servant de médiateur à l'interaction protéine-protéine (Riggelman, Wieschaus, & Schedl, 1989) (Peifer & Wieschaus, 1990) (Peifer, Berg, & B. Reynolds, 1994) (Coates, 2003). Le domaine N-terminal des protéines ARVCF, pp0071 et NPRAP est composé d'un motif superhélice, composé d'acides aminés constituant 2 à 5 α -hélices empaquées entre elles (Paffenholz & Franke, 1997) (Mason & Arndt, 2004). Le domaine C-terminal des protéines ARVCF, pp0071 et NPRAP est composé d'un *PSD-95/Dlg-A/ZO-1 (PDZ)-binding motif*, d'une séquence de 80-90 acides aminés formant une structure globulaire composée de 6 β -feuilletés et 2 α -hélices. La protéine p120ctn ne possède pas ce motif PDZ (Karthikeyan et al., 2001). NPRAP possède en plus une insertion de 25 acides aminés dans le domaine *arm 8*, suggérant un épissage alternatif (Lu et al., 1999). Les quatre protéines possèdent une séquence poly-lysine (polyK) entre les motifs *arm* plus précisément, dans une région d'insertion de la protéine qui pourrait avoir un rôle potentiel de favoriser la translocation vers le noyau (Paffenholz & Franke, 1997), (Hatzfeld & Nachtshiem, 1996), (Sirotkin et al., 1997), (Reynolds et al., 1992) (Koutras et al., 2011).

La séquence polyK de NPRAP pourrait être un signal de localisation nucléaire (SLN) permettant sa translocation vers le noyau afin d'agir comme un régulateur transcriptionnel (Koutras et al., 2011). Une étude a démontré qu'après clivage de la protéine NPRAP, un fragment du domaine C-terminal contenant une séquence polyK qui favorise la localisation nucléaire de NPRAP, cependant, ce n'est pas clair si la forme pleine longueur est localisée dans le noyau (D. Gu et al., 2011). Cette séquence polyK est localisée dans une région insérée (7-18 acides aminés) entre les domaines *arm 5* et *6* de NPRAP (Paffenholz & Franke, 1997) (D. Gu et al., 2011).

NPRAP joue un rôle dans la régulation de gènes impliqués dans la sénescence cellulaire, le cancer et la maladie d'Alzheimer, se transloquant vers le noyau et modulant l'expression génique (Koutras et al., 2011). Notre groupe a démontré que NPRAP est le régulateur de transcription de plusieurs gènes, comme IFI16, RNASEL et BCHE. Le gène

BCHE code pour la protéine Butyrylcholinestérase (voir section 1.10) et celui-ci est sous régulé après une surexpression de NPRAP grâce à la présence de la séquence polyK qui pourrait agir comme un signal de localisation nucléaire de NPRAP (Koutras et al., 2011). NPRAP est un composant du complexe d'adhésion cellulaire cadhérine-cathénine impliqué dans la motilité cellulaire (J. Zhou et al., 1997) (Lu et al., 1999). De plus, NPRAP se lie aux GTPases dynamines 1 et 2, essentielles pour l'endocytoses et impliquées dans le réarrangement du cytosquelette d'actine (Koutras & Lévesque, 2011).

Des études ont démontré que NPRAP interagit avec des protéines d'échafaudage et d'adhésion cellulaire contenant le domaine PDZ: Synaptic scaffolding molecule (S-SCAM) (Ide et al., 1999), densin-180 (Izawa, Nishizawa, Ohtakara, & Inagaki, 2002), plakophilin related armadillo repeat protein-interacting PDZ protein (PAPIN) (Deguchi et al., 2000), Cadhérines/PSD-95/AMPA receptor (AMPA)-binding protein (ABP) (Silverman et al., 2007) et Erbin (Laura et al., 2002).

La surexpression de NPRAP peut influencer la morphogénèse dendritiques dans les neurones de l'hippocampe (K. Kim et al., 2002), par exemple à travers l'interaction avec les protéines Erbin et Densin-180 (Izawa et al., 2002) (Laura et al., 2002). De plus, NPRAP peut induire la formation de protrusions dendritiques (Abu-Elneel et al., 2008). NPRAP interagit aussi avec la protéine Cortactin, une protéine qui se lie à l'actine du cytosquelette, par son domaine C-terminal (Martinez, Ochiishi, Majewski, & Kosik, 2003). L'ensemble de ces travaux indiquent que NPRAP pourrait influencer la régulation de la morphogénèse du cerveau et l'activité synaptique (Lu et al., 1999).

La délétion de la région 5p15.2 (chromosome 5) du gène (CTNND2) de NPRAP, associée à des phénotype de retard mental est aussi associée à la maladie génétique du Cri-du-Chat (Medina, Marinescu, Overhauser, & Kosik, 2000). Cette dernière, est une maladie caractérisée par un cri très aigu à la naissance, ressemblant à un cri aigu d'un chat, des dysmorphismes de la face, microcéphalie et un sévère retard mental et psychomoteur (figure 11) (Cerruti, 2006). De plus, des mutations sur NPRAP dégrade la fonction cognitive et synaptiques et est à la base de quelques formes de retard mental, comme la maladie du Cri-du-Chat ou la maladie d'Alzheimer (Israely et al., 2004). Une étude récente a décrit une délétion partielle de la région 5p15.2 du gène de NPRAP ainsi que la duplication de son promoteur chez une patiente de 8 ans présentant des troubles cognitifs très légers,

confirmant ainsi l'importance de NPRAP sur le phénotype cognitif des patients atteints par la maladie du Cri-du-Chat (Sardina, Walters, Singh, Owen, & Kimonis, 2014).

L'invalidation du gène de NPRAP dans l'hippocampe de souris peut provoquer des altérations de la fonction, plasticité et développement de l'arborisation dendritique et des synapses, ainsi que contribuer aux dommages cognitifs causés par la maladie du Cri-du-Chat (Arikkath et al., 2009) (Yuan, Seong, Beuscher, & Arikkath, 2015). De plus, deux patients portant des délétions sur l'exon et intron de CTNND2 ont présenté des troubles intellectuels (Belcaro et al., 2015).

NPRAP est aussi associée à d'autres maladies comme, le cancer de la prostate (Burger et al., 2002), la schizophrénie (Vrijenhoek et al., 2008), des troubles d'anxiété (Nivard et al., 2014) et l'autisme (Turner, Sharma, Oh, Liu, & Collins, 2015).



Figure 11 : **Maladie du cri du Chat.**

Une maladie caractérisée par un cri très aigu à la naissance, ressemblant à un cri aigu d'un chat, des dysmorphismes de la face, microcéphalie et un sévère retard mental et psychomoteur (Cerruti, 2006).

1.8.1 Mutation G810R

Un groupe en collaboration (Jun et al., 2012) avec le groupe du Dr Georges Lévesque a démontré un lien entre la cataracte et la protéine NPRAP dans le développement de la maladie d'Alzheimer en analysant des dommages cérébraux et l'opacité du cristallin chez les mêmes individus (Jun et al., 2012). Une rare mutation faux-sens G810R (glycine à la place d'une arginine dans la position 810) a été retrouvée dans la cataracte corticale (figure 12) (Jun et al., 2012). NPRAP G810R est localisée en amont de la séquence poly-lysine de NPRAP et la mutation possède donc un possible effet sur la localisation de NPRAP (Jun et al., 2012). De plus, la mutation a un effet sur les protrusions cellulaires, suggérant que la mutation pourrait altérer l'interaction de la membrane plasmique avec l'actine du cytosquelette (Jun et al., 2012). NPRAP semble augmenter légèrement la quantité de A β 42 dans des cellules HEK293, suggérant ainsi un mécanisme pathologique liant la maladie d'Alzheimer et la cataracte corticale (figure 13) (Jun et al., 2012). Le cristallin de patients présentant la maladie d'Alzheimer ont présenté une augmentation de l'expression de NPRAP comparée à des contrôles (Jun et al., 2012).

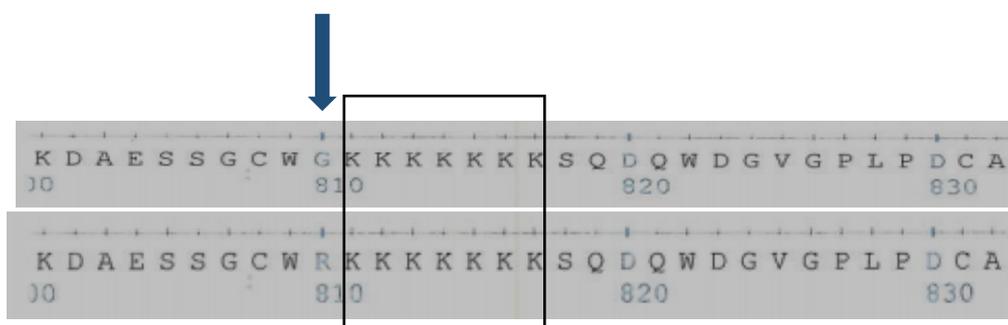


Figure 12 : **Position de la mutation dans la séquence de NPRAP.**

La mutation G810R, une glycine à la place d'une arginine dans la position 810, est localisée en amont de la séquence polyK, qui débute à la position 811.

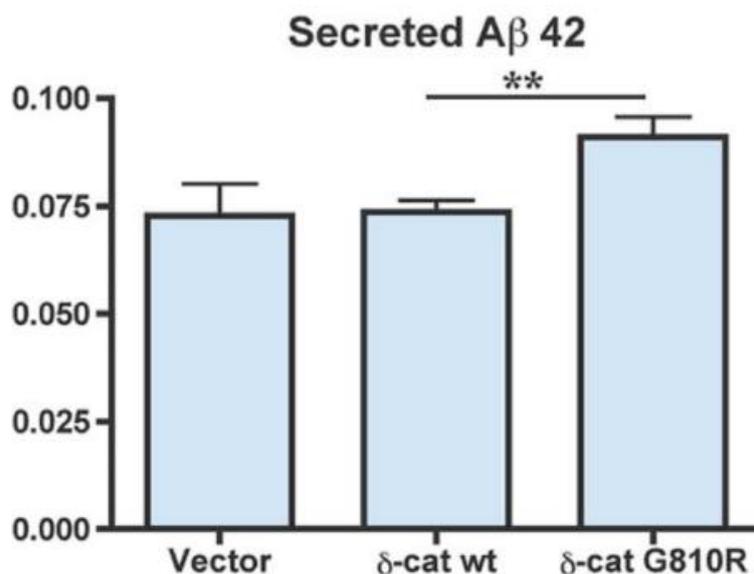


Figure 13 : **Production du peptide Aβ42 par NPRAP (δ-caténine).**

Le graphique montre une augmentation significative de la production du peptide peptide Aβ42 par NPRAP G810R ($p=0.02$), comparé à NPRAP wild-type (sauvage) (Jun et al., 2012).

1.9 Butyrylcholinestérase

La neurotransmission cholinergique dépend de l'hydrolyse du neurotransmetteur Acétylcholine (ACh) par les cholinesterases, butyrylcholinestérase (BuChE), présent dans une plus petite quantité et acetylcholinestérase (AChE), la plus abondante des deux dans le cerveau (Silver, 1974), (S. Darvesh et al., 1998), (Mesulam et al., 2002), (Duysen, Li, Darvesh, & Lockridge, 2007), (Reid, Chilukuri, & Darvesh, 2013).

Butyrylcholinestérase ou pseudocholinestérase est une glycoprotéine tétramérique (Teng, Harpst, Lee, & Zinn, 1976) et une sérine hydrolase qui catalyse l'hydrolyse des esters de choline, comme butyrylcholine, succinylcholine and acetylcholine (Sultan Darvesh, Hopkins, & Geula, 2003). BuChE est localisée dans les neurones de l'hippocampe, l'amygdale, thalamus et du cortex cérébral et dans les cellules neurogliales (Silver, 1974) (S. Darvesh et al., 1998) (Mesulam et al., 2002) (Sultan Darvesh & Hopkins, 2003). L'immunoréactivité de Butyrylcholinestérase a été détecté dans toutes les régions du cerveau humain (Brimijoin & Hammond, 1988) et dans la maladie d'Alzheimer BuChE est retrouvé dans la matière grise corticale souvent absente dans un cerveau sain (Sultan Darvesh, 2013).

On n'observe pas des défauts physiologiques dans des souris invalidées pour le gène de BuChE (B. Li et al., 2007) et des individus avec le gène silencieux de BuChE peuvent vivre normalement (Manoharan, Boopathy, Darvesh, & Lockridge, 2007). BuChE compense l'activité de l'AChE comme observé dans une étude avec des souris nullizygotes avec perte total de fonction de l'AChE, où BuChE était capable de remplacer l'activité de l'AChE et permettre le fonctionnement de la transmission cholinergique normale de la jonction neuromusculaire (Xie et al., 2000).

Une augmentation de l'activité de BuChE a été observée dans le cortex cérébral et l'hippocampe atteint par la maladie d'Alzheimer, ce qui pourrait contribuer à la progression de la maladie, déjà caractérisée par une perte de la transmission cholinérgique (E. Perry & Perry, 1978) (K. E. Perry et al., 1978) (E. K. Perry, 1980), (Court & Perry, 1991), (Geula & Mesulam, 1995), (Ciro, Park, Burkhard, Yan, & Geula, 2012) (Sultan Darvesh, 2013).

Darvesh et al., ont observé dans la matière grise de cerveau humain non pathologique que en présence et aussi en absence de plaques amyloïdes, le niveau d'activité de BuChE est très faible voir absent (Sultan Darvesh, 2013). Cependant, dans le cerveau humain Alzheimer, présentant des plaques amyloïdes, le niveau de BuChE est très élevé, comme observé dans la figure 14 (Sultan Darvesh, 2013). BuChE donc joue un rôle important dans le développement de la maladie d'Alzheimer et serait un meilleur marqueur de la pathologie Alzheimer que la présence d'amyloïde dans le cerveau, ainsi que, une meilleure cible thérapeutique pour la maladie d'Alzheimer (Giacobini, 2003) (Sultan Darvesh, 2013) (Sultan Darvesh, 2016).

Le polymorphisme plus connu du gène de BuChE touche le codon 539 (alanine à la place d'une thréonine), appelé la variante K de BCHE (BCHE-K) qui diminue de 30% la concentration moléculaire de BCHE wild-type (Bartels et al., 1992). Cette variante BCHE-K a été signalé comme une forme qui augmente la susceptibilité à la forme sporadique de la maladie d'Alzheimer en synergie avec l'allèle apoE4 (Lehmann, Johnston, & Smith, 1997) (Lehmann, Williams, Mcbroom, & Smith, 2001) (Z. Wang et al., 2015). Cependant, ces résultats sont contredits par d'autres études (Yamamoto, Yasuda, Mori, & Maeda, 1999), (O'Brien et al., 2003), (Arcaya et al., 2000).

Butyrylcholinestérase s'associe à l'amyloïde et pourrait jouer un rôle dans l'agrégation des peptides dans le cerveau atteint par la maladie d'Alzheimer (Morán, Mufson, & Gómez-Ramos, 1993) (Sultan Darvesh et al., 2012). Une étude a suggéré que BCHE interagit avec les peptides A β et participe à l'évolution de la forme bénigne à une forme maligne de ceux-ci (Guillozet, Smiley, Mash, & Mesulam, 1997). BChE est présente entre 48 et 70% dans les plaques amyloïdes de cerveau de singes rhésus mais l'AChE est présente entre 24 et 34% (Sani et al., 2003). Une étude a suggéré, cependant, que BuChE pourrait s'associer au peptide amyloïde- β (A β) neurotoxique et retarder leur formation et agrégation in vitro (Diamant et al., 2006). De plus, BuChE s'associe aux enchevêtrements neurofibrillaires dans le cortex cérébrale atteint par la maladie d'Alzheimer (Carson, Geula, & Mesulam, 1991) (Gómez-Ramos, Bouras, & Morán, 1994).

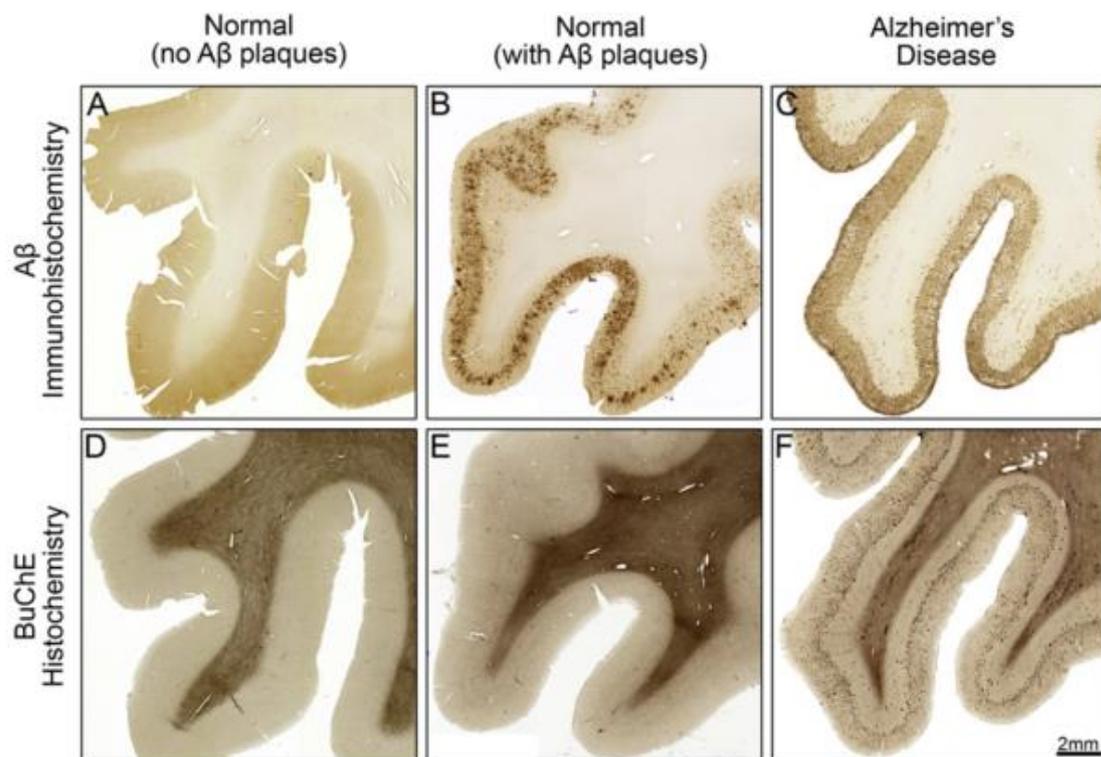


Figure 14 : **Marquage de Butyrylcholinestérase et plaques amyloïdes dans le cortex orbitofrontal non pathologique et pathologique.**

L'absence (A) ou présence (B) de plaques amyloïdes dans la matière grise de cerveaux non pathologiques sont caractérisées par une très faible activité et/ou absence de Butyrylcholinestérase (D et E). La maladie d'Alzheimer est caractérisée par une activité élevée de Butyrylcholinestérase (F) dans la matière grise associée aux plaques amyloïdes (C) (Sultan Darvesh, 2013).

1.10 Synaptophysine

La communication entre les neurones est nécessaire pour le bon fonctionnement du cerveau et cela est possible par des synapses chimiques et électriques (Pereda, 2014). La synapse chimique est caractérisée par la libération de neurotransmetteur par des terminaisons pré-synaptiques dans la fente synaptique et détection de celui-ci par une cellule adjacente (terminal post-synaptique) (Pereda, 2014). De façon intéressante, la maladie d'Alzheimer est caractérisée par une perte synaptique dans l'hippocampe et le néocortex (Eliezer Masliah, Terry, DeTeresa, & Hansen, 1989) (Scheff & Price, 1993) (Scheff et al., 1996). Des études sur des cerveaux humains post-mortem ont montré une perte de 45% de l'immunoréactivité de la synaptophysine dans le cortex frontal et pariétal (E Masliah, Terry, Alford, DeTeresa, & Hansen, 1991), 54 % dans le cortex temporal et 77% dans l'hippocampe (Honer, Dickson, Gleeson, & Davies, 1992), 20-43% dans l'hippocampe et 33-42% dans le cortex entorhinal (Heinonen et al., 1995) de patients atteints par la maladie d'Alzheimer par rapport au contrôle. La synaptophysine est une glycoprotéine d'environ 38kDa avec 4 domaines transmembranaires hydrophobes, un domaine C et N-terminal cytoplasmique, localisée dans les vésicules présynaptiques de tous les neurones et cellules endocrines (Wiedenmann & Franke, 1985) (Rehm, Wiedenmann, & Betz, 1986) (Südhof et al., 1987). La synaptophysine est exprimée à un niveau élevé pendant la synaptogenèse, et est un marqueur de la synaptogenèse (Fletcher, Cameron, De Camilli, & Banker, 1991). Elle est localisée dans les axones dès le début de leurs différenciations (Tarsa & Goda, 2002). Elle est synthétisée dans le réticulum endoplasmique et transloquée par la suite vers les zones de synapses dans des vésicules (Wiedenmann & Franke, 1985).

Les vésicules synaptiques sont des organelles des terminaux nerveux qui accumulent des neurotransmetteurs. Par l'excitation du terminal nerveux, les vésicules synaptiques subissent l'exocytose dépendante du calcium, libérant ainsi les neurotransmetteurs (Fykse et al., 1993).

Dans ce contexte, la protéine de 38kDa peut se lier au calcium par son domaine cytoplasmique, ainsi que former des complexes homo-oligomères liés par des forces non-covalentes ou des ponts disulfures qui pourraient fonctionner comme un canal d'ions pour la libération des neurotransmetteurs (Wiedenmann & Franke, 1985), (Rehm et al., 1986), (Thomas et al., 1988), (Johnston & Südhof, 1990), (Gincel & Shoshan-Barmatz, 2002). De

plus, la surexpression de synaptophysine a augmenté la libération de neurotransmetteur chez les synapses neuromuscular de *Xenopus* (Alder, Kanki, Valtorta, Greengard, & Poo, 1995).

La fonction de synaptophysine dans la libération des neurotransmetteurs a été remise en question par une étude qui n'a pas observée un changement de la transmission synaptique lors de la délétion du gène de la synaptophysine chez des souris (McMahon et al., 1996) (Eshkind & Leube, 1995).

Des études ont également suggéré que Synaptophysine joue des rôles dans la formation des synapses (Tarsa & Goda, 2002), biogénèse (Thiele, Hannah, Fahrenholz, & Huttner, 2000) et l'endocytose des vésicules synaptiques (Kwon & Chapman, 2011) (Daly & Ziff, 2002), le recyclage et la formation des vésicules synaptiques (Spiwox-Becker et al., 2001). La synaptophysine joue aussi un rôle dans la stabilisation des synapses après phosphorylation des sérines (Tarsa & Goda, 2002). SYN est phosphorylée dans le domaine C-terminal par les deux sérine/thréonine et tyrosine kinases dans la terminason nerveuse ce qui pourrait être important pour sa fonction (Rubenstein, Greengard, & Czernik, 1993) (Evans & Cousin, 2005).

Des analyses post-mortem du niveau de synaptophysine dans des cerveaux d'individus atteints par la maladie d'Alzheimer ont démontré un niveau réduit dans l'hippocampe comparé à des contrôles (Sze et al., 1997). La réduction de synaptophysine dans l'hippocampe (figure 15) est fortement liée aux troubles de mémoire chez les patients atteint par la maladie d'Alzheimer à début précoce (Sze et al., 1997).

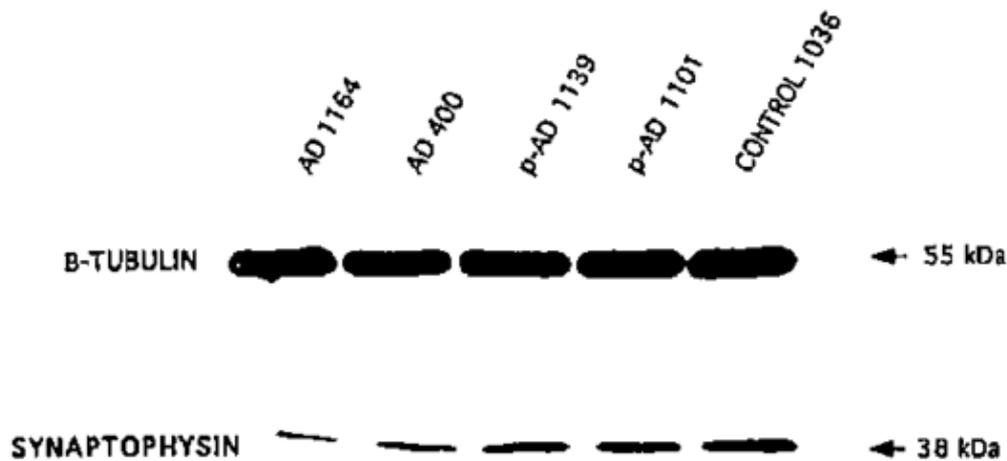


Figure 15 : **Diminution de Synaptophysine dans la maladie d'Alzheimer.**

Immunoblots de Syn et β -tubuline (contrôle positif) dans les membranes synaptiques de l'hippocampe chez des patients Alzheimer (AD) et Alzheimer précoce (p-AD). On observe une diminution de la Syn comparé au contrôle (1036) (Sze et al., 1997).

D'une manière intéressante, des patients atteints de la schizophrénie ont démontré un niveau bas de synaptophysine (Egbujo, Sinclair, & Hahn, 2016) (Eastwood, Burnet, & Harrison, 1995) (Vawter, Howard, Hyde, Kleinman, & Freed, 1999). De plus, la *Primary Progressive Aphasia* (PPA), caractérisée par une perte de la capacité du langage et causée par une démence frontotemporale présente les mêmes types de dommages cérébraux de la maladie d'Alzheimer à début précoce, comme les plaques amyloïdes et les enchevêtrements neurofibrillaires (<https://www.alzheimersresearchuk.org>) (Kertesz, 2002). Récemment, une étude a démontré que cette condition présente une perte synaptique, par la diminution de l'immunoreactivité de la protéine synaptophysine dans le cortex cérébrale (Lippa & Rosso, 2012).

De manière très intéressante, au sein du laboratoire, grâce à des images d'immunofluorescence dans des cellules SH-SY5Y, nous avons aussi mis en évidence un effet de synergie entre PS1 et NPRAP qui induit une augmentation du niveau de synaptophysine. En effet, NPRAP seul ne semble pas moduler l'expression de SYN. Cette augmentation n'est visible que lorsque PS1 et NPRAP sont présents (figure 16).

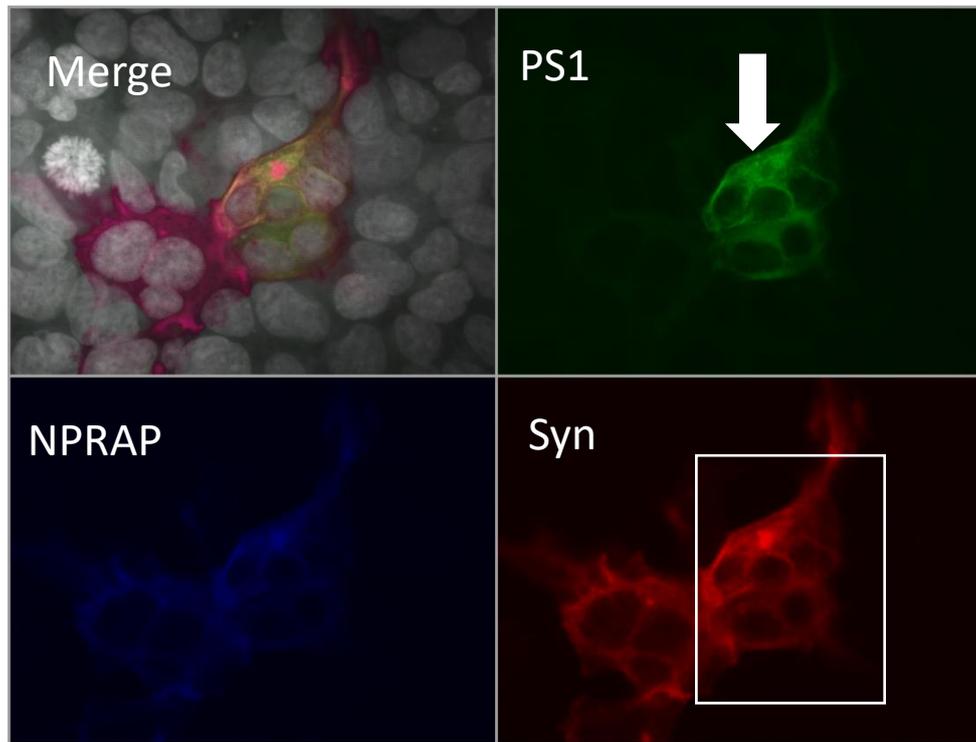


Figure 16 : **Immunofluorescence de NPRAP, PS1 et Syn dans des cellules SH-SY5Y.** On observe une augmentation de l'expression de Syn (rouge) en présence de NPRAP (bleu). Cependant, en présence de PS1 (vert, flèche blanche) on observe un potentiel effet de synergie sur l'induction de l'expression de Syn (carré blanc) (microscopie confocale-collection du laboratoire).

1.11 Hypothèse et Objectifs

Certaines mutations de la protéine PS1 augmentent le clivage de APP par γ -sécrétase et augmentent, par conséquent, la fabrication du peptide A β . Ces mutations sont connues pour causer une forme très agressive de la maladie d'Alzheimer. Cependant, APP n'est pas le seul substrat de PS1, il y en a d'autres dans la cellule comme par exemple, la protéine Notch. Ainsi, malgré que l'hypothèse de la cascade amyloïde domine la recherche sur la maladie d'Alzheimer, il est tout de même important d'explorer l'interaction de protéines à travers le domaine de la biologie des synapses afin de déterminer s'il y a une voie moins étudiée qui augmenteraient la perte synaptique et neuronale dans la MA.

Il a déjà été démontré que NPRAP est un partenaire neuronal de PS1. NPRAP agit comme un modulateur de transcription de plusieurs gènes et de manière intéressante, réprime l'expression de BuChE. La maladie d'Alzheimer est caractérisée par une augmentation du niveau de BuChE, qui provoque une diminution du niveau d'Acétylcholine et ainsi, une augmentation des troubles cognitifs.

Au sein du laboratoire il a été observé que NPRAP et PS1 semblent avoir un potentiel effet d'induction de l'expression de Synaptophysine dans les cellules neuronales SH-SY5Y. Synaptophysine est un marqueur de la synaptogenèse et régule la formation des synapses dans les neurones qui sont sensibles à la neurodégénérescence dans la maladie d'Alzheimer et provoque une communication synaptique moins efficace.

On suppose donc un lien fonctionnel entre ces protéines et un possible effet des mutations NPRAP G810R, PS1 L392V et PS2 M146L sur ces voies métaboliques.

Ces informations ont mené donc à l'hypothèse que PS1 et NPRAP sont importantes pour le maintien de l'intégrité neuronale, *via* synaptophysine et butyrylcholinestérase.

Pour vérifier cette hypothèse, deux objectifs ont été mis en place :

- Objectif 1: Étude de la régulation de l'expression de BuChE et SYN par NPRAP et PS1 au niveau protéique (Western Blot) et ARN (RT-PCR) dans des cellules HEK-293 et SH-SY5Y.
- Objectif 2 : Étude de la régulation au niveau cellulaire de l'expression de BuChE et SYN par NPRAP et PS1 (Immunofluorescence) dans des cellules HEK-293 et SH-SY5Y.

Chapitre 1 : Matériel et Méthodes

2.0 Plasmides

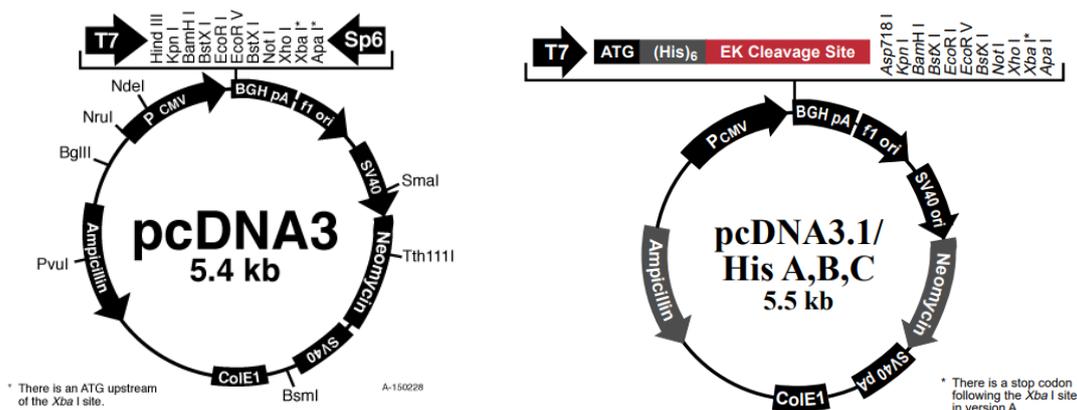


Figure 17 : Schémas des plasmides utilisés lors des transfections.

Le plasmide pcDNA3 contient les gènes de PS1 sauvage et mutant (M146L et L392V) et le plasmide pcDNA3.1/His A contient les gènes de NPRAP sauvage et NPRAP G810R (Images provenant de Invitrogen®).

Les plasmides d'expression pcDNA3 et pcDNA3.1 codant pour Préséniline 1 et NPRAP, respectivement ont été préparés au laboratoire du Dr Georges Lévesque (figure 17). L'agent de sélection de ces plasmides est l'ampicilline. Ces plasmides ont été ensuite utilisés pour des transfections dans les cellules HEK293 et SH-SY5Y.

2.1 Transformation bactérienne

La transformation est une technique réalisée afin d'intégrer les plasmides fusionnés aux protéines dans les bactéries *Escherichia coli* (*E coli*) pour amplifier le matériel génétique d'intérêt.

Pour cela, 100ng d'ADN d'intérêt (plasmides) sont mis dans un eppendorff avec 50ul de souche DH5α de la bactérie *E coli* pendant 30 minutes sur glace. Ensuite, l'ADN va pouvoir entrer dans la bactérie par un choc thermique de 30s à 42°C et 2 minutes sur glace. Par la suite, le mélange est dilué dans 950ul de milieu LB (Lysiology Broth, 10g/L tryptone, 5g/L Extrait de levure, 5g/L de NaCl) et incubé pendant 1 heure à 37°C sous agitation pour

permettre l'expression du gène de résistance à l'antibiotique du plasmide. Après l'incubation, les pré-cultures sont étalées sur des boîtes de pétri contenant du LB-Agar (Lysioyeny Broth, 10g/L tryptone, 5g/L Extrait de levure, 5g/L de NaCl, 15g Agar) et supplémenté par la concentration d'antibiotique adéquate, dans ce cas, l'Ampicilline à une concentration de 75mg/mL. Les plaques de pétri sont ensuite incubés *overnight* à 37°C.

2.2 Extraction de l'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique est ensuite extrait selon deux protocoles commerciaux Qiagen® :

- QIAprep®Spin Miniprep Kit (250) qui peut purifier entre 5 à 15 ug d'ADN plasmidique à partir de la cellule bactérienne dans 1.5mL de milieu LB.
- QIAfilter™ Plasmid Midi Kit (25) qui peut purifier de 20 à 100 ug d'ADN plasmidique à partir de cellule bactérienne dans 50-100mL de milieu LB.

Ces techniques permettent la lyse de la cellule bactérienne et la purification de l'ADN à l'aide d'une membrane de silice.

Des mini-cultures (4ml) de milieu LB supplémenté en antibiotique correspondant (voir tableau 2) sont préparées à partir d'une colonie de bactérie d'intérêt et placés dans un incubateur à 37°C sous constante agitation (230rpm), *overnight* (16-18h). Le lendemain, l'ADN plasmidique est extrait à l'aide du QIAprep®Spin Miniprep Kit.

Tableau 2 : Liste des antibiotiques pour la préparation des cultures bactériennes

Plasmide	Gène	Antibiotique	Gène de résistance	Concentration finale
PcDNA3.1/His A 5.5 kb	NPRAP wild-type	Ampicilline	<i>Amp</i>	75mg/mL (1000X)
PcDNA3.1/His A 5.5 kb	NPRAP G810R	Ampicilline	<i>Amp</i>	75mg/mL (1000X)
PcDNA3 5.4 kb	PS1 wild-type	Ampicilline	<i>Amp</i>	75mg/mL (1000X)
PcDNA3 5.4 kb	PS1 L392V	Ampicilline	<i>Amp</i>	75mg/mL (1000X)
PcDNA3 5.4 kb	PS1 M146L	Ampicilline	<i>Amp</i>	75mg/mL (1000X)
pEGFP-N1 4.7 kb	GFP	Kanamicine	<i>Kan</i>	50mg/mL (1000X)

Deux échantillons de 1.5mL du milieu de culture sont pipetés dans un eppendorff vide et centrifugés pendant 1 minute à 13 000 rpm (16 000xg – Desaga Sarstedt-Gruppe MC2®). Ensuite, le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu avec 250ul de tampon P1 froid. Après, 250ul du tampon P2 de lyse est ajouté et la solution est mélangée complètement par inversion de 4 à 6 fois, jusqu'à ce que la solution devienne complètement bleu. Par la suite, 350ul de tampon de neutralization N3 et la solution est mélangée immédiatement par inversion de 4 à 6 fois jusqu'à ce que le bleu disparaisse et que la solution devienne trouble et sans couleur. Après, la solution est centrifugée 10 minutes à 13 000 rpm (16 000xg – Desaga Sarstedt-Gruppe MC2®) et le surnageant est versé dans le QIAprep spin column, qui contient une membrane de silice qui permet l'adsorption de l'ADN plasmidique. La QIAprep spin column est centrifugée 60s et le liquide restant est éliminé. Après, 750ul de tampon PE est ajouté pour laver la QIAprep spin column et encore une fois centrifugé 60s à 13 000 rpm (16 000xg – Desaga Sarstedt-Gruppe MC2®). Le liquide restant est jeté et le QIAprep spin column est centrifugé encore une fois pour 1 minute pour assurer la complète élimination du tampon à 13 000 rpm (16 000xg – Desaga Sarstedt-Gruppe MC2®). L'ADN est enfin élué avec de l'eau MQ, après 1 minute en repos et centrifugation de 1 minute à 13 000 rpm (16 000xg – Desaga Sarstedt-Gruppe MC2®).

Tableau 3 : Composition des techniques de QIAprep®Spin Miniprep Kit (250) et QIAfilter™ Plasmid Midi Kit (25)

Tampon	Composition
Tampon de resuspension P1	50mM Tris-Cl, pH 8,0, 10mM EDTA, 100µg/ml Rnase A + LyseBlue® - pH indicator dye 1000x).
Tampon de lyse P2	200mM NaOH, 1% SDS (p/v)
Tampon de neutralisation P3	3,0M acétate de potassium pH 5,5
Tampon d'équilibration QBT	750mM NaCl, 50mM MOPS, pH 7,0, 15% isopropanol (v/v), 0,15% Triton X-100 (v/v)
Tampon de lavage QC	1,0M NaCl, 50mM MOPS, pH 7,0, 15% isopropanol (v/v)
Tampon d'élution QF	1,25M NaCl, 50mM Tris-Cl, pH 8,5, 15% isopropanol (v/v)
Tampon de Neutralisation N3	Composition confidentielle
Tampon PE	Composition confidentielle

2.3 Vérification des vecteurs

L'ADN plasmidique extrait est ensuite digéré par une enzyme de restriction spécifique (Tableau 4) et les produits de digestion sont analysés par migration sur gel d'agarose 1% % (1 gramme d'agarose dans 100mL de tampon TAE 1X (40mM Tris.acetate, 2mM Na₂EDTA.2H₂O)) est préparé avec 5ul de Redsafe™ Nucleic Acid Staining Solution dans 100mL (dilué 20 000x) pour visualiser l'ADN sous la lumière UV.

Tableau 4 : Liste des enzymes de restriction utilisées pour la digestion des plasmides

Plasmide	Gène	Enzyme de Restriction	Taille des fragments d'ADN
PcDNA3 5.4 kb	Vecteur vide	NcoI	735,1366 et 3345pb
PcDNA3 5.4 kb	PS1 wild-type	EcoRI	2110pb
PcDNA3 5.4 kb	PS1 M146L	BamH1 et Xho1	1860pb
PcDNA3 5.4 kb	PS1 L392V	BamH1 et Xho1	1860pb
PcDNA3.1/His A 5.5 kb	Vecteur vide	NcoI	308,7365,1125 et 3345pb
PcDNA3.1/His A 5.5 kb	NPRAP wild-type	EcoRI	2920pb
PcDNA3.1/His A 5.5 kb	NPRAP G810R	EcoRI	2920pb
pEGFP-N1 4.7 kb	GFP	HindII	879 et 3854 pb

Après, le gel d'agarose 1% est mis dans une machine d'électrophorèse à 100V pendant 20 à 30 minutes, afin de pouvoir séparer les fragments d'ADN. Un tampon de charge 5X (0.25% bleu de bromophénol, 50% glycérol, TAE 1X) est ajouté à l'ADN, pour pouvoir bien déposer l'ADN dans les puits du gel d'agarose. Les échantillons sont posés dans les puits, ainsi qu'un marqueur de poids moléculaires pour identifier la hauteur des bandes d'ADN sur gel. À la suite de l'électrophorèse, le gel est révélé dans le Molecular Imager® Gel Doc™ XR System (Biorad). Les fragments d'ADN coupés par les enzymes de restriction utilisés pendant la digestion enzymatique sont observés en forme de bande noir sur le gel. Une fois l'identité du vecteur confirmée, le restant de mini-culture est utilisé pour réaliser une culture de bactéries dans un plus grand volume (50-100mL). L'ADN plasmidique est ensuite extrait à l'aide du QIAfilter™ Plasmid Midi Kit. Pour la midi-préparation, des cultures de 100mL de milieu LB et 100ul d'antibiotique correspondant (voir tableau X) et l'ADN d'intérêt sont incubés dans un erlenmeyer *overnight* (16-18h) à 37°C sous constante agitation (230 rpm).

Le lendemain, le contenu de l'erlenmeyer est versé dans un petit contenant et centrifugé 15 minutes à 4800 rpm (4147 x g) à 4°C (Allegra™21R Centrifuge, rotor S4180 – Beckman Coulter™). Ensuite, le milieu LB est jeté et le culot est resuspendu avec 4mL de tampon P1 froid. Après, 4mL de tampon P2 est ajouté et la solution est mélangée par inversion de 4 à 6 fois jusqu'à ce que la solution devienne bleu. La solution est incubée 5 minutes à TP et après 4mL du tampon de neutralisation P3 est ajouté et le bleu disparaît en

mélanger en inversant 4 à 6 fois. La formation d'un précipitat blanc est observé dans la solution. Le système QIAFilter cartridge est préparé et un bouchon est inséré sur le QIAfilter midi et la solution est ajoutée et le tout est incubé 10 minutes à TP.

Pendant ce temps, 4mL de tampon QBT est ajouté dans le QIAGEN-Tip 100 et on attend que la colonne se vide. Après l'incubation le bouchon du système est enlevé et un piston de seringue est inséré dans le QIAfilter et le contenu est filtré dans le QIAGEN-Tip. Le système est lavé deux fois avec 10mL de tampon QC. Ensuite, l'ADN est élué avec 10mL de tampon QF dans un falcon vide. Ensuite, 7mL d'isopropanol est ajouté et centrifugé immédiatement à 13 000 rpm (14 737 x g) à 4°C (Allegra™21R Centrifuge, rotor F0630 – Beckman Coulter™). Après la centrifugation, le surnageant est jeté et le culot est lavé avec 500ul d'éthanol 70% sans mélanger et centrifugé 5 minutes à 4°C à 13 000 rpm (15 700 x g) pendant 30 minutes (Eppendorff®Centrifuge 5415R). Finalement, le surnageant est jeté et le culot sec est resuspendu dans 50 à 100ul d'eau MQ, selon la taille du culot. L'ADN plasmidique obtenu est quantifié par spectrophotomètre (mesure de la densité optique de l'ADN à 260nm) puis utilisé pour réaliser les transfections. Le spectrophotomètre est calibré avec de l'eau MQ avant la lecture et ajusté selon le facteur de dilution d'intérêt.

Un volume de 2ul d'ADN est mélangé à 98ul d'eau MQ et placé dans une cuvette de quartz et inséré dans la machine pour effectuer la lecture de la concentration d'ADN en mg/ml.

2.4 Culture Cellulaire

Au cours de cette étude, deux lignées cellulaires ont été utilisées : la lignée HEK-293 (cellules de rein embryonnaire humaine) et la lignée SH-SY5Y (Neuroblastome humaine) (<https://www.atcc.org>) pour étudier la surexpression de protéines à l'aide des vecteurs d'expression détaillés précédemment.

2.5 Conditions de culture

Les cellules HEK293 et SH-SY5Y sont cultivées dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂ dans du DMEM/high-glucose (HyClone™) supplémenté avec 10% de sérum de croissance bovin (HyCLone™) dans une plaque de pétri de 10cm ou plaques 6 puits.

Le passage des cellules à confluence était réalisé à chaque 2 jours. Sous la hotte biologique, avec des pipettes stériles, les cellules étaient lavées avec du PBS (Phosphate Buffered Saline

1X, HyClone) et décollées de la plaque à l'aide de trypsine (TrypLE™Express gibco®) Ensuite, le mélange cellule/trypsine est resuspendu dans le milieu de culture et mis dans l'incubateur.

2.6 Transfection des vecteurs

Les transfections permettent d'introduire les vecteurs d'expression d'intérêt contenant des protéines fusionnées dans la lignée cellulaire choisie, dans ce cas HEK293 et SH-SY5Y. Ainsi, les protéines (fusionnées) d'intérêt sont exprimées par la cellule transfectée et comme ces vecteurs possèdent un promoteur en amont du gène de la protéine d'intérêt, elles sont surexprimées. Afin d'analyser le lien fonctionnel entre différentes protéines, les co-transfections (voir figure 18) ont été préparées selon le protocole commercial de jetPRIME® pour la lignée HEK293 et par la technique au CaCl₂/Phosphate pour la lignée SH-SY5Y. Différents contrôles de transfection sont utilisés : le plasmide pEGFP-N1, comme contrôle positif de transfection, des cellules non-transfectées et le vecteur vide, pour évaluer l'effet de transfection.

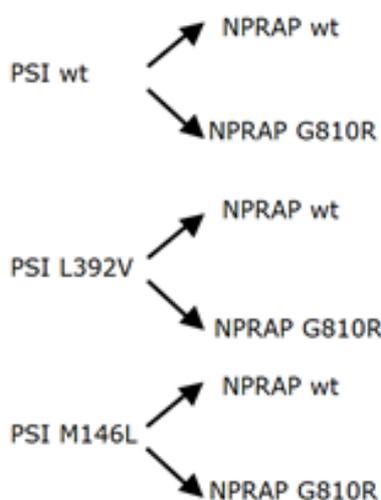


Figure 18 : **Schéma représentatif des transfections effectuées entre les plasmides de PS1 sauvage, PS1 M146L, PS1 L392V, NPRAP sauvage et NPRAP G810R.**

Transfections réalisées afin d'analyser le niveau d'expression endogène des protéines Syn et BuChE dans des cellules HEK-293 et SH-SY5Y.

Pour réaliser les transfections des cellules HEK293, 10µg ou 5µg (si co-transfection) d'ADN sont dilués dans 500ul de jetPRIME® buffer dans un falcon® de 15mL, puis vortexés 10 secondes et rapidement centrifugés (Eppendorff®Centrifuge 5702) à 1200 rpm

(0,2 x g) à température ambiante. Ensuite, 20ul de jetPRIME® reagent est ajouté, vortexé 10s et la solution est incubé à TP pour 10 minutes. La solution est ensuite versée goutte à goutte dans la plaque de pétri de 10 cm contenant les cellules à 60-80% de confluence et le milieu de culture. Les plaques de pétris sont incubées 48h à 37°C sous 5% de CO₂.

Pour réaliser les transfections des cellules SH-SY5Y (tableau 5), 2µg ou 1ug (si co-transfection) d'ADN sont dilués dans 40ul de TE 1X (EDTA 1mM, Tris 10mM), 250ul de CaCl₂ 0.5M et de l'eau stérile pour 250ul total. Ce mélange est ensuite versé goutte à goutte dans une solution de 250ul de HEBS 2X (NaCl 0.28M, HEPES 0.05M, Na₂HPO₄ 1.5mM - pH 7,05) et incubé pendant 30 minutes à température pièce. La solution est ensuite versée goutte à goutte dans la plaque de pétri de 10 cm contenant les cellules à 60-80% de confluence et le milieu de culture. Les plaques sont ensuite incubées à 37°C sous 5% de CO₂ et après 5 heures le milieu de culture est remplacé par un milieu de culture normal (sans les solutions de la transfection) et par la suite sont incubées jusqu'à 48h à 37°C sous 5% de CO₂.

Tableau 5 : Composants utilisés pour la transfection au CaCl₂ dans des pétris 10 cm et dans des plaques 6 puits

Composants	Pétri de 10cm	Pétri de 6 puits
Solution 1	500uL HEBS 2X	100uL HEBS 2X
Solution 2	40uL TE1X	8uL TE1X
	ADN (5ug ou 10ug)	ADN (1ug ou 2ug)
	Eau Milli-Q Filtrée (qs 250uL)	Eau Milli-Q Filtrée (qs 50uL)
	250uL de CaCl ₂	50uL de CaCl ₂

2.7 Extraction protéique

Après 48h de transfection, les cellules transfectées sont rincées au PBS1X afin d'enlever toute trace de sérum bovin, décollées de la plaque de pétri avec la trypsine et centrifugées (Eppendorff®Centrifuge 5702) pendant 5 min à 1500 rpm (0,4 x g). Le culot cellulaire est ensuite resuspendu avec du tampon de lyse Sten (50mM Tris pH 7.6, 150mM

NaCl, 2mM EDTA, 0.2% NP-40, 0.5% Triton + 1 pastille de complete Roche® pour 10mL). Les échantillons sont incubés dans la glace pendant 30 minutes puis lysés mécaniquement dans un dounce qui brise les cellules et libère leurs contenus). Le contenu du dounce est ensuite transféré dans un nouvel eppendorff et centrifugé 15 min à 13000rpm (15 700 x g) (Eppendorff Centrifuge 5415R) à 4°C puis conservés à -20°C jusqu'à la réalisation de l'immuno-buvardage.

2.8 Immunobuvardage du type Western Blot

Dans un premier temps, la concentration de chaque extrait protéique (surnageant) est déterminée à l'aide de la méthode de dosage colorimétrique de Bradford (Bradford, 1976). Cette technique permet le dosage colorimétrique impliquant la liaison du colorant Bleu de Coomassie G-250 (Bio-Rad Protein Assay-Dye reagent concentrate) avec les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et avec les résidus hydrophobique d'acides aminés composants les protéines. Ainsi, lorsque le colorant se lie à une protéine, il est converti en forme stable non-protonée de couleur bleue et la mesure se fait à une absorbance de 595 nm grâce à une courbe standard de BSA 10mg/mL 100X de concentration connue. La lecture de l'absorbance est effectuée sur la machine InfiniteF200 (Tecan). Afin de vérifier l'expression des protéines en étude (PS1, NPRAP, BuChE et Syn), les protéines sont d'abord migrées dans du gel SDS-PAGE (tableau 6) à l'aide d'un courant électrique pour être par la suite soumises à la technique d'immunobuvardage du type Western Blot et enfin, identifiées selon leur poids moléculaire. Initialement, les extraits protéiques (voir section 2.7) sont mélangés à un tampon de chargement laemmli - beta-mercaptoéthanol 6X (375Mm Tris HCl ph 6.8 ; 50% glycérol 100% ; 3% SDS 10% ; 0.1% bleu de bromophénol ; 15% 2-mercapto 14.3M). Par la suite, un marqueur de poids moléculaire (Precision Plus Protein™Dual Xtra Standards Bio-Rad) et chaque échantillon est chargé puis migrés dans un gel de polyacrylamide SDS-PAGE 10% (tableau avec composition – réactifs ; gel de séparation (lower) %/quantité ; gel d'entassement (upper)) afin de les séparer selon leurs poids moléculaires. L'appareil à l'électrophorèse est rempli par un tampon de migration 1X (tampon 10X : 29g Tris ; 144g Glycine ; 10g SDS dans 1L d'eau) et la migration est réalisée à 125V pour environ 1h30 (figure 19).

Tableau 6 : Recette des gels de polyacrylamide SDS-PAGE 10%

Gels de polyacrylamide SDS-PAGE 10%	
Lower Gel (Gel de Séparation)	Upper Gel (Gel d'entassement)
Lower Buffer 4X (1.5M Tris-HCl pH 8.8, 0.4% SDS)	Upper Buffer 4X (0.5M Tris-HCl pH 6.8, 0.4% SDS)
10% Acrylamide-Bis-Acrylamide 29 :1	6% Acrylamide-Bis-Acrylamide 29 :1
0.15% APS	0.15% APS
0.1% TEMED	0.1% TEMED

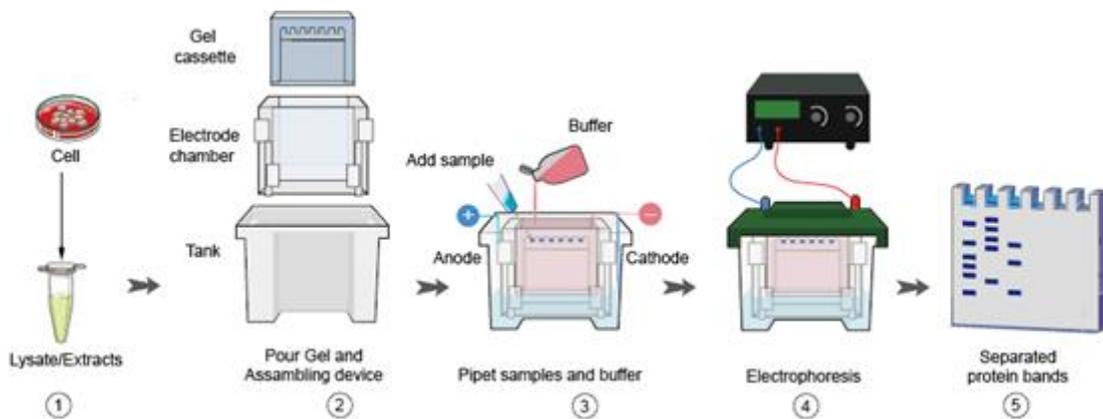


Figure 19 : **Étape de migration en Western Blot.**

Afin de vérifier l'expression des protéines par la technique de Western Blot, celles-ci sont tout d'abord lysées en utilisant un tampon de lyse (1). Le gel de migration SDS-PAGE est inséré dans une boîte en plastique avec des électrodes (anode et cathode), le tampon de migration, et les échantillons sont *loadés* dans chaque puit du gel (2 et 3). La migration est réalisée par électrophorèse (4). La migration est réalisée à 125V pour environ 1h30. Les protéines sont identifiées selon leurs poids moléculaire (image adaptée de <https://www.creative-diagnostics.com>).

Après la migration, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (polyvinylidene fluoride) précédemment humidifiée 30 secondes dans du méthanol et ensuite, 30s dans de l'eau MQ. Pour le transfert humide, un 'sandwich' est préparé et mis à l'intérieur d'une cassette de transfert (BioRad) selon l'ordre suivante à partir de son côté noir : une éponge, un premier papier filtre, le gel de polyacrylamide, la membrane de PVDF, un deuxième papier filtre, et enfin une dernière éponge. Pour éviter la présence de bulles un

petit rouleau est passé délicatement sur le gel et la membrane de PVDF. La cassette est finalement insérée dans une boîte de transfert avec un bloc de glace et le tampon de transfert (25mM Tris ; 200mM glycine, 20% méthanol) et le transfert est réalisé à 400mA pendant 1 heure ou à 150mA *overnight*, à 4°C (figure 20). Après le transfert, les membranes sont retirées du ‘sandwich’ et sont trempées rapidement dans du TBS-Tween (TBS-Tween (50mM Tris ; 150mM NaCl ; 0.05% Tween®20) et après, dans une solution de Ponceau S (0.5% Ponceau S, 1% acide acétique) afin de bien confirmer le transfert des protéines. Ensuite, les membranes sont lavées avec de l’eau. Par la suite, les membranes sont soumises à une étape de blocage dans 10ml d’une solution de TBS-Tween contenant 5% de lait en poudre pendant 1 heure à TP et sous agitation légère, pour blocage des sites de liaison non spécifiques sur la membrane.

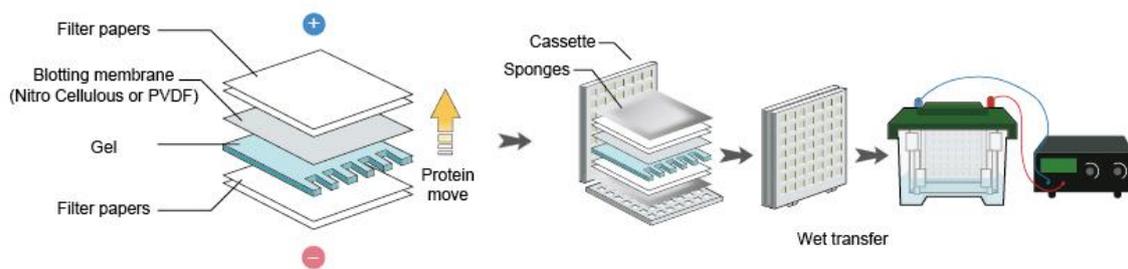


Figure 20 : **Étape de transfert en Western Blot.**

Après la migration, le gel SDS-PAGE est transféré dans une membrane de PVDF (polyvinylidene fluoride) précédemment humidifiée 30 secondes dans du méthanol et ensuite, 30s dans de l’eau MQ. Pour le transfert humide, un ‘sandwich’ est préparé et mis à l’intérieur d’une cassette de transfert (BioRad), avec du tampon de transfert, selon l’ordre suivante à partir de son côté noir : une éponge, un premier papier filtre, le gel de polyacrylamide, la membrane de PVDF, un deuxième papier filtre, et enfin une dernière éponge. La cassette est finalement insérée dans une boîte de transfert avec un bloc de glace et le tampon de transfert (25mM Tris ; 200mM glycine, 20% méthanol) et le transfert est réalisé à 400mA pendant 1 heure ou à 150mA *overnight*, à 4°C (image adaptée de <https://www.creative-diagnostics.com>).

Après l’étape de blocage, la dernière étape est un marquage immunologique (figure 21). Les membranes sont incubées *overnight* à 4°C, sous agitation légère, dans une solution de 10ml de SuperBlock®Blocking Buffer in PBS (Thermo Scientific) et l’anticorps primaire (tableau 7), dilué selon la concentration recommandée par la compagnie, qui reconnaît la protéine d’intérêt. Le lendemain, les membranes sont lavées trois fois pendant 10 minutes dans du TBS-Tween sous agitation plus élevée, afin d’enlever des interactions non-spécifiques (bruit de fond). L’anticorps secondaire (tableau 7) couplé à une enzyme HRP (horseradish peroxidase) détecte les chaînes lourdes de l’anticorps primaire spécifique et les

protéines immobilisées sur la membrane sont détectées par chemiluminescence à l'aide des réactifs d'électrochimiluminescence ECL, qui réagissent à la présence de HRP couplé à l'anticorps secondaire. Finalement, pour détecter les protéines, les membranes sont incubées dans 10ml d'une solution contenant l'anticorps secondaire dilué dans du TBS-Tween lait 5%, en présence de Spretactine (Biorad), dilué 1 :20 000, pendant 1 heure à TP sous agitation légère. À la fin de l'incubation, les membranes sont lavées trois fois pendant 10 minutes dans du TBS-Tween et après, révélées avec le kit ECL (mélange 1 :1 des solutions A et B). Les membranes sont incubées 2 min dans le mélange et ensuite sont placée dans une cassette d'exposition et exposée le temps nécessaire pour visualiser les protéines. Le temps d'exposition peut varier de 8s à 5 min.

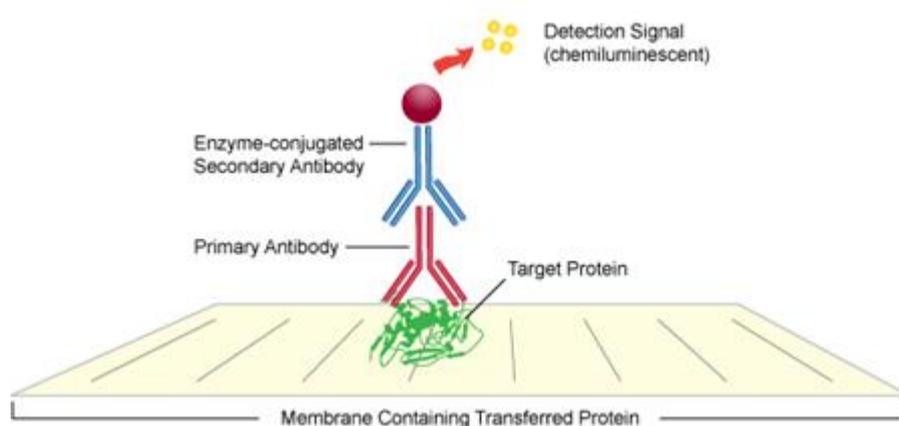


Figure 21 : **Détection des protéines.**

Un anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt est dirigé contre cette protéine que l'on souhaite détecter, sur la membrane. Un anticorps secondaire couplé à une enzyme HRP (horseradish peroxidase) détecte les chaînes lourdes de l'anticorps primaire spécifique et les protéines immobilisées sur la membrane sont détectées par chemiluminescence à l'aide des réactifs d'électrochimiluminescence (image adaptée de <https://www.elabscience.com>).

Tableau 7 : Liste des anticorps utilisée en Western Blot

Anticorps Primaire	Description	Dilution	Anticorps Secondaire	Dilution
α -PS1 Ab14	Anticorps polyclonal de lapin (Collection du laboratoire)	1 :2000	α -IgG de lapin HRP (Santa Cruz sc-2004)	1 :10000
α -NPRAP	Anticorps monoclonal de Souris (Santa Cruz sc-81793)	1 :2000	α -IgG chèvre anti souris HRP (Santa Cruz sc-2005)	1 :10000
α -Syn	Anticorps polyclonal de lapin (Abcam Ab14692)	1 :2500	α -IgG de lapin HRP (Santa Cruz sc-2004)	1 :10000
α -BuChE	Anticorps polyclonal de lapin (LSBIO LS-B7912)	1 :2000	α -IgG de lapin HRP (Santa Cruz sc-2004)	1 :10000
α -GAPDH	Anticorps monoclonal de Souris (Calbiochem 6C5)	1 :40000	α -IgG anti souris HRP (Santa Cruz sc-2005)	1 :20000

2.9 Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

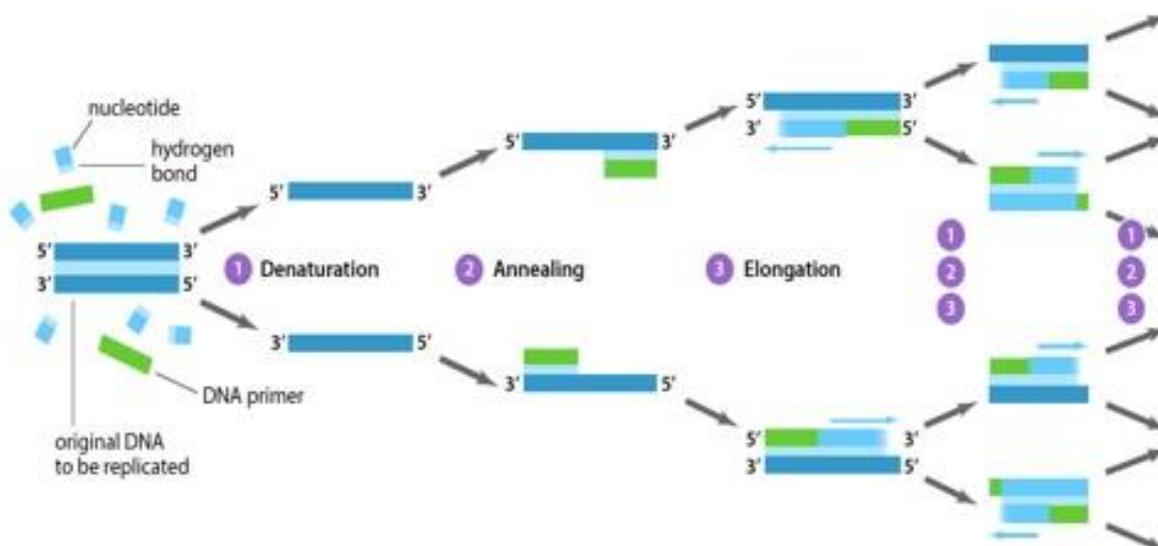


Figure 22 : Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR).

L'étape 1, de dénaturation, permet de dénaturer l'ADN double brin en simple brin. L'étape suivante d'hybridation (annealing) (2) aux amorces de s'hybrider aux ADN grâce à une température favorable et spécifique. La dernière étape (3), permet aux enzymes (polymérases) de synthétiser le brin complémentaire à l'ADN simple brin à partir de dNTPs libres dans le milieu réactionnel. Ces trois étapes sont répétées de 30 à 40 fois, selon la quantité d'ADNc nécessaire (Image tirée de <http://www.quora.com>).

2.9.1 Extraction de l'ARN au TRizol®Reagent

À la suite de la transfection (voir section 2.6) de cellules HEK 293T, le milieu des puits est aspiré et 1mL de TRizol®Reagent est ajouté pour isoler l'ARN total des cellules. Ensuite, le mélange est transféré dans un tube. Après une incubation de 5 minutes à TP pour permettre la dissociation complète des complexes nucléoprotéines, 50ul de Chloroforme 100% est ajoutée. Le tout est mélangé vigoureusement par inversion pendant 15 sec et est incubé pendant 2 à 3 minutes à TP. Ensuite, le tout est centrifugé (Eppendorff Centrifuge 5415R) à 13 000 rpm (15 700 x g) pendant 15 minutes à 4°C, afin de permettre la séparation de mélange en trois phases distinctes : la phase aqueuse transparente contenant l'ARN, l'interphase blanche contenant l'ADN et la phase rose contenant le TRizol®Reagent. La phase aqueuse est minutieusement transférée dans un autre tube et 125ul d'isopropanol 100% est ajoutée pour précipiter l'ARN et le tout est mélangé vigoureusement par inversion pendant 15 sec. Par la suite, la solution est incubée 10 minutes à TP et après est centrifugé (Eppendorff Centrifuge 5415R) à 13 000 rpm (15 700 x g) pendant 15 minutes à 4°C. Après la centrifugation, le surnageant est jeté et le culot est lavé avec 500ul d'éthanol 70%. Suite au lavage, le mélange est encore une fois centrifugé à 13 000rpm (15 700 x g) pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est jeté et le culot est séché à TP entre 5 et 15 minutes. Finalement, le culot est resuspendu dans 50ul d'eau.

2.9.2 Gel d'agarose, électrophorèse

Suite à l'extraction de l'ARN, les échantillons sont quantifiés au spectrophotomètre pour vérifier la qualité de l'ARN sur gel d'agarose 1%. Le gel d'agarose est préparé avec du Redsafe™ Nucleic Acid Staining Solution. Le spectrophotomètre est calibré avec de l'eau MQ avant la lecture et ajusté selon le facteur de dilution d'intérêt. Un volume de 2ul d'ARN est mélangé à 98ul d'eau MQ et placé dans une cuvette de quartz et inséré dans la machine pour effectuer la lecture de la concentration d'ARN en ug/ml.

Après la quantification, le gel est déposé dans une boîte d'électrophorèse avec du tampon TAE 1X (fait à partir du tampon TAE 50x – 121g Tris, 28.6ml d'acide acétique glacial, 50ml EDTA 0.5M pour un volume de 500ml) et 20uL des échantillons sont déposés dans les puits du gel avec 5uL de tampon de chargement (12.5% ficoll dans TAE 5x, bleu bromophénol) en présence d'un marqueur de poids moléculaire 1Kb (Invitrogen 1 Kb Plus DNA Ladder) afin de vérifier la position de chaque bande sur gel.

La migration est réalisée à 100V, pendant 20 minutes. A la fin de la migration, le gel est révélé et la qualité est vérifiée par la présence de trois bandes distinctes représentant les sous-unités 5S, 18S et 28S de l'ARN ribosomal. L'ARN peut être stocké à -20°C.

2.9.3 Transcription inverse (RT)

L'ARN simple brin est converti en l'ADNc simple brin à partir de l'ARN extrait (voir section 2.9.1), pour être utilisé postérieurement dans l'étape de Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR). La méthode (Abm®) commence par l'activation de la DNase par une incubation de 2 minutes à 42°C dans un Thermal Cycler C1000 Touch (Biorad) de 2 µg d'ARN (selon la quantification de l'ARN), 2 µl de AccuRT Reaction Mix (4X) et x µl de Nuclease-free H₂O (pour un volume total de 8 µl). Par la suite, 2 µl de AccuRT Reaction Stopper (5X) sont ajoutés au mélange pour arrêter la réaction de la DNase, suivi d'une incubation à 65°C pendant 5 minutes et sont déposés 1 minute sur glace.

Par la suite, les produits suivants sont ajoutés au mélange : 4 µl de 5X RT Buffer, 1 µl de Oligo(dT) (10 µl) ou Oligo spécifique, 1 µl de dNTPs Mix (10 nM), 0.5 µl de RNaseOFF, Ribonuclease Inhibitor (40U/µl), 1 µl de EasyScript® RTase (200U/µl) et x µl de Nuclease-free H₂O (pour un volume total de 20 µl). Puis la méthode se poursuit par l'incubation du mélange à 25°C pendant 10 minutes, à 42°C pendant 50 minutes et pour inactiver la réaction 85°C pendant 5 minutes. L'ADNc obtenu peut être conservé à 4°C.

2.9.4 Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

La Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) (figure 22) permet l'amplification de l'ADNc des gènes d'intérêt produit à partir de l'ARN, grâce à une couple d'amorce (*forward et reverse*) spécifique à cette ADNc. La réaction de PCR est effectuée en prenant en considération la température d'hybridation (T_m) des amorces spécifiques (tableau 8 et 9) et, généralement, la T_m retenue est la plus basse entre les deux. Pour calculer la T_m approximative, la relation suivante est utilisée pour chaque amorce: $(A + T) * 2 + (C + G) * 4$ (A : nombre d'adénines; T : nombre de thymidines; G : nombre de guanines; C : nombre de cytosines). Le temps d'extension est calculé en fonction de la longueur du produit de PCR attendu, généralement de 30 sec/Kb.

Un PCR de Bêta-actine est effectué avec les amorces P613 (forward) et P614 (reverse), comme un contrôle positif interne.

Le mélange comprend: 2 ul d'ADNc, 2ul d'amorce forward (0.4µM), 2ul d'amorce reverse (0.4µM), 2 ul de dNTPs (10nM) 200uM each, 1 ul de MgCl2 (50 mM), 2 (ou 4 ul) de DMSO, 1 ul de Phusion DNA Polymerase (concentration finale 0.02 U/µL), 10ul 5X Phusion GC Buffer (contient 1.5 mM MgCl2) (concentration finale 1X) et Eau Milli-Q (qs pour volume total de 50ul).

Tableau 8 : Séquences des amorces utilisés pour la PCR

Numéro de l'amorce	Séquence de l'amorce 5'-3'	Gène amplifié
P6	GGTCATCCATGCCTGGCTTA	PS1-728 F
P11	TTTACTCCCCITTCCTCTG	PS1-1388 R
P267	CAGTTGGCTCTTCAGTGGGTTC	BuChE-F598
P268	TGAAGCCAGGAGCACCATAGACT	BuChE-R1096
P147	CATCTGTGGGCCGTGCTGG	GT24 (NPRAP)- 1441R
P152-A	AGCTCCCGGCCGAGGCACA	GT24 (NPRAP)- 559F
P206	TTCTTTGTCACCGTGGCCGT	Syn-332F
P207	TAGCCTTGCTGCCCATAGTC	Syn-913R
P613	ATCGTGCGTGACATTAAGGA	β-actine-812F
P614	GAAGCATTGCGGTGGACGA	β-actine-1317 F

Tableau 9 : Températures d'hybridation des amorces utilisés en PCR

Numéro de l'amorce	Température d'hybridation	Longueur du fragment
P6	57°C	660pb
P11		
P267	65°C	498pb
P268		
P147	55°C	882pb
P152		
P206	57°C	581pb
P207		
P613	61°C	505pb
P614		

Programme de l'appareil PCR pour amplifier le gène PS1 : Dénaturation initiale : 98°C - 4min, 30 cycles, Dénaturation : 98°C - 10s, Hybridation des amorces : 57°C - 30s, Élongation : 72°C - 20s, Extension finale : 72°C - 10min.

Programme de l'appareil PCR pour amplifier le gène BCHE : Dénaturation initiale : 98°C - 4min, 30 cycles, Dénaturation : 98°C - 10s, Hybridation des amorces : 65°C - 30s, Élongation : 72°C - 30s, Extension finale : 72°C - 10min.

Programme de l'appareil PCR pour amplifier le gène SYN : Dénaturation initiale : 98°C - 4min, 30 cycles, Dénaturation : 98°C - 10s, Hybridation des amorces : 57°C - 15s, Élongation : 72°C - 30s, Extension finale : 72°C - 10min.

Programme de l'appareil PCR pour amplifier le gène GAPDH : Dénaturation initiale : 98°C - 4min, 30 cycles, Dénaturation : 98°C - 30s, Hybridation des amorces : 61°C - 30s, Élongation : 72°C - 35s, Extension finale : 72°C - 10min.

Programme de l'appareil PCR pour amplifier le gène NPRAP : Dénaturation initiale : 98°C - 4min, 30 cycles, Dénaturation : 98°C - 10s, Hybridation des amorces : 55°C - 15s, Élongation : 72°C - 30s, Extension finale : 72°C - 10min.

À la fin de la réaction, 20ul de l'ADN amplifié est déposé sur gel d'agarose 1.5% avec 5ul de tampon de chargement en présence d'un marqueur de poids moléculaire 1Kb (Invitrogen 1 Kb Plus DNA Ladder) afin de vérifier la position de chaque bande sur gel.

2.10 Immunofluorescence

L'immunofluorescence est utilisée pour détecter et visualiser une ou plusieurs protéines au niveau intracellulaire ou membranaire grâce à un anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt. Ce dernier est ensuite révélé par l'intermédiaire d'un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome et dirigé spécifiquement contre l'anticorps primaire (voir figure 23). Le marquage est ensuite observé au microscope à fluorescence.



Figure 23 : **Marquage en immunofluorescence.**

L'anticorps primaire reconnaît spécifiquement la protéine d'intérêt. L'anticorps secondaire, marqué par un fluorochrome est dirigé contre l'anticorps primaire. Le marquage est ensuite observé au microscope à fluorescence (image adaptée de <http://www.abcam.com>).

Les cellules SH-SY5Y sont cultivées (vois section 2.4 et 2.5) sur des plaques 6 puits avec des lamelles 22mmx22mm au fond des puits. Les transfections sont réalisées d'après le protocole de CaCl₂ (voir section 2.6). Après 48h, le milieu de culture est aspiré et les cellules sont rincées deux fois au PBS 1X (Phosphate Buffered Saline 1X, HyClone) puis fixées dans une solution de méthanol-acétone (3 Volume de Méthanol pour 7 Volume d'acétone) durant 20 min à - 20 °C. Les cellules sont ensuite à nouveau rincées deux fois avec 1mL de PBS1X et incubées durant 10 min avec 1mL de PBS1X pour réhydrater les cellules. Par la suite, les sites de fixation non spécifiques sont bloqués dans une solution de blocage (100µl PBS1X, 0.1% Saponine, 2% BSA) durant 30 min à température pièce. Les cellules sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire (tableau 10) dilué dans 100µl de PBS1X, 0.1% Saponine, 2% BSA pendant 1 heure à température pièce. Les cellules sont ensuite rincées deux fois avec

1 mL de PBS1X. Les cellules sont ensuite à nouveau incubées à l'obscurité avec l'anticorps secondaire (tableau 10) dilué dans 100µl de PBS1X, 0.1% Saponine pendant 1 heure à température pièce. Les cellules sont ensuite à nouveau rincées deux fois avec 1 mL de PBS1X. Pour préserver le signal de fluorescence les cellules sont incubées avec 100µl de Slow Fade Gold anti-fade (1:2) à l'obscurité pendant 10 min à température pièce. Par la suite, la solution est aspirée et les lamelles avec les cellules sont ensuite montées délicatement à l'envers sur des lames avec une goutte de Dapi Fluoromount-G, pour marquer le noyau des cellules. Les lames sont mises à sécher durant 24 heures à l'obscurité à température pièce.

Tableau 10 : Liste des anticorps utilisé en Immunofluorescence

Anticorps Primaire	Description	Dilution	Anticorps secondaire	Dilution
α -PS1	Anticorps primaire, polyclonal de Chèvre (Santa Cruz N-19, sc-1245)	1 :50	α -IgG d'âne anti-chèvre (AlexaFlour® 680)	1 :1000
α -NPRAP	Anticorps primaire, monoclonal de Souris (Santa Cruz sc-81793)	1 :200	α -IgG d'âne anti-souris (AlexaFlour® 555)	1 :1000
α -SYN	Anticorps primaire, polyclonal de lapin (Abcam Ab14692)	1 :200	α -IgG d'âne anti-lapin (AlexaFlour® 480)	1 :1000
α -BuChE	Anticorps primaire, polyclonal de lapin (LSBIO LS-B7912)	1 :200	α -IgG d'âne anti-lapin (AlexaFlour® 480)	1 :1000

2.11 Analyses statistiques

La quantification des membranes de Western Blot et des gels de PCR ont été faites en utilisant le software Image J. Les analyses statistiques ont été faites à l'aide du logiciel Graph Pad Prism (version 6.0). Les données ont été évaluées par le test d'analyse de la variance, One-way ANOVA (test de Kruskal-Willis), suivie du post test de Dunn's. Les résultats présentés représentent la moyenne de chaque transfection réalisée pour chaque traitement \pm SEM et le seuil de signification statistique a été fixé à $p < 0.05$.

Chapitre 2 : Résultats

3.0 Analyse protéique

Nous avons préalablement démontré dans notre laboratoire que les protéines PS1 et NPRAP interagissent fortement (Levesque et al., 1999), (Koutras & Lévesque, 2011) et possèdent un potentiel effet de synergie sur l'induction de l'expression de Syn ainsi que NPRAP réprime BuChE.

Notre point de départ pour répondre à l'hypothèse du projet fut l'exécution des essais de transfections cellulaires sur des cellules embryonnaires de rein humains 293 (HEK-293), où nous avons mis en place les conditions de Western Blot et RT-PCR. Afin d'avoir un exemple de cellule neuronale nous avons postérieurement réalisé les transfections cellulaires dans des cellules dérivées de neuroblastome de la moelle osseuse, les SH-SY5Y.

Pour un premier essai, en utilisant la méthode JetPrime®, nous avons co-transfecté des cellules HEK-293 les vecteurs PS1 sauvage et NPRAP sauvage, PS1 sauvage et NPRAP G810R, PS1 M146L et NPRAP sauvage, PS1 M146L et NPRAP G810R, PS1 L392V et NPRAP sauvage et finalement PS1 L392V et NPRAP G810R. Nous avons répété l'expérience 5 fois, afin d'avoir un *n* total de 6 expériences différentes.

Nous avons exécuté les mêmes transfections pour les cellules SH-SY5Y, en utilisant la technique de CaCl₂. Nous avons également répété l'expérience 2 fois, afin d'avoir un *n* total de 3 expériences différentes.

Pour ces transfections, PS1 et NPRAP mutantes résultent d'une substitution d'acide aminé. La mutation M146L provient du remplacement d'une Méthionine à la position 146 à la place d'une Leucine et L392V provient du remplacement d'une Leucine à la position 392 à la place d'une Valine. La mutation de NPRAP résulte du remplacement d'une glycine à la position 810 à la place d'une Arginine.

Les contrôles de transfection utilisés sont le vecteur vide PcDNA3 5.4kb, pour vérifier l'effet de transfection, un vecteur vide portant le gène de GFP, pour vérifier si la transfection a fonctionné (figure 24 et 25) et des cellules non transfecté, comme contrôle positif pour vérifier l'expression endogène des protéines. Après la transfection, les protéines ont été extraites et quantifier par la technique de Bradford (voir section 2.8).

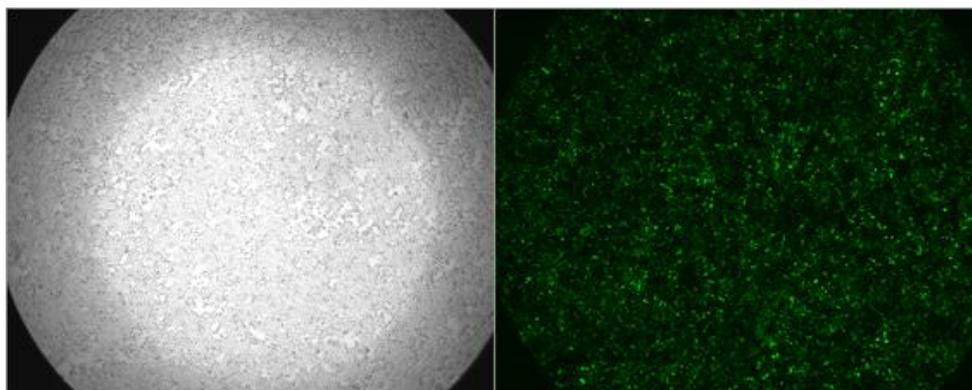


Figura 24 : **Cellules HEK-293** transfectées avec vecteur avec le gène de GFP.
Image de Microscope confocale à fluorescence avec le logiciel SimplePCI©, version 5.1.0.0110, Objective 40x.

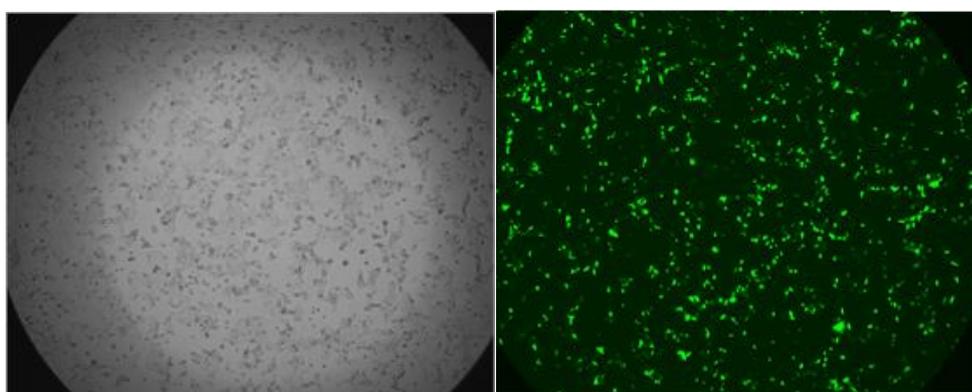


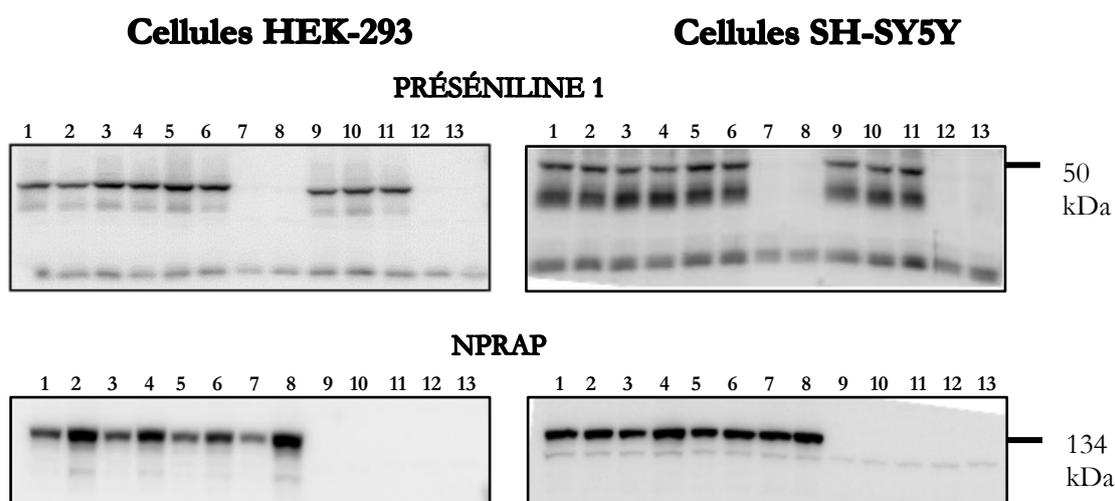
Figura 25 : **Cellules SH-SY5Y** transfectées avec vecteur avec le gène de GFP.
Image de Microscope confocale à fluorescence avec le logiciel SimplePCI©, version 5.1.0.0110, Objective 40x.

Nous avons voulu vérifier donc par Immunobuvardage du type Western Blot (voir section 2.8) si l'interaction entre NPRAP et PS1 modifie le niveau d'expression des protéines Syn et BuChE, en quantifiant les membranes avec des anticorps primaire spécifique (voir tableau 7). Nous avons rapporté tous les résultats de Syn et BuChE sur les niveaux de GAPDH quantifiés comme contrôle de chargement des protéines.

Afin de vérifier si la co-transfection avait bien fonctionné nous avons réalisé le Western Blot pour les protéines NPRAP et PS1. Nous avons observé que la surexpression de NPRAP et PS1 est bien présente dans les membranes (figure 26 puit 1-6). Nous avons observé également que NPRAP n'est pas exprimée dans les cellules HEK-293 et SH-SY5Y (figure 26, NPRAP - puit 13). Toutefois, nous avons observé au niveau endogène (non transfectée) la présence de PS1 N-terminal et non de la pleine longueur, en situation de

surexpression (voir figure 26, PS1 - puit 13). Dans les membranes de PS1 et NPRAP nous avons observé que en transfectant les protéines isolées en présence de vecteur vide, les bandes apparaissent seulement si la transfection correspond à la protéine quantifiée par Western Blot.

À la suite de la vérification que la transfection avait bien fonctionné, nous avons analysé par Western Blot 15ug de protéines provenant des cellules HEK-293 et SH-SY5Y et nous avons quantifié les membranes de Syn et BuChE.



1	PS1 L392V + NPRAP G810R	8	NPRAP sauvage + V.V.
2	PS1 L392V + NPRAP sauvage	9	PS1 L392V + V.V.
3	PS1 M146L + NPRAP G810R	10	PS1 M146L + V.V.
4	PS1 M146L + NPRAP sauvage	11	PS1 sauvage + V.V.
5	PS1 sauvage + NPRAP G810R	12	Vecteur vide
6	PS1 sauvage + NPRAP sauvage	13	Non Transfectée
7	NPRAP G810R + Vecteur Vide (V.V.)		

Figure 26 : Vérification de l'expression protéique de NPRAP et PS1 par Western Blot après transfection de NPRAP et PS1 sauvages dans les cellules HEK-293 et SH-SY5Y. Les protéines NPRAP et PS1 sont surexprimées dans les cellules HEK-293 et SH-SY5Y. La membrane est quantifiée avec l'anticorps primaire α -PS1 (1: 2000) afin de détecter PS1, dont on observe une bande à 50 kDa et un anticorps primaire α -NPRAP (1 :2000) afin de détecter NPRAP, dont on observe une bande à 134 kDa.

3.0.1 Synaptophysine

Les résultats des analyses de Syn (Figure 27 et 28) nous ont permis de démontrer qu'il y a une faible expression de synaptophysine dans les cellules HEK-293 et une plus forte expression dans les cellules SH-SY5Y. En effet, des bandes de faible et forte intensité apparaissent à 38kDa qui représente Syn dans les HEK-293 et SH-SY5Y, respectivement Figure 27 et 28. Des cellules HEK-293 et SH-SY5Y non transfectées nous servent de contrôle négatif et dans ce cas-ci nous pouvons observer qu'il n'y a une faible détection de l'expression de Syn dans les cellules.

Pour l'analyse des membranes nous avons utilisé le vecteur vide comme point de comparaison entre les échantillons, qui représente l'effet de transfection. Nous n'avons pas observé de différence significative avec les données des cellules non-transfectée (niveau endogène). Cela nous indique aussi que la transfection n'a pas affecté le niveau de synaptophysine dans les cellules.

Le graphique (Figure 27) nous démontre que la transfection des vecteurs seuls avec le vecteur vide (puits 7 à 11) n'influence pas le niveau de Syn, parce qu'on n'observe pas de différence significative par rapport au vecteur vide seul. De plus, nos résultats démontrent qu'il n'y a pas de différences significatives entre les co-transfections de PS1 sauvage et mutante avec NPRAP sauvage et mutante sur le niveau d'expression de Synaptophysine (figure 27 et 28, puits 1 à 6) dans les 2 lignées cellulaires étudiées (HEK-293 et SH-SY5Y). Ces résultats suggèrent que NPRAP et PS1 n'influencent pas le niveau d'expression de Syn dans la cellule.

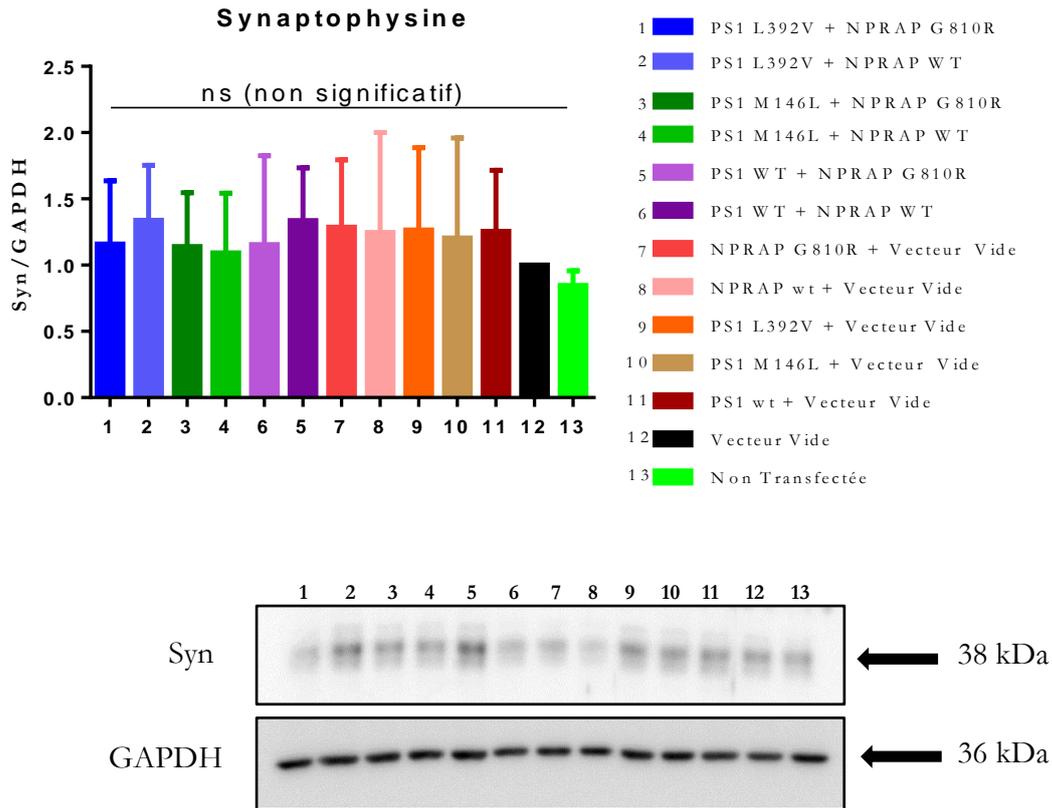


Figure 27 : Vérification de l'expression protéique de Synaptophysine par Western Blot après transfection de NPRAP et PS1 sauvages et mutantes dans les cellules HEK-293.

Étude de l'effet de l'interaction entre PS1 et NPRAP sauvages et mutantes sur le niveau d'expression de la protéine Syn endogène dans les cellules HEK-293 (migrée sur un gel SDS-PAGE 10%). La membrane est quantifiée avec l'anticorps primaire α -Syn (1: 2500) afin de détecter Syn, dont on observe une bande à 38 kDa. Les valeurs obtenues sont normalisées sur le niveau de GAPDH (bande à 36 kDa) et par la suite sur le vecteur vide (point de comparaison des échantillons). Les expériences ont été faites 6 fois.

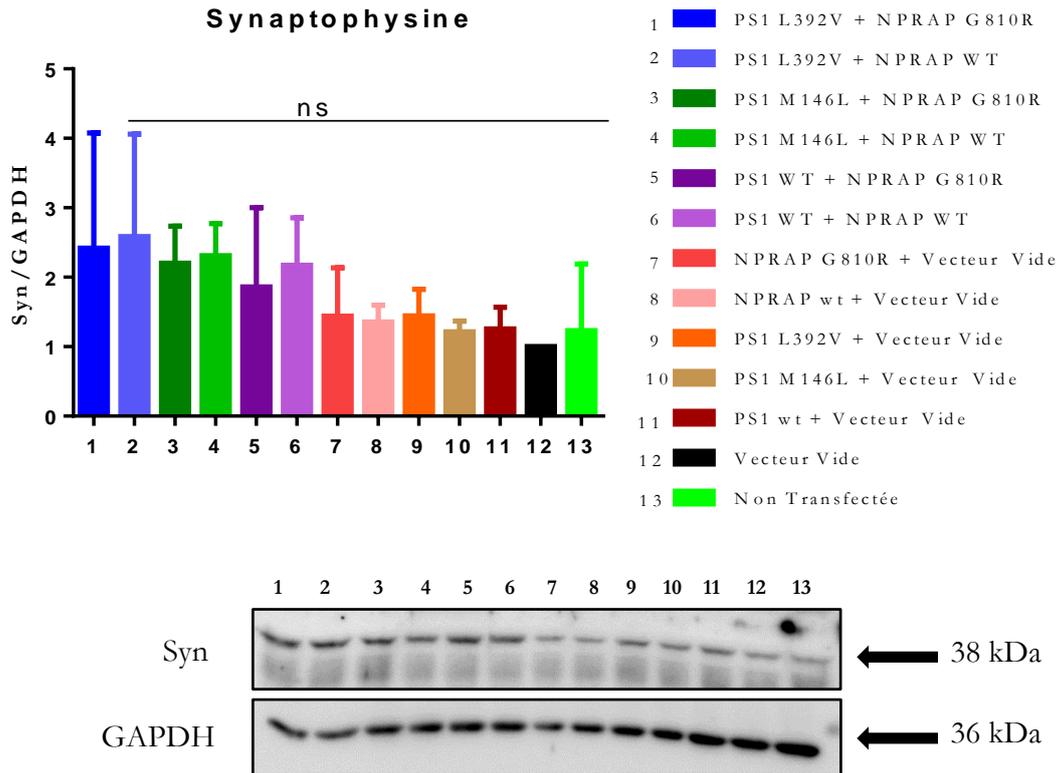


Figure 28 : **Vérification de l'expression protéique de Synaptophysine par Western Blot après transfection de NPRAP et PS1 sauvages et mutantes dans les cellules SH-SY5Y.** Étude de l'effet de l'interaction entre PS1 et NPRAP sauvages et mutantes sur le niveau d'expression de la protéine Syn endogène dans les cellules SH-SY5Y (migrée sur un gel SDS-PAGE 10%). La membrane est quantifiée avec l'anticorps primaire α -Syn (1: 2500) afin de détecter Syn, dont on observe une bande à 38 kDa. Les valeurs obtenues sont normalisées sur le niveau de GAPDH (bande à 36 kDa) et par la suite sur le vecteur vide (point de comparaison des échantillons). Les expériences ont été faites 3 fois.

3.0.2 Butyrylcholinestérase

Les résultats des analyses de BuChE (figure 29 et 30) nous permettent de mettre en évidence une forte expression de butyrylcholinestérase dans les cellules HEK-293 et une plus faible expression dans les cellules SH-SY5Y. En effet, des bandes de faible et forte intensité apparaissent à 66kDa qui représente BuChE dans les HEK-293 et SH-SY5Y, respectivement Figure 29 et 30. Des cellules HEK-293 et SH-SY5Y non transfectées nous servent de contrôle négatif et dans ce cas-ci nous pouvons observer qu'il n'y a une faible détection de l'expression de BuChE dans les cellules SH-SY5Y mais une plus forte expression dans les cellules HEK-293.

Notre contrôle est un vecteur vide et les cellules non transfecté qui montrent les mêmes résultats. Cela nous dit également que l'effet de réaliser la transfection n'a pas affecté le niveau de butyrylcholinestérase dans les cellules.

Le graphique (figure 29) nous démontre que la transfection des protéines seules avec le vecteur vide (puits 7 à 11) n'influence pas le niveau de BuChE, parce qu'on n'observe pas de différence significative par rapport au vecteur vide seul. Nous n'observons pas de différences significatives entre les co-transfections de PS1 sauvage et mutante avec NPRAP sauvage et mutante sur le niveau d'expression de Butyrylcholinestérase. Cependant, dans les cellules SH-SY5Y (figure 30), on observe une différence significative (one way-ANOVA) entre PS1 M146L + Vecteur Vide et PS1 M146L + NPRAP sauvage. De plus, on n'observe pas une différence significative (one way-ANOVA) entre PS1 M146L + Vecteur Vide et Vecteur Vide, ni une différence significative (one way-ANOVA) entre NPRAP sauvage + Vecteur Vide et Vecteur Vide. Cela suggère une possible influence de NPRAP sauvage en présence de PS1 M146L sur le niveau de BuChE. Nos résultats démontrent aussi une différence significative (one way-ANOVA) entre PS1 M146L + NPRAP sauvage et PS1 M146L + NPRAP G810R, mais NPRAP G810R ne semble pas avoir le même effet sur le niveau de BuChE parce qu'il n'y a pas de différence significative entre NPRAP G810R + Vecteur Vide et le Vecteur Vide seul, ni une différence entre PS1 M146L + NPRAP G810R et PS1 M146L + Vecteur Vide.

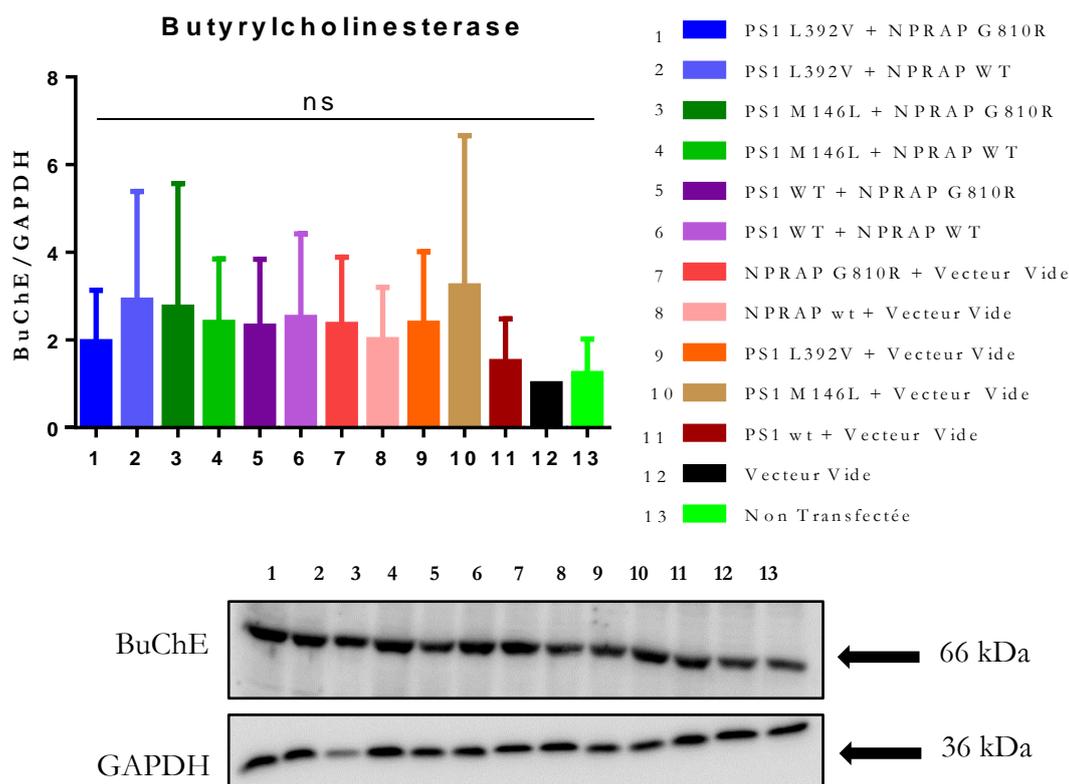


Figure 29 : Vérification de l'expression protéique de Butyrylcholinesterase par Western Blot après transfection de NPRAP et PS1 sauvages et mutantes dans les cellules HEK-293.

Étude de l'effet de l'interaction entre PS1 et NPRAP sauvages et mutantes sur le niveau d'expression de la protéine BuChE endogène dans les cellules HEK-293 (migrée sur un gel SDS-PAGE 10%). La membrane est quantifiée avec l'anticorps primaire α -BuChE (1: 2000) afin de détecter BuChE, dont on observe une bande à 66 kDa. Les valeurs obtenues sont normalisées sur GAPDH (bande à 36 kDa) et par la suite sur le vecteur vide (point de comparaison des échantillons). Les expériences ont été faites 6 fois.

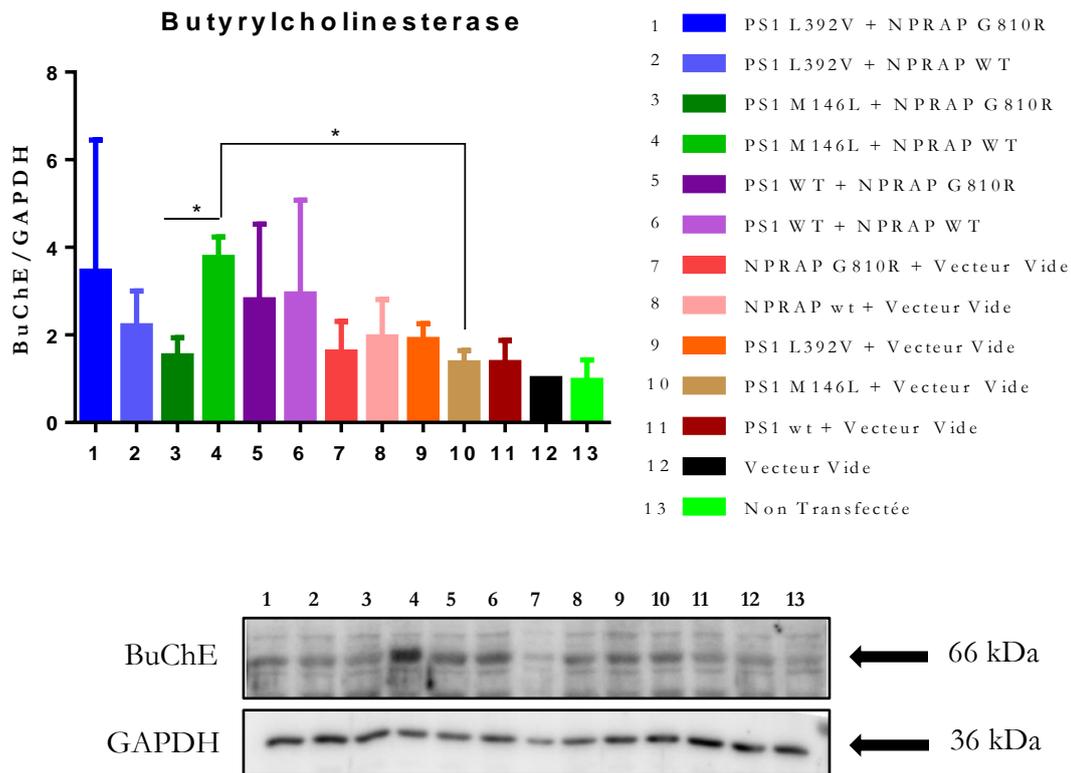


Figure 30 : **Vérification de l'expression protéique de Butyrylcholinestrase par Western Blot après transfection de NPRAP et PS1 sauvages et mutantes dans les cellules SH-SY5Y.**

Étude de l'effet de l'interaction entre PS1 et NPRAP sauvages et mutantes sur le niveau d'expression de la protéine BuChE endogène dans les cellules SH-SY5Y (migrée sur un gel SDS-PAGE 10%). La membrane est quantifiée avec l'anticorps primaire α -BuChE (1: 2000) afin de détecter BuChE, dont on observe une bande à 66 kDa. Les valeurs obtenues sont normalisées sur GAPDH (bande à 36 kDa) et par la suite sur le vecteur vide (point de comparaison des échantillons). Les expériences ont été faites 3 fois.

À la suite des résultats obtenus, nous nous sommes intéressés à vérifier les données obtenues au niveau de l'ARNm.

3.1 Analyse des ARNm

Afin de valider dans notre laboratoire ces premiers résultats obtenus en Western Blot, nous avons étudié l'expression des gènes codant pour les protéines Syn et BuChE. Nous avons effectué une RT-PCR à partir d'ARN extraits des cellules transfectées SH-SY5Y. Les co-transfections ont été exécuté selon la méthode de CaCl₂ avec PS1 sauvage et de NPRAP sauvage, PS1 sauvage et NPRAP G810R, PS1 M146L et NPRAP sauvage, PS1 M146L et

NPRAP G810R, PS1 L392V et NPRAP sauvage et PS1 L392V et NPRAP G810R. Nous avons encore répété l'expérience 2 fois, afin d'avoir un *n* total de 3 expériences différentes.

A l'aide d'amorces spécifiques des gènes codant ces deux protéines, nous avons pu amplifier l'expression de ces deux gènes et obtenir des amplicons aux tailles attendues d'environ 581pb pour Syn et 882pb pour BuChE (figure 31 et 32). Les produits obtenus après RT-PCR ont été vérifiés sur gel d'agarose 1,5%.

Les contrôles de la réaction PCR se retrouvent dans les quatre derniers puits (figures 31 et 32, puits 14-17). Les 2 premiers (puits 14 et 15) contiennent des échantillons d'ARN en absence de l'enzyme RT, pour vérifier une possible contamination d'ADN génomique et la réaction PCR a été effectuée en utilisant les mêmes conditions (voir section 2.9) que dans les autres tubes avec l'enzyme. Le troisième (puits 16) contient une banque de ADNc humain (100ng/ μ l) au lieu de l'ADNc provenant de la RT, pour vérifier si le programme de PCR a fonctionné. La réaction de PCR a été également effectuée en utilisant les mêmes conditions que dans les autres tubes. Le dernier (puits 17) un échantillon contenant de l'eau MQ (blanc) au lieu de l'ARN, pour vérifier une possible contamination de l'eau MQ utilisé dans l'expérience. La réaction de PCR a été également effectuée en utilisant les mêmes conditions que dans les autres tubes. Le contrôle positif pour la RT consiste à prendre l'ADNc nouvellement synthétisé et d'effectuer une réaction PCR dans le but d'amplifier le gène de la β -actine, exprimé de façon ubiquitaire dans la cellule (figures 31 et 32). Ainsi, les résultats de la RT-PCR présentés dans ce projet ont été normalisés par rapport à β -actine.

Nous avons également utilisé le vecteur vide seul comme point de comparaison après ne pas avoir observé une différence significative avec les données des cellules non-transfectées. Cela nous dit également que l'effet de réaliser la transfection n'a pas affecté le niveau de butyrylcholinestérase et synaptophysine dans les cellules.

La bande de faible intensité retrouvée dans le premier puits (figure 31 (1)) représente l'expression endogène de la protéine Synaptophysine dans les cellules SH-SY5Y. On observe que l'expression endogène est plus élevée pour BuChE dans les cellules SH-SY5Y (figure 32 (1)).

Nos résultats démontrent que l'interaction PS1 et NPRAP sauvages et mutantes n'a pas d'effet significatif sur le niveau d'ARN de Syn et BuChE.

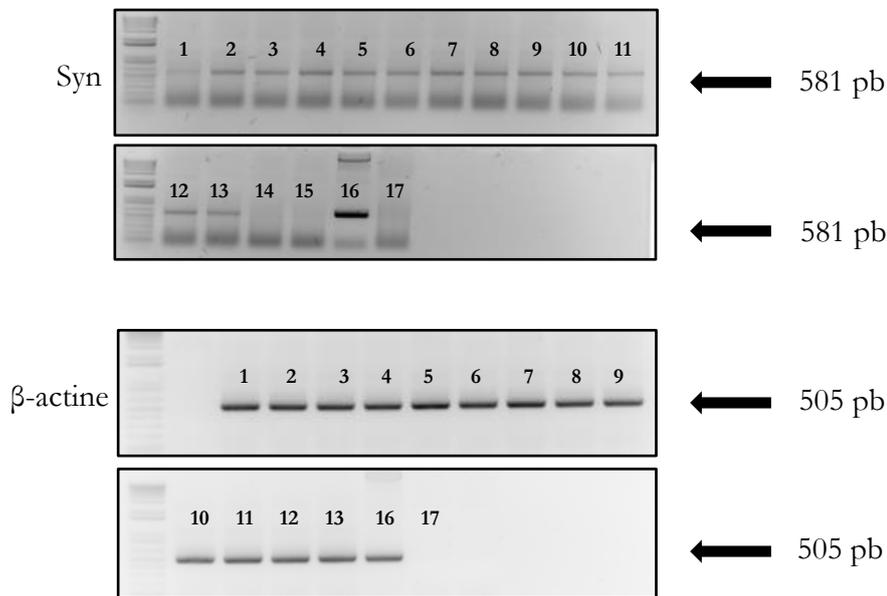
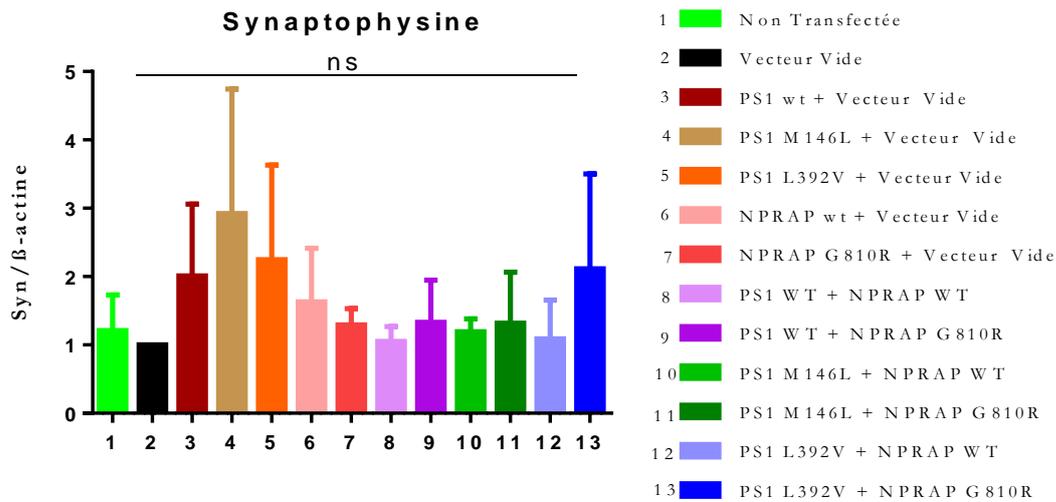


Figure 31 : **Vérification du niveau d'ARNm de Synaptophysine suite à une RT-PCR après transfection de NPRAP et PS1 sauvages et mutantes dans les cellules SH-SY5Y.** Étude de l'effet de l'interaction entre PS1 et NPRAP sauvages et mutantes sur le niveau d'ARNm de Syn dans les cellules SH-SY5Y (migrée sur un gel d'agarose 1,5%). On observe une bande à 581pb qui représente Syn. Les valeurs obtenues sont normalisées sur le niveau de β-actine (bande à 505pb). Puits 1 à 13 : échantillons d'ADNc utilisés pour la RT-PCR de Syn et β-actine (voir graphique). Puits 14 et 15 : contrôles -RT (absence de l'enzyme). Puit 16 : banque d'ADNc humaine. Puit 17 : contrôle avec de l'eau MQ au lieu de l'ADNc. Les expériences ont été faites 3 fois.

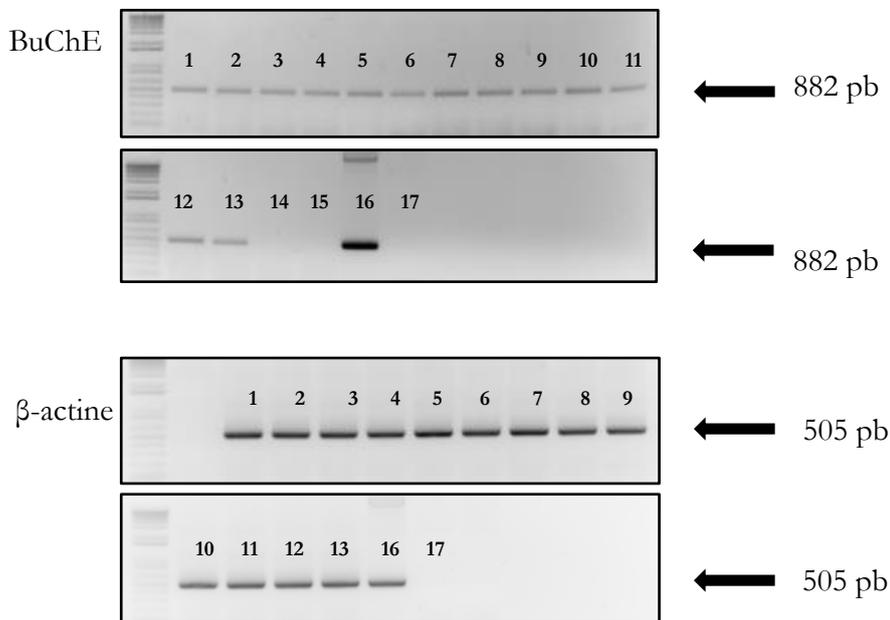
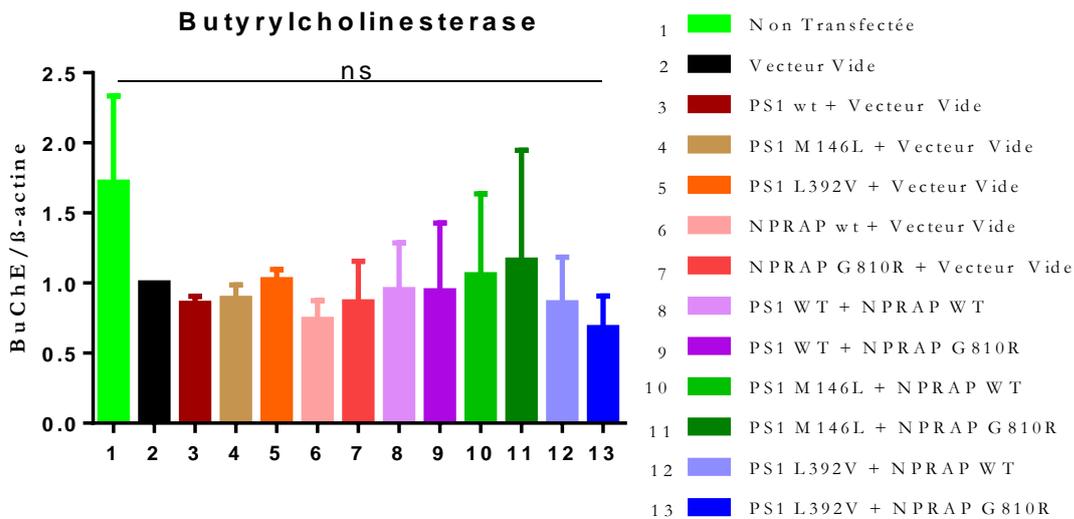


Figure 32 : Vérification du niveau d'ARNm de Butyrylcholinesterase suite à une RT-PCR après transfection de NPRAP et PS1 sauvages et mutantes dans les cellules SH-SY5Y.

Étude de l'effet de l'interaction entre PS1 et NPRAP sauvages et mutantes sur le niveau d'ARNm de BuChE endogène dans les cellules SH-SY5Y (migrée sur un gel d'agarose 1,5%). On observe une bande à 882 pb qui représente BuChE. Les valeurs obtenues sont normalisées sur le niveau de β-actine (bande à 505pb). Puits 1 à 13 : échantillons d'ADNc utilisés pour la RT-PCR de BuChE et β-actine (voir graphique). Puits 14 et 15 : contrôles - RT (absence de l'enzyme). Puit 16 : banque d'ADNc humaine. Puit 17 : contrôle avec de l'eau MQ au lieu de l'ADNc. Les expériences ont été faites 3 fois.

3.2 Analyse à niveau cellulaire

Après les résultats de Western Blot et RT-PCR nous avons voulu vérifier si PS1 M146L, NPRAP G810R et NPRAP sauvage influencent l'expression de synaptophysine et butyrylcholinestérase par immunofluorescence. Nous avons réalisé des transfections de PS1 M146L avec NPRAP G810R et sauvage, selon la technique de CaCl₂ (voir section 2.6). Nous avons également répété l'expérience encore 2 fois, afin d'avoir un n total de 3 expériences différentes.

Pour ce faire, nous avons effectué des analyses d'immunofluorescence pour vérifier si ces protéines étaient présentes dans les cellules SH-SY5Y. En utilisant des anticorps spécifiques pour PS1, NPRAP, Syn et BuChE (voir tableau 10), nous avons pu réaliser le marquage des protéines sur les cellules SH-SY5Y. Nous avons fait le marquage de cellules non transfectées comme contrôles positifs pour s'assurer que la fluorescence qui est émise n'est pas intrinsèque à la cellule ou qu'elle n'est pas due à un marquage non spécifique de l'anticorps secondaire (figure 33 et 34). On n'observe pas de marquage spécifique pour les quatre protéines marquées (NPRAP, PS1, Syn et BuChE). Les figures 35 et 36 présente les résultats des immunofluorescences effectuées avec l'anticorps anti-PS1 (PS1 M146L), anti-NPRAP (G810R et sauvage) et anti-Syn et les figures 37 et 38 l'anticorps anti-PS1 (PS1 M146L), anti-NPRAP (G810R et sauvage) et anti-BuChE (Figure XB). On peut observer une forte expression de PS1 M146L et NPRAP G810R et sauvage qui suggère qu'il y a eu liaison anticorps-antigène à la surface des cellules SH-SY5Y comparé au marquage des cellules non transfectées (figure 33 et 34). Cependant, le marquage de Syn et BuChE semble très diffus et correspondant à du bruit de fond (figure 35 et 36). Cela est confirmé par l'immunofluorescence effectué pour BuChE et Syn seulement en présence d'anticorps secondaire (contrôle négatif) que nous montrent les figures 39 et 40. On observe que le marquage ressemble beaucoup au marquage avec l'anticorps primaire et secondaire. Cette expérience nécessite une mise au point afin de localiser plus précisément Syn et BuChE dans les cellules (changer d'anticorps primaire ou le tanpom).

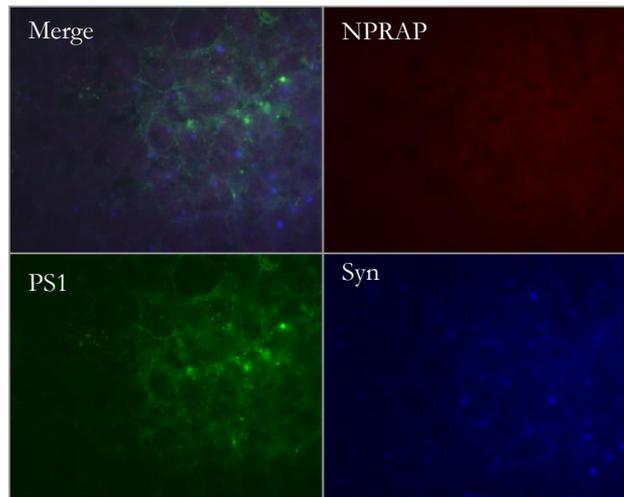


Figure 33 : Immunofluorescence montrant le marquage des protéines **NPRAP (rouge)**, **PS1 (vert)** et **Syn (bleu)** dans les cellules SH-SY5Y non transfectées (niveau endogène des protéines).

Image de Microscope confocale à fluorescence à l'immersion à huile avec le logiciel SimplePCI©, version 5.1.0.0110, Objective 100x.

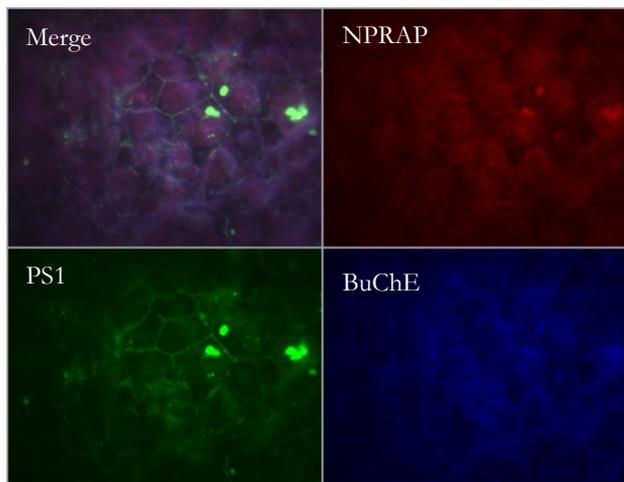


Figure 34 : Immunofluorescence montrant le marquage des protéines **NPRAP (rouge)**, **PS1 (vert)** et **BuChE (bleu)** dans les cellules SH-SY5Y non transfectées (niveau endogène des protéines).

Image de Microscope confocale à fluorescence à l'immersion à huile avec le logiciel SimplePCI©, version 5.1.0.0110, Objective 100x.

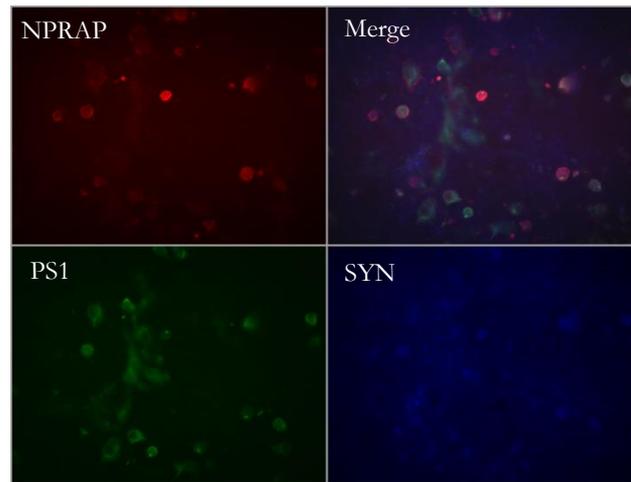


Figure 35 : Immunofluorescence montrant le marquage des protéines NPRAP (rouge), PS1 (vert) et Syn (bleu) dans les cellules SH-SY5Y transfectées.

Les cellules SH-SY5Y ont été transfectées avec les plasmides de PS1 M146L et NPRAP G810R. Image de Microscope confocale à fluorescence à l'immersion à huile avec le logiciel SimplePCI©, version 5.1.0.0110, Objective 40x.

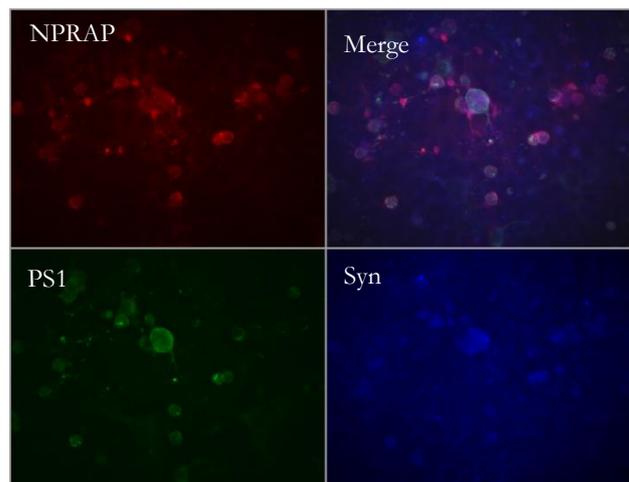


Figure 36 : Immunofluorescence montrant le marquage des protéines NPRAP (rouge), PS1 (vert) et Syn (bleu) dans les cellules SH-SY5Y transfectées.

Les cellules SH-SY5Y ont été transfectées avec les plasmides de PS1 M146L et NPRAP sauvage. Image de Microscope confocale à fluorescence à l'immersion à huile avec le logiciel SimplePCI©, version 5.1.0.0110, Objective 40x.

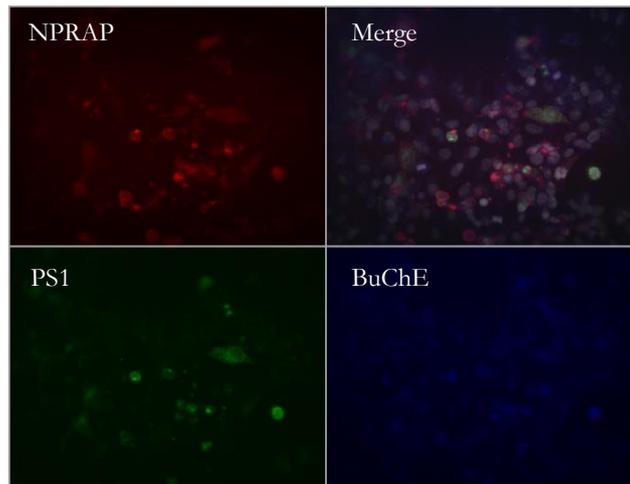


Figure 37 : **Immunofluorescence montrant le marquage des protéines NPRAP (rouge), PS1 (vert) et BuChE (bleu) dans les cellules SH-SY5Y transfectées.**
 Les cellules SH-SY5Y ont été transfectées avec les plasmides de PS1 M146L et NPRAP G810R. Image de Microscope confocale à fluorescence à l'immersion à huile avec le logiciel SimplePCI©, version 5.1.0.0110, Objective 40x.

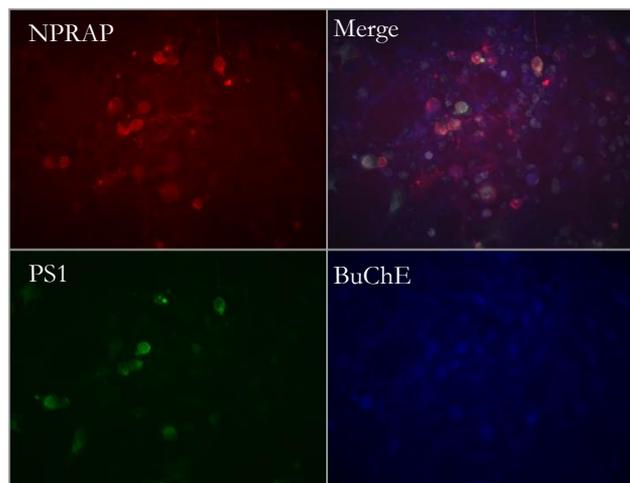


Figure 38 : **Immunofluorescence montrant le marquage des protéines NPRAP (rouge), PS1 (vert) et BuChE (bleu) dans les cellules SH-SY5Y transfectées.**
 Les cellules SH-SY5Y ont été transfectées avec les plasmides de PS1 M146L et NPRAP sauvage. Image de Microscope confocale à fluorescence à l'immersion à huile avec le logiciel SimplePCI©, version 5.1.0.0110, Objective 40x.

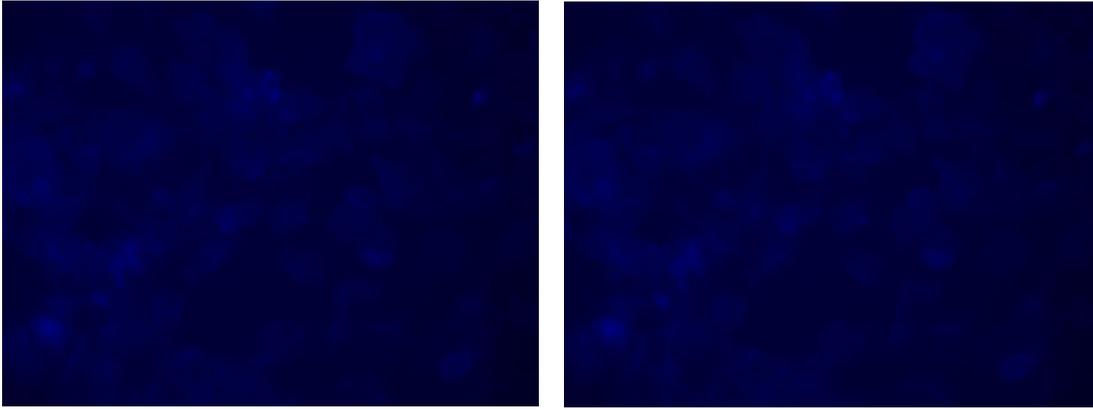


Figure 39 : Immunofluorescence montrant le marquage des protéines BuChE (bleu) dans les cellules SH-SY5Y transfectées.

Les cellules SH-SY5Y ont été transfectées avec les plasmides de PS1 M146L et NPRAP G810R (à gauche) et PS1 M146L et NPRAP sauvage (à droite). Marquage effectué seulement avec la présence de l'anticorps secondaire α -IgG d'âne anti-lapin (AlexaFlour® 480). Image de Microscope confocale à fluorescence à l'immersion à huile avec le logiciel SimplePCI©, version 5.1.0.0110, Objective 60x.

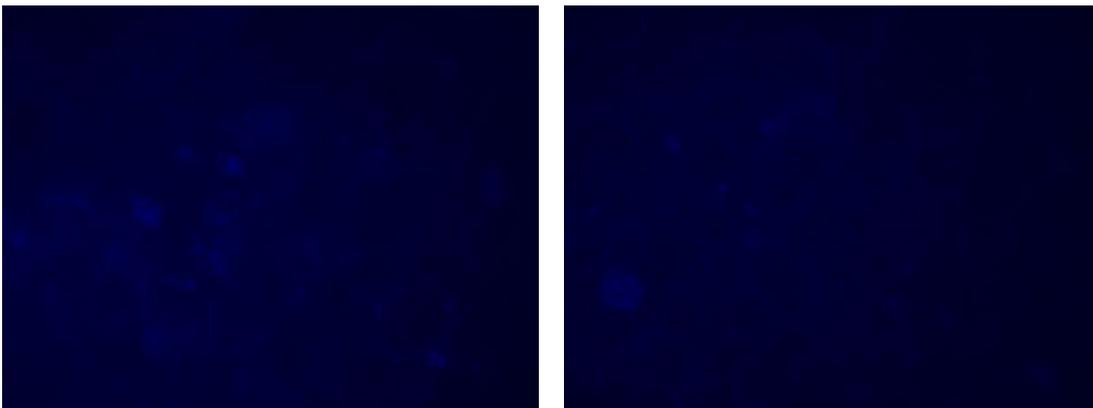


Figure 40 : Immunofluorescence montrant le marquage des protéines Syn (bleu) dans les cellules SH-SY5Y transfectées.

Les cellules SH-SY5Y ont été transfectées avec les plasmides de PS1 M146L et NPRAP G810R (à gauche) et PS1 M146L et NPRAP sauvage (à droite). Marquage effectué seulement avec la présence de l'anticorps secondaire α -IgG d'âne anti-lapin (AlexaFlour® 480). Image de Microscope confocale à fluorescence à l'immersion à huile avec le logiciel SimplePCI©, version 5.1.0.0110, Objective 60x.

Chapitre 3 : Discussion

La maladie d'Alzheimer est une pathologie neurodégénérative qui est associée à des troubles cognitifs importants, principalement la perte de la mémoire (National Institute on Aging, 2017). Elle est caractérisée par la présence d'enchevêtrements neurofibrillaires, l'accumulation de plaques amyloïdes et une importante perte synaptique et neuronale (Hardy et al., 1992); (Selkoe, 2001).

Préséniline 1 est une protéine transmembranaire qui fait partie du complexe protéique γ -sécrétase. Elle porte une activité catalytique capable de cliver APP libérant les peptides β -amyloïdes. Ces peptides qui peuvent alors s'accumuler et former des plaques amyloïdes neurotoxiques dans le cerveau (Spasic & Annaert, 2008). Certaines mutations de la Préséniline 1 cause la forme familiale de la maladie d'Alzheimer qui est la forme la plus agressive et atteint des individus avant 65 ans. Ces mutations sont connues pour augmenter la fabrication des peptides β -amyloïdes issus du clivage de APP (Sherrington et al., 1995). Mais APP n'est pas le seul substrat de PS1. Les mutations de PS1 pourraient jouer un rôle dans l'amplification de la perte synaptique et neuronale dans la maladie d'Alzheimer. De plus, Lévesque et al., ont démontré une forte interaction, dont le rôle inconnu, de PS1 avec la protéine NPRAP dans le cerveau (Lévesque et al., 1999). De façon intéressante, la délétion du gène de NPRAP cause la maladie du Cri-du-Chat qui est caractérisée par un profond retard mental, moteur et de la parole (Medina et al., 2000).

Au sein du laboratoire, il a été démontré que NPRAP joue un rôle dans la modulation de l'expression de BuChE et qu'il y a un potentiel effet de synergie de PS1 et NPRAP sur l'expression de Syn. NPRAP et PS1 pourraient donc jouer un rôle dans le maintien de l'intégrité neuronale, *via* synaptophysine et butyrylcholinestérase. Pour cela nous avons réalisé différentes expériences afin de répondre à cette hypothèse et la discussion qui suit présente les principaux points observés au long de mon projet.

Pour la réalisation de ce travail, nous avons choisi deux lignées cellulaires humaines différentes, les cellules embryonnaires du rein, HEK-293 et les cellules dérivées de neuroblastome de la moelle osseuse, les SH-SY5Y.

4.0 Étude du lien fonctionnel entre NPRAP, PS1 et Syn

Les résultats concernant le niveau d'expression protéique et d'ARNm de Syn dans les cellules HEK-293 et SH-SY5Y mettent en évidence que l'interaction entre NPRAP sauvage ou NPRAP G810R avec PS1 sauvage ou PS1 M146L ou PS1 L392V ne semble pas influencer le niveau d'expression de Syn dans ces cellules.

Actuellement, aucune donnée de la littérature n'évoque de lien entre les trois protéines Syn, PS1 et NPRAP, malgré le fait que ces protéines soient des partenaires importantes de la MA. Cependant, des études ont déjà décrit l'interaction entre NPRAP et PS1 dans le cerveau (J. Zhou et al., 1997); (Levesque et al., 1999); (Tanahashi & Tabira, 1999); (Koutras & Lévesque, 2011). Au sein du laboratoire des analyses d'immunofluorescence ont démontré un potentiel effet de synergie entre la présence des protéines Syn, PS1 et NPRAP dans les cellules SH-SY5Y. Nous avons donc supposé l'existence d'un lien fonctionnel entre NPRAP, PS1 et Syn et nous avons ainsi décidé d'étudier l'influence de NPRAP et PS1 sauvages et mutantes sur l'expression de Syn dans les cellules HEK-293 et SH-SY5Y.

Nous avons réalisé des co-transfections cellulaires, dans les cellules HEK-293 et SH-SY5Y, du vecteur d'expression des protéines NPRAP et PS1 sauvages et mutantes.

Nous avons réalisé des Western Blot afin d'étudier le niveau de protéine. Nous avons constaté qu'il existe une différence d'expression entre nos différentes lignées cellulaires. Les Western Blot nous ont révélé un faible signal de l'expression de Syn dans les cellules HEK-293 et un signal plus fort dans les cellules SH-SY5Y. Ce signal moins fort dans les cellules HEK-293 peut-être dû à une incubation insuffisante avec l'anticorps primaire et/ou dilution erronée de l'anticorps primaire. Ce faible signal peut aussi être dû à une faible expression de Syn dans la lignée cellulaire HEK-293, donc, il serait intéressant de tester une autre lignée cellulaire comme les cellules neuronales humaines SK-N-MC (<https://www.atcc.org>) et peut-être même en exprimant NPRAP et PS1 endogène, afin de pouvoir analyser le niveau endogène de Syn. Un autre problème qui aurait pu causer ce signal plus faible est la technique d'extraction protéique qui pourrait être mise en cause de part son efficacité de lyse des cellules. Il serait intéressant de tester d'autres techniques d'extraction comme l'utilisation d'un ultrason ou passer les cellules à travers une aiguille et aussi, tester l'utilisation d'un autre tampon de lyse. Il serait également intéressant de tester une autre dilution de l'anticorps

primaire, comme par exemple, 1 :1000 overnight à 4°C (Y.-G. Kim & Lee, 2012); (L. Zhou et al., 2015).

La quantification des membranes de Western Blot nous montre qu'il n'y a pas de différences significatives (one-way-ANOVA) entre les échantillons contenant NPRAP sauvage ou G810R et PS1 sauvage ou M146L ou L392V.

Les résultats précédents nous ont amenés à vouloir réaliser des RT-PCR, avec des amorces spécifiques à Syn, pour étudier l'influence de PS1 et NPRAP sauvages et mutantes sur Syn à niveau de l'ARN. Nous avons observé par PCR que PS1 et NPRAP ne semble pas influencer l'expression d'ARN de Syn. Ces résultats sont en accord avec le niveau d'expression protéique qui nous montraient aucune différence significative. Il serait toutefois important d'augmenter le nombre d'expériences dans les SH afin de pouvoir confirmer ces résultats.

La technique d'Immunofluorescence a été utilisée afin de visualiser l'influence de PS1 et NPRAP sauvages et mutantes au niveau cellulaire. Les protéines NPRAP, PS1 et Syn ont été marquées avec des anticorps spécifiques. Cependant, une observation rigoureuse de chacune des lames à l'aide du logiciel SimplePCI© a révélé un marquage dense et non spécifique de Syn. En plus, les images des cellules incubées seulement avec l'anticorps secondaire ressemblaient beaucoup aux images des cellules incubées avec les anticorps primaire et secondaire. Il serait intéressant de tester d'autres dilutions plus concentrées de l'anticorps primaire utilisé (Pyeon & Lee, 2012), (Hinckelmann et al., 2016) ou la même dilution utilisée (1:200) mais augmenter le temps d'incubation, comme par exemple laisser les cellules du jour au lendemain à 4°C au lieu de seulement 1 heure (Rodriguez-Ortiz et al., 2013).

Les résultats obtenus indiquent donc que la présence de NPRAP et PS1 sauvages ou mutantes ne modèleraient pas directement au niveau protéique de Syn dans les cellules HEK-293 et SH-SY5Y.

4.1 Étude du lien fonctionnel entre NPRAP, PS1 et BuChE

Pour étudier le lien fonctionnel entre les protéines NPRAP, PS1 et BuChE nous avons également utilisé les cellules embryonnaires rénales, HEK-293 et les cellules dérivées de neuroblastome de la moelle osseuse, les SH-SY5Y. Les résultats concernant le niveau d'expression protéique de BuChE dans les cellules HEK-293 et SH-SY5Y démontrent que l'interaction entre NPRAP sauvage et PS1 M146L semble influencer le niveau d'expression de BuChE dans ces cellules.

Actuellement, aucune donnée de la littérature n'évoque de lien entre les trois protéines NPRAP, PS1 et BuChE, malgré le fait que ces protéines soient des partenaires importants de la MA. Cependant, des études ont déjà décrit l'interaction entre NPRAP et PS1 dans le cerveau (J. Zhou et al., 1997) (Levesque et al., 1999) (Tanahashi & Tabira, 1999) (Koutras & Lévesque, 2011). En étudiant la modulation génique de la protéine NPRAP à l'aide d'analyses de micropuces à ADN, notre laboratoire a mis en évidence plusieurs gènes régulés par NPRAP, un de ces gènes étant BCHE qui code pour la protéine BuChE. Ces analyses ont montré que NPRAP agit en tant que répresseur de BCHE. Cette modulation est rendue possible grâce la séquence poly-lysine de NPRAP qui est essentielle pour sa translocation au noyau de NPRAP et son rôle en tant que régulateur transcriptionnel.

Nous avons réalisé des co-transfections cellulaires, dans les cellules HEK-293 et SH-SY5Y, du vecteur d'expression des protéines NPRAP et PS1 sauvages et mutantes puis nous avons réalisé des Western Blot afin d'étudier le niveau protéique de BuChE en fonction de l'expression de NPRAP et PS1 sauvages et mutantes. Nous avons constaté qu'il existe une variation du niveau d'expression de BuChE entre les différentes lignées cellulaires. Les Western Blot nous ont révélé un signal fort de l'expression de BuChE dans les cellules HEK-293 et un signal moins fort dans les cellules SH-SY5Y malgré les mêmes quantités de protéines totales déposées, les mêmes dilutions d'anticorps et les mêmes temps d'exposition.

La quantification des membranes de Western Blot nous montre qu'il n'y a pas de différences significatives (one-way ANOVA) entre les échantillons contenant NPRAP sauvage ou G810R et PS1 sauvage ou L392V. En revanche, en présence de PS1 M146L, l'ajout du vecteur NPRAP sauvage et seulement du vecteur sauvage induisent une augmentation du niveau de BuChE. La présence de NPRAP G810R n'influence pas

l'expression de BuChE. Cette différence dans les résultats pourrait s'expliquer par un effet de rétention de NPRAP sauvage par PS1 M146L qui empêcherait NPRAP de jouer son rôle comme régulateur transcriptionnel. En effet, au sein du laboratoire, il a été décrit qu'en situation de surexpression, PS1 et NPRAP vont interagir fortement et former un agrégat périnucléaire associés à la membrane de l'appareil de golgi. Ces observations suggèrent que NPRAP serait retenue dans le cytoplasme par PS1. La réduction de NPRAP nucléaire entraînerait une diminution de la répression sur le gène Bche ce qui expliquerait l'augmentation de son niveau protéique.

Ces résultats précédents nous ont amené à réaliser des RT-PCR, avec des amorces spécifiques à BuChE, pour étudier l'influence de PS1 et NPRAP sauvages et mutantes sur BuChE au niveau de l'ARN. Nous avons observé par PCR que PS1 et NPRAP ne semblent pas influencer l'expression d'ARN de BuChE. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus avec les résultats en Western Blot. Cette différence pourrait s'expliquer par une augmentation de stabilité où la protéine pourrait être moins dégradée par le protéasome suite à sa séquestration par PS1.

Ces expériences que j'ai réalisé durant mes travaux de recherche de maîtrise ont permis de mettre en évidence une régulation du niveau de BuChE par PS1 M146L en présence de NPRAP sauvage. L'augmentation de BuChE dans le cerveau, favoriserait la dégradation de l'ACh et risquerait d'augmenter les troubles cognitifs. Afin de palier à cet effet la prise de médicaments Inhibiteur de BuChE serait à envisager.

Conclusions et perspectives

L'interaction entre les protéines NPRAP et PS1 est déjà connue mais le rôle de cette interaction n'est toujours pas connu. Certaines mutations de PS1 causent une forme très agressive de la maladie d'Alzheimer et récemment, la mutation G810R de la protéine NPRAP a été découverte en étant un précurseur de la maladie d'Alzheimer. La maladie d'Alzheimer est la cause la plus connue de démence et atteint de plus en plus d'individu dans le monde. Pour cela, il est important de continuer à identifier un moyen de prévenir et/ou de mieux soulager les symptômes.

L'équipe du Dr Georges Lévesque a mis en évidence l'effet de répresseur de NPRAP sur BuChE et un potentiel effet de synergie entre NPRAP et PS1 sur le niveau de Syn. L'objectif de ce projet de maîtrise était d'étudier un possible lien fonctionnel entre les protéines PS1, NPRAP, BuChE/Syn. Dans ce but, j'ai effectué des transfections de PS1 et NPRAP sauvages et mutantes pour étudier l'influence des protéines PS1 et NPRAP sur le niveau d'expression de Syn et BuChE. En effet, le lien fonctionnel entre PS1/ NPRAP/Syn et PS1/ NPRAP/BuChE est très peu décrit dans la littérature actuellement. Les résultats obtenus au cours de ma maîtrise ont permis de déterminer que l'expression de BuChE semble augmenter en présence de NPRAP sauvage et PS1 M146L mais aucun effet de NPRAP et PS1 sauvages et mutantes sur l'expression de Syn. D'autres recherches devraient être entreprises pour valider le lien entre ces protéines, vérifier si les forces d'interaction sont altérées ou si une rétention de protéine ou dégradation pourraient être à l'origine de cette augmentation de BuChE. Bien que les résultats acquis soient considérés comme préliminaires, ceux-ci nous ont permis d'explorer de nouveaux champs d'étude de l'implication de PS1, NPRAP, BuChE et Syn dans la pathologie d'Alzheimer. Une grande variabilité dans la vérification à niveau cellulaire de mes protéines d'intérêt dans les cellules SH-SY5Y est observée. Conséquemment, aucune conclusion concernant les analyses d'immunofluorescence dans le modèle cellulaire humain n'a pu être faite. Ainsi, une mise au point de la technique est nécessaire avant de pouvoir apporter des conclusions à ces analyses. Il serait intéressant d'étudier par microarray si l'interaction de NPRAP et PS1 peut influencer l'expression d'autres gènes. Ainsi, il serait intéressant de vérifier la modulation d'autres gènes impliqués dans la MA par l'interaction NPRAP/PS1, comme par exemple, Synaptotagmine, Syntaxine, PSD-95, GAP-43 et SNAP25.

Bibliographies

- Abu-Elneel, K., Ochiishi, T., Medina, M., Remedi, M., Gastaldi, L., Caceres, A., & Kosik, K. S. (2008). A δ -catenin signaling pathway leading to dendritic protrusions. *Journal of Biological Chemistry*, 283(47), 32781–32791.
- Albert, M. S., DeKosky, S. T., Dickson, D., Dubois, B., Feldman, H. H., Fox, N. C., ... Phelps, C. H. (2011). The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on. *Alzheimer's & Dementia*, 7(3), 270–279.
- Alder, J., Kanki, H., Valtorta, F., Greengard, P., & Poo, M. M. (1995). Overexpression of synaptophysin enhances neurotransmitter secretion at *Xenopus* neuromuscular synapses. *The Journal of Neuroscience*, 15(1 Pt 2), 511–519.
- Arcaya, A., Combarros, O., Llorca, J., Sánchez Guerra, M., Berciano, J., Fernández Viadero, C., & Peña, N. (2000). The butyrylcholinesterase K variant is a protective factor for sporadic Alzheimer's disease in women. *Acta Neurologica Scandinavica*, 102(6), 350–353.
- Arikath, J., Peng, I., Ng, Y. G., Israely, I., Liu, X., Ullian, E. M., & Reichardt, L. F. (2009). δ -Catenin Regulates Spine and Synapse Morphogenesis and Function in Hippocampal Neurons during Development. *J Neurosci.*, 29(17), 5435–5442.
- Bagad, M., & Khan, Z. (2013). Towards understanding Alzheimer's Disease : An Overview. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 4, 286–298.
- Barnes, J., Bartlett, J. W., Van de Pol, L. A., Loy, C. T., Scahill, R. I., Frost, C., ... Fox, N. C. (2010). A meta-analysis of hippocampal atrophy in Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Aging*, 30(11), 1711–1723.
- Bartels, C. F., Jensen, F. S., Lockridge, O., van der Spek, A. F., Rubinstein, H. M., Lubrano, T., & La Du, B. N. (1992). DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. *American Journal of Human Genetics*, 50(5), 1086–103. =
- Bartus, R. T., Iii, R. L. D., Beer, B., & Lippa, A. S. (1982). The Cholinergic Hypothesis of Geriatric Memory Dysfunction Authors (s): Raymond T . Bartus , Reginald L . Dean , Bernard Beer and Arnold S . Lippa Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stabl>. *Science*, 217(4558), 408–417.
- Belcaro, C., Dipresa, S., Morini, G., Pecile, V., Skabar, A., & Fabretto, A. (2015). CTNND2 deletion and intellectual disability. *Gene*, 565, 146–149.
- Berchtold, N. C., & Cotman, C. W. (1998). Evolution in the Conceptualization of Dementia and Alzheimer's Disease: Greco-Roman Period to the 1960s. *Neurobiology of Aging*, 19(3), 173–189.
- Borchelt, D. R., Thinakaran, G., Eckman, C. B., Lee, M. K., Davenport, F., Ratovitsky, T., ... Sisodia, S. S. (1996). Familial Alzheimer's Disease–Linked Presenilin 1 Variants Elevate A β 1–42/1–40 Ratio In Vitro and In Vivo. *Neuron*, 17(5), 1005–1013.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254.
- Bray, S. J. (2006). Notch signalling: A simple pathway becomes complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(9), 678–689.
- Breton, M.-C., Turgeon, M., & Tremblay, É. (2015). *Traitement pharmacologique de la maladie d'Alzheimer et des maladies apparentées. Rapport d'évaluation des technologies de la santé, INESSS*, 1- 68.
- Brigidi G.S., Sun Y., Beccano-Kelly D., Pitman K., Mobasser M., Borgland S.L., Milnerwood A.J., Bamji S.X., Palmitoylation of delta-catenin by DHHC5 mediates activity-induced synapse plasticity, *Nat. Neurosci.* 17 (2014) 522–532.
- Brimijoin, S., & Hammond, P. (1988). Butyrylcholinesterase in Human Brain and Acetylcholinesterase in Human Plasma: Trace Enzymes Measured by Two-Site Immunoassay. *Journal of Neurochemistry*, 51(4), 1227–1231.
- Burger, M. J., Tebay, M. A., Keith, P. A., Samaratunga, H. M., Clements, J., Lavin, M. F., & Gardiner, R. A. (2002). Expression analysis of δ -catenin and prostate-specific membrane antigen: Their potential as diagnostic markers for prostate cancer. *International Journal of Cancer*, 100(2), 228–237.
- Campion, D., Flaman, J. M., Brice, A., Hannequin, D., Dubois, B., Martin, C., ... Frebourg, T. (1995). Mutations of the presenilin-1 gene in families with early-onset Alzheimer's disease. *Human Mol. Genet.*, 4(12), 2373–2377.
- Caring for a Person with Alzheimer's Disease. (2017). *National Institute on Aging*, 1-106.
- Carson, K. A., Geula, C., & Mesulam, M. M. (1991). Electron microscopic localization of cholinesterase activity in Alzheimer brain tissue. *Brain Research*, 540(1), 204–208.
- Cerruti, M. P. (2006). Cri du Chat syndrome. *Orphanet.J.Rare.Dis.*, 1(1), 33.
- Chai, C. K. (2007). The genetics of Alzheimer's disease. *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias*, 22(1), 37–41.
- Chiang, P.-M., Fortna, R. R., Price, D. L., Li, T., & Wong, P. C. (2012). Specific domains in anterior pharynx-defective 1 determine its intramembrane interactions with nicastrin and presenilin. *Neurobiology of Aging*, 33(2), 277–285.
- Ciro, A., Park, J., Burkhard, G., Yan, N., & Geula, C. (2012). Biochemical Differentiation of Cholinesterases from Normal and Alzheimers Disease Cortex. *Current Alzheimer Research*, 9(1), 138–143.
- Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., ... Selkoe, D. J. (1997). Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid β -protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nature Medicine*, 3(1), 67–72.
- Coates, J. C. (2003). Armadillo repeat proteins: Beyond the animal kingdom. *Trends in Cell Biology*, 13(9), 463–471.
- Cole, S. L., & Vassar, R. (2007). The Alzheimer's disease β -secretase enzyme, BACE1. *Molecular Neurodegeneration*, 2(1), 1–25.

- Court, J. A., & Perry, E. K. (1991). Dementia: The neurochemical basis of putative transmitter orientated therapy. *Pharmacology and Therapeutics*, 52(3), 423–443.
- Cruts, M., & Van Broeckhoven, C. (1998). Presenilin mutations in Alzheimer's disease. *Human Mutation*, 11(3), 183–190.
- Daly, C., & Ziff, E. B. (2002). Ca²⁺-dependent formation of a dynamin-synaptophysin complex. Potential role in synaptic vesicle endocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(11), 9010–9015.
- Darvesh, S., Grantham, D. L., & Hopkins, D. A. (1998). Distribution of butyrylcholinesterase in the human amygdala and hippocampal formation. *Journal of Comparative Neurology*, 393(3), 374–390.
- Darvesh, S. (2016). Butyrylcholinesterase as a Diagnostic and Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*, 13(10), 1173–7.
- Darvesh, S. (2013). Butyrylcholinesterase radioligands to image Alzheimer's disease brain. *Chemico-Biological Interactions*, 203(1), 354–357.
- Darvesh, S., & Hopkins, D. A. (2003). Differential distribution of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase in the human thalamus. *Journal of Comparative Neurology*, 463(1), 25–43.
- Darvesh, S., Hopkins, D. A., & Geula, C. (2003). Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(2), 131–138.
- Dawkins, E., & Small, D. H. (2014). Insights into the physiological function of the β -amyloid precursor protein: Beyond Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 129(5), 756–769.
- De Strooper, B. (2003). Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active γ -Secretase complex. *Neuron*, 38(1), 9–12.
- De Strooper, B., Craessaerts, K., Annaert, W., & Leuven, F. Van. (1998). Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*, 391(January), 387–390.
- De Strooper, B., Iwatsubo, T., & Wolfe, M. S. (2012). Presenilins and γ -secretase: structure, function, and role in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(1), 1–19.
- Deguchi, M., Iizukas, T., Hata, Y., Nishimura, W., Hirao, K., Yao, I., ... Yoshimi, T. (2000). A NOVEL MULTIPLE PSD-95/Dlg-A/ZO-1 PROTEIN INTERACTING WITH NEURAL PLAKOPHILIN-RELATED Armadillo REPEAT PROTEIN/ DELTA-CATENIN AND p0071. *Journal of Biological Chemistry*, 275(38), 29875–29880.
- Dennis J. Selkoe. (2002). Alzheimer's Disease Is a Synaptic Failure. *Science*, 298(5594), 789–791.
- Di Luca, M., Colciaghi, F., Pastorino, L., Borroni, B., Padovani, A., & Cattabeni, F. (2000). Platelets as a peripheral district where to study pathogenetic mechanisms of Alzheimer disease: The case of amyloid precursor protein. *European Journal of Pharmacology*, 405(1–3), 277–283.

- Diamant, S., Podoly, E., Friedler, A., Ligumsky, H., Livnah, O., & Soreq, H. (2006). Butyrylcholinesterase attenuates amyloid fibril formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, *103*(23).
- Dumanchin, C., Czech, C., Campion, D., Cuif, M. H., Poyot, T., Martin, C., ... Frebourg, T. (1999). Presenilins interact with Rab11, a small GTPase involved in the regulation of vesicular transport. *Human Molecular Genetics*, *8*(7), 1263–1269.
- Duysen, E. G., Li, B., Darvesh, S., & Lockridge, O. (2007). Sensitivity of butyrylcholinesterase knockout mice to (-)-huperzine A and donepezil suggests humans with butyrylcholinesterase deficiency may not tolerate these Alzheimer's disease drugs and indicates butyrylcholinesterase function in neurotransmission. *Toxicology*, *233*(1–3 SPEC. ISS.), 60–69.
- Eastwood, S. L., Burnet, P. W. J., & Harrison, P. J. (1995). Altered synaptophysin expression as a marker of synaptic pathology in schizophrenia. *Neuroscience*, *66*(2), 309–319.
- Edbauer D., Cheng D., Batterton M.N., Wang C.F., Duong D.M., Yaffe M.B., Peng J., Sheng M., Identification and characterization of neuronal mitogen-activated protein kinase substrates using a specific phosphomotif antibody, *Mol. Cell. Proteom.* *8* (2009) 681–695.
- Egbujo, C. N., Sinclair, D., & Hahn, C.-G. (2016). Dysregulations of Synaptic Vesicle Trafficking in Schizophrenia. *Curr Psychiatry Rep*, *18*(8), 77.
- Esch, F. S., Keim, P. S., Beattie, E. C., Blacher, R. W., Alan, R. C., Oltersdorf, T., ... Ward, P. J. (1990). Cleavage of Amyloid β Peptide During Constitutive Processing of Its Precursor. *American Association for the Advancement of Science*, *248*(4959), 1122–1124.
- Eshkind, L. G., & Leube, R. E. (1995). Mice lacking synaptophysin reproduce and form typical synaptic vesicles. *Cell and Tissue Research*, *282*(3), 423–433.
- Evans, G. J. O., & Cousin, M. A. (2005). Tyrosine phosphorylation of synaptophysin in synaptic vesicle recycling. *Biochem Soc Trans.*, *33*(Pt 6), 1350–1353.
- Evin, G. (2003). Proteolytic Processing of the Alzheimer's Disease Amyloid Precursor Protein in Brain and Platelets. *Journal of Neuroscience Research*, *74*(3), 386–392.
- Fletcher, T. L., Cameron, P., De Camilli, P., & Banker, G. (1991). The distribution of synapsin I and synaptophysin in hippocampal neurons developing in culture. *The Journal of Neuroscience*, *11*(6), 1617–1626.
- Folstein, M. F., Folstein, S. E., & McHugh, P. R. (1975). "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of Psychiatric Research*, *12*(3), 189–198. [https://doi.org/10.1016/0022-3956\(75\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0022-3956(75)90026-6)
- Francis, R., McGrath, G., Zhang, J., Ruddy, D. A., Sym, M., Apfeld, J., ... Curtis, D. (2002). *aph-1* and *pen-2* are required for Notch pathway signaling, γ -secretase cleavage of β APP, and presenilin protein accumulation. *Developmental Cell*, *3*(1), 85–97.
- Fykse, E. M., Takei, K., Walch-Solimena, C., Geppert, M., Jahn, R., De Camilli, P., & Südhof, T. C. (1993). Relative properties and localizations of synaptic vesicle protein isoforms: the case of the synaptophysins. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *13*(11), 4997–5007.
- Gantier, R., Dumanchin, C., Campion, D., Loutelier, C., Lange, C., Gagnon, J., ... Toma, F. (1999). The L392V mutation of presenilin 1 associated with autosomal dominant early-

- onset Alzheimer's disease alters the secondary structure of the hydrophilic loop. *Neuroreport*, 10(14), 3071–3074.
- Geula, C., & Mesulam, M.-M. (1995). Cholinesterases and the Pathology of Alzheimer Disease. *Alzheimer Disease & Associated Disorders*.
- Giacobini, E. (2003). Cholinergic function and Alzheimer's disease. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 18(SUPPL. 1), 1–5.
- Gincel, D., & Shoshan-Barmatz, V. (2002). The synaptic vesicle protein synaptophysin: purification and characterization of its channel activity. *Biophys J*, 83(6), 3223–3229.
- Giri, M., Shah, A., Upreti, B., & Rai, J. (2017). Unraveling the genes implicated in Alzheimer's disease (Review). *Biomedical Reports*, 105–114.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., ... James, L. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 349(6311), 704–6.
- Gomez-Isla, T., Growdon, W. B., McNamara, M. J., Nochlin, D., Bird, T. D., Arango, J. C., ... Hyman, B. T. (1999). The impact of different presenilin 1 and presenilin 2 mutations on amyloid deposition, neurofibrillary changes and neuronal loss in the familial Alzheimer's disease brain: evidence for other phenotype-modifying factors. *Brain*, 122(Pt 9), 1709–19.
- Gómez-Ramos, P., Bouras, C., & Morán, M. A. (1994). Ultrastructural localization of butyrylcholinesterase on neurofibrillary degeneration sites in the brains of aged and Alzheimer's disease patients. *Brain Research*, 640(1–2), 17–24.
- Greig, N. H., Lahiri, D. K., & Sambamurti, K. (2002). Butyrylcholinesterase : An Important New Target in Alzheimer ' s Disease Therapy, 14.
- Gu, Y., Chen, F., Sanjo, N., Kawarai, T., Hasegawa, H., Duthie, M., ... 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. *Journal of Biological Chemistry*, 278(9), 7374–7380.
- Guillozet, A. L., Smiley, J. F., Mash, D. C., & Mesulam, M. M. (1997). Butyrylcholinesterase in the life cycle of amyloid plaques. *Annals of Neurology*, 42(6), 909–918.
- Hardy, J. A., Higgins, G. A., Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's Disease : The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science*, 256(5054), 184–185.
- Hardy, J., & Allsop, D. (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 12(C), 383–388.
- Harrison, E. M. (2013). Understanding suffering: Utermohlen's self-portraits and alzheimer's disease. *Nurse Educator*, 38(1), 20–25.
- Hatzfeld, M., & Nachtsheim, C. (1996). Cloning and characterization of a new armadillo family member, p0071, associated with the junctional plaque: evidence for a subfamily of closely related proteins. *Journal of Cell Science*, 109, 2767–2778.
- Hefter, D., & Draguhn, A. (2017). APP as a Protective Factor in Acute Neuronal Insults. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10(February), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00022>

- Heinonen, O., Soininen, H., Sorvari, H., Kosunen, O., Paljärvi, L., Koivisto, E., & Riekkinen, P. J. (1995). Loss of synaptophysin-like immunoreactivity in the hippocampal formation is an early phenomenon in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, *64*(2), 375–384.
- Hinckelmann, M. V., Virlogeux, A., Niehage, C., Poujol, C., Choquet, D., Hoflack, B., ... Saudou, F. (2016). Self-propelling vesicles define glycolysis as the minimal energy machinery for neuronal transport. *Nature Communications*, *7*.
- Honer, W. G., Dickson, D. W., Gleeson, J., & Davies, P. (1992). Regional synaptic pathology in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *13*(3), 375–382.
- Ide, N., Hata, Y., Deguchi, M., Hirao, K., Yao, I., & Takai, Y. (1999). Interaction of S-SCAM with neural plakophilin-related armadillo-repeat protein/ δ -catenin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *256*(3), 456–461.
- Israely, I., Costa, R. M., Xie, C. W., Silva, A. J., Kosik, K. S., & Liu, X. (2004). Deletion of the Neuron-Specific Protein Delta-Catenin Leads to Severe Cognitive and Synaptic Dysfunction. *Current Biology*, *14*(18), 1657–1663.
- Izawa, I., Nishizawa, M., Ohtakara, K., & Inagaki, M. (2002). Densin-180 interacts with δ -catenin/neural plakophilin-related armadillo repeat protein at synapses. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(7), 5345–5350.
- Jie Shen, Roderick T. Bronson, Dong Feng Chen, Weiming Xia, D. J. S. and S. T. (1997). Skeletal and CNS Defects in Presenilin-1-Deficient Mice. *Cell*, *89*(1), 629–639.
- Johnston, A. P., & Sudhof, C. T. (1990). The Multisubunit Structure of Synaptophysin. *The Journal of Biological Chemistry*, *265*(15), 8896–8873.
- Jun, G., Moncaster, J. A., Koutras, C., Seshadri, S., Buros, J., McKee, A. C., ... Farrer, L. A. (2012). δ -Catenin Is Genetically and Biologically Associated with Cortical Cataract and Future Alzheimer-Related Structural and Functional Brain Changes. *PLoS ONE*, *7*(9), 5–8.
- Kaether, C., Capell, A., Edbauer, D., Winkler, E., Novak, B., Steiner, H., & Haass, C. (2004). The presenilin C-terminus is required for ER-retention, nicastrin-binding and γ -secretase activity. *EMBO Journal*, *23*(24), 4738–4748.
- Kang, J., Lemaire, H.-G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K.-H., ... Müller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*.
- Kertesz, A. (2002). Primary progressive aphasia: A review of the neurobiology of a common presentation of Pick complex. *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias*, *17*(1), 30–36.
- Kim H., Han J.R., Park J., Oh M., James S.E., Chang S., Lu Q., Lee K.Y., Ki H., Song W.J., Kim K., Delta-catenin-induced dendritic morphogenesis. An essential role of p190RhoGEF interaction through Akt1-mediated phosphorylation, *J. Biol. Chem.* *283* (2008) 977–987.
- Kim, K., Sirota, A., Chen, Y. H., Jones, S. B., Dudek, R., Lanford, G. W., ... Lu, Q. (2002). Dendrite-like process formation and cytoskeletal remodeling regulated by δ -catenin expression. *Experimental Cell Research*, *275*(2), 171–184.

- Kim, S. H., Lah, J. J., Thinakaran, G., Levey, A., & Sisodia, S. S. (2000). Subcellular localization of presenilins: Association with a unique membrane pool in cultured cells. *Neurobiology of Disease*, 7(2), 99–117.
- Kim H., Han J.R., Park J., Oh M., James S.E., Chang S., Lu Q., Lee K.Y., Ki H., Song W.J., Kim K., Delta-catenin-induced dendritic morphogenesis. An essential role of p190RhoGEF interaction through Akt1-mediated phosphorylation, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 977–987.
- Kim, Y.-G., & Lee, Y.-I. (2012). Differential Expressions of Synaptogenic Markers between Primary Cultured Cortical and Hippocampal Neurons. *Experimental Neurobiology*, 21(2), 61.
- Klinkenberg, I., Sambeth, A., & Blokland, A. (2011). Acetylcholine and attention. *Behavioural Brain Research*, 221(2), 430–442.
- Knappenberger, K. S., Tian, G., Ye, X., Sobotka-Briner, C., Ghanekar, S. V., Greenberg, B. D., & Scott, C. W. (2004). Mechanism of γ -secretase cleavage activation: Is γ -secretase regulated through autoinhibition involving the presenilin-1 exon 9 loop? *Biochemistry*, 43(20), 6208–6218.
- Komano, H., Sudoh, S., Kawamura, Y., Wang, R., & Yanagisawa, K. (1999). Implications of presenilin 1 mutations in Alzheimer's disease. *Mechanisms of Ageing and Development*, 107(3), 281–298. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(98\)00135-3](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(98)00135-3)
- Kopan, R., & Ilagan, M. X. G. (2004). Gamma-secretase: proteasome of the membrane? *Nature Reviews - Molecular Cell Biology*, 5(June), 499–504.
- Koutras, C., Lessard, C. B., & Lévesque, G. (2011). A nuclear function for the presenilin 1 neuronal partner NPRAP/ δ -catenin. *Journal of Alzheimer's Disease*, 27(2), 307–316.
- Koutras, C., & Lévesque, G. (2011). Identification of novel NPRAP/ δ -catenin-interacting proteins and the direct association of NPRAP with dynamin 2. *PLoS ONE*, 6(10).
- Kovacs, D. M., Fausett, H. J., Page, K. J., Kim, T. W., Moir, R. D., Merriam, D. E., ... Wasco, W. (1996). Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: Neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nature Medicine*, 2(2), 224–229.
- Kwon, S. E., & Chapman, E. R. (2011). Synaptophysin Regulates the Kinetics of Synaptic Vesicle Endocytosis in Central Neurons. *Neuron*, 70(5), 847–854.
- Lane, R. F., Shineman, D. W., Steele, J. W., Lee, L. B. H., & Fillit, H. M. (2012). *Beyond Amyloid. The Future of Therapeutics for Alzheimer's Disease. Advances in Pharmacology* (Vol. 64). Elsevier Inc.
- Laudon, H., Hansson, E. M., Melén, K., Bergman, A., Farmery, M. R., Winblad, B., ... Näslund, J. (2005). A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1. *Journal of Biological Chemistry*, 280(42), 35352–35360.
- Laura, R. P., Witt, A. S., Held, H. A., Gerstner, R., Deshayes, K., Koehler, M. F. T., ... Lasky, L. A. (2002). The Erbin PDZ domain binds with high affinity and specificity to the carboxyl termini of δ -catenin and ARVCF. *Journal of Biological Chemistry*, 277(15), 12906–12914.

- LaVoie, M. J., Fraering, P. C., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Kimberly, W. T., Wolfe, M. S., & Selkoe, D. J. (2003). Assembly of the γ -secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin. *Journal of Biological Chemistry*, 278(39), 37213–37222. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303941200>
- Lee, M. K., Slunt, H. H., Martin, L. J., Thinakaran, G., Kim, G., Gandy, S. E., ... Sisodia, S. S. (1996). Expression of presenilin 1 and 2 (PS1 and PS2) in human and murine tissues. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(23), 7513–7525.
- Lehmann, D. J., Johnston, C., & Smith, A. D. (1997). Synergy between the genes for butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in late-onset confirmed Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*, 6(11), 1933–1936.
- Lehmann, D. J., Williams, J., Mcbroom, J., & Smith, A. D. (2001). Using meta-analysis to explain the diversity of results in genetic studies of late-onset Alzheimer's disease and to identify high-risk subgroups. *Neuroscience*, 108(4), 541–554.
- Lemere, C. A., Lopera, F., Kosik, K. S., Lendon, C. L., Ossa, J., Saido, T. C., ... Arango V., J. C. (1996). The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A β 42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nature Medicine*, 2(10), 1146–1150.
- Levesque, G., Yu, G., Nishimura, M., Zhang, D. M., Levesque, L., Yu, H., ... St. George-Hyslop, P. (1999). Presenilins interact with armadillo proteins including neural-specific plakophilin-related protein and β -catenin. *Journal of Neurochemistry*, 72(3), 999–1008.
- Levy-lahad, E., & Bird, T. D. (1996). Genetic Factors in Alzheimer's Disease: A Review of Recent Advances. *American Neurological Association*, (127), 829–840.
- Li, B., Duysen, E. G., Carlson, M., & Lockridge, O. (2007). The Butyrylcholinesterase Knockout Mouse as a Model for Human Butyrylcholinesterase Deficiency. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 324(3), 1146–1154.
- Li, N., Liu, K., Qiu, Y., Ren, Z., Dai, R., Deng, Y., & Qing, H. (2016). Effect of presenilin mutations on APP cleavage; Insights into the pathogenesis of FAD. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 8(MAR), 1–11.
- Lichtenthaler, S. F. (2011). Alpha-secretase in Alzheimer's disease: Molecular identity, regulation and therapeutic potential. *Journal of Neurochemistry*, 116(1), 10–21.
- Lippa, C. F., & Rosso, A. L. (2012). Loss of synaptophysin immunoreactivity in primary progressive aphasia. *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias*, 27(4), 250–253.
- Liu, J., Sato, C., Cerletti, M., & Wagers, A. (2010). *Notch signaling in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation*. *Curr Top Dev Biol* (Vol. 92). Elsevier Inc.
- Luo, W. jie, Wang, H., Li, H., Kim, B. S., Shah, S., Lee, H. J., ... Xu, H. (2003). PEN-2 and APH-1 coordinately regulate proteolytic processing of presenilin 1. *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 7850–7854.
- Mackie S., Aitken A., Novel brain 14-3-3 interacting proteins involved in neurodegenerative disease, *FEBS J.* 272 (2005) 4202–4210.
- Manoharan, I., Boopathy, R., Darvesh, S., & Lockridge, O. (2007). A medical health report on individuals with silent butyrylcholinesterase in the Vysya community of India. *Clinica Chimica Acta*, 378(1–2), 128–135.

- Martinez, M. C., Ochiishi, T., Majewski, M., & Kosik, K. S. (2003). Dual regulation of neuronal morphogenesis by a δ -catenin-cortactin complex and Rho. *Journal of Cell Biology*, *162*(1), 99–111.
- Masliah, E., Terry, R. D., Alford, M., DeTeresa, R., & Hansen, L. (1991). Cortical and subcortical patterns of synaptophysinlike immunoreactivity in Alzheimer's disease. *The American Journal of Pathology*, *138*(1), 235–246.
- Masliah, E., Terry, R. D., DeTeresa, R. M., & Hansen, L. A. (1989). Immunohistochemical quantification of the synapse-related protein synaptophysin in Alzheimer disease. *Neuroscience Letters*, *103*(2), 234–239
- Mason, J. M., & Arndt, K. M. (2004). Coiled coil domains: Stability, specificity, and biological implications. *ChemBioChem*, *5*(2), 170–176.
- Mayeux, R., Stern, Y., Holtzman, D. M., Mandelkow, E., Selkoe, D. J., Tanzi, R. E., ... Nixon, R. (2012). Epidemiology of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(3), 18. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006239>
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., & Stadlan, E. M. (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*, *34*(7), 939–944.
- McMahon, H. T., Bolshakov, V. Y., Janz, R., Hammer, R. E., Siegelbaum, S. a, & Südhof, T. C. (1996). Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for neurotransmitter release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(10), 4760–4764. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.10.4760>
- Mesulam, M., Guillozet, A., Shaw, P., & Quinn, B. (2002). Widely spread butyrylcholinesterase can hydrolyze acetylcholine in the normal and Alzheimer brain. *Neurobiology of Disease*, *9*(1), 88–93. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2001.0462>
- Morán, M. A., Mufson, E. J., & Gómez-Ramos, P. (1993). Colocalization of cholinesterases with β amyloid protein in aged and Alzheimer's brains. *Acta Neuropathologica*, *85*(4), 362–369.
- Musardo, S., & Marcello, E. (2017). Synaptic dysfunction in Alzheimer's disease: From the role of amyloid β -peptide to the α -secretase ADAM10. *European Journal of Pharmacology*, *817*(June), 30–37.
- Berchtold, N. C., & Cotman, C. W. (1998). Evolution in the Conceptualization of Dementia and Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Aging*, *19*(May 1998), 173–189.
- Nasreddine, Z. S., Phillips, N. A., Bédirian, V., Charbonneau, S., Whitehead, V., Collin, I., ... Chertkow, H. (2005). The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *J Am Geriatr Soc*, *53*(4), 695–699.
- Ng, Y. P., Or, T. C. T., & Ip, N. Y. (2015). Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, *89*, 260–270.
- Nivard, M. G., Mbarek, H., Hottenga, J. J., Smit, J. H., Jansen, R., Penninx, B. W., ... Boomsma, D. I. (2014). Further confirmation of the association between anxiety and CTNND2: Replication in humans. *Genes, Brain and Behavior*, *13*(2), 195–201.

- O'Brien, K. K., Saxby, B. K., Ballard, C. G., Grace, J., Harrington, F., Ford, G. A., ... McKeith, I. G. (2003). Regulation of attention and response to therapy in dementia by butyrylcholinesterase. *Pharmacogenetics*, *13*(4), 231–239.
- Oh M., Kim H., Yang I., Park J.H., Cong W.T., Baek M.C., Bareiss S., Ki H., Lu Q., No J., Kwon I., Choi J.K., Kim K., GSK-3 phosphorylates delta-catenin and negatively regulates its stability via ubiquitination/proteasome-mediated proteolysis, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 28579–28589.
- Paffenholz, R., & Franke, W. W. (1997). Identification and localization of a neurally expressed member of the plakoglobin/armadillo multigene family. *Differentiation*, *61*(5), 293–304.
- Paffenholz, R., Kuhn, C., Grund, C., Stehr, S., & Franke, W. W. (1999). The Arm-repeat protein NPRAP (neurojungin) is a constituent of the plaques of the outer limiting zone in the retina, defining a novel type of adhering junction. *Experimental Cell Research*, *250*(2), 452–464.
- Panpalli Ates, M., Karaman, Y., Guntekin, S., & Ergun, M. A. (2016). Analysis of genetics and risk factors of Alzheimer's Disease. *Neuroscience*, *325*, 124–131.
- Parks, A. L., & Curtis, D. (2007). Presenilin diversifies its portfolio. *Trends in Genetics*, *23*(3), 140–150.
- Peifer, M., Berg, S., & B. Reynolds, A. (1994). A Repeating Amino Acid Motif Shared by Proteins with Diverse Cellular Roles. *Cell*, *76*, 789–791.
- Peifer, M., & Wleschhaus, E. (1990). The segment polarity gene armadillo encodes a functionally modular protein that is the Drosophila homolog of human plakoglobin. *Cell*, *63*(6), 1167–1178.
- Penke, B., Bogár, F., & Fülöp, L. (2017). β -Amyloid and the Pathomechanisms of Alzheimer's Disease: A Comprehensive View. *Molecules*, *22*(10), 1692.
- Pereda, A. E. (2014). Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, *15*(4), 250–263.
- Perry, E., & Perry, R. (1978). Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathology and ...*, 273–277.
- Perry, E. K. (1980). THE CHOLINERGIC SYSTEM IN OLD AGE AND ALZHEIMER'S DISEASE. *Age and Ageing*, *9*(1), 7–10.
- Perry, K. E., Tomlinson, B., Blessed, G., E.Bergmann, K., Gibson, P. H., & Perry, R. H. (1978). Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *British Medical Journal*, *2*, 1457–1459.
- Peters, R., & Pinto, E. M. (2008). Predictive value of the clock drawing test: A review of the literature. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, *26*(4), 351–355.
- Pini, L., Pievani, M., Bocchetta, M., Altomare, D., Bosco, P., Cavedo, E., ... Frisoni, G. B. (2016). Brain atrophy in Alzheimer's Disease and aging. *Ageing Research Reviews*, *30*, 25–48.
- Podlisny, M. B., Citron, M., Amarante, P., Sherrington, R., Xia, W., Zhang, J., ... Selkoe, D. J. (1997). Presenilin proteins undergo heterogeneous endoproteolysis between

- Thr291 and Ala299 occur as stable N- and C-terminal fragments in normal and Alzheimer brain tissue. *Neurobiology of Disease*, 3(4), 325–337.
- Poore C.P., Sundaram J.R., Pareek T.K., Fu A., Amin N., Mohamed N.E., Zheng Y.L., Goh A.X., Lai M.K., Ip N.Y., Pant H.C., Kesavapany S., Cdk5-mediated phosphorylation of delta-catenin regulates its localization and GluR2-mediated synaptic activity, *J. Neurosci.* 30 (2010) 8457–8467.
- Pyeon, H.-J., & Lee, Y.-I. (2012). Differential expression levels of synaptophysin through developmental stages in hippocampal region of mouse brain. *Anatomy & Cell Biology*, 45(2), 97–102.
- Qiu, C., Kivipelto, M., & Von Strauss, E. (2009). Epidemiology of Alzheimer's disease: Occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 11(2), 111–128.
- Querfurth, H. W., & LaFerla, F. M. (2010). Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 362(4), 329–344.
- Randall, A. D., Witton, J., Booth, C., Hynes-Allen, A., & Brown, J. T. (2010). The functional neurophysiology of the amyloid precursor protein (APP) processing pathway. *Neuropharmacology*, 59(4–5), 243–267.
- Ray, W. J., Ashall, F., & Goate, A. M. (1998). Molecular pathogenesis of sporadic and familial forms of Alzheimer's disease. *Molecular Medicine Today*, 4(4), 151–157.
- Rehm, H., Wiedenmann, B., & Betz, H. (1986). Molecular characterization of synaptophysin, a major calcium-binding protein of the synaptic vesicle membrane. *The EMBO Journal*, 5(3), 535–41.
- Reid, G. A., Chilukuri, N., & Darvesh, S. (2013). Butyrylcholinesterase and the cholinergic system. *Neuroscience*, 234, 53–68.
- Riggleman, B., Wieschaus, E., & Schedl, P. (1989). Molecular analysis of the armadillo locus: uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a Drosophila segment polarity gene. *Genes & Development*, 3(1), 96–113.
- Rodriguez-Ortiz, C. J., Hoshino, H., Cheng, D., Liu-Yescevitiz, L., Blurton-Jones, M., Wolozin, B., ... Kitazawa, M. (2013). Neuronal-specific overexpression of a mutant valosin-containing protein associated with ibmpfd promotes aberrant ubiquitin and TDP-43 accumulation and cognitive dysfunction in transgenic mice. *American Journal of Pathology*, 183(2), 504–515.
- Rogaev, E. I., Sherrington, R., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., ... George-Hyslop, P. H. S. (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*.
- Rogaeva, E. (2002). The solved and unsolved mysteries of the genetics of early-onset Alzheimer's disease. *Neuromolecular Medicine*, 2(1), 1–10.
- Rubenstein, J. L., Greengard, P., & Czernik, A. J. (1993). Calcium-dependent serine phosphorylation of synaptophysin. *Synapse*, 13(2), 161–172.
- Sani, S., Traul, D., Klink, A., Niaraki, N., Gonzalo-Ruiz, A., Wu, C.-K., & Geula, C. (2003). Distribution, progression and chemical composition of cortical amyloid-beta deposits

- in aged rhesus monkeys: similarities to the human. *Acta Neuropathologica*, 105(2), 145–56.
- Sardina, J. M., Walters, A. R., Singh, K. E., Owen, R. X., & Kimonis, V. E. (2014). Amelioration of the typical cognitive phenotype in a patient with the 5pter deletion associated with Cri-du-chat syndrome in addition to a partial duplication of CTNND2. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 164(7), 1761–1764.
- Sato, T., Diehl, T. S., Narayanan, S., Funamoto, S., Ihara, Y., De Strooper, B., ... Wolfe, M. S. (2007). Active γ -secretase complexes contain only one of each component. *Journal of Biological Chemistry*, 282(47), 33985–33993.
- Saura, C. A., Choi, S. Y., Beglopoulos, V., Malkani, S., Zhang, D., Rao, B. S. S., ... Shen, J. (2004). Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. *Neuron*, 42(1), 23–36. =
- Scheff, S. W., Price, D. A., Schmitt, F. A., & Mufson, E. J. (2006). Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiology of Aging*, 27(10), 1372–1384.
- Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., ... Younkin, S. (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 2(8), 864–870. <https://doi.org/10.1038/nm0896-864>
- Selkoe, D. J. (2001). Presenilins , β -amyloid precursor protein and the molecular basis of Alzheimer's disease. *Clinical Neuroscience Research*, 1, 91–103.
- Shankar, G. M., & Walsh, D. M. (2009). Alzheimer's disease: Synaptic dysfunction and A β . *Molecular Neurodegeneration*, 4(1), 1–13.
- Shen, A. H. and J. (2011). Presenilins in Synaptic Function and Disease. *Trends in Molecular Medicine*, 17(11), 617–624.
- Sheng, M., Sabatini, B. L., & Su, T. C. (2012). Synapses and Alzheimer's Disease. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1–18.
- Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., ... St George-Hyslop, P. H. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*.
- Shi, F., Liu, B., Zhou, Y., Yu, C., & Jiang, T. (2009). Hippocampal volume and asymmetry in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: Meta-analyses of MRI studies. *Hippocampus*, 19(11), 1055–1064.
- Shioi, J., Georgakopoulos, A., Mehta, P., Kouchi, Z., Litterst, C. M., Baki, L., & Robakis, N. K. (2007). FAD mutants unable to increase neurotoxic A β 42 suggest that mutation effects on neurodegeneration may be independent of effects on A β . *Journal of Neurochemistry*, 101(3), 674–681.
- Silverman, J. B., Restituito, S., Lu, W., Lee-Edwards, L., Khatri, L., & Ziff, E. B. (2007). Synaptic Anchorage of AMPA Receptors by Cadherins through Neural Plakophilin-Related Arm Protein AMPA Receptor-Binding Protein Complexes. *Journal of Neuroscience*, 27(32), 8505–8516.

- Sirotkin, H., O'Donnell, H., DasGupta, R., Halford, S., St. Jore, B., Puech, A., ... Kucherlapati, R. (1997). Identification of a new human catenin gene family member (ARVCF) from the region deleted in velo-cardio-facial syndrome. *Genomics*, 41(1), 75–83.
- Société Alzheimer, C. (2010). *Raz-de-marée : Impact de la maladie d'Alzheimer et des affections connexes au Canada*.
- Spasic, D., & Annaert, W. (2008). Building γ -secretase – the bits and pieces. *Journal of Cell Science*, 121(4), 413–420.
- Spasic, D., Tolia, A., Dillen, K., Baert, V., De Strooper, B., Vrijens, S., & Annaert, W. (2006). Presenilin-1 maintains a nine-transmembrane topology throughout the secretory pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 281(36), 26569–26577.
- Spiwox-Becker, I., Vollrath, L., Seeliger, M. W., Jaissle, G., Eshkind, L. G., & Leube, R. E. (2001). Synaptic vesicle alterations in rod photoreceptors of synaptophysin-deficient mice. *Neuroscience*, 107(1), 127–142.
- Stanga, S., Vranx, C., Tasiaux, B., Marinangeli, C., Karlström, H., & Kienlen-Campard, P. (2017). Specificity of presenilin-1- and presenilin-2-dependent γ -secretases towards substrate processing. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, XX(X), 1–11.
- Steiner, H., Winkler, E., & Haass, C. (2008). Chemical cross-linking provides a model of the γ -secretase complex subunit architecture and evidence for close proximity of the C-terminal fragment of presenilin with APH-1. *Journal of Biological Chemistry*, 283(50), 34677–34686.
- Stelzma, R. A., Schnitzlein, H. N., & Murlagh, F. R. (1995). An English I ' ranslation of Alzheimer ' s 1907 Paper , “ ijber eine eigenartige Erlranliung der Hirnrinde .” *Clinical Anatomy*, 8, 429–431.
- Südhof, T. C., Lottspeich, F., Greengard, P., Mehl, E., Südhof, T. C., Lotspeich, F., & Greengard, P. (1987). A Synaptic Vesicle Protein with a Novel Cytoplasmic Domain and Four Transmembrane Regions. *American Association for the Advancement of Science*, 238(4830), 1142–1144.
- Sze, C.-I., Troncoso, J. C., Kawas, C., Mouton, P., Price, D. L., & Martin, L. J. (1997). Loss of the Presynaptic Vesicle Protein Synaptophysin in Hippocampus Correlates with Cognitive Decline in Alzheimer Disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 56(8), 933–944.
- Tanahashi, H., & Tabira, T. (1999). Isolation of human delta- catenin and its binding specificity with presenilin 1. *Molecular Neuroscience*, 10(3), 563–568.
- Tarsa, L., & Goda, Y. (2002). Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(2), 1012–6.
- Teich, A. F., & Arancio, O. (2012). Is the Amyloid Hypothesis of Alzheimer's disease therapeutically relevant? *Biochemical Journal*, 446(2), 165–177.
- Teipel, S. J., & Hampel, H. (2006). Neuroanatomy of Down syndrome in vivo: A model of preclinical Alzheimer's disease. *Behavior Genetics*, 36(3), 405–415.
- Teng, T., Harpst, J. A., Lee, J. C., & Zinn, A. (1976). Composition and Molecular Weights of Butyrylcholinesterase Horse. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 176, 71–81.

- Thiele, C., Hannah, M. J., Fahrenholz, F., & Huttner, W. B. (2000). Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nature Cell Biology*, 2(1), 42–49.
- Thinakaran, G., Borchelt, D. R., Lee, M. K., Slunt, H. H., Spitzer, L., Kim, G., ... Sisodia, S. S. (1996). Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron*, 17(1), 181–190.
- Thinakaran, G., & Koo, E. H. (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *Journal of Biological Chemistry*, 283(44), 29615–29619.
- Thinakaran, G., & Parent, A. T. (2004). Identification of the role of presenilins beyond Alzheimer's disease. *Pharmacological Research*, 50(4), 411–418.
- Thomas, L., Hartung, K., Langosch, D., Rehm, H., Bamberg, E., Thomas, L. E. O., ... Betzt, H. (1988). Identification of Synaptophysin as a Hexameric Channel Protein of the Synaptic Vesicle Membrane. *Science, New Series*, 242(4881), 1050–1053.
- Toodayan, N. (2016). Professor Alois Alzheimer (1864–1915): Lest we forget. *Journal of Clinical Neuroscience*, 31, 47–55.
- Toyo-oka K., Wachi T., Hunt R. F., Baraban S.C., Taya S., Ramshaw H., Kaibuchi K., Schwarz Q.P., Lopez A.F., Wynshaw-Boris A., 14-3-3epsilon and zeta regulate neurogenesis and differentiation of neuronal progenitor cells in the developing brain, *J. Neurosci.* 34 (2014) 12168–12181.
- Turner, T. N., Sharma, K., Oh, E. C., Liu, Y. P., & Collins, R. L. (2015). Loss of delta catenin function in severe autism. *Nature*, 520(7545), 51–56.
- Van Cauwenberghe, C., Van Broeckhoven, C., & Sleegers, K. (2016). The genetic landscape of Alzheimer disease: Clinical implications and perspectives. *Genetics in Medicine*, 18(5), 421–430.
- van der Kant, R., & Goldstein, L. S. B. (2015). Cellular Functions of the Amyloid Precursor Protein from Development to Dementia. *Developmental Cell*, 32(4), 502–515.
- Vawter, M. P., Howard, a L., Hyde, T. M., Kleinman, J. E., & Freed, W. J. (1999). Alterations of hippocampal secreted N-CAM in bipolar disorder and synaptophysin in schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 4(5), 467–75.
- Verhey, F. R. (2009). Alois Alzheimer (1864-1915). *Journal of Neurology*, 256(3), 502–503.
- Vrijenhoek, T., Buizer-Voskamp, J. E., van der Stelt, I., Strengman, E., Sabatti, C., Geurts van Kessel, A., ... Veltman, J. A. (2008). Recurrent CNVs Disrupt Three Candidate Genes in Schizophrenia Patients. *American Journal of Human Genetics*, 83(4), 504–510.
- Walter, J. (2015). Twenty Years of Presenilins—Important Proteins in Health and Disease. *Molecular Medicine*, 21(Suppl 1), 1.
- Wang, Y., & Mandelkow, E. (2016). Tau in physiology and pathology. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(1), 5–21.
- Wang, Z., Jiang, Y., Wang, X., DU, Y., Xiao, D., Deng, Y., & Wang, J. (2015). Butyrylcholinesterase K variant and Alzheimer's disease Risk : A Meta-Analysis. *Medical Science - Monitor*, 21, 1408–1413. <https://doi.org/10.1007/s004150050365>

- Whitehouse, P. J., Price L, D., Struble, R. G., Clark, A. W., Coyle, J. T., & DeLong, M. R. (1982). Alzheimer's Disease and Senile Dementia: Loss of Neurons in the Basal Forebrain. *American Association for the Advancement of Science*, 215(4537), 1237–1239.
- Wiedenmann, B., & Franke, W. W. (1985). Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell*, 41(3), 1017–1028.
- Wines-Samuelson, M., Schulte, E. C., Smith, M. J., Aoki, C., Liu, X., Kelleher, R. J., & Shen, J. (2010). Characterization of age-dependent and progressive cortical neuronal degeneration in Presenilin conditional mutant mice. *PLoS ONE*, 5(4).
- Wolfe & Kopan (2004). Intramembrane Proteolysis : Theme and Variations. *Advancement Of Science*, 305(5687), 1119–1123.
- 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(1907), 513–517.
- Wolfe, M. S. (2012). *γ-Secretase as a Target for Alzheimer's Disease*. *Advances in Pharmacology* (Vol. 64). Elsevier Inc.
- Wu, J., Tian, Y., Wang, S., Pistolozzi, M., Jin, Y., Zhou, T., ... Tan, W. (2017). Design, synthesis and biological evaluation of bambuterol analogues as novel inhibitors of butyrylcholinesterase. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 126, 61–71.
- Wu, L., Rosa-neto, P., Hsiung, G. R., Sadovnick, A. D., Masellis, M., Black, S. E., ... Gauthier, S. (2012). Early-Onset Familial Alzheimer ' s Disease (EOFAD). *Can J Neurol Sci*, 39, 436–445.
- Xie, W., Stribley, J. A., Chatonnet, A., Wilder, P. J., Rizzino, A., McComb, R. D., ... Lockridge, O. (2000). Postnatal developmental delay and supersensitivity to organophosphate in gene-targeted mice lacking acetylcholinesterase. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 293(3), 896–902.
- Yamamoto, Y., Yasuda, M., Mori, E., & Maeda, K. (1999). Failure to confirm a synergistic effect between the K-variant of the butyrylcholinesterase gene and the epsilon4 allele of the apolipoprotein gene in Japanese patients with Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 67(1), 94–96.
- Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., ... George-Hyslop, P. S. (2000). Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and βAPP processing. *Nature*, 407(6800), 48–54.
- Yuan, L., & Arikath, J. (2017). Functional roles of p120ctn family of proteins in central neurons. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 69, 70–82.
- Yuan, L., Seong, E., Beuscher, J. L., & Arikath, J. (2015). Delta-Catenin regulates spine architecture via cadherin and PDZ-dependent interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 290(17), 10947–10957.
- Zhang, S., Zhang, M., Cai, F., & Song, W. (2013). Biological function of Presenilin and its role in AD pathogenesis. *Translational Neurodegeneration*, 2(1), 1–13.
- Zhou, J., Liyanage, U., Medina, M., Ho, C., Simmons, A. D., Lovett, M., & Kosik, K. S. (1997). Presenilin 1 interaction in the brain with a novel member of the Armadillo family. *NeuroReport*, 8(6), 1489–1494.

Zhou, L., Wang, Z., Zhou, H., Liu, T., Lu, F., Wang, S., ... Zuo, Z. (2015). Neonatal exposure to sevoflurane may not cause learning and memory deficits and behavioral abnormality in the childhood of Cynomolgus monkeys. *Scientific Reports*, 5(May), 1–10.