



HAL
open science

Implication des disintégrines dans le clivage physiologique de la protéine prion : régulation par les récepteurs muscariniques et les protéines kinases

Moustapha Alfa Cisse

► **To cite this version:**

Moustapha Alfa Cisse. Implication des disintégrines dans le clivage physiologique de la protéine prion : régulation par les récepteurs muscariniques et les protéines kinases. Biologie cellulaire. Université Nice Sophia Antipolis, 2007. Français. NNT : . tel-00169101

HAL Id: tel-00169101

<https://theses.hal.science/tel-00169101>

Submitted on 31 Aug 2007

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

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

THESE DE DOCTORAT

Mention Sciences de la vie

**présentée à la Faculté des Sciences de
l'Université de Nice-Sophia Antipolis**

par

Moustapha ALFA CISSE

**Implication des disintégrines dans le clivage
physiologique de la protéine prion : régulation
par les récepteurs muscariniques et les
protéines kinases**

soutenue le 21 mars 2007

devant la commission d'Examen

Dr. Frédéric CHECLER	Président
Dr. Jean-Noël OCTAVE	Rapporteur
Dr. Didier VILETTE	Rapporteur
Dr. Bernadette ALLINQUANT	Examinatrice
Pr. Michel LAZDUNSKI	Examineur
Pr. Bernard ROQUES	Examineur
Dr. Bruno VINCENT	Directeur de thèse

**Institut de Pharmacologie Moléculaire
et Cellulaire-UMR6097-CNRS/UNSA**

à mammy

à mes parents

à mes frères et soeurs

Remerciements

Je remercie l'ensemble des membres du jury pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail : Merci à Jean-Noël Octave et à Didier Vilette, qui ont sans hésiter accepté la lourde tâche de rapporteurs et pour le temps consacré à ce manuscrit. Merci à Bernadette Allinquant pour avoir accepté d'être examinatrice malgré son emploi du temps surchargé.

Mes profonds et respectueux remerciements à Michel Lazdunski et Bernard Roques qui me font le grand honneur de faire partie de ce jury.

Ces remerciements s'adressent plus particulièrement à Frédéric Checler, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et pour m'avoir fait confiance durant ces années de thèse. Votre rigueur scientifique et votre sens du devoir ont été pour moi une source d'inspiration quotidienne. Vous avez également toujours su trouver les mots justes dans les moments de doute pour me permettre d'aller de l'avant. Merci pour tout...

Que dire de nos discussions passionnées sur le plan cinématographique, dans les couloirs de l'institut ou pendant le déjeuner, on partait alors dans des fous rires en se remémorant telle ou telle autre scène d'un classique du cinéma, des moments inoubliables...

J'exprime ma profonde reconnaissance à Bruno Vincent pour m'avoir encadré durant toutes ces années, pour son enthousiasme, son humour et sa disponibilité, et pour ses connaissances scientifiques, qui m'ont beaucoup appris et m'ont donné envie d'apprendre. Merci également pour tes informations éclairées sur le plan du football, ce sport qui reste encore pour moi un mystère...(J'ai dit allez L'O.M.).

Je remercie également Claire et Cristine, pour les discussions enrichissantes que nous avons eues, des fois tard le soir... Cela m'a beaucoup aidé à acquérir une maturité scientifique. Merci également pour votre soutien dans les moments de joie comme dans les moments difficiles, vos qualités humaines ont su rendre l'ambiance au laboratoire des plus agréables. Merci...

Je remercie la joyeuse bande du 211 et du 212 que forment Julie (Youli), Virginie, Emilie et Jeannot (Omar) pour leur enthousiasme au quotidien. C'est un vrai bonheur que de travailler

et d'interagir avec vous au jour le jour, votre présence a su rendre moins difficiles ces années de thèse.

Merci aux deux anciens (ils se reconnaîtront...) pour votre bonne humeur, votre gentillesse et votre disponibilité (et Dieu sait que je vous ai souvent sollicité, des fois par simple manie, d'autres fois pour des choses plus sérieuses). Merci pour tout...

Je remercie également tout le 210, plus particulièrement Kenza, Géraldine, Lisa, Karine, Marie-Pierre, Chimène, Kevin, Thomas et Pascal Barbry. Vous cotoyer a été très enrichissant tant sur le plan humain que scientifique.

Merci à 43, nos conversations délirantes (des fois dignes d'un roman de Ludlum) restent des moments de pur bonheur, j'en rigole encore des fois tout seul...

Mes tendres remerciements à Catherine Chevance... Ta jovialité, ton enthousiasme, ton aide précieuse de tous les jours ont été d'un apport considérable. Je ne te remercierai jamais assez...

J'exprime ma profonde gratitude à Marie-Pierre Gaya et Jaqueline Kervella pour leur disponibilité et leur sympathie.

J'adresse mes remerciements à Franck Aguilla, Franck Stevenot et Michel Bordes pour leurs qualités professionnelles et leur gentillesse.

Merci à tous mes proches, en particulier ceux qui ont participé et consacré du temps à la relecture et à la correction de certaines parties de ce manuscrit.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS.....	8
TABLES ET ILLUSTRATIONS.....	9
Objectifs de la thèse.....	10
INTRODUCTION	
I/ LA PROTEINE PRION.....	13
I/ 1. Généralités sur la PrP^c.....	14
I/ 2. Généralités sur la PrP^{sc}	13
I/ 3. Fonction de la PrP^c.....	17
- La PrP ^c comme molécule de signalisation cellulaire ?.....	20
- Un rôle de la PrP ^c dans l'homéostasie du cuivre?.....	21
- Un rôle de la PrP ^c dans la survie cellulaire ou l'apoptose?.....	22
- Le catabolite C1 dans la régulation de la mort cellulaire (Article1)	24
II/ METABOLISME DE LA PROTEINE PRION.....	28
II/ 1.1. Les disintégrines.....	28
- Généralités.....	28
- Structure des disintégrines.....	28
- Maturation des disintégrines : implication des proprotéines convertases.....	33
- Fonctions des disintégrines.....	34
- ADAM9.....	34
- ADAM10.....	35
- ADAM17/TACE.....	36
- Régulation de l'activité des disintégrines.....	37

II/ 1.2. Les disintégrines dans le metabolisme de la βAPP.....	39
- Généralités.....	39
II/ 1.3. Les Disintégrines dans le métabolisme de la PrP^c	42
- Généralités.....	42
- ADAM10 et ADAM17 participent au clivage physiologique de la PrP ^c	44
- ADAM9 contribue indirectement via ADAM10 au clivage physiologique de la PrP ^c (Article 2).....	46
II/ 2. Les récepteurs muscariniques.....	53
- Généralités.....	53
- Structure des différents récepteurs muscariniques.....	54
- Fonctions physiologiques des récepteurs muscariniques.....	57
II/ 2.1. Les récepteurs muscariniques comme régulateurs du clivage de la βAPP.....	61
II/ 2.2. Les récepteurs muscariniques comme régulateurs du clivage de la PrP^c (Article 3)	63
II/ 2.3. Résultats complémentaires.....	70
II/ 3. La Protéine kinase C.....	76
- Généralités.....	76
- Structure et régulation de la protéine kinase C.....	76
- Fonctions de la protéine kinase C.....	78
II/ 3.1. La PKC dans la régulation du métabolisme de la βAPP.....	80
II/ 3.2. La PKC dans la régulation du clivage physiologique de la PrP^c (Article 4)	82

III/ AUTRES TRAVAUX.....	86
- Caractérisation d'un nouveau substrat fluorimétrique quenché mimant la coupure 111/112 de la PrP ^c (Article 5).....	84
IV/ DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	90
LISTE DES PUBLICATIONS.....	103
BIBLIOGRAPHIE.....	104

ABREVIATIONS

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
Ach	Acétylcholine
ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease
ADAMTS	A Disintegrin And Metalloprotease-Thrombospondins
AGRP	Agouti-Related peptide
BACE	β -site APP-Cleaving Enzyme
β APP	β -Amyloid precursor Protein
DAG	Diacylglycerol
EGF	Epithelial Growgth Factor
ERK	Extracellular signal Regulated Kinase
EST	Encephalopathie Spongiforme Transmissible
GPCRs	G-Protein Coupled Receptors
GPI	Glycosyl Phosphatidyl Inositol
HB-EGF	Heparin Binding EGF-like Growgth Factor
HEK	Human Embryonic Kidney
IP3	Inositol-2-4-6 Phosphate
JNK	c-Jun-amino-terminal Kinase
MADM	Mammalian Disintegrin-Metalloprotease
MAPK	Microtubule Associated Protein Kinase
MCH	Melanin-Concentrating Hormone
MMP	Matrix Metalloproteinase
NEXT	Notch Extracellular Truncation
NGF	Nerve Growgth Factor
NICD	Notch Intracellular Domain
NSE	Neuron Specific Enolase
PC	Proprotein Convertase
PDBu	Phorbol-12-13-Dibutyrate
PKC	Protein Kinase C
PLA2	Phospholipase A2
SH3	Src Homology domain 3
SOD1	Superoxide Dismutase1
STI1	Stress-inducible protein 1
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α

TABLES ET ILLUSTRATIONS

Table 1 : Etiologie des encéphalopathies spongiformes transmissibles	18
Table 2 : Nomenclature et tissus d'expression des disintégrines.....	31
Table 3 : Souris invalidées pour les disintégrines et leur phénotypes.....	37
Figure 1 : Structure et maturation de la PrP ^c	16
Figure 2 : Structures tridimensionnelles de la PrP ^c et de la PrP ^{sc}	18
Figure 3 : Signes histopathologiques des EST.....	19
Figure 4 : Structure des disintégrines.....	29
Figure 5 : Structure et clivage de la β APP.....	40
Figure 6 : Le clivage physiologique de la PrP ^c par les disintégrines.....	42
Figure 7 : Le clivage pathogénique de la PrP ^c	44
Figure 8 : ADAM9 contribue indirectement au clivage de la PrP ^c	50
Figure 9 : Structure générale des récepteurs muscariniques.....	54
Figure 10 : Modulation du clivage de la PrP ^c par les récepteurs muscariniques...	66
Figure 11 : Voie des MAP kinases.....	69
Figure 12 : L'inhibiteur spécifique de la voie MAPK/ERK, le U0126, abroge la formation de N1 induite par le carbachol ou le PDBu.....	71
Figure 13 : Les voies PKC et MAPK/ERK ne sont pas impliquées dans le mécanisme de régulation de la formation de sAPP α	72
Figure 14 : Implication de la voie MAPK/ERK dans la régulation du clivage de la PrP ^c induit par l'activation des récepteurs muscariniques.....	73
Figure 15 : Modèle de la cascade de phosphorylation/activation de la PKC.....	75
Figure 16 : Structure des différentes classes de PKC	77

Objectifs de la thèse

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) constituent de graves maladies neurodégénératives atypiques, affectant aussi bien l'homme que l'animal. Ces maladies ont une origine infectieuse, génétique ou sporadique. On distingue chez l'homme la maladie de Creutzfeldt-Jakob, le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Sheinker, le nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob dû à l'ingestion d'aliments contaminés, et les formes iatrogènes, qui surviennent le plus souvent à la suite d'une contamination contractée lors d'interventions chirurgicales. Les maladies à prions animales les plus courantes sont l'encéphalopathie spongiforme bovine et la tremblante du mouton. Le facteur commun à toutes ces maladies est la protéine prion ou PrP, présente de façon ubiquitaire dans l'organisme et de manière prépondérante dans le cerveau. La PrP existe sous deux états conformationnels qui ont la même séquence en acides aminés, mais qui possèdent des propriétés physicochimiques différentes. La forme normale du prion ou "PrP^c" est attachée à la membrane cellulaire par une ancre glypiée et sa fonction physiologique est encore discutée. Des travaux ont montré son éventuelle implication dans la compensation du stress oxydatif, le contrôle de la survie cellulaire et le métabolisme du cuivre. La forme anormale du prion appelée "scrapie" ou "PrP^{sc}" est partiellement résistante aux protéases et plus riche en feuillets β que la PrP^c, ce qui lui confère une susceptibilité exacerbée à l'agrégation. L'hypothèse de "la protéine seule" proposée par Prusiner prédit que le titre infectieux serait composé uniquement de la PrP^{sc}, capable de se répliquer de manière autocatalytique en se servant de la PrP^c endogène comme matrice de conversion. Les mécanismes moléculaires régissant ce processus sont encore mal connus. Cependant ce phénomène de conversion apparaît comme l'évènement central contrôlant l'infection et sa propagation vers le système nerveux central. Ces processus nécessitent la présence de la PrP^c endogène, puisqu'il a été montré que des souris invalidées pour la protéine prion résistent à l'infection et sont viables. Ces observations ouvrent de nouvelles perspectives en terme d'approches thérapeutiques théoriquement envisageables dans le domaine des EST. Par des méthodes immunologiques et biochimiques, une corrélation directe a été établie entre l'infection et la quantité de

PrP^{sc} présente dans des cerveaux de souris atteintes de la maladie. Par ailleurs, des souris ont pu être infectées avec de la PrP^{sc} générée *in vitro* par des techniques d'amplifications cycliques. Il est donc crucial de mieux connaître les mécanismes intracellulaires qui régulent les taux endogènes de la PrP^c, substrat indispensable à la mise en place du processus infectieux.

La PrP^c, après une étape de maturation, subit un clivage physiologique en position 111/112 qui conduit à la formation d'un fragment sécrété appelé N1. Des travaux effectués dans notre laboratoire ont montré d'une part que ce clivage est constitutif ou régulé par les esters de phorbol et d'autre part que la formation du fragment N1 est presque totalement inhibée par TAPI et BB-3103, des inhibiteurs de disintégrines, impliquant ainsi cette classe d'enzymes dans la coupure physiologique de la PrP^c. Les disintégrines ADAM10 et ADAM17 ont par la suite été identifiées comme étant responsables des coupures constitutive et régulée par la protéine kinase C, de la PrP^c, respectivement. Amplifier le clivage qui conduit à la formation du fragment N1 pourrait donc constituer une approche thérapeutique visant à baisser le niveau de PrP^c disponible et permettre de moduler négativement la conversion en sa forme pathogène, la PrP^{sc}.

Les études menées au cours de ma thèse ont visé à mieux comprendre les mécanismes cellulaires qui régulent le métabolisme de la PrP^c, en dehors du cadre infectieux ou pathophysiologique. Pour une meilleure compréhension de la régulation du clivage normal de la PrP^c, il nous paraissait important d'identifier d'autres disintégrines éventuellement impliquées dans le processus protéolytique qui conduit à la formation de N1 en vue d'élargir le plus possible les cibles pharmacologiques potentielles. Le proche parallèle du point de vue de leur régulation métabolique qui existe entre la PrP^c et la β APP nous a conforté dans notre hypothèse qu'ADAM9 pourrait être impliquée dans le clivage de la PrP^c. La synthèse et la caractérisation d'un substrat fluorimétrique mimant la séquence de la PrP^c ciblée par les disintégrines nous sont également apparues comme essentielles afin de disposer d'un outil de criblage pharmacologique à haut débit qui nous permettrait de rapidement identifier d'éventuelles protéines activatrices de l'activité de type disintégrine.

La seconde partie de ma thèse a consisté à démontrer une éventuelle implication de la voie cholinergique dans la régulation du métabolisme de la PrP^c. En effet, certains sous-types de récepteurs muscariniques sont couplés à la voie PKC, faisant d'eux des cibles pharmacologiques intéressantes. En effet, leur implication dans la régulation du clivage de la PrP^c permettrait d'avoir un activateur de la voie PKC pouvant être modulé de façon pharmacologique par des agonistes sélectifs. Cela permettrait également de contourner le fait que les esters de phorbol sont promoteurs de tumeurs et ne sont donc pas envisageables en tant qu'activateurs de la PKC dans une éventuelle stratégie thérapeutique *in vivo*. Par ailleurs, les récepteurs muscariniques ont été bien caractérisés et leurs fonctions respectives sont relativement bien connues. De plus, ces récepteurs sont impliqués dans le métabolisme de la β APP et l'utilisation d'agonistes plus sélectifs a donné des résultats prometteurs chez des souris modèles de la maladie d'Alzheimer.

Enfin, dans la dernière partie de mon travail de thèse, je me suis intéressé à l'identité des isoformes de la PKC impliquées dans la régulation du clivage de la PrP^c, de façon à pouvoir cartographier la cascade de signalisation initiée par l'activation des récepteurs muscariniques et ainsi avoir la vue la plus complète possible du mécanisme de régulation de ce clivage. L'ensemble de cette étude nous aura également permis de pousser plus loin le comparatif entre les métabolismes de la PrP^c et de la β APP et de jauger les limites de ce parallèle très intéressant entre deux protéines impliquées dans deux pathologies neurodégénératives a priori distinctes avec une étiologie et une symptomatologie qui sont différentes.

I/ LA PROTEINE PRION

I/ 1. Généralités sur la PrP^c

La protéine prion cellulaire ou "PrP^c" est codée par un gène présent en une seule copie située sur le bras court du chromosome 20 chez l'homme (Robakis et al., 1986). Ce gène appelé PRNP est composé de deux exons séparés par un intron de 10 kb et sa séquence codante est entièrement située dans le second exon (Kretzschmar et al., 1986). La PrP^c est une protéine relativement conservée chez les mammifères. Chez l'homme, elle comprend environ 254 acides aminés dont cinq séquences octapeptidiques capables de lier le cuivre dans sa région amino-terminale. Cette protéine majoritairement exprimée dans les neurones et de manière moins importante dans les cellules gliales, se retrouve dans tous les tissus périphériques et dans les cellules immunocompétentes. Lors de son trafic vers la membrane plasmique, la PrP^c subit des modifications post-transcriptionnelles (Voir Figure 1) dont le clivage de son peptide signal en position N-terminale, l'addition d'oligosaccharides sur des résidus asparagines (N181 et N197) et la formation d'un pont disulfure (entre C179 et C241). La protéine se présente sous trois formes électrophorétiques selon son niveau de glycosylation (formes mono- di- et non-glycosylées). La partie carboxy-terminale comporte une ancre glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) permettant l'accrochage de la protéine sur la face externe de la membrane plasmique. La partie amino-terminale est flexible tandis que la partie carboxy-terminale (121-231) est globulaire et majoritairement composée d'hélices α et de feuillets β plissés antiparallèles. Après cette étape de "maturation", la PrP^c est adressée à la membrane plasmique dans des régions riches en cholestérol, les radeaux lipidiques ou rafts (Vey et al., 1996).

La localisation cellulaire de la PrP^c reste un sujet de débats. Ainsi, si certains travaux indiquent une localisation prédominante de la protéine au niveau de la membrane plasmique neuronale (principalement au niveau de l'axone) (Sales et al., 2002), d'autres suggèrent une localisation plus importante au niveau des membranes des vésicules d'endocytose ou au niveau du cytosol de neurones spécifiques de certaines régions du cerveau, comme l'hippocampe, le thalamus et le néocortex

(Mironov et al., 2003). Comprendre les mécanismes d'internalisation de la PrP^c a été le centre d'intérêt de plusieurs laboratoires de recherche ces dernières années. Il apparaît très important de comprendre les processus physiologiques liés au trafic de la PrP^c endogène, tant sa localisation au niveau de la membrane plasmique et de certains compartiments intracellulaires semble cruciale pour la mise en place du processus infectieux, qui au stade final déclenche des signaux cellulaires conduisant à la mort neuronale (Beranger et al., 2002; Barmada and Harris, 2005; Chesebro et al., 2005). C'est ainsi que des travaux ont montré que la région amino-terminale de la PrP^c est essentielle aussi bien pour sa localisation au niveau des puits recouverts de clathrines que pour son internalisation (Lee et al., 2001). Les acides aminés basiques situés dans cette région semblent également très importants pour ce mécanisme (Sunyach et al., 2003). La liaison du cuivre au niveau de la région octapeptidique à l'extrémité amino-terminale favorise la dissociation de la PrP^c des rafts, tandis que la région polybasique contrôle son interaction avec un partenaire transmembranaire qui l'engagerait dans le processus d'endocytose dépendante de la clathrine (Taylor et al., 2005). Cependant, d'autres études ont aussi montré l'implication des caveolae dans le mécanisme d'internalisation de la PrP^c (Peters et al., 2003). Ainsi globalement, le phénomène d'internalisation de la PrP^c apparaît comme un processus complexe qui semble impliquer plus d'une voie de signalisation.

I/2. Généralités sur la PrP^{sc}

La conversion de la PrP^c en une forme aberrante appelée PrP^{sc} est un évènement fondamental et mal compris qui constitue un des déterminismes des encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) ou maladies à prions (Prusiner, 1998). La séquence primaire de la PrP^{sc} est rigoureusement identique à celle de la PrP^c. Cependant, la PrP^{sc} est insoluble dans les détergents non ioniques et la séquence située entre les résidus 121-231 résiste partiellement à la protéolyse. Les structures en feuillets β sont plus importantes chez la protéine pathologique que chez la protéine normale (Nguyen et al., 1995) (Voir Figure 2). Le concept de "la protéine seule" proposé par Prusiner au début des années 1980 prédit que la PrP^{sc} se servirait de la PrP^c endogène comme matrice de conversion afin de se répliquer dans les

organes lymphoïdes et de se propager vers le système nerveux central (Prusiner, 1989). Cette hypothèse est en parfaite adéquation avec les observations selon lesquelles des souris invalidées pour la PrP^c résistent à l'infection par de la PrP^{sc} (Bueler et al., 1993; Weissmann et al., 1994; Brandner et al., 1996). Cette hypothèse est aussi confortée par les travaux de Castilla et collaborateurs qui ont montré que l'inoculation de hamsters de phénotype sauvage avec de la PrP^{sc} générée in vitro, par une technique d'amplification cyclique, conduit au développement par ces animaux de signes cliniques et histopathologiques caractéristiques des maladies à prion et qui sont identiques à ceux observés suite à l'inoculation d'animaux avec des titres infectieux dérivés de cerveaux atteints de la maladie (Saborio et al., 2001; Castilla et al., 2005).

Il est intéressant de noter que dans certains cas, les signes cliniques associés à la pathologie apparaissent sans aucune détection de la PrP^{sc} (Lasmezas et al., 1997), indiquant qu'il pourrait exister d'autres formes, lors de la transition conformationnelle de la PrP, qui sont différentes de la scrapie et qui véhiculent une certaine toxicité pour les neurones. Plusieurs résultats expérimentaux démontrent que la PrP^c endogène ainsi que sa localisation cellulaire sont déterminantes pour la mise en place du processus infectieux. Ces observations démontrent également que la PrP^{sc} *per se* ne serait pas l'agent toxique. En effet, des souris invalidées pour la PrP^c et injectées en intracérébrale de façon massive avec des titres infectieux ne développent pas la maladie (Bueler et al., 1992; Bueler et al., 1993). Par ailleurs, des souris transgéniques surexprimant une forme de PrP dépourvue de son ancre GPI et infectées avec de la scrapie ne présentent pas de signes cliniques caractéristiques des maladies à prion, bien qu'on détecte chez ces souris des taux importants de plaques amyloïdes au niveau périvasculaire dans le système nerveux central (Chesebro et al., 2005).

De manière générale, les EST animales et humaines débutent toutes par une phase asymptomatique pouvant aller de 16 mois à 40 ans chez l'homme (Pour l'étiologie voir Table 1). Les signes cliniques sont généralement une ataxie et une démence chez l'homme et des troubles comportementaux chez l'animal. Sur le plan

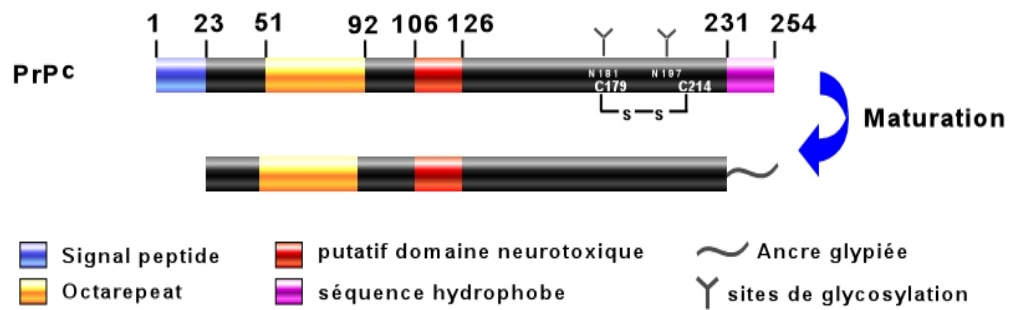


Figure 1 : Structure et maturation de la PrP^c. La protéine subit des modifications post-transcriptionnelles pendant son transit vers la membrane plasmique

biologique, le système immunitaire ne réagit pas face à l'infection et à la multiplication de la PrP^{sc}, ce qui rend difficile la mise au point de systèmes de dépistage non invasifs permettant le diagnostic des malades en phase préclinique. Cependant, l'analyse biochimique du liquide céphalo-rachidien de patients atteints de la maladie de Creutzfeldt-Jakob met en évidence la présence de deux protéines en quantités anormales, la protéine 14-3-3 et l'énolase neurone spécifique (NSE) ([Giraud et al., 2002](#)).

Les lésions histopathologiques, localisées de façon exclusive au niveau du système nerveux central, sont neurodégénératives, sans œdème cérébral, ni infiltrat macrophagique ou lymphocitaire ([Hauw et al., 1995](#)) ([Voir Figure 3](#)) et se caractérisent par : 1) Une gliose, qui est une hyperactivation des astrocytes au site de l'inflammation, plus précisément au niveau de l'hippocampe; 2) Une spongiose qui se caractérise par la formation de vacuoles d'environ 3µm de diamètre dans le cytoplasme des neurones; 3) Des dépôts amyloïdes au niveau périvasculaire ou au niveau du cortex qui forment des plaques réactives avec des anticorps dirigés contre la PrP^c.

Sur le plan biochimique, la seule anomalie observée est l'accumulation de la forme anormale de la PrP appelée PrP scrapie "PrP^{sc}" ou PrP résistante "PrP^{res}" ([Prusiner, 1982](#)). Chez l'individu infecté, cette forme anormale résistante à la dégradation par les protéases cellulaires s'accumule en formant des dépôts amyloïdes extracellulaires. La taille des agents transmissibles non conventionnels a pu être estimée entre 15 et 40 nm grâce à des méthodes d'ultrafiltration. Leur résistance à la chaleur sèche est exceptionnelle car par exemple, une exposition de 24 heures à une température de 600°C n'inactive pas totalement un titre infectieux dérivé du hamster ([Brown et al., 2000](#)).

I/ 3. Fonction de la PrP^c

Comprendre la fonction de la PrP^c a été l'axe de recherche d'un grand nombre de laboratoires dans le domaine de la recherche sur les maladies à prion. Il paraît essentiel d'avoir la vue la plus complète possible de la physiologie de la protéine

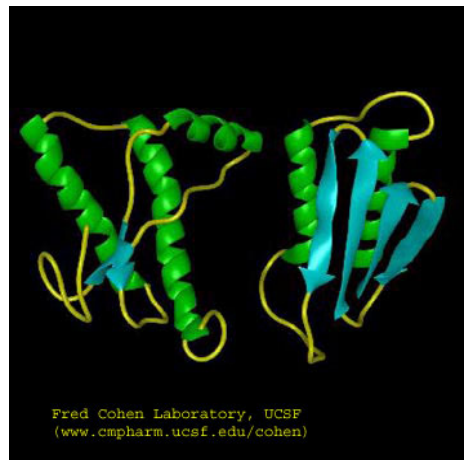
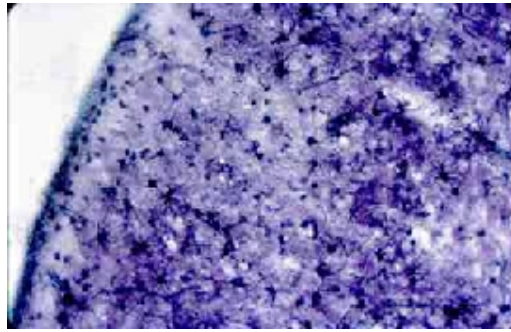


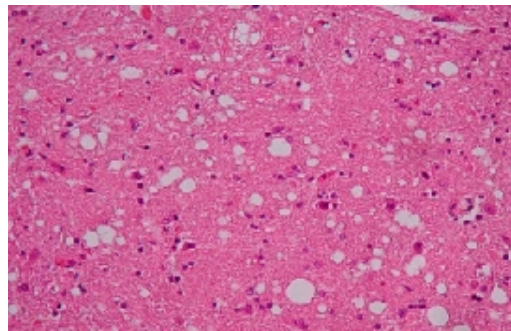
Figure 2 : Structures tridimensionnelles de la PrP^c et de sa forme infectieuse, la PrP^{sc}, qui est enrichie en feuillets β

Disease	Host	Transmission
Creutzfeldt-Jakob (variant or iatrogenic)	Human	Infection from bovine prion ?
Creutzfeldt-Jakob (familial)	Human	Mutation on <i>PRNP</i> gene
Creutzfeldt-Jakob (sporadic) Gerstmann-Straussler-Scheinker	Human Human	Somatic mutation or spontaneous conversion of PrP Mutation on <i>PRNP</i> gene
Fatal familial insomnia	Human	Mutations (D 178N, M 129) on <i>PRNP</i>
Scrapie	Sheep	Infection and genetic susceptibility
Bovine spongiform encephalopathy	Cattle	Infection with prion-contaminated meat and bone meal

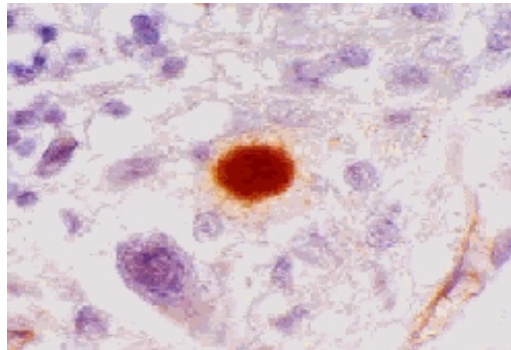
Table 1 : Etiologie des encéphalopathies spongiformes transmissibles



Astrogliose



Spongiose



Dépôts amyloïdes

Figure 3 : Signes histopathologiques des encéphalopathies spongiformes transmissibles

prion afin de pouvoir y associer un éventuel dysfonctionnement pouvant expliquer la pathologie. Beaucoup d'espoir a été fondé dans l'établissement de souris invalidées pour la PrP^c afin de pouvoir désigner un rôle dévolu à cette protéine. Cette approche s'est révélée inefficace car ces souris sont viables et fertiles et n'affichent aucun phénotype particulier (Bueler et al., 1992). Ces observations peuvent paraître surprenantes au regard de l'expression importante de la PrP^c au niveau du système nerveux central et de sa régulation pendant le développement (Miele et al., 2003). Ainsi, des phénomènes de compensation pourraient se mettre en place pendant l'embryogenèse, empêchant le développement ultérieur par ces souris d'un phénotype particulier pouvant être associé à l'invalidation de la PrP^c. Pour contourner ce problème, des souris ont été établies à l'aide du système Cre-loxP, ce qui permet l'ablation de la PrP^c 9 semaines après la naissance. Ces souris restent en bonne santé jusqu'à 1 mois post-invalidation sans aucune neurodégénération ou signes histopathologiques apparents (Mallucci et al., 2002). En revanche, sur le plan électrophysiologique, ces souris présentent des anomalies au niveau du potentiel d'hyperpolarisation des cellules situées dans la zone CA1 de l'hippocampe, suggérant une implication de la PrP^c dans la plasticité et la transmission synaptique (Mallucci et al., 2002).

Une autre approche expérimentale utilisée pour essayer de mettre en évidence le rôle physiologique de la PrP^c a été d'identifier ses éventuels partenaires d'interaction. Ainsi, plusieurs candidats potentiels ont été proposés tels que la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Kurschner and Morgan, 1995), la protéine chaperonne Hsp60 (Edenhofer et al., 1996), l'héparine (Gabizon et al., 1993), la laminine et le récepteur de la laminine (Gauczynski et al., 2001) et la protéine liée au stress STI1 (stress-inducible protein 1) (Zanata et al., 2002). Cependant, aucune de ces études n'a permis de clairement établir une fonction liée à la PrP^c. Globalement, la fonction physiologique exacte de la PrP^c reste encore à déterminer, bien que quelques hypothèses aient été avancées dans la littérature.

- La PrP^c comme molécule de signalisation cellulaire ?

La colocalisation prédominante de la PrP^c au niveau des synapses, plus précisément au niveau des microdomaines riches en cholestérol de la membrane plasmique, avec de nombreux récepteurs a permis d'émettre l'hypothèse qu'elle pourrait jouer un rôle dans la signalisation cellulaire. Cette idée s'est trouvée confortée par les travaux montrant une interaction fonctionnelle entre la PrP^c et une tyrosine kinase de la famille Src appelée fyn ([Mouillet-Richard et al., 2000](#); [Santuccione et al., 2005](#)). De nombreuses équipes ont émis l'hypothèse selon laquelle la PrP^c pourrait avoir des propriétés neurotrophiques et favoriser la croissance des axones et la formation des synapses. Récemment, des études ont montré que l'incubation de neurones dérivés de l'hippocampe de rat avec de la PrP^c recombinante de hamster conduit à une augmentation significative du nombre de neurones ayant des axones différenciés, une hausse de treize fois le nombre de neurones ayant des dendrites différenciés et de cinq fois la longueur des axones et la formation des circuits neuronaux ([Kanaani et al., 2005](#)). En revanche, ni les fragments amino-terminal (23-98) et carboxy-terminal (90-231) dérivés de la PrP^c, ni la protéine apparentée à la PrP^c appelée Doppel n'induisent de tels changements morphologiques des neurones ([Kanaani et al., 2005](#)). De plus, des inhibiteurs de la voie protéine kinase C et de la voie Fyn bloquent les effets médiés par cette PrP^c recombinante ([Kanaani et al., 2005](#)). D'autre part, de récents travaux ont montré que la PrP^c a des effets positifs sur la prolifération neuronale dans la zone subventriculaire et dans le gyrus denté chez la souris adulte en comparaison avec des souris du même âge invalidées pour la PrP^c ([Steele et al., 2006](#)). Pris ensemble, ces travaux indiquent que la PrP^c pourrait jouer un rôle de transduction de signal en partenariat avec des molécules telle que p59Fyn, aboutissant à réguler positivement la neurogenèse. Cependant, l'existence d'un tel mécanisme impliquant p59Fyn reste à démontrer *in vivo*.

- Un rôle de la PrP^c dans l'homéostasie du cuivre?

La partie amino-terminale de la PrP^c est une structure flexible impliquée dans la liaison avec de nombreux ligands, notamment avec les ions cuivre ([Brown et al.,](#)

1997a; Viles et al., 1999). Cette liaison se fait par l'intermédiaire de résidus histidines dont six d'entre eux (la majorité de ces histidines sont localisées dans les séquences octapeptidiques en position amino-terminale) ont une forte affinité de liaison avec le cuivre (Jackson et al., 2001).

De manière intéressante, des souris invalidées pour la PrP^c présentent une baisse d'environ 50% de la concentration en cuivre au niveau des synaptosomes, suggérant une implication de la PrP^c dans la régulation de l'homéostasie du cuivre (Kretzschmar et al., 2000). D'autre part, l'addition de cuivre à des neuroblastomes en culture entraîne l'endocytose de la PrP^c (Pauly and Harris, 1998). Cette dernière pourrait ainsi servir de transporteur de cuivre du compartiment extracellulaire vers le compartiment intracellulaire, contribuant ainsi à réguler son équilibre. En accord avec ces travaux, on observe une baisse de l'activité antioxydante de la superoxyde dismutase 1 (SOD1) qui est dépendante du cuivre et du zinc, dans des cerveaux dérivés de souris invalidées pour la PrP^c (Brown et al., 1997b) et à l'inverse, il y a une augmentation de l'activité SOD1 et de la concentration en cuivre dans des souris surexprimant la PrP^c (Brown and Besinger, 1998). Cependant, ces résultats ont été infirmés par d'autres équipes qui n'observent ni de modulation du niveau de cuivre dans des fractions subcellulaires, ni de modulation de l'activité SOD1 dérivée de souris sauvages, invalidées pour la PrP^c ou surexprimant la PrP^c de façon importante (Waggoner et al., 2000).

- Un rôle de la PrP^c dans la survie cellulaire ou l'apoptose?

Plusieurs travaux ont montré l'implication de la PrP^c dans la régulation de la survie cellulaire. En effet, la PrP^c interagit avec la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Kurschner and Morgan, 1995). De plus, des neurones primaires dérivés de souris invalidées pour la PrP^c sont moins résistants à la déprivation en sérum que les cellules contrôles, et ce phénotype est réversé par la surexpression de Bcl-2 (Kuwahara et al., 1999). Par ailleurs, la PrP^c protège des cultures primaires de neurones contre la mort cellulaire médiée par Bax de façon dépendante de sa région amino-terminale (Bounhar et al., 2001).

En revanche, des travaux effectués dans notre laboratoire montrant que l'expression de la PrP^c entraîne une augmentation de la toxicité et de l'apoptose induites par la staurosporine via un mécanisme impliquant la protéine p53 sont en contradiction avec un rôle protecteur de la PrP^c (Paitel et al., 2003). Des cultures primaires de neurones dérivés d'embryons de souris Zrch-1 portant une mutation invalidante sur le gène PRNP, présentent une baisse drastique de l'activité de type caspase-3, mais également une diminution significative du niveau d'expression et de l'activité transcriptionnelle de p53, des observations qui sont en accord avec la réduction de l'expression de p53 observée dans des cerveaux de souris Prnp^{-/-} (Paitel et al., 2004). De manière intéressante, la délétion de la PrP^c entraîne une augmentation de l'immunoréactivité de Mdm2 et une baisse de la phosphorylation de la MAPK p38 (Paitel et al., 2004). Pris ensembles, ces résultats permettent d'émettre l'hypothèse selon laquelle la PrP^c pourrait contrôler la mort cellulaire dépendante de la caspase 3 via la régulation de l'expression et de l'activité de p53.

Ainsi, de façon paradoxale, la PrP^c semble jouer un rôle aussi bien dans des phénomènes de neurotoxicité que de neuroprotection (Harris and True, 2006). D'une part, la PrP^c protège les cellules contre des stimuli pro-apoptotiques (Kawahara et al., 1999; Brown et al., 2002; Diarra-Mehrpour et al., 2004; McLennan et al., 2004; Spudich et al., 2005) et d'autre part elle promeut la mort cellulaire sous certaines conditions expérimentales (Brown et al., 1994; Solfrosi et al., 2004; Sunyach and Checler, 2005). Par ailleurs, des études faites sur des souris transgéniques qui surexpriment des formes de PrP tronquées en position N-terminale (la PrP Δ 32-134 et la PrP Δ 32-121 collectivement appelées PrP Δ N) apportent une preuve supplémentaire du double rôle biologique de la PrP^c. Ces souris développent une ataxie et subissent une neurodégénération caractérisée par de l'apoptose massive au niveau des cellules du cervelet (Shmerling et al., 1998; Flechsig et al., 2003). Ce phénotype est observé seulement chez les souris Prnp^{-/-} et la réintroduction du gène prévient la neurodégénération chez les souris transgéniques (PrP Δ N), indiquant que la délétion spécifique de certaines régions amino-terminales de la protéine conduit à une neurotoxicité. Plusieurs observations apportent l'évidence que la séquence 106-126 de la PrP^c est importante dans le déterminisme des propriétés neurotoxiques ou

neuroprotectives de la protéine : 1/ Des souris transgéniques surexprimant la PrP contenant des délétions courtes dans la région amino-terminale (PrP Δ 32-80, PrP Δ 32-93, PrP Δ 32-106) sont normales, tandis que des délétions plus longues (PrP Δ 32-121, PrP Δ 32-134) conduisent à un phénotype neurodégénératif (Shmerling et al., 1998); 2/ Le peptide synthétique PrP106-126 est toxique pour des cellules neuronales dérivées de souris Prnp^{+/+}, en revanche, il est sans effet sur celles dérivées de souris Prnp^{-/-} (Forloni et al., 1993; Brown et al., 1994). Ainsi, la séquence 106-126 semble matérialiser une zone d'interaction de la PrP^c avec un hypothétique récepteur, dont la délétion génère un dominant négatif qui initie un signal intracellulaire neurotoxique (Baumann et al., 2007; Li et al., 2007). Il serait très intéressant par la suite d'examiner le comportement et le phénotype de souris PrnP^{-/-} qui surexpriment les fragments C1 ou N1, dérivés du clivage physiologique de la PrP^c.

- Le catabolite C1 dans la régulation de la mort cellulaire (Article1)

La PrP^c subit un clivage physiologique en position 111/112 qui génère un fragment appelé N1 et à sa contrepartie carboxy-terminale appelée C1 qui reste ancrée à la membrane (Chen et al., 1995; Laffont-Proust et al., 2005) (Voir Figure 6). En revanche, dans des cerveaux atteints de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, une coupure additionnelle intervient en position 90/91, générant ainsi les fragments appelés N2 et C2 (Chen et al., 1995) (Voir Figure 7). Dans la présente étude, l'effet des fragments C1 et C2 sur la mort cellulaire induite par la staurosporine a été étudié via l'établissement de cellules HEK293 surexprimant de manière stable ces deux fragments dérivés du clivage de la PrP^c.

- La surexpression de C1 sensibilise les cellules HEK293 à la mort cellulaire induite par la staurosporine

Les cellules HEK293 surexprimant de manière stable le fragment C1 ou la PrP^c entière présentent une susceptibilité accrue à la mort cellulaire induite par la staurosporine tandis que les transfectants C2 présentent le même phénotype que les cellules contrôles. De manière intéressante, les analyses faites par marquage TUNEL

suggèrent l'implication de la voie apoptotique dans la mort cellulaire induite par le fragment C1 ou par la PrP^c.

- La PrP^c et son catabolite C1 exacerbent la mort cellulaire par apoptose induite par la staurosporine

Pour confirmer l'implication de la voie apoptotique dans la mort cellulaire induite par la PrP^c ou par son catabolite C1, l'activité de la caspase-3 a été mesurée dans différents systèmes cellulaires. Les résultats montrent clairement une augmentation de l'activité caspase-3 dans les cellules HEK293 surexprimant de manière stable la PrP^c ou le C1, alors que les transfectants C2 restent inertes. De plus, les mêmes résultats sont obtenus par transfections transitoires dans les cellules TSM1, qui sont des neurones dérivés du cortex de souris, suggérant que les phénotypes observés associés à la PrP^c et à son catabolite C1 ne sont pas spécifiques d'un système cellulaire.

- Le blocage de l'endocytose n'abroge pas le phénotype apoptotique associé à C1

Il a été récemment montré dans notre laboratoire que l'activation de la caspase-3 induite par la PrP^c passe par un mécanisme d'internalisation dépendante de la clathrine ([Sunyach and Checler, 2005](#)). Le blocage de l'internalisation par un traitement hypertonique des transfectants C1 n'abroge pas le phénotype apoptotique induite par la staurosporine et l'activation de la caspase-3 associés à ce fragment dans des cellules HEK293. Ces résultats montrent que l'apoptose induite par le fragment C1, à l'inverse de la PrP^c, n'est pas régulée par un mécanisme d'endocytose.

- Le fragment C1 module p53 au niveau transcriptionnel et au niveau post-transcriptionnel

Il a été montré au laboratoire que l'apoptose médiée par la PrP^c et induite par la caspase-3 passe par la modulation de l'expression et de l'activité de p53 ([Paitel et al., 2004](#)). De manière intéressante, il y a une augmentation de l'activité de p53 dans les cellules HEK293 surexprimant la PrP^c ou le fragment C1, alors qu'il n'y a aucune modification phénotypique notable chez les btransfectants C2. De plus, les résultats

montrent une augmentation des niveaux de transcrits de p53 de façon concomitante avec une activité transcriptionnelle élevée de son promoteur. Par ailleurs, l'invalidation de p53 abroge l'activation de la caspase-3 induite par le fragment C1. Pris ensemble, ces résultats indiquent clairement que le phénotype apoptotique associé à C1 passe par un mécanisme d'activation qui est totalement dépendant de p53.

L'ensemble de ces résultats démontre de façon probante l'implication du catabolite C1 dans la régulation de la mort cellulaire dépendante de p53. Il serait très intéressant par la suite d'essayer d'identifier les partenaires moléculaires impliqués dans ces processus permettant d'une part à la PrP^c et d'autre part à son catabolite C1 d'initier deux voies à priori distinctes qui aboutissent à l'activation des mêmes partenaires moléculaires et à la régulation de la survie cellulaire. Il serait également intéressant à plus long terme d'évaluer les effets d'une surexpression des catabolites C1 ou C2, mais aussi de leurs contreparties amino-terminales N1 et N2 chez des souris afin de voir si elles développent un phénotype particulier.

Article 1

"The C-terminal products of cellular prion protein processing, C1 and C2, exert distinct influence on p53-dependent staurosporine-induced caspase-3 activation".

Sunyach C., Cissé MA., Da Costa C.A., Vincent B., Checler F.

J Biol Chem. 2007 Jan 19; 282(3):1956-63

II/ METABOLISME DE LA PROTEINE PRION

II/ 1. Les disintégrines

- Généralités

Les métalloprotéases de la famille ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) ou "disintégrines" sont des adamalysines faisant partie du groupe des Metzincines qui comprend également les ADAMs à motifs ThromboSpondin (ADAMTS) et les métalloprotéases de la matrice extracellulaire (MMPs). Ces enzymes se retrouvent chez toutes les espèces animales, des protozoaires aux mammifères. Les premières disintégrines qui ont été découvertes sont les sous-unités de la protéine hétérodimérique de sperme appelée fertiline, ADAM1 et ADAM2 (Blobel et al., 1992; Wolfsberg et al., 1993), depuis, une quarantaine de membres ont été répertoriés chez les mammifères (Yang et al., 2006). Certains des gènes codant pour des disintégrines donnent lieu à plus d'une protéine, dû à l'épissage alternatif de leur ARN messager, dont certaines sont sécrétées dans le milieu extracellulaire, tandis que d'autres sont associées à la membrane plasmique par l'intermédiaire d'un domaine transmembranaire.

- Structure des disintégrines

Les ADAMs sont des protéines transmembranaires de type I qui ont une structure assez caractéristique constituée de plusieurs domaines leur conférant des propriétés de protéolyse, d'adhésion et de signalisation (Primakoff and Myles, 2000). Cette structure très conservée à travers les espèces comprend un peptide signal, un prodomaine, un domaine métalloprotéase, un domaine disintégrine, un domaine riche en cystéines, un domaine EGF, un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique (Voir Figure 4). Seule la moitié des disintégrines possède une activité catalytique portée par leur domaine métalloprotéase. Ce domaine contient une séquence consensus, HEXXH (X représente un acide aminé quelconque), qui porte le site catalytique actif ou inactif selon l'état de liaison de l'ion zinc avec le prodomaine. Parmi les 33 ADAMs répertoriées chez les mammifères, 17 sont

exprimées principalement au niveau du système nerveux central (Yong et al., 2001), tandis que d'autres se retrouvent essentiellement au niveau des testicules et de certains tissus périphériques (Choi et al., 2003; Puente et al., 2003) (Voir Table 2). Parmi les disintégrines exprimées dans le cerveau, seulement 10 sont catalytiquement actives, c'est-à-dire capables de cliver les protéines à la membrane plasmique.

- **Le prodomaine:** De manière générale, les disintégrines sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs. Sous cette forme, le prodomaine est lié, par l'intermédiaire d'un résidu cystéine, à un ion zinc contenu dans le site catalytique du domaine métalloprotéase de l'enzyme, maintenant ainsi la protéine dans un état catalytiquement inactif. La protéine subit ensuite des modifications post-traductionnelles telles que le clivage de la séquence signal et des glycosylations au niveau du réticulum endoplasmique. Elle est ensuite aiguillée vers le réseau golgien où elle incorpore des résidus carbohydrates, puis elle est déletée de son prodomaine par l'intermédiaire d'enzymes de type proprotéines convertases qui reconnaissent une séquence contenant un doublet basique (voir chapitre "**maturation des disintégrines**"), libérant de ce fait son site catalytique, lui permettant ainsi d'acquérir sa forme active. Le prodomaine sert également à maintenir la protéine dans une conformation lui permettant d'être reconnue de manière spécifique par les proprotéines convertases.

- **Le domaine métalloprotéase :** Certaines protéines peuvent être clivées à la membrane plasmique, entraînant le relargage d'un fragment dans le milieu extracellulaire. Ce mécanisme majoritairement médié par les disintégrines via leur domaine métalloprotéase a été observé pour de nombreuses protéines telles que la cytokine TNF- α (Black et al., 1997), la molécule d'adhésion L-selectine (Li et al., 2006), et des protéines associées à des maladies neurodégénératives comme la PrP^c (Vincent et al., 2001) ou la β APP (Koike et al., 1999).

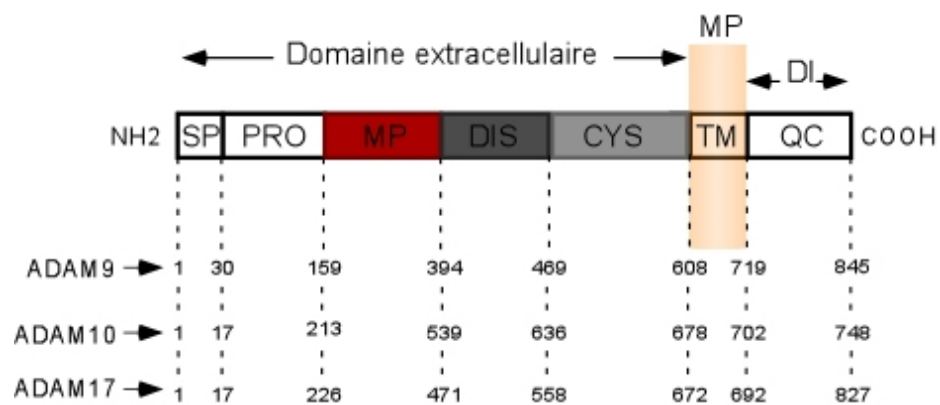


Figure 4 : Structure des disintégrines. Les numéros des acides aminés correspondant à chaque domaine sont représentés (SP, peptide signal; PRO, Prodomaine; MP, Domaine metalloprotéase ; CYS, Domaine riche en cystéines; TM, domaine transmembranaire; QC, Queue cytoplasmique; MP, Membrane plasmique; DI, Domaine intracellulaire)

La régulation de la localisation des protéines à la membrane plasmique serait un moyen de les confiner et de restreindre leurs activités biologiques à un microenvironnement donné, tandis que leur clivage par les disintégrines conduit au largage de fragments dans le milieu extracellulaire, donnant lieu à une régulation de type paracrine. Il y a peu d'informations disponibles sur les spécificités de clivage liées aux disintégrines, mais il semble que le facteur déterminant soit la distance du site de clivage du substrat par rapport à la membrane plutôt qu'une séquence spécifique en acides aminés (Sisodia, 1992).

- **Le domaine disintégrine** : Ce domaine d'environ 90 acides aminés très conservé à travers les espèces est impliqué dans les phénomènes d'adhésion cellulaire, mais intervient aussi dans la régulation de l'activité catalytique des disintégrines (Blobel, 1997). Tous les membres de la famille ADAM contiennent au niveau de ce domaine trois cystéines contenues dans une boucle très conservée de 14 résidus. Plusieurs travaux montrent que cette séquence permet à l'enzyme d'interagir avec les intégrines de la matrice extracellulaire, mais les mécanismes moléculaires contrôlant ces interactions ne sont pas bien connus.

- **Le domaine riche en cystéines** : Ce domaine est commun à toutes les disintégrines et semble impliqué dans la régulation de leurs activités biologiques et dans les processus d'adhésion cellulaire. Ce domaine en partenariat avec le domaine disintégrine permet aussi à l'enzyme d'interagir avec les protéoglycans cellulaires.

- **La queue cytoplasmique** : Ce domaine est très hétérogène en longueur et en séquence et contient des motifs SH3 qui semblent impliqués dans la régulation de l'activité des disintégrines (Weskamp et al., 1996). Ainsi, de nombreuses protéines interagissent avec ces enzymes via leur queue cytoplasmique, modulant ainsi leur localisation et leur activité (voir chapitre "Régulation des disintégrines") (Howard et al., 1999; Cousin et al., 2000).

ADAM	Autres noms	Activité protéase	Expression
ADAM1	Fertilin α	Active	Testicule
ADAM2	Fertilin β	Inactive	Testicule
ADAM3	Cyritestin	Inactive	Testicule
ADAM4		Inactive	Testicule
ADAM5		Inactive	Testicule
ADAM6		Inactive	Testicule
ADAM7		Inactive	Epididyme
ADAM8	CD156/MS2	Active	Monocytes, granulocytes, neurones, astrocytes
ADAM9	Meltrin γ	Active	Mésenchyme, cerveau, coeur
ADAM10	MADM, Kuzbanian	Active	Ubiquitaire
ADAM11	MDC	Inactive	Neurones, astrocytes
ADAM12	MCMP, Meltrin α	Active	Ubiquitaire
ADAM13 (<i>Xenopus</i>)			Crête neurale
ADAM14 (<i>C.elegans</i>)			
ADAM15		Active	SNC, poumons
ADAM17	TACE	Active	Ubiquitaire
ADAM18	ADAM27	Inactive	Testicule
ADAM19	Meltrin β	Active	Ubiquitaire
ADAM20		Active	Testicule
ADAM21	ADAM31	Active	Testicule
ADAM22	MDC2	Inactive	Cerveau
ADAM23	MDC3	Inactive	Cerveau
ADAM24	Testase-1	Active	Testicule
ADAM25	Testase-2	Active	Testicule
ADAM26	Testase-3	Active	Testicule
ADAM27	ADAM18	Inactive	Testicule
ADAM28		Active	Lymphocytes, poumons, épидидyme
ADAM29		Inactive	Testicule
ADAM30		Inactive	Testicule
ADAM31	ADAM21	Active	Testicule
ADAM32		Inactive	Testicule, épидидyme
ADAM33		Active	Cerveau, poumons, testicule, coeur, rein

Table 2 : Nomenclature et tissus d'expression des disintégrines

(D'après Novak, 2004)

- Maturation des disintégrines : implication des proprotéines convertases

Le clivage du prodomaine d'une disintégrine est la condition *sine quanon* pour que cette dernière devienne mature et acquiert son activité catalytique. Cette étape de maturation est dépendante des proprotéines convertases (PCs) telles que la PC7 ou la furine et se fait pendant l'adressage de l'enzyme à la membrane plasmique. En effet, la furine colocalise avec les disintégrines au niveau du complexe réticulum/golgi et l'incubation du précurseur d'ADAM9 avec de la furine recombinante *in vitro* conduit au clivage de son prodomaine, générant ainsi une enzyme dite "mature" (Roghani et al., 1999). La surexpression de la PC7 ou de la furine dans des cellules HEK293 conduit à une augmentation très importante de la forme mature d'ADAM10 et d'ADAM17 et au clivage subséquent de la β APP au niveau de son site α (Endres et al., 2003). Ces résultats permettent d'affirmer que les PCs sont les principales enzymes responsables de la maturation des disintégrines.

Les PCs constituent une large famille de protéases à sérines qui reconnaissent en règle générale les doublets basiques d'une séquence peptidique. Cette famille d'enzymes comprend 7 membres parmi lesquels la furine, PC1/PC3, PC2, PACE4, PC4, PC5/PC6 et PC7/PC8/LPC (Steiner, 1998). La furine qui est principalement localisée au niveau du réseau golgien active un large panel de protéines précurseurs dont BACE (β -site APP Converting Enzyme) (Creemers et al., 2001), la MMP-11 (Pei and Weiss, 1995) ou le facteur de Von Willebrand (Wise et al., 1990). La furine est une protéine transmembranaire de type I synthétisée sous la forme d'un zymogène de 96 Kda qui subit une activation intramoléculaire autocatalytique conduisant à la formation de la protéine active d'environ 90 Kda (Leduc et al., 1992). Ce processus d'activation autoprotéolytique a été rapporté pour de nombreux zymogènes tels que la cathepsine D (Conner et al., 1989) ou la cathepsine E (Athauda et al., 1991). La furine se retrouve aussi au niveau de la membrane plasmique où elle peut être clivée, ce qui génère un fragment sécrété dans le milieu extracellulaire qui conserve une activité protéolytique (Vidricaire et al., 1993). La furine est capable de cliver la pro-ADAMTS9 à la membrane plasmique (Koo et al., 2006), donnant une dimension nouvelle à la conception classique selon laquelle les PCs n'activent leurs substrats qu'au niveau des compartiments intracellulaires. De manière intéressante, des souris

invalidées pour la furine ne sont pas viables (Scamuffa et al., 2006). Cela paraît peut surprenant au regard de la pléthore de molécules ciblées par les PCs de façon générale, parmi lesquelles des métalloprotéases, des molécules d'adhésion et des facteurs de croissance (Logeat et al., 1998; Siegfried et al., 2003).

- Fonctions des disintégrines

Les disintégrines sont impliquées dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que la migration cellulaire (Arribas et al., 2006), la croissance axonale (Naus et al., 2004) ou la spermatogenèse (Zhu et al., 1999). Ces enzymes multifonctionnelles ont fait l'objet d'une attention toute particulière ces dernières années dans des domaines aussi variés que la tumorigenèse, les maladies neurodégénératives ou les maladies liées au système immunitaire. Nous nous focaliserons essentiellement sur ADAM9, ADAM10 et ADAM17 qui sont les enzymes majeures participant directement ou indirectement aux coupures physiologiques des protéines PrP^c et β APP.

- **ADAM9** : Cette disintégrine aussi appelée MDC9 ou meltrin γ est très conservée chez l'homme, la souris et le xénope, suggérant un rôle physiologique important de la protéine. Le gène codant pour cette enzyme est localisé sur le chromosome 8p11.21 chez l'homme. ADAM9 est synthétisée comme un précurseur inactif d'environ 110 KDa qui subit un clivage de son prodomaine par les proprotéines convertases dans le réseau transgolgien, conduisant à sa forme mature de 84 KDa qui est principalement localisée à la surface cellulaire. Elle est exprimée par les cellules mésenchymateuses, le cœur et le cerveau (Novak, 2004). De manière intéressante, il y a une expression importante d'ADAM9 dans de nombreux carcinomes humains affectant le foie (Tannapfel et al., 2003), le pancréas (Grutzmann et al., 2004), la prostate (Peduto et al., 2005) et le système gastro-intestinal (Carl-McGrath et al., 2005). En effet, des études récentes montrent qu'ADAM9 est capable de cliver l'EGF (Epithelial Growth Factor), une protéine ayant un rôle établi dans les cancers de la prostate, conduisant à l'activation de son récepteur EGFR et à la prolifération des cellules épithéliales (Izumi et al., 1998). Par ailleurs, ADAM9 régule les taux intracellulaires de la

cadhérine épithéliale en empêchant son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (Hirao et al., 2006), fournissant une corrélation supplémentaire entre le niveau d'expression de la disintégrine et la progression des tumeurs malignes. De façon générale, ADAM9 pourrait constituer un bon marqueur biologique pour certains cancers et faire l'objet d'une thérapie visant à inhiber son activité dans ce paradigme. Des souris invalidées pour MDC9 sont viables et fertiles (Voir Table 3) et ne manifestent aucun changement phénotypique apparent ni de dysfonctionnements du point de vue physiologique (Weskamp et al., 2002). Ces résultats laissent à penser que malgré son expression ubiquitaire, cette protéine n'a pas un rôle essentiel ou que d'autres membres de cette famille d'enzymes pourraient compenser son invalidation.

- **ADAM10** : La première disintégrine a été isolée et caractérisée en 1989 à partir de membranes myéliniques dérivées de cerveaux bovins, par des chercheurs anglais (Chantry et al., 1989). La séquence de cette protéine purifiée a servi par la suite à synthétiser des oligonucléotides et à cribler une banque d'ADNc de cerveaux bovins, permettant ainsi le clonage de la première disintégrine dérivée d'un mammifère et qui sera nommée MADM (Mammalian Disintegrin-Metalloprotease) ou ADAM10. Cette enzyme aussi appelée kuzbanian chez la drosophile est très conservée chez les différentes espèces animales.

ADAM10 clive une large variété de protéines impliquées dans les phénomènes d'adhésion cellulaire, notamment les cadhérines qui jouent un rôle très important durant l'embryogenèse (Reiss et al., 2005). ADAM10 régule la fonction des récepteurs appelés Eph faisant partie de la sous-familles des récepteurs tyrosine kinase, et leurs ligands appelés ephrins qui sont des médiateurs des communications cellule-cellule régulant la motilité, l'adhésion et la forme des cellules (Poliakov et al., 2004). Ainsi, des travaux récents ont montré qu'ADAM10 s'associe avec EphA3 par l'intermédiaire d'un motif moléculaire reconnu par le domaine riche en cystéines de l'enzyme après la liaison en position trans du ligand ephrin-A5 au complexe, permettant ainsi sa protéolyse (Janes et al., 2005).

Notch qui joue un rôle essentiel dans la mise en place des cellules neuronales et non neuronales durant le développement des systèmes nerveux central et périphérique

est aussi un substrat d'ADAM10 (Rooke et al., 1996). Après la liaison de son ligand situé en position trans, notch subit un premier clivage au site appelé S1 par une proprotéine convertase de type furine qui génère deux fragments (Blaumueller et al., 1997; Logeat et al., 1998). Ensuite intervient un second clivage au site S2 par ADAM10 qui conduit à la formation d'un fragment appelé NEXT (Notch Extracellular Truncation). Ce dernier subit alors un clivage au site appelé S3 par la γ -sécrétase, entraînant le relargage du domaine intracellulaire de Notch (NICD) qui transloque au noyau et sert de facteur de transcription (Kopan, 2002). Chez la drosophile, la coupure au site S2 est principalement médiée par kuzbanian (Lieber et al., 2002), tandis que chez les vertébrés, en plus d'ADAM10, le clivage au site S2 fait également intervenir ADAM17 (Brou et al., 2000). Des souris ADAM10^{+/-} arborent un phénotype normal et sont fertiles, alors que les souris ADAM10^{-/-} meurent au jour 9.5 de l'embryogenèse avec des défauts majeurs de mise en place du système nerveux central, des somites et du système cardiovasculaire, qui s'accompagnent d'une réduction importante de l'expression des gènes cibles de la voie Notch (Hartmann et al., 2002).

- **ADAM17/TACE** : ADAM17 est exprimée de façon ubiquitaire dans l'organisme et son gène est localisé sur le chromosome 2q52.2 chez l'homme. Cette disintégrine est la mieux caractérisée du fait de son implication dans le clivage de la cytokine pro-inflammatoire TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) qui est associée à plusieurs maladies auto-immunes telles que les arthrites (Vassalli et al., 1992) ou la maladie de Crohn (Locksley et al., 2001). De manière intéressante, des souris invalidées pour ADAM17 (Voir Table 3) meurent entre le 17^{ème} jour du stade embryonnaire et le 1^{er} jour post-natal (Peschon et al., 1998), suggérant un rôle important de l'enzyme pendant le développement. ADAM17 a récemment été impliquée dans le clivage du récepteur de l'hormone de croissance NGF (Nerve Growth Factor) appelé TrkA (Diaz-Rodriguez et al., 1999) ou dans le clivage de Notch au site S2 (Brou et al., 2000). Par ailleurs, ACE2 (Angiotensin Converting Enzyme 2) qui est une protéine impliquée dans la régulation de la pression sanguine (Turner and Hooper, 2002) ou

de la fonction cardiaque (Crackower et al., 2002), est également clivée par ADAM17 (Lambert et al., 2005).

- Régulation de l'activité des disintégrines

Les disintégrines régulent de nombreux processus physiologiques, il est donc crucial pour la cellule de contrôler leurs fonctions. Cette régulation se fait par la modulation de la localisation et de l'activité de l'enzyme. Les disintégrines catalytiquement actives contiennent des sites consensus d'interaction avec des protéines kinases ou des protéines cargos au niveau de leurs queues cytoplasmiques, permettant la modulation de leurs fonctions. La queue cytoplasmique d'ADAM17, comme pour la majorité des disintégrines, contient un motif d'interaction potentiel avec des protéines à domaine SH3 (Src homology 3) (Black et al., 1997). Par ailleurs, ADAM17 est capable de se lier à la protéine PTPH1 via son domaine PDZ, entraînant une baisse de son activité (Zheng et al., 2002). Il a également été montré qu'ADAM9 et ADAM15 interagissent avec l'endophiline et SH3PX1, des molécules impliquées dans la régulation de la localisation subcellulaire et le transport vers la membrane plasmique de plusieurs protéines (Howard et al., 1999).

La phosphorylation des protéines sur des résidus sérine, thréonine ou tyrosine constitue un phénomène physiologique majeur permettant de réguler de nombreuses voies de signalisation intracellulaire. Ainsi, il a été montré qu'ADAM17 peut être phosphorylée sur sa queue cytoplasmique suite à une activation de la voie PKC *in vitro* (Diaz-Rodriguez et al., 2002). ADAM9 interagit avec la PKC δ , ce qui conduit à sa phosphorylation et à l'augmentation de son activité qui se traduit par un clivage accru de HB-EGF suite à une stimulation des cellules COS par du PMA (Izumi et al., 1998). De manière intéressante, ADAM12 et la PKC ϵ interagissent de manière directe et le traitement de cellules dérivées de rhabdomyosarcomes humains avec des esters de phorbol entraîne une translocation d'ADAM12 à la membrane cellulaire, modulant ainsi son activité catalytique (Sundberg et al., 2004).

ADAM	Phénotype des souris -/-	Références
ADAM9	Pas de phénotype	(Weskamp et al., 2002)
ADAM10	Létal	(Hartmann et al., 2002)
ADAM11	Pas de phénotype	(Sagane et al., 1999)
ADAM12	Viable et fertile	(Kurisaki et al., 2003)
ADAM17	Létal	(Peschon et al., 1998)
ADAM22	Ataxie	(Sagane et al., 1999)
ADAM23	Létal	(Leighton et al., 2001)
ADAM33	Pas déterminé	

Table 3 : Souris invalidées pour les disintégrines et leur phénotypes
(D'après Novak, 2004)

Ces résultats démontrent clairement l'implication de la voie PKC dans la régulation de l'activité des disintégrines. Il a été également montré qu'ADAM17 et ERK interagissent de façon directe, ce qui conduit à la phosphorylation de la thréonine 735 située sur sa queue cytoplasmique, suite à une stimulation des cellules CHO (Diaz-Rodriguez et al., 2002) ou COS-7 (Soond et al., 2005) par des esters de phorbol.

De manière générale, la régulation de l'activité catalytique des disintégrines qui se traduit par le clivage de diverses protéines au niveau de la membrane se fait de manière constitutive, mais également suite à divers stimuli tels que les hormones de croissance qui activent les voies MAPK et PKC, ainsi que les variations de concentrations calciques intracellulaires.

II/ 2. Rôle des Disintégrines dans le métabolisme de la β APP

- Généralités

La β APP (β -Amyloid Precursor Protein) est une glycoprotéine transmembranaire de type I exprimée de manière ubiquitaire par l'organisme, et de façon majoritaire dans le cerveau (Kitaguchi et al., 1988; Palmert et al., 1988; Tanzi et al., 1988). Cette protéine est impliquée dans l'adhésion cellulaire (Breen et al., 1991), la plasticité et la transmission synaptique (Mucke et al., 1994), l'apprentissage et la mémoire (Dawson et al., 1999; Turner et al., 2003). La β APP subit des clivages séquentiels à des sites appelés β , γ et ϵ par des activités appelées sécrétases qui conditionnent la voie dite "amyloïdogénique" (Voir Figure 5). Ces activités protéolytiques conduisent à la formation d'un peptide de 40 à 42 acides aminés appelé $A\beta$ qui est le composé majeur des plaques séniles extracellulaires dans des cerveaux atteints de la maladie d'Alzheimer (Haass and Selkoe, 1993). La coupure β -sécrétase intervient au niveau du domaine extracellulaire de la β APP par l'intermédiaire d'une protéase à aspartates appelé BACE, entre la méthionine 596 et l'aspartate 597, générant un fragment amino-terminal sécrété appelé sAPP β et sa contrepartie carboxy-terminale appelée C99 (Vassar and Citron, 2000). Ce fragment est ensuite clivé par la γ -sécrétase en position 40-42 pour générer la $A\beta_{40-42}$ et les

fragments intracellulaires appelés AICDs (β APP IntraCellular Domains) qui peuvent agir comme facteurs de transcription (**Pardossi-Piquard et al., 2005**).

Le clivage de la β APP au site α intervient au milieu de la séquence du peptide $A\beta$, entre la lysine 613 et la leucine 614, en générant le fragment amino-terminal sAPP α qui est sécrété, et sa contrepartie carboxy-terminale appelé C83 (**Voir Figure 5**). Il a été montré que l'activation de la voie PKC par des esters de phorbol potentialise la sécrétion de sAPP α par des cellules en culture (**Gillespie et al., 1992; Bergamaschi et al., 1995**). Plusieurs équipes ont émis l'hypothèse selon laquelle la voie non amyloïdogénique peut être médiée par des récepteurs couplés aux protéines G, initiant ainsi deux voies dont l'une serait dépendante de la PKC (**Nitsch and Growdon, 1994; Racchi and Govoni, 1999**). La coupure de la β APP au site α n'est pas spécifique d'une séquence donnée, mais intervient dans un domaine en hélice α situé à une certaine distance par rapport à la membrane plasmique et conditionne la voie dite "non-amyloïdogénique" (**Sisodia, 1992**). Le fragment sécrété sAPP α qui résulte du clivage de la β APP par l'activité α -sécrétase a des propriétés neurotrophiques et neuroprotectrices (**Luo et al., 2001**). Les premiers travaux impliquant des disintégrines dans la coupure de type α -sécrétase proviennent d'études pharmacologiques montrant que des inhibiteurs de métalloprotéases conduisent à une baisse de plus de 92% de la sécrétion de sAPP α par des lignées SH-5YSY dérivées de neuroblastomes humains (**Parvathy et al., 1998**). Il a ensuite été montré qu'ADAM17 est capable de cliver de la β APP recombinante au niveau de son site α (**Buxbaum et al., 1998**). Par ailleurs, des cellules invalidées pour ADAM17 ne sont plus capables de sécréter le fragment sAPP α de manière dépendante de la PKC, tandis que sa sécrétion constitutive reste inchangée (**Buxbaum et al., 1998**), indiquant clairement qu'ADAM17 est l'enzyme impliquée de manière exclusive dans la formation régulée par la PKC de sAPP α . D'autre part, l'activité constitutive de type α -sécrétase est significativement altérée dans des cellules HEK293 par une forme dominante négative d'ADAM10 arborant une mutation au sein de son site catalytique (**Lammich et al., 1999**) et la surexpression d'ADAM9 dans des cellules COS-7 augmente les sécrétions constitutive et régulée par la voie PKC du fragment sAPP α (**Koike et al., 1999; Asai et al., 2003**).

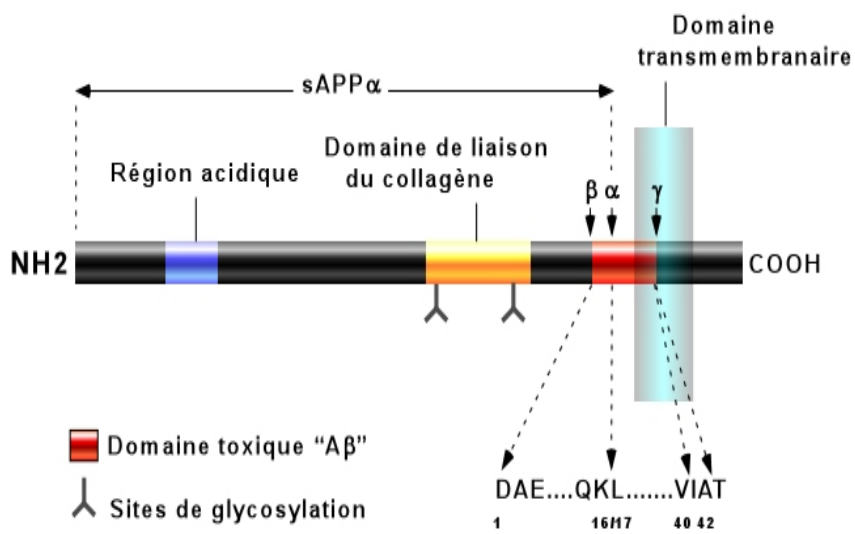


Figure 5 : Structure et clivage de la β APP. La β APP est séquentiellement clivée par les activités β et γ sécrétases pour générer le peptide neurotoxique A β . L'activité α -sécrétase qui intervient à l'intérieur de la séquence A β conduit à la sécrétion du fragment neurotrophique sAPP α

Des travaux menés au sein de notre laboratoire montrent également qu'ADAM10 est impliquée dans la formation constitutive de sAPP α dans des cellules LoVo déficientes en activité de type furine (Lopez-Perez et al., 2001).

Ainsi, l'ensemble de ces travaux démontre clairement l'implication des disintégrines ADAM9, ADAM10 et ADAM17 dans les métabolismes constitutif et régulé par la PKC de la β APP.

II/ 3. Rôle des Disintégrines dans le métabolisme de la PrP^c

- Généralités

La PrP^c subit un clivage physiologique en position 111/112 qui conduit à la formation d'un fragment sécrété appelé N1 et à sa contrepartie carboxy-terminale C1 qui reste ancrée à la membrane plasmique. Ce clivage a été mis en évidence dans des cerveaux humains (Chen et al., 1995, Laffont-Proust et al., 2005) et bovins (Zhao et al., 2006). Dans des cerveaux atteints de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, la PrP subit une coupure additionnelle en amont du site 110/111 qui génère un fragment amino-terminal appelé N2 et sa contrepartie carboxy-terminale C2 (Chen et al., 1995). Ce clivage intervient entre les acides aminés localisés en positions 90 et 91 et laisse intact le domaine 106-126 de la PrP^c. Par ailleurs, des traitements chroniques de cellules primaires dérivées de l'hippocampe de rat avec le peptide 106-126 conduit à une mort neuronale (Forloni et al., 1993). A des valeurs de pH acide, ce peptide a une propension à former des structures stables riches en feuillets β et acquiert la capacité de former des canaux ioniques dans des bicouches lipidiques reconstituées *in vitro* (Dupiereux et al., 2005). De plus, la toxicité du peptide 106-126 a été montrée *in vivo* par injection directe du fragment au niveau de l'oeil de rat (Ettaiche et al., 2000). La propension des peptides amyloïdogéniques à former de larges canaux membranaires non sélectifs, entraînant des changements du potentiel de membrane et affectant l'homéostasie ionique, et à s'agréger pourrait expliquer leur toxicité inhérente. Cependant, d'autres travaux stipulent que la toxicité du peptide 106-126 serait due à une association directe du peptide avec la partie extracellulaire du récepteur de la

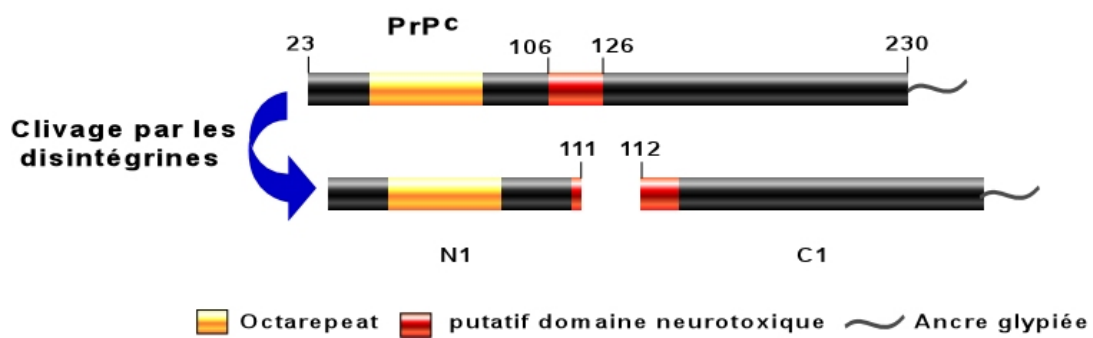


Figure 6 : Le clivage physiologique de la PrP^c par les disintégrine. Ce clivage intervient à l'intérieur de son domaine toxique 106-126, et conduit à la formation du fragment N1 qui est sécrété et de sa contrepartie C-terminale C1

neurotrophine p75, entraînant une induction de signal intracellulaire conduisant à l'apoptose (Della-Bianca et al., 2001). Gu et collaborateurs proposent l'hypothèse selon laquelle ce peptide formerait des microagrégats au niveau de la membrane plasmique, conduisant à l'internalisation et au transport de la PrP^c vers les lysosomes où elle favoriserait la synthèse de formes tronquées transmembranaires de PrP qui s'accumuleraient au niveau de la membrane plasmique (Gu et al., 2002). Cependant, il convient de noter que le peptide 106-126 n'est jamais retrouvé en l'état *in vivo*. Ainsi, l'ensemble de ces travaux démontrent clairement que la séquence 106-126 portée par la PrP^c véhicule une certaine toxicité inhérente pour les cellules et le clivage de la PrP^c au niveau des résidus 110/111, qui donne lieu au fragment sécrété N1, apparaît donc comme un moyen physiologique permettant de toucher à l'intégrité de cette séquence et de dépléter les cellules de sa toxicité. De plus, les observations selon lesquelles la PrP^c endogène est indispensable pour la mise en place du processus infectieux (Bueler et al., 1992; Bueler et al., 1993; Brandner et al., 1996) font de cette approche pharmacologique une stratégie thérapeutique qui pourrait également permettre d'empêcher ou de ralentir l'infection en modulant les niveaux endogènes de la protéine.

- ADAM10 et ADAM17 participent au clivage physiologique de la PrP^c

Des travaux effectués au sein du laboratoire montrent que la PrP^c est hydrolysée en position 111/112 de manière constitutive et régulée par les esters de phorbol (Vincent et al., 2000). La production de N1 est réduite de façon drastique suite à un traitement des cellules HEK293 ou TSM1 avec des inhibiteurs de métalloprotéases (Vincent et al., 2001). Par ailleurs, des cellules HEK293 qui surexpriment les disintégrines ADAM10 ou ADAM17 sécrètent de façon plus importante le fragment N1 que les cellules contrôles, et à l'inverse des fibroblastes déficientes pour ADAM10 ou ADAM17 ont des productions constitutive et régulée drastiquement réduites, respectivement (Vincent et al., 2001). Ces résultats indiquent clairement que les disintégrines ADAM10 et ADAM17 participent au clivage physiologique de la PrP^c qui conduit à la production de N1.

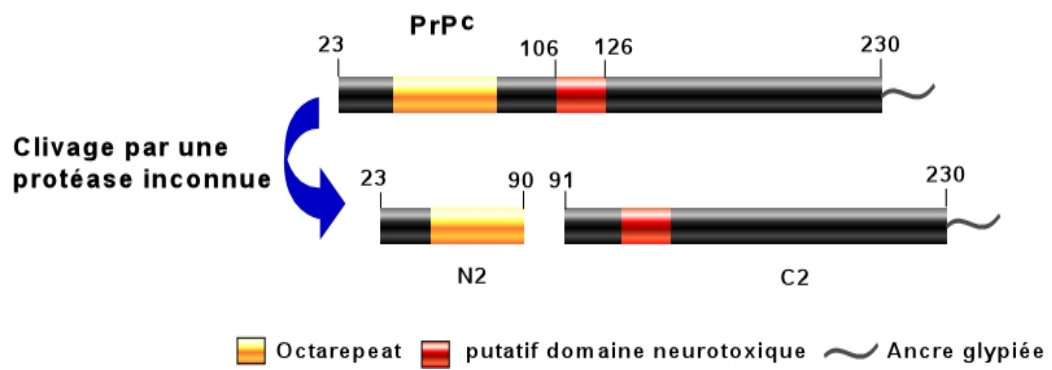


Figure 7 : Le clivage pathogénique de la PrP^c. Le clivage de la PrP^c en position 90/91 par une protéase non encore identifiée intervient en dehors de son domaine toxique 106-126, conduisant à la formation du fragment N2 qui est sécrété et de sa contrepartie C-terminale appelée C2

ADAM10 participe à la formation constitutive du fragment N1, tandis qu'ADAM17 est responsable de sa formation régulée par la voie PKC.

- ADAM9 contribue indirectement via ADAM10 au clivage physiologique de la PrP^c (Article 2)

Dans cette étude, nous avons mené des investigations sur la possibilité de l'implication d'une autre disintégrine, en dehors d'ADAM10 et d'ADAM17, dans la coupure physiologique de la PrP^c. En effet, des cellules invalidées pour ADAM10 restent capables de sécréter de manière constitutive le fragment N1, tandis que des inhibiteurs spécifiques de disintégrines abolissent presque totalement la formation de ce fragment, indiquant que vraisemblablement, les disintégrines sont les seules enzymes responsables du clivage de la PrP^c en position 111/112. Notre choix s'est porté sur ADAM9 car cette disintégrine est impliquée dans la coupure α -sécrétase de la β APP, et jusqu'à présent, un proche parallèle a été démontré entre les métabolismes de la PrP^c et de la β APP.

- La surexpression d'ADAM9 augmente la formation du fragment N1

Nous avons montré que la surexpression de la disintégrine ADAM9 de manière transitoire ou stable conduit à une augmentation significative de la formation de N1 dans des cellules HEK293 sans entraîner de modulation du niveau d'expression de la PrP^c, indiquant clairement que l'effet observé reflète une activité de protéolyse véhiculée par ADAM9 sur son substrat, et non une augmentation des taux endogènes de la PrP^c. Comme attendu, la surexpression d'ADAM9 conduit également à une augmentation du fragment sAPP α dérivé de la β APP. Cet effet de potentialisation d'ADAM9 sur la formation de N1 est très fortement réduit par des inhibiteurs de métalloprotéase avec une baisse quasi totale observée en présence de l'inhibiteur de disintégrines BB3103. En revanche, des inhibiteurs de protéases à sérines comme l'AEBSF ou des inhibiteurs de protéases acides comme la pepstatine n'affectent pas le niveau de sécrétion de N1. Ces résultats indiquent clairement l'implication de la disintégrine ADAM9 dans le clivage physiologique de la PrP^c et

de la β APP et suggèrent également que le clivage en position 111/112 est très fortement, sinon exclusivement dépendant des disintégrines.

- La réduction des niveaux endogènes d'ADAM9 conduit à une baisse de la formation de N1

Il est toujours important de confirmer des résultats obtenus par surexpression avec la protéine endogène d'intérêt, car surexprimer une protéine peut conduire à des effets secondaires pouvant masquer ou fausser les interprétations expérimentales. Ainsi, par une approche anti-sens, nous avons testé l'effet de la baisse des taux endogènes d'ADAM9 sur les formations de N1 et sAPP α dans des cellules HEK293. Les clones choisies pour nos expériences affichent une baisse d'environ 50% de l'expression d'ADAM9 qui se traduit par des baisses équivalentes des niveaux de N1 et de sAPP α , sans que ne soient affectés les niveaux d'expression de la PrP^c et de la β APP. Ces résultats indiquent clairement qu'ADAM9 participe de manière indubitable aux clivages de la β APP et de la PrP^c.

- L'augmentation de la formation de N1 induite par ADAM9 n'est pas spécifique d'un type cellulaire

Nous avons ensuite voulu vérifier si la potentialisation de la formation de N1 induite par ADAM9 est spécifique d'un type cellulaire ou traduit un processus protéolytique ubiquiste. Nous observons que la surexpression d'ADAM9 dans des fibroblastes immortalisés ou dans la lignée TSM1 conduit à une augmentation significative de la formation de N1, indiquant que l'implication de la disintégrine ADAM9 dans le métabolisme de la PrP^c n'est pas spécifique d'un système cellulaire.

- L'invalidation d'ADAM10 abroge la potentialisation des formations de N1 et sAPP α induite par ADAM9 dans des fibroblastes

Nous avons clairement mis en évidence l'implication d'ADAM9, en plus d'ADAM10, dans le clivage constitutif de la PrP^c. Cet effet est-il direct ou ADAM9 agit-il en relation avec une autre disintégrine? Ainsi, ADAM9 et ADAM10 pourraient de façon totalement indépendante cliver la PrP^c ou la β APP, ou l'une des deux

enzymes pourrait être un facteur limitant en régulant l'activité de l'autre. La surexpression d'ADAM9 dans des fibroblastes sauvages conduit à une augmentation importante de N1 et de sAPP α . En revanche, l'invalidation d'ADAM10 abroge totalement ce phénotype bien qu'ADAM9 soit maturée, donc potentiellement active, comme l'indique la détection des formes mature et immature qui sont caractéristiques de l'enzyme. Il apparaît donc clairement qu'ADAM9 et ADAM10 interagissent du point de vue fonctionnel pour conduire *in fine* à l'augmentation de la production des fragments N1 et sAPP α .

- ADAM9 est capable de cliver ADAM10 en libérant un fragment soluble qui conserve une activité protéolytique

Plusieurs hypothèses nous sont apparues envisageables pour expliquer cette relation fonctionnelle entre ADAM9 et ADAM10: 1) La surexpression d'ADAM9 pourrait affecter le niveau d'expression d'ADAM10; 2) ADAM9 pourrait agir comme enzyme de maturation d'ADAM10 en se substituant aux protéines convertases; 3) ADAM9 pourrait directement ou indirectement moduler la distribution subcellulaire d'ADAM10; 4) Enfin, ADAM9 pourrait agir comme une enzyme de clivage d'ADAM10 à la membrane plasmique, conduisant au largage d'un fragment dans le milieu extracellulaire qui conserve ses propriétés catalytiques et qui serait capable d'agir à distance.

Par différentes approches expérimentales nous avons éliminé les trois premières hypothèses et montré par un dosage fluorimétrique, en utilisant un substrat commercial qui contient la séquence de la β APP ciblée par les disintégrines ADAM10 et ADAM17, que la dernière hypothèse est la bonne. En effet, par des dosages effectués en parallèle sur des cellules intacts et sur des milieux conditionnés, nous avons montré que la co-expression d'ADAM9 et d'ADAM10 dans des cellules invalidées pour ADAM10 conduit à une augmentation de l'activité d'hydrolyse du substrat fluorimétrique, tandis que la seule expression d'ADAM9 dans ces mêmes cellules n'a aucun effet sur l'activité d'hydrolyse basale du substrat. Ces résultats confirment les observations précédentes faites par immunodétection et indiquent qu'ADAM9 est capable de cliver ADAM10 à la membrane plasmique.

- Le fragment soluble dérivé du clivage d'ADAM10 par ADAM9 conserve une activité enzymatique capable de cliver la PrP^c endogène et d'augmenter la formation de N1

Pour vérifier si le fragment dérivé d'ADAM10 à la suite de son clivage par ADAM9 est capable d'hydrolyser la PrP^c endogène, nous avons conditionné du milieu avec des fibroblastes sauvages, que nous avons déplété en N1 préformé pour éliminer tout bruit de fond. Ensuite nous avons incubé les fibroblastes invalidés pour ADAM10 avec ce milieu conditionné théoriquement concentré en fragments solubles dérivés d'ADAM10. Nous observons que cette source enzymatique est capable de générer le fragment N1 de manière dépendante de l'inhibiteur spécifique de disintégrines BB3103. Ces résultats démontrent clairement que le fragment dérivé d'ADAM10 conserve une activité protéolytique capable de cliver la PrP^c endogène.

Cette étude nous a permis de démontrer l'implication indirecte d'ADAM9 dans les clivages de la PrP^c et de la β APP au site α -sécrétase, mais également de mettre en évidence pour la première fois une interaction originale entre deux enzymes de la même famille qui au final régule le métabolisme de deux protéines impliquées dans deux pathologies neurodégénératives distinctes (**Voir Figure 8**). Quelle est la relevance physiologique d'un tel mécanisme? Les ectodomains de nombreuses protéines transmembranaires peuvent subir un clivage au niveau de la membrane plasmique par un mécanisme appelé "shedding", conduisant au largage d'un fragment soluble. Ce processus a été bien décrit concernant des facteurs de croissance et leurs récepteurs (**Massague and Pandiella, 1993**), ou pour des molécules d'adhésion (**Kishimoto et al., 1989**) et conduit à la création de gradients de diffusion permettant la régulation de leurs fonctions. Ainsi, certaines pathologies ont été associées à des mutations autosomales conduisant à une altération du clivage de protéines transmembranaires (**McDermott, 1999**). De manière intéressante, des travaux ont décrit des formes solubles pour ADAM9 (**Mazzocca et al., 2005**) et ADAM12 (**Makrydimas et al., 2006**) provenant de l'épissage alternatif de leurs gènes. On pourrait imaginer au regard de notre étude que le gradient d'activité enzymatique crée par l'interaction entre ADAM9 et ADAM10 permet à l'enzyme

d'atteindre des cibles inaccessibles par sa forme transmembranaire, régulant ainsi certaines fonctions physiologiques. Par ailleurs, l'identification d'ADAM9 comme médiateur indirecte du clivage de la PrP^c ajoute une nouvelle cible potentielle dans une stratégie visant à favoriser le clivage de la PrP^c en position 111/112, et à créer une sorte d'invalidation pharmacologique d'une part en touchant à l'intégrité du domaine toxique 106-126, d'autre part en permettant de baisser les taux de substrat endogène nécessaires pour la conversion de la PrP^c en PrP^{sc} et la mise en place du processus infectieux. L'idée d'une telle stratégie est d'autant plus envisageable que des travaux récents ont montré que la surexpression d'ADAM10 par des souris transgéniques modèles de la maladie d'Alzheimer conduit à la baisse des plaques amyloïdes et à une amélioration des déficits cognitifs associés (Postina et al., 2004). Il serait intéressant par la suite de déterminer dans quelle mesure des souris surexprimant ADAM9, ADAM10 ou ADAM17 résistent à l'infection par de la scrapie.

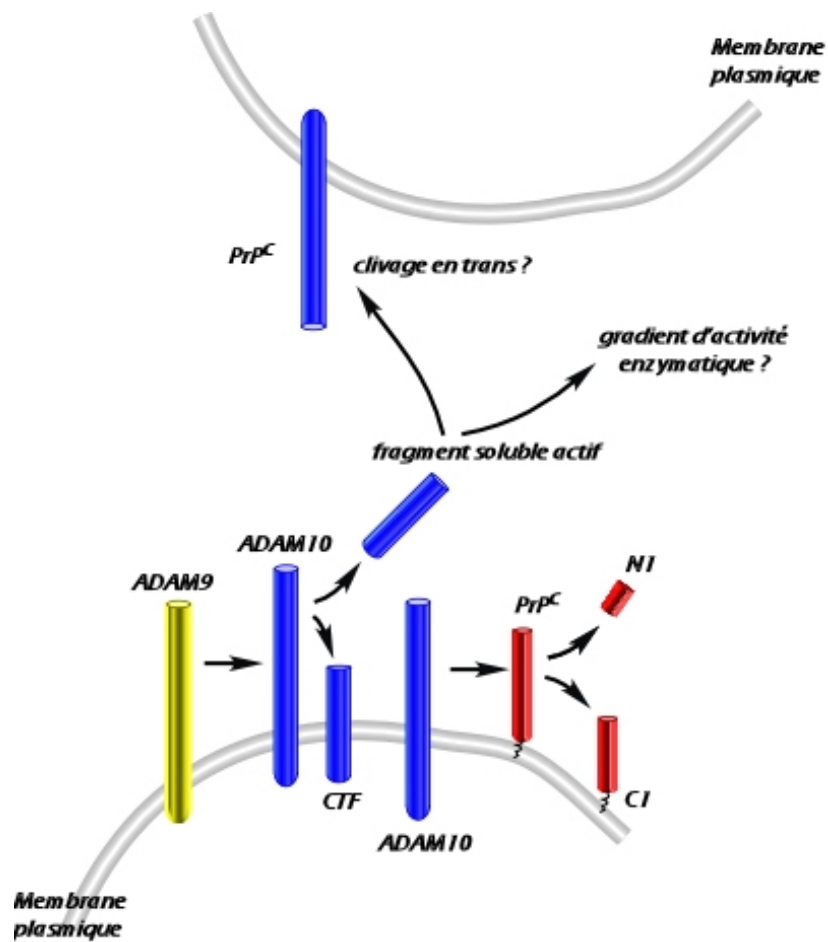


Figure 8 : ADAM9 contribue indirectement, via ADAM10, au clivage physiologique de la PrP^c. Le clivage d'ADAM10 par ADAM9 conduit au largage dans le milieu extracellulaire d'un fragment actif qui est capable de cliver la PrP^c à distance (CTF, C-Terminal Fragment)

Article 2

"The disintegrin ADAM9 indirectly contributes to the physiological processing of cellular prion by modulating ADAM10 activity".

Cissé MA., Sunyach C., Lefranc-Jullien S., Vincent B. and Checler F.

J Biol Chem. 2005 Dec 9; 280 (49):40624-31

II/ 2. Les Récepteurs muscariniques

- Généralités

La superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) constitue l'une des plus larges familles de protéines du génome chez les mammifères (**Lander et al., 2001**) avec près de 1000 gènes répertoriés à ce jour. De toutes les molécules cliniquement utilisées chez l'homme, 40% d'entre elles ciblent les GPCRs (**Teller et al., 2001**). Ces récepteurs ont deux principales caractéristiques: 1/ ils possèdent tous 7 domaines transmembranaires d'environ 25 à 35 résidus consécutifs représentant 7 hélices α interconnectées par des boucles internes et externes alternées; 2/ ils ont la capacité d'interagir avec les petites protéines G. On distingue ainsi cinq grandes familles de GPCRs: 1) la famille des sécrétines qui comprend 15 membres, parmi lesquels on distingue le récepteur du glucagon. Cette famille doit son nom au fait que le premier récepteur à avoir été cloné est celui de la sécrétine; 2) la famille des protéines d'adhésion qui compte 24 membres; 3) la famille des récepteurs à glutamate qui compte 15 membres; 4) les récepteurs Frizzled et TAS2 qui comptent 24 membres; 5) et la famille des récepteurs à rhodopsine qui comprend environ 700 membres (**Fredriksson et al., 2003**).

Les récepteurs cholinergiques font partie de la famille des GPCRs à rhodopsine. On distingue deux types de récepteurs cholinergiques: les récepteurs nicotiniques qui sont ionotropiques et permettent de manière générale de réguler les flux ioniques cellulaires, notamment des ions chlorures, et les récepteurs muscariniques (**Voir Figure 9**) qui sont métabotropiques et entraînent une transduction de signal intracellulaire suite à leur activation par un agoniste (**Bikadi and Simonyi, 2003**). L'approche classique permettant la classification des récepteurs basée sur leurs affinités relatives par rapport à différentes classes d'agonistes et d'antagonistes, leurs séquences en acides aminés et leurs capacités à activer un effecteur donné, a permis de démontrer l'existence de 5 types de récepteurs muscariniques appelés M1-M5. Les sous-types M1 et M2 dérivés de cerveaux et de coeurs porcins ont été les premiers clonés en 1986 (**Kubo et al., 1986**). La même année, le criblage d'une banque d'ADNc dérivée de cortex de rat a permis d'identifier les récepteurs muscariniques de types

M3, M4 et M5 (Bonner et al., 1988). Les récepteurs de type M1 et M3 sont localisés exclusivement au niveau du cerveau et des glandes exocrines, tandis que le type M2 se retrouve de manière prépondérante aux niveaux des muscles lisses et du coeur (Peralta et al., 1987; Buckley et al., 1988; Maeda et al., 1988). Les types M4 et M5 ont une distribution assez limitée et sont localisés majoritairement au niveau des tissus neuronaux (Liao et al., 1989). Dans le cerveau humain, les récepteurs M1 qui sont situés au niveau de l'hippocampe et dans le néocortex représentent entre 35 et 60% des récepteurs cholinergiques alors qu'en comparaison, les types M2 et M4 n'en représentent que 15 à 25% chacun (Flynn et al., 1995).

- Structure des différents récepteurs muscariniques

Il existe une homologie de séquence entre les différents types de récepteurs muscariniques. Cette homologie est plus importante dans les régions comprises entre les domaines transmembranaires 2 et 7 (TM2 et TM7) (Hulme, 1990), tandis que la séquence du TM1 est beaucoup plus variable. Par ailleurs, il existe un certain nombre de résidus conservés au niveau des types M1, M3 et M5, substitués par d'autres résidus conservés au niveau des types M2 et M4 pouvant expliquer la différence du point de vue fonctionnelle entre ces deux groupes. Ces récepteurs contiennent tous deux paires de résidus cystéines au niveau de leurs boucles extracellulaires 1 et 3, dont la première forme un pont disulfure qui sert à stabiliser la protéine dans sa structure tridimensionnelle. La réduction de ce pont altère de façon significative l'affinité de différents agonistes ou antagonistes pour le récepteur (Berstein et al., 1988). En revanche, cette réduction n'altère pas la transduction de signal du complexe agoniste/récepteur, indiquant que le pont disulfure n'est pas essentiel pour sa fonction (Florio and Sternweis, 1989). Tous les récepteurs muscariniques possèdent entre deux et cinq sites potentiels de glycosylation (Asn-X-Ser/Thr) sur des résidus asparagines au niveau amino-terminal. L'inhibition de la glycosylation par la tunicamycine entraîne une baisse importante du nombre de récepteurs muscariniques au niveau de la membrane plasmique (Liles and Nathanson, 1986), suggérant que la glycosylation pourrait jouer un rôle dans la régulation de leur transport vers la surface cellulaire.

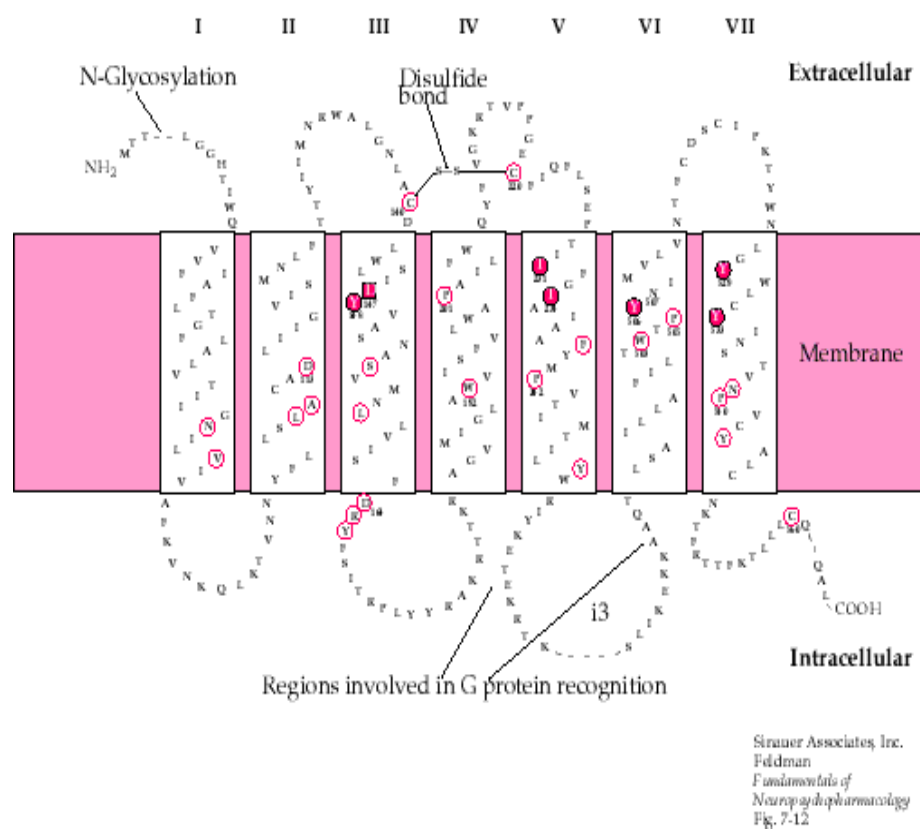


Figure 9 : Structure générale des récepteurs muscariniques

De manière générale, les récepteurs de type M1, M3 et M5 sont couplés à l'hydrolyse des phosphoinositides par la PLC et à l'activation de la voie protéine kinase C (PKC), tandis que les sous-types M2 et M4 sont liés à l'inhibition de l'adenylyl cyclase (Ishii and Kurachi, 2006). La topographie du site de liaison de l'agoniste et les changements conformationnels du récepteur sont des phénomènes physiologiques qui ne sont pas très bien connus. Cependant, des travaux récents ont permis d'identifier les résidus dans le TM3 (Lu and Hulme, 1999), le TM5 (Allman et al., 2000) et le TM6 (Ward et al., 1999) comme facteurs essentiels pour l'interaction du récepteur avec son ligand (Huang et al., 1992), tandis que d'autres études ont identifié des résidus localisés au niveau des TM7 et TM4 qui semblent cruciaux pour la liaison du ligand et l'activation subséquente du récepteur (Lu et al., 2001). Ainsi, les résidus aromatiques situés au niveau des TM7 et TM4, de concert avec ceux localisés dans les TM6 et TM3, pourraient former une sorte de cage aromatique à charge stabilisante autour du groupement positif de l'acétylcholine, entraînant la rotation des TM3, TM6 et TM7, la déstabilisation du complexe, l'activation subséquente du récepteur et l'initiation d'un signal intracellulaire.

Un facteur déterminant pour la spécificité de liaison du récepteur aux protéines G réside au niveau de la boucle interne 3 (i3) (Kubo et al., 1988). Par ailleurs, cette zone montre la plus grande divergence en terme de séquence en acides aminés entre le groupe M1, M2, M3 et le groupe M2, M4, notamment un nombre important de substitutions de résidus qui confèrent à ces derniers des taux plus élevés d'acides aminés de charge positive. La boucle i2 semble aussi avoir un rôle dans la modulation de l'efficacité de couplage aux protéines G. En effet, la mutation d'une aspartate en asparagine sur cette boucle au niveau du récepteur M1 augmente son affinité pour le carbachol (Fraser et al., 1989). Des études récentes montrent que les agonistes muscariniques induisent des changements structuraux importants du récepteur M3 au niveau de sa surface intracellulaire tels que le rapprochement des boucles i5 et i6 (Ward et al., 2002) et des boucles i1 et i2 (Han et al., 2005), permettant ainsi le recrutement de partenaires intracellulaires et l'induction d'une voie de signalisation.

- Fonctions physiologiques des récepteurs muscariniques

Les récepteurs muscariniques jouent des rôles importants dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques des systèmes nerveux central et périphérique. Les voies cholinergiques sont impliquées dans de nombreuses pathologies liées au système nerveux central, notamment la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, certaines formes de dépressions, la schizophrénie et l'épilepsie (Eglen et al., 1999; Felder et al., 2000). Les difficultés pour synthétiser des molécules biodisponibles et à forts degrés de sélectivité et le fait que la plupart des tissus et systèmes cellulaires expriment plus d'un type de récepteur rendent difficile l'attribution d'un rôle physiologique ou physiopathologique à un sous-type donné. Pour surmonter cette difficulté, des souches de souris mutantes déficientes pour chacun des 5 types de récepteurs muscariniques ont été générées. Ces souris sont viables et fertiles et paraissent saines de façon générale, cependant, des techniques plus élaborées ont permis de révéler des anomalies du point de vue pharmacologique, électrophysiologique et biochimique.

- **Les récepteurs muscariniques M1:** Les souris invalidées pour le récepteur muscarinique de type M1 (M1R^{-/-}) manifestent une certaine hyperactivité locomotrice (Miyakawa et al., 2001). Ces souris ne présentent aucun signe caractéristique de défaillance au niveau des performances cognitives liées essentiellement à l'hippocampe, mais montrent des défaillances face à des tests nécessitant le concours simultané du cortex et de l'hippocampe (Anagnostaras et al., 2003). Ces résultats indiquent que les récepteurs de type M1 jouent un rôle important dans la régulation de l'activité locomotrice, mais ne sont pas indispensables pour les fonctions cognitives. L'hyperactivité de ces souris est associée à une augmentation de la transmission dopaminergique au niveau du striatum et à une réceptivité accrue aux effets stimulants des amphétamines (Gerber et al., 2001). Ces résultats indiquent que la transmission dopaminergique est régulée via les récepteurs muscariniques M1 et sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle un dysfonctionnement des récepteurs de type M1 pourrait constituer un facteur de risques pour les troubles psychiatriques dans lesquels il y a une altération de la voie dopaminergique. Le

développement d'antagonistes biodisponibles et spécifiques des récepteurs M1 pourrait constituer une stratégie thérapeutique efficace contre la maladie de Parkinson, caractérisée par une baisse drastique des taux endogènes de dopamine au niveau du striatum. Sur le plan biochimique, les souris M1R^{-/-} présentent également quelques déficiences. En effet, des cultures primaires de neurones dérivés des souris M1R^{-/-} présentent une baisse de plus de 60% du niveau d'hydrolyse des phosphoinositides se traduisant par une quasi absence d'activation de la voie MAPK/ERK (Hamilton and Nathanson, 2001). Ces résultats suggèrent que chez la souris, les récepteurs muscariniques M1 constituent le sous-type majeur impliqué dans l'activation de la PLC et de la voie ERK au niveau du cortex.

- **Les récepteurs muscariniques M2/M4:** Il est assez difficile de discriminer les sous-types muscariniques M2 et M4 par des approches pharmacologiques classiques vu leur grande homologie de séquence. L'activation des récepteurs muscariniques périphériques conduit à différentes réponses physiologiques telles que la bradycardie ou la contraction des muscles lisses (Brodde and Michel, 1999). Chez des souris invalidées pour M2 (M2R^{-/-}), le carbachol n'entraîne pas de bradycardie au niveau de l'atrium (Stengel et al., 2000), de plus, une concentration deux fois plus importante de carbachol est nécessaire pour provoquer une contraction des muscles lisses au niveau de la vessie ou de la trachée, tandis que les souris invalidées pour les récepteurs M4 (M4R^{-/-}) affichent le même profil de réponse au carbachol au niveau de l'atrium, des muscles lisses de l'estomac, de la trachée et de la vessie (Stengel et al., 2000). L'ensemble de ces résultats indique que les récepteurs de type M2 sont impliqués dans la régulation du rythme cardiaque au niveau de l'atrium et de la contractilité des muscles lisses.

Plusieurs études ont montré que les récepteurs muscariniques situés au niveau du système nerveux central jouent un rôle important dans la régulation de la température corporelle. En effet, l'injection d'oxotremorine, un agoniste muscarinique non sélectif, à des souris de phénotype sauvage conduit à une hypothermie très prononcée qui serait due en grande partie aux récepteurs muscariniques situés au niveau de l'hypothalamus, et ce phénomène est

partiellement réduit chez les souris M2R^{-/-}. Ces résultats indiquent que les récepteurs M2 jouent un rôle dans la régulation de la température corporelle dépendante des récepteurs muscariniques et que d'autres types de récepteurs muscariniques pourraient y être impliqués (Gomez et al., 1999a). Par ailleurs, les agonistes muscariniques ainsi que les inhibiteurs d'acétylcholinestérase produisent des effets analgésiques chez l'homme et chez différentes espèces animales (Eisenach, 1999). Plusieurs types de récepteurs muscariniques sont présents au niveau du thalamus, de la moelle épinière et d'autres régions du système nerveux impliquées dans la nociception (Levey, 1993; Wei et al., 1994). Les souris invalidées pour les récepteurs M2 et M4 (M2/M4R^{-/-}) ne manifestent aucune analgésie après administration systémique, intrathécale ou intracérébroventriculaire d'agonistes muscariniques, alors qu'il subsiste une activité analgésique chez les souris M2R^{-/-} ou M4R^{-/-} (Duttaroy et al., 2002). Ces résultats démontrent clairement que les récepteurs M2 et M4 sont impliqués dans la régulation de l'analgésie.

Par ailleurs, les souris M4R^{-/-} sont hyperactives et montrent une forte réponse locomotrice après l'activation des récepteurs dopaminergiques D1 (Gomez et al., 1999b). Ces résultats indiquent que les récepteurs M4 exercent un effet inhibiteur sur la stimulation de la locomotion induite par les récepteurs dopaminergiques D1. Ces découvertes ont ouvert de nouvelles perspectives thérapeutiques pour la maladie de Parkinson et d'autres désordres neurologiques caractérisés par un déséquilibre entre la neurotransmission cholinergique et dopaminergique.

- **Les récepteurs muscariniques M3:** Peu de choses sont connues sur le rôle physiologique des récepteurs M3 situés au niveau du système nerveux central. En revanche, au niveau périphérique, ils semblent jouer un rôle dans la régulation de la contractilité des muscles lisses (Caulfield, 1993; Wess et al., 1996). Les souris invalidées pour le récepteur M3 (M3R^{-/-}) affichent une perte de poids d'environ 25% et une réduction de 5 à 10 fois des niveaux sériques d'insuline et de leptine par rapport aux souris de phénotype sauvage (Yamada et al., 2001). Bien qu'elles s'alimentent moins souvent que les souris de phénotype sauvage, les souris M3R^{-/-} ne montrent aucune anomalie au niveau des fonctions métaboliques et locomotrices

(Yamada et al., 2001). Les auteurs avancent l'hypothèse selon laquelle la baisse de la fréquence de prise alimentaire serait la principale cause du phénotype arboré par ces souris. Les récepteurs M3 sont fortement exprimés au niveau de l'hypothalamus, le centre de régulation de la satiété, et l'activation de la voie muscarinique conduit à l'augmentation de l'expression de la MCH (Melanin-Concentrating Hormone), un peptide impliqué dans la régulation de la satiété, au niveau de l'hypothalamus (Bayer et al., 1999). Les souris M3R^{-/-} ont un niveau d'expression de MCH très réduit et l'administration d'AGRP (Agouti-related peptide), un peptide qui stimule l'appétit via la MCH, à ces souris ne restore pas leur appétit (Yamada et al., 2001). L'ensemble de ces résultats indique que les récepteurs M3 situés au niveau de l'hypothalamus contrôlent le désir de prise alimentaire via la régulation de l'expression de la MCH.

De nombreuses études ont également montré que la contractilité des muscles lisses (Matsui et al., 2000; Stengel et al., 2002) et les sécrétions salivaires (Yamada et al., 2001; Bymaster et al., 2003) induites par les récepteurs muscariniques sont réduites, mais pas complètement abolies, chez les souris M3R^{-/-}. En effet, ces souris ont des pupilles plus dilatées et présentent des muscles lisses dérivés de la trachée, de la vessie et de l'estomac moins réactifs au carbachol (Matsui et al., 2000; Stengel et al., 2002). Ces déficits périphériques sont-ils à l'origine du phénotype hypophagique observé chez ces souris? Des études *in vivo* ont montré que le transit gastro-intestinal est normal chez les souris M3R^{-/-} (Matsui et al., 2000), et que ces souris restent hypophagiques, qu'on leur propose une alimentation standard sèche ou prémachée (Yamada et al., 2001), suggérant que le défaut de salivation de ces souris n'est pas la cause principale de leur trouble de prise alimentaire. Cependant, les mécanismes physiologiques par lesquels les récepteurs M3 exercent ces effets restent à déterminer.

- **Les récepteurs muscariniques M5:** Les récepteurs M5 sont les derniers à avoir été clonés (Bonner et al., 1988; Eglén and Nahorski, 2000), ce qui pourrait expliquer le peu de renseignements disponibles sur leurs fonctions. Récemment, de l'ARN messager codant pour le récepteur M5 a été détecté au niveau des vaisseaux sanguins périphériques et cérébraux chez le rat (Phillips et al., 1997) et chez l'homme

(Elhusseiny et al., 1999). Des études ont montré que l'absence de récepteurs M5 n'a aucun effet sur la relaxation des artères extra-cérébrales (carotide et coronaires) induite par l'acétylcholine (ACh) (Yamada et al., 2001). En revanche, l'ACh perd sa capacité à dilater les artères et les artérioles cérébrales dérivées de souris M5R^{-/-} (Yamada et al., 2001). Ces résultats supportent l'hypothèse que les effets vassorelaxants de l'ACh sur les artères et les artérioles cérébrales sont induits par les récepteurs M5 endothéliaux.

En conclusion, l'analyse phénotypique des souris déficientes pour chacun des récepteurs muscariniques a permis de mettre en lumière certains rôles physiologiques. Le développement dans le futur de lignées de souris déficientes pour plusieurs récepteurs ou invalidées de façon conditionnelle pourrait constituer des outils d'investigation importants pour aider à mieux comprendre la physiologie de ces récepteurs.

II/ 2.1. Rôle des récepteurs muscariniques dans la régulation du clivage de la β APP

Les premiers déficits cholinergiques détectés dans des cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer ont été des baisses d'expression des marqueurs cholinergiques dans le cortex (Davies and Maloney, 1976; Perry et al., 1977). La réduction dramatique du niveau de ces marqueurs dans le cortex se traduit par une perte de 30 à 90% des neurones du noyau basal de Meynert, la source principale d'innervation cholinergique corticale (Whitehouse et al., 1981; Chozick, 1987). L'acétylcholine est synthétisée à partir de la choline circulante dérivée de la phosphatidylcholine membranaire et de la coenzyme A. Chez les malades atteints de la maladie d'Alzheimer, les taux de choline et de phosphatidylcholine sont réduits au niveau du cerveau (Nitsch and Growdon, 1994). De plus, des études ont montré que de faibles concentrations d'A β interfèrent avec certaines étapes de la transmission cholinergique (Kar et al., 1996; Pedersen et al., 1996; Auld et al., 1998), notamment en baissant l'activité de la CAT (Choline Acetyl Transferase). Hoshi et collaborateurs ont également rapporté les effets inhibiteurs de l'A β sur l'activité de la puryvate

déshydrogénase, une enzyme jouant un rôle majeur dans la voie de synthèse de l'acétylcholine (Hoshi et al., 1997).

Au niveau cellulaire, Nitsch et collaborateurs ont été les premiers à démontrer que le clivage de type α -sécrétase de la β APP, suite à l'activation des récepteurs muscariniques M1 ou M3 surexprimés de manière stable dans des cellules HEK293, est augmenté (Nitsch et al., 1992). En revanche, l'activation des récepteurs M2 ou M4 n'a aucun effet sur ce clivage (Nitsch et al., 1992). Ces résultats ont été confirmés par la suite dans d'autres lignées cellulaires surexprimant les récepteurs M1, telles que les cellules PC12 (Buxbaum et al., 1992). Plusieurs équipes ont également montré l'implication de la voie MAPK/ERK (Microtubule Associated Protein Kinase/Extracellular signal-Regulated Kinase) dans la régulation de la formation de sAPP α induite par les récepteurs muscariniques (Mills et al., 1997; Desdouits-Magnen et al., 1998; Haring et al., 1998).

Il y a une baisse de 30% de l'activité α -sécrétase, accompagnée d'une augmentation des formes fibrillaires d'A β 1-40 et d'A β 1-42 chez des souris chroniquement traitées avec de la scopolamine (un antagoniste réversible des récepteurs muscariniques) (Liskowsky and Schliebs, 2006). Ces données suggèrent que des défauts touchant la transmission synaptique cholinergique au niveau du système nerveux central altèrent la balance entre les voies "amyloïdogénique" et "non amyloïdogénique" de la β APP, entraînant une baisse de la coupure α -sécrétase. Par ailleurs, des travaux récents ont montré que l'administration d'AF267B (un agoniste spécifique des récepteurs muscariniques de type M1) à des souris modèles de la maladie d'Alzheimer augmente la phosphorylation de la MAPK/ERK, l'activité de la disintégrine ADAM17, la sécrétion du fragment sAPP α et améliore les déficits cognitifs liés à leur capacité d'apprentissage spatial (Caccamo et al., 2006). D'autre part, le traitement chronique de ces souris par la dicyclomine (un antagoniste spécifique des récepteurs M1) conduit à une augmentation du niveau d'A β au niveau du cortex (Caccamo et al., 2006). Ces résultats indiquent clairement qu'une altération du système cholinergique pourrait être à l'origine de la pathologie ou du moins constituer un facteur aggravant. Il y aurait donc une corrélation directe entre

l'activation des récepteurs M1, la phosphorylation de la MAPK/ERK et l'activité d'ADAM17 *in vivo*.

II/ 2.2. Rôle des récepteurs muscariniques dans la régulation du clivage de la PrP^c (Article 3)

Nous avons émis l'hypothèse d'une implication des récepteurs muscariniques dans la régulation du clivage physiologique de la PrP^c pour plusieurs raisons : 1/ Un proche parallèle a été démontré entre les métabolismes de la β APP et de la PrP^c (Checler and Vincent, 2002). En effet, la PrP^c et la β APP subissent des clivages constitutif et régulé par la voie PKC, conduisant à la formation des fragments sécrétés N1 et sAPP α , respectivement (Buxbaum et al., 1998; Lammich et al., 1999; Vincent et al., 2000). Ces clivages interviennent à l'intérieur du domaine toxique 106-126 et du peptide A β de la PrP^c et de la β APP, respectivement et ces attaques protéolytiques sont perpétrées par les mêmes disintégrines; 2/ les récepteurs muscariniques de type M1, M3 et M5 sont liés à l'hydrolyse des phosphoinositides par la PLC qui entraîne l'activation subséquente de la voie PKC (Peralta et al., 1988); 3/ l'activation des récepteurs muscariniques couplés à la voie PKC augmente la coupure de la β APP qui génère le fragment sécrété sAPP α *in vitro* (Nitsch et al., 1992) et *in vivo* (Caccamo et al., 2006) ; 4 / et ce mécanisme serait médié de façon spécifique par ADAM17; 5/ la PrP^c est très largement distribuée dans les neurones cholinergiques (Harris et al., 1991; Harris et al., 1993); 6/ l'infection de cellules PC12 par la souche scrapie 139A conduit à une baisse de l'activité de la choline acetyltransférase, une enzymes associée au métabolisme cholinergique (Rubenstein et al., 1991).

- L'activation des récepteurs muscariniques conduit au clivage physiologique de la PrP^c qui génère le fragment N1

Nous avons évalué l'effet de l'activation de la voie muscarinique sur le métabolisme de la PrP^c en suivant le niveau de sécrétion du fragment N1 dans le milieu extracellulaire suite à l'activation des récepteurs muscariniques. Nos résultats montrent que le carbachol (un agoniste muscarinique non sélectif) conduit à

l'augmentation de la formation de N1 de manière dépendante de l'atropine (un antagoniste muscarinique non sélectif) par des cultures primaires de neurone, suggérant l'implication des récepteurs muscariniques endogènes dans le contrôle de la formation de N1.

Nous avons tiré partie de cellules HEK293 surexprimant indépendamment et de manière stable les différents récepteurs muscariniques afin d'identifier ceux qui sont impliqués dans la formation de N1. Les résultats obtenus montrent clairement que l'agoniste spécifique des récepteurs M1, l'AF267B et le carbachol, augmentent de manière dose-dépendante et de manière sensible à l'atropine la formation de N1 par les cellules HEK-M1 et HEK-M3, respectivement, sans que le niveau d'expression de la PrP^c ne soit affecté. En revanche, l'activation des sous-types M2 et M4 ne conduit pas à la modification de la formation de N1. Ces résultats sont en parfaite adéquation avec le fait que les récepteurs muscariniques M2 et M4 modulent la voie liée à l'inhibition de l'adenylyl cyclase et à la protéine kinase A, qui à l'inverse de la PKC, ne régule pas le clivage de la PrP^c (Vincent et al., 2000) et démontrent clairement l'implication des récepteurs muscariniques M1 et M3 dans le clivage physiologique de la PrP^c.

- L'activation des récepteurs muscariniques conduit à l'augmentation de l'activité α -sécrétase

Plusieurs mécanismes cellulaires peuvent expliquer l'augmentation de la formation de N1 suite à l'activation des récepteurs muscariniques:

1/ Une redistribution de la PrP^c vers la membrane plasmique par activation de protéines chaperonnes, ce qui aurait comme conséquence de permettre une meilleure accessibilité de l'enzyme à son substrat.

2/ Une redistribution des enzymes responsables du clivage de la PrP^c qui aboutirait à augmenter le pool de disintégrines disponible au niveau de la membrane plasmique ou une augmentation de l'expression de ces enzymes. En effet, des travaux récents ont montré que la PKC ϵ module la translocation d'ADAM12 au niveau de la membrane plasmique de façon dépendante de son activité catalytique (Sundberg et al., 2004). Des analyses faites par gradients de sucrose montrent que les

distributions subcellulaires des disintégrines ADAM10, ADAM17 et de la PrP^c ne changent pas suite à l'activation des récepteurs muscariniques M1 ou M3. De plus, il apparaît clairement qu'il n'y a aucune modulation ni de leurs niveaux de transcription, ni de leurs niveaux d'expression suite à l'activation de ces récepteurs (résultats non publiés).

3/ Une modulation positive de l'activité des disintégrines. Nos résultats montrent une augmentation de l'hydrolyse sensible à BB3103 du substrat fluorimétrique JMV2770 (**voir article 5**) suite à l'activation des récepteurs M1 par l'AF267B ou par du carbachol, indiquant que ces récepteurs modulent positivement l'activité des disintégrines responsable de la formation de N1.

- Les récepteurs muscariniques M1 et M3 induisent le clivage de la PrP^c via la phosphorylation d'ADAM17 et la modulation de son activité

Il a été montré de façon exhaustive que les disintégrines peuvent interagir avec des protéines au niveau de leurs queues cytoplasmiques ou subir une phosphorylation directe par la PKC ou via la MAPK/ERK qui aboutit à la régulation de leur activité. Ainsi, nos résultats montrent que la stimulation des récepteurs muscariniques M1 par du carbachol conduit à la phosphorylation d'ADAM17 sur la thréonine 735, alors que l'on n'observe aucune phosphorylation d'ADAM9. De plus, la mutation de ce résidu en alanine abroge totalement la potentialisation de la sécrétion de N1 induite par le carbachol et baisse de façon significative l'activité d'hydrolyse sensible à BB3103 du substrat fluorimétrique JMV2770 dans les cellules HEK293. On observe également une phosphorylation d'ADAM17 sur sa tyrosine 702 dans les mêmes conditions. En revanche, la mutation de cette dernière en alanine n'affecte pas la potentialisation de la sécrétion de N1 induite par les récepteurs muscariniques M1. L'ensemble de ces résultats démontre de façon probante que la stimulation des récepteurs M1 entraîne la phosphorylation de la disintégrine ADAM17 sur la thréonine 735, régulant de ce fait son activité et conduisant à l'augmentation de la formation de N1.

- Les récepteurs muscariniques modulent l'activité d'ADAM17 et le clivage de la PrP^c via la voie PKC

La thréonine 735 d'ADAM17 est située sur un site consensus qui peut être potentiellement ciblée par la PKC. Ainsi, pour confirmer l'implication de la voie PKC dans le mécanisme qui conduit à la phosphorylation d'ADAM17, à l'augmentation de son activité et à la potentialisation subséquente de la formation de N1 par l'intermédiaire des récepteurs muscariniques, nous avons montré que le GF109206X (un inhibiteur à spectre large de la PKC) abroge totalement l'effet de potentialisation de la sécrétion de N1 induite par l'activation des récepteurs muscariniques M1 par du carbachol. Ces résultats mettent également en exergue le fait que seule la voie PKC est impliquée dans ce mécanisme. Cependant, on ne peut pas écarter la possibilité qu'il pourrait exister une cascade d'activation initiée par la PKC conduisant à la phosphorylation d'autres kinases en aval et à la régulation positive de l'activité d'ADAM17. Un bon candidat comme protéine cible de la PKC pourrait être la MAPK/ERK, d'autant plus qu'il a été montré que l'activation de la voie ERK1/2 conduit à la phosphorylation d'ADAM17 sur la thréonine 735, modulant ainsi sa localisation dans des cellules COS-7 (Soond et al., 2005) et qu'il existe une interaction directe entre ERK1/2 et ADAM17 dans des cellules HEK293 (Diaz-Rodriguez et al., 2002). De plus, la thréonine 735 se trouve à l'intérieur de la séquence consensus Pro-Gln-Thr⁷³⁵-Pro qui, en plus de la PKC, est aussi un site potentiel de phosphorylation ciblé par la MAPK/ERK. Il serait donc intéressant par la suite de tester l'effet d'inhibiteurs spécifiques de la voie MAPK/ERK comme le PD98059 ou l'U0126 sur la sécrétion de N1 suite à l'activation des récepteurs muscariniques (voir "Résultats complémentaires").

En conclusion, cette étude nous a permis de démontrer pour la première fois l'implication des récepteurs muscariniques dans la régulation du clivage physiologique de la PrP^c (Voir Figure 10). L'observation selon laquelle l'inactivation de la PrP^c protège des souris contre l'infection par de la scrapie (Bueler et al., 1993) a ouvert de nouvelles perspectives en terme de thérapies envisageables contre les maladies à prion. Ainsi, baisser les taux de la PrP^c endogène devrait s'avérer efficace

pour empêcher ou ralentir le processus infectieux. Dans ce paradigme, les récepteurs muscariniques constituent des cibles pharmacologiques intéressantes, d'autant plus que l'activation de la voie PKC s'est révélée efficace pour inhiber la toxicité induite par le peptide A β dans des neurones hippocampiques de rat (Garrido et al., 2002) et pour atténuer les marques histopathologiques chez des souris modèles de la maladie d'Alzheimer (Etcheberrigaray et al., 2004).

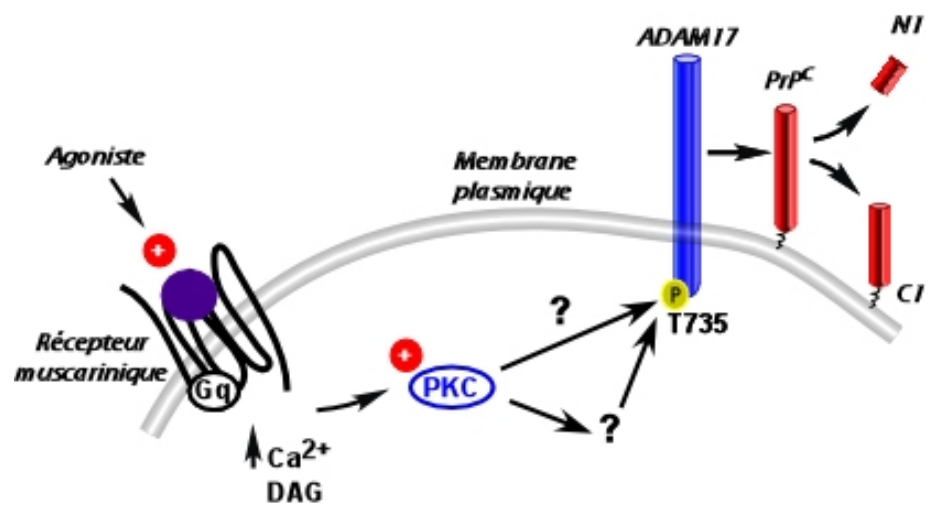


Figure 10 : Modulation du clivage de la PrP^c par les récepteurs muscariniques. L'activation des récepteurs muscariniques conduit à la modulation de l'activité d'ADAM17 par la phosphorylation de la thréonine 735 située sur sa queue cytoplasmique et entraîne une augmentation du clivage physiologique de la PrP^c et de la formation de N1, un mécanisme médié par la voie PKC.

Article 3

"M1 and M3 Muscarinic Receptors Control Physiological Processing of Cellular Prion by Modulating ADAM17 Phosphorylation and Activity".

Cissé MA., Sunyach C., Slack BE., Fisher A., Vincent B., and Checler F.

J. Neuroscience (in press)

II/ 2.3. Résultats complémentaires

- La voie MAPK/ERK est-elle impliquée dans la régulation de la formation de N1 ou de sAPP α ?

- Généralités

La voie des MAPKs est une voie de signalisation hautement conservée chez les espèces et qui régule une grande diversité de fonctions physiologiques, incluant la prolifération cellulaire, la différenciation et la migration (Aouadi et al., 2006). Au moins 5 membres de la famille des MAPKs ont été identifiés (Voir Figure 11): ERK1/2 (Extracellular-signal Regulated Kinase 1/2), JNK (c-Jun-amino-terminal Kinase), p38 et ERK5 (Robinson and Cobb, 1997; Wang and Tournier, 2006). ERK1 et ERK2, identiques à 90% du point de vue de leurs séquences en acides aminés, sont activées par MEK1/2 (MAPK/ERK kinase 1/2), aussi appelées MAPKK (MAPK kinase) par la phosphorylation séquentielle de résidus tyrosine et thréonine situés au niveau de la séquence consensus Thr-Glu-Tyr (TEY) (Robbins and Cobb, 1992; Ferrell and Bhatt, 1997). MEK1 et MEK2 sont activées par phosphorylation de résidus sérines (S217/218 et S221/222) situés au niveau de leurs boucles d'activation (Alessi et al., 1994; Zheng and Guan, 1994) par les kinases de la famille Raf qui comprend 3 membres appelés Raf-A, Raf-B et Raf-C (Pearson et al., 2001).

La cascade des MAP kinases conduit à la formation de complexes protéiques qui régulent leur localisation et leur fonction (Marcus et al., 1994; Yasuda et al., 1999). Chez les mammifères, ces kinases sont activées entre autre par des facteurs de croissance (Winston and Bertics, 1992), par la PKC (Kolch et al., 1993) ou via des récepteurs couplés aux protéines G (English et al., 1999), ce qui conduit le plus souvent à la phosphorylation de certaines protéines en aval, régulant de ce fait leurs activités et leurs fonctions (Voir Figure 11). Dans certains cas, selon le stimulus, la MAPK/ERK peut transloquer au noyau où elle sert de facteur de transcription (Voir Figure 11) (Pearson et al., 2001).

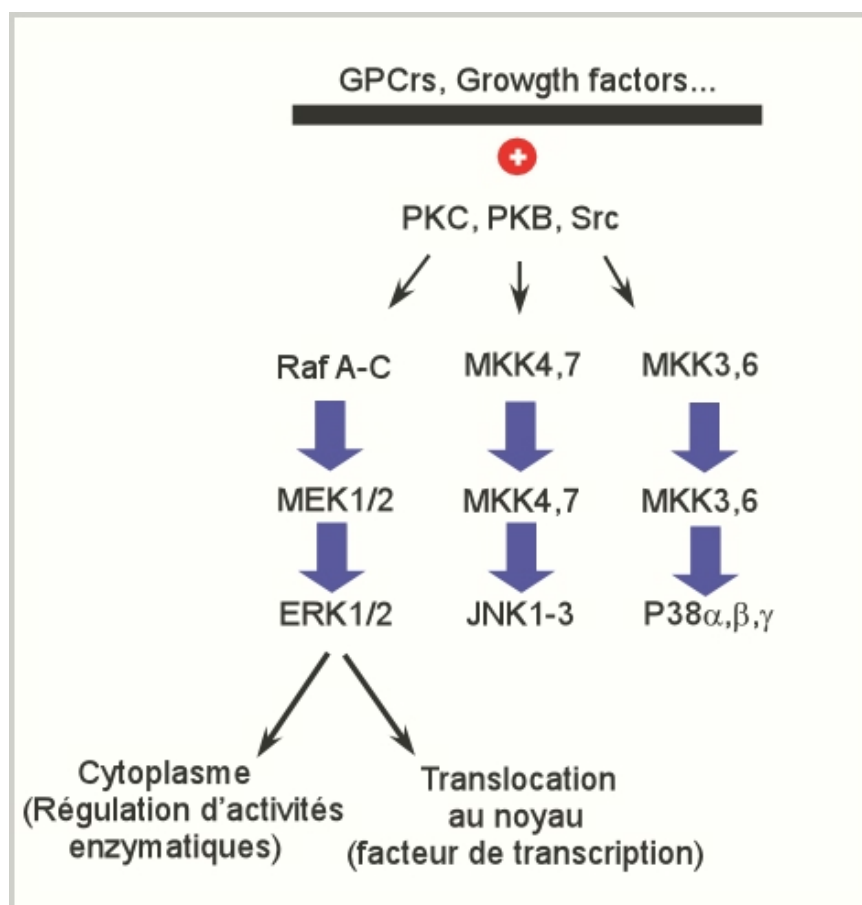


Figure 11 : Voie des MAP kinases. La cascade d'activation de ERK1/2 est montrée comme décrite dans le texte
D'après Pearson et al., 2001

- Résultats

Les inhibiteurs couramment utilisés en pharmacologie pour étudier les fonctions des MAPKs ERK1 et ERK2 *in vitro* sont le PD98059 et l'U0126, des composés qui empêchent la phosphorylation des MAPKKs MEK1 et MEK2 et l'activation subséquente d'ERK1/2 (English and Cobb, 2002). Ainsi, pour apporter la preuve de l'implication de la voie MAPK/ERK dans la régulation du clivage physiologique de la PrP^c et la formation de N1 suite à l'activation par du carbachol des récepteurs muscariniques M1, nous avons utilisé l'U0126. Nos résultats montrent clairement que l'inhibiteur à spectre large de la PKC, le GF109206X ou l'U0126 abrogent de manière importante la formation de N1 (Figure 12A). Par ailleurs, l'U0126 affecte aussi la formation de N1 induite par une activation directe de la PKC par du PDBu (Figure 12B), indiquant que la voie ERK1/2 est impliquée dans la régulation du clivage de la PrP^c et la formation de N1 et que les MAPKs ERK1/2 sont situées en aval de la PKC dans cette cascade de signalisation. De manière intéressante, la formation de sAPP α induite par l'activation des récepteurs muscariniques (Figure 13A) ou par du PDBu (Figure 13C) n'est pas affectée par l'U0126, alors que le GF109206X inhibe totalement la production de sAPP α induite par du PDBu (Figure 13B). L'ensemble de ces résultats démontre clairement que les voies PKC et MAPK/ERK ne sont pas impliquées dans la régulation du clivage physiologique de la β APP dépendante des récepteurs muscariniques.

La voie PKC/ERK apparaît comme la voie majoritaire, sinon exclusive contrôlant la régulation du clivage de la PrP^c et la formation de N1 suite à l'activation des récepteurs muscariniques ou suite à l'activation directe de la PKC par les esters de phorbol (Voir Figure 14). De manière intéressante, le GF109206X et l'U0126 n'affectent pas la formation de sAPP α induite par les récepteurs muscariniques M1, permettant ainsi de proposer un modèle de régulation du clivage de la β APP au site α -sécrétase qui ferait intervenir deux voies de régulations distinctes : 1/ Une voie dépendante de l'activation de la PKC via le DAG et qui est complètement indépendante des récepteurs muscariniques; 2/ Une voie initiée par les récepteurs muscariniques qui est complètement indépendante de la PKC et qui pourrait

impliquer la voie calcique via l'IP3, comme suggéré par Buxbaum et collaborateurs (Buxbaum et al., 1994).

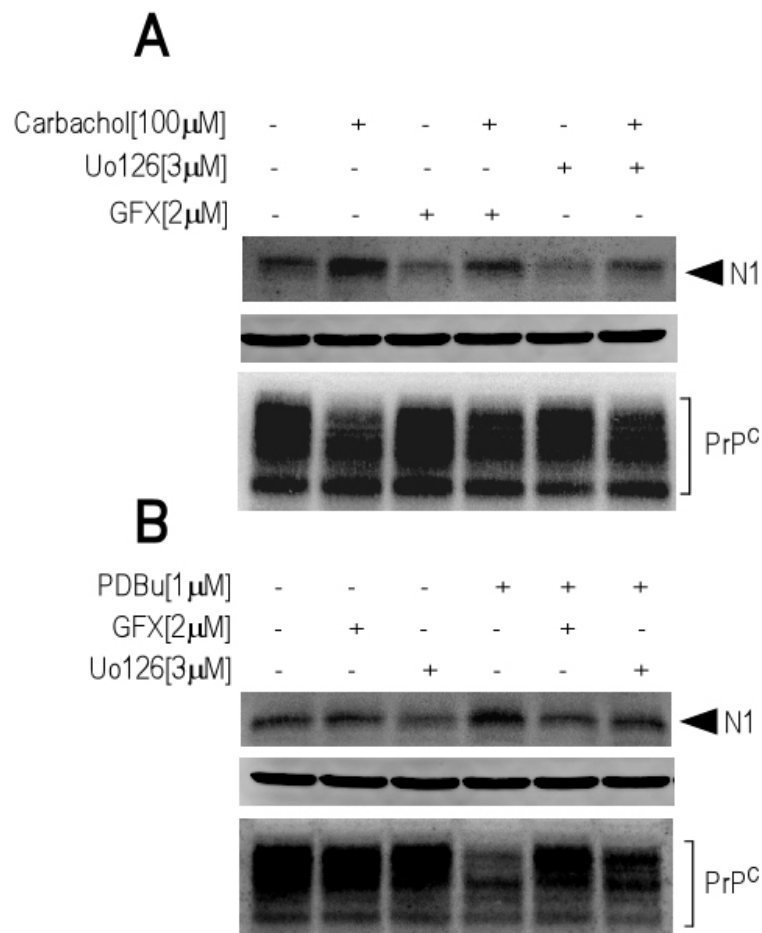


Figure 12 : L'inhibiteur spécifique de la voie MAPK/ERK, le U0126, abroge la formation de N1 induite par le carbachol ou le PDBu. Les cellules HEK293 surexprimant les récepteurs muscariniques M1 sont prétraitées pendant 30 minutes avec du DMEM contenant (+) ou non (-) les inhibiteurs U0126 ou GF109206X (GFX) (concentrations indiquées) ou du DMSO (en contrôle), puis le milieu est changé et les cellules sont incubées pendant 8H avec du milieu contenant (+) ou non (-) du PDBu ou du carbachol seuls ou associés avec les inhibiteurs ci-dessus cités. Le milieu est ensuite récupéré et immunoprécipité avec l'anticorps monoclonal SAF32 pour la détection du fragment N1. Les homogénats sont récupérés et séparés (25µg protéines) par western blot pour la détection de la PrP^c ou de la tubuline (12% Tris/Glycine SDS-PAGE) en utilisant des anticorps spécifiques.

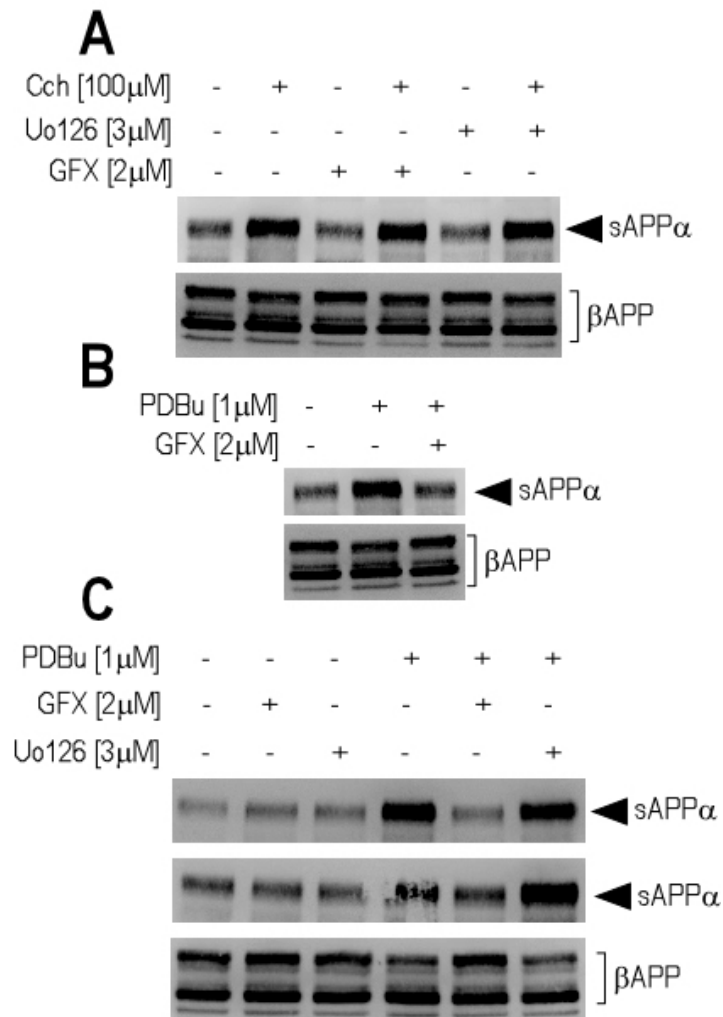


Figure 13 : Les voies PKC et MAPK/ERK ne sont pas impliquées dans le mécanisme de régulation de la formation de sAPP α médié par les récepteurs muscariniques M1 dans les cellules HEK293. Les cellules HEK293 surexprimant les récepteurs muscariniques M1 sont prétraitées pendant 30 minutes avec du DMEM contenant (+) ou non (-) les inhibiteurs U0126 ou GF109206X (GFX) (concentrations indiquées) ou du DMSO (en contrôle), puis le milieu est changé et les cellules sont incubées pendant 2H avec 1ml de DMEM contenant (+) ou non (-) du PDBu ou du carbachol seuls ou associés avec les inhibiteurs ci-dessus cités. Le milieu est ensuite récupéré et immunoprécipité avec l'anticorps monoclonal 207 pour la détection du fragment sAPP α . Les homogénats sont récupérés et l'équivalent de 25μg protéines est séparé par western blot pour la détection de la βAPP ou de la tubuline (12% Tris/Glycine SDS-PAGE) en utilisant des anticorps spécifiques.

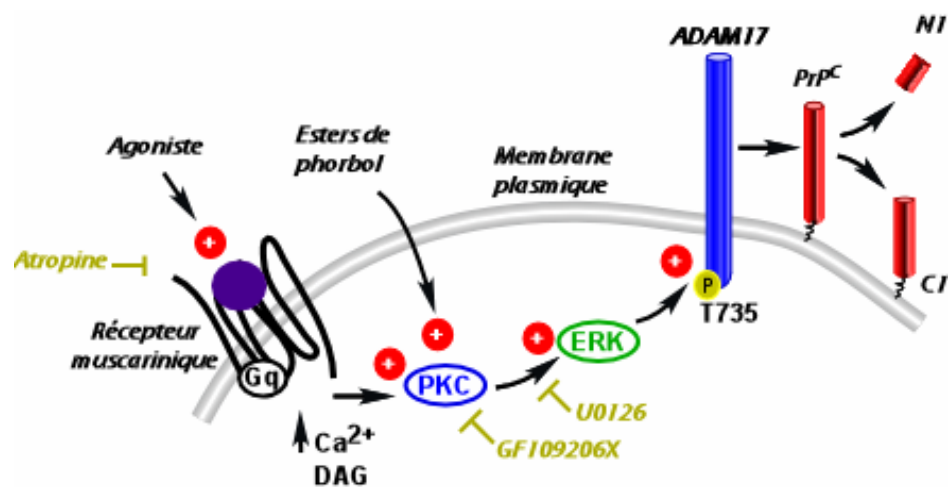


Figure 14 : Implication de la voie MAPK/ERK dans la régulation du clivage de la PrP^c induit par l'activation des récepteurs muscariniques. L'activation des récepteurs muscariniques M1 couplés à la PKC conduit à la phosphorylation d'ADAM17 sur la thréonine 735 et à la modulation de son activité qui se traduit par une hausse de la formation de N1, un mécanisme de régulation du clivage de la PrP^c qui se fait par l'intermédiaire de la MAPK/ERK.

II/ 3. La Protéine kinase C

- Généralités

La protéine kinase C (PKC) a été identifiée et caractérisée par plusieurs groupes (Takai et al., 1979; Knopf et al., 1986c; Ohno et al., 1988). La PKC appartient à une famille de sérine/thréonine kinases constituée de trois sous-familles (voir chapitre « Structure et régulation ») qui contrôlent de nombreuses fonctions selon l'isoforme considérée, sa localisation et de manière dépendante des besoins cellulaires. Ainsi, la PKC a été impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire, la régulation de l'expression de gènes, le cycle cellulaire, la différenciation et la migration cellulaire et l'apoptose (pour revue voir (Carter and Kane, 2004)). L'activation aberrante de la PKC peut conduire à des dérégulations cellulaires et à des pathologies comme le cancer ou le diabète. Ainsi, leur activation et leur dégradation est strictement régulée de manière spatio-temporale (Violin et al., 2003). Les acides gras générés par la PLA2 (phospholipase A2), ainsi que par le DAG (diacylglycérol) modulent l'activité de la PKC (Wang, 2006). Les esters de phorbol peuvent se substituer au DAG pour activer la PKC, mais sont potentiellement promoteurs de tumeurs, sont difficilement métabolisés et entraînent une activation prolongée de la PKC (Asaoka et al., 1992).

- Structure et régulation de la protéine kinase C

La PKC est un polypeptide contenant une région régulatrice à son extrémité amino-terminale (environ 20-40 KDa) et une région catalytique à l'extrémité carboxy-terminale (environ 45 KDa) (Voir Figure 16). Le clonage et l'analyse d'une première classe de la famille PKC a permis dans les années 1980 d'identifier quatre domaines conservés appelés C1-C4, dont chacun a des caractéristiques et des fonctions qui lui sont propres (Coussens et al., 1986): le domaine C1 contient un motif riche en cystéines et constitue le site de liaison du DAG; le domaine C2 contient le site de reconnaissance des lipides membranaires et constitue également le site de liaison calcique. Les domaines C3 et C4 constituent les sites de liaison du substrat et de l'ATP nécessaire à l'activité enzymatique (Voir Figure 16). Un peu plus d'une dizaine

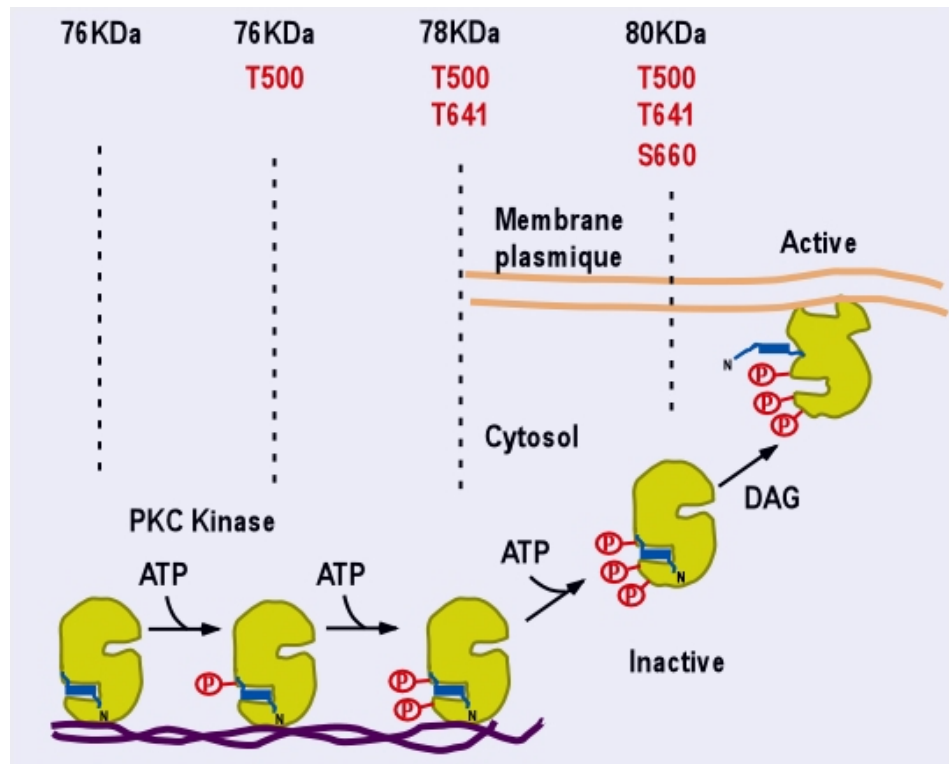


Figure 15 : Modèle de la cascade de phosphorylation/activation de la PKC
 D'après Keranen et al., 1995

de membres ont été identifiés à ce jour et classés en trois groupes distincts en fonction de leur structure et de leur mode d'activation. On distingue ainsi les PKCs conventionnelles parmi lesquelles: α , $\beta 1$, $\beta 2$ et γ , qui sont activées par le calcium; les PKC nouvelles: δ , ϵ , η , θ et μ , qui ne sont pas activées par le calcium, mais par le DAG; et enfin les PKC atypiques: ζ et ν , qui constituent la classe la moins connue, et qui ne sont activés ni par le calcium, ni par le DAG (Voir Figure 16).

Les PKCs acquièrent leur fonctionnalité par deux mécanismes distincts: la phosphorylation et la translocation à la membrane plasmique (Voir Figure 15). Le premier mécanisme rend la PKC catalytiquement compétente par une série de phosphorylations ordonnées (Keranen et al., 1995). La PKC nouvellement synthétisée et catalytiquement incompétente est d'abord phosphorylée sur la thréonine 500 (T500), au niveau du domaine catalytique, rendant ainsi la protéine compétente. La première conséquence de cette phosphorylation sur la T500 est l'autophosphorylation de la PKC sur la T641. Une deuxième autophosphorylation de l'enzyme sur la sérine 660 (S660) la rend "mature" et conduit à sa relocalisation dans le cytosol. La génération du DAG suite à divers stimuli et son interaction directe avec la PKC entraîne la translocation de l'enzyme au niveau de la membrane plasmique et conduit au largage du pseudosubstrat (Orr et al., 1992) et à la libération du site actif. La PKC devient ainsi pleinement active et peut alors phosphoryler son substrat.

- Fonctions de la protéine kinase C

Les PKCs sont des kinases qui phosphorylent leurs cibles sur des résidus sérines ou thréonines. Bien qu'étant de manière générale exprimées de façon ubiquitaire dans l'organisme, certaines isoformes de la PKC ont une expression prépondérante dans certains types cellulaires. Par exemple, la PKC α est préférentiellement exprimée dans les cellules T (Baier, 2003), la PKC β dans les cellules B (Baier, 2003), la PKC γ dans le cerveau (Saito and Shirai, 2002), la PKC θ dans les cellules T et les cellules musculaires (Osada et al., 1992) et la PKC η dans les cellules épithéliales (Maissel et al., 2006). L'invalidation sélective de certaines isoformes de la PKC a permis de mieux cerner leurs fonctions chez les mammifères: La PKC γ a été montrée comme jouant un rôle important dans l'apprentissage et la

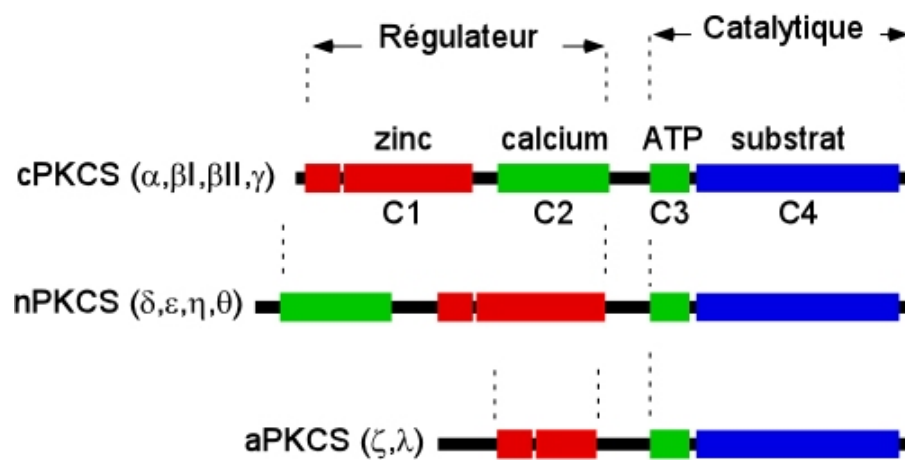


Figure 16 : Les différentes classes de la PKC et leur structure

mémoire (Abeliovich et al., 1993). L'invalidation de la PKC β conduit à une altération de la réponse immunitaire humorale et à une baisse de la réponse des lymphocytes B (Leitges et al., 1996). La PKC ϵ a été impliquée dans la régulation des récepteurs GABA $_A$ (Hodge et al., 1999) et dans la voie de signalisation médiée par les lipopolysaccharides (Castrillo et al., 2001). De manière intéressante, l'invalidation de la PKC ζ conduit à l'inhibition de la prolifération cellulaire et à des défauts d'activation de la voie MAPK/ERK et de transcription de gènes dépendants de NF- κ B (Leitges et al., 2001; Martin et al., 2002). L'approche inverse qui consiste à générer des souris transgéniques surexprimant de manière spécifique une isoforme de la PKC a également permis de mettre en lumière certaines de leurs fonctions et notamment l'identification des PKC α et δ comme les principales isoformes impliquées dans la régulation du transport de glucose (Tsuru et al., 2002). Cependant, des études plus approfondies seront nécessaires pour évaluer l'impact réel des isoformes de la PKC sur les fonctions de l'organisme, notamment par l'utilisation d'inhibiteurs/activateurs plus sélectifs.

II/ 3.1. La PKC dans la régulation du métabolisme de la β APP

De nombreuses études ont montré que le métabolisme de la β APP est fortement régulé par des stimuli extracellulaires qui conduisent au recrutement de seconds messagers intracellulaires (Buxbaum et al., 1992; Nitsch et al., 1992). L'activation de la voie PKC par des traitement de cellules aux esters de phorbol conduit à l'augmentation de la sécrétion du fragment sAPP α (Gillespie et al., 1992; Buxbaum et al., 1993; Checler, 1995; Benussi et al., 1998) et à la réduction du peptide A β (Buxbaum et al., 1993). La surexpression des PKC α et ϵ , mais pas de la PKC δ , dans des fibroblastes de rat, augmente la sécrétion de sAPP α (Kinouchi et al., 1995), indiquant que ces deux isoformes de la PKC sont impliquées dans la régulation du clivage de la β APP par l'activité α -sécrétase. Ces résultats ont par la suite été confirmés dans d'autres systèmes cellulaires, notamment des neuroblastomes humains (Lanni et al., 2004) et dans des cellules B103 dérivées de neuroblastomes de rat (Yeon et al., 2001). De manière intéressante, l'administration du peptide A β à des rats entraîne une baisse de l'activité PKC, accompagnée d'une altération de leur

capacité de mémorisation (Olariu et al., 2002). Par ailleurs, l'inhibition sélective de la PKC ϵ bloque l'augmentation de la sécrétion de sAPP α induite par des agonistes de la PKC dans des cellules B103 (Yeon et al., 2001). Des études récentes réalisées *in vivo* ont permis de démontrer que les PKC α et β régulent la coupure α -sécrétase de la β APP (Rossner et al., 2001). Toutes ces observations vont dans le sens d'une implication majeure des PKC α , β et ϵ dans la régulation du métabolisme de la β APP et la production de sAPP α .

D'autre part, des études menées sur des souris transgéniques modèles de la maladie d'Alzheimer ont permis de mettre en évidence la possibilité d'une stratégie thérapeutique visant à activer la PKC, favorisant ainsi la voie non amyloïdogénique et la formation de sAPP α qui a des propriétés neurotrophiques et neuroprotectrices. C'est ainsi qu'il a été montré que la bryostatine 1, un activateur de la PKC synthétisée par des bactéries symbiotes (Davidson et al., 2001), augmente de façon très importante la sécrétion de sAPP α dans des fibroblastes dérivés de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Etcheberrigaray et al., 2004). De plus, le benzolactame (un autre activateur de la PKC) non seulement augmente le niveau de sAPP α , mais réduit également les niveaux de A β 40-42 dans des cerveaux de souris transgéniques APP[V717I] en améliorant leurs fonctions cognitives (Etcheberrigaray et al., 2004). Par ailleurs, la surexpression de la PKC ϵ au niveau neuronal chez des souris transgéniques qui surexpriment de la β APP portant une mutation familiale associée à la maladie d'Alzheimer conduit à une baisse du peptide A β et de la charge en plaques séniles (Choi et al., 2006). Le phénotype arboré par ces souris serait dû à la surexpression de la PKC ϵ qui activerait de manière sélective l'enzyme de conversion de l'endothéline qui est une enzyme de dégradation de l'A β (Choi et al., 2006). Des études récentes effectuées sur des fibroblastes provenant de biopsies effectuées sur des patients atteints de la maladie d'Alzheimer montrent une réduction de l'activité de la PKC (Govoni et al., 1993). L'ensemble de ces observations démontre clairement qu'une approche thérapeutique visant à activer la PKC pourrait s'avérer efficace contre la maladie d'Alzheimer.

II/ 3.2. La PKC dans la régulation du clivage physiologique de la PrP^c (Article 4)

Le clivage physiologique de la PrP^c présente certaines similitudes avec celui de la β APP. En effet, les deux protéines subissent des clivages constitutif et régulé par la voie PKC conduisant à la production de N1 et de sAPP α , respectivement. Les travaux de Bruno Vincent dans notre laboratoire ont montré d'une part qu'il existe un clivage physiologique de la PrP^c qui est constitutif ou régulé par la PKC et qui génère le fragment N1 de manière sensible à des inhibiteurs de métalloprotéases (Vincent et al., 2000). Ses travaux ont également montré qu'ADAM10 est impliquée dans la formation constitutive du fragment N1, alors qu'ADAM17 est responsable de sa formation régulée par les esters de phorbol (Vincent et al., 2000; Vincent et al., 2001). Ainsi, la présente étude nous a permis d'identifier les isoformes de la PKC impliquées dans la régulation du clivage de la PrP^c. Les résultats montrent que cette régulation se fait via la phosphorylation d'ADAM17 sur sa thréonine 735, renforçant nos observations précédentes selon lesquelles ce résidu joue un rôle important dans la régulation de l'activité d'ADAM17 et la formation de N1 suite à l'activation des récepteurs muscariniques.

- La surexpression des PKC alpha, delta et epsilon augmente la formation de N1

La surexpression transitoire de formes constitutivement actives des PKC α , δ et ϵ dans des cellules HEK293 conduit à une augmentation de la formation de N1, sans que le niveau d'expression de la PrP^c ne soit affecté. A l'inverse, la surexpression des dominants négatifs des mêmes isoformes de la PKC réduit de façon significative le niveau de N1 dépendant du PDBu, démontrant ainsi leur implication dans le clivage régulé de la PrP^c. De manière intéressante, ces mêmes isoformes de la PKC modulent la formation de sAPP α , à l'exception de la PKC δ (résultats non publiés).

Pour confirmer ces résultats, nous avons utilisé des cellules dérivées de rhabdomyosarcomes humains inductibles aussi bien pour des formes constitutivement actives (CA) que pour des formes dominantes négatives (DN) de la PKC. L'induction des PKC α , δ ou ϵ par de la tétracycline dans ces cellules augmente la formation de N1. En revanche, l'induction des mutants dominants négatifs conduit

à une baisse significative de la formation de N1 induite par le PDBu. L'ensemble de ces résultats confirme l'implication des PKC α , δ et ϵ dans la formation régulée de N1 par un mécanisme qui n'est pas spécifique d'un type cellulaire donné.

- L'invalidation de la PKC alpha ou beta conduit à la baisse de la formation du fragment N1 par des fibroblastes en culture primaire

Pour aller plus loin dans nos investigations, nous avons examiné la contribution endogène des PKC α et β dans la formation du fragment N1 dans des fibroblastes en culture primaire invalidés pour ces isoformes obtenues par une collaboration avec le Dr. Michaël Leitges. Nos résultats montrent une abrogation quasi totale des formations basale et régulée par la PKC du fragment N1 par les fibroblastes invalidés pour la PKC α ou pour la PKC β , démontrant ainsi la participation des PKC α et β à la formation de N1.

- La surexpression des PKC alpha, delta et epsilon augmente l'activité d'hydrolyse du substrat fluorimétrique JMV2770

Nous avons ensuite testé la capacité des PKC α , δ , et ϵ à promouvoir l'hydrolyse du substrat fluorimétrique JMV2770. La surexpression de ces isoformes de la PKC conduit à une augmentation de l'activité d'hydrolyse de JMV2770 de manière dépendante de BB3103, un inhibiteur spécifique de disintgrines, par des cellules HEK293 intactes stimulées avec du PDBu. Ces résultats suggèrent que le mécanisme passant par la voie PKC et conduisant à une potentialisation de la formation de N1 aboutit à une augmentation de l'activité enzymatique des disintgrines.

- la surexpression de la PKC alpha ou epsilon conduit à la phosphorylation d'ADAM17 sur la thréonine 735

Des travaux effectués au sein de notre laboratoire ont clairement établi la seule implication de la disintgrine ADAM17 dans le clivage régulé par la voie PKC de la PrP^c. Nous avons ainsi démontré qu'ADAM17 est phosphorylée sur sa thréonine 735 localisée au niveau de sa queue cytoplasmique par les PKC α , et ϵ , entraînant une

augmentation de son activité enzymatique. La mutation de ce résidu en alanine abroge totalement l'augmentation de la formation de N1, mais également l'activité d'hydrolyse du substrat fluorimétrique JMV2770 induite par du PDBu, démontrant ainsi que le mécanisme de régulation du clivage de la PrP^c par la PKC est médié par les isoformes α et ε via la phosphorylation d'ADAM17 sur sa thréonine 735 qui promeut l'augmentation de son activité.

Cette étude nous a donc permis de démontrer l'implication des PKC α , β , δ et ε dans la régulation du clivage physiologique de la PrP^c. Les mêmes isoformes régulent le clivage de la β APP à son site α -sécrétase, à l'exception de la PKC δ (**résultats non publiés**). Ces observations mettent en lumière une différence entre les métabolismes de la PrP^c et de la β APP et corroborent les observations de Kinouchi et collaborateurs (**Kinouchi et al., 1995**). Nous avons montré qu'ADAM17 est phosphorylée sur sa thréonine 735 suite à l'activation de la PKC, conduisant ainsi à une augmentation de son activité qui se traduit par la potentialisation de la sécrétion de N1, mais également par une activité d'hydrolyse plus importante du substrat fluorimétrique JMV2770. Ces observations établissent un lien avec notre étude précédente qui a clairement montré que les récepteurs muscariniques M1 et M3 contrôlent le clivage physiologique de la PrP^c par un mécanisme qui implique la PKC et qui nécessite la phosphorylation d'ADAM17 sur la thréonine 735 (**voir article 3**). Il est tentant, au regard de ces observations de spéculer que les mêmes isoformes de la PKC participent à la régulation du clivage physiologique de la PrP^c suite à l'activation des récepteurs muscariniques.

Article 4

"Protein kinase C isoforms α and ε contribute to the α -secretase cleavage of cellular prion: role in ADAM17 phosphorylation and activity".

Cissé MA., Louis K., Braun U., Mari B., Leitges M., Auberger P., Checler F., and Vincent B.

J Biol Chem. (submitted)

III/ AUTRES TRAVAUX

- Caractérisation d'un nouveau substrat fluorimétrique quenché mimant la coupure 111/112 de la PrP^c (Article 5)

Dans cette étude, nous avons décrit et caractérisé un dosage enzymatique basé sur un substrat fluorimétrique quenché appelé JMV2770. Ce substrat mime la séquence en acides aminés de la protéine prion humaine comprise entre la thréonine 107 et l'alanine 116, donc le site de clivage 111/112 ciblé par les disintégrines. Le clivage du substrat libère un fluorophore qui émet une fluorescence enregistrée à des longueurs d'onde de 320 nm et 420 nm (excitation et émission respectivement).

Les valeurs de fluorescence optimales, suite au clivage du substrat JMV2770, sont enregistrées à pH neutre, ce qui constitue un environnement adéquat pour une activité de type disintégrine. Le choix d'effectuer nos dosages sur des cellules intactes nous a paru judicieux pour deux raisons principales : 1/ Le substrat étant non perméant, la fluorescence émise enregistrée sera directement fonction d'une activité protéolytique membranaire dans une topologie de type ectopeptidase, c'est-à-dire une configuration d'une enzyme ayant son site catalytique exposé vers le milieu extracellulaire; 2/Pour pouvoir bénéficier de toute la machinerie cellulaire de régulation permettant de jauger les effets de molécules activatrices sur l'activité de type disintégrine.

Nous avons ainsi procédé à la caractérisation complète de ce substrat quenché en testant son activité d'hydrolyse sur plusieurs lignées cellulaires.

- L'hydrolyse du substrat JMV2770 par les cellules HEK293 et les fibroblastes est sensible aux inhibiteurs de disintégrines

Nos résultats montrent que les cellules HEK293 et les fibroblastes ont la capacité d'hydrolyser le substrat JMV2770 de manière dépendante de l'inhibiteur BB3103. De plus, l'*o*-phénanthroline, un inhibiteur de métalloprotéase, et TAPI, un inhibiteur spécifique d'ADAM17, inhibent également d'environ 50% l'activité d'hydrolyse du substrat JMV2770 par les cellules intactes. En revanche, l'AEBSF et la pepstatine, qui inhibent les protéases à sérines et les protéases acides, respectivement, n'affectent pas l'activité d'hydrolyse du JMV2770.

- L'activité d'hydrolyse du substrat JMV2770 est fonction du niveau d'expression des disintégrines ADAM9, ADAM10 et ADAM17

Nous avons effectué des dosages sur des cellules HEK293 qui surexpriment de manière stable les disintégrines ADAM9, ADAM10 ou ADAM17. La surexpression de chacune des disintégrines augmente l'activité d'hydrolyse sensible à l'inhibiteur BB3103 du substrat fluorimétrique JMV2770. Nous disposons également au laboratoire de fibroblastes invalidés pour ADAM10 ou ADAM17, ce qui nous a permis d'examiner la contribution relative de chacune des disintégrines à l'hydrolyse du JMV2770. Ainsi, l'invalidation des disintégrines ADAM10 ou ADAM17 conduit à une baisse significative de l'activité d'hydrolyse du substrat JMV2770. En tirant avantage de la disponibilité de cellules HEK293 dont les taux endogènes d'ADAM9 ont été baissés par une approche antisens ([voir article 2](#)), nous avons enregistré, sur trois clones différents, une activité d'hydrolyse du substrat JMV2770 qui diminue et qui est corrélée avec le niveau d'expression/activité d'ADAM9.

- La surexpression d'ADAM9 potentialise l'hydrolyse de JMV2770 médiée par ADAM10 dans des fibroblastes intacts

Nous avons précédemment démontré qu'il existe une relation fonctionnelle entre ADAM9 et ADAM10 qui permet de réguler le clivage physiologique de la PrP^c ([voir article 2](#)). Pour renforcer ces résultats, nous avons effectué une série de dosages, en utilisant le substrat JMV2770, sur les fibroblastes intacts invalidés pour la disintégrine ADAM10. La surexpression d'ADAM9 seule dans ces cellules n'a aucun effet sur l'hydrolyse de JMV2770. En revanche, la surexpression d'ADAM10 seule augmente l'hydrolyse de JMV2770 et la co-expression d'ADAM9 et d'ADAM10 conduit à une plus grande activité d'hydrolyse du substrat. Les mêmes expériences faites sur du milieu conditionné à partir des fibroblastes invalidés pour ADAM10 montrent des résultats similaires. Ces résultats corroborent ainsi nos observations précédentes ([voir article 2](#)) et démontrent que ce mécanisme de régulation de la formation de N1 impliquant ADAM9 et ADAM10 est médié en partie par le largage dans le milieu extracellulaire d'un fragment dérivé d'ADAM10 qui agit à distance.

Ainsi, la synthèse et la caractérisation du substrat fluorimétrique quenché JMV2770 permettent de disposer d'un outil de criblage pharmacologique à haut débit et d'avoir la possibilité de tester des molécules potentiellement activatrices ou inhibitrices de l'activité de type disintégrine. La mise au point de ce dosage fluorimétrique pourrait également nous permettre d'identifier d'autres enzymes susceptibles de participer au clivage de la PrP^c en position 111/112.

Par ailleurs, les disintégrines étant impliquées dans certaines tumeurs ([Zigrino et al., 2005](#); [Wildeboer et al., 2006](#)), avoir la possibilité de tester des inhibiteurs spécifiques de cette classe d'enzyme à l'aide de ce substrat peut s'avérer d'un apport non négligeable dans une perspective de thérapie pharmacologique.

Article 5

"Design and Characterization of a novel Cellular Prion-derived Quenched Fluorimetric Substrate of α -secretase".

Cissé MA., Gandreuil C., Hernandez JF., Martinez J., Checler F., and Vincent B.

BBRC 2006 June 21; 374: 254-260

IV/ DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles et la maladie d'Alzheimer constituent des syndrômes neurodégénératifs contre lesquels il n'existe à ce jour aucun traitement efficace. La β APP et la PrP^c, les deux protéines impliquées dans la maladie d'Alzheimer et les pathologies à prions, respectivement, présentent certaines similitudes du point de vue de la régulation de leurs métabolismes. En effet, les deux protéines subissent des protéolyses constitutives et régulées par la voie PKC par l'intermédiaire des mêmes disintégriines, et ces clivages interviennent à l'intérieur des domaines toxiques A β et PrP^c106-126. Le point commun à toutes les pathologies liées au cerveau réside dans la propension des protéines impliquées à s'agrèger et à former des structures fibrillaires qui véhiculent une toxicité inhérente aboutissant irrémédiablement à la mort neuronale (Bucciantini et al., 2002). Ainsi, il a été montré de façon exhaustive que la PrP^c106-126, tout comme la A β , a la propriété de s'agrèger et de former des structures fibrillaires (Forloni et al., 1993; Selvaggini et al., 1993; Tagliavini et al., 1993). De plus, la PrP^c106-126 est neurotoxique *in vitro* (Brown et al., 1996; Dupiereux et al., 2006) et *in vivo* (Ettaiche et al., 2000) et des anticorps dirigés contre la PrP^c95-123 empêchent la propagation de la PrP^{sc} dans des cellules infectées (Oboznaya et al., 2007). D'autre part, des souris immunisées avec de la PrP^c105-125 résistent plus longtemps à l'infection par de la scrapie que des souris non immunisées (Schwarz et al., 2003). L'ensemble de ces résultats indique que la séquence 106-126 représente un site très important pour le processus de conversion de la PrP^c en PrP^{sc}. Par ailleurs, des souris invalidées pour la PrP^c sont viables et fertiles et résistent à l'infection par de la scrapie (Bueler et al., 1992; Bueler et al., 1993). Ainsi, faire de la séquence 106-126 une cible protéolytique privilégiée en vue de dépléter les cellules de sa toxicité intrinsèque et de baisser les taux endogènes de la PrP^c qui est nécessaire à la mise en place du processus infectieux peut s'avérer être une stratégie thérapeutique efficace.

Nous avons identifié ADAM9 comme étant une enzyme intervenant indirectement dans le clivage physiologique de la PrP^c ou de la β APP, par

l'intermédiaire d'ADAM10, mettant ainsi en lumière pour la première fois une interaction fonctionnelle entre deux disintégrines (**Voir article 2**). Ainsi, nous avons démontré qu'ADAM9 est capable de cliver ADAM10 au niveau membranaire, libérant de ce fait un fragment soluble qui garde une activité enzymatique et qui contribue à la production de N1.

- Quelle serait la portée physiologique de cette interaction fonctionnelle entre ces deux disintégrines? Dans certaines situations, la cellule a besoin "d'exporter" des activités de type disintégrines en des lieux inaccessibles à la protéine dans sa conformation transmembranaire, permettant de réguler à distance des fonctions biologiques de certaines protéines comme la PrP^c, la β APP, des cytokines ou des facteurs de croissance. En effet, la régulation des fonctions biologiques de ces derniers passe par le clivage de leurs récepteurs, créant ainsi des facteurs solubles qui vont faire compétition avec les récepteurs transmembranaires pour leurs ligands, aboutissant à la modulation de signaux intracellulaires. Ce mécanisme pourrait également permettre à la cellule de cliver spécifiquement une protéine, qui ne serait accessible que par la forme diffusible et soluble de l'enzyme, dans une situation de stress particulier. Gutwein et collaborateurs ont récemment décrit un mécanisme qui montre qu'ADAM10 peut cliver L1, une molécule impliquée dans la migration cellulaire, soit de manière directe à la surface cellulaire, soit par l'intermédiaire d'une forme sécrétée de l'enzyme (**Gutwein et al., 2003**). Ainsi, la régulation de fonctions physiologiques par des formes sécrétées de disintégrines aux propriétés protéolytiques intactes semble être un mécanisme répandu et intégré par les cellules eucaryotes. Cependant plusieurs questions demeurent:

- Ce mécanisme est-il spécifique d'ADAM9 et d'ADAM10 ou s'agit-il d'un mode de régulation étendu à la majorité des disintégrines?

- Laquelle des deux formes, entre la transmembranaire et la sécrétée, a un plus gros impact sur la physiologie de la PrP^c ou de la β APP?

- A l'inverse, ADAM10 est-elle capable de cliver ADAM9 et de réguler son activité?

- Existe-t-il des polymorphismes associés aux disintégrines qui favorisent l'infection par la scrapie et la formation subséquente de plaques amyloïdes au niveau du système nerveux central?

Une seule mutation située sur une disintégrine a été identifiée chez l'homme, elle est située sur ADAM33 et constitue un facteur de risques pour l'asthme (Cakebread et al., 2004). Une étude récente a permis de conclure que la susceptibilité à la maladie de Creutzfeldt-Jakob n'est pas associée à une mutation du gène codant pour ADAM10, sans pour autant exclure une possible relation de cause à effet entre l'activité de l'enzyme et la pathologie (Plamont et al., 2003). ADAM10 colocalise avec la β APP dans les neurones corticaux et des baisses de l'expression de l'ARNm d'ADAM10 dans des cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Marcinkiewicz and Seidah, 2000) ont été rapportées. De plus, il y a une baisse notable du niveau de sAPP α en corrélation avec une baisse de l'expression d'ADAM10 dans le liquide céphalo-rachidien (Colciaghi et al., 2002) et dans certaines régions du cortex (Bernstein et al., 2003) chez certains de ces patients. Il a également été montré qu'ADAM17 colocalise avec les plaques amyloïdes dans des cerveaux atteints de la maladie d'Alzheimer (Skovronsky et al., 2001). Par ailleurs, la surexpression d'ADAM10 chez des souris modèles pour la maladie d'Alzheimer conduit à une baisse de la production du peptide A β et à une réversion des déficits cognitifs associés à la maladie (Postina et al., 2004). Ces études indexent clairement ADAM10 et ADAM17 comme des enzymes potentiellement impliquées dans la pathophysiologie de la maladie d'Alzheimer. Endres et collaborateurs ont montré que l'activité du promoteur d'ADAM10 peut être régulée par l'intermédiaire de l'acide rétinoïque *in vitro* (Endres et al., 2005). Il a également été montré que l'acide rétinoïque a des effets anti-amyloïdogéniques et peut protéger contre la neurodégénération induite par le peptide A β , alors qu'une altération de sa voie de signalisation conduit à la formation de dépôts amyloïdes chez des souris (Corcoran et al., 2004). Il serait intéressant de savoir si ces effets sont liés à une modulation de l'expression et de l'activité d'ADAM10, ce qui permettrait d'entrevoir de nouvelles thérapies contre certaines pathologies neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer. Cependant, une relation directe de cause à effet entre les disintégrines

et la maladie d'Alzheimer d'une part et la maladie de Creutzfeldt-Jakob d'autre part reste à déterminer.

La stimulation des récepteurs muscariniques par le carbachol conduit à l'activation de nombreuses voies de signalisation dans des neuroblastomes, notamment celle de la PKC, qui peut à son tour activer la voie MAPK/ERK (**Offermanns et al., 1993**). Nous avons montré l'implication des récepteurs muscariniques couplés à la voie PKC dans la régulation du métabolisme de la PrP^c, et cette voie d'activation est complètement dépendante de la PKC (**Voir article 3**). Cependant, l'identité des isoformes impliquées dans ce mécanisme n'était jusqu'à ce jour pas connue. Nous avons montré que les PKC α , β , δ et ϵ participent à la régulation de la formation de N1 suite à une stimulation directe des cellules par des esters de phorbol. Il serait intéressant de savoir si ce sont les mêmes isoformes de la PKC qui sont recrutées suite à l'activation des récepteurs muscariniques et qui conduisent à la formation de N1. Des travaux récents ont montré que l'activation des récepteurs muscariniques par du carbachol conduit à une translocation rapide et transitoire des PKC α , β II, et δ à la membrane plasmique de neuroblastomes humains, tandis que celle de la PKC ϵ est plus lente et soutenue (**Raghunath et al., 2003**), donnant ainsi des indications sur l'identité probable des PKCs impliquées dans la régulation du métabolisme de la PrP^c par les récepteurs muscariniques.

La phosphorylation de certaines protéines permet de réguler leurs fonctions et d'initier des signaux intracellulaires conduisant à la modulation d'une réponse physiologique donnée. Ainsi, il a été montré qu'ADAM9 interagit directement avec la PKC δ , conduisant à sa phosphorylation et la régulation du clivage de HB-EGF de manière directe (**Izumi et al., 1998**) ou via la MAPK/ERK (**Gechtman et al., 1999; Umata et al., 2001**). Nous avons démontré que l'activation des récepteurs muscariniques de type M1 conduit à la phosphorylation d'ADAM17 sur la thréonine 735 localisée au niveau de sa queue cytoplasmique par un mécanisme impliquant la PKC, contribuant à réguler son activité. Ce mécanisme est-il directement médié par une interaction physique de la PKC avec l'enzyme ou existe-t-il un facteur intermédiaire? Plusieurs résultats préliminaires suggèrent l'implication de la voie

MAPK/ERK dans la régulation du clivage de la PrP^c médiée par les récepteurs muscariniques : 1/ La thréonine 735 est localisée au niveau de la queue cytoplasmique d'ADAM17 dans un site consensus de phosphorylation reconnu par ERK1/2; 2/ ERK1 et ERK2 sont phosphorylées/activées suite à une stimulation de cellules qui surexpriment les récepteurs muscariniques M1 par du carbachol ou par l'agoniste sélectif AF267B (**résultats non publiés**); 3/ La formation de N1 qui est dépendante des récepteurs muscariniques est totalement abrogée par les inhibiteurs spécifiques de la voie MAPK/ERK tels que l'U0126 et le PD98059 (**résultats non publiés**) (Dudley et al., 1995; Favata et al., 1998), tandis que le LY294002 (Shoba et al., 2001), le SB203580 (Badger et al., 1996) et le SP600125 (Bennett et al., 2001), des inhibiteurs des voies PI3K, p38 et JNK, respectivement, n'ont aucun effet sur la production de N1 dépendante des récepteurs muscariniques (**résultats non publiés**). Ces observations apportent également l'évidence qu'il n'existe qu'une seule voie initiée par les récepteurs muscariniques et qui implique la voie PKC et la voie ERK, aboutissant au clivage de la PrP^c et à la formation de N1. Il serait intéressant d'établir si ADAM17 et ERK co-immunoprécipitent suite à l'activation des récepteurs muscariniques par du carbachol.

Bien qu'ils soient similaires sur bien des points, les métabolismes de la PrP^c et celui de la β APP présentent des différences notables. En effet, contrairement à la PrP^c, la PKC δ n'affecte pas le métabolisme de la β APP. De plus, l'augmentation de sAPP α induite par l'activation des récepteurs muscariniques est insensible à l'inhibiteur de la voie ERK, l'U0126 et à l'inhibiteur à spectre large de la PKC, le GF109206X (**voir "résultats complémentaires"**), indiquant que le mécanisme impliqué dans cette régulation ne nécessite ni la PKC, ni la MAPK/ERK. De manière intéressante, Ueda et collaborateurs ont montré que la PKC δ est impliquée de manière spécifique dans le mécanisme aboutissant à l'activation de la voie MEK/ERK de manière dépendante de la kinase Raf (Ueda et al., 1996). Ces résultats pourraient expliquer pourquoi le clivage physiologique de la β APP n'implique pas la voie ERK dans nos modèles cellulaires et apportent une preuve supplémentaire de l'existence d'une relation fonctionnelle hautement régulée entre certaines isoformes de la PKC et la voie ERK1/2. De plus, l'U0126 à l'inverse du GF109206X, n'inhibe pas

la formation de sAPP α induite par du PDBu, alors que celle de N1 est presque totalement abrogée dans les mêmes conditions (**voir "résultats complémentaires"**), indiquant clairement que le clivage régulé par la PKC de la β APP qui génère le fragment sAPP α passe par une voie qui est complètement indépendante de la voie MAPK/ERK. Ces résultats sont en contradiction avec les observations faites *in vitro* (**Mills et al., 1997; Haring et al., 1998**) et *in vivo* (**Caccamo et al., 2006**) montrant l'implication de la MAPK/ERK dans le mécanisme de régulation par la PKC de la production de sAPP α . Cependant, des différences majeures existent par exemple entre les études de Mills et collaborateurs et les nôtres: 1/ Ces auteurs ont utilisé des cellules HEK293 qui surexpriment la β APP⁶⁹⁵, tandis que nos observations sont faites sur de la β APP endogène; 2/ Ces auteurs ont également stimulé des cellules PC12 avec du NGF (Nerve Growth Factor) pour faire la corrélation entre l'activation de la MAPK/ERK et l'augmentation de la formation de sAPP α , tandis que nous passons par l'activation des récepteurs muscariniques; 3/ De plus, nous utilisons l'U0126 qui est un inhibiteur plus spécifique de la voie MAPK/ERK, tandis que ces auteurs utilisent le PD98059 qui peut affecter d'autres voies de manière aspécifique. Nos deux études ont donc été faites dans des conditions différentes. Par ailleurs, les travaux de Caccamo et collaborateurs montrent effectivement une corrélation entre l'activation des récepteurs muscariniques, la phosphorylation de ERK1/2, le niveau d'expression/activité d'ADAM17 et les niveaux de formations du fragment C83 (le fragment C-terminal qui est dérivé de la coupure α -sécrétase de la β APP) et du peptide A β (**Caccamo et al., 2006**). Ces auteurs démontrent *in vivo* qu'il y a une phosphorylation/activation des MAPKs ERK1/2 suite à l'activation des récepteurs muscariniques de type M1 par l'AF267B, mais ne prouvent à aucun moment que c'est l'activation de la voie ERK1/2 via la PKC qui est directement ou indirectement responsable de la formation de sAPP α /C83. En revanche, les résultats de Desdoutis-Magnen et collaborateurs abondent dans notre sens et montrent clairement que la formation de sAPP α induite par l'activation des récepteurs muscariniques M1 ou M3 n'est pas affectée par le GF10920X ou par le PD98059, suggérant donc que la voie de signalisation impliquée dans ce mécanisme est indépendante de la PKC et de la MAPK/ERK (**Desdoutis-Magnen et al., 1998**). Ainsi, des études plus approfondies

seront nécessaires afin de déterminer la réelle contribution de la voie MAPK/ERK dans la régulation du clivage de la β APP par l'activité de type α -sécrétase. Il a par ailleurs été rapporté que l'activation des récepteurs muscariniques conduit également à l'activation de p38 (Hildebrandt and Prowald, 2000) et de JNK (Fujino et al., 2000), il serait donc intéressant par la suite de voir si des inhibiteurs spécifiques de ces deux voies MAPK affectent le clivage de la β APP et la sécrétion de sAPP α . De plus, la formation de sAPP α induite par l'activation des récepteurs muscariniques M1 et M3 pourrait impliquer une tyrosine kinase comme cela a été suggéré par Slack et collaborateurs (Slack et al., 1995).

Plusieurs groupes ont décrit une relation fonctionnelle entre les présénilines et la MAPK/ERK. Ainsi, les travaux de Kim et collaborateurs ont montré que l'inactivation de la préséniline 1 conduit à une perte presque totale de l'activité des MAPKs ERK1/2 dans des fibroblastes immortalisés, tandis que les voies P38 et JNK ne sont pas affectées (Kim et al., 2005). De plus, la double inactivation des présénilines conduit à une baisse très importante des formes phosphorylées des MAPKs ERK1/2 dans des fibroblastes (Kang et al., 2005). Au regard du mécanisme de régulation du métabolisme de la PrP^c mettant en relation les voies PKC et ERK avec l'activité de type disintégrine, il serait très intéressant de voir si l'inactivation des présénilines affecte la formation de N1 *in vitro*. Ces observations rajoutent un nouveau facteur commun potentiel entre la β APP et la PrP^c et permettent ainsi de soulever plusieurs questions: 1/ Observe-t-on une baisse de N1 dans des cerveaux de patients atteints de certaines formes de la maladie d'Alzheimer liées à une mutation affectant l'activité des présénilines? 2/ Cette relation fonctionnelle entre les présénilines et ERK1/2 est-elle liée à l'activité des présénilines dépendante du complexe γ -sécrétase? Existe-t-il un quelconque polymorphisme des présénilines associé à la maladie de Creutzfeldt-jakob? Autant de questions pour lesquelles il serait intéressant de chercher des réponses qui permettraient de faire un pas supplémentaire dans la compréhension de la physiologie assez complexe de cette catégorie de protéines impliquées dans des pathologies neurodégénératives.

De nombreuses maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson présentent des altérations du système cholinergique (Newhouse et al., 1997; Yan and Feng, 2004; Clader and Wang, 2005). Le système dopaminergique nigrostriatal, qui contrôle de nombreuses fonctions physiologiques, telle que la coordination motrice, est régulé par de nombreuses afférences cholinergiques en provenance du striatum. Ainsi, tout dysfonctionnement lié au système cholinergique peut entraîner de graves troubles affectant le système dopaminergique pouvant par exemple conduire à des symptômes de type Parkinsoniens (Zhou et al., 2003). Des études récentes ont montré une altération du profil de glycosylation de l'acétylcholinestérase dans le liquide céphalorachidien de patients atteints de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (Silveyra et al., 2006), laissant penser qu'un dysfonctionnement au niveau des aires cholinergiques du cerveau pourrait contribuer au développement de la pathologie. Ces hypothèses peuvent paraître pertinentes du fait que : 1/le peptide A β et la PrP^{sc} s'accumulent dans les mêmes aires cérébrales (Hainfellner et al., 1998; Armstrong et al., 2001); 2/ l'acétylcholinestérase colocalise avec les dépôts de A β dans des cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et accélère la transition en formes fibrillaires dans des zones périphériques à l'enzyme (Inestrosa et al., 1996). Cependant, les mécanismes moléculaires qui favorisent cet état de transition ne sont pas encore bien connus. De manière intéressante, une étude réalisée sur une cohorte de patients atteints de la maladie d'Alzheimer a montré qu'il y a une baisse importante de la densité de récepteurs muscariniques M1 en corrélation avec une baisse de l'activité PKC au niveau du cortex frontal, mettant ainsi en lumière un lien putatif entre un dysfonctionnement du système cholinergique et la PKC (Tsang et al., 2006). De plus, l'analyse de cortex post-mortem a permis de rapporter une baisse de l'activité de la PKC chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Wang et al., 1994), suggérant que cette perte de fonction pourrait être liée à une altération de l'équilibre du système cholinergique, due à une baisse des taux endogènes de récepteurs muscariniques M1.

L'ensemble de ces résultats laisse à penser qu'une altération du système cholinergique pourrait être à l'origine ou du moins constituer un facteur aggravant de certaines formes de maladies à prions.

Les inhibiteurs d'acétylcholinestérase ont fait l'objet de nombreux essais cliniques chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, et les résultats obtenus se sont avérés encourageants, notamment avec le donepezil ([Rogers and Friedhoff, 1998](#); [Boada-Rovira et al., 2004](#)). Cependant, chez certains de ces patients des effets secondaires, tels que des vomissements, des douleurs abdominales et de l'hypotension ont été rapportés suite au traitement ([Bordier et al., 2006](#)). Par ailleurs, les récepteurs muscariniques étant impliqués dans la régulation de nombreuses fonctions biologiques, il paraît crucial de développer des molécules plus spécifiques et biodisponibles de façon à perturber le moins possible l'équilibre physiologique. Dans cette perspective, potentialiser la voie cholinergique par l'utilisation de molécules de seconde génération comme l'AF267B pourrait permettre d'améliorer ou de réverser les déficits cognitifs associés aux pathologies à prions et à la maladie d'Alzheimer.

La PrP^c, dans des conditions physiologiques, subit un clivage qui conduit à la formation de N1 et de sa contrepartie C-terminale appelée C1. Dans des cerveaux atteints de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, il intervient un clivage additionnel qui conduit à la formation de N2 et de sa contrepartie C-terminale appelée C2. Les travaux de Claire Sunyach dans notre laboratoire qui visent à mieux comprendre les fonctions respectives de ces catabolites ont permis de démontrer que le fragment C1 sensibilise les cellules à la mort cellulaire par apoptose induite par la staurosporine, alors que le fragment C2 reste inerte ([Voir article 1](#)). Au regard de cette étude il paraît légitime de se poser la question de savoir quelle serait la fonction du fragment N1? Ce dernier pourrait avoir des propriétés neurotrophiques et neuroprotectrices, par analogie avec le fragment sAPP α ([Wallace et al., 1997](#)). En effet, il existe une modulation de l'expression de la PrP^c chez la souris et le hamster pendant le développement ([Lazarini et al., 1991](#); [Mobley et al., 1988](#)), suggérant un rôle important de la protéine pendant l'embryogénèse. De plus, plusieurs équipes ont

montré que la PrP^c favorise la croissance neuronale et la synaptogenèse (Sales et al., 2002; Kanaani et al., 2005; Steele et al., 2006) et des souris invalidées de manière conditionnelle pour la PrP^c présentent des défauts sur le plan électrophysiologique (Mallucci et al., 2002). Ces propriétés sont-elles véhiculées par la PrP^c ou par son catabolite N1? Par ailleurs, aucun polymorphisme associé aux disintégrines chez des patients atteints de la maladie de Creutzfeldt-Jakob n'a été rapporté dans la littérature. Ainsi, le fragment N1 pourrait compenser pour la perte des propriétés neurotrophiques et neuroprotectrices de sAPP α , et vice et versa, ce qui pourrait expliquer le fait que dans certains cas, des personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer ou de la maladie de Creutzfeldt-Jakob mettent relativement longtemps à manifester les premiers signes cliniques. Cela pourrait aussi expliquer (si la relation fonctionnelle entre les présénilines et la voie MAPK/ERK est avérée) pourquoi les cas de maladie d'Alzheimer liés à des mutations associées aux présénilines sont plus virulentes que ceux liés à des mutations situées sur la β APP. Cela pourrait être dû aux effets d'une baisse simultanée des tonus protecteurs des fragments sAPP α et N1 et de l'augmentation concomitante de la production du peptide A β . Il serait donc très intéressant de tester l'effet du peptide recombinant N1 sur la synaptogenèse en utilisant des cellules en culture.

L'établissement de souris invalidées pour la PrP^c et surexprimant les différents fragments N1, N2, C1 et C2 dérivés de son clivage permettrait de mieux comprendre leurs fonctions physiologiques respectives et d'ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques concernant les pathologies à prions. Cependant, plusieurs questions restent en suspens:

- Des souris invalidées pour la PrP^c et surexprimant C1 résistent-elles à l'infection par de la PrP^{sc}?

- La surexpression des disintégrines ADAM9, ADAM10 ou ADAM17 chez des souris modèles de la maladie de Creutzfeldt-Jakob peut-elle permettre d'empêcher ou de ralentir le développement de la pathologie?

- Il y aurait-il une baisse de l'activité de la PKC ou des disintégrines dans certaines régions du cerveau atteintes par la maladie? Si oui, la surexpression de la

PKC peut-elle permettre de moduler l'activité de type disintégrine *in vivo* et d'empêcher l'évolution de l'infection?

- L'invalidation de la MAPK ERK1 chez des souris constituerait-elle un facteur favorisant l'infection par de la scrapie ou à l'inverse, activer cette MAPK de manière pharmacologique permettra-t-il de ralentir le développement de la maladie et l'apparition des premiers symptômes?

Plusieurs approches sont également envisageables *in vitro* afin de valider notre hypothèse selon laquelle baisser de manière pharmacologique la PrP^c endogène pourrait empêcher ou ralentir sa conversion en PrP^{sc} et permettre d'influer sur le processus infectieux. Nous avons obtenu en collaboration avec le Dr Didier Vilette des cellules ROV9 inductibles avec de la doxycycline pour la PrP^c ovine. Ces cellules ont été caractérisées (Vilette et al., 2001) et constituent un bon modèle pour étudier des mécanismes infectieux liés à la PrP^c car elles permettent de contrôler la cinétique de propagation de l'infection et de déterminer de manière plus fiable les effets éventuels d'une molécule sur ce processus. Plusieurs approches expérimentales nous paraissent pertinentes et assez vite réalisables dans le but de mimer une invalidation pharmacologique de la PrP^c: 1/ Traiter de façon chronique ces cellules avec des agonistes muscariniques. Par cette méthode nous espérons induire la voie PKC conduisant à l'activation d'ADAM17 via la voie ERK et au clivage de la PrP^c au site 111/112; 2/ Surexprimer les disintégrines ADAM9, ADAM10 ou ADAM17 dans les ROV9 de façon à favoriser la coupure en position 111/112; 3/ Traiter de façon chronique les cellules avec des esters de phorbol ou avec des activateurs non cancérogènes de la PKC telle que la bryostatine, afin de favoriser le clivage de la PrP^c. A plus long terme, il serait intéressant de voir si l'injection d'agonistes muscariniques à des souris modèles de la maladie de Creutzfeldt-Jakob permettrait d'activer de manière préférentielle la voie PKC et ainsi d'augmenter l'activité des disintégrines, de baisser les taux endogènes de la PrP^c et de ralentir l'infection qui y est associée.

Chen et collaborateurs ont été les premiers à démontrer *in vivo* l'existence de différentes coupures protéolytiques de la PrP^c pouvant permettre de discriminer un sujet sain d'un patient atteint de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (Chen et al., 1995).

A l'heure actuelle, rien n'est connu sur la fonction du fragment N2 et sur l'identité de la protéase impliquée dans sa formation. En effet, si le ratio N1/N2 détermine l'évolution vers la pathologie, identifier et cibler de manière pharmacologique cette protéase de façon à moduler négativement son activité pourrait s'avérer efficace. Un candidat possible serait BACE1, la β -sécrétase responsable de la formation du peptide A β (Vassar et al., 1999). En effet, des études montrent que BACE est exprimée au niveau des rafts dans des neurones (Tun et al., 2002), lieu de localisation par excellence de la PrP^c, ce qui rend donc possible une interaction de type enzyme/substrat entre les deux protéines. De manière intéressante, il a été montré que l'activation de la voie PKC conduit à la régulation du trafic intracellulaire et de la dégradation de BACE1 dans des lignées neuronales et fibroblastiques, respectivement, ce qui module son activité et contribue à baisser le niveau de peptide A β (Wang et al., 2006). Ces travaux suggèrent donc que la PKC pourrait avoir un double effet sur le métabolisme de la β APP, d'une part la modulation positive de l'activité des disintégrines, ce qui aboutit à augmenter le niveau de sAPP α , d'autre part elle contribue à baisser l'activité de la β -sécrétase, et de ce fait les taux endogènes du peptide A β . Ainsi on pourrait émettre comme hypothèse l'existence d'un tel mécanisme concernant la PrP^c, d'un côté il y aurait la relation entre l'activation de la PKC, la modulation de l'activité d'ADAM17 et l'augmentation de la formation de N1, et de l'autre, une modulation négative de l'activité de BACE1 par la PKC qui aboutirait à baisser les niveaux endogènes de N2. Il serait intéressant de voir si la surexpression de BACE1 affecte le clivage de la PrP^c *in vitro* et contribue à baisser le ratio N1/N2. Dans cette perspective, un substrat fluorimétrique quenché mimant la coupure de la PrP^c en position 90/91 a été synthétisé et sa caractérisation permettra de disposer d'un outil de criblage pharmacologique à haut débit qui pourrait rapidement conduire à l'identification d'une famille d'enzymes potentiellement impliquée dans le clivage de la PrP^c qui génère le fragment N2.

En conclusion, l'ensemble de ce travail aura permis de connaître certains des partenaires moléculaires qui interagissent au niveau cellulaire pour réguler le métabolisme de la PrP^c. Bien que l'on ne puisse pas ignorer les difficultés inévitables

au criblage pharmacologique et spécifique des récepteurs et des enzymes qui régulent de nombreuses fonctions biologiques, ces découvertes permettent d'envisager de nouvelles perspectives thérapeutiques contre les maladies à prions.

LISTE DES PUBLICATIONS

- Cissé M. A., Sunyach C., Lefranc-Jullien S., Postina R., Vincent B., and Checler F. The disintegrin ADAM9 indirectly contributes to the physiological processing of cellular prion by modulating ADAM10 activity.

J Biol Chem. 2005 Dec 9; 280(49):40624-31.

- Cissé M.A., Gandreuil C., Hernandez J.F., Martinez J., Checler F., and Vincent B. Design and characterization of a novel cellular prion-derived quenched fluorimetric substrate of α -secretase.

Biochem Biophys Res Commun. 2006 Aug 18;347(1):254-60.

- Sunyach C., Cissé M.A., Da Costa C.A., Vincent B., and Checler F. The C-terminal products of cellular prion protein processing, C1 and C2, exert distinct influence on p53-dependent staurosporine induced caspase-3 activation.

J Biol Chem. 2007 Jan 19;282(3):1956-63 2006 Nov 22.

- Cissé M.A., Sunyach C., Slack B.E., Fisher A., Vincent B., and Checler F. M1 and M3 Muscarinic receptors control physiological processing of cellular prion by modulating ADAM17 phosphorylation and activity.

J Neuroscience (In press)

- Cissé MA., Louis K., Braun U., Mari B., Leitges M., Checler F., and Vincent B. Protein kinase C isoforms α and ϵ contribute to the α -secretase cleavage of cellular prion: role in ADAM17 phosphorylation and activity.

J Biol Chem. (Submitted)

BIBLIOGRAPHIE

- Abeliovich, A., R. Paylor, C. Chen, J.J. Kim, J.M. Wehner, and S. Tonegawa. 1993. PKC gamma mutant mice exhibit mild deficits in spatial and contextual learning. *Cell*. 75:1263-71.
- Alessi, D.R., Y. Saito, D.G. Campbell, P. Cohen, G. Sithanandam, U. Rapp, A. Ashworth, C.J. Marshall, and S. Cowley. 1994. Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *Embo J*. 13:1610-9.
- Allman, K., K.M. Page, C.A. Curtis, and E.C. Hulme. 2000. Scanning mutagenesis identifies amino acid side chains in transmembrane domain 5 of the M(1) muscarinic receptor that participate in binding the acetyl methyl group of acetylcholine. *Mol Pharmacol*. 58:175-84.
- Anagnostaras, S.G., G.G. Murphy, S.E. Hamilton, S.L. Mitchell, N.P. Rahnema, N.M. Nathanson, and A.J. Silva. 2003. Selective cognitive dysfunction in acetylcholine M1 muscarinic receptor mutant mice. *Nat Neurosci*. 6:51-8.
- Aouadi, M., B. Binetruy, L. Caron, Y. Le Marchand-Brustel, and F. Bost. 2006. Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice. *Biochimie*. 88:1091-8.
- Armstrong, R.A., P.L. Lantos, and N.J. Cairns. 2001. The spatial patterns of prion protein deposits in Creutzfeldt-Jakob disease: comparison with beta-amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 298:53-6.
- Arribas, J., J.J. Bech-Serra, and B. Santiago-Josefat. 2006. ADAMs, cell migration and cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 25:57-68.
- Asai, M., C. Hattori, B. Szabo, N. Sasagawa, K. Maruyama, S. Tanuma, and S. Ishiura. 2003. Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. *Biochem Biophys Res Commun*. 301:231-5.
- Asaoka, Y., K. Yoshida, M. Oka, T. Shinomura, H. Mishima, S. Matsushima, and Y. Nishizuka. 1992. The signal-induced phospholipid degradation cascade and protein kinase C activation. *Ciba Found Symp*. 164:50-9; discussion 59-65.
- Athauda, S.B., T. Takahashi, T. Kageyama, and K. Takahashi. 1991. Autocatalytic processing of procathepsin E to cathepsin E and their structural differences. *Biochem Biophys Res Commun*. 175:152-8.
- Auld, D.S., S. Kar, and R. Quirion. 1998. Beta-amyloid peptides as direct cholinergic neuromodulators: a missing link? *Trends Neurosci*. 21:43-9.

- Badger, A.M., J.N. Bradbeer, B. Votta, J.C. Lee, J.L. Adams, and D.E. Griswold. 1996. Pharmacological profile of SB 203580, a selective inhibitor of cytokine suppressive binding protein/p38 kinase, in animal models of arthritis, bone resorption, endotoxin shock and immune function. *J Pharmacol Exp Ther.* 279:1453-61.
- Baier, G. 2003. The PKC gene module: molecular biosystematics to resolve its T cell functions. *Immunol Rev.* 192:64-79.
- Barmada, S.J., and D.A. Harris. 2005. Visualization of prion infection in transgenic mice expressing green fluorescent protein-tagged prion protein. *J Neurosci.* 25:5824-32.
- Baumann, F., M. Tolnay, C. Brabeck, J. Pahnke, U. Kloz, H.H. Niemann, M. Heikenwalder, T. Rulicke, A. Burkle, and A. Aguzzi. 2007. Lethal recessive myelin toxicity of prion protein lacking its central domain. *Embo J.* 26:538-47.
- Bayer, L., P.Y. Risold, B. Griffond, and D. Fellmann. 1999. Rat diencephalic neurons producing melanin-concentrating hormone are influenced by ascending cholinergic projections. *Neuroscience.* 91:1087-101.
- Bennett, B.L., D.T. Sasaki, B.W. Murray, E.C. O'Leary, S.T. Sakata, W. Xu, J.C. Leisten, A. Motiwala, S. Pierce, Y. Satoh, S.S. Bhagwat, A.M. Manning, and D.W. Anderson. 2001. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:13681-6.
- Benussi, L., S. Govoni, L. Gasparini, G. Binetti, M. Trabucchi, A. Bianchetti, and M. Racchi. 1998. Specific role for protein kinase C alpha in the constitutive and regulated secretion of amyloid precursor protein in human skin fibroblasts. *Neurosci Lett.* 240:97-101.
- Beranger, F., A. Mange, B. Goud, and S. Lehmann. 2002. Stimulation of PrP(C) retrograde transport toward the endoplasmic reticulum increases accumulation of PrP(Sc) in prion-infected cells. *J Biol Chem.* 277:38972-7.
- Bergamaschi, S., G. Binetti, S. Govoni, W.C. Wetsel, F. Battaini, M. Trabucchi, A. Bianchetti, and M. Racchi. 1995. Defective phorbol ester-stimulated secretion of beta-amyloid precursor protein from Alzheimer's disease fibroblasts. *Neurosci Lett.* 201:1-5.
- Bernstein, H.G., A. Bukowska, D. Krell, B. Bogerts, S. Ansorge, and U. Lendeckel. 2003. Comparative localization of ADAMs 10 and 15 in human cerebral cortex normal aging, Alzheimer disease and Down syndrome. *J Neurocytol.* 32:153-60.
- Berstein, G., K. Haga, T. Haga, and A. Ichiyama. 1988. Agonist and antagonist binding of muscarinic acetylcholine receptors purified from porcine brain: interconversion of high- and low-affinity sites by sulfhydryl reagents. *J Neurochem.* 50:1687-94.

- Bikadi, Z., and M. Simonyi. 2003. Muscarinic and nicotinic cholinergic agonists: structural analogies and discrepancies. *Curr Med Chem.* 10:2611-20.**
- Black, R.A., C.T. Rauch, C.J. Kozlosky, J.J. Peschon, J.L. Slack, M.F. Wolfson, B.J. Castner, K.L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K.A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J.N. Fitzner, R.S. Johnson, R.J. Paxton, C.J. March, and D.P. Cerretti. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature.* 385:729-33.**
- Blaumueller, C.M., H. Qi, P. Zagouras, and S. Artavanis-Tsakonas. 1997. Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell.* 90:281-91.**
- Blobel, C.P. 1997. Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch. *Cell.* 90:589-92.**
- Blobel, C.P., T.G. Wolfsberg, C.W. Turck, D.G. Myles, P. Primakoff, and J.M. White. 1992. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature.* 356:248-52.**
- Boada-Rovira, M., H. Brodaty, P. Cras, S. Baloyannis, M. Emre, R. Zhang, and R. Bahra. 2004. Efficacy and safety of donepezil in patients with Alzheimer's disease: results of a global, multinational, clinical experience study. *Drugs Aging.* 21:43-53.**
- Bonner, T.I., A.C. Young, M.R. Brann, and N.J. Buckley. 1988. Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron.* 1:403-10.**
- Bordier, P., S. Garrigue, S. Lanusse, J. Margaine, F. Robert, L. Gencel, and A. Lafitte. 2006. Cardiovascular effects and risk of syncope related to donepezil in patients with Alzheimer's disease. *CNS Drugs.* 20:411-7.**
- Bounhar, Y., Y. Zhang, C.G. Goodyer, and A. LeBlanc. 2001. Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 276:39145-9.**
- Brandner, S., A. Raeber, A. Sailer, T. Blattler, M. Fischer, C. Weissmann, and A. Aguzzi. 1996. Normal host prion protein (PrPC) is required for scrapie spread within the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:13148-51.**
- Breen, K.C., M. Bruce, and B.H. Anderton. 1991. Beta amyloid precursor protein mediates neuronal cell-cell and cell-surface adhesion. *J Neurosci Res.* 28:90-100.**
- Brodde, O.E., and M.C. Michel. 1999. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev.* 51:651-90.**
- Brou, C., F. Logeat, N. Gupta, C. Bessia, O. LeBail, J.R. Doedens, A. Cumano, P. Roux, R.A. Black, and A. Israel. 2000. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell.* 5:207-16.**

- Brown, D.R., and A. Besinger. 1998. Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem J.* 334 (Pt 2):423-9.
- Brown, D.R., J. Herms, and H.A. Kretzschmar. 1994. Mouse cortical cells lacking cellular PrP survive in culture with a neurotoxic PrP fragment. *Neuroreport.* 5:2057-60.
- Brown, D.R., R.S. Nicholas, and L. Canevari. 2002. Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. *J Neurosci Res.* 67:211-24.
- Brown, D.R., K. Qin, J.W. Herms, A. Madlung, J. Manson, R. Strome, P.E. Fraser, T. Kruck, A. von Bohlen, W. Schulz-Schaeffer, A. Giese, D. Westaway, and H. Kretzschmar. 1997a. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature.* 390:684-7.
- Brown, D.R., B. Schmidt, and H.A. Kretzschmar. 1996. Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature.* 380:345-7.
- Brown, D.R., W.J. Schulz-Schaeffer, B. Schmidt, and H.A. Kretzschmar. 1997b. Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol.* 146:104-12.
- Brown, P., E.H. Rau, B.K. Johnson, A.E. Bacote, C.J. Gibbs, Jr., and D.C. Gajdusek. 2000. New studies on the heat resistance of hamster-adapted scrapie agent: threshold survival after ashing at 600 degrees C suggests an inorganic template of replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:3418-21.
- Bucciantini, M., E. Giannoni, F. Chiti, F. Baroni, L. Formigli, J. Zurdo, N. Taddei, G. Ramponi, C.M. Dobson, and M. Stefani. 2002. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature.* 416:507-11.
- Buckley, N.J., T.I. Bonner, and M.R. Brann. 1988. Localization of a family of muscarinic receptor mRNAs in rat brain. *J Neurosci.* 8:4646-52.
- Bueler, H., A. Aguzzi, A. Sailer, R.A. Greiner, P. Autenried, M. Aguet, and C. Weissmann. 1993. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell.* 73:1339-47.
- Bueler, H., M. Fischer, Y. Lang, H. Bluethmann, H.P. Lipp, S.J. DeArmond, S.B. Prusiner, M. Aguet, and C. Weissmann. 1992. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature.* 356:577-82.
- Buxbaum, J.D., E.H. Koo, and P. Greengard. 1993. Protein phosphorylation inhibits production of Alzheimer amyloid beta/A4 peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:9195-8.

- Buxbaum, J.D., K.N. Liu, Y. Luo, J.L. Slack, K.L. Stocking, J.J. Peschon, R.S. Johnson, B.J. Castner, D.P. Cerretti, and R.A. Black. 1998. Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem.* 273:27765-7.
- Buxbaum, J.D., M. Oishi, H.I. Chen, R. Pinkas-Kramarski, E.A. Jaffe, S.E. Gandy, and P. Greengard. 1992. Cholinergic agonists and interleukin 1 regulate processing and secretion of the Alzheimer beta/A4 amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:10075-8.
- Buxbaum, J.D., A.A. Ruefli, C.A. Parker, A.M. Cypess, and P. Greengard. 1994. Calcium regulates processing of the Alzheimer amyloid protein precursor in a protein kinase C-independent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:4489-93.
- Bymaster, F.P., D.L. McKinzie, C.C. Felder, and J. Wess. 2003. Use of M1-M5 muscarinic receptor knockout mice as novel tools to delineate the physiological roles of the muscarinic cholinergic system. *Neurochem Res.* 28:437-42.
- Caccamo, A., S. Oddo, L.M. Billings, K.N. Green, H. Martinez-Coria, A. Fisher, and F.M. LaFerla. 2006. M1 receptors play a central role in modulating AD-like pathology in transgenic mice. *Neuron.* 49:671-82.
- Cakebread, J.A., H.M. Haitchi, J.W. Holloway, R.M. Powell, T. Keith, D.E. Davies, and S.T. Holgate. 2004. The role of ADAM33 in the pathogenesis of asthma. *Springer Semin Immunopathol.* 25:361-75.
- Carl-McGrath, S., U. Lendeckel, M. Ebert, A. Roessner, and C. Rocken. 2005. The disintegrin-metalloproteinases ADAM9, ADAM12, and ADAM15 are upregulated in gastric cancer. *Int J Oncol.* 26:17-24.
- Carter, C.A., and C.J. Kane. 2004. Therapeutic potential of natural compounds that regulate the activity of protein kinase C. *Curr Med Chem.* 11:2883-902.
- Castilla, J., P. Saa, C. Hetz, and C. Soto. 2005. In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell.* 121:195-206.
- Castrillo, A., D.J. Pennington, F. Otto, P.J. Parker, M.J. Owen, and L. Bosca. 2001. Protein kinase Cepsilon is required for macrophage activation and defense against bacterial infection. *J Exp Med.* 194:1231-42.
- Caulfield, M.P. 1993. Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther.* 58:319-79.
- Chantry, A., N.A. Gregson, and P. Glynn. 1989. A novel metalloproteinase associated with brain myelin membranes. Isolation and characterization. *J Biol Chem.* 264:21603-7.
- Checler, F. 1995. Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 65:1431-44.

- Checler, F., and B. Vincent. 2002. Alzheimer's and prion diseases: distinct pathologies, common proteolytic denominators. *Trends Neurosci.* 25:616-20.
- Chen, S.G., D.B. Teplow, P. Parchi, J.K. Teller, P. Gambetti, and L. Autilio-Gambetti. 1995. Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases. *J Biol Chem.* 270:19173-80.
- Chesebro, B., M. Trifilo, R. Race, K. Meade-White, C. Teng, R. LaCasse, L. Raymond, C. Favara, G. Baron, S. Priola, B. Caughey, E. Masliah, and M. Oldstone. 2005. Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science.* 308:1435-9.
- Choi, D.S., D. Wang, G.Q. Yu, G. Zhu, V.N. Kharazia, J.P. Paredes, W.S. Chang, J.K. Deitchman, L. Mucke, and R.O. Messing. 2006. PKCepsilon increases endothelin converting enzyme activity and reduces amyloid plaque pathology in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:8215-20.
- Choi, I., J.M. Woo, S. Hong, Y.K. Jung, D.H. Kim, and C. Cho. 2003. Identification and characterization of ADAM32 with testis-predominant gene expression. *Gene.* 304:151-62.
- Chozick, B. 1987. The nucleus basalis of Meynert in neurological dementing disease: a review. *Int J Neurosci.* 37:31-48.
- Cisse, M.A., C. Sunyach, S. Lefranc-Jullien, R. Postina, B. Vincent, and F. Checler. 2005. The disintegrin ADAM9 indirectly contributes to the physiological processing of cellular prion by modulating ADAM10 activity. *J Biol Chem.* 280:40624-31.
- Clader, J.W., and Y. Wang. 2005. Muscarinic receptor agonists and antagonists in the treatment of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des.* 11:3353-61.
- Colciaghi, F., B. Borroni, L. Pastorino, E. Marcello, M. Zimmermann, F. Cattabeni, A. Padovani, and M. Di Luca. 2002. [alpha]-Secretase ADAM10 as well as [alpha]APPs is reduced in platelets and CSF of Alzheimer disease patients. *Mol Med.* 8:67-74.
- Conner, G.E., J.A. Udey, C. Pinto, and J. Sola. 1989. Nonhuman cells correctly sort and process the human lysosomal enzyme cathepsin D. *Biochemistry.* 28:3530-3.
- Corcoran, J.P., P.L. So, and M. Maden. 2004. Disruption of the retinoid signalling pathway causes a deposition of amyloid beta in the adult rat brain. *Eur J Neurosci.* 20:896-902.
- Cousin, H., A. Gaultier, C. Bleux, T. Darribere, and D. Alfandari. 2000. PACSIN2 is a regulator of the metalloprotease/disintegrin ADAM13. *Dev Biol.* 227:197-210.

- Coussens, L., P.J. Parker, L. Rhee, T.L. Yang-Feng, E. Chen, M.D. Waterfield, U. Francke, and A. Ullrich. 1986. Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science*. 233:859-66.
- Crackower, M.A., R. Sarao, G.Y. Oudit, C. Yagil, I. Kozieradzki, S.E. Scanga, A.J. Oliveira-dos-Santos, J. da Costa, L. Zhang, Y. Pei, J. Scholey, C.M. Ferrario, A.S. Manoukian, M.C. Chappell, P.H. Backx, Y. Yagil, and J.M. Penninger. 2002. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*. 417:822-8.
- Creemers, J.W., D. Ines Dominguez, E. Plets, L. Serneels, N.A. Taylor, G. Multhaup, K. Craessaerts, W. Annaert, and B. De Strooper. 2001. Processing of beta-secretase by furin and other members of the proprotein convertase family. *J Biol Chem*. 276:4211-7.
- Davidson, S.K., S.W. Allen, G.E. Lim, C.M. Anderson, and M.G. Haygood. 2001. Evidence for the biosynthesis of bryostatins by the bacterial symbiont "Candidatus Endobugula sertula" of the bryozoan *Bugula neritina*. *Appl Environ Microbiol*. 67:4531-7.
- Davies, P., and A.J. Maloney. 1976. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*. 2:1403.
- Dawson, G.R., G.R. Seabrook, H. Zheng, D.W. Smith, S. Graham, G. O'Dowd, B.J. Bowery, S. Boyce, M.E. Trumbauer, H.Y. Chen, L.H. Van der Ploeg, and D.J. Sirinathsinghji. 1999. Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience*. 90:1-13.
- Della-Bianca, V., F. Rossi, U. Armato, I. Dal-Pra, C. Costantini, G. Perini, V. Politi, and G. Della Valle. 2001. Neurotrophin p75 receptor is involved in neuronal damage by prion peptide-(106-126). *J Biol Chem*. 276:38929-33.
- Desdouits-Magnen, J., F. Desdouits, S. Takeda, L.J. Syu, A.R. Saltiel, J.D. Buxbaum, A.J. Czernik, A.C. Nairn, and P. Greengard. 1998. Regulation of secretion of Alzheimer amyloid precursor protein by the mitogen-activated protein kinase cascade. *J Neurochem*. 70:524-30.
- Diarra-Mehrpour, M., S. Arrabal, A. Jalil, X. Pinson, C. Gaudin, G. Pietu, A. Pitaval, H. Ripoché, M. Eloit, D. Dormont, and S. Chouaib. 2004. Prion protein prevents human breast carcinoma cell line from tumor necrosis factor alpha-induced cell death. *Cancer Res*. 64:719-27.
- Diaz-Rodriguez, E., N. Cabrera, A. Esparis-Ogando, J.C. Montero, and A. Pandiella. 1999. Cleavage of the TrkA neurotrophin receptor by multiple metalloproteases generates signalling-competent truncated forms. *Eur J Neurosci*. 11:1421-30.

- Diaz-Rodriguez, E., J.C. Montero, A. Esparis-Ogando, L. Yuste, and A. Pandiella. 2002. Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor alpha-converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding. *Mol Biol Cell*. 13:2031-44.
- Dudley, D.T., L. Pang, S.J. Decker, A.J. Bridges, and A.R. Saltiel. 1995. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:7686-9.
- Dupiereux, I., W. Zorzi, L. Lins, R. Brasseur, P. Colson, E. Heinen, and B. Elmoualij. 2005. Interaction of the 106-126 prion peptide with lipid membranes and potential implication for neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun*. 331:894-901.
- Dupiereux, I., W. Zorzi, W. Rachidi, D. Zorzi, O. Pierard, B. Lhereux, E. Heinen, and B. Elmoualij. 2006. Study on the toxic mechanism of prion protein peptide 106-126 in neuronal and non neuronal cells. *J Neurosci Res*. 84:637-46.
- Duttaroy, A., J. Gomeza, J.W. Gan, N. Siddiqui, A.S. Basile, W.D. Harman, P.L. Smith, C.C. Felder, A.I. Levey, and J. Wess. 2002. Evaluation of muscarinic agonist-induced analgesia in muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Mol Pharmacol*. 62:1084-93.
- Edenhofer, F., R. Rieger, M. Famulok, W. Wendler, S. Weiss, and E.L. Winnacker. 1996. Prion protein PrPc interacts with molecular chaperones of the Hsp60 family. *J Virol*. 70:4724-8.
- Eglen, R.M., A. Choppin, M.P. Dillon, and S. Hegde. 1999. Muscarinic receptor ligands and their therapeutic potential. *Curr Opin Chem Biol*. 3:426-32.
- Eglen, R.M., and S.R. Nahorski. 2000. The muscarinic M(5) receptor: a silent or emerging subtype? *Br J Pharmacol*. 130:13-21.
- Eisenach, J.C. 1999. Muscarinic-mediated analgesia. *Life Sci*. 64:549-54.
- Elhusseiny, A., Z. Cohen, A. Olivier, D.B. Stanimirovic, and E. Hamel. 1999. Functional acetylcholine muscarinic receptor subtypes in human brain microcirculation: identification and cellular localization. *J Cereb Blood Flow Metab*. 19:794-802.
- Endres, K., A. Anders, E. Kojro, S. Gilbert, F. Fahrenholz, and R. Postina. 2003. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme is processed by proprotein-convertases to its mature form which is degraded upon phorbol ester stimulation. *Eur J Biochem*. 270:2386-93.
- Endres, K., R. Postina, A. Schroeder, U. Mueller, and F. Fahrenholz. 2005. Shedding of the amyloid precursor protein-like protein APLP2 by disintegrin-metalloproteinases. *Febs J*. 272:5808-20.

- English, J., G. Pearson, J. Wilsbacher, J. Swantek, M. Karandikar, S. Xu, and M.H. Cobb. 1999. New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp Cell Res.* 253:255-70.
- English, J.M., and M.H. Cobb. 2002. Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *Trends Pharmacol Sci.* 23:40-5.
- Etcheberrigaray, R., M. Tan, I. Dewachter, C. Kuiperi, I. Van der Auwera, S. Wera, L. Qiao, B. Bank, T.J. Nelson, A.P. Kozikowski, F. Van Leuven, and D.L. Alkon. 2004. Therapeutic effects of PKC activators in Alzheimer's disease transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:11141-6.
- Ettaiche, M., R. Pichot, J.P. Vincent, and J. Chabry. 2000. In vivo cytotoxicity of the prion protein fragment 106-126. *J Biol Chem.* 275:36487-90.
- Favata, M.F., K.Y. Horiuchi, E.J. Manos, A.J. Daulerio, D.A. Stradley, W.S. Feeser, D.E. Van Dyk, W.J. Pitts, R.A. Earl, F. Hobbs, R.A. Copeland, R.L. Magolda, P.A. Scherle, and J.M. Trzaskos. 1998. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem.* 273:18623-32.
- Felder, C.C., F.P. Bymaster, J. Ward, and N. DeLapp. 2000. Therapeutic opportunities for muscarinic receptors in the central nervous system. *J Med Chem.* 43:4333-53.
- Ferrell, J.E., Jr., and R.R. Bhatt. 1997. Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 272:19008-16.
- Flechsig, E., I. Hegyi, R. Leimeroth, A. Zuniga, D. Rossi, A. Cozzio, P. Schwarz, T. Rulicke, J. Gotz, A. Aguzzi, and C. Weissmann. 2003. Expression of truncated PrP targeted to Purkinje cells of PrP knockout mice causes Purkinje cell death and ataxia. *Embo J.* 22:3095-101.
- Florio, V.A., and P.C. Sternweis. 1989. Mechanisms of muscarinic receptor action on Go in reconstituted phospholipid vesicles. *J Biol Chem.* 264:3909-15.
- Flynn, D.D., G. Ferrari-DiLeo, D.C. Mash, and A.I. Levey. 1995. Differential regulation of molecular subtypes of muscarinic receptors in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 64:1888-91.
- Forloni, G., N. Angeretti, R. Chiesa, E. Monzani, M. Salmona, O. Bugiani, and F. Tagliavini. 1993. Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature.* 362:543-6.
- Fraser, C.M., C.D. Wang, D.A. Robinson, J.D. Gocayne, and J.C. Venter. 1989. Site-directed mutagenesis of m1 muscarinic acetylcholine receptors: conserved aspartic acids play important roles in receptor function. *Mol Pharmacol.* 36:840-7.
- Fredriksson, R., M.C. Lagerstrom, L.G. Lundin, and H.B. Schioth. 2003. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol.* 63:1256-72.

- Fujino, H., T. Uehara, T. Murayama, Y. Okuma, H. Ariga, and Y. Nomura. 2000. Extracellular signal regulated protein kinase and c-jun N-terminal kinase are involved in ml muscarinic receptor-enhanced interleukin-2 production pathway in Jurkat cells. *Biol Pharm Bull.* 23:1198-205.
- Gabizon, R., Z. Meiner, M. Halimi, and S.A. Ben-Sasson. 1993. Heparin-like molecules bind differentially to prion-proteins and change their intracellular metabolic fate. *J Cell Physiol.* 157:319-25.
- Garrido, J.L., J.A. Godoy, A. Alvarez, M. Bronfman, and N.C. Inestrosa. 2002. Protein kinase C inhibits amyloid beta peptide neurotoxicity by acting on members of the Wnt pathway. *Faseb J.* 16:1982-4.
- Gauczynski, S., J.M. Peyrin, S. Haik, C. Leucht, C. Hundt, R. Rieger, S. Krasemann, J.P. Deslys, D. Dormont, C.I. Lasmezas, and S. Weiss. 2001. The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *Embo J.* 20:5863-75.
- Gechtman, Z., J.L. Alonso, G. Raab, D.E. Ingber, and M. Klagsbrun. 1999. The shedding of membrane-anchored heparin-binding epidermal-like growth factor is regulated by the Raf/mitogen-activated protein kinase cascade and by cell adhesion and spreading. *J Biol Chem.* 274:28828-35.
- Gerber, D.J., T.D. Sotnikova, R.R. Gainetdinov, S.Y. Huang, M.G. Caron, and S. Tonegawa. 2001. Hyperactivity, elevated dopaminergic transmission, and response to amphetamine in M1 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:15312-7.
- Gillespie, S.L., T.E. Golde, and S.G. Younkin. 1992. Secretory processing of the Alzheimer amyloid beta/A4 protein precursor is increased by protein phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 187:1285-90.
- Giraud, P., A.G. Biacabe, G. Chazot, R. Later, O. Joyeux, Y. Moene, and A. Perret-Liaudet. 2002. Increased detection of 14-3-3 protein in cerebrospinal fluid in Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease during the disease course. *Eur Neurol.* 48:218-21.
- Gomez, J., H. Shannon, E. Kostenis, C. Felder, L. Zhang, J. Brodtkin, A. Grinberg, H. Sheng, and J. Wess. 1999a. Pronounced pharmacologic deficits in M2 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:1692-7.
- Gomez, J., L. Zhang, E. Kostenis, C. Felder, F. Bymaster, J. Brodtkin, H. Shannon, B. Xia, C. Deng, and J. Wess. 1999b. Enhancement of D1 dopamine receptor-mediated locomotor stimulation in M(4) muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:10483-8.
- Govoni, S., S. Bergamaschi, M. Racchi, F. Battaini, G. Binetti, A. Bianchetti, and M. Trabucchi. 1993. Cytosol protein kinase C downregulation in fibroblasts from Alzheimer's disease patients. *Neurology.* 43:2581-6.

- Grutzmann, R., J. Luttes, B. Sipos, O. Ammerpohl, F. Dobrowolski, I. Alldinger, S. Kersting, D. Ockert, R. Koch, H. Kalthoff, H.K. Schackert, H.D. Saeger, G. Kloppel, and C. Pilarsky. 2004. ADAM9 expression in pancreatic cancer is associated with tumour type and is a prognostic factor in ductal adenocarcinoma. *Br J Cancer*. 90:1053-8.
- Gu, Y., H. Fujioka, R.S. Mishra, R. Li, and N. Singh. 2002. Prion peptide 106-126 modulates the aggregation of cellular prion protein and induces the synthesis of potentially neurotoxic transmembrane PrP. *J Biol Chem*. 277:2275-86.
- Gutwein, P., S. Mechttersheimer, S. Riedle, A. Stoeck, D. Gast, S. Joumaa, H. Zentgraf, M. Fogel, and D.P. Altevogt. 2003. ADAM10-mediated cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles. *Faseb J*. 17:292-4.
- Haass, C., and D.J. Selkoe. 1993. Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell*. 75:1039-42.
- Hainfellner, J.A., J. Wanschitz, K. Jellinger, P.P. Liberski, F. Gullotta, and H. Budka. 1998. Coexistence of Alzheimer-type neuropathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol (Berl)*. 96:116-22.
- Hamilton, S.E., and N.M. Nathanson. 2001. The M1 receptor is required for muscarinic activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in murine cerebral cortical neurons. *J Biol Chem*. 276:15850-3.
- Han, S.J., F.F. Hamdan, S.K. Kim, K.A. Jacobson, L.M. Bloodworth, B. Li, and J. Wess. 2005. Identification of an agonist-induced conformational change occurring adjacent to the ligand-binding pocket of the M(3) muscarinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem*. 280:34849-58.
- Haring, R., A. Fisher, D. Marciano, Z. Pittel, Y. Kloog, A. Zuckerman, N. Eshhar, and E. Heldman. 1998. Mitogen-activated protein kinase-dependent and protein kinase C-dependent pathways link the m1 muscarinic receptor to beta-amyloid precursor protein secretion. *J Neurochem*. 71:2094-103.
- Harris, D.A., D.L. Falls, F.A. Johnson, and G.D. Fischbach. 1991. A prion-like protein from chicken brain copurifies with an acetylcholine receptor-inducing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:7664-8.
- Harris, D.A., P. Lele, and W.D. Snider. 1993. Localization of the mRNA for a chicken prion protein by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:4309-13.
- Harris, D.A., and H.L. True. 2006. New insights into prion structure and toxicity. *Neuron*. 50:353-7.
- Hartmann, D., B. de Strooper, L. Serneels, K. Craessaerts, A. Herreman, W. Annaert, L. Umans, T. Lubke, A. Lena Illert, K. von Figura, and P. Saftig. 2002. The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet*. 11:2615-24.

- Hauw, J.J., P.Y. Naccache, D. Seilhean, S. Camilleri, K. Mokhtari, and C. Duyckaerts. 1995. [Neuropathology of non conventional infectious agents or prions]. *Pathol Biol (Paris)*. 43:43-52.
- Hildebrandt, J.P., and A. Prowald. 2000. Ca(2+) and p38 MAP kinase regulate mAChR-mediated c-Fos expression in avian exocrine cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 278:C879-84.
- Hirao, T., D. Nanba, M. Tanaka, H. Ishiguro, Y. Kinugasa, Y. Doki, M. Yano, N. Matsuura, M. Monden, and S. Higashiyama. 2006. Overexpression of ADAM9 enhances growth factor-mediated recycling of E-cadherin in human colon cancer cell line HT29 cells. *Exp Cell Res*. 312:331-9.
- Hodge, C.W., K.K. Mehmert, S.P. Kelley, T. McMahon, A. Haywood, M.F. Olive, D. Wang, A.M. Sanchez-Perez, and R.O. Messing. 1999. Supersensitivity to allosteric GABA(A) receptor modulators and alcohol in mice lacking PKCepsilon. *Nat Neurosci*. 2:997-1002.
- Hoshi, M., A. Takashima, M. Murayama, K. Yasutake, N. Yoshida, K. Ishiguro, T. Hoshino, and K. Imahori. 1997. Nontoxic amyloid beta peptide 1-42 suppresses acetylcholine synthesis. Possible role in cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease. *J Biol Chem*. 272:2038-41.
- Howard, L., K.K. Nelson, R.A. Maciewicz, and C.P. Blobel. 1999. Interaction of the metalloprotease disintegrins MDC9 and MDC15 with two SH3 domain-containing proteins, endophilin I and SH3PX1. *J Biol Chem*. 274:31693-9.
- Huang, H.J., C.F. Liao, B.C. Yang, and T.T. Kuo. 1992. Functional expression of rat M5 muscarinic acetylcholine receptor in yeast. *Biochem Biophys Res Commun*. 182:1180-6.
- Hulme, E.C. 1990. Muscarinic acetylcholine receptors: typical G-coupled receptors. *Symp Soc Exp Biol*. 44:39-54.
- Inestrosa, N.C., A. Alvarez, C.A. Perez, R.D. Moreno, M. Vicente, C. Linker, O.I. Casanueva, C. Soto, and J. Garrido. 1996. Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron*. 16:881-91.
- Ishii, M., and Y. Kurachi. 2006. Muscarinic acetylcholine receptors. *Curr Pharm Des*. 12:3573-81.
- Izumi, Y., M. Hirata, H. Hasuwa, R. Iwamoto, T. Umata, K. Miyado, Y. Tamai, T. Kurisaki, A. Sehara-Fujisawa, S. Ohno, and E. Mekada. 1998. A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *Embo J*. 17:7260-72.

- Jackson, G.S., I. Murray, L.L. Hosszu, N. Gibbs, J.P. Waltho, A.R. Clarke, and J. Collinge. 2001. Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:8531-5.
- Janes, P.W., N. Saha, W.A. Barton, M.V. Kolev, S.H. Wimmer-Kleikamp, E. Nievergall, C.P. Blobel, J.P. Himanen, M. Lackmann, and D.B. Nikolov. 2005. Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell*. 123:291-304.
- Kanaani, J., S.B. Prusiner, J. Diacovo, S. Baekkeskov, and G. Legname. 2005. Recombinant prion protein induces rapid polarization and development of synapses in embryonic rat hippocampal neurons in vitro. *J Neurochem*. 95:1373-86.
- Kang, D.E., I.S. Yoon, E. Repetto, T. Busse, N. Yermian, L. Ie, and E.H. Koo. 2005. Presenilins mediate phosphatidylinositol 3-kinase/AKT and ERK activation via select signaling receptors. Selectivity of PS2 in platelet-derived growth factor signaling. *J Biol Chem*. 280:31537-47.
- Kar, S., D. Seto, P. Gaudreau, and R. Quirion. 1996. Beta-amyloid-related peptides inhibit potassium-evoked acetylcholine release from rat hippocampal slices. *J Neurosci*. 16:1034-40.
- Keranen, L.M., E.M. Dutil, and A.C. Newton. 1995. Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Curr Biol*. 5:1394-1403.
- Kim, M.Y., J.H. Park, E.J. Choi, and H.S. Park. 2005. Presenilin acts as a positive regulator of basal level activity of ERK through the Raf-MEK1 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 332:609-13.
- Kinouchi, T., H. Sorimachi, K. Maruyama, K. Mizuno, S. Ohno, S. Ishiura, and K. Suzuki. 1995. Conventional protein kinase C (PKC)-alpha and novel PKC epsilon, but not -delta, increase the secretion of an N-terminal fragment of Alzheimer's disease amyloid precursor protein from PKC cDNA transfected 3Y1 fibroblasts. *FEBS Lett*. 364:203-6.
- Kishimoto, T.K., R.S. Larson, A.L. Corbi, M.L. Dustin, D.E. Staunton, and T.A. Springer. 1989. The leukocyte integrins. *Adv Immunol*. 46:149-82.
- Kitaguchi, N., Y. Takahashi, Y. Tokushima, S. Shiojiri, and H. Ito. 1988. Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature*. 331:530-2.
- Knopf, J.L., M.H. Lee, L.A. Sultzman, R.W. Kriz, C.R. Loomis, R.M. Hewick, and R.M. Bell. 1986. Cloning and expression of multiple protein kinase C cDNAs. *Cell*. 46:491-502.

- Koike, H., S. Tomioka, H. Sorimachi, T.C. Saido, K. Maruyama, A. Okuyama, A. Fujisawa-Sehara, S. Ohno, K. Suzuki, and S. Ishiura. 1999. Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem J.* 343 Pt 2:371-5.
- Kolch, W., G. Heidecker, G. Kochs, R. Hummel, H. Vahidi, H. Mischak, G. Finkenzeller, D. Marme, and U.R. Rapp. 1993. Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature.* 364:249-52.
- Koo, B.H., J.M. Longpre, R.P. Somerville, J.P. Alexander, R. Leduc, and S.S. Apte. 2006. Cell-surface processing of pro-ADAMTS9 by furin. *J Biol Chem.* 281:12485-94.
- Kopan, R. 2002. Notch: a membrane-bound transcription factor. *J Cell Sci.* 115:1095-7.
- Kretschmar, H.A., L.E. Stowring, D. Westaway, W.H. Stubblebine, S.B. Prusiner, and S.J. Dearmond. 1986. Molecular cloning of a human prion protein cDNA. *DNA.* 5:315-24.
- Kretschmar, H.A., T. Tings, A. Madlung, A. Giese, and J. Herms. 2000. Function of PrP(C) as a copper-binding protein at the synapse. *Arch Virol Suppl:*239-49.
- Kubo, T., H. Bujo, I. Akiba, J. Nakai, M. Mishina, and S. Numa. 1988. Location of a region of the muscarinic acetylcholine receptor involved in selective effector coupling. *FEBS Lett.* 241:119-25.
- Kubo, T., K. Fukuda, A. Mikami, A. Maeda, H. Takahashi, M. Mishina, T. Haga, K. Haga, A. Ichiyama, K. Kangawa, and et al. 1986. Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature.* 323:411-6.
- Kurschner, C., and J.I. Morgan. 1995. The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system. *Brain Res Mol Brain Res.* 30:165-8.
- Kuwahara, C., A.M. Takeuchi, T. Nishimura, K. Haraguchi, A. Kubosaki, Y. Matsumoto, K. Saeki, T. Yokoyama, S. Itoharu, and T. Onodera. 1999. Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature.* 400:225-6.
- Laffont-Proust, I., B.A. Faucheux, R. Hassig, V. Sazdovitch, S. Simon, J. Grassi, J.J. Hauw, K.L. Moya, and S. Haik. 2005. The N-terminal cleavage of cellular prion protein in the human brain. *FEBS Lett.* 579:6333-7.
- Lambert, D.W., Yarski, M., Warner, F.J., Thornhill, P., Parkin, E.T., Smith, A.I., Hooper, N.M., Turner, A.J. 2005. Tumor necrosis factor-alpha convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2). *J Biol chem.* 280(34): 30113-9.

- Lammich, S., E. Kojro, R. Postina, S. Gilbert, R. Pfeiffer, M. Jasionowski, C. Haass, and F. Fahrenholz. 1999. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:3922-7.
- Lander, E.S., L.M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M.C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczky, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J.P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, N. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J.C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R.H. Waterston, R.K. Wilson, L.W. Hillier, J.D. McPherson, M.A. Marra, E.R. Mardis, L.A. Fulton, A.T. Chinwalla, K.H. Pepin, W.R. Gish, S.L. Chisoe, M.C. Wendl, K.D. Delehaunty, T.L. Miner, A. Delehaunty, J.B. Kramer, L.L. Cook, R.S. Fulton, D.L. Johnson, P.J. Minx, S.W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J.F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Uberbacher, M. Frazier, et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 409:860-921.
- Lanni, C., M. Mazzucchelli, E. Porrello, S. Govoni, and M. Racchi. 2004. Differential involvement of protein kinase C alpha and epsilon in the regulated secretion of soluble amyloid precursor protein. *Eur J Biochem*. 271:3068-75.
- Lasmezas, C.I., J.P. Deslys, O. Robain, A. Jaegly, V. Beringue, J.M. Peyrin, J.G. Fournier, J.J. Hauw, J. Rossier, and D. Dormont. 1997. Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science*. 275:402-5.
- Lazarini, F., J.P. Deslys, and D. Dormont. 1991. Regulation of the glial fibrillary acidic protein, beta actin and prion protein mRNAs during brain development in mouse. *Brain Res Mol Brain Res*. 10:343-6.
- Leduc, R., S.S. Molloy, B.A. Thorne, and G. Thomas. 1992. Activation of human furin precursor processing endoprotease occurs by an intramolecular autoproteolytic cleavage. *J Biol Chem*. 267:14304-8.
- Lee, K.S., A.C. Magalhaes, S.M. Zanata, R.R. Brentani, V.R. Martins, and M.A. Prado. 2001. Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells. *J Neurochem*. 79:79-87.
- Leighton, P.A., Mitchell, K.J., Goodrich, L.V., Lu, X., Pinson, K., Scherz, P., Skarnez, W.C., Tessier-Lavigne, M. 2001. Defining brain wiring patterns and mechanisms through gene trapping in mice. *Nature*. 410: 174-9

- Leitges, M., L. Sanz, P. Martin, A. Duran, U. Braun, J.F. Garcia, F. Camacho, M.T. Diaz-Meco, P.D. Rennert, and J. Moscat. 2001. Targeted disruption of the zetaPKC gene results in the impairment of the NF-kappaB pathway. *Mol Cell*. 8:771-80.
- Leitges, M., C. Schmedt, R. Guinamard, J. Davoust, S. Schaal, S. Stabel, and A. Tarakhovsky. 1996. Immunodeficiency in protein kinase cbeta-deficient mice. *Science*. 273:788-91.
- Levey, A.I. 1993. Immunological localization of m1-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. *Life Sci*. 52:441-8.
- Li, A., H.M. Christensen, L.R. Stewart, K.A. Roth, R. Chiesa, and D.A. Harris. 2007. Neonatal lethality in transgenic mice expressing prion protein with a deletion of residues 105-125. *Embo J*. 26:548-58.
- Li, Y., J. Brazzell, A. Herrera, and B. Walcheck. 2006. ADAM17 deficiency by mature neutrophils has differential effects on L-selectin shedding. *Blood*. 108:2275-9.
- Liao, C.F., A.P. Themmen, R. Joho, C. Barberis, M. Birnbaumer, and L. Birnbaumer. 1989. Molecular cloning and expression of a fifth muscarinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem*. 264:7328-37.
- Lieber, T., S. Kidd, and M.W. Young. 2002. kuzbanian-mediated cleavage of Drosophila Notch. *Genes Dev*. 16:209-21.
- Liles, W.C., and N.M. Nathanson. 1986. Regulation of neuronal muscarinic acetylcholine receptor number by protein glycosylation. *J Neurochem*. 46:89-95.
- Liskowsky, W., and R. Schliebs. 2006. Muscarinic acetylcholine receptor inhibition in transgenic Alzheimer-like Tg2576 mice by scopolamine favours the amyloidogenic route of processing of amyloid precursor protein. *Int J Dev Neurosci*. 24:149-56.
- Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 104:487-501.
- Logeat, F., C. Bessia, C. Brou, O. LeBail, S. Jarriault, N.G. Seidah, and A. Israel. 1998. The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:8108-12.
- Lopez-Perez, E., Y. Zhang, S.J. Frank, J. Creemers, N. Seidah, and F. Checler. 2001. Constitutive alpha-secretase cleavage of the beta-amyloid precursor protein in the furin-deficient LoVo cell line: involvement of the pro-hormone convertase 7 and the disintegrin metalloprotease ADAM10. *J Neurochem*. 76:1532-9.
- Lu, Z.L., and E.C. Hulme. 1999. The functional topography of transmembrane domain 3 of the M1 muscarinic acetylcholine receptor, revealed by scanning mutagenesis. *J Biol Chem*. 274:7309-15.

- Lu, Z.L., J.W. Saldanha, and E.C. Hulme. 2001. Transmembrane domains 4 and 7 of the M(1) muscarinic acetylcholine receptor are critical for ligand binding and the receptor activation switch. *J Biol Chem.* 276:34098-104.
- Luo, J.J., M.S. Wallace, D.B. Hawver, J.W. Kusiak, and W.C. Wallace. 2001. Characterization of the neurotrophic interaction between nerve growth factor and secreted alpha-amyloid precursor protein. *J Neurosci Res.* 63:410-20.
- Maeda, A., T. Kubo, M. Mishina, and S. Numa. 1988. Tissue distribution of mRNAs encoding muscarinic acetylcholine receptor subtypes. *FEBS Lett.* 239:339-42.
- Maissel, A., M. Marom, M. Shtutman, G. Shahaf, and E. Livneh. 2006. PKC ϵ is localized in the Golgi, ER and nuclear envelope and translocates to the nuclear envelope upon PMA activation and serum-starvation: C1b domain and the pseudosubstrate containing fragment target PKC ϵ to the Golgi and the nuclear envelope. *Cell Signal.* 18:1127-39.
- Makrydimas, G., A. Sotiriadis, K. Spencer, N.J. Cowans, and K.H. Nicolaides. 2006. ADAM12-s in coelomic fluid and maternal serum in early pregnancy. *Prenat Diagn.* 26:1197-200.
- Mallucci, G.R., S. Ratte, E.A. Asante, J. Linehan, I. Gowland, J.G. Jefferys, and J. Collinge. 2002. Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *Embo J.* 21:202-10.
- Marcinkiewicz, M., and N.G. Seidah. 2000. Coordinated expression of beta-amyloid precursor protein and the putative beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 in mouse and human brain. *J Neurochem.* 75:2133-43.
- Marcus, S., A. Polverino, M. Barr, and M. Wigler. 1994. Complexes between STE5 and components of the pheromone-responsive mitogen-activated protein kinase module. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:7762-6.
- Martin, P., A. Duran, S. Minguet, M.L. Gaspar, M.T. Diaz-Meco, P. Rennert, M. Leitges, and J. Moscat. 2002. Role of zeta PKC in B-cell signaling and function. *Embo J.* 21:4049-57.
- Massague, J., and A. Pandiella. 1993. Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem.* 62:515-41.
- Matsui, M., D. Motomura, H. Karasawa, T. Fujikawa, J. Jiang, Y. Komiya, S. Takahashi, and M.M. Taketo. 2000. Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M3 subtype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:9579-84.
- Mazzocca, A., R. Coppari, R. De Franco, J.Y. Cho, T.A. Libermann, M. Pinzani, and A. Toker. 2005. A secreted form of ADAM9 promotes carcinoma invasion through tumor-stromal interactions. *Cancer Res.* 65:4728-38.

- McDermott, M.F. 1999. Autosomal dominant recurrent fevers. Clinical and genetic aspects. *Rev Rhum Engl Ed.* 66:484-91.
- McLennan, N.F., P.M. Brennan, A. McNeill, I. Davies, A. Fotheringham, K.A. Rennison, D. Ritchie, F. Brannan, M.W. Head, J.W. Ironside, A. Williams, and J.E. Bell. 2004. Prion protein accumulation and neuroprotection in hypoxic brain damage. *Am J Pathol.* 165:227-35.
- Miele, G., A.R. Alejo Blanco, H. Baybutt, S. Horvat, J. Manson, and M. Clinton. 2003. Embryonic activation and developmental expression of the murine prion protein gene. *Gene Expr.* 11:1-12.
- Mills, J., D. Laurent Charest, F. Lam, K. Beyreuther, N. Ida, S.L. Pelech, and P.B. Reiner. 1997. Regulation of amyloid precursor protein catabolism involves the mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Neurosci.* 17:9415-22.
- Mironov, A., Jr., D. Latawiec, H. Wille, E. Bouzamondo-Bernstein, G. Legname, R.A. Williamson, D. Burton, S.J. DeArmond, S.B. Prusiner, and P.J. Peters. 2003. Cytosolic prion protein in neurons. *J Neurosci.* 23:7183-93.
- Miyakawa, T., M. Yamada, A. Duttaroy, and J. Wess. 2001. Hyperactivity and intact hippocampus-dependent learning in mice lacking the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *J Neurosci.* 21:5239-50.
- Mobley, W.C., R.L. Neve, S.B. Prusiner, and M.P. McKinley. 1988. Nerve growth factor increases mRNA levels for the prion protein and the beta-amyloid protein precursor in developing hamster brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:9811-5.
- Mouillet-Richard, S., M. Ermonval, C. Chebassier, J.L. Laplanche, S. Lehmann, J.M. Launay, and O. Kellermann. 2000. Signal transduction through prion protein. *Science.* 289:1925-8.
- Mucke, L., E. Masliah, W.B. Johnson, M.D. Ruppe, M. Alford, E.M. Rockenstein, S. Forss-Petter, M. Pietropaolo, M. Mallory, and C.R. Abraham. 1994. Synaptotrophic effects of human amyloid beta protein precursors in the cortex of transgenic mice. *Brain Res.* 666:151-67.
- Naus, S., M. Richter, D. Wildeboer, M. Moss, M. Schachner, and J.W. Bartsch. 2004. Ectodomain shedding of the neural recognition molecule CHL1 by the metalloprotease-disintegrin ADAM8 promotes neurite outgrowth and suppresses neuronal cell death. *J Biol Chem.* 279:16083-90.
- Newhouse, P.A., A. Potter, and E.D. Levin. 1997. Nicotinic system involvement in Alzheimer's and Parkinson's diseases. Implications for therapeutics. *Drugs Aging.* 11:206-28.

- Nguyen, J., M.A. Baldwin, F.E. Cohen, and S.B. Prusiner. 1995. Prion protein peptides induce alpha-helix to beta-sheet conformational transitions. *Biochemistry*. 34:4186-92.
- Nitsch, R.M., and J.H. Growdon. 1994. Role of neurotransmission in the regulation of amyloid beta-protein precursor processing. *Biochem Pharmacol*. 47:1275-84.
- Nitsch, R.M., B.E. Slack, R.J. Wurtman, and J.H. Growdon. 1992. Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science*. 258:304-7.
- Novak, U. 2004. ADAM proteins in the brain. *J Clin Neurosci*. 11:227-35.
- Oboznaya, M.B., S. Gilch, M.A. Titova, D.O. Koroev, T.D. Volkova, O.M. Volpina, and H.M. Schatzl. 2007. Antibodies to a Nonconjugated Prion Protein Peptide 95-123 Interfere with PrP(Sc) Propagation in Prion-Infected Cells. *Cell Mol Neurobiol*.
- Offermanns, S., E. Bombien, and G. Schultz. 1993. Stimulation of tyrosine phosphorylation and mitogen-activated-protein (MAP) kinase activity in human SH-SY5Y neuroblastoma cells by carbachol. *Biochem J*. 294 (Pt 2):545-50.
- Ohno, S., Y. Akita, Y. Konno, S. Imajoh, and K. Suzuki. 1988. A novel phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC, distantly related to the protein kinase C family. *Cell*. 53:731-41.
- Olariu, A., K. Yamada, T. Mamiya, V. Hefco, and T. Nabeshima. 2002. Memory impairment induced by chronic intracerebroventricular infusion of beta-amyloid (1-40) involves downregulation of protein kinase C. *Brain Res*. 957:278-86.
- Orr, N., Yavin, E., Lester, D.S. 1992. Identification of two distinct populations of protein kinase C in rat brain membranes. *J Neurochem*. 58(2): 461-70
- Osada, S., K. Mizuno, T.C. Saido, K. Suzuki, T. Kuroki, and S. Ohno. 1992. A new member of the protein kinase C family, nPKC theta, predominantly expressed in skeletal muscle. *Mol Cell Biol*. 12:3930-8.
- Paitel, E., R. Fahraeus, and F. Checler. 2003. Cellular prion protein sensitizes neurons to apoptotic stimuli through Mdm2-regulated and p53-dependent caspase 3-like activation. *J Biol Chem*. 278:10061-6.
- Paitel, E., C. Sunyach, C. Alves da Costa, J.C. Bourdon, B. Vincent, and F. Checler. 2004. Primary cultured neurons devoid of cellular prion display lower responsiveness to staurosporine through the control of p53 at both transcriptional and post-transcriptional levels. *J Biol Chem*. 279:612-8.
- Palmert, M.R., T.E. Golde, M.L. Cohen, D.M. Kovacs, R.E. Tanzi, J.F. Gusella, M.F. Usiak, L.H. Younkin, and S.G. Younkin. 1988. Amyloid protein precursor messenger RNAs: differential expression in Alzheimer's disease. *Science*. 241:1080-4.

- Pardossi-Piquard, R., A. Petit, T. Kawarai, C. Sunyach, C. Alves da Costa, B. Vincent, S. Ring, L. D'Adamio, J. Shen, U. Muller, P. St George Hyslop, and F. Checler. 2005. Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP. *Neuron*. 46:541-54.
- Parvathy, S., I. Hussain, E.H. Karran, A.J. Turner, and N.M. Hooper. 1998. Alzheimer's amyloid precursor protein alpha-secretase is inhibited by hydroxamic acid-based zinc metalloprotease inhibitors: similarities to the angiotensin converting enzyme secretase. *Biochemistry*. 37:1680-5.
- Pauly, P.C., and D.A. Harris. 1998. Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol Chem*. 273:33107-10.
- Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B.E. Xu, M. Karandikar, K. Berman, and M.H. Cobb. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*. 22:153-83.
- Pedersen, W.A., M.A. Kloczewiak, and J.K. Blusztajn. 1996. Amyloid beta-protein reduces acetylcholine synthesis in a cell line derived from cholinergic neurons of the basal forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:8068-71.
- Peduto, L., V.E. Reuter, D.R. Shaffer, H.I. Scher, and C.P. Blobel. 2005. Critical function for ADAM9 in mouse prostate cancer. *Cancer Res*. 65:9312-9.
- Pei, D., and S.J. Weiss. 1995. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature*. 375:244-7.
- Peralta, E.G., A. Ashkenazi, J.W. Winslow, J. Ramachandran, and D.J. Capon. 1988. Differential regulation of PI hydrolysis and adenylyl cyclase by muscarinic receptor subtypes. *Nature*. 334:434-7.
- Peralta, E.G., A. Ashkenazi, J.W. Winslow, D.H. Smith, J. Ramachandran, and D.J. Capon. 1987. Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. *Embo J*. 6:3923-9.
- Perry, E.K., P.H. Gibson, G. Blessed, R.H. Perry, and B.E. Tomlinson. 1977. Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue. *J Neurol Sci*. 34:247-65.
- Peschon, J.J., D.S. Torrance, K.L. Stocking, M.B. Glaccum, C. Otten, C.R. Willis, K. Charrier, P.J. Morrissey, C.B. Ware, and K.M. Mohler. 1998. TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. *J Immunol*. 160:943-52.

- Peters, P.J., A. Mironov, Jr., D. Peretz, E. van Donselaar, E. Leclerc, S. Erpel, S.J. DeArmond, D.R. Burton, R.A. Williamson, M. Vey, and S.B. Prusiner. 2003. Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *J Cell Biol.* 162:703-17.
- Phillips, J.K., M. Vidovic, and C.E. Hill. 1997. Variation in mRNA expression of alpha-adrenergic, neurokinin and muscarinic receptors amongst four arteries of the rat. *J Auton Nerv Syst.* 62:85-93.
- Plamont, M.A., S. Chasseigneaux, N. Delasnerie-Laupretre, P. Beaudry, K. Peoc'h, and J.L. Laplanche. 2003. Variation at the ADAM10 gene locus is not associated with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett.* 344:132-4.
- Poliakov, A., M. Cotrina, and D.G. Wilkinson. 2004. Diverse roles of eph receptors and ephrins in the regulation of cell migration and tissue assembly. *Dev Cell.* 7:465-80.
- Postina, R., A. Schroeder, I. Dewachter, J. Bohl, U. Schmitt, E. Kojro, C. Prinzen, K. Endres, C. Hiemke, M. Blessing, P. Flamez, A. Dequenne, E. Godaux, F. van Leuven, and F. Fahrenholz. 2004. A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest.* 113:1456-64.
- Primakoff, P., and D.G. Myles. 2000. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet.* 16:83-7.
- Prusiner, S.B. 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science.* 216:136-44.
- Prusiner, S.B. 1989. Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie prions. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 3:52-78.
- Prusiner, S.B. 1998. The prion diseases. *Brain Pathol.* 8:499-513.
- Puente, X.S., L.M. Sanchez, C.M. Overall, and C. Lopez-Otin. 2003. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet.* 4:544-58.
- Racchi, M., and S. Govoni. 1999. Rationalizing a pharmacological intervention on the amyloid precursor protein metabolism. *Trends Pharmacol Sci.* 20:418-23.
- Raghunath, A., M. Ling, and C. Larsson. 2003. The catalytic domain limits the translocation of protein kinase C alpha in response to increases in Ca²⁺ and diacylglycerol. *Biochem J.* 370:901-12.
- Reiss, K., T. Maretzky, A. Ludwig, T. Tousseyn, B. de Strooper, D. Hartmann, and P. Saftig. 2005. ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *Embo J.* 24:742-52.

- Robakis, N.K., E.A. Devine-Gage, E.C. Jenkins, R.J. Kascsak, W.T. Brown, M.S. Krawczun, and W.P. Silverman. 1986. Localization of a human gene homologous to the PrP gene on the p arm of chromosome 20 and detection of PrP-related antigens in normal human brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 140:758-65.
- Robbins, D.J., and M.H. Cobb. 1992. Extracellular signal-regulated kinases 2 autophosphorylates on a subset of peptides phosphorylated in intact cells in response to insulin and nerve growth factor: analysis by peptide mapping. *Mol Biol Cell.* 3:299-308.
- Robinson, M.J., and M.H. Cobb. 1997. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 9:180-6.
- Rogers, S.L., and L.T. Friedhoff. 1998. Long-term efficacy and safety of donepezil in the treatment of Alzheimer's disease: an interim analysis of the results of a US multicentre open label extension study. *Eur Neuropsychopharmacol.* 8:67-75.
- Roghani, M., J.D. Becherer, M.L. Moss, R.E. Atherton, H. Erdjument-Bromage, J. Arribas, R.K. Blackburn, G. Weskamp, P. Tempst, and C.P. Blobel. 1999. Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J Biol Chem.* 274:3531-40.
- Rooke, J., D. Pan, T. Xu, and G.M. Rubin. 1996. KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in Drosophila neurogenesis. *Science.* 273:1227-31.
- Rossner, S., K. Mendla, R. Schliebs, and V. Bigl. 2001. Protein kinase Calpha and beta1 isoforms are regulators of alpha-secretory proteolytic processing of amyloid precursor protein in vivo. *Eur J Neurosci.* 13:1644-8.
- Rubenstein, R., H. Deng, C.L. Scalici, and M.C. Papini. 1991. Alterations in neurotransmitter-related enzyme activity in scrapie-infected PC12 cells. *J Gen Virol.* 72 (Pt 6):1279-85.
- Saborio, G.P., B. Permanne, and C. Soto. 2001. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature.* 411:810-3.
- Saito, N., and Y. Shirai. 2002. Protein kinase C gamma (PKC gamma): function of neuron specific isotype. *J Biochem (Tokyo).* 132:683-7.
- Sales, N., R. Hassig, K. Rodolfo, L. Di Giamberardino, E. Traiffort, M. Ruat, P. Fretier, and K.L. Moya. 2002. Developmental expression of the cellular prion protein in elongating axons. *Eur J Neurosci.* 15:1163-77.
- Santuccione, A., V. Sytnyk, I. Leshchyn'ska, and M. Schachner. 2005. Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *J Cell Biol.* 169:341-54.
- Scamuffa, N., F. Calvo, M. Chretien, N.G. Seidah, and A.M. Khatib. 2006. Proprotein convertases: lessons from knockouts. *Faseb J.* 20:1954-63.

- Schwarz, A., O. Kratke, M. Burwinkel, C. Riemer, J. Schultz, P. Henklein, T. Bamme, and M. Baier. 2003. Immunisation with a synthetic prion protein-derived peptide prolongs survival times of mice orally exposed to the scrapie agent. *Neurosci Lett.* 350:187-9.
- Selvaggini, C., L. De Gioia, L. Cantu, E. Ghibaudi, L. Diomede, F. Passerini, G. Forloni, O. Bugiani, F. Tagliavini, and M. Salmona. 1993. Molecular characteristics of a protease-resistant, amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues 106-126 of the prion protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 194:1380-6.
- Shmerling, D., I. Hegyi, M. Fischer, T. Blattler, S. Brandner, J. Gotz, T. Rulicke, E. Flechsig, A. Cozzio, C. von Mering, C. Hangartner, A. Aguzzi, and C. Weissmann. 1998. Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell.* 93:203-14.
- Shoba, L.N., M. Newman, W. Liu, and W.L. Lowe, Jr. 2001. LY 294002, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, inhibits GH-mediated expression of the IGF-I gene in rat hepatocytes. *Endocrinology.* 142:3980-6.
- Siegfried, G., A. Basak, J.A. Cromlish, S. Benjannet, J. Marcinkiewicz, M. Chretien, N.G. Seidah, and A.M. Khatib. 2003. The secretory proprotein convertases furin, PC5, and PC7 activate VEGF-C to induce tumorigenesis. *J Clin Invest.* 111:1723-32.
- Silveyra, M.X., M.S. Garcia-Ayllon, M. Calero, and J. Saez-Valero. 2006. Altered glycosylation of acetylcholinesterase in the Creutzfeldt-Jakob cerebrospinal fluid. *J Mol Neurosci.* 30:65-6.
- Sisodia, S.S. 1992. Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:6075-9.
- Skovronsky, D.M., S. Fath, V.M. Lee, and M.E. Milla. 2001. Neuronal localization of the TNFalpha converting enzyme (TACE) in brain tissue and its correlation to amyloid plaques. *J Neurobiol.* 49:40-6.
- Slack, B.E., J. Breu, M.A. Petryniak, K. Srivastava, and R.J. Wurtman. 1995. Tyrosine phosphorylation-dependent stimulation of amyloid precursor protein secretion by the m3 muscarinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem.* 270:8337-44.
- Solforosi, L., J.R. Criado, D.B. McGavern, S. Wirz, M. Sanchez-Alavez, S. Sugama, L.A. DeGiorgio, B.T. Volpe, E. Wiseman, G. Abalos, E. Masliah, D. Gilden, M.B. Oldstone, B. Conti, and R.A. Williamson. 2004. Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo. *Science.* 303:1514-6.
- Soond, S.M., B. Everson, D.W. Riches, and G. Murphy. 2005. ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNFalpha-converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking. *J Cell Sci.* 118:2371-80.

- Spudich, A., R. Frigg, E. Kilic, U. Kilic, B. Oesch, A. Raeber, C.L. Bassetti, and D.M. Hermann. 2005. Aggravation of ischemic brain injury by prion protein deficiency: role of ERK-1/-2 and STAT-1. *Neurobiol Dis.* 20:442-9.
- Steele, A.D., J.G. Emsley, P.H. Ozdinler, S. Lindquist, and J.D. Macklis. 2006. Prion protein (PrPc) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:3416-21.
- Steiner, D.F. 1998. The proprotein convertases. *Curr Opin Chem Biol.* 2:31-9.
- Stengel, P.W., J. Gomeza, J. Wess, and M.L. Cohen. 2000. M(2) and M(4) receptor knockout mice: muscarinic receptor function in cardiac and smooth muscle in vitro. *J Pharmacol Exp Ther.* 292:877-85.
- Stengel, P.W., M. Yamada, J. Wess, and M.L. Cohen. 2002. M(3)-receptor knockout mice: muscarinic receptor function in atria, stomach fundus, urinary bladder, and trachea. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 282:R1443-9.
- Sundberg, C., C.K. Thodeti, M. Kveiborg, C. Larsson, P. Parker, R. Albrechtsen, and U.M. Wewer. 2004. Regulation of ADAM12 cell-surface expression by protein kinase C epsilon. *J Biol Chem.* 279:51601-11.
- Sunyach, C., and F. Checler. 2005. Combined pharmacological, mutational and cell biology approaches indicate that p53-dependent caspase 3 activation triggered by cellular prion is dependent on its endocytosis. *J Neurochem.* 92:1399-407.
- Sunyach, C., A. Jen, J. Deng, K.T. Fitzgerald, Y. Frobert, J. Grassi, M.W. McCaffrey, and R. Morris. 2003. The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *Embo J.* 22:3591-601.
- Tagliavini, F., F. Prelli, L. Verga, G. Giaccone, R. Sarma, P. Gorevic, B. Ghetti, F. Passerini, E. Ghibaudi, G. Forloni, and et al. 1993. Synthetic peptides homologous to prion protein residues 106-147 form amyloid-like fibrils in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:9678-82.
- Takai, Y., A. Kishimoto, Y. Iwasa, Y. Kawahara, T. Mori, Y. Nishizuka, A. Tamura, and T. Fujii. 1979. A role of membranes in the activation of a new multifunctional protein kinase system. *J Biochem (Tokyo).* 86:575-8.
- Tannapfel, A., K. Anhalt, P. Hausermann, F. Sommerer, M. Benicke, D. Uhlmann, H. Witzigmann, J. Hauss, and C. Wittekind. 2003. Identification of novel proteins associated with hepatocellular carcinomas using protein microarrays. *J Pathol.* 201:238-49.
- Tanzi, R.E., A.I. McClatchey, E.D. Lamperti, L. Villa-Komaroff, J.F. Gusella, and R.L. Neve. 1988. Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature.* 331:528-30.

- Taylor, D.R., N.T. Watt, W.S. Perera, and N.M. Hooper. 2005. Assigning functions to distinct regions of the N-terminus of the prion protein that are involved in its copper-stimulated, clathrin-dependent endocytosis. *J Cell Sci.* 118:5141-53.
- Teller, D.C., T. Okada, C.A. Behnke, K. Palczewski, and R.E. Stenkamp. 2001. Advances in determination of a high-resolution three-dimensional structure of rhodopsin, a model of G-protein-coupled receptors (GPCRs). *Biochemistry.* 40:7761-72.
- Tsang, S.W., J. Pomakian, G.A. Marshall, H.V. Vinters, J.L. Cummings, C.P. Chen, P.T. Wong, and M.K. Lai. 2006. Disrupted muscarinic M(1) receptor signaling correlates with loss of protein kinase C activity and glutamatergic deficit in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.*
- Tsuru, M., H. Katagiri, T. Asano, T. Yamada, S. Ohno, T. Ogihara, and Y. Oka. 2002. Role of PKC isoforms in glucose transport in 3T3-L1 adipocytes: insignificance of atypical PKC. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 283:E338-45.
- Tun, H., L. Marlow, I. Pinnix, R. Kinsey, and K. Sambamurti. 2002. Lipid rafts play an important role in A beta biogenesis by regulating the beta-secretase pathway. *J Mol Neurosci.* 19:31-5.
- Turner, A.J., and N.M. Hooper. 2002. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 23:177-83.
- Turner, P.R., K. O'Connor, W.P. Tate, and W.C. Abraham. 2003. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol.* 70:1-32.
- Ueda, Y., S. Hirai, S. Osada, A. Suzuki, K. Mizuno, and S. Ohno. 1996. Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *J Biol Chem.* 271:23512-9.
- Umata, T., M. Hirata, T. Takahashi, F. Ryu, S. Shida, Y. Takahashi, M. Tsuneoka, Y. Miura, M. Masuda, Y. Horiguchi, and E. Mekada. 2001. A dual signaling cascade that regulates the ectodomain shedding of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor. *J Biol Chem.* 276:30475-82.
- Vassalli, P., G.E. Grau, and P.F. Piguet. 1992. TNF in autoimmune diseases, graft-versus-host reactions, and pulmonary fibrosis. *Immunol Ser.* 56:409-30.
- Vassar, R., B.D. Bennett, S. Babu-Khan, S. Kahn, E.A. Mendiaz, P. Denis, D.B. Teplow, S. Ross, P. Amarante, R. Loeloff, Y. Luo, S. Fisher, J. Fuller, S. Edenson, J. Lile, M.A. Jarosinski, A.L. Biere, E. Curran, T. Burgess, J.C. Louis, F. Collins, J. Treanor, G. Rogers, and M. Citron. 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science.* 286:735-41.
- Vassar, R., and M. Citron. 2000. Abeta-generating enzymes: recent advances in beta- and gamma-secretase research. *Neuron.* 27:419-22.

- Vey, M., S. Pilkuhn, H. Wille, R. Nixon, S.J. DeArmond, E.J. Smart, R.G. Anderson, A. Taraboulos, and S.B. Prusiner. 1996. Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:14945-9.
- Vidricaire, G., J.B. Denault, and R. Leduc. 1993. Characterization of a secreted form of human furin endoprotease. *Biochem Biophys Res Commun.* 195:1011-8.
- Viles, J.H., F.E. Cohen, S.B. Prusiner, D.B. Goodin, P.E. Wright, and H.J. Dyson. 1999. Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:2042-7.
- Vilette, D., O. Andreoletti, F. Archer, M.F. Madelaine, J.L. Vilotte, S. Lehmann, and H. Laude. 2001. Ex vivo propagation of infectious sheep scrapie agent in heterologous epithelial cells expressing ovine prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:4055-9.
- Vincent, B., E. Paitel, Y. Frobert, S. Lehmann, J. Grassi, and F. Checler. 2000. Phorbol ester-regulated cleavage of normal prion protein in HEK293 human cells and murine neurons. *J Biol Chem.* 275:35612-6.
- Vincent, B., E. Paitel, P. Saftig, Y. Frobert, D. Hartmann, B. De Strooper, J. Grassi, E. Lopez-Perez, and F. Checler. 2001. The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. *J Biol Chem.* 276:37743-6.
- Violin, J.D., J. Zhang, R.Y. Tsien, and A.C. Newton. 2003. A genetically encoded fluorescent reporter reveals oscillatory phosphorylation by protein kinase C. *J Cell Biol.* 161:899-909.
- Waggoner, D.J., B. Drisaldi, T.B. Bartnikas, R.L. Casareno, J.R. Prohaska, J.D. Gitlin, and D.A. Harris. 2000. Brain copper content and cuproenzyme activity do not vary with prion protein expression level. *J Biol Chem.* 275:7455-8.
- Wallace, W.C., C.A. Akar, and W.E. Lyons. 1997. Amyloid precursor protein potentiates the neurotrophic activity of NGF. *Brain Res Mol Brain Res.* 52:201-12.
- Wang, H.Y., M.R. Pisano, and E. Friedman. 1994. Attenuated protein kinase C activity and translocation in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Aging.* 15:293-8.
- Wang, L., H. Shim, C. Xie, and H. Cai. 2006. Activation of protein kinase C modulates BACE1-mediated beta-secretase activity. *Neurobiol Aging.*
- Wang, Q.J. 2006. PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. *Trends Pharmacol Sci.* 27:317-23.
- Wang, X., and C. Tournier. 2006. Regulation of cellular functions by the ERK5 signalling pathway. *Cell Signal.* 18:753-60.

- Ward, S.D., C.A. Curtis, and E.C. Hulme. 1999. Alanine-scanning mutagenesis of transmembrane domain 6 of the M(1) muscarinic acetylcholine receptor suggests that Tyr381 plays key roles in receptor function. *Mol Pharmacol.* 56:1031-41.
- Ward, S.D., F.F. Hamdan, L.M. Bloodworth, and J. Wess. 2002. Conformational changes that occur during M3 muscarinic acetylcholine receptor activation probed by the use of an in situ disulfide cross-linking strategy. *J Biol Chem.* 277:2247-57.
- Wei, J., E.A. Walton, A. Milici, and J.J. Buccafusco. 1994. m1-m5 muscarinic receptor distribution in rat CNS by RT-PCR and HPLC. *J Neurochem.* 63:815-21.
- Weissmann, C., H. Bueller, M. Fischer, A. Sailer, A. Aguzzi, and M. Aguet. 1994. PrP-deficient mice are resistant to scrapie. *Ann N Y Acad Sci.* 724:235-40.
- Weskamp, G., H. Cai, T.A. Brodie, S. Higashyama, K. Manova, T. Ludwig, and C.P. Blobel. 2002. Mice lacking the metalloprotease-disintegrin MDC9 (ADAM9) have no evident major abnormalities during development or adult life. *Mol Cell Biol.* 22:1537-44.
- Weskamp, G., J. Kratzschmar, M.S. Reid, and C.P. Blobel. 1996. MDC9, a widely expressed cellular disintegrin containing cytoplasmic SH3 ligand domains. *J Cell Biol.* 132:717-26.
- Wess, J., N. Blin, J. Yun, T. Schoneberg, and J. Liu. 1996. Molecular aspects of muscarinic receptor assembly and function. *Prog Brain Res.* 109:153-62.
- Whitehouse, P.J., D.L. Price, A.W. Clark, J.T. Coyle, and M.R. DeLong. 1981. Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann Neurol.* 10:122-6.
- Wildeboer, D., S. Naus, Q.X. Amy Sang, J.W. Bartsch, and A. Pagenstecher. 2006. Metalloproteinase disintegrins ADAM8 and ADAM19 are highly regulated in human primary brain tumors and their expression levels and activities are associated with invasiveness. *J Neuropathol Exp Neurol.* 65:516-27.
- Winston, L.A., and P.J. Bertics. 1992. Growth hormone stimulates the tyrosine phosphorylation of 42- and 45-kDa ERK-related proteins. *J Biol Chem.* 267:4747-51.
- Wise, R.J., P.J. Barr, P.A. Wong, M.C. Kiefer, A.J. Brake, and R.J. Kaufman. 1990. Expression of a human proprotein processing enzyme: correct cleavage of the von Willebrand factor precursor at a paired basic amino acid site. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:9378-82.
- Wolfsberg, T.G., J.F. Bazan, C.P. Blobel, D.G. Myles, P. Primakoff, and J.M. White. 1993. The precursor region of a protein active in sperm-egg fusion contains a metalloprotease and a disintegrin domain: structural, functional, and evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:10783-7.

- Yamada, M., T. Miyakawa, A. Duttaroy, A. Yamanaka, T. Moriguchi, R. Makita, M. Ogawa, C.J. Chou, B. Xia, J.N. Crawley, C.C. Felder, C.X. Deng, and J. Wess. 2001. Mice lacking the M3 muscarinic acetylcholine receptor are hypophagic and lean. *Nature*. 410:207-12.
- Yan, Z., and J. Feng. 2004. Alzheimer's disease: interactions between cholinergic functions and beta-amyloid. *Curr Alzheimer Res*. 1:241-8.
- Yang, P., K.A. Baker, and T. Hagg. 2006. The ADAMs family: coordinators of nervous system development, plasticity and repair. *Prog Neurobiol*. 79:73-94.
- Yasuda, J., A.J. Whitmarsh, J. Cavanagh, M. Sharma, and R.J. Davis. 1999. The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins. *Mol Cell Biol*. 19:7245-54.
- Yeon, S.W., M.W. Jung, M.J. Ha, S.U. Kim, K. Huh, M.J. Savage, E. Masliah, and I. Mook-Jung. 2001. Blockade of PKC epsilon activation attenuates phorbol ester-induced increase of alpha-secretase-derived secreted form of amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 280:782-7.
- Yong, V.W., C. Power, P. Forsyth, and D.R. Edwards. 2001. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat Rev Neurosci*. 2:502-11.
- Zanata, S.M., M.H. Lopes, A.F. Mercadante, G.N. Hajj, L.B. Chiarini, R. Nomizo, A.R. Freitas, A.L. Cabral, K.S. Lee, M.A. Juliano, E. de Oliveira, S.G. Jachieri, A. Burlingame, L. Huang, R. Linden, R.R. Brentani, and V.R. Martins. 2002. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *Embo J*. 21:3307-16.
- Zhao, H., M. Klingeborn, M. Simonsson, and T. Linne. 2006. Proteolytic cleavage and shedding of the bovine prion protein in two cell culture systems. *Virus Res*. 115:43-55.
- Zheng, C.F., and K.L. Guan. 1994. Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *Embo J*. 13:1123-31.
- Zheng, Y., J. Schlondorff, and C.P. Blobel. 2002. Evidence for regulation of the tumor necrosis factor alpha-convertase (TACE) by protein-tyrosine phosphatase PTPH1. *J Biol Chem*. 277:42463-70.
- Zhou, F.M., C. Wilson, and J.A. Dani. 2003. Muscarinic and nicotinic cholinergic mechanisms in the mesostriatal dopamine systems. *Neuroscientist*. 9:23-36.
- Zhu, G.Z., Y. Lin, D.G. Myles, and P. Primakoff. 1999. Identification of four novel ADAMs with potential roles in spermatogenesis and fertilization. *Gene*. 234:227-37.
- Zigrino, P., C. Mauch, J.W. Fox, and R. Nischt. 2005. Adam-9 expression and regulation in human skin melanoma and melanoma cell lines. *Int J Cancer*. 116:853-9.