

UNIVERSITE DENIS DIDEROT PARIS 7

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 7

Spécialité biologie moléculaire et cellulaire

Ecole Doctorale Complexité du Vivant

Présentée et soutenue publiquement par

Jack-Christophe COSSEC

Le 15 septembre 2009

**ENDOSOMES ELARGIS ET CHOLESTEROL :
DE LA TRISOMIE 21 A LA MALADIE
D'ALZHEIMER**

Jury

**Pr. Reiner VEITIA
Dr. Marie-Claude POTIER
Dr. Bernadette ALLINQUANT
Pr. Jean-Noël OCTAVE
Dr. Yann HERAULT
Dr. Christophe LAMAZE
Dr. Frédéric CHECLER**

**Président
Directrice de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur**

Les convictions sont des prisons.

[Friedrich Nietzsche]

REMERCIEMENTS

Je désire remercier chaleureusement le Docteur Marie-Claude Potier pour ces quatre années formidables au sein de son équipe. Merci de m'avoir fait confiance pour entreprendre ce travail qui me tenait à cœur. Merci pour ta combativité à toujours vouloir le meilleur. Merci d'avoir toujours pris le temps d'écouter mes suggestions, mes idées, mes erreurs. Merci pour m'avoir donné l'occasion de présenter mes résultats à de nombreux colloques internationaux. Finalement, merci de m'avoir laissé une liberté d'action afin de découvrir par moi-même ce qu'est la recherche et surtout ce que je suis à travers elle. Et comme disait Hans Christian Andersen : « la reconnaissance est la mémoire du cœur » et je te suis très reconnaissant.

Je tiens à remercier le Professeur Reiner Veitia pour deux raisons essentielles : de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider mon jury de thèse et surtout pour la qualité de son enseignement et l'enthousiasme scientifique qu'il a su faire partager au cours de mes études au sein du magistère de génétique.

Je souhaite également remercier sincèrement les rapporteurs de ma thèse : le Docteur Bernadette Allinquant qui a suivi tout au long de mon doctorat l'évolution de mon travail et le Professeur Jean-Noël Octave d'avoir pris le temps de lire et de commenter mon manuscrit.

Je remercie les Docteurs Yann Hérault, Christophe Lamaze et Frederic Checler d'avoir acceptés d'être examinateurs de ma thèse.

Je souhaite remercier le Professeur Jean Rossier, directeur du laboratoire à l'ESPCI pour son implication dans l'obtention épique de ma bourse de thèse ministérielle et nos discussions matinales ainsi que le Professeur Charles Duyckaerts, directeur du laboratoire à la Pitié-Salpêtrière pour m'avoir accueilli chaleureusement dans son équipe et son intérêt pour mes travaux avec les maintes relectures des articles.

Je remercie le Docteur Zsolt Lenkei pour notre collaboration riche en enseignements, pour nos discussions instructives, pour avoir partagé sa vision de la science avec moi. Je remercie également Christophe pour avoir initié le projet et m'avoir formé à la microscopie confocale.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, consciemment ou inconsciemment, passées ou présentes, réelles ou fictives, ont participé à ces quatre années de formation scientifique, personnelle et spirituelle. Une thèse ne se fait pas seul ! Elle se réalise jour après jour...

...Lundi c'est football...

Je remercie tous les membres de la LGE (définitivement La Grande Equipe et pas La Grande Esbroufe) et plus particulièrement les Gladiniens, j'ai nommé Ben (bien plus qu'un capitaine : le meilleur, the best, Georges Best), el Suizo (un phénomène physique et vocal : notre perle helvétique), Jon, Riton, Adrien, Gaillard, Arthur le président, Baz, Edou pour nos victoires, surtout pour nos défaites mais toujours pour nos troisième mi-temps ... animées dirons nous.

...Mardi au travail à PC!...

Mes premières pensées vont à chaque membre de l'équipe et en particulier à Julien qui au cours de ces quatre années a apporté de la bonne humeur, des kinders et des madeleines. Merci pour tous ces moments de partage et de franche rigolade à travers nos périples Montpelliérain, Américain et finalement Belge. Je te souhaite toute la réussite que tu mérites. A distance, je voudrais remercier Randall X. qui m'a formé à la biologie cellulaire et moléculaire avec patience et dévouement. Un jour, j'irai te voir en Australie. Merci Luce pour toutes tes analyses de puces, les commandes, les dosages et j'en passe. Merci pour ta gaieté au jour le jour. Un regret : je n'ai toujours pas goûté ta mousse au chocolat. Je tiens à remercier Laili pour sa fraîcheur dépaysante : une Irano-Japono-Française ça ne court pas les rues ! Voilà pour le labo de bio, à mais non ! Y'a ma petite Catherine que je félicite de m'avoir supporté. Plus sérieusement, merci d'avoir lu ma thèse et corrigé mes anglicismes, isn't it ? Merci d'avoir pris le temps de m'écouter radoter mes résultats et surtout mes non-résultats. Tu es merveilleuse. Je souhaite également remercier les différents stagiaires et anciens doctorants principalement Cyril (bon courage pour ta thèse), Jessica (ma première stagiaire rien qu'à moi) et Nathalie ma baroudeuse préférée. Je souhaite remercier Tania qui m'a fait aimer les sushi, Vincent (à quand la revanche au squash ?), Jean-Christophe à l'accent qui chante le Sud, Fabien, et à tous les autres membres de l'unité : Armelle (Merci pour le tuyau des cours en Prépa Kiné), Sophie, Bernard, Thierry, Bruno, Iman, Anne-Marie, Sega (c'est pour quand ce Bowling ?), Valérie, Joëlle, Thomas, Paulo, Emmanuelle, Yann (Merci pour les Tut),

Hélène, Anina, Paul, Nicolas, Niki, Annie, Anne-Laure, Chaminou, Bob et Cindy. Je tiens à dire un GRAND merci à Sylvie et Marcel qui savent désembrouiller les embrouilles et rendre le quotidien le plus agréable possible.

...Mercredi il fait beau, c'est balade...

Mes remerciements sincères vont à tous ceux avec qui j'ai eu la chance de collaborer, plus particulièrement à Elo, quel dynamisme ! Quelle passion ! Je suis admiratif de ta force de travail, à Nathalie Cartier et à Patrick Aubourg. Merci à toute l'équipe d'Orsay (Pierre, Viviane, Sandrine & Sandrine Lévèque-Fort). Ce fut un plaisir de travailler avec vous. Vous m'avez appris beaucoup de choses : je me suis réconcilié avec l'optique. Un grand merci à Clémentine et Jean Delabar pour leurs aides et leurs conseils. Merci Samantha (la pro du ficoll) pour ta confiance et ta motivation dans le projet. Enfin, que serait une ballade sans aller squasher entre 12h et 13h ? Merci Vince pour ton écoute, ton grain de folie (5 fois 55km : faut quand même être un peu barge) et ton amitié depuis San Francisco.

...Qui dit « Jeudi » dit « Je dis bière » © ...

Karine : quel talent ! J'ai eu deux vies dans ma thèse : une avant de t'avoir parlé, l'autre après. Heureusement la première a été courte, heureusement la seconde se prolongera bien après la thèse. Merci pour ton écoute. ReMerci pour ta générosité. ReReMerci pour ta gentillesse. ReReReMerci pour être ce que tu es c'est-à-dire formidable, ReReReReMerci pour m'avoir fait connaître tes amies : merci Sophie, créatrice du meilleur fondant au chocolat de Paris, merci Aurélie tu resteras toujours madame Allociné pour moi, merci Florence pour ton hospitalité et ta spontanéité (prend bien soin de ta plante). Et maintenant arrive ma triplète préférée avec dans l'ordre : Quentin Mister Folk, Eric le Comédien et Alex le Squatteur de futon. Merci beaucoup pour votre énergie, votre enthousiasme, pour me faire oublier les manips qui ratent. Vous êtes beaux ! Mes respects sincères pour le président Julien : 3 ans de fac et 4 ans de thèse ensemble, ça compte beaucoup pour moi. Je remercie particulièrement Anne, Madame salle de culture qui sait où tout se trouve ; Guillaume, le plus jeune d'entre nous tous ; Isabelle, LA référence ; Séverine, ma meilleure Picarde ; Courtney, la texane reine du cookie ; Perrine qui nous manque ; Léna, la dame au cocktails ; Anne-Lise, la femme aux 14 bourses MRT ; Pierre-Yves, bon bah faut bien un physicien oui ! Mais on a le meilleur et Thomas le dernier arrivé le dernier à partir : un assidu. Un p'tit merci et un p'tit coucou à Raphaëlle qui mérite son niveau III de squash.

...Vendredi, direction la Pitié...

Je tiens chaudement à remercier toute l'équipe Alzheimer : Adina l'astrofootballeuse (Il n'y que toi qui peut m'appeler Jackù), Claire, Maï, José, Jérôme, Myriam et Benoît Delatour. Je remercie également Adel, les techniciennes, toute l'équipe prion et tout le cinquième étage du bâtiment pharmacie pour leur accueil sympathique. Bonne chance à tous !

...Samedi c'est Coco...

Mon bol d'air anti-science... Je souhaite remercier tout le groupe, plus de dix ans que l'on se connaît par cœur et pourtant vous me surprenez toujours par votre spontanéité, votre goût de la vie et du partage. J'ai de la chance de vous avoir comme amis. Honneur au plus anciens : merci Sylvain pour ta confiance et ton amitié. Je sais que je pourrai toujours compter sur toi. Je remercie Florian mon poteau de resto, de soirées ligues des champions et de poker. Je tiens à remercier Pierre-Yves, un Normand (tout le monde à ses défauts) mais un ami incroyable que j'admire sincèrement. Merci Pierre, on se voit moins mais cela rapproche davantage dit-on... et c'est vrai. Un grand merci à Erwan : le plus curieux et le plus intéressé par mon travail avec toujours cet esprit critique que j'affectionne. Toutes mes félicitations vont à Pierre-Eric, on se voit peu mais ces rares moments sont importants pour moi. Enfin, je remercie Frédéric, un philosophe parmi les brutes. Sly, Dudu, Bibi, Touf, R1, Kidou, 2fre : vous êtes INSUUUPORTABLES ! Mais que serions nous sans Karine, Sandra, Emilie, Dometille, Claire et toutes nos Polonaises ? Merci les filles pour ces moments partagés lors de ma thèse qui m'ont permis de décompresser. Merci beaucoup pour ces soirées mythiques et délirantes. Je sais que je suis heureux avec vous tous.

...Dimanche en famille...

Le pilier, la base sans quoi rien n'est possible. Vous ne comprenez pas grand-chose à ce que je fais et pourtant vous avez confiance en moi. Je tiens tout d'abord à remercier mes grands-parents qui sont mon modèle de courage et d'abnégation. Merci beaucoup pour votre présence (malgré la distance), vos bons petits plats et votre gentillesse. J'adresse mes remerciements à toute la famille un peu plus éloignée, oncles, tantes, cousins et cousines avec une dédicace particulière à Cécile, Jean-René, et mes cousins préférés Clémence et Simon. Je tiens à remercier ma sœur qui a toujours eu confiance en moi et m'a toujours soutenu. Je souhaite lui dire combien elle est importante pour moi. Je remercie profondément mes parents pour l'éducation qu'ils m'ont apporté, l'esprit critique qu'ils ont su m'inculquer et la liberté

d'entreprendre et de croire en moi qu'ils m'ont transmis. Pour tout cela et bien plus encore, merci.

TABLE des MATIERES

ABREVIATIONS	11
RESUME	12
ABSTRACT	13
AVANT-PROPOS	14
I. INTRODUCTION	20
1. LA MALADIE D'ALZHEIMER	21
1.1 <i>Lésions histopathologiques</i>	21
1.1.1 Les plaques amyloïdes	21
1.1.2 Les corps neurofibrillaires	21
1.2 <i>L'APP et ces produits de clivage</i>	22
1.2.1 L'APP	22
1.2.2 Le clivage α -sécrétase de l'APP	25
1.2.3 Le clivage β -sécrétase de l'APP	26
1.2.4 Le clivage γ -sécrétase	27
1.2.5 Interaction avec la protéine Tau	31
1.3 <i>Formes génétiques et sporadiques</i>	32
1.3.1 Les formes monogéniques	32
i. L'APP	32
ii. Les présénilines	32
1.3.2 La trisomie 21	34
i. Introduction historique, épidémiologique et clinique	34
ii. Etiologie	35
iii. Les modèles murins de la trisomie 21	36
1.3.3 Les formes sporadiques	39
i. La composante génétique	39
ii Les facteurs environnementaux	42
1.4 <i>L'hypothèse de la cascade amyloïde</i>	43
1.5 <i>Un facteur de risque : le cholestérol</i>	46
1.5.1 Synthèse et métabolisme du cholestérol	46
i. Synthèse	47
ii. Transport	48
iii. Stockage et Elimination	49
1.5.2 Localisation et trafic du cholestérol cellulaire	49
i. Localisation subcellulaire du cholestérol	49
ii. Trafic inter- et intracellulaire du cholestérol	50
1.5.3 Cholestérol cérébral	51
1.5.4 Taux de cholestérol chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer	53
i. Dans le plasma sanguin	53
ii. Dans le cerveau	53
1.5.5 Modulation du cholestérol : impact sur la maladie d'Alzheimer	54
i. La méthyl- β -cyclodextrine	54
ii. Les statines et les régimes hyper- et hypocholestérolémiés	54
iii. Acylcoenzyme A cholesterol acyltransferase (ACAT)	55
iv. la cholestérol 24-hydroxylase	56
v. Seladin-1	56

1.5.6 Apoe	57
1.5.7 Conclusions	58
2. LES ENDOSOMES PRECOSES : FORMATION, TRAFIC, DEREGULATION	60
2.1 Définition.....	60
2.2 Formation des endosomes précoces.....	61
2.2.1 Les différents types d'endocytose	61
2.2.2 Les mécanismes moléculaires de l'endocytose	62
i. dépendante de la clathrine	62
ii. dépendante de la cavéoline-1	64
2.3 Formation et devenir des endosomes précoces.....	65
2.3.1 Déterminants moléculaires	66
2.3.2 Marqueurs des endosomes précoces	67
2.3.3 Les voies de recyclage.....	69
2.3.4 La voie de dégradation	69
2.4 Trafic de l'APP.....	70
2.5 L'élargissement des endosomes précoces	73
2.5.1 Définition	73
2.5.2 Les pathologies associées.....	74
i Maladie d'Alzheimer et Trisomie 21	74
ii Autres maladies neurodégénératives.....	77
2.5.3 Les molécules impliquées	78
3. HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE TRAVAIL	79
3.1 Projet 1 : Contexte, hypothèses et objectifs	79
3.2 Projet 2 : Contexte, hypothèses et objectifs	80
II. RESULTATS	82
1. LE CHOLESTEROL AUGMENTE L'ENDOCYTOSE DE L'APP DEPENDANTE DE LA CLATHRINE ET LA TAILLE DES ENDOSOMES PRECOSES	83
1.1 Article (en anglais).....	83
1.2 Résumé des résultats	110
1.3 Données supplémentaires.....	111
1.3.1 L'excès de cholestérol à la membrane plasmique va dans les radeaux lipidiques où l'APP se concentre	111
1.3.2 Dimérisation de l'APP à la surface cellulaire	112
2. LA SYNAPTOJANINE-1 EST LE GENE RESPONSABLE DE L'ELARGISSEMENT DES ENDOSOMES PRECOSES DANS LES LYMPHOCYTES DE PATIENTS PORTEUR D'UNE TRISOMIE 21	117
2.1 Article (en anglais).....	117
2.2 Résumé des résultats	129
2.3 Données supplémentaires.....	130
2.3.1 Création du modèle APPxTs1Cje et validation de l'élargissement des endosomes dans le modèle Ts65Dn	130
III. DISCUSSION ET PERSPECTIVES	133
1. DISCUSSION DE LA PARTIE 1 DES RESULTATS.....	134
1.1 Pertinence du modèle cellulaire et du traitement hyper- et hypocholestérolémiant	134
1.2 Le cholestérol augmente l'endocytose de l'APP. Un effet spécifique ?.....	135
1.3 Modèles des effets du cholestérol sur la répartition de l'APP à la membrane plasmique et sur l'endocytose.	139
1.4 L'APP : rôle de senseur du cholestérol cellulaire ?.....	141
1.5 La maladie d'Alzheimer : une pathologie de la dérégulation de l'homéostasie du cholestérol ?	143

2. DISCUSSION DE LA PARTIE 2 DES RESULTAS.....	145
2.1 <i>La synaptojanine : rôles et fonctions. Implication dans la trisomie 21 et la maladie d'Alzheimer.</i>	145
2.2 <i>Explication de l'élargissement des endosomes dans le modèle murin Ts65Dn.....</i>	150
3. TENTATIVE D'UNIFICATION DES DEUX VOIES ABOUTISSANT A L'ELARGISSEMENT DES ENDOSOMES PRECOCES.....	151
4. PERSPECTIVES	155
4.1 <i>Mutation du domaine de liaison de l'APP au cholestérol</i>	155
4.2 <i>Analyse de la répartition de l'APP à la membrane plasmique par spectroscopie de corrélation de fluorescence.....</i>	155
4.3 <i>Etude du trafic des endosomes élargis.....</i>	156
4.4 <i>Confirmation que la surexpression de la synaptojanine-1 est responsable de l'élargissement des endosomes</i>	157
4.5 <i>Expression et localisation de la synaptojanine-1 dans le cerveau des patients Alzheimer.....</i>	159
4.6 <i>Amélioration de la détection des endosomes élargis dans les lignées lymphoblastoïdes trisomiques et dans le sang de patients porteurs d'une trisomie 21 .</i>	160
4.7 <i>Exploration de la taille des endosomes dans les lignées lymphoblastoïdes de patients atteints de la maladie Alzheimer</i>	161
IV. REFERENCES.....	162
V. ANNEXE	204

ABBREVIATIONS

A β : Amyloid β

ACAT : Ayl-coenzyme A cholesterol acyltransferase

AICD : APP intracellular domain

ApoE : Apolipoprotein E

APP : Amyloid Precursor Protein

Bace : β -site APP cleaving enzyme

EEA1 : Early endosomal antigene 1

GFP : Green Fluorescent Protein

HMGCR : 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase

LCL : Lignées de cellules lymphoblastoïdes

LDLR : Low density lipoprotein receptor

LRP1 : Low density lipoprotein-related protein 1

MBCD : Methyl- β -cyclodextrine

NPC : Niemann Pick C

PtdIns(4,5)P₂ : phosphatidylinositol-4,5-biphosphates

PS : Préséniline

Rab : Ras-like protein in brain

RESUME

Le premier signe morphologique observé dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (MA) est l'élargissement des endosomes précoces dans les neurones. Ce phénotype est retrouvé dans les formes sporadiques de la MA et chez les individus porteurs d'une trisomie 21 qui développent une neuropathologie de type Alzheimer dès l'âge de 40 ans. Cette forme précoce de la maladie d'Alzheimer serait causée par la surexpression de l'APP (Amyloid precursor protein) dont le gène est sur le chromosome 21. Suite à deux clivages successifs, l'APP génère le peptide amyloïde (A β) qui s'agrège pour former des plaques séniles, lésions caractéristiques de la MA.

Les endosomes élargis apparaissant avant la formation des dépôts d' A β , nous avons donc recherché d'autres facteurs responsables de ce phénotype.

Nous avons trouvé qu'une augmentation du cholestérol membranaire est associée à l'élargissement des endosomes, l'augmentation de l'endocytose de l'APP et de la sécrétion d'A β dans des cultures cellulaires de types neuronales et non neuronales. Cette augmentation d'endocytose de l'APP est inhibée par un ARN interférence contre la clathrine et les mutants des protéines dynamine2 et Rab5 impliquées dans la formation des endosomes précoces. Le cholestérol total étant augmenté dans le cerveau des patients Alzheimer, nous postulons que l'internalisation de l'APP dépendante de la clathrine est accrue, conduisant à l'élargissement des endosomes et la surproduction du peptide amyloïde.

Afin de trouver d'autres gènes impliqués dans l'élargissement des endosomes dans la trisomie 21, nous avons utilisé des lignées de cellules lymphoblastoïdes (LCL) et des cellules mononucléaires provenant de sang d'individus porteurs d'une trisomie 21 complète ou partielle. Nous avons trouvé une augmentation de la taille moyenne des endosomes précoces (+35%) dans les LCL et les cellules mononucléaires. Quatre lignées de trisomies partielles ont montré un élargissement des endosomes, permettant de réduire l'intervalle génétique à 1.3Mb. Le gène de l'APP est en dehors de cette région, suggérant qu'il n'est pas impliqué dans le phénotype dans ce type cellulaire. Nous avons identifié un gène candidat : SYNJ1 qui code pour la protéine synaptojanine-1, une phosphatase régulant la phosphorylation des phosphatidylinositol-4,5-biphosphates (PtdIns(4,5)P₂) impliqués dans le trafic intracellulaire. Nous avons observé de larges endosomes dans des cellules transfectée avec le plasmide SYNJ1. Nous concluons que la dérégulation de l'homéostasie des PtdIns(4,5)P₂ par la surexpression de la synaptojanine-1 peut conduire à l'élargissement des endosomes.

ABSTRACT

Enlarged endosomes are believed to be the first morphological change observed in Alzheimer's disease brains (AD). They are found in sporadic cases with no pathological evidence of AD yet, in Down syndrome (DS) as early as 28 weeks of gestation. DS patients developed AD because amyloid peptides found in senile plaques, were generated from APP (amyloid precursor protein), a gene localized on the chromosome 21. As APP and amyloid peptide seems not to be involved in enlarged endosomes, we thus searched for other factors that could modify the endosome morphology in AD and DS.

We found unexpectedly that increased membrane cholesterol was associated with the appearance of enlarged endosomes together with increased APP endocytosis and A β secretion in cultured neuronal and non neuronal cells. This effect of cholesterol was inhibited by siRNA against clathrin and by mutants of proteins involved in the formation of early endosomes (dynamin2 and Rab5). We suggest that the endo-lysosomal pathway of APP is regulated by cholesterol, in a Rab5 and clathrin dependent manner. As levels of total cholesterol are increased in the brains of AD patients we postulate that this raise could be responsible for the enhanced internalization of APP in enlarged endosomes and the overproduction of A β .

In search for new genes involved in the enlargement of early endosomes, we used lymphoblastoid cell lines (LCL) and blood mononuclear cells (BMC) from DS patients carrying full or partial trisomy 21. Using confocal microscopy, we showed that the mean size of the endosomes was significantly increased (+35%) in LCLs and BMC. Enlarged endosomes were absent in the 3 LCLs carrying APP microduplications. This result suggested that APP is not involved in the enlargement of early endosomes in this cell type. In four out of seven LCLs from DS patients carrying partial trisomy 21 we could very easily identify enlarged endosomes. By correlating the presence of enlarged endosomes to the triplicated genomic segment from Hsa21 we identified *SYNJI* as a candidate gene. *SYNJI* gene codes for the phosphoinositide phosphatase synaptojanin 1 protein, a key regulator of the signalling phospholipids phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PtdIns(4,5)P₂). We observed abnormally large endosomes in SH-SY5Y cells transfected with *SYNJI* plasmid. We conclude that deregulation of PtdIns(4,5)P₂ homeostasy by synaptojanin 1 over-expression can lead to the enlargement of early endosomes.

AVANT-PROPOS

26 Novembre 1901,

Note d'Aloïs Alzheimer : elle s'assoit sur son lit, sans expression.

Alzheimer : Quelle est votre prénom ?

Auguste D. : Auguste.

Alzheimer : Votre nom ?

Auguste D. : Auguste.

Alzheimer : Quelle est le nom de votre mari ?

Auguste D. : Auguste, je crois.

Alzheimer : Votre mari ?

Auguste D. : Ah, mon mari ? [Elle paraît ne pas avoir compris la question]

Alzheimer : Etes-vous marié ?

Auguste D. : A Auguste

Alzheimer : Mrs D. ?

Auguste D. : Oui, Auguste D.

Alzheimer : Depuis combien de temps êtes-vous ici ? [Elle semble essayer de se souvenir]

Auguste D. : Trois semaines.

Alzheimer : Qu'est ce que c'est ? [Je montre un crayon]

Auguste D. : Un stylo.

Cet entretien se déroula à l'hôpital de Francfort entre le psychiatre Allemand Aloïs Alzheimer (1864-1915) et sa patiente de 51 ans Auguste D. (1850-1906) atteinte de démence. Il suivit sa patiente jusqu'à son décès par septicémie le 8 Avril 1906, puis réalisa l'étude histopathologique de son cerveau. Il présenta ces résultats le 3 Novembre 1906 au 37^{ème} rencontre de la Psychiatrie Allemande à Tübingen :

« La maladie commença avec un fort ressentiment de jalousie envers son mari. Très rapidement après, elle montra des signes de troubles de la mémoire...Elle était désorientée [...] Après 4 ans et demi de maladie, elle était complètement apathique et confinée en position fœtale [...] L'autopsie montra un cerveau atrophié [...] »

Concernant les lésions histopathologiques, il écrivit :

« ...beaucoup de neurofibrilles s'accumulent formant des paquets denses [...] parfois le noyau et le cytoplasme disparaissent, et seulement les fibres emmêlées indiquent le lieu où fut antérieurement localisé le neurone. »

« Dispersés dans le cortex, en nombre important, particulièrement dans les couches supérieures, des foyers miliars peuvent être trouvés. Ils sont caractérisés par un dépôt d'une substance particulière dans le cortex cérébral. »

En 1907, son exposé fut publié dans *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie and und Psychisch-Gerichtliche Medizin* sous le titre « Une maladie caractéristique grave du cortex cérébral » (Alzheimer et al 1907). C'est le psychiatre renommé Emil Kraepelin (1856-1926), qui est à l'époque responsable de la chaire de psychiatrie de Munich, qui propose par la suite de désigner ce type de démence par le nom de son collègue en 1910.

La maladie d'Alzheimer (OMIM : 104300) est aujourd'hui la première cause de démence et se caractérise toujours par la présence de deux lésions histopathologiques : les corps neurofibrillaires (Fig. 1C, 1D) et les plaques amyloïdes (Fig. 1A, 1B) comme observé initialement par Aloïs Alzheimer, ainsi qu'une mort neuronale et une neuroinflammation.

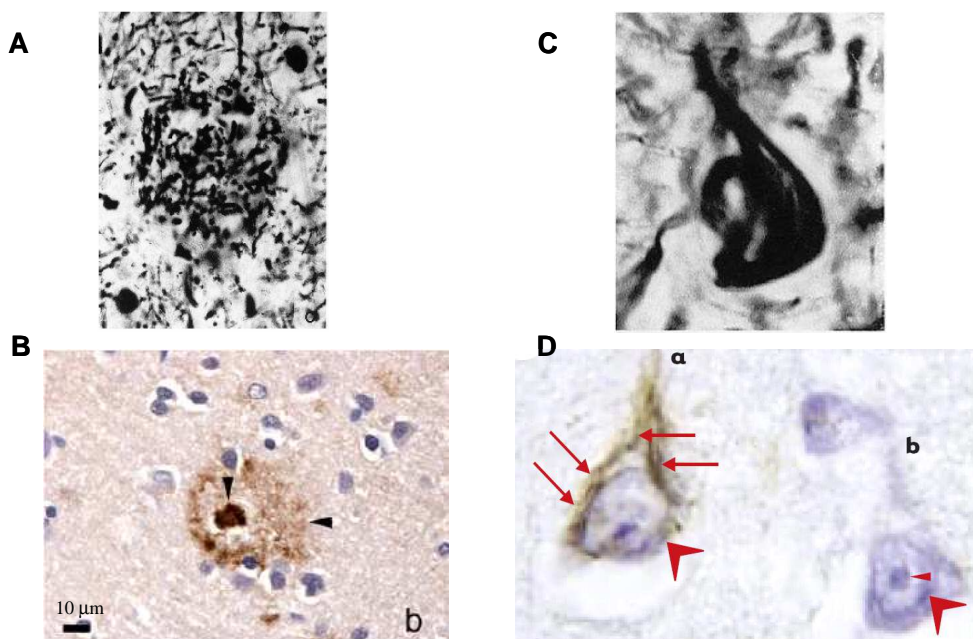


Figure 1: Plaques amyloïdes et corps neurofibrillaires

- A. Plaques amyloïdes décrites par Aloïs Alzheimer par la technique histologique d'imprégnation argentique.**
- B. Plaques amyloïdes mises en évidence par immunomarquage avec un anticorps dirigé contre le peptide amyloïde (Dako). (Duyckaerts et al., 2009).**
- C. Corps neurofibrillaires décrits par Aloïs Alzheimer par la technique histologique d'imprégnation argentique.**
- D. Corps neurofibrillaires mis en évidence par immunomarquage avec un anticorps dirigé contre la protéine Tau (Dako).**

La maladie d'Alzheimer touche environ 850 000 personnes de plus de 65 ans en France et, dans l'hypothèse d'une prévalence constante de la démence, toucheraient plus de 2 millions de personnes en 2040 (Ramaroson et al., 2003). Avec 220 000 nouveaux cas par an en France, la maladie d'Alzheimer est à la fois un problème de santé publique et un problème de société.

La progression de la maladie est évaluée grâce à différents tests neuropsychologiques, le plus utilisé étant le « Mini-Mental State Examination » (Folstein et al., 1975) et peut se définir en quatre phases :

1/ Une phase pré-clinique longue, durant laquelle des signes subtils sont présents mais aucun diagnostic ne peut être établi,

2/ Une phase initiale, la personne est généralement consciente du diagnostic et est capable de participer à des décisions concernant les soins futurs. Parmi les symptômes courants, on note des oublis bénins et des problèmes de communication comme trouver le mot juste ou suivre une conversation. Certaines personnes poursuivent leurs activités tandis que d'autres ont tendance à devenir passives et à se replier sur elles-mêmes. La personne atteinte peut également être frustrée par ses pertes de capacités. Elle deviendra peut-être anxieuse ou déprimée. Il est donc important de surveiller son bien-être émotionnel.

3/ Une phase intermédiaire, on note une détérioration plus grande des capacités mentales et physiques de la personne. Les pertes de mémoire s'aggravent et elle en vient à ne plus se souvenir de son histoire personnelle et à ne plus reconnaître sa famille et ses amis. La perte du sens de l'orientation dans l'espace et dans le temps exigera qu'on l'aide pour de nombreuses tâches quotidiennes comme s'habiller, se laver, aller aux toilettes.

4/ Dans la phase avancée, la personne n'est plus en mesure de se souvenir, de communiquer ou de prendre soin d'elle-même. Elle nécessitera des soins jour et nuit. Éventuellement, elle sera alitée, elle aura de la difficulté à manger et à avaler, et elle perdra la maîtrise de ses fonctions corporelles. Cette phase se termine par le décès de la personne, souvent à la suite de complications secondaires.

Aujourd'hui, aucun biomarqueur anté-mortem ne permet de diagnostiquer sans équivoque la maladie. D'importantes avancées ont été réalisées dans les techniques de dosages de biomarqueurs spécifiques du sang et du liquide céphalo-rachidien, d'imageries bio-médicales pour mesurer la taille de l'hippocampe (Du et al., 2001) et du développement de traceurs des plaques amyloïdes comme le composé B de Pittsburgh (Klunk et al., 2004).

Néanmoins, seule l'autopsie suivie de l'examen anatomopathologique du cerveau permet de diagnostiquer avec certitude la maladie.

La maladie d'Alzheimer se caractérise par la dégénérescence précoce des projections neuronales cholinergiques du noyau basal du néocortex (Whitehouse et al., 1981). Les traitements disponibles visent donc essentiellement à améliorer la transmission synaptique cholinergique. Le taux d'acétylcholine (neurotransmetteur impliqué dans la mémorisation) diminuant progressivement au cours de la maladie, les médicaments vont agir sur l'enzyme qui dégrade l'acétylcholine : la cholinestérase. Les anticholinestérasiques regroupent trois molécules différentes mais de même efficacité : donépézil (Aricept®), galantamine (Reminyl®) et rivastigmine (Exelon®). L'entourage du patient note généralement une amélioration globale, tant au niveau du comportement que dans les gestes quotidiens. En revanche, il n'y a pas d'amélioration significative en terme de mémoire. La seconde famille de médicament (un seul médicament : la mémantine ; Ebixa®) vise à bloquer les récepteurs du glutamate, molécule responsable d'une excitation toxique du système nerveux. Ils ont pour effet de retarder la perte des fonctions cognitives allant parfois jusqu'à les améliorer chez certains patients. Aucune de ces thérapies ne ralentit l'évolution de la maladie d'Alzheimer. Mais elles améliorent les conditions de vie du patient et rendent plus confortable la prise en charge par l'entourage. Les nouvelles stratégies comme l'immunothérapie visent désormais à traiter les causes de la maladie.

Ce « trop » succinct avant-propos des données historiques, épidémiologiques et thérapeutiques me permet de réaliser une introduction davantage centrée sur ma problématique. Lors de ma thèse, je me suis intéressé à un phénotype très précoce retrouvé dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer décrit pour la première fois par Cataldo et al (Cataldo et al., 1997). En effet, bien avant l'apparition des plaques amyloïdes et corps neurofibrillaires, les auteurs ont observé un élargissement de vésicules neuronales intracellulaires caractérisées comme étant des endosomes. J'ai tenté d'en comprendre les causes par deux approches différentes. La première, in vitro, en modulant le cholestérol membranaire dans des lignées cellulaires et en mesurer l'impact sur la taille des endosomes, leurs voies d'entrées dans la cellule ainsi que sur la production du peptide amyloïde en utilisant des outils de la biologie moléculaire. La seconde prend comme modèle la Trisomie 21 (OMIM : 190685) afin d'étudier la maladie d'Alzheimer. En effet, les individus porteurs d'une troisième copie du chromosome 21 développent une neuropathologie de type Alzheimer dès l'âge de 40 ans. Grâce à des échantillons de sang d'individus porteurs de Trisomie 21 et

des lignées cellulaires de trisomie 21 partielle, j'ai pu identifier un gène qui dérégule la taille des endosomes.

Mon introduction comportera donc trois parties :

1/ Sur la maladie d'Alzheimer avec les données récentes sur la pathologie ainsi que deux zooms sur la Trisomie 21 et le cholestérol.

2/ Sur la fonction, la formation, le trafic et la dérégulation des endosomes

3/Sur les hypothèses de travail.

Ce support permettra de faciliter la prise de connaissance des résultats, d'en juger et d'en discuter dans le dernier chapitre du manuscrit.

Bonne lecture.

I. INTRODUCTION

1. La maladie d'Alzheimer

1.1 Lésions histopathologiques

1.1.1 Les plaques amyloïdes

L'existence de plaques extracellulaires fut décrite pour la première fois en 1898 par Emil Redlich, appelé à l'époque « sclérose miliaire » et associée à une démence sénile. Mais c'est Aloïs Alzheimer qui comprit que les plaques séniles étaient « formées d'un dépôt d'un produit métabolique pathologique » (Alzheimer, 1911). En 1984, Glenner et *al.* séquença partiellement le principal composant des plaques séniles : le peptide amyloïde (Glenner and Wong, 1984b). Ce peptide hydrophobe principalement formé de 40 ou 42 acides aminés a une tendance à s'agréger sous forme de dépôts diffus (Delaere et al., 1990) ou denses détectables entre autre par le rouge Congo ou la Thioflavine-S. Alors que les dépôts diffus sont mal délimités morphologiquement et peuvent être détectés chez des individus considérés comme intellectuellement normaux, les dépôts denses sont composés de peptides amyloïdes ayant pris une conformation en feuillet β très insoluble. Ce sont ces dépôts denses que l'on appelle plaques séniles ou plaques amyloïdes. La formation de ces plaques est très rapide chez la Souris, de l'ordre de un à deux jours (Meyer-Luehmann et al., 2008) et chez l'Homme elles apparaissent suivant un schéma spatio-temporel stéréotypé au cours de la maladie (Duyckaerts et al., 1999). La présence de ces plaques conduit à une perturbation du réseau synaptique adjacent engendrant l'apparition de prolongements axonaux et dendritiques dystrophiques (Knowles et al., 1999). Localement, autour des plaques, il a été observé l'activation de cellules microgliales avec l'expression de protéines impliquées dans la réponse à l'inflammation. De plus, elles se révèlent être non seulement des réservoirs de molécules bioactives et attractives mais joueraient également un rôle dans la modification des fonctions et propriétés neuronales, les rendant hyperactifs (Busche et al., 2008).

L'angiopathie amyloïde cérébrale est l'accumulation du peptide amyloïde dans les vaisseaux sanguins des méninges et du cortex et est associée avec la démence dans la maladie d'Alzheimer (Attems et al., 2007). L'accumulation des dépôts amyloïdes insolubles empêche l'élimination des formes solubles conduisant à l'augmentation du peptide dans le cerveau. La rupture de l'homéostasie cérébrale et la détérioration de l'environnement neuronal pourraient dès lors causer le déclin cognitif (Weller et al., 2008).

1.1.2 Les corps neurofibrillaires

Les neurofibrilles ont été décrites pour la première fois en 1838 par Remak (1815-1865) qui remarqua de fines structures intracellulaires dans le soma et les axones des neurones. Mais c'est seulement au milieu des années 1980 que le composant principal des neurofibrilles fut découvert, en l'occurrence la protéine associée aux microtubules : Tau (Brion et al., 1985; Grundke-Iqbal et al., 1986; Kosik et al., 1986; Wood et al., 1986). Physiologiquement, tau joue un rôle crucial dans les neurones en liant et stabilisant les microtubules (Drubin and Kirschner, 1986) ; il régule ainsi le transport axonal. Dans la maladie d'Alzheimer, tau est anormalement hyperphosphorylé (Ihara et al., 1986) entraînant une diminution de son affinité pour les microtubules (Iqbal et al., 1986). La protéine tau libre a alors tendance à former des filaments hélicoïdaux puis des corps neurofibrillaires au niveau périnucléaire. La conversion de tau soluble en neurofibrilles peut occasionner une diminution du transport intraneuronale du soma vers les régions distales du neurone compromettant les fonctions neuronales et leur viabilité ; et cela soit par un gain de fonction (toxicité des corps neurofibrillaires) soit par une perte de fonction (perte de la fonction physiologique de tau). Ces hypothèses ont été validées expérimentalement avec des souris transgéniques pour la protéine tau comme modèle de dégénérescence de la maladie d'Alzheimer (Ishihara et al., 1999; Ballatore et al., 2007; Lee et al., 2005).

La formation progressive des corps neurofibrillaires d'une aire cérébrale à une autre au cours de l'évolution de la maladie corrèle parfaitement avec sa sévérité (ce qui n'est pas le cas avec les plaques séniles). Ainsi, Heiko et Eva Braak ont déterminé 6 stades de l'évolution de la maladie (Braak and Braak, 1991). Par exemple, la période pré-clinique de la maladie d'Alzheimer se caractérise par des corps neurofibrillaires localisés exclusivement dans la région transentorhinale (Stade I) puis enthorinale et hippocampique (Stade II).

Notons que cette lésion n'est pas spécifique de la maladie d'Alzheimer. En effet, il existe de nombreuses autres maladies neurodégénératives dites « tauopathies » présentant les mêmes caractéristiques comme la maladie de Pick, la dégénérescence cortico-basale, la dégénérescence fronto-temporale... (Buee et al., 2000).

1.2 L'APP et ces produits de clivage

1.2.1 L'APP

L'origine du peptide amyloïde a été découverte en 1987 avec le séquençage de son précurseur : l'Amyloïd Precursor Protein ou APP (Kang et al., 1987). L'APP est maintenant

connu pour être un des trois membres d'une petite famille de gène qui inclut 2 paralogues chez l'Homme nommés amyloïd precursor-like protein 1 et 2 (APLP1, APLP2) et à ce jour 40 orthologues dont l'Appl chez la Drosophile ou l'apl-1 chez le Ver (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000142192). Tous codent pour une protéine transmembranaire de type I avec un large domaine extracellulaire et une courte région cytoplasmique. Seul l'APP contient la séquence codant pour le peptide amyloïde chez l'Homme. Le gène de l'APP est localisé sur le chromosome 21 et suite à un épissage alternatif peut générer trois transcrits majoritaires : APP₆₉₅, APP₇₅₁, APP₇₇₀ (poids moléculaire de 110 à 130 kDa). L'APP₆₉₅ est la forme prédominante produite par les neurones (environ 10% des cellules du cerveau). APP₇₅₁ et APP₇₇₀ sont majoritairement exprimés dans les cellules non neuronales comme la glie, les plaquettes et de très autres nombreuses lignées cellulaires (Golde et al., 1990). Les ratios entre les différents isoformes peuvent varier au cours de la maladie d'Alzheimer (Moir et al., 1998). Notons que la surexpression d'APP₇₅₁ dans les cultures cellulaires est très utilisée car elle produit davantage de peptide amyloïde qu'APP₆₉₅ (Ho et al., 1996).

Durant son transit du réticulum endoplasmique à la membrane plasmique, l'APP subit des modifications post-traductionnelles avec une N- glycosylation (APP immature) puis une O-glycosylation (APP mature) (Tomita et al., 1998), des phosphorylations (Gandy et al., 1988; Knops et al., 1993; Oltersdorf et al., 1990) et une sulfatation au niveau de la tyrosine (Small et al., 1992). Seulement 10% de l'APP est présent à la membrane plasmique, la majorité étant dans l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique. L'APP localisé à la membrane plasmique est internalisé en quelques minutes grâce à son motif d'internalisation YENPTY (entre les résidus 682 et 687 de l' APP₆₉₅). Après endocytose, une fraction de l'APP est recyclée et une autre est dégradée par la voie lysosomiale (Thinakaran and Koo, 2008). Nous verrons dans la partie suivante que la localisation subcellulaire de l'APP est une donnée importante pour son clivage et la production de peptide amyloïde.

Le rôle de l'APP est mal connu mais plusieurs pistes sont intéressantes :

1/ La F-spondin, une glycoprotéine sécrétée impliquée dans le développement neuronal, lie le domaine extracellulaire de l'APP ainsi que l'APLP1 et 2. Ce ligand régulerait le clivage de l'APP (Ho and Sudhof, 2004).

2/ L'APP interagit avec la laminine et l'héparine suggérant un rôle dans l'adhésion avec la matrice extracellulaire (Kibbey et al., 1993; Small et al., 1994). L'adhésion entre cellules a également été démontrée in vitro par l'interaction de deux molécules d'APP ou d'une molécule d'APP et une molécule d'intégrine (Herzog et al., 2004; Storey et al., 1996).

Ajoutons que deux molécules d'APP sont capables de former des dimères à la membrane plasmique via le motif GXXXG (Munter et al., 2007). Les auteurs proposent que la dimérisation serait un facteur de risque pour développer la maladie car elle conduirait à une augmentation de la production du peptide amyloïde. Une étude récente invalide ce modèle en proposant que la dimérisation de l'APP à l'inverse, diminuerait la production du peptide amyloïde (Eggert et al., 2009). Quoi qu'il en soit, le clivage de l'APP semble affecté par le processus de dimérisation mais également par l'orientation de l'hélice du domaine transmembranaire de l'APP (Kienlen-Campard et al., 2008).

3/ Le rôle trophique de l'APP a été le plus étudié. L'APP stimule la croissance neuritique et la synaptogénèse (Allinquant et al., 1995). Ce phénomène est compatible avec la forte expression de l'APP durant la maturation neuronale (Hung et al., 1992).

4/ L'APP favorise la différenciation des cellules souches neuronales vers une lignée astrocytaire (Kwak et al., 2006). Il a également été montré que l'APP stimule de concert avec l'epidermal growth factor EGF la prolifération des cellules souches de la zone subventriculaire (Caille et al., 2004).

5/ L'injection d'anticorps dirigés contre l'APP dans le cerveau de rat conduit à des défauts comportementaux (Meziane et al., 1998). Des défauts d'apprentissage ont également été rapportés chez la Souris dont le gène de l'APP est inactivé (Senechal et al., 2008).

6/ L'APP pourrait aussi jouer un rôle comme protéine inductrice des voies de signalisation. L'APP lie FE65, une protéine dont le rôle est mal connu mais qui influencerait l'expression de gènes dans le noyau. Ainsi la phosphorylation de l'APP sur la thréonine 668 libère FE65 dans le cytoplasme permettant sa translocation dans le noyau (Nakaya et al., 2008). D'autres protéines comme X11 et X11L régulent le métabolisme de l'APP et activent la phosphorylation de l'APP par les JNK kinases (Taru and Suzuki, 2004). En outre, interaction de l'APP avec les adaptateurs moléculaires shc induiraient finalement la voie Ras (Russo et al., 2005).

7/ Enfin, d'autres études ont montré un rôle de l'APP dans l'homéostasie du cuivre et du zinc (Hesse et al., 1994).

Alors que l'APP semble impliqué dans de nombreuses fonctions, les souris invalidées pour le gène de l'APP sont viables, fertiles et présentent des phénotypes discrets : une perte de poids, une diminution de l'activité locomotrice, une gliose (Zheng et al., 1995) et un rapport suggère une réduction des marqueurs synaptiques (Dawson et al., 1999). L'absence d'un phénotype plus sévère est due à la compensation par APLP1 et APLP2. En effet, les souris inactivées pour les gènes APP, APLP1 et APLP2 meurent peu après la naissance et présentent

une dysplasie corticale. Cela suggère des anomalies graves de migrations des neuroblastes avec une perte des cellules corticales de Cajal-Retzius (Herms et al., 2004).

Prises ensembles, ces données montrent que les protéines de la famille de l'APP jouent un rôle essentiel dans le développement du système nerveux, dans la migration neuronale et l'arborisation synaptique. Néanmoins, le rôle de l'APP seul reste encore flou, d'autant plus que la majorité des différentes observations ci-dessus peut être imputée aux produits de clivage de l'APP et non pas à la protéine entière. Nous pourrions même supposer que l'APP n'a aucun rôle intrinsèque sauf celui d'être précurseur des différents peptides générés après son clivage (voir ci-dessous).

1.2.2 Le clivage α -sécrétase de l'APP

Le clivage de l'APP par l' α -sécrétase (Fig. 2) est physiologiquement majoritaire et intervient entre les résidus lys613 et leu614 (pour l'APP695) correspondant au 17^{ème} acide aminé de la séquence du peptide amyloïde (Esch et al., 1990; Sisodia, 1992). Cette première étape de la voie non-amyloïdogénique se réalise préférentiellement à la membrane plasmique (Kojro et al., 2001). Le peptide N-terminal libéré est appelé sAPP α et le fragment transmembranaire restant C83. De nombreuses autres protéines transmembranaires peuvent subir ce type de clivage tel que des récepteurs de facteurs de croissance, des ectoenzymes et des molécules d'adhésion cellulaire. Trois enzymes appartenant à la famille des protéines métalloprotéinases possèdent une activité α -sécrétase : ADAM10, ADAM17 et ADAM9 (Buxbaum et al., 1998).

De nombreux articles suggèrent que sAPP α est neurotrophique et neuroprotecteur. In vitro, l'application de sAPP α cause une pousse neuritique des cellules neuronales hippocampiques (Araki et al., 1991), et protège contre la cytotoxicité d'une hypoglycémie et du stress oxydatif (Mattson et al., 1999). Ex vivo, l'application de sAPP α sur des tranches organotypiques d'hippocampe est neuroprotectrice (Stein et al., 2004). In vivo, sAPP α augmente la densité synaptique, la mémoire à court et à long terme (Roch et al., 1994) (Meziane et al., 1998) et la prolifération des cellules souches de la zone subventriculaire chez la Souris adulte (Caille et al., 2004). En outre, la souris transgénique surexprimant ADAM-10 augmente la synaptogénèse corticale et ceci confirme l'influence neurotrophique de sAPP α (Bell et al., 2008).

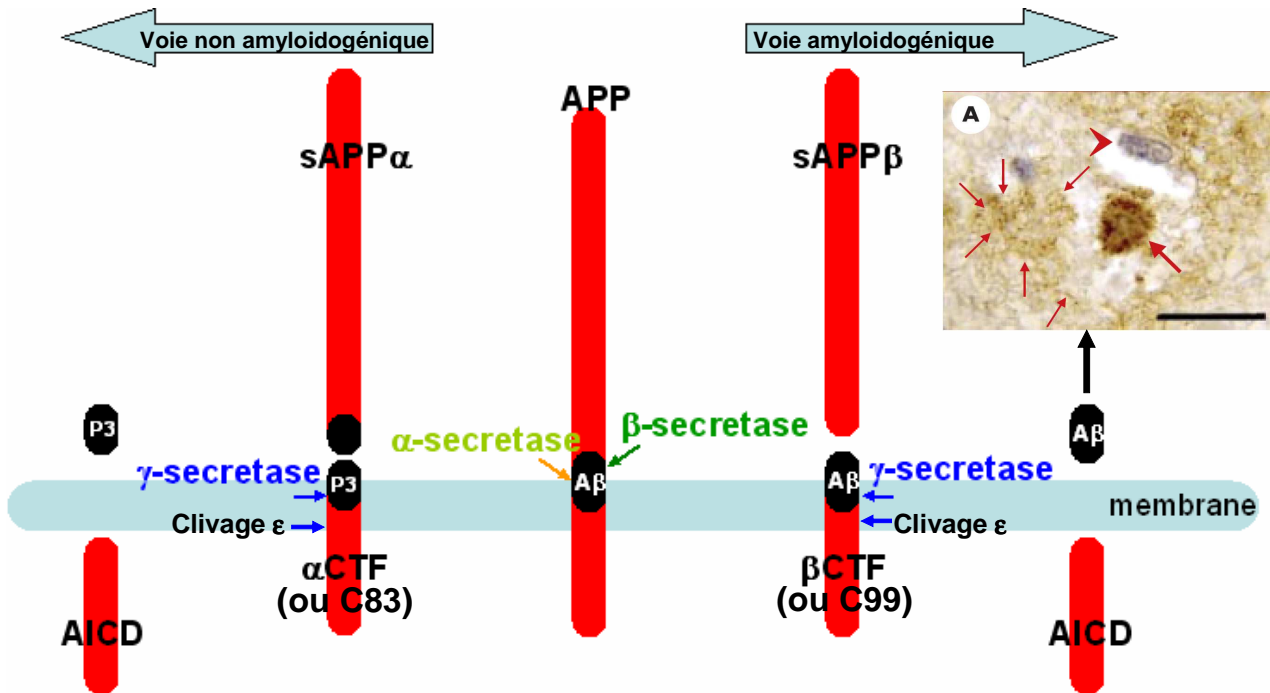


Figure 2 : Clivage de l'APP

La voie non amyloïdogénique de l'APP est la succession de deux clivages : le premier par l' α -sécrétase, le second par la γ sécrétase formant de nombreux dérivés (P3, AICD, sAPP α). L'action de la β -sécrétase remplace celle de l' α -sécrétase pour entrer dans la voie amyloïdogénique. Les peptides terminaux sont : AICD, sAPP β et le peptide amyloïde A β . Ce dernier s'agrège pour former les plaques amyloïdes.

1.2.3 Le clivage β -sécrétase de l'APP

L'APP peut-être clivé par une voie alternative impliquant l'activité d'une β -sécrétase (Seubert et al., 1993). La β -sécrétase coupe l'ectodomaine de l'APP au niveau de l'extrémité N-terminale du peptide amyloïde (entre les résidus 596 et 597 de l' APP695) relarguant ainsi un fragment soluble nommé sAPP β (Fig. 2). Le fragment transmembranaire restant est nommé C99. C'est la première étape de la voie amyloïdogénique qui se déroule majoritairement dans les endosomes. En effet, le processus d'endocytose de l'APP est nécessaire pour le β -clivage (Carey et al., 2005; Cirrito et al., 2008; Eehalt et al., 2003). L'activité enzymatique de Bace-1 est pH-dépendant, et fonctionne davantage dans le compartiment endosomal plus acide. A plus petite échelle, le β -clivage a lieu dans l'appareil de Golgi et la voie de sécrétion.

Plusieurs groupes ont simultanément identifié l'enzyme Bace1 (β -APP cleaving enzyme) comme la β -sécrétase (Hussain et al., 1999; Lin et al., 2000; Sinha et al., 1999;

Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). Bace-1 (70KDa) est augmentée dans le cortex des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Fukumoto et al., 2002; Holsinger et al., 2002; Li et al., 2004b; Tyler et al., 2002) ainsi que son activité (Yang et al., 2003), pouvant conduire à une augmentation de la production du peptide amyloïde. Une étude récente montre que l'ARN de Bace-1 serait stabilisé par un ARN anti-sens de BACE-1 formant alors un duplex. Ce duplex serait fortement présent dans les cerveaux Alzheimer, diminuant ainsi la dégradation de l'ARN Bace-1 et favorisant sa traduction en protéine (Faghihi et al., 2008).

Il existe également une seconde aspartyl protéase appelée BACE-2 (64% d'homologie avec BACE-1) localisée sur le chromosome 21. Elle est capable de cliver l'APP au même site que BACE-1 mais également à d'autres sites (Lin et al., 2000). Cependant, la protéine BACE-2 diminue dans le cerveau des patients Alzheimer (Stockley et al., 2006) et la délétion de BACE-1 chez des souris transgéniques surexprimant l'APP abolit la production et le dépôt du peptide amyloïde (Vassar, 2004). Cela suggère que l'activité β -sécrétase de BACE-2 est minime sur le substrat APP.

Peu d'études ont été réalisées sur le rôle de sAPP β . Notons tout de même que l'application de sAPP α est 100 fois plus protectrice que sAPP β sur les cultures de neurones d'hippocampe ayant reçu une dose toxique de peptide amyloïde ou privés de glucose (Furukawa et al., 1996). D'après cette étude, ce sont les 17 derniers acides aminés C-terminaux présents sur sAPP α (donc absents sur sAPP β) qui confèrent le mécanisme de protection.

1.2.4 Le clivage γ sécrétase

La γ -sécrétase est responsable de la protéolyse finale de la voie amyloïdogénique et non-amyloïdogénique (Fig. 2). A partir des fragments transmembranaires C83 et C99, le complexe enzymatique génère respectivement le peptide P3 et AICD (APP Intracellular Domain) d'une part et le peptide amyloïde et AICD d'autre part. L'activité γ -sécrétase nécessite la formation d'un complexe multiprotéique d'au moins quatre sous-unités : la préséniline 1 ou la préséniline 2, la nicastrine, Aph-1 (Anterior Pharynx defective-1) et Pen-2 (Presenilin-Enhancer-2) avec une stoechiométrie de 1 : 1 : 1 : 1 (Edbauer et al., 2003; Fraering et al., 2004; Kimberly et al., 2003; Sato et al., 2007). Les présénilines stabilisent (Pitsi and Octave, 2004) et clivent C99 (Haass and Steiner, 2002) ; il a été néanmoins démontré qu'une activité enzymatique de la γ -sécrétase était possible en absence de présénilines (Armogida et

al., 2001; Wilson et al., 2002; Sevalle et al., 2009;). La nicastrine est le récepteur des substrats qui sont tous des protéines transmembranaires de type I dépourvues de leur ectodomaine (Shah et al., 2005). PEN-2 est requis pour la stabilisation du complexe (Hasegawa et al., 2004; Prokop et al., 2004), alors que Aph-1 a un rôle encore mal identifié. Néanmoins, un tout récent papier montre que l'inactivation spécifique de l'isoforme Aph-1b conduit à l'amélioration des phénotypes neuropathologiques associés à la maladie d'Alzheimer dans un modèle murin (Serneels et al., 2009). Des protéines auxiliaires contrôlent la formation du complexe comme Rer1 (Spasic et al., 2007). L'activité γ -sécrétase a été détectée dans le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, la membrane plasmique et les endosomes (Thinakaran and Koo, 2008). L'action du complexe enzymatique est compliquée puisque il doit hydrolyser le substrat dans le domaine trans-membranaire, un milieu hydrophobe (Wolfe and Kopan, 2004). Récemment, il a été proposé que la γ -sécrétase formerait un pore permettant de créer des cavités aqueuses dans la membrane plasmique afin de réaliser le clivage (Lazarov et al., 2006). Ou plutôt les clivages ! En effet, la γ -sécrétase coupe majoritairement à 2 endroits : site- γ et site- ϵ . Le modèle proposé par Qi-Takahara et al. suggère un clivage au niveau du site- ϵ libérant le peptide AICD, puis par clivages successifs la formation de peptides amyloïdes de différentes tailles dont les majoritaires sont les peptides amyloïdes de 40 (A β 40) et 42 (A β 42) acides aminés (Qi-Takahara et al., 2005).

La γ -sécrétase a de nombreux substrats autre que l'APP comme les protéines Notch, ErbB-4, la E-cadherin ou la nectin-1 α (Selkoe, 2001). Inhiber le clivage de ces protéines conduit à de graves troubles développementaux. Un des enjeux actuels est donc de trouver des inhibiteurs ou des modulateurs spécifiques du clivage de l'APP par la γ -sécrétase sans affecter le clivage de Notch. A l'heure actuelle, de nombreux composés sont prometteurs comme les isocoumarines (Petit et al., 2001; Petit et al., 2003), le R-flurbiprofen (Weggen et al., 2001) ou Gleevec (Netzer et al., 2003).

Le rôle des différents peptides est mal connu. Le peptide P3 dérivé de la voie non-amyloïdogénique correspond aux résidus 17 à 40 et 17 à 42 du peptide amyloïde et représenterait une forme amyloïde bénigne puisqu'il ne possède pas les domaines d'activation et de recrutement de la glie autour des plaques (Dickson, 1997). Une étude récente montre que P3 est incapable de former des oligomères stables (formes amyloïdes les plus toxiques), évoluant directement vers des agrégats fibrillaires moins toxiques. P3 n'a aucun effet sur la fonction synaptique confortant les idées que le peptide amyloïde est la principale forme

synaptotoxique et que la voie non-amyloïdogénique est à l'inverse neuroprotectrice (Dulin et al., 2008).

Le rôle d'AICD est très controversé. Certains lui suggèrent une capacité à être transloqué dans le noyau afin de réguler l'activité transcriptionnelle de certains gènes via la formation d'un complexe ternaire AICD/FE65/TIP60 (Cao and Sudhof, 2001), ou un rôle dans l'apoptose (Kinoshita et al., 2002) ou encore dans la plasticité synaptique (Galvan et al., 2006). Plus de 20 protéines peuvent interagir avec AICD (Muller et al., 2008) mais aucune étude n'a analysé l'expression d'AICD et de ses partenaires dans des échantillons de cerveaux humains sains ou atteints de la maladie d'Alzheimer et cela certainement du fait de son instabilité et de sa dégradation rapide par le protéasome (Nunan et al., 2001). Il faut aussi noter que AICD est produit à la fois par la voie amyloïdogénique et non-amyloïdogénique et qu'aucune étude à ma connaissance ne rapporte de différence de production d'AICD entre ces deux voies, ni de différence d'affinité entre C99 ou C83 et la γ -sécrétase. Pour complexifier encore les processus de clivages, AICD possède un site de clivage pour les caspases, des protéases impliquées dans le phénomène d'apoptose cellulaire (Gervais et al., 1999). Ce clivage génère deux peptides : Jcasp et C31 qui entraîne une réduction de la transmission synaptique, une perte synaptique puis la mort cellulaire (Lu et al., 2000; Bertrand et al., 2001; Madeira et al., 2005; Nikolaev et al., 2009).

Quand il fut découvert que le peptide amyloïde était le composant majeur des plaques séniles, il fut naturel de conjecturer de sa toxicité. Cependant, le fait que d'une part, le peptide soit constitutivement produit par le métabolisme normal des cellules (Haass et al., 1992), et que d'autre part, il soit extrêmement bien conservé au cours de l'évolution (Wasling et al., 2009) reposent le paradigme de la toxicité du peptide amyloïde. Ainsi, à une concentration picomolaire, le peptide $\text{A}\beta$ 40 semblent avoir un rôle neurogénique sur des cellules neuronales progénitrices (Chen and Dong, 2009). Il est également capable d'induire la synthèse de cholestérol alors que le peptide $\text{A}\beta$ 42 régule l'activité de la sphingomyélinase (Grimm et al., 2007). $\text{A}\beta$ 42 serait également impliqué dans la formation de la mémoire et de l'apprentissage (Garcia-Osta and Alberini, 2009). Leur action passerait par leur interaction avec les récepteurs à l'acétylcholine. D'autres rôles ont été postulés comme la régulation de l'arborisation dendritique lors du développement ou dans la régulation du stress oxydatif grâce aux pouvoirs chélateurs du peptide amyloïde pour certains ions comme Cu^{2+} , Fe^{2+} et Zn^{2+} (Atwood et al., 2002).

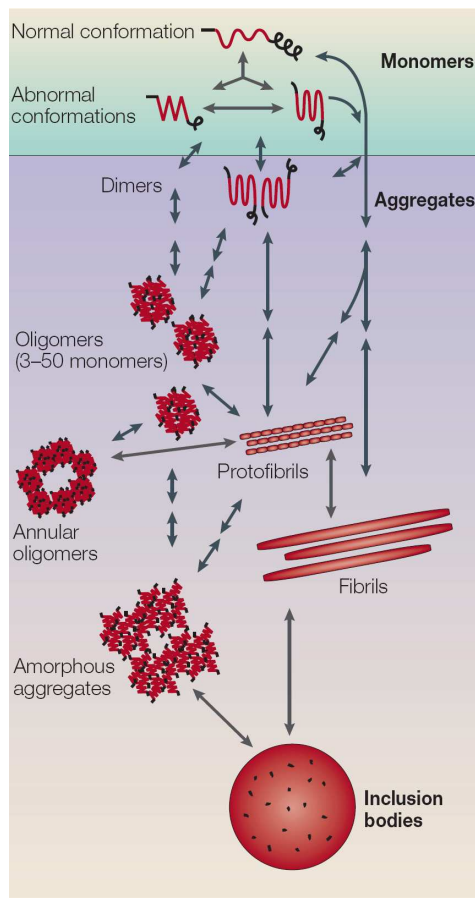


Figure 3 : Fibrillogénèse du peptide amyloïde

Le processus d'agrégation commence par l'association de monomères du peptide amyloïde de conformation anormale. Les fibrilles amyloïdes peuvent être formées par l'addition successive de monomères linéaires, ou par l'assemblage d'intermédiaires oligomériques ou de protofibrilles. Les oligomères ou les protofibrilles sont capables de former des anneaux annulaires. Les plaques séniles (« inclusion bodies ») résultent de l'association des fibrilles ou des agrégats amorphes et peuvent être observées par microscopie optique. Il a été proposé que les oligomères soient davantage toxiques que les agrégats plus larges. L'enchaînement des étapes de fibrillogénèse demande encore à être clarifié (Ross and Poirier, 2005).

Alors que les monomères de peptide amyloïde semblent peu voire pas toxique, les agrégats semblent davantage neurotoxiques et constituent une multitude d'intermédiaires jusqu'au stade finale de la plaque sénile non soluble (Fig3). Le peptide $\alpha\beta 42$ s'oligomériser plus facilement et serait donc plus toxique que l' $\alpha\beta 40$. Sous le terme oligomère se regroupent les termes de micelles, protofibrilles, agrégats préfibrillaires, ADDL (Alzheimer disease diffusable ligands), $\alpha\beta^*56$, globulomères, amylosphéroïdes, tab (toxic soluble $\alpha\beta$) et protofibrilles annulaires. Ces classes ont été répertoriées suivant leur reconnaissance par des anticorps anti-amyloïde, leurs tailles et parfois selon leurs structures tridimensionnelles. Par exemple, les ADDL auraient une taille de l'ordre du trimère au dodécamère in vitro et in vivo (Gong et al., 2003; Lambert et al., 2001), se lieraient préférentiellement aux synapses et seraient enrichis dans le cerveau des personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer (Lacor et al., 2004). Les oligomères préfibrillaires sont reconnus par l'anticorps A11, et sont présents

dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Ab*56 est un dodécamère dont les taux sont corrélés avec les déficits cognitifs chez l'animal (Lesne et al., 2006). Enfin, les dimères ou trimères inhibent la LTP (long term potentiation) in vitro (Walsh et al., 2002), la LTP étant la mesure de la plasticité électrophysiologique synaptique.

Les peptides amyloïdes pourraient également former des pores dans les membranes (Lashuel et al., 2002) altérant ainsi les flux ioniques et protéiques, endommager les cellules endothéliales et promouvoir le stress oxydatif (péroxydation des lipides, production de peroxyde d'hydrogène, oxydation des protéines). Le peptide amyloïde interagit avec de nombreuses autres protéines comme tau (Guo et al., 2006) et ApoE (Sadowski et al., 2006) favorisant le développement de la maladie.

1.2.5 Interaction avec la protéine Tau

La maladie d'Alzheimer se caractérise à la fois par un dépôt amyloïde extracellulaire et des corps neurofibrillaires constitués de la protéine tau hyperphosphorylée. Un nombre croissant d'études supporte l'idée que le peptide amyloïde pourrait interagir avec tau pour accélérer la formation des neurofibrilles. Par exemple :

- des extraits de cerveaux de souris âgées surexprimant l'APP et contenant en grande quantité du peptide amyloïde ont été injectés à de jeunes souris surexprimant une forme mutée du gène tau. Celles-ci ont montré des lésions neurofibrillaires autour du site d'injection (Bolmont et al., 2007).

- des souris surexprimant l'APP mais déficientes pour le gène tau ($APP/tau^{-/-}$) présentent le même taux d' $a\beta_{42}$, de plaques séniles ou de neurites dystrophiques que les souris $APP/tau^{+/+}$ mais les anomalies calciques, synaptiques et comportementales sont sensiblement réduites montrant l'effet protecteur de l'inactivation du gène tau (Roberson et al., 2007).

A l'échelle moléculaire, le peptide amyloïde pourrait induire la phosphorylation de tau par plusieurs voies de transduction du signal. Ainsi, le peptide amyloïde augmente les molécules du stress oxydatif déclenchant l'activité de la kinase c-Jun N-terminal qui serait capable de phosphoryler tau (Savage et al., 2002). Alternativement, le peptide amyloïde se fixe directement sur une sous-unité du récepteur nicotinique à l'acétylcholine ($\alpha 7nAChR$) formant un complexe qui activerait la voie PI3K/Akt. L'activation de cette voie entraînerait la phosphorylation de la kinase GSK3 β qui à son tour hyperphosphorylerait la protéine tau dans le cerveau des patients Alzheimer (Wang et al., 2003).

Ces données sont encore parcellaires et hypothétiques. De nombreuses équipes cherchent à trouver le lien entre la pathologie amyloïde et la pathologie tau.

1.3 Formes génétiques et sporadiques

1.3.1 Les formes monogéniques

On appelle « formes monogéniques ou familiales », une transmission mendélienne d'un gène muté qui récapitule le phénotype étudié. Dans la maladie d'Alzheimer, elles représentent moins de 1% de la totalité des cas.

i. L'APP

Après la découverte du peptide amyloïde dans les plaques séniles puis son lien avec l'APP, les premières études de liaison génétique ont très rapidement proposé l'APP comme gène candidat des formes familiales de la maladie d'Alzheimer (Van Broeckhoven et al., 1990). La première mutation (E693Q) dans l'APP montra de façon irrévocable que les mutations dans l'APP conduisent à un dépôt amyloïde et à une maladie d'Alzheimer (Levy et al., 1990). Plusieurs mutations sont désormais répertoriées (24 sur alzforum.com, Fig. 4A), la plupart adjacentes aux sites β - et γ - sécrétases. Citons en particulier la mutation dite « suédoise » (Mullan et al., 1992) utilisée en culture cellulaire. Il est clairement établi que l'effet pathogénique des mutations affecte le clivage de l'APP en augmentant la production du peptide amyloïde (Citron et al., 1992).

Les personnes atteintes de formes familiales de la maladie développent dans la plupart des cas des maladies d'Alzheimer précoces (avant l'âge de 60ans).

Si toutes les mutations sont dominantes, un papier récent montre pour la première fois une mutation récessive (A673V). A l'état hétérozygote la mutation inhibe l'amyloïdogénèse et la neurotoxicité en formant des complexes instables avec le peptide amyloïde sauvage, alors qu'à l'état homozygote le peptide muté est très stable et très toxique (Di Fede et al., 2009).

ii. Les présénilines

Les deux autres gènes responsables des formes familiales de la maladie d'Alzheimer sont la préséniline-1 et la préséniline-2 (Levy-Lahad et al., 1995; Rogaev et al., 1995). Quarante-deux mutations de la préséniline-1 (Fig. 4B) sont répertoriées sur le site Alzforum.org, et 11 sur la préséniline-2 (Fig. 4C). Les mutations sont réparties le long des protéines sans topologie particulière. Les mutations sont majoritairement de type faux-sens, elles affectent

l'activité de la γ -sécrétase en augmentant le ratio $a\beta_{42}/a\beta_{40}$ (Scheuner et al., 1996). Alors que les mutations dans l'APP augmentent la production du peptide amyloïde, les mutations dans les présénilines diminuent la production du peptide $a\beta_{40}$ conduisant à une augmentation relative d' $a\beta_{42}$ par rapport à $a\beta_{40}$ (Suzuki et al., 1994). Cette perte de fonction des présénilines mutées occasionne une digestion incomplète de C99, générant moins de peptide amyloïde et de taille plus grande : 42 au lieu de 40 (Qi et al., 2003; Yagishita et al., 2006). Les peptides $a\beta_{42}$ étant plus toxiques que les peptides $a\beta_{40}$, et sachant que l'expression d' $a\beta_{42}$ seul (sans $a\beta_{40}$) est suffisante pour causer une amyloïdogénèse chez les souris transgéniques (McGowan et al., 2005), on comprend que ces mutations puissent engendrer des maladies d'Alzheimer très agressives, les premiers symptômes pouvant être détectés entre 30 et 50 ans.

Aucun autre gène n'est impliqué dans les formes familiales de la maladie d'Alzheimer. Les mutations trouvées dans le gène tau causent des démences frontotemporales (Hutton et al., 1998), jamais de cas d'Alzheimer.

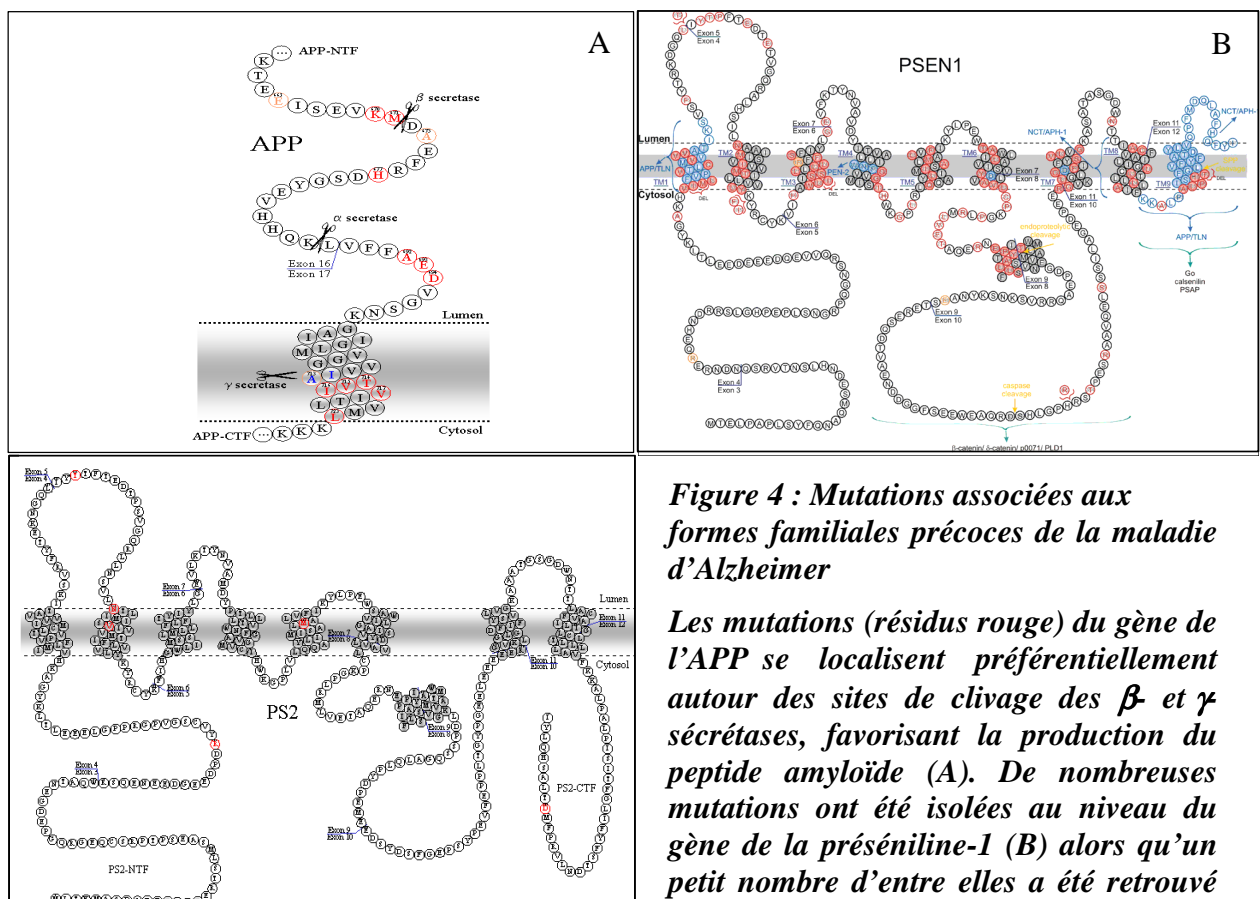


Figure 4 : Mutations associées aux formes familiales précoces de la maladie d'Alzheimer

Les mutations (résidus rouge) du gène de l'APP se localisent préférentiellement autour des sites de clivage des β et γ sécrétases, favorisant la production du peptide amyloïde (A). De nombreuses mutations ont été isolées au niveau du gène de la préséniline-1 (B) alors qu'un petit nombre d'entre elles a été retrouvé dans le gène de la préséniline-2 (C) (www.alzforum.org).

1.3.2 La trisomie 21

i. Introduction historique, épidémiologique et clinique

C'est en 1838 qu'est définie par Esquirol une curieuse maladie mentale appelée l'idiotie et caractérisée comme « un état dans lequel les facultés intellectuelles ne se sont jamais manifestées ou n'ont pas su se développer assez pour que l'idiot ait pu acquérir les connaissances relatives à l'éducation que reçoivent les individus de son âge et placés dans les mêmes conditions que lui. ». D'autres s'essaieront à classifier le déficit intellectuel comme Seguin dans les catégories de faibles d'esprits, idiots ou imbéciles. En 1866, l'anglais Down décrit les caractéristiques détaillées de la déficience intellectuelle et la nomme idiotie mongoloïde en raison du faciès particulier des sujets atteints, ressemblant d'après lui aux peuples de Mongolie. C'est en 1959 qu'est découverte l'existence d'un troisième chromosome 21 au sein de toutes les cellules de 8 sujets atteints de « Mongolisme » par l'équipe de Jérôme Lejeune (Lejeune et al., 1959). Il décide dès lors d'imposer le terme de trisomie 21 dans les pays francophones. En effet, dans les pays anglo-saxons, le terme de syndrome de Down est plus couramment usité.

La trisomie 21 est la cause de retard mental d'origine génétique la plus fréquente : environ 1 naissance sur 900. Ce risque augmente avec l'âge de la mère pouvant atteindre 1 :111 après 40 ans (Ayme, 1996).

La maladie se caractérise par de nombreuses anomalies morphologiques avec une importante variabilité interindividuelle. Aucun signe clinique n'est spécifique à la trisomie 21, tous sont présents dans la population générale mais avec une prévalence plus faible. Les traits phénotypiques les plus souvent observés sont les suivants : dysmorphies cranio-faciales et des membres, anomalies cardiaques, troubles gastro-intestinaux, défaillance du système immunitaire, troubles hormonaux, retard mental.

De nombreuses pathologies sont associées à la Trisomie 21 (Fig. 5). Par exemple, les patients ont un risque plus élevé de développer des leucémies, de l'obésité, du diabète, et une cataracte précoce. Dans la population trisomique 21, des lésions comparables (plaques séniles, corps neurofibrillaires, perte neuronale) à celles observées dans la maladie d'Alzheimer apparaissent précocement vers l'âge de 20 ans et sont constantes à partir de 40 ans. Une très grande majorité développe une démence avant l'âge de 50 ans (Lai and Williams, 1989). La trisomie 21 peut donc conduire à une maladie d'Alzheimer précoce d'origine génétique.

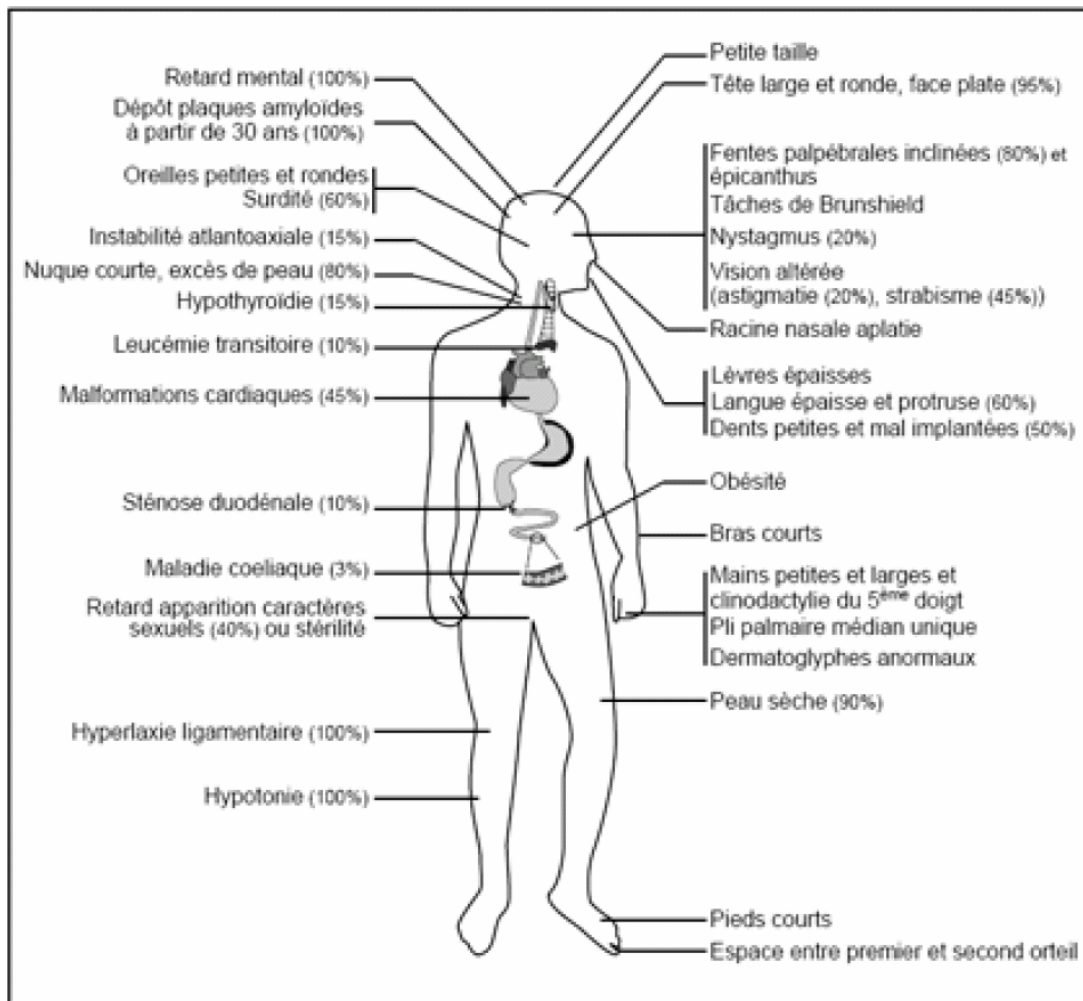


Figure 5 : Schéma récapitulatif des principaux signes cliniques associés à la Trisomie 21.

ii. Etiologie

En raison de la taille de la région génomique tripliquée, les trisomies peuvent être classées en cinq catégories :

1/ les trisomies complètes libres sont dues à la présence de 3 chromosomes 21 entiers et résultent de la mauvaise ségrégation d'un chromosome 21 lors de la méiose de l'un des parents, le plus souvent la mère.

2/ les trisomies complètes par translocation robertsonienne sont la fusion du chromosome 21 acrocentrique avec un autre chromosome acrocentrique (13, 14, 15, 21, 22). Ce cas est à l'origine de 3% des cas de trisomie 21.

3/ les trisomies partielles sont beaucoup moins fréquentes (1% des cas de trisomie 21), elles correspondent à la triplification d'une région du chromosome (segment en général supérieur à 5

Mb). Ce type de trisomie résulte d'une mauvaise ségrégation méiotique avec des réarrangements chromosomiques.

4/ les microtrisomies décrites par le groupe d'Antonarakis (Antonarakis et al., 2004) correspondent à la triplification d'un segment génomique court inférieur à 5Mb, qui n'est pas discernable par les analyses cytogénétiques classiques.

5/ les trisomies en mosaïque concernent 2% des patients porteurs d'une trisomie 21 et proviennent d'une mauvaise ségrégation mitotique au cours de la segmentation. L'organisme est composé de cellules trisomiques et normales ; le phénotype de l'individu variant en fonction du taux de mosaïcisme dans les tissus.

Ces différentes anomalies génétiques ont permis de mieux comprendre la corrélation génotype-phénotype. Ainsi, l'étude des trisomies partielles a permis de définir des régions minimums pour 24 signes phénotypiques de la trisomie 21 (Delabar et al., 1993). Ces différents types de trisomies 21 ont également apporté une meilleure compréhension de la maladie d'Alzheimer. Ainsi dès 1974 Malamud et Hirano suggéraient que « l'anomalie chromosomique chez les trisomiques 21 prédisposerait au développement des changements neuropathologiques caractéristiques de la maladie d'Alzheimer ». En 1984, Glenner suggérait que le gène du peptide amyloïde soit localisé sur le chromosome 21, car il l'avait retrouvé dans les cerveaux de patients trisomiques 21 et d'Alzheimer (Glenner and Wong, 1984a). La découverte de la protéine APP dont le gène est localisé sur le chromosome 21 rendit le lien évident. Ce lien a été confirmé récemment grâce à trois microduplications indépendantes du locus de l'APP dans 3 familles françaises différentes (Rovelet-Lecrux et al., 2006). Les membres porteurs de 3 copies d'APP présentent une neuropathologie sévère de type Alzheimer avec angiopathie amyloïde. En outre, un remarquable cas décrit une femme de 78 ans présentant les caractéristiques phénotypiques de la trisomie 21 mais non démente. Son caryotype présente une trisomie partielle excluant l'APP et l'examen post-mortem de son cerveau ne mit pas en évidence les lésions typiques de la maladie d'Alzheimer (Prasher et al., 1998). Prises ensemble, ces données placent l'APP et ses produits de clivage comme agent causal de la maladie d'Alzheimer dans les formes génétiques pures et par extrapolation dans les formes sporadiques. Une augmentation de 50% du dosage génique de l'APP est donc suffisante pour conduire à une maladie d'Alzheimer, cela en l'espace de 40 à 50 ans.

iii. Les modèles murins de la trisomie 21

Différents modèles murins de la Trisomie 21 (Fig. 6) et monogéniques pour les gènes du chromosome 21 existent. Je développerai davantage ceux que j'ai utilisés, c'est-à-dire le modèle Ts65Dn, Ts1Cje, et TgAPP.

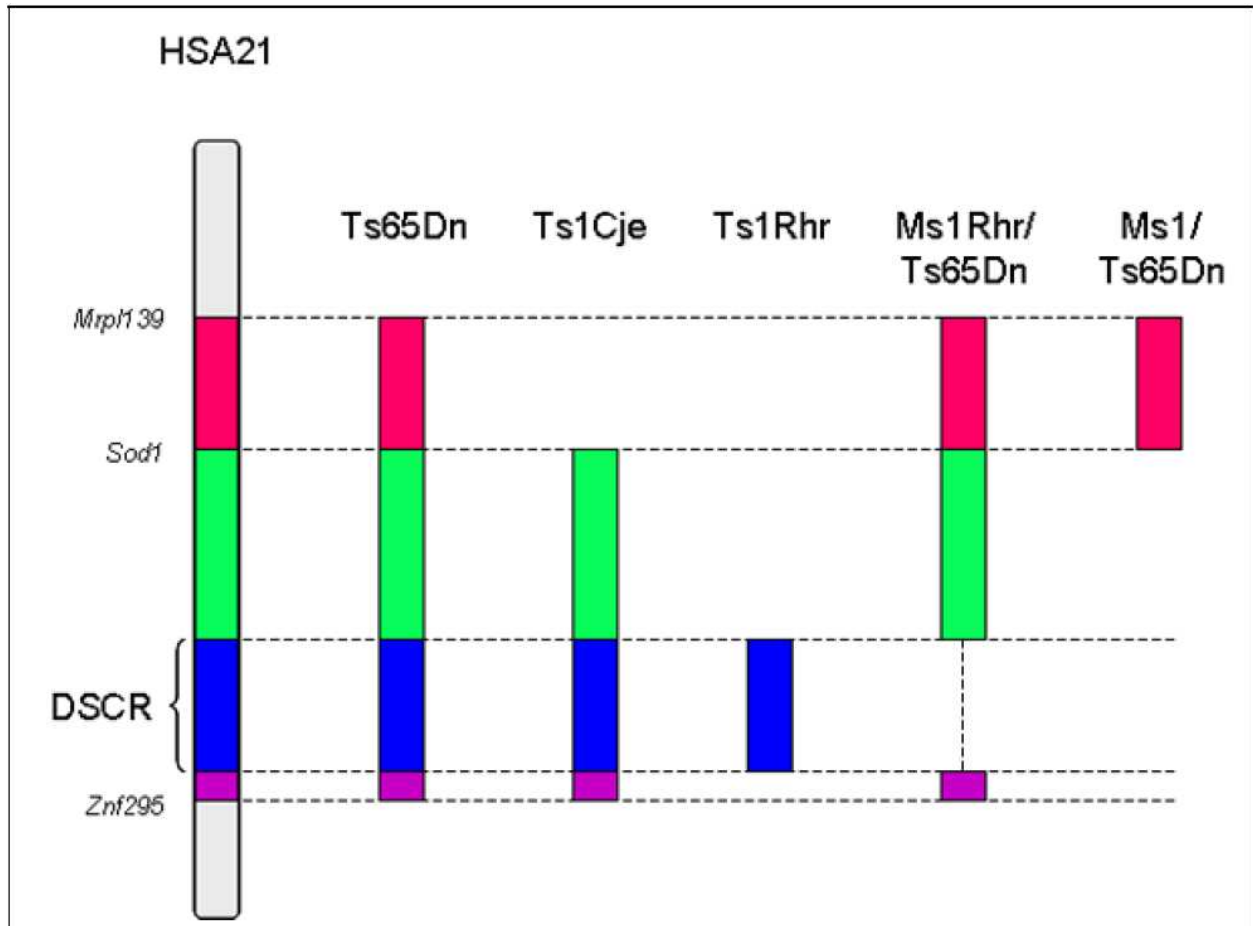


Figure 6 : Comparaison des différents modèles murins de la Trisomie 21

1/ Les souris Ts16.

C'est un modèle de trisomie totale du chromosome 16 murin. Le chromosome 16 murin est orthologue à hauteur de 35% avec le chromosome 21 humain, les 65% restant avec les chromosomes 3, 22 et 16 humains. Malgré les similitudes avec les phénotypes retrouvés chez les trisomiques 21 (malformations cardiaques, anomalies immunologiques, cou court), les anomalies observées peuvent ne pas être dues uniquement à la région synthénique entre le chromosome 21 humain et 16 murin (Epstein, 2002; Epstein et al., 1985). En outre, elles ne survivent pas à la naissance, limitant leur étude au stade embryonnaire.

2/ Les souris Ts65Dn.

La souris Ts65Dn possède une troisième copie de la partie distale du chromosome 16 transloquée sur le chromosome 17. Ces souris sont trisomiques pour 132 gènes compris entre

Mrpl39 et Znf295, tous orthologues au chromosome 21 humain (Davisson et al., 1990). Les souris sont viables avec quelques traits phénotypiques caractéristiques des individus porteurs d'une trisomie 21 comme la réduction du poids à la naissance, la stérilité des mâles, les anomalies cranio-faciales, les troubles de l'apprentissage et de la mémoire (Reeves et al., 1995; Richtsmeier et al., 2000). Anatomiquement, il a été noté une réduction du volume cérébelleux, hippocampique (région CA2), et une diminution de 30% du nombre de synapses excitatrices (Baxter et al., 2000; Granholm et al., 2000; Insausti et al., 1998; Kurt et al., 2004). Ce modèle est le plus étudié pour la recherche sur la trisomie 21 mais sert également pour la maladie d'Alzheimer même s'il ne présente pas de plaques séniles ni de corps neurofibrillaires. Ainsi, ce modèle a permis de montrer que la surexpression de l'APP occasionne une perte des neurones cholinergiques due à un défaut du transport du NGF. En effet, le fait de rétablir à 2 doses géniques l'APP au lieu de 3 restaure partiellement le phénotype (Salehi et al., 2006). Récemment, il a été montré chez les souris Ts65Dn que la troisième copie du gène Dyrk1A (dual specificity tyrosine phosphorylated and regulated kinase 1A) augmentait la phosphorylation de tau contribuant ainsi au phénomène de fibrillogénèse (Liu et al., 2008).

3/ Les souris Ts1Cje.

Ces souris sont trisomiques pour 85 gènes du chromosome 16 murin du gène Sod1 (non fonctionnel) au gène Znf295 et résultent d'une translocation réciproque 12;16 (Fig. 6). Ces souris présentent un volume cérébelleux réduit (Laffaire et al., 2009), des anomalies cranio-faciales et des troubles de la mémorisation mais moindres que chez les souris Ts65Dn (Richtsmeier et al., 2002; Sago et al., 2000). Contrairement aux souris Ts65Dn, il n'y a pas de dégénérescence cholinergique et le transport rétrograde de NGF est meilleur. Les auteurs mettent en avant l'absence de la troisième copie de l'APP pour expliquer ces résultats (Salehi et al., 2006).

4/ Autres modèles.

Notons d'autres modèles moins étudiés comme Ms1/Ts65Dn (trisomique de l'APP à Sod1), Ts1Rhr (de Cbr3 à Mx2), et les modèles Ts1Yah, Ts2Yah trisomiques pour les régions homologues du chromosome 21 humain situées sur les chromosomes 17 et 10 de la Souris respectivement. Le croisement des souris Ts65Dn x Ts1Yah x Ts2Yah récapitulera la trisomie 21.

5/ Les modèles monogéniques.

Cette approche permet de déterminer si la triplication d'un seul gène peut être associée avec un ou plusieurs phénotypes de la trisomie 21. Selon les modèles, le gène inséré est soit

humain soit murin. Le modèle de surexpression de l'APP que j'ai utilisé a été développé par Hsiao et *al.* (TgAPP6209) (Hsiao et al., 1995). Le gène humain sauvage est dans un YAC sous le contrôle du promoteur prion. La lignée de souris possède 28 copies du transgène mais ne surexprime la protéine que 1.6 fois. C'est donc un bon modèle pour étudier l'APP dans la trisomie 21. Ces souris meurent précocement, ont des altérations spatiales avec une astroglie ainsi qu'une diminution de l'utilisation du glucose cérébrale.

1.3.3 Les formes sporadiques

La maladie d'Alzheimer est une pathologie multifactorielle où rentrent en compte des facteurs génétiques et environnementaux. Les formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer se développent plus tardivement à partir de 65 ans, et représentent 99% des cas.

i. La composante génétique

Les associations génétiques des dernières décennies ont détecté plus de 1000 polymorphismes dans 355 gènes potentiellement impliqués (Bertram et al., 2007) dans la maladie. Cependant, beaucoup d'études n'ont pas pu être répliquées à cause de l'hétérogénéité de la maladie dans la population. Quelques gènes et quelques voies métaboliques sont néanmoins de sérieux candidats (Tableau 1).

1/Apolipoprotéine E (ApoE) : le principal facteur de risque

ApoE est le principal transporteur cérébral du cholestérol et des phospholipides et joue un rôle important dans le métabolisme des lipoprotéines dans le cerveau. Il est également impliqué dans la croissance, et la maintenance de la myéline des membranes neuronales lors du développement et après trauma. ApoE existe sous trois isoformes E2, E3, E4 trouvées dans la population aux fréquences de 7%, 78%, et 15% respectivement (Corder et al., 1994). L'allèle ApoE4 est le principal facteur de risque dans le développement de la forme sporadique de la maladie d'Alzheimer alors que ApoE2 est relativement protecteur (Farrer et al., 1997). Ainsi chez les centenaires l'allèle ApoE2 est surreprésenté (Blanche et al., 2001). Les patients atteints de la maladie d'Alzheimer porteurs de l'allèle ApoE4 ont davantage de plaques séniles et de corps neurofibrillaires (Nagy et al., 1995) et présentent une réduction de l'arborisation dendritique (Arendt et al., 1998) et des protéines synaptiques (Tannenberg et al., 2006). Malgré tout, ApoE reste un facteur de risque et n'est pas suffisant pour promouvoir

à lui seul la maladie (Kamboh, 2004). La moitié des malades sont homozygotes pour l'allèle ApoE3 et certaines publications rapportent des cas de personnes âgées de plus de 90 ans sans trouble de la mémoire et pourtant porteurs de la double dose génique d'ApoE4 (Mayeux et al., 2001). Seuls 30% du risque génétique est imputable à ApoE, d'autres gènes sont donc impliqués.

2/ Les gènes connectés au métabolisme du cholestérol

Plusieurs études montrent que le métabolisme lipidique et particulièrement celui du cholestérol a un impact sur le développement de la pathologie. Outre ApoE, deux haplotypes du gène ABCA1 (ATP-binding cassette transporter 1) sont enrichis chez les patients Alzheimer (Chu et al., 2007; Katzov et al., 2004). Cette protéine fonctionne comme une pompe régulant l'efflux de cholestérol cellulaire. Néanmoins une autre étude ne cautionne pas cette hypothèse (Shibata et al., 2006). CYP46A1 impliqué dans le catabolisme du cholestérol aurait un polymorphisme que l'on retrouve plus fréquemment associé à la maladie (Li et al., 2006b; Ma et al., 2006). Cette étude est remise en cause par Wang et al. (Wang and Jia, 2007). CH25H et LPL (Lipoprotein lipase) dont le rôle est de réguler le métabolisme lipidique sont également des gènes candidats. L'expression de CH25H est plus ou moins augmentée dans le cerveau suivant ces polymorphismes et corrélée avec les dépôts amyloïdes (Papassotiropoulos et al., 2005). LPL est retrouvée dans les plaques séniles (Baum et al., 1999) et les polymorphismes de LPL sont associés avec la sévérité de la maladie (Scacchi et al., 2004). D'autres études contredisent ces résultats (Fidani et al., 2002; Riemenschneider et al., 2004).

3/ Les gènes du métabolisme du peptide amyloïde (voir tableau 1)

4/ La réponse inflammatoire (voir tableau 1)

Les régions génomiques montrant une forte association avec la maladie et rapportées de façon constante sont situées sur les chromosomes 12, 10, 9 et 6.

Gène	rôle	localisation	étude
ABCA1	Efflux du cholestérol	9q31.1	Katzov 2004
APOC1	Inhibiteur de la lipolyse	19q13.2	Retz 2001
APOE	Transporteur du cholestérol	19q13.2	Corder 1994
CYP46A1	Enzyme du métabolisme du cholestérol	14q32.1	Li 2006
CH25H	Inhibiteur de la transcription des enzymes de la synthèse du cholestérol	10q23	Papassotiropoulos 2005
LPL	Enzyme transportant le cholestérol	8p22	Baum 1999
ACT	Liaison avec le peptide amyloïde	14q32.1	Licastro 2003
CST3	Composant des plaques amyloïdes	20p11.21	Goddard 2003
IDE	Clive le peptide amyloïde	10q23	Bian 2004
NCSTN	Régule la production du peptide amyloïde	1q22	Confaloni 2003
SORL1	Module le trafic de l'APP	11q23.2	Rogaeva 2007
UBQLN1	Module le trafic de l'APP	9q21.2	Kamboh 2006
HLA	Protéine-clé dans la présentation de l'antigène	6p21.3	Ballerini 1999
IL-10	Cytokine anti-inflammatoire	1q31	Arosio 2004
IL-1A	Cytokine anti-inflammatoire	2q14	Grimaldi 2000
IL-6	Cytokine anti-inflammatoire	7p21	Licastro 2003
TGFβ	Cytokine contrôlant le cycle cellulaire, apoptose	19q13.2	Luedeking 2000
TNFα	Cytokine pro-inflammatoire	6p21.3	Ramos 2006

Tableau 1 : Voies potentiellement associées à un risque de maladie d'Alzheimer

Jaune : gènes connectés au métabolisme du cholestérol

Vert : gènes du métabolisme du peptide amyloïde

Rouge : gènes de l'inflammation

ii Les facteurs environnementaux

1/ L'âge, le principal facteur de risque.

Plus les individus sont âgés, plus la probabilité de développer la maladie est grande. Ainsi, la prévalence de la maladie double tous les cinq ans à partir de 65 ans. Après 85 ans, ce risque est de 50% (Evans et al., 1989).

2/ L'hypertension.

L'hypertension augmente la charge en corps neurofibrillaires et plaques séniles (Petrovitch et al., 2000). Associée également avec les angiopathies et l'athérosclérose, l'hypertension diminue le flux sanguin dans le cerveau causant des dommages neuronaux, des ischémies, l'altération de l'homéostasie calcique et du stress oxydatif (Inzitari et al., 2007).

3/ Cholestérol.

Un taux élevé en cholestérol (hypercholestérolémie) apparaît comme un facteur de risque dans la maladie (Kivipelto et al., 2001). Un régime riche en cholestérol administré à un modèle murin de la maladie d'Alzheimer augmenterait l'accumulation du peptide amyloïde (Refolo et al., 2000). L'ensemble des données sur le cholestérol sera davantage explicité dans le prochain chapitre.

4/ Le diabète.

L'insuline joue un rôle important dans la mémorisation (Watson and Craft, 2003). La dérégulation de l'insuline peut contribuer à la diminution de l'utilisation du glucose par les neurones, augmenter la phosphorylation de tau, et le stress oxydatif (Grossman, 2003). En outre, IDE (insulin degrading enzyme) une des enzymes qui dégrade le peptide amyloïde a une meilleure affinité pour l'insuline (Taubes, 2003). Enfin, les études épidémiologiques montrent une corrélation entre diabète et maladie d'Alzheimer (Breteler, 2000).

5/ L'obésité.

Indépendamment d'autres facteurs co-morbides, l'obésité est fortement associée avec la pathologie Alzheimer (Whitmer et al., 2005). Des chercheurs proposent que le tissu adipeux soit une source de cytokines et interleukines contribuant à un état chronique d'inflammation, de résistance à l'insuline, et de défauts cognitifs (Gunstad et al., 2006).

6/ Les oestrogènes.

Les femmes sont plus fréquemment atteintes que les hommes. Le rapport entre patients femmes et hommes est de l'ordre de 1.2 à 1.5 suivant les études (Gao et al., 1998). Les concentrations en oestrogènes pourraient être associées au déclin cognitif et au

développement de la maladie, confirmé par des recherches sur l'utilisation de traitements hormonaux de substitution (Fillit, 2002).

7/ Infection virale.

Les virus de l'herpès de type 1 et 6 (HSV-1, HSV-6) et le cytomégalovirus (CMV) sont plus fréquemment retrouvés chez les patients souffrant de la maladie d'Alzheimer que chez les témoins (Lin et al., 2002). De plus, il a été montré que HSV-1 pénètre dans le cerveau plus facilement si la personne possède l'allèle E4 du gène ApoE (Burgos et al., 2003). Une exposition précoce aux vaccins anti-viraux conventionnels (diphtérie, tétanos, poliomyélite, et grippe) diminue le risque de développer une maladie d'Alzheimer (Verreault et al., 2001).

8/ Les traumatismes crâniens.

Plusieurs études ont montré qu'un seul traumatisme crânien augmentait le facteur de risque de développer la maladie (Lye and Shores, 2000; Szczygielski et al., 2005). L'hypothèse la plus retenue serait une rupture de la barrière hémato-encéphalique.

9/ L'exposition aux métaux.

Le cerveau a la capacité d'accumuler les métaux, entraînant des modifications des protéines qui s'agrègent davantage. L'influence des métaux comme l'aluminium, le zinc, le cuivre, le fer ou le mercure est encore débattue (Coppede et al., 2006).

Ces différents facteurs de risque sont pour la plupart imputables à notre style de vie. Ainsi notre alimentation quotidienne influence notre taux de cholestérol ou de glucose, notre matière grasse, notre tension. Il faut également comprendre que l'obésité ou l'hypertension par exemple, que j'ai placées dans les facteurs « environnementaux », ont également une part génétique. En effet, nous ne sommes pas égaux face à la même consommation de sucre, de sel ou de graisse. Il est à noter que les facteurs convergent le plus souvent vers un processus neuro-inflammatoire qui semble être le dénominateur commun aux nombreux facteurs de risque.

Pour terminer sur un point positif, il y a également des facteurs protecteurs comme les interactions sociales, la stimulation intellectuelle, l'activité physique, les omega-3, les vitamines, les anti-inflammatoires et les statines.

1.4 L'hypothèse de la cascade amyloïde

Nous avons résumé dans les chapitres précédents tous les éléments permettant de comprendre l'hypothèse de la cascade amyloïde proposée par John Hardy en 1991 (Hardy, 1992; Hardy and Allsop, 1991) et reformulée en 2002 (Hardy and Selkoe, 2002). Celle-ci

propose que l'augmentation de la présence du peptide $A\beta_{42}$ dans le cerveau soit le facteur déclencheur qui conduit à la pathologie à travers différentes étapes (voir fig 7). Ainsi, l'activation astrocytaire, le stress oxydatif, la formation des corps neurofibrillaires, le dysfonctionnement synaptique et finalement la perte neuronale seraient un enchaînement d'événements dont l'unique raison proviendrait du déséquilibre entre la production et l'élimination du peptide amyloïde.

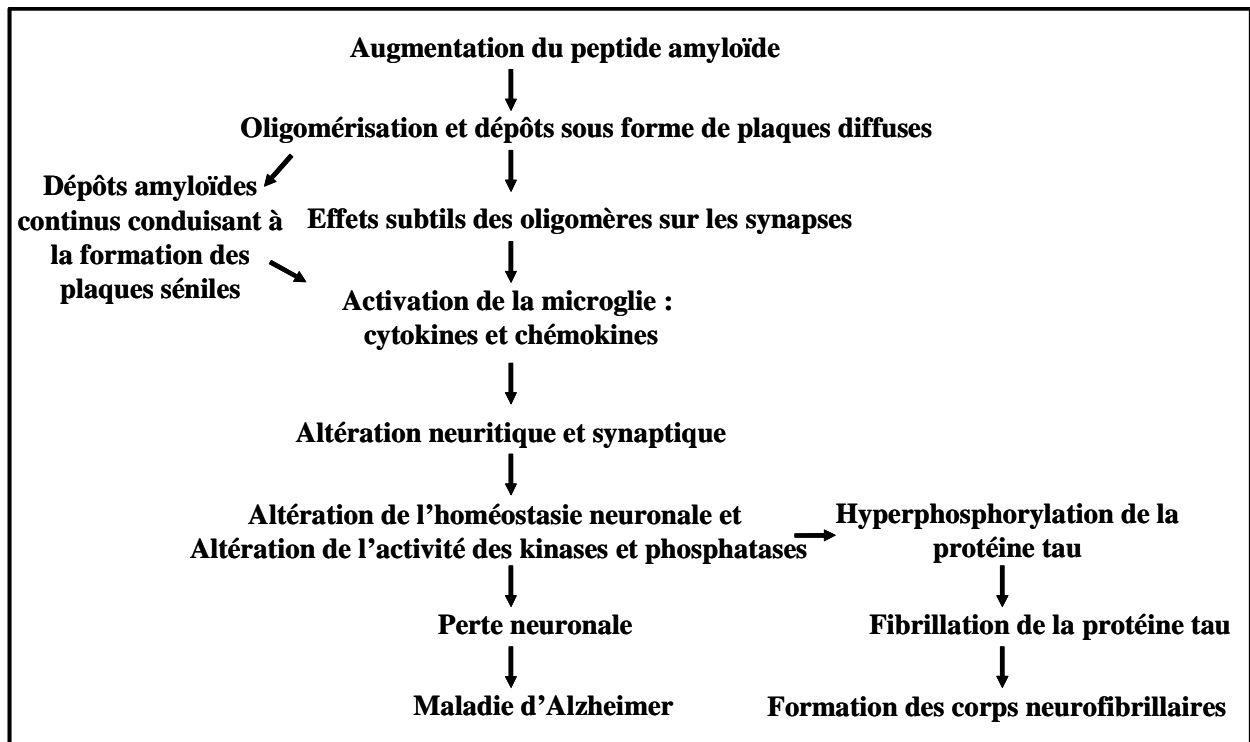


Figure 7 : Étapes de l'hypothèse de la cascade amyloïde proposée par J. Hardy (1991)

L'augmentation de la concentration du peptide amyloïde, particulièrement la forme $A\beta_{42}$, serait l'élément déclencheur causant toutes les caractéristiques pathologiques de la maladie d'Alzheimer.

Plusieurs éléments permettent d'étayer cette hypothèse :

1/ Toutes les formes génétiques pures de la maladie (mutation dans l'APP, dans les présénilines, microduplication de l'APP, trisomie 21) conduisent à une augmentation de $A\beta_{42}$ avec la présence de toutes les lésions caractéristiques de la maladie.

2/ Les mutations du gène tau causent une démence fronto-temporale caractérisée par des corps neurofibrillaires mais pas de dépôts amyloïdes. Les corps neurofibrillaires ne sont pas suffisants pour induire les plaques amyloïdes. C'est donc le changement de l'homéostasie du peptide amyloïde qui entraîne la formation des neurofibrilles et non l'inverse.

3/ Les souris transgéniques inactivées pour le gène de l'ApoE présentent une diminution du nombre de plaques séniles, arguant un lien avec ApoE, le principal facteur de risque des formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer.

4/ La variabilité des gènes impliqués dans l'élimination et le catabolisme du peptide amyloïde contribue au risque de développer la maladie.

5/ Alors que les plaques séniles ne sont effectivement pas corrélées avec le degré des défauts cognitifs, les formes solubles oligomériques du peptide amyloïde le sont.

6/ Les oligomères du peptide amyloïde sont capables d'entraîner des dysfonctionnements synaptiques dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer et dans les modèles murins.

La principale critique du modèle est la conclusion des recherches menées sur l'immunisation des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Holmes et al., 2008). Des anticorps dirigés contre le peptide $\text{A}\beta_{42}$ ont été injectés à des patients pour tenter de stopper la progression de la maladie. Des cas létaux de méningo-encéphalites sur quelques patients ont contraint à l'arrêt du traitement. Néanmoins, l'analyse post-mortem de certains cerveaux a montré une diminution drastique des plaques séniles. Malgré la disparition des plaques, le déclin cognitif des patients autopsiés a empiré au cours du traitement. Il est possible d'expliquer ces résultats par le fait que le traitement a été administré trop tardivement aux patients ou que le peptide amyloïde n'est qu'un facteur déclencheur et qu'une fois tau hyperphosphorylée la pathologie progresse inexorablement ou encore que les anticorps ciblaient les plaques séniles mais pas les oligomères du peptide amyloïde. Mais on peut également conclure que l'agent pathogène n'est pas le peptide amyloïde. Ainsi, d'autres chercheurs proposent des hypothèses alternatives.

1/ L'hypothèse de l'inhibition des présénilines. Les formes familiales de la maladie d'Alzheimer dues aux mutations des présénilines conduisent à une perte de fonction de celles-ci comme mentionné dans le paragraphe 1.2.4. Ainsi Sambamurti propose que cette perte de fonction occasionne tous les phénotypes observés dans la maladie d'Alzheimer. Les présénilines ont de nombreux substrats conduisant à une dérégulation de nombreuses voies de signalisation (Sambamurti et al., 2006). Ainsi, les souris dont l'activité γ -sécrétase est nulle présentent une atrophie hippocampale, une perte neuronale, une gliose, l'hyperphosphorylation de la protéine tau, des structures neurofibrillaires intracellulaires et des fonctions d'apprentissage et de mémorisation pratiquement abolies, cela sans présence du

peptide amyloïde. Ces résultats suggèrent que le développement de drogues inhibitrices de la γ -sécrétase ne serait pas une stratégie adéquate (Chen et al., 2008).

2/ J'ai déjà mentionné le fait qu'un des phénotypes de la maladie d'Alzheimer est l'angiopathie amyloïde. Il a été proposé que les plaques séniles soient centrées sur les vaisseaux sanguins angiopathiques (Kumar-Singh et al., 2005). Ainsi, le facteur initial serait des microhémorragies qui conduiraient à une altération de la structure de la γ -sécrétase libérant ainsi davantage d'A β 42. A β 42 irait colmater les vaisseaux sanguins et former une plaque et parallèlement, il réduirait la transmission synaptique afin de diminuer le métabolisme lors de la guérison. La formation des corps neurofibrillaires et la mort neuronale seraient la conséquence des hémorragies successives et de la privation d'oxygène plutôt que du dépôt amyloïde. Les peptides amyloïdes agiraient ici comme des boucliers contre les hémorragies cérébrales. Il est intéressant de noter que l'allèle ApoE2 est associé à la fois avec les hémorragies cérébrales (McCarron and Nicoll, 1998) et un faible dépôt amyloïde.

3/ L'hypothèse des voies parallèles. Si cette hypothèse ne remet pas en cause la cascade amyloïde dans les formes familiales de la maladie, elle propose pour les cas sporadiques un défaut moléculaire en amont qui augmenterait à la fois la présence du peptide amyloïde dans le cerveau et l'hyperphosphorylation anormale de tau (Small and Duff, 2008). Cet agent causal pourrait être ApoE, la kinase GSK3 β ou le complexe multimérique des rétromères impliqué dans le transport intracellulaire. Si cette hypothèse est récente avec peu d'éléments disponibles, elle a l'avantage de séparer les causes de la pathologie entre les formes familiales et les cas sporadiques. A l'heure actuelle aucune donnée ne permet de dire comment le peptide amyloïde serait augmenté dans les formes sporadiques. Augmentation du clivage β -sécrétase ? γ -sécrétase ? Diminution de la dégradation du peptide ? Susceptibilité à la toxicité du peptide amyloïde ? Augmentation des co-facteurs pro-agrégants ?...

Malgré certaines critiques fondées, l'hypothèse de la cascade amyloïde reste la plus solide et la plus admise par la communauté scientifique.

1.5 Un facteur de risque : le cholestérol

1.5.1 Synthèse et métabolisme du cholestérol

Le cholestérol est un lipide de la famille des stérols qui joue un rôle important dans la structure et la fonction des membranes, en particulier celle de la membrane plasmique. Il est nécessaire pour la croissance et la viabilité cellulaire et représente 20 à 25% des lipides. La

structure du cholestérol consiste en quatre cycles carbonés avec un groupe hydroxyle -OH sur le carbone 3 (Fig. 8A). Ce composé est très hydrophobe. Une dérégulation de l'homéostasie du cholestérol est un facteur de risque majeur dans de nombreuses maladies dont la maladie d'Alzheimer semble en faire partie.

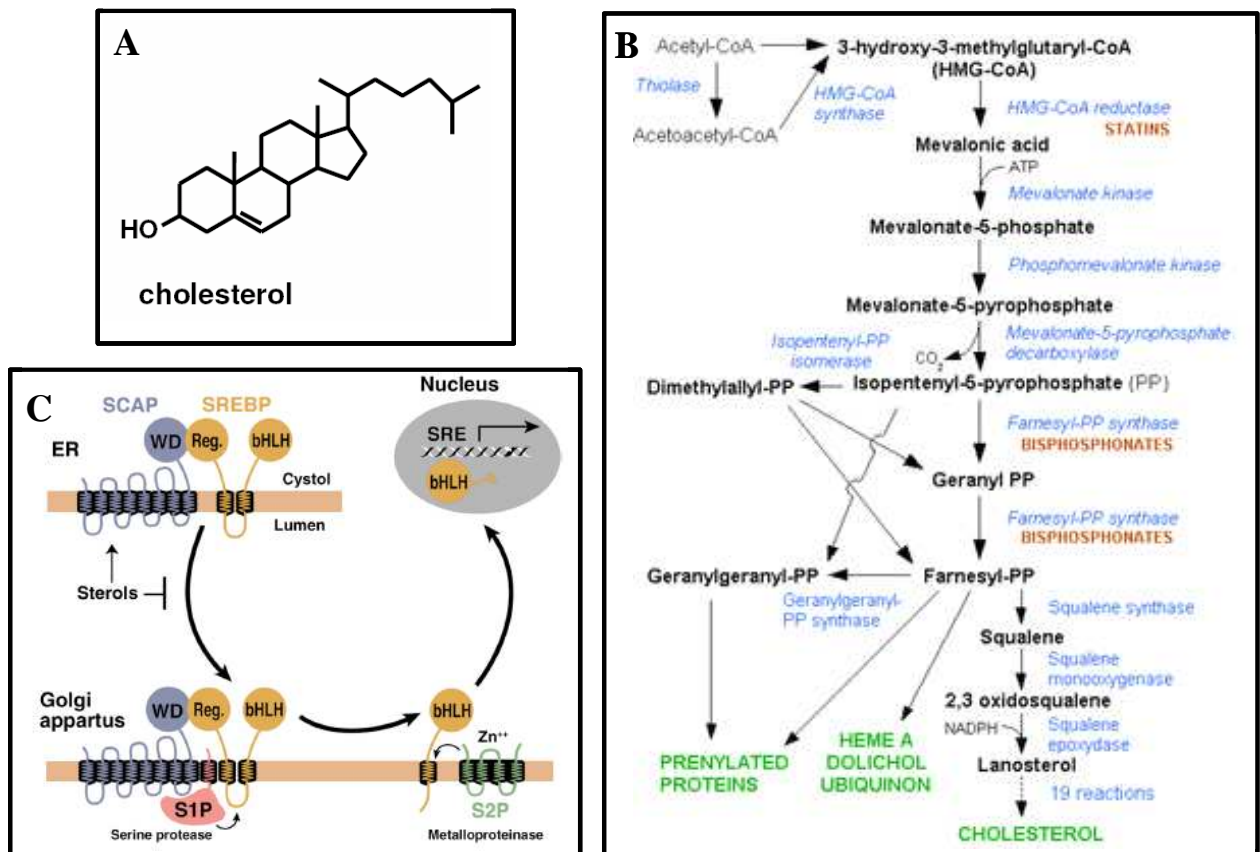


Figure 8 : Structure (A), synthèse (B) et régulation (C) du cholestérol

i. Synthèse

Le cholestérol des cellules de mammifères est issu de l'alimentation (30%) et de sa synthèse de novo (70%) principalement par le foie. Le cholestérol est synthétisé à partir de l'acétyl-CoA via la voie des mévalonates (Fig. 8B). De nombreux intermédiaires sont synthétisés et de nombreuses enzymes utilisées. L'étape limitante et finement régulée est la conversion de l'HMG-CoA en mévalonate par la HMG-CoA réductase (HMGCR). Cette enzyme et les suivantes fonctionnent dans la membrane du réticulum endoplasmique de la cellule. La diminution du cholestérol cellulaire permet au complexe SCAP/SREBP (SREBP

Cleavage-Activating Enzyme/Sterol Regulatory Element-Binding Proteins) de quitter le réticulum endoplasmique pour être transporté au golgi. SREBPs est alors clivé par deux protéases appelées S1P et S2P. Le domaine N-terminal de SREBP entre dans le noyau pour jouer son rôle de facteur de transcription activant de nombreux gènes de la voie de biosynthèse lipidique en particulier la HMG-CoA réductase (Fig8 C) (Goldstein et al., 2006).

ii. Transport

Très schématiquement (Fig. 9), le cholestérol d'origine alimentaire est transporté par les chylomicrons jusqu'au foie. Les VLDL (very low density lipoparticles) assurent le transport du foie vers les muscles et les cellules adipeuses puis les LDL (proportion élevée de cholestérol) prennent le relais pour apporter le cholestérol à tous les autres tissus. Le transport rétrograde du cholestérol des tissus vers le foie est assuré par les HDL (high density lipoparticles). Les lipoprotéines diffèrent entre elles par :

- l'importance et la nature de leur partie protéique (apolipoprotéine)
- la composition de leur fraction lipidique : plus le noyau lipidique a un diamètre important, plus elles contiennent de lipides apolaires, et plus leur densité est faible. L'hétérogénéité des lipoprotéines est détaillée dans le tableau 2.

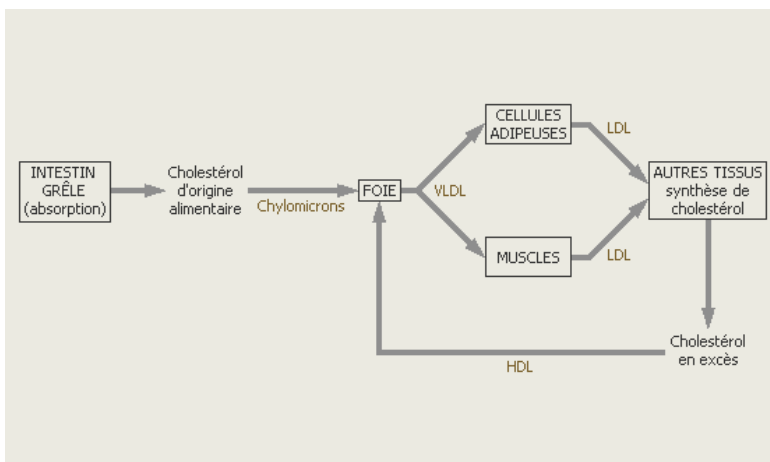


Figure 9 : Représentation schématique du trafic du cholestérol dans l'organisme

Lipoprotéine	Densité	Taille nm	% de la masse totale				Apolipoprotéines
			CT	TG	PL	Prot.	
Chylomicrons	< 0,98	200 → 50	4	90	4	2	B ₄₈ , C, E
VLDL	0,98 - 1,006	70 → 28	18	60	14	8	B ₁₀₀ , C, E
IDL	1,006 - 1,019	45 → 23	36	30	20	14	B ₁₀₀ , C, E
LDL	1,019 - 1,063	25 → 20	51	5	22	22	B ₁₀₀
HDL	1,063 - 1,121	11 → 8	23	7	25	45	A ₁ , C, E

Tableau 2 : Hétérogénéité des Lipoprotéines. Relations entre Composition en Lipides, Taille et Densité

CT : Cholestérol Total

TG : Triglycérides

PL : Phospholipides

Prot : Protéines

iii. Stockage et Elimination

L'accumulation du cholestérol libre est toxique pour la cellule (Tabas, 2002). Pour empêcher ce trop-plein, le cholestérol est converti en ester de cholestérol qui existe majoritairement sous forme de gouttelettes lipidiques cytosoliques. La conversion s'effectue par la cholestérol acyl-transférase 1 (ACAT1). A l'inverse, la libération de cholestérol à partir des esters de cholestérol se réalise par la cholestéryl ester hydrolase (CEH). La biosynthèse et l'hydrolyse ont lieu continuellement dans la cellule déterminant un équilibre cholestérol/ester de cholestérol. Notons que ACAT1 est considérée comme une cible thérapeutique de premier choix pour lutter contre l'athérosclérose (Chang et al., 2006) et également dans la maladie d'Alzheimer.

Les cellules peuvent stocker mais ne peuvent pas détruire le cholestérol. L'excès de cholestérol cellulaire doit donc être transporté vers le foie pour y être excrété. Les HDL composés des apolipoprotéines A-I et A-II transportent les esters de cholestérol vers le foie et les tissus stéroïdiens. Le foie prend en charge les HDL et élimine le cholestérol sous forme d'acides biliaires. L'efflux du cholestérol cellulaire s'effectue par deux mécanismes :

- la diffusion passive, induite par le gradient de cholestérol entre la surface cellulaire et les HDL en contact avec la membrane.
- la voie dépendante des apolipoprotéines, principalement ApoA-I (Yokoyama, 2005).

La protéine membranaire ABC1 joue un rôle essentiel dans ce processus. Sa mutation conduit à une déficience des HDL connue sous le nom de maladie de Tangier (Oram, 2002).

L'ajout d'un groupement hydroxyle sur différents résidus du cholestérol (7a, 24, 25, 27) par des hydrolases permet à ces composés (oxysterols) d'être plus hydrophiles et de diffuser à travers la membrane plasmique plus facilement que le cholestérol.

1.5.2 Localisation et trafic du cholestérol cellulaire

i. Localisation subcellulaire du cholestérol

Le cholestérol est enrichi à la membrane plasmique, où il représente 20 à 25% des molécules lipidiques. Le cholestérol est également abondant dans les endosomes et l'appareil de golgi, particulièrement dans le trans-golgi (Mukherjee et al., 1998). A l'inverse, le réticulum endoplasmique est pauvre en cholestérol, environ 1% du cholestérol cellulaire. Le cholestérol affecte plusieurs processus cellulaires en interagissant avec d'autres lipides membranaires et des protéines spécifiques. La structure du cholestérol lui confère des propriétés biophysiques particulières comme le fait d'augmenter la cohésion et le

regroupement des lipides avoisinants. Cela entraîne une diminution de la fluidité et de la perméabilité. Cette organisation latérale orchestre la spécialisation de la membrane plasmique. Même si il n’y a pas de consensus quant à la taille, la dynamique, les forces qui gouvernent ces régions, l’hypothèse des radeaux lipidiques postule une association préférentielle du cholestérol avec les sphingolipides pour former des plateformes avec des protéines affines (Simons and Ikonen, 1997). Ces microdomaines enrichis en cholestérol et en protéines serviraient pour la transduction du signal, le trafic membranaire, et l’adhésion cellulaire (Fig. 10) (Balasubramanian et al., 2007; Viola and Gupta, 2007). Les protéines des radeaux peuvent être théoriquement caractérisées biochimiquement en isolant les domaines résistants aux détergents. Cette approche est malheureusement soumise à de nombreuses critiques aux vues des nombreux protocoles existants avec l’utilisation de détergents très divers. In vivo, la taille d’un radeau est trop petit (inférieure à 100nm) pour être détecté par la microscopie conventionnelle. L’utilisation de nouvelles techniques est en plein essor comme la spectroscopie de corrélation de fluorescence qui permet d’avoir accès aux temps de diffusion des protéines dans un faible volume (Kim and Schwille, 2003).

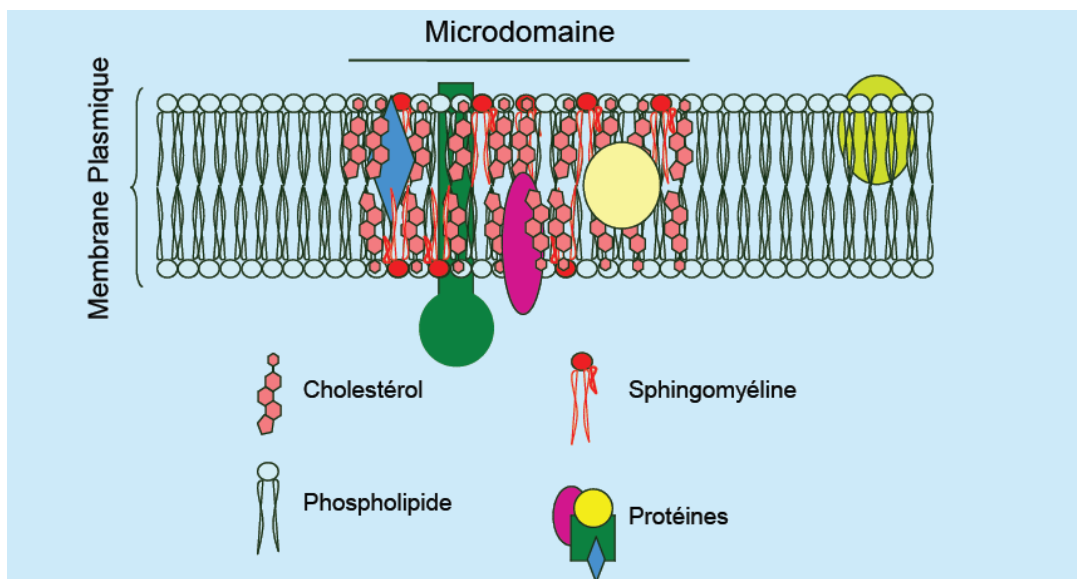


Figure 10 : Microdomaine enrichi en cholestérol et sphingomyéline appelé radeau lipidique (raft)

ii. Trafic inter- et intracellulaire du cholestérol

Les particules lipidiques sont captées par des récepteurs membranaires aux LDL appelés : LDLR. Les LDLR reconnaissent les apolipoprotéines. Après endocytose par la voie dépendante de la clathrine des lipoprotéines (voir chapitre II), et hydrolyse des esters de

cholestérol, le cholestérol libre entre dans le pool métaboliquement actif de la cellule. Cette transition nécessite la présence des protéines Niemann Pick C1 et C2 qui permettent le transfert du cholestérol en dehors du système endosomal. Leurs dysfonctionnements conduisent à une accumulation des esters de cholestérol au niveau des endosomes tardifs (Chang et al., 2005) formant des neurones « ballonnés ». Ce syndrome dit de Niemann Pick entraîne une neurodégénérescence, la présence de corps neurofibrillaires et une démence sénile.

1.5.3 Cholestérol cérébral

Le cerveau représente environ 3% du poids chez l'homme mais comprend 25% du cholestérol total du corps. Le cholestérol est principalement retrouvé sous forme estérifiée dans la myéline (70 à 80%).

Dietschy et *al.* ont calculé que la quantité de cholestérol cérébral augmentait de 1.5 à 10.6 mg quelques semaines après la naissance chez la souris et de 6 à 23 mg chez l'homme (Dietschy and Turley, 2004). Cette augmentation est due au processus de myélinisation qui a lieu après la naissance.

Plusieurs études montrent que le cholestérol du cerveau ne provient pas du cholestérol plasmatique par le transfert des HDL ou LDL à travers la barrière hémato-encéphalique. En particulier, l'élimination des récepteurs HDL ou ABCA1 chez la souris n'altère pas la concentration ni la synthèse du cholestérol dans le cerveau (Osono et al., 1995; Quan et al., 2003). Moins de 1% du cholestérol radiomarqué périphérique entre dans le cerveau (Bjorkhem, 2006). Ces résultats montrent que les lipoprotéines sont peu voire pas capables de traverser la barrière hémato-encéphalique et ne sont pas la source de cholestérol dans le cerveau.

Le renouvellement du cholestérol du cerveau est très faible, de l'ordre d'une demi-année dans le cerveau de rat (Canevari and Clark, 2007). Très peu d'échanges ont donc lieu entre le cholestérol périphérique et le cholestérol du cerveau. Ce système cloisonné implique un métabolisme propre au cerveau avec une synthèse *in situ*.

Cependant, un excès de synthèse de cholestérol dans le cerveau entraîne une augmentation de son efflux vers le plasma. Cette excrétion à travers la barrière hémato-encéphalique n'est possible que par sa conversion en 24-hydroxycholestérol par la cholestérol 24-hydroxylase (Fig. 11) (Bjorkhem et al., 1997). La suppression de cette enzyme diminue le 24-hydroxycholestérol de 75% dans le sérum et de 98% dans le cerveau. La synthèse de

cholestérol diminue de 40% alors que le taux de cholestérol cérébral n'est pas altéré (Lund et al., 2003). La cholestérol 24-hydroxylase, synthétisée par seulement 1% des cellules du cerveau (10% des neurones) est donc responsable de 40% du renouvellement du cholestérol !

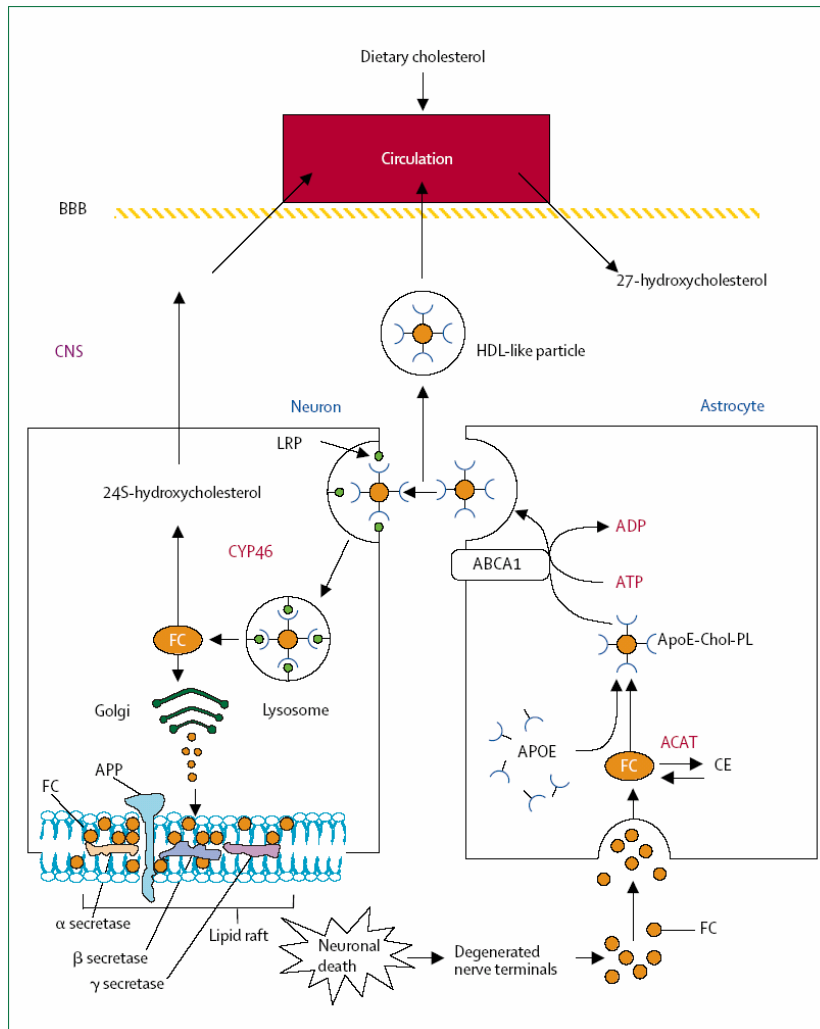


Figure 11 : Métabolisme du cholestérol intracérébral

La synthèse d'ApoE et de cholestérol se réalise dans les astrocytes. Une fois associés par l'action d'ABCA1, ils sont relargués dans le milieu extra-cellulaire sous forme de lipoprotéines et captés par le neurone grâce aux récepteurs au LDL (LRP par exemple sur le dessin). Le neurone peut désormais utiliser le cholestérol pour former par exemple des radeaux lipidiques à la membrane plasmique. L'APP, la β -sécrétase et la γ -sécrétase sont localisés dans les radeaux lipidiques. L'excès de cholestérol est transformé en 24-hydroxycholestérol, ce dernier est alors capable de traverser la barrière hémato-encéphalique pour être éliminé. (Shobab et al., 2005).

La source majeure du cholestérol cérébral est la synthèse de novo par les cellules gliales. Les neurones sont capables de synthétiser du cholestérol uniquement lors du développement embryonnaire de l'individu. Ensuite, les lipoprotéines gliales deviennent donc physiologiquement la source de cholestérol neuronal dans le système nerveux central. L'apport de cholestérol permet aux neurones de croître (Hayashi et al., 2004) et de développer leurs réseaux synaptiques (Fig. 11) (Mauch et al., 2001).

1.5.4 Taux de cholestérol chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer

ApoE est le principal facteur de risque pour développer la forme sporadique de la maladie d'Alzheimer et est le transporteur privilégié du cholestérol dans le cerveau. De nombreuses études ont donc tenté de corréler les taux de cholestérol plasmatique ou cérébral avec la pathologie. Ces données sont nombreuses et encore débattues mais il semble se dégager un consensus autour d'une augmentation de la production du peptide amyloïde liée à une surcharge en cholestérol.

i. Dans le plasma sanguin

En 2002, Kivipelto et *al.* ont reporté un lien significatif entre un taux de cholestérol plasmatique élevé et une plus grande susceptibilité de développer la maladie d'Alzheimer (Kivipelto et al., 2002). Cependant d'autres études n'ont pas pu démontrer ce lien (Mielke et al., 2005; Reitz et al., 2004). Il est donc difficile de conclure à l'heure actuelle. D'autres études ont tenté de trouver des différences dans le nombre de particules de HDL dans le sang mais, de même que pour le taux de cholestérol, les conclusions sont contradictoires et incertaines (Merched et al., 2000; Reitz et al., 2004). Aucun profil lipidique plasmatique particulier n'est pour l'instant clairement associé à la maladie d'Alzheimer. Les résultats contradictoires sont certainement le fait de la multitude de facteurs pouvant modifier le contenu lipidique sanguin comme la présence d'ApoE4, du stade de la maladie, de l'âge ou de l'alimentation du patient.

ii. Dans le cerveau

Peu d'études se sont intéressées aux concentrations de cholestérol dans le système nerveux central au cours de la maladie d'Alzheimer. Néanmoins les deux dernières études sérieuses ont mesuré une augmentation du cholestérol dans le cerveau des patients. La première (Cutler et al., 2004) montre que le cholestérol est augmenté dans le gyrus frontal chez les malades mais pas dans le cervelet (tissu non lésé lors de la maladie). Parce que le

cholestérol est enrichi dans les membranes, les auteurs les ont isolées des cerveaux de patients morts à différents stades de la maladie. Le taux de cholestérol membranaire augmente significativement au cours de la maladie. Dès le stade « modéré » le cholestérol est plus élevé que chez les contrôles, et au stade « sévère » le taux est significativement augmenté par rapport au stade « débutant ». Le taux augmente donc tout au long de la maladie. La seconde étude (Xiong et al., 2008) a détecté davantage de cholestérol dans le cerveau des patients Alzheimer par des techniques enzymatiques (Amplex red cholesterol assay kit, invitrogen), chimiques, et des marquages immunohistologiques avec la filipine (molécule fluorescente s'insérant dans les régions riches en cholestérol). Le cholestérol serait enrichi autour des plaques séniles et au niveau des neurites dystrophiques. Les auteurs proposent que l'augmentation de la rétention de cholestérol soit responsable de l'augmentation de la production du peptide amyloïde par une activité accrue des β - et γ -sécrétases.

1.5.5 Modulation du cholestérol : impact sur la maladie d'Alzheimer

i. La méthyl- β -cyclodextrine

La méthyl- β -cyclodextrine (MBCD) est une molécule utilisée pour diminuer le cholestérol de la membrane plasmique. In vitro, l'utilisation de la MBCD diminue la production du peptide amyloïde (Guardia-Laguarta et al., 2009; Kojro et al., 2001; Simons et al., 1998) dans des cultures de neurones primaires. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer cette diminution comme l'augmentation de l'activité α -sécrétase ou la perturbation des radeaux lipidiques conduisant à la baisse du clivage de l'APP et de la production du peptide amyloïde (Ehehalt et al., 2003). Une seule étude mesure une augmentation de la production du peptide amyloïde en déplaçant le cholestérol membranaire de 20% (Abad-Rodriguez et al., 2004).

ii. Les statines et les régimes hyper- et hypocholestérolémiés

Les statines (inhibiteurs de la HMG-CoA réductase) forment une classe d'hypolipémiants, utilisés comme médicaments pour baisser la cholestérolémie de personnes à risque pour les maladies cardiovasculaires présentant des taux de cholestérol élevés. Chez l'Homme, quatre études épidémiologiques ont montré une diminution de 70% environ de la prévalence de la maladie d'Alzheimer chez les patients atteints de pathologies cardiovasculaires traités par des statines. Ces résultats sont concluants pour différentes statines (lovastatine, simvastatine, pravastatine) mais pas pour des bêta-bloquants (Rockwood et al., 2002; Wolozin et al., 2000; Yaffe et al., 2002). Néanmoins, des études plus récentes

n'ont pu confirmer les premiers résultats (Shepherd et al., 2002; Li et al., 2004a; Zandi et al., 2005) exceptée la toute dernière publication qui confirme la diminution du risque de développer la maladie avec la prise de statine (Haag et al., 2009). Cette dernière étude est intéressante car elle montre que cette réduction du risque ne dépend pas de l'état lipophile des statines. En effet, certaines statines traversent la barrière hémato-encéphalique et d'autres non. L'effet des statines semble donc jouer en périphérie mais pas dans le système nerveux central. Si leur fonction première est d'abaisser les taux de cholestérol, les statines présentent des effets pléiotropes comme des actions anti-inflammatoires, anti-oxydantes (Stuve et al., 2003) et des effets secondaires comme une augmentation des HDL, une diminution des triglycérides, une altération des concentrations en apolipoprotéines plasmatiques (Waldman and Kritharides, 2003). Enfin, les statines inhibent la voie des mévalonates conduisant à la synthèse du cholestérol et des dérivés isoprénoïdes nécessaires pour la signalisation intracellulaire des petites protéines G (Fig 8B).

Les statines diminuent la production des peptides amyloïdes chez la Souris transgénique pour le gène de l'APP (Kurinami et al., 2008; Li et al., 2006a; Petanceska et al., 2002). A l'inverse, des régimes riches en cholestérol augmentent le nombre de plaques séniles (Shie et al., 2002).

In vitro, sur des lignées neuronales surexprimant l'APP, les statines augmentent l'activité α -sécrétase, diminuent la sécrétion du peptide amyloïde (Buxbaum et al., 2001; Fassbender et al., 2001) et les réponses inflammatoires (Paris et al., 2002). Les statines semblent également diminuer le cholestérol dans le feuillet externe de la membrane plasmique conduisant à une diminution de la production du peptide amyloïde (Kirsch et al., 2003). Pour expliquer cette diminution des peptides amyloïdes, les auteurs proposent une réorganisation des radeaux lipidiques entraînant une baisse de l'interaction entre l'APP et Bace1. D'autres pensent que l'effet des statines passe par l'inhibition du processus d'isoprénylation conduisant à l'accumulation de l'APP vers le protéasome pour y être dégradé sans production du peptide amyloïde (Ostrowski et al., 2007).

iii. Acylcoenzyme A cholesterol acyltransferase (ACAT)

Il n'est pas nécessaire de modifier la concentration en cholestérol pour déréguler la production du peptide amyloïde, une simple redistribution du cholestérol dans la cellule est suffisante pour altérer le clivage de l'APP. ACAT est une enzyme qui génère des esters de

cholestérol à partir du cholestérol libre. Une inhibition de cette enzyme réduit la pathologie amyloïde (production infime du peptide amyloïde) et améliore les performances cognitives chez la Souris (Hutter-Paier et al., 2004). L'inhibition de l'ACAT engendrerait un nouveau clivage de l'APP stérol-dépendant supprimant ainsi la possibilité d'un β -clivage et la sécrétion du peptide amyloïde (Huttunen et al., 2009). De nombreux inhibiteurs pharmacologiques ont été développés pour être testés dans la maladie d'Alzheimer (Puglielli et al., 2004).

iv. la cholestérol 24-hydroxylase

La cholestérol 24-hydroxylase codée par le gène CYP46A1 permet de convertir le cholestérol en 24S-hydroxycholestérol afin d'être exporté dans la circulation sanguine. Une surexpression de la cholestérol 24-hydroxylase diminue la quantité de peptide amyloïde, des plaques séniles et améliore les performances cognitives des souris. Le mécanisme mis en jeu est encore mal connu mais passerait par la diminution de l'activité γ -sécrétase. A l'inverse, l'inhibition de la cholestérol 24-hydroxylase augmente la production de peptides détectée dans le cerveau de souris. Une relation directe avec les taux de cholestérol dans le cerveau pourrait être envisagée pour expliquer ces résultats (Hudry et al., manuscrit sous presse, en collaboration dans l'ANR choAD).

Récemment, il a été montré que le croisement de souris inactivées pour le gène de la cholestérol 24-hydroxylase avec un modèle murin de la maladie d'Alzheimer n'affecte pas le dépôt amyloïde. Globalement, le taux de cholestérol cérébral n'est pas différent entre ces souris et les contrôles mais le taux d'excrétion diminue de 50%, compensé par une diminution de 50% de la synthèse de novo de cholestérol. Les auteurs concluent que réduire la synthèse de novo du cholestérol dans le cerveau n'altère pas la progression de la maladie et augmente même la longévité de ces souris (Halford and Russell, 2009).

v. Seladin-1

La seladin (SElective AD INdicator-1) est un gène identifié lors d'une comparaison des ARNm exprimés entre des régions vulnérables (hippocampe, cortex entorhinal) et des régions saines de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Greeve et al., 2000). L'expression de la seladin est très diminuée dans les tissus cérébraux touchés par la pathologie. La seladin a plusieurs rôles dont celui de convertir le desmostrérol en cholestérol

par son activité 3- β -hydroxysterol Δ -24-reductase. La surexpression de la seladin augmente le cholestérol cérébral chez la Souris et en parallèle augmente la résistance à la toxicité des peptides amyloïdes (Cecchi et al., 2008). L'inactivation du gène de la seladin conduit à une augmentation de la voie amyloïdogénique suite à une diminution du cholestérol. Ces résultats qui tendent à montrer un effet protecteur d'un excès de cholestérol est à remettre en perspective avec les nombreux rôles attribués à la seladin (Peri and Serio, 2008), par exemple dans l'apoptose (inhibe l'activation de la caspase-3), la neurogénèse, comme régulateur de facteur de croissance (le facteur de croissance à l'insuline par exemple) et d'hormones (hormone thyroïdienne). En outre, certaines données montrent que le cholestérol est nécessaire à la fois pour engendrer la toxicité des peptides amyloïdes et leur adhésion sur les surfaces membranaires des cellules (Subasinghe et al., 2003).

1.5.6 Apoe

Les lipoprotéines contenant l'ApoE sont produites par les astrocytes et délivrent les lipides essentiels aux neurones par leurs interactions avec les LDLR. La nature des mécanismes qui rend plus pathogénique ApoE4 est mal connue mais plusieurs voies ont récemment été identifiées *in vitro* et *in vivo*.

1/ ApoE et cholestérol.

ApoE4 semble être un moins bon transporteur du cholestérol que ApoE3 (Rapp et al., 2006). ApoE4 est moins efficace pour promouvoir l'efflux de cholestérol des neurones et des astrocytes (Michikawa et al., 2000).

Les souris transgéniques ApoE4 humaine dépendante de l'activité endogène du promoteur d'ApoE (souris « knock-in ») présentent une augmentation du cholestérol sur le feuillet externe de la membrane plasmique (Hayashi et al., 2002) par rapport au Knock-in ApoE3

2/ ApoE et APP.

LRP1, un récepteur d'ApoE peut également interagir avec l'APP et moduler son trafic (augmentation de l'endocytose de l'APP) et la production du peptide amyloïde (Fig 17) (Kounnas et al., 1995). Trois autres récepteurs sont capables d'interagir à la fois avec ApoE et l'APP : LRP1B (leur interaction contribue à diminuer la production du peptide amyloïde) (Cam et al., 2004), APOER2 (rôle ambiguë), et SORLA. L'expression de ce dernier est réduite chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer et sa surexpression dans les neurones induit une redistribution de l'APP dans le compartiment golgien conduisant à une

diminution de la production du peptide amyloïde (Fig 17) (Andersen et al., 2005). Le rôle d'ApoE reste inconnu sur la régulation de SORLA.

3/ ApoE et le peptide amyloïde.

Le peptide amyloïde est capable de se fixer à ApoE. Ce complexe se fixe au LDLR et entre dans la cellule, le peptide amyloïde est alors dégradé par les endopeptidases. La fixation du peptide amyloïde sur la région C-terminale d'ApoE empêche la fixation des lipides (Tamamizu-Kato et al., 2008). ApoE3 lie avec une plus forte affinité le peptide amyloïde et le dégrade davantage que ApoE4 (LaDu et al., 1994).

L'expression des enzymes de dégradation du peptide amyloïde comme la neprilysine et l'insulin-degrading enzyme sont significativement réduites chez les porteurs de l'allèle ApoE4.

4/ ApoE et neurotoxicité

ApoE4 augmente les formes oligomériques toxiques du peptide amyloïde dans une plus grande proportion que ApoE3 (Manelli et al., 2007). Il semblerait que les oligomères et ApoE4 agissent de manière synergique pour promouvoir la neurodégénérescence dans le cerveau des souris (Belinson et al., 2008).

5/ ApoE et tau

La surexpression d'ApoE4 dans les neurones augmente la phosphorylation de tau chez la Souris (Brecht et al., 2004). Cette donnée est à prendre avec précaution puisque les neurones ne synthétisent pas d'ApoE. De plus tau et ApoE ne sont pas dans les mêmes compartiments, leur interaction est donc soumise à interrogation.

La figure 12 récapitule les multiples voies qui pourraient expliquer la nature pathogène d'ApoE4 par rapport à ApoE3.

1.5.7 Conclusions

L'ensemble des données épidémiologiques, génétiques, in vitro et in vivo, indique clairement un lien entre le métabolisme du cholestérol et la pathologie. Deux écoles s'affrontent sur le rôle protecteur ou néfaste du cholestérol. Il est certain que le cholestérol est un composé essentiel de la cellule, une augmentation ou une déplétion trop importante entraînera à coup sûr une dérégulation des voies vitales de la cellule. Comme la maladie d'Alzheimer s'étend sur des dizaines d'années, les dérégulations sont donc dans un premier temps de faibles ampleurs mais chroniques. Quel est l'impact d'une faible augmentation du cholestérol à la membrane plasmique sur la production du peptide amyloïde ? Ou d'une

mauvaise répartition intracellulaire du cholestérol ? Ces questions seront abordées dans la troisième partie de l'introduction.

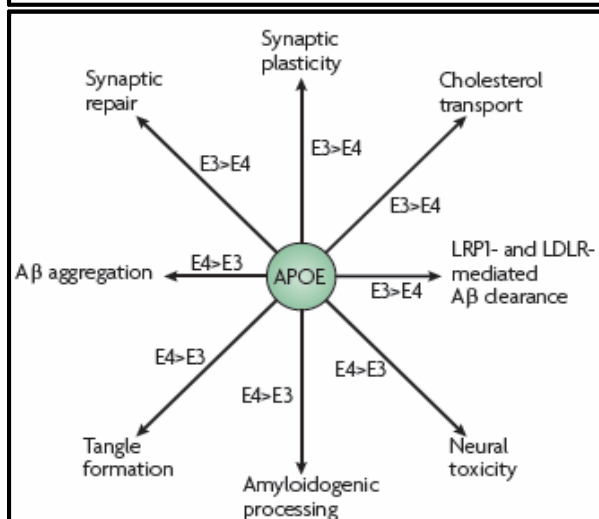
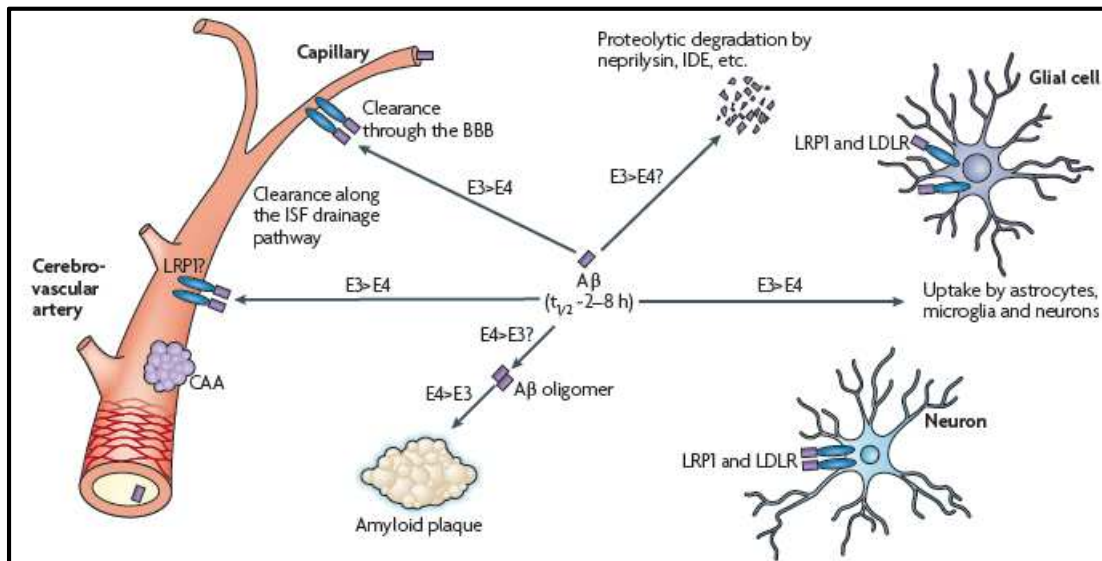


Figure 12 : Rôle des isoformes d'ApoE dans la pathologie Alzheimer (Bu, 2009)

2. Les endosomes précoces : formation, trafic, dérégulation

2.1 Définition

L'internalisation est définie comme l'ensemble des mécanismes permettant à la cellule d'ingérer des éléments extérieurs (molécules, protéines, particules, autres cellules). Elle comprend trois phénomènes : la phagocytose (« cellule qui mange »), la pinocytose (« cellule qui boit ») et l'endocytose (Fig 13). La phagocytose permet l'ingestion de grosses particules et d'autres cellules. Bien qu'elle soit présente dans beaucoup de types cellulaires, elle est avant tout importante dans les cellules spécialisées comme les macrophages et possède un rôle dans la construction de l'immunité cellulaire. La pinocytose et la macropinocytose sont des moyens pour la cellule d'absorber des solutés du milieu environnant de manière aspécifique. L'endocytose permet d'internaliser à la fois les molécules fixées sur leur récepteur spécifique et les protéines membranaires.

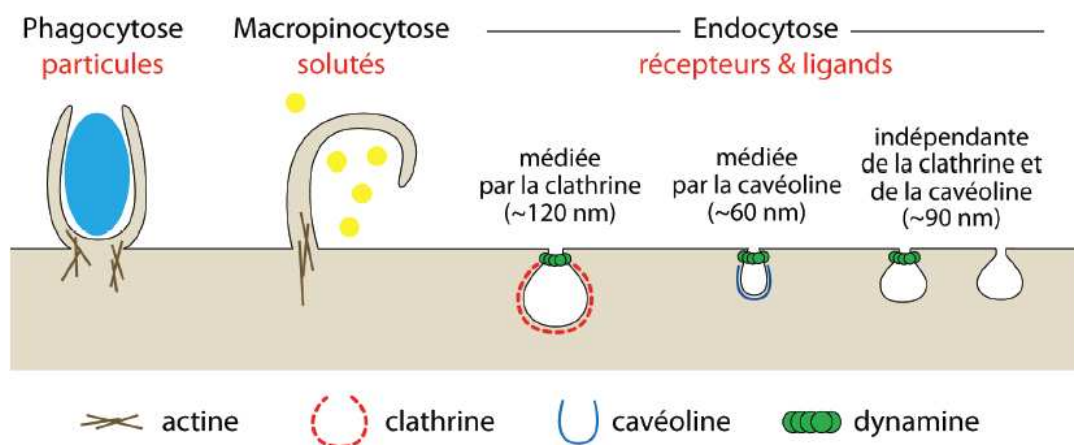


Figure 13 : Types d'internalisation cellulaire

Les cellules possèdent plusieurs moyens pour intégrer des particules ou des solutés. La phagocytose permet l'ingestion de grosses particules ($>1\mu\text{m}$), tandis que la pinocytose/macropinocytose permet d'englober un volume de liquide extracellulaire grâce à des extensions de la membrane. L'endocytose par des récepteurs permet l'entrée de ligands, de récepteurs et de protéines membranaires, et peut se faire grâce à des puits recouverts de clathrine, des cavéolines ou des mécanismes indépendants de la clathrine et de la cavéoline. D'après Conner and Schmid, 2003.

Après l'endocytose, les vésicules formées fusionnent avec les endosomes précoces. Ces endosomes précoces possèdent une identité moléculaire et fonctionnelle qui les distingue des autres types d'endosomes (endosomes tardifs, endosomes de recyclage).

Voici les principales caractéristiques morphologiques et moléculaires des endosomes précoces :

- Ce sont des compartiments vacuolaires localisés près de la surface de la membrane plasmique
- Ils sont immunomarqués sélectivement par des anticorps dirigés contre la protéine GTPase Rab5 (Ras-related GTP binding protein 5) ou EEA1 (Early Endosomal Antigen 1). Nous discuterons dans la partie 2.3.2 du rôle de ces protéines. A l'inverse, les protéines spécifiques d'autres compartiments comme MP-R215 (endosome tardif) ou LAMP-2 (lysosome) ne sont pas des marqueurs des endosomes précoces.
- Ils ne contiennent pas de pigment comme la lipofuscine (pigment cellulaire composé de débris de molécules apparaissant dans les cellules des personnes âgées)
- Ils peuvent contenir des hydrolases acides. Les endosomes précoces ont un pH acide de l'ordre de 5
- Ils ont une taille comprise entre 100 et 250nm de diamètre.

2.2 Formation des endosomes précoces

2.2.1 Les différents types d'endocytose

Les vésicules recouvertes de « manteau de soie » (Bristle-coated vesicles) ont été observées pour la première fois en 1964, mais c'est une décennie plus tard que la clathrine fut purifiée après l'isolement des vésicules (Pearse, 1976). L'endocytose dépendante de la clathrine constitue la voie majeure d'internalisation des récepteurs chez les eukaryotes.

L'existence d'autres mécanismes d'endocytose a été très débattue dans les années 80 et il a fallu du temps pour accepter le fait que cette voie n'internalisait pas toutes les protéines membranaires (Doxsey et al., 1987). Le fait que la toxine du ricin continue à être internalisée après l'inhibition de l'endocytose dépendante de la clathrine (choc hypotonique, déplétion du potassium cytosolique) était difficile à accepter pour une partie de la communauté scientifique. Avec l'avènement de la biologie moléculaire, la complexité de l'endocytose commença à devenir apparente aux investigateurs. Désormais, nous savons que des endocytoses indépendantes de la clathrine existent et qu'elles sont également finement régulées. Mayor et Pagano ont récemment subdivisé les différentes voies d'endocytose indépendante de la clathrine en quatre types : régulé par RhoA, régulé par cdc42, dépendant de Arf6, et dépendante de la cavéoline-1 (Mayor and Pagano, 2007). Seule, cette dernière sera détaillée dans le chapitre suivant.

2.2.2 Les mécanismes moléculaires de l'endocytose

i. dépendante de la clathrine

L'endocytose par la voie dépendante de la clathrine débute par le regroupement des récepteurs et de leur cargaison à la membrane plasmique et la formation d'une structure complexe, le puits recouvert de clathrine. Après invagination, il y a scission et démantèlement du manteau de clathrine pour libérer la vésicule d'endocytose (Fig 14C).

1/ Nucléation des structures des « puits recouverts de clathrine ».

La première étape est la reconnaissance du principal phosphoinositide de la membrane plasmique : le phosphatidylinositol (4, 5) bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂) par l'adaptateur AP-2. AP-2 est constitué de quatre sous-unités α , β , μ 2 et δ 2 formant des hétérotétramères avec une « tête » et « deux oreilles » (conformation dite « en tête de Mickey », Fig 14B). AP-2 interagit à la fois avec le récepteur chargé de sa cargaison (par les motifs protéiques YXX ϕ ou [D/E]XXXL[L/I], ou FXNPXY), et les PtdIns(4,5)P₂, conduisant à une forte association entre AP-2 et la membrane plasmique (Honing et al., 2005). AP-2 a donc une position centrale et cruciale. Son inactivation est létale chez les Insectes, le Ver et la Souris et la diminution de son expression élimine 90% de l'endocytose dépendante de la clathrine. Néanmoins, l'endocytose des LDLR dépendante de la clathrine par exemple, persiste, suggérant un processus indépendant de AP-2 (Motley et al., 2003). AP-2 va dès lors pouvoir lier la clathrine et une multitude de protéines associées comme AP180/CALM, l'epsine, et Eps15. La clathrine est une protéine organisée en hexamère de 650 kDa et constituée de trois sous-unités légères et trois sous-unités lourdes s'assemblant en une structure en forme de triskèle (Fig 14A). La clathrine est capable de polymériser pour former un maillage rigide en nid d'abeilles autour d'une vésicule d'endocytose. AP180/CALM, l'epsine, et Eps15 lient AP-2 alors que seules les deux premières sont capables de lier la clathrine. AP180/CALM et l'epsine interagissent également avec les PtdIns(4,5)P₂ et sont impliqués dans la polymérisation de la clathrine (Ford et al., 2001).

2/ Invagination de la membrane plasmique.

L'enrichissement de certains lipides (phosphoinositide, cholestérol) dans le feuillet interne de la membrane plasmique, les protéines impliquées dans l'endocytose et les forces exercées par le cytosquelette paraissent importantes pour incurver la membrane plasmique (Gallop and McMahon, 2005). Ainsi, la présence de clathrine est essentielle pour l'invagination des protéines à internaliser (Hinrichsen et al., 2006) mais la présence de celle-ci et d'AP-2 ne sont néanmoins pas suffisantes. L'epsine insère une hélice amphipatique dans

la membrane plasmique, et *in vitro*, sa surexpression forme des réseaux tubulaires membranaires dépendants de la présence de PtdIns(4,5)P₂ (Ford et al., 2001). Par ailleurs, la déphosphorylation des PtdIns(4,5)P₂ par la synaptojanine-1 (recrutée par la clathrine lors du bourgeonnement de la vésicule) réduirait l'interaction d'AP-2 avec la membrane, permettant ainsi l'invagination. Des résultats suggèrent que d'autres protéines avec un domaine protéique EFC/F-BAR possèderaient d'importantes propriétés pour invaginer la membrane plasmique et seraient requises pour l'endocytose dépendante de la clathrine (Itoh et al., 2005). Enfin, l'actine serait également impliquée dans le mouvement endocytique (Merrifield et al., 2005).

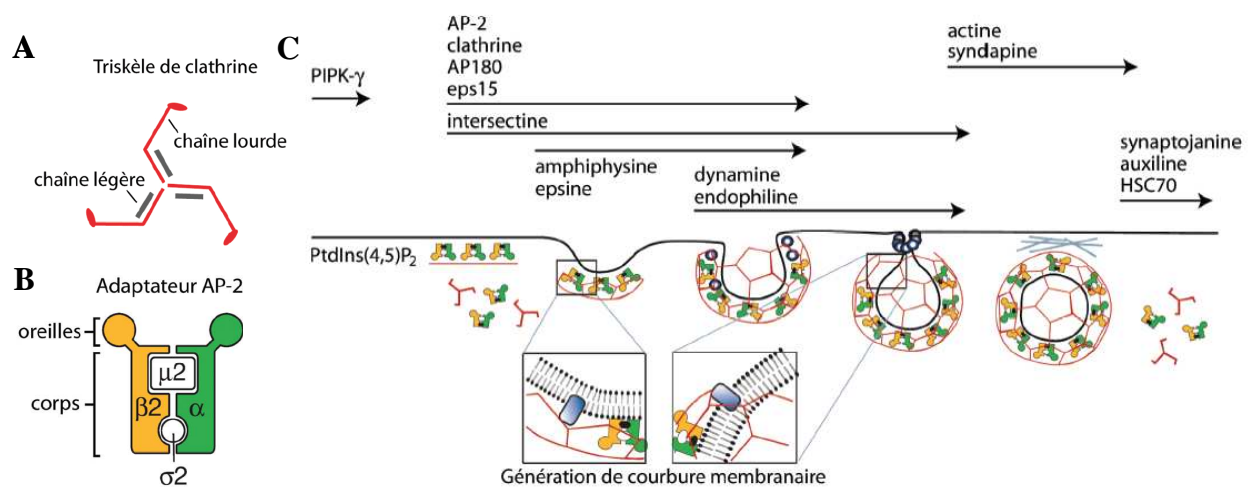


Figure 14 : Mécanismes de l'endocytose médiée par la clathrine

La clathrine (A) est un triskèle composé de deux fois trois sous-unités, qui interagit avec l'adaptateur AP-2 constitué de quatre sous-unités (B). (C) Chronologie de l'implication de ces protéines ainsi que d'autres partenaires lors de la formation d'un puits recouvert de clathrine, puis d'une vésicule d'endocytose. D'après Conner and Schmid, 2003.

3/ Fission et dissociation du manteau

Après l'invagination, la dynamine est recrutée au niveau du goulot pour créer une fission nécessaire à la libération de la vésicule. Lors de ce processus, de nombreuses autres protéines sont présentes sur le puits recouvert de clathrine. Ainsi, la myosine VI s'attache à Dab2 et au PtdIns(4,5)P₂ (Spudich et al., 2007) alors que la myosine 1E se lie à la dynamine et à la synaptojanine-1 (Krendel et al., 2007). Ces complexes permettent à l'actine de fixer la myosine pour appliquer une force sur l'anneau de dynamine et couper la membrane plasmique et également pour « tirer » la vésicule vers le domaine cytosolique (Roux et al., 2006).

Le démantèlement du manteau de clathrine entourant la vésicule semble avoir lieu après la déphosphorylation des PtdIns(4,5)P₂ en PtdIns-4P par la synaptojanine-1. L'augmentation des

PtdIns-4P permettrait de recruter la protéine GAK/auxilin qui jouerait un rôle dans la dépolymérisation du réseau de clathrine (Sever et al., 2006).

De nombreux récepteurs sont internalisés par la voie dépendante de la clathrine, les plus étudiés étant les récepteurs à la transferrine et à l'EGF (epithelial growth factor). L'APP est également endocyté par cette voie.

Ajoutons qu'il existe des relations étroites entre les protéines de l'endocytose et la signalisation intracellulaire. Ainsi, la β -arrestine a un domaine de liaison d'un côté pour la clathrine, AP-2, les phosphoinositides et les récepteurs couplés aux protéines G et de l'autre pour des composants de la voie des MAP kinases (Shenoy and Lefkowitz, 2003). Autre exemple : l'activation de la voie MAP kinase dépend de l'endocytose du récepteur à l'EGF (Vieira et al., 1996). En outre, les variations de phosphorylation et d'ubiquitination sont importantes pour réguler l'endocytose dépendante de la clathrine. Les kinases responsables de la maintenance de la phosphorylation de la dynamine, AP180/CALM, ou la synaptojanine-1 sont entre autres, la protéine kinase C et la caséine kinase II dans les neurones.

Même si l'endocytose dépendante de la clathrine commence à être bien disséquée sur le plan moléculaire, la dynamique, les interactions et les régulations doivent encore être étudiées.

ii. dépendante de la cavéoline-1

Les cavéoles sont plus petites (50 à 100nm) que les vésicules de clathrine (120nm) et plus régulières, plus lisses d'après les clichés obtenus par microscopie électronique. Cette voie d'entrée dans la cellule est particulièrement utilisée par les virus (SV40, echovirus 1, polyomavirus) (Pelkmans et al., 2002). La composition lipidique est très importante pour la dynamique cavéolaire. Ainsi, l'augmentation des glycosphingolipides, du ganglioside GM1 (le récepteur de SV40) ou du cholestérol accroît l'endocytose dépendante de la cavéoline-1 (Sharma et al., 2004). Le rôle de la cavéoline est mal compris puisque sa surexpression occasionne une diminution (Le et al., 2002) ou une augmentation (Cheng et al., 2006) de l'endocytose suivant les types cellulaires. Néanmoins, la cavéoline-1 est enrichie dans les cavéoles avec 100 à 200 molécules par cavéole (Pelkmans et al., 2005) et est capable de lier le cholestérol et les acides gras (Monier et al., 1996). L'équilibre entre lipides membranaires et cavéoline semble donc important pour la formation des cavéoles. L'inhibition des phosphatases, le stress oxydatif, la chaleur, et les chocs hyperosmotiques induisent l'internalisation des cavéoles (Parton et al., 1994).

La régulation de l'internalisation des cavéoles est complexe et reste encore peu comprise. Plusieurs études mettent en avant le rôle fondamental de la dynamine comme régulateur des premières étapes de l'endocytose (Henley et al., 1998). Une diminution de la synthèse protéique de la dynamine inhibe l'internalisation de SV40 (Pelkmans et al., 2002). L'intersectine (une protéine impliquée dans l'endocytose dépendante de la clathrine) est localisée à la base de la cavéole en cours d'invagination et interagit avec la dynamine, suggérant un rôle dans la fission des cavéoles (Predescu et al., 2003). Une étude globale sur l'expression de 590 kinases montre que 19% d'entre elles affectent l'infection par SV40 (Pelkmans et al., 2005).

L'actine jouerait également un rôle important dans la formation des cavéoles et/ou leur internalisation. Ainsi, la polymérisation ou la dépolymérisation corrèle respectivement avec une diminution ou une augmentation de l'endocytose de SV40 (Pelkmans et al., 2005).

Enfin des mécanismes de phosphorylation de la cavéoline-1 sur le résidu tyrosine 14 augmentent la formation des cavéoles (Lee et al., 2006).

Ajoutons qu'il semble que la plupart des structures cavéolaires ne subissent pas de scission et qu'elles restent connectées à la membrane plasmique (Parton et al., 2002). Même les larges cavéoles éloignées de la membrane plasmique seraient encore reliées à la membrane (Sandvig et al., 2008). Pour réconcilier les données de ce chapitre, les spécialistes de l'endocytose proposent que les cavéoles ne soient effectivement pas endocytées mais que la cavéoline-1 reste associée à l'endocytose indépendante de la clathrine (par une autre voie ?) et soit présente dans les endosomes précoces.

De nombreuses questions restent donc en suspens comme la fonction biologique des différentes voies d'endocytoses indépendantes de la clathrine, leurs régulations, les protéines associées ? Etc...

2.3 Formation et devenir des endosomes précoces

Une fois les vésicules d'endocytose formées, elles fusionnent avec les structures endosomales. Les cargaisons et leurs récepteurs sont transportés au sein de ce système par le biais de fissions et de fusions vésiculaires successives. On ne développera pas ici les mécanismes moléculaires permettant la fusion physique des bicouches lipidiques, qui font intervenir des complexes de protéines transmembranaires appelées SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment protein REceptor). Le chapitre suivant s'intéressera au maintien de l'identité moléculaire des différents compartiments cellulaires par la présence de la superfamille des petites protéines G.

2.3.1 Déterminants moléculaires

La superfamille des petites protéines G contient plus de 100 membres qui sont généralement classés selon leur similarité de structure en 5 sous-familles : les Ras GTPases (Ras, Rap, Ral par exemple), les Rho GTPases (Rho, Rac, cdc42), les Arf GTPases (Arf1 à 6, Arl1 à 7, Sar), les Rab GTPases (plus de 60 membres) et les Ran GTPases. Ces protéines sont toutes monomériques avec une masse comprise entre 20 et 30 kDa. De manière générale, les Ras GTPases régulent la signalisation intracellulaire qui conduit à la modification de la transcription des gènes ; les Rho GTPases fonctionnent comme des régulateurs du cytosquelette, en particulier de l'actine ; les Rab et Arf GTPases contrôlent la formation, la fusion et le mouvement du trafic vésiculaire entre les différents compartiments membranaires de la cellule ; et les Ran GTPases régulent à la fois l'organisation des microtubules et le transport protéique nucléocytoplasmique. Toutes ces GTPases fonctionnent comme des interrupteurs moléculaires qui contrôlent les fonctions cellulaires cyclant entre deux formes interconvertibles : une forme inactive liée au GDP et une forme active liée au GTP (Bos, 1998).

Nous allons nous intéresser plus particulièrement à la famille des Rabs GTPases (Ras-related GTP binding protein) qui s'associent de manière spécifique à certains compartiments. L'état inactif (lié au GDP) est soluble et cytosolique, tandis que l'état actif (lié au GTP) est lié aux membranes. Comme la liaison entre les GTPases et les membranes dépend de l'activité GTPase, les vésicules peuvent échanger rapidement les GTPases qui leur sont associées et ainsi traverser différents compartiments identifiés (Rink et al., 2005). Il existe une soixantaine de Rab chez les mammifères, et beaucoup ont un rôle dans le transport intracellulaire, en association avec des organelles spécifiques. L'ancrage à la membrane se fait grâce à des résidus prénylés situés au niveau de la queue carboxyterminale. Lorsqu'elles sont inactives, les protéines Rab sont liées au GDP et forment un complexe cytosolique avec une protéine appelée « Inhibiteur de la Dissociation du GDP » (GDI). Le GDI masque les groupes prénylés et empêche l'association aux membranes. D'autres protéines appelées « Facteurs de Déplacement du GDI » (GDF) catalysent la dissociation du complexe Rab-GDI, permettant l'insertion des groupes prénylés dans la membrane (Pfeffer and Aivazian, 2004). Une fois ancrée dans la membrane, la protéine Rab est activée par remplacement du GDP en GTP, favorisé par un « Facteur d'Echange du nucléotide Guanine » (GEF). La protéine Rab ainsi activée peut interagir avec ses effecteurs. L'activité GTPase intrinsèque des protéines Rab est

en général très faible, et l'intervention d'une « Protéine Activatrice des GTPases » (GAP) qui stimule l'hydrolyse du GTP est nécessaire. La protéine Rab redevenue inactive est alors retirée de la membrane par les GDI libres du cytosol (Fig 15). Des protéines Rab différentes sont présentes à la surface des différentes organelles, participant à la définition de leur identité moléculaire et fonctionnelle (Zerial and McBride, 2001). Le mécanisme gouvernant la spécificité de la présence des Rabs actives sur certaines organelles est peu connu, mais il est probable qu'il fasse intervenir le ciblage dû aux différences entre les Rab elles-mêmes au niveau des domaines hypervariables (Chavrier et al., 1991) ainsi que la distribution différentielle des différents GDF et GEF (Pfeffer, 2005). Dans le système endosomal, les Rabs les mieux caractérisées sont Rab5, Rab4, Rab11, Rab7 et Rab9.

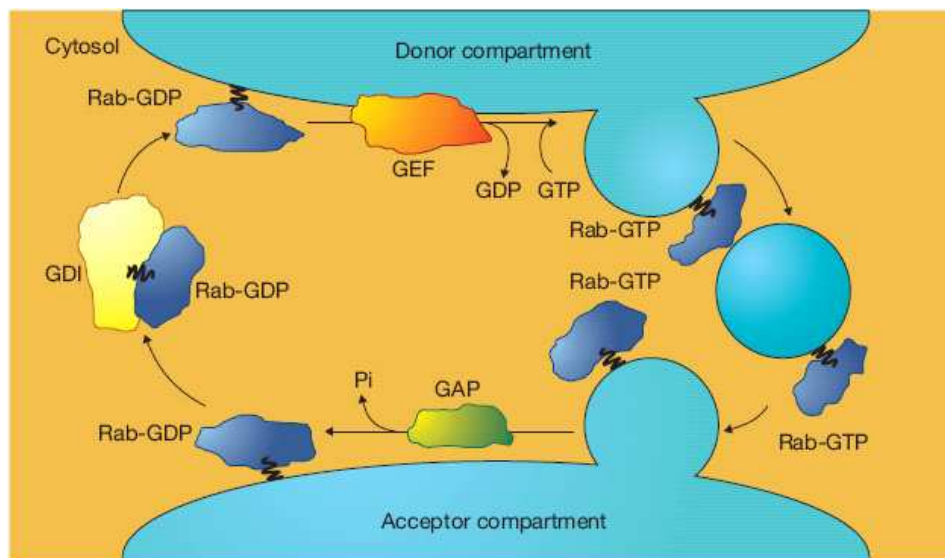


Figure 15 : Mécanismes de l'action des GTPases Rab

Les protéines Rab possèdent un résidu prénylé qui est masqué à l'état inactif (lié au GDP) par un « Inhibiteur de la Dissociation du GDP » (GDI). Sous l'action d'un « Facteur de Déplacement du GDI » (GDF), la Rab est libérée du GDI et s'accroche aux membranes (en haut). Le « Facteur d'Echange du nucléotide Guanine » (GEF) peut dès lors favoriser le remplacement du GDP par du GTP, activant la Rab qui interagit avec ses effecteurs (à droite). Le GTP est finalement hydrolysé avec l'aide d'une « Protéine Activatrice des GTPases » (GAP), ce qui inactive la Rab qui est ensuite retirée de la membrane par le GDI cytosolique (en bas).

2.3.2 Marqueurs des endosomes précoces

Rab5 est localisé à la membrane plasmique, sur les vésicules d'endocytose dépendant de la clathrine et est un marqueur des endosomes précoces (Fig 16). Rab5 est nécessaire pour

la fusion des endosomes in vitro (Gorvel et al., 1991). In vitro, l'expression de la protéine sauvage stimule l'internalisation dépendante de la clathrine, et cause l'élargissement des endosomes précoces (Bucci et al., 1992). De plus, l'expression du mutant dominant-positif constitutivement actif Rab5-Q79L, qui présente une diminution de son activité GTPase intrinsèque, augmente l'internalisation de la transferrine, stimule la fusion des endosomes précoces, et cause de très larges endosomes non conventionnels. A l'inverse le mutant dominant-négatif Rab5-S34N, qui lie préférentiellement le GDP, induit l'accumulation de très petites vésicules d'endocytose et inhibe de manière significative l'endocytose du récepteur à la transferrine (Stenmark et al., 1994).

Rab5 est capable de recruter de nombreuses protéines accessoires comme le facteur de fusion endosomal EEA1 (Early Endosomal Antigen 1) (Simonsen et al., 1998) qui est considéré également comme un marqueur des endosomes précoces.

Une fois que le cargo (récepteur avec ou sans ligand) a été internalisé et est arrivé dans les endosomes précoces, ceux-ci vont fusionner ensemble pour former les endosomes de tri. A partir de là, le cargo peut être envoyé vers le circuit de recyclage ou de dégradation (Fig 16).

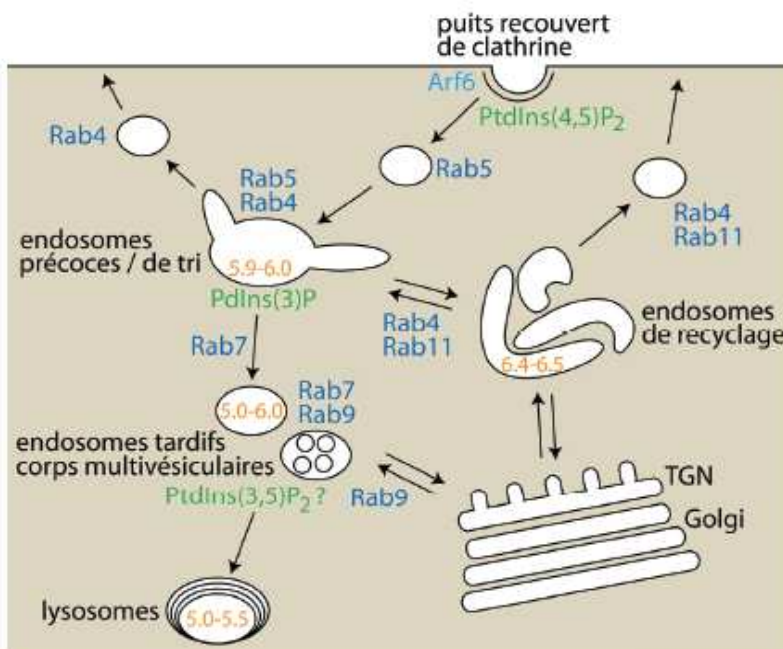


Figure 16 : Anatomie des compartiments endosomaux

Les compartiments endosomaux (en noir) possèdent une morphologie et un pH interne distincts (en orange). Les dernières étapes des voies de sécrétion (Trans Golgi Network TGN et Golgi) sont également représentées. Des GTPases Rab (en bleu foncé), ainsi que des GTPases Arf (en bleu clair) sont associées avec les différentes voies de transports et compartiments. En vert, sont signalés les lipides spécifiques à certains compartiments.

2.3.3 Les voies de recyclage

Le recyclage permet aux récepteurs d'être renvoyés à la membrane plasmique après avoir libéré leurs ligands dans les endosomes précoces. Il existe deux voies de recyclage, une dite rapide, permettant le retour à la membrane depuis les endosomes de tri. Le marqueur spécifique de ce type de vésicule est la petite GTPase Rab4 (van der Sluijs et al., 1992). L'autre voie, dite lente, passe par les endosomes de tri puis par les endosomes de recyclage avant de retourner vers la membrane plasmique. La petite GTPase Rab11 est préférentiellement associée à la voie lente du recyclage (Fig 16). Comme pour Rab5, il existe des mutants dominants-positifs et -négatifs pour Rab4 et Rab11. Les mutants dominants-négatifs (Rab4 S22N et Rab11 S26N) bloquent le recyclage des protéines, elles s'accumulent donc dans les compartiments intracellulaires. A l'inverse, les mutants dominants-positifs (Rab4 Q67L et Rab11 Q79L) favorisent le recyclage, et augmentent la présence du récepteur à la membrane plasmique. Le modèle le plus étudié est le récepteur à la transferrine qui cycle constitutivement entre la membrane plasmique et les compartiments endosomaux, empruntant les voies de recyclages rapides et lentes.

2.3.4 La voie de dégradation

Le circuit de dégradation se dirige d'abord vers les endosomes tardifs, puis les corps multivésiculaires, et enfin vers les lysosomes où le ligand et/ou le récepteur sont dégradés par l'action d'enzymes (Fig 16). Les deux petites GTPases Rab7 et Rab9 sont associées aux voies de dégradation et sont présentes à la surface des endosomes tardifs (Feng et al., 1995). Le récepteur à l'EGF recycle très peu et constitue le modèle pour étudier la voie de dégradation. Aucun récepteur n'est spécifique à 100% d'une voie particulière, il existe donc des mécanismes de tri entre les voies de recyclage et les voies de dégradation. Un modèle propose un tri entre les récepteurs recyclés et les ligands dégradés par la topologie des endosomes de tri : un corps central vésiculaire d'où émergent de longs tubules. Les vésicules d'endocytose fusionnent avec les tubules, et le pH acide détache le ligand du récepteur. Le ligand se concentre dans la partie centrale sphérique où le rapport surface/volume est faible, et d'où partent les vésicules en direction des endosomes tardifs et des lysosomes, tandis que les récepteurs sont plus concentrés le long des tubules, là où le rapport surface/volume est grand, à cet endroit se forment les vésicules dirigées vers les endosomes de recyclage (Mellman, 1996).

2.4 Trafic de l'APP

L'APP membranaire entre dans la cellule par endocytose dépendante de la clathrine. Plusieurs éléments permettent de le prouver :

1/ Des études en microscopie électronique montrent une colocalisation entre les puits recouverts de clathrine et l'APP dans les cultures primaires de neurones (Yamazaki et al., 1996).

2/ L'utilisation de dominants négatifs de la protéine dynamine, ou d'AP180, et la déplétion de AP-2 par siRNA montrent une diminution de l'endocytose de l'APP dans les lignées et les cultures primaires de neurones. Ces 3 protéines sont impliquées dans l'endocytose dépendante de la clathrine (Carey et al., 2005; Cirrito et al., 2008; Eehalt et al., 2003; Schneider et al., 2008)

3/ La surexpression du dominant positif Rab5-GTP augmente l'internalisation de l'APP (Grbovic et al., 2003).

L'APP est donc présent dans les endosomes précoces. Il est ensuite capable d'être recyclé à la membrane plasmique (Yamazaki et al., 1995) ou d'être dégradé dans les lysosomes.

Le clivage β -sécrétase ayant lieu principalement dans les endosomes, la compréhension de la localisation subcellulaire de bace-1 et de l'APP devient dès lors très importante (Fig 17). Le modèle actuel est le suivant :

L'APP, localisé à la membrane plasmique, est principalement le substrat de l' α -sécrétase, première étape de la voie non-amyloïdogénique (Kojro et al., 2001). Cependant, une petite fraction de l'APP et de bace-1 est localisée dans les radeaux lipidiques (rafts), conduisant à leur interaction. L'endocytose (dépendante de la clathrine) de ce complexe favorise le clivage β -sécrétase et la production du peptide amyloïde car l'activité de bace-1 est dépendante d'un pH acide (Fig 18). L'absence d'endocytose (par l'expression du dominant négatif de la dynamine par exemple) de l'APP et de bace-1 diminue la production du peptide amyloïde (Eehalt et al., 2003). A l'inverse, favoriser l'internalisation de l'APP par la surexpression de Rab5 augmente la production du peptide amyloïde (Grbovic et al., 2003).

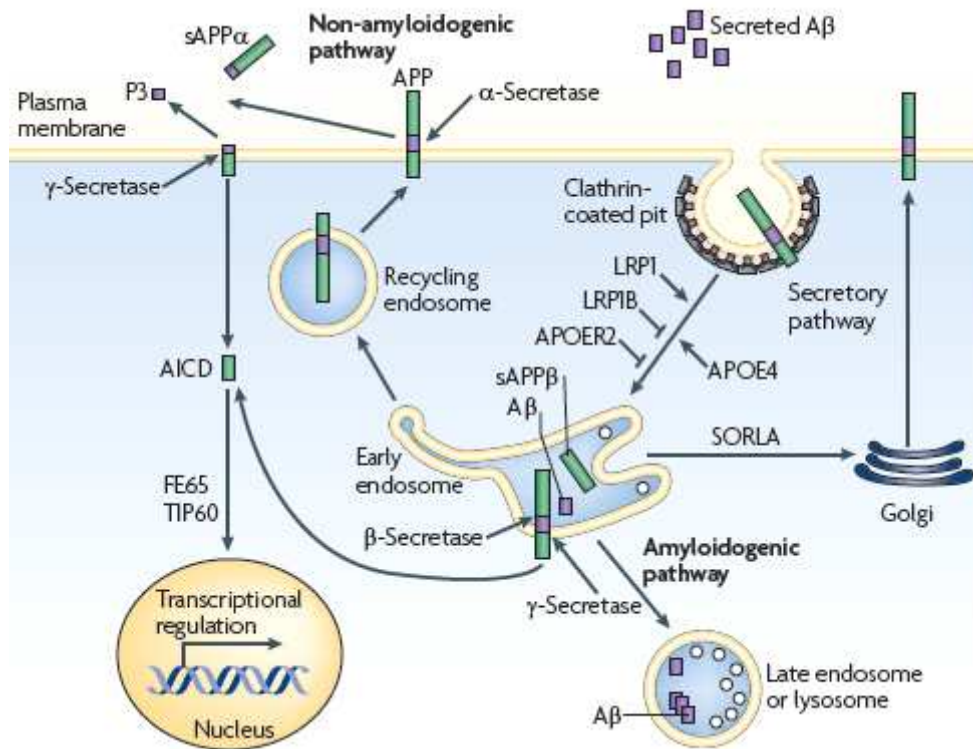


Figure 17 : Trafic intracellulaire et clivage de l'APP

L'APP nouvellement synthétisé arrive à la membrane plasmique par la voie de sécrétion, où il peut être clivé par l' α -sécrétase conduisant à la voie non-amyloïdogénique. Quand l'APP est internalisé par la voie dépendante de la clathrine, c'est la β -sécrétase qui clive l'APP dans les endosomes, puis la γ -sécrétase libérant ainsi le peptide amyloïde. Celui-ci est majoritairement sécrété dans l'espace extra-cellulaire mais une fraction peut s'agréger dans les endosomes tardifs. L'endocytose rapide de LRP1 augmente l'endocytose de l'APP et augmente la production du peptide amyloïde. Inversement, l'endocytose lente d'ApoER2 et LRP1B favorise la rétention de l'APP à la membrane plasmique et la voie non-amyloïdogénique. La liaison de SORLA et de l'APP déplace l'APP des compartiments endosomaux vers la voie de sécrétion diminuant ainsi le clivage β -sécrétase et la production du peptide amyloïde. ApoE4 augmenterait la production du peptide amyloïde via son interaction avec LRP1. Enfin le domaine intracellulaire de l'APP (AICD) interagit avec FE65 et TIP60 afin de réguler la transcription de certains gènes dans le noyau. (Bu, 2009)

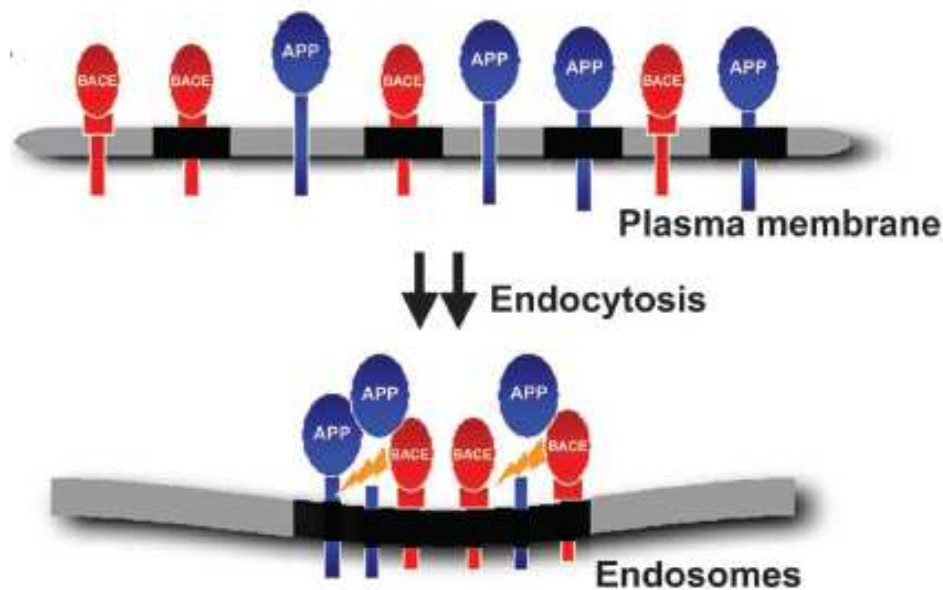


Figure 18 : Modèle du clivage de l'APP dépendant des radeaux lipidiques

Il existerait à la membrane plasmique deux pools d'APP et certainement deux de Bace1. L'un est associé aux radeaux (noir), l'autre non (gris). Parce qu'ils contiennent peu de protéines, APP et Bace1 seraient principalement localisés dans des radeaux différents à la membrane plasmique. L'endocytose permettrait le regroupement des radeaux conduisant au clivage de l'APP par Bace1 dans les endosomes, première étape de la voie amyloïdogénique. (Ehehalt et al., 2003)

La répartition de l'APP entre les régions rafts et non-rafts dépend du cholestérol membranaire. Une réduction du cholestérol à la membrane plasmique (par traitement à la MBCD par exemple) diminuerait le nombre ou la taille des raft et donc les possibilités d'interaction entre l'APP et bace-1 d'où la baisse de production du peptide amyloïde mesurée (Ehehalt et al., 2003). De plus, l'interaction de la flotilline-2 (protéine sensible à la concentration en cholestérol et présente dans les rafts) avec l'APP, stimulerait la relocalisation de l'APP vers les zones rafts et augmenterait l'endocytose de l'APP favorisant ainsi la production du peptide amyloïde (Schneider et al., 2008). A l'inverse, l'association de l'APP avec le complexe syntaxine-1/X11/Munc 18 empêche la liaison de l'APP avec bace-1 et entraîne la relocalisation de l'APP en dehors des rafts lipidiques. Enfin, l'hyperactivité des neurones favoriserait l'association de l'APP et de bace-1 et la production du peptide amyloïde (Sakurai et al., 2008).

Nous avons mentionné que l'APP était clivé par la β -sécrétase dans les endosomes, mais quel endosome ? Précoce, tardif, de recyclage ? L'étude de SorlA nous apporte des éléments de réponses. L'interaction de SorlA et de l'APP dans les endosomes précoces évite

le clivage amyloïdogénique et dirige le complexe vers la voie de recyclage rapide ou fusionne avec les vésicules de la voie de sécrétion évitant ainsi la production du peptide amyloïde (effet protecteur). L'absence de SorLA conduit l'APP vers les endosomes tardifs. Lors de ce cheminement il y a production du peptide amyloïde. Celui-ci sera déversé dans le milieu extracellulaire après un recyclage de type lent (Fig 17) (Andersen et al., 2005).

2.5 L'élargissement des endosomes précoces

Aux vues du chapitre précédent, il apparaît évident que les mécanismes de l'endocytose sont complexes et font intervenir de nombreuses molécules, différentes voies d'entrée dans la cellule, à la fois régulés et régulant l'homéostasie cellulaire. Bien avant l'apparition des plaques séniles et des corps neurofibrillaires, l'analyse des coupes de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou de Trisomie 21 (Rappel : développent une neuropathologie de type Alzheimer à partir de 40 ans) ont permis de révéler la présence d'endosomes précoces élargis. Ce chapitre sera consacré à l'étude de leurs caractéristiques, la compréhension de leur formation et leur impact sur la pathologie Alzheimer.

2.5.1 Définition

Les endosomes élargis dans le cerveau des patients Alzheimer se caractérisent par :

- un diamètre moyen compris entre 400 et 620 nm (100 à 250 nm chez les témoins)
- un élargissement pouvant mesurer jusqu'à 32 fois la taille normale
- une aire totale augmentée de 2,5 fois dans les cellules
- leur localisation principalement dans les cellules pyramidales du cortex couche III et V, et l'hippocampe (taille normale dans les couches I et IV et dans le cervelet)
- leur présence dans environ 40% des neurones (cellules pyramidales) analysés
- leur immunoréactivité avec les anticorps anti-Rab5 et anti-EEA1
- une augmentation du pourcentage d'endosomes contenant de l'hydrolase acide

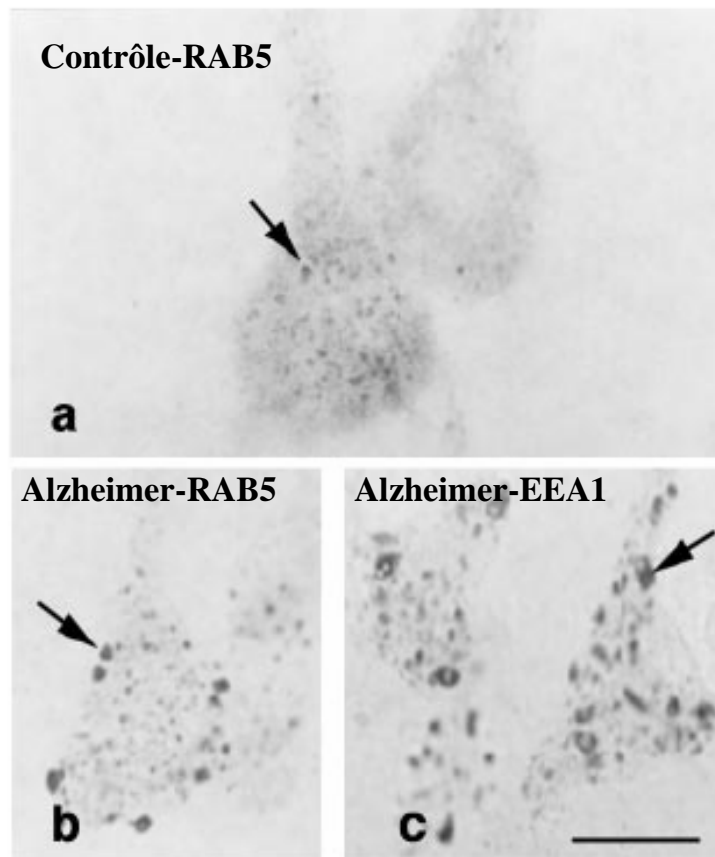


Figure 19 : Élargissement des endosomes précoces dans la maladie d'Alzheimer

Les neurones pyramidaux du cortex préfrontal présentent des endosomes élargis chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (B, C) comparé au sujet contrôle (A). Les endosomes sont visualisés grâce à des anticorps dirigés contre Rab5 ou EEA1, deux marqueurs des endosomes précoces. (Cataldo et al., 2003).

2.5.2 Les pathologies associées

i Maladie d'Alzheimer et Trisomie 21

La découverte des endosomes élargis dans le cerveau des patients Alzheimer en 1996 est l'œuvre du groupe de Cataldo et Nixon avec plusieurs publications à leurs actifs (Cataldo et al., 1996). A l'heure actuelle, aucun autre groupe n'a publié sur ce sujet.

Voici le résumé de leurs différents articles :

1/ L'élargissement des endosomes précoces précède le dépôt amyloïde et la présence des corps neurofibrillaires.

En effet, l'étude de cerveaux de personnes âgées non démentes et présentant des plaques dans le cortex enthorinal mais pas dans le néocortex (pré-Alzheimer de stade de

Braak I-III) montre une augmentation de la taille des endosomes comparé à des cerveaux de personnes âgées sans aucune neuropathologie. De plus, des endosomes élargis ont été retrouvés dès le stade fœtal (28 semaines de gestation) d'un individu porteur de la Trisomie 21. Le même phénotype est observé à 1 an, 2 ans et 7 ans chez d'autres porteurs soit bien avant le début des dépôts du peptide amyloïde (Fig 20). Notons que le nombre de neurones pyramidaux présentant des endosomes élargis augmente avec l'âge, passant de 20% chez le fœtus à 40% chez l'adulte (Cataldo et al., 2000).

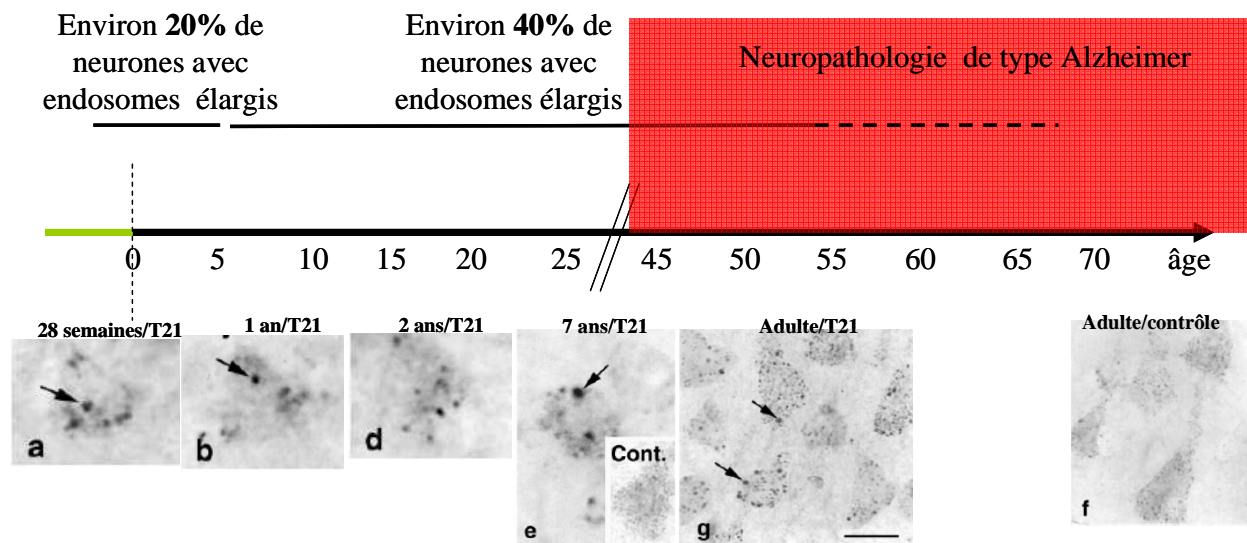


Figure 20 : Les endosomes élargis dans la trisomie 21.

Les endosomes élargis sont détectés dès le stade fœtal de porteur de trisomie dans les neurones, soit bien avant le dépôts de plaques séniles et de l'apparition des signes cliniques de la maladie d'Alzheimer. Le nombre de neurones présentant des endosomes élargis est de 20% chez l'enfant et se stabilise à 40% chez l'adulte.

2/ Le peptide amyloïde ne cause pas l'élargissement des endosomes.

La recherche d'endosomes élargis sur des coupes de cerveaux de patients atteints des formes monogéniques de la maladie d'Alzheimer (mutations dans l'APP ou dans la préséniline-1) s'est révélée infructueuse. L'augmentation du peptide amyloïde n'est pas la cause du phénotype. A l'inverse, ApoE favorise l'élargissement des endosomes. Etre porteur d'un ou deux allèles ApoE4 augmente de 50% la taille des endosomes par rapport à des endosomes déjà élargis de patients Alzheimer porteurs des allèles ApoE2 et/ou ApoE3. Cette différence s'estompe aux stades sévères de la maladie, ApoE4 influence donc le départ de la maladie mais pas sa progression (Cataldo et al., 2000).

3/ L'élargissement des endosomes est associé à l'augmentation du peptide amyloïde.

Si, comme nous l'avons vu plus haut, le peptide n'augmente pas la taille des endosomes, à l'inverse, des taux élevés de peptides amyloïdes solubles coïncident avec un élargissement des endosomes. En outre, le peptide amyloïde colocalise avec les endosomes élargis positifs pour Rab5 et EEA-1. Ajoutons que la détection du peptide amyloïde intracellulaire par des anticorps sur des coupes de cerveaux humains est sujette à caution. Souvent, c'est l'APP qui est détecté au lieu du peptide amyloïde (Cataldo et al., 2004).

4/ L'APP en 3 copies est nécessaire pour l'établissement des endosomes élargis dans les modèles murins de trisomie 21.

Afin de comprendre quel(s) gène(s) est (sont) responsable(s) du phénotype, les auteurs ont étudié différents modèles de trisomie 21. Les souris Ts65Dn possèdent 3 copies des gènes compris entre Mrpl139 et Znf295 et présentent un élargissement des endosomes. Les souris Ts1Cje trisomiques du gène Sod1 au gène Znf295 ne montrent pas le phénotype (Fig 6). Afin de comprendre le rôle de l'APP (tripliqué seulement dans le modèle Ts65Dn), ils ont généré une souris Ts65Dn avec l'APP en deux copie (Ts65Dn-APP^{+/-}). Ce modèle ne présente plus d'endosomes élargis. L'étude des modèles monogéniques murins surexprimant l'APP sauvage ou muté (avec les mutations retrouvées dans les formes familiales de la maladie) a permis de montrer l'absence d'endosomes élargis. Ils en concluent que l'APP est nécessaire mais pas suffisant pour générer des endosomes élargis chez la souris. Il existe donc au moins un autre gène responsable du phénotype sur la région tripliquée du chromosome 16 murin équivalent au chromosome 21 humain (Cataldo et al., 2003).

5/ Le phénotype est retrouvé dans des cultures de fibroblastes issues de patients porteurs d'une trisomie 21.

Les cellules de fibroblastes montrent les mêmes anomalies morphologiques (endosomes précoces élargis) que les neurones pyramidaux. Ce modèle cellulaire a permis d'étudier plus en détail les conséquences du phénotype. Ainsi, il a été montré l'augmentation de l'endocytose du récepteur à la transferrine et de l'EGF dans les fibroblastes trisomiques par rapport aux contrôles. En outre, l'élargissement des endosomes précoces entraîne en aval des dérégulations des compartiments subcellulaires et du trafic. Les hydrolases lysosomiales sont ainsi redistribuées dans les endosomes précoces, les endosomes tardifs sont également élargis. L'expression du dominant négatif Rab5-GDP conduit à une diminution de l'endocytose, et supprime en partie les endosomes précoces et également l'élargissement des endosomes tardifs. L'élargissement des endosomes tardifs est donc bien la résultante de l'élargissement des endosomes précoces. Enfin, Rab4, le marqueur des vésicules de recyclage est surexprimé

dans les fibroblastes trisomiques suggérant une tentative d'accélérer le recyclage pour contrebalancer l'excès d'internalisation (Cataldo et al., 2008).

Cette étude souligne les complications que peuvent occasionner un excès d'endocytose sur la compartimentation subcellulaire et donc potentiellement sur le trafic de l'APP et la production du peptide amyloïde.

ii Autres maladies neurodégénératives

Aucune augmentation significative des endosomes précoces n'a été mesurée dans des cas d'encéphalite, de maladie de Pick, de démence à corps de Lewy, de maladie d'huntington, de paralysie supranucléaire progressive et de sclérose amyotrophique latérale (Cataldo et al., 2000). Notons tout de même, que la maladie de Pick est due à une mutation dans le gène NPC (Niemann-Pick type C) qui conduit à un trafic aberrant du cholestérol et un élargissement des endosomes tardifs (Kobayashi et al., 1999). Ces endosomes élargis montrent une accumulation du peptide amyloïde cholestérol-dépendant (Yamazaki et al., 2001). Si l'on mentionne que les maladies d'Alzheimer et de Pick sont également toutes deux des tauopathies, les ressemblances phénotypiques entre ces deux pathologies deviennent dès lors troublantes.

Le tableau 3 récapitule les données sur l'élargissement des endosomes dans la pathologie Alzheimer et les autres maladies neurodégénératives.

Alzheimer sporadique	De 8 à 32x dans 40% des neurones
Pré-Alzheimer	2x
Pré-Alzheimer avec l'allèle ApoE ε4	1.5x plus
Trisomie 21	1.5x
Alzheimer familial/ APP	+ si ApoE ε4
Alzheimer familial/ PS1	0
Alzheimer familial/ microduplication APP	?
Pick, Huntington, PSP, ALS	0

Tableau 3 : Élargissement des endosomes précoces dans les différentes formes de la maladie d'Alzheimer et dans les autres maladies neurodégénératives

2.5.3 Les molécules impliquées

Par immunoblot, Cataldo *et al.* ont montré que les protéines petites GTPases Rab4, Rab5 et Rab7 sont augmentées dans le modèle cellulaire des fibroblastes trisomiques par rapport aux contrôles (Cataldo *et al.*, 2008). Sur coupe de cerveau de patients Alzheimer et trisomiques pour le chromosome 21, ils ont également trouvé une plus grande immunoréactivité des protéines Rab5 et Rab4 (Cataldo *et al.*, 2004). In vitro, la surexpression seule de Rab5 sauvage conduit à une augmentation de la taille des endosomes et de la production du peptide amyloïde (Grbovic *et al.*, 2003). Il semble donc évident que la dérégulation de Rab5 module la taille des endosomes. Par contre, en amont de Rab5, aucune piste n'est pour l'instant sérieusement validée afin de comprendre la genèse de l'élargissement des endosomes. Il existe de nombreuses autres protéines capables d'augmenter la taille des endosomes :

- les protéines impliquées dans le mécanisme de l'endocytose comme la famille EHD (Eps15 Homology Domain). Une inactivation de EHD3 ou EHD4 conduit à l'augmentation de la taille des endosomes (Naslavsky *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2008). Rabaptin-5, l'effecteur de Rab5, régule également la taille des endosomes précoces (Stenmark *et al.*, 1995). In vivo, des souris invalidées pour le gène de l'intersectine montrent un élargissement de leurs endosomes. Ce gène est très intéressant puisqu'il est localisé sur le chromosome 21 et la protéine intersectine recrute la synaptojanine-1 impliquée dans les mécanismes d'endocytose dont le gène est également positionnée sur le chromosome 21 (Yu *et al.*, 2008). Les dérégulations de HAP-1 (Huntingtin associated protein-1) ou de OCRL1 (oculocerebrorenal-1) augmentent la taille des endosomes précoces (Choudhury *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2002).

- les protéines impliquées dans la dynamique de l'actine. Par exemple la diminution de la synthèse endogène des protéines Calmoduline, ou de la protéine kinase C delta par siRNA augmentent la taille des endosomes avec la formation d'un manteau d'actine autour de l'endosome (Llado *et al.*, 2008).

- les protéines régulant les phosphoinositols comme la kinase PIKfyve (Ikononov *et al.*, 2006).

Cette liste est loin d'être exhaustive (des interleukines, prostaglandines (Wainszelbaum *et al.*, 2006)). De plus, les différentes voies citées ci-dessus interagissent entre elles compliquant l'apport de chacune dans l'apparition du phénotype.

3. Hypothèses et objectifs de travail

3.1 Projet 1 : Contexte, hypothèses et objectifs

Le récepteur aux cannabinoïdes de type 1 (CB1) est un récepteur à sept domaines transmembranaires qui cycle de manière constitutive avec le trajet suivant : membrane plasmique/endosomes précoces/endosomes de recyclage/membrane plasmique (Leterrier et al., 2004) dans les lignées cellulaires HEK293. Cette dynamique n'est pas dépendante de la fixation de son ligand. Christophe Leterrier, à l'époque doctorant sous la direction du Docteur Zsolt Lenkei (équipe dynamique des récepteurs neuronaux, ESPCI) souhaitait trouver des modulateurs de l'activité constitutive de CB1. Il observa une augmentation du ratio « CB1 membranaire/ CB1 intracellulaire » après la déplétion du cholestérol membranaire par la MBCD dans des cellules HEK293 (Human Embryonic Kidney). A l'inverse, les cellules incubées avec le complexe MBCD-cholestérol se chargent en cholestérol spécifiquement à la membrane plasmique et ce même ratio diminuait, avec la présence de grosses vésicules intracellulaires. Il était connu que la MBCD bloquait l'endocytose dépendante de la clathrine (Subtil et al., 1999), la question soulevée fut donc celle-ci : si une déplétion du cholestérol inhibe l'endocytose, est-ce qu'une augmentation du cholestérol accroît l'internalisation de CB1 ? Le Docteur Marie-Claude Potier connaissant les travaux de Cataldo et *al.* sur l'élargissement des endosomes précoces et la littérature sur les liens ténus entre la maladie d'Alzheimer et le cholestérol me proposa un sujet sur l'impact du cholestérol membranaire sur le trafic de l'APP et la taille des endosomes en collaboration avec l'équipe du Dr. Zsolt Lenkei.

Suite aux observations de Christophe Leterrier, l'hypothèse de travail était la suivante : l'excès de cholestérol à la membrane plasmique augmente l'internalisation de l'APP tout en augmentant la taille des endosomes. Cet environnement endosomique au pH acide devient alors propice à la surproduction du peptide amyloïde par l'action de la β -sécrétase.

Afin de valider notre modèle, il fallait :

- augmenter le cholestérol dans des proportions raisonnables (entre +15 et +40%)
- comprendre par quelle type d'endocytose s'effectuait cette excès d'internalisation de l'APP causé par l'augmentation du cholestérol
- analyser le cycle endocytose/recyclage de l'APP

- comprendre si cet effet du cholestérol était spécifique à l'APP
- déterminer la nature des vésicules élargies et mesurer leur taille
- doser les peptides amyloïdes $\alpha\beta 40$ et $\alpha\beta 42$ in vitro
- tenter d'établir un lien entre cholestérol membranaire et endocytose (rôle des radeaux lipidiques ?)
- valider le modèle dans différentes lignées

Pour cela, nous avons à disposition des constructions Rab5, Rab11, dynamine, eps15 sous forme sauvages, dominants négatifs, dominants positifs (que pour les petites GTPases), couplées à la molécule fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein). La construction APP-GFP avait été construite par le post-doctorant Dr. Randal X. Moldrich. Enfin, une macro avait été développée par Christophe Leterrier afin d'analyser le rapport entre la fluorescence localisée à la membrane plasmique et la fluorescence intracellulaire.

3.2 Projet 2 : Contexte, hypothèses et objectifs

Les endosomes élargis retrouvés chez les personnes porteuses d'une troisième copie du chromosome 21 sont causés par un ou plusieurs gènes localisés sur ce chromosome et surexprimés dans le cerveau. Si ce ou ces gènes s'expriment dans d'autres tissus trisomiques, il serait alors possible d'obtenir le même phénotype en périphérie du système nerveux central. Cette hypothèse a été validée par Cataldo et *al.* en observant in vitro des endosomes élargis dans des cultures de fibroblastes issus de patients trisomiques 21 (Cataldo et al., 2008). Pour aller plus loin, nous nous sommes demandés si l'on pouvait retrouver le phénotype dans les lignées lymphoblastoïdes dans un premier temps et dans un second temps directement dans le sang de patients porteurs d'une trisomie 21 en isolant les lymphocytes. Cette avancée ouvrirait la voie à l'étude des lignées lymphoblastoïdes de trisomies partielles pour tenter de réduire l'intervalle génétique conduisant à l'élargissement des endosomes précoces avec comme but final de valider le ou les gènes responsables. L'étude du transcriptome de ces différentes lignées pourrait également nous apporter des éléments sur les gènes différemment exprimés entre les lignées.

Une autre stratégie pour réduire l'intervalle génétique a été de réaliser des croisements entre le modèle murin Ts1Cje disponible dans le laboratoire et le modèle transgénique pour le gène de l'APP (TgAPP), le contrôle positif étant le modèle Ts65Dn.

Les lignées lymphoblastoïdes nous ont été généreusement fournies par l'équipe du Professeur Jean-Maurice Delabar (Trisomie 21 et hyperhomocystéinémie, Paris 7), et le sang

de patients par la Fondation Jérôme Lejeune. L'équipe du Dr. Jacqueline London (Trisomie 21 et hyperhomocystéinémie, Paris 7) et l'équipe du Dr. Yann Hérault (Institut de Transgénose Orléans-Villejuif) nous ont respectivement fourni les lignées de souris TgAPP et Ts65Dn.

II. RESULTATS

1. Le cholestérol augmente l'endocytose de l'APP dépendante de la clathrine et la taille des endosomes précoces

1.1 Article (en anglais)

Cholesterol increases the clathrin-dependent endocytosis of APP and the size of early endosomes.

Jack-Christophe Cossec¹, Anne Simon², Catherine Marquer¹, Randal X. Moldrich^{2,3}, Christophe Leterrier^{2,4}, Jean Rossier², Charles Duyckaerts¹, Zsolt Lenkei², and Marie-Claude Potier^{1§}.

¹,Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle, INSERM UMRS975 CNRS UMRS7225, Hôpital de La Salpêtrière, 47 Boulevard de l'Hôpital, 75651, Paris Cedex 13, France;

² ESPCI-CNRS UMR 7637, Laboratoire de Neurobiologie et Diversité Cellulaire, 10 rue Vauquelin, 75231 Paris Cedex 05, France.

Present address: ³The Queensland Brain Institute, The University of Queensland, St Lucia, Queensland 4072, Australia; ⁴INSERM UMR S 641, Laboratoire de Neurobiologie des canaux ioniques, Boulevard Pierre Dramard, 13916 Marseille, France.

§Corresponding author

ABSTRACT

Enlarged endosomes are believed to be the first morphological change observed in Alzheimer's disease brains (AD). They are found in sporadic cases with no pathological evidence of AD yet, in Down syndrome as early as 28 weeks of gestation but not in familial AD with mutations in the presenilin genes, suggesting that A β deposition is not the cause. We found that increased membrane cholesterol was associated not only with increased secretion of A β peptide as described previously but also with the appearance of enlarged endosomes and increased endocytosis of APP in cultured neuronal and non neuronal cells. We show that depletion of plasma membrane cholesterol favours APP localization at the plasma membrane while increase of plasma membrane cholesterol enhances the intracellular pool of APP. This graduated effect of cholesterol is inhibited by siRNA against clathrin and by mutants of proteins involved in the formation of early endosomes (dynamin2 and Rab5). This regulation by cholesterol is selective for APP since the endocytosis of other membrane proteins is not as much affected by cholesterol. We suggest that the endo-lysosomal pathway of APP is regulated by cholesterol, in a Rab5 and clathrin dependent manner. As levels of total cholesterol are increased in the

brains of AD patients we postulate that this raise could be responsible for the enhanced internalization of APP in enlarged endosomes and the overproduction of A β .

INTRODUCTION

Enlarged endosomes are believed to be the first morphological change observed in neurons of Alzheimer's disease (AD) brains (Cataldo et al., 1997). They were found in sporadic cases as well as in cases with Down syndrome and with certain APP mutations (Cataldo et al., 2001). Interestingly they were detected in sporadic cases in regions with no pathological evidence of AD yet and in Down syndrome as early as 28 weeks of gestation (Cataldo et al., 2000). Enlarged endosomes were absent in advanced stages of familial AD caused by mutations of presenilin 1 or 2 thus suggesting that altered endocytosis was not a consequence of amyloid- β (A β) deposition (Cataldo et al., 2001). Moreover since in the earliest forms of AD enlarged endosomes contain high levels of soluble A β , altered endosomes could lead to β -amyloid formation (Cataldo et al., 2004).

Early endosomes are the first individualized organelles containing endocytosed material originating from the plasma membrane or the extracellular fluid. They are also at the crossroads between recycling endosomes and late endosomes/lysosomes where molecules will ultimately be degraded. It is known that APP is cleaved along the secretory and the endo-lysosomal pathway (Koo and Squazzo, 1994). However the importance of the endocytic pathway in AD pathogenesis is evidenced by its crucial role in APP processing and from the localization of APP secretases within endosomes. Indeed inhibition or acceleration of the endocytic process reduces or increases A β production respectively (Carey et al., 2005; Eehalt et al., 2003; Grbovic et al., 2003).

It has also been known that membrane cholesterol modulates A β secretion. Most studies have explored the effects of a depletion of membrane cholesterol using methyl- β -cyclodextrin (MBCD) that resulted in a decrease of A β production in cell cultures (Eehalt et al., 2003; Guardia-Laguarta et al., 2009; Kojro et al., 2001; Simons et al., 1998). Several additional evidences support a strong relationship between high cholesterol and the development of AD (12). Genetic association studies have incriminated apolipoprotein E (APOE) ϵ 4 allele as the major risk factor for AD (Carter, 2007; Corder et al., 1993). The APOE gene encodes a lipid-binding protein that is critical for cholesterol transport in the brain. The Rotterdam epidemiologic study has shown that a high saturated-fat and cholesterol intake increases the risk of dementia mostly related to AD (Kalmijn et al., 1997). A lower incidence of AD in patients treated with statins that inhibit cholesterol biosynthesis was found in retrospective

studies (Wolozin et al., 2000). In AD mouse model, enrichment of the diet with cholesterol induces an increase in A β deposition while treatment by cholesterol lowering drugs reduces A β levels in neuronal cultures (Fassbender et al., 2001).

We found unexpectedly that increased membrane cholesterol was associated not only with increased secretion of A β peptide but also with the appearance of enlarged endosomes and increased endocytosis of APP in cultured neuronal and non neuronal cells.

We suggest that the endo-lysosomal pathway of APP processing is regulated by cholesterol, in a Rab5 and clathrin dependent manner. This regulation by cholesterol is at least selective (if not specific) since the endocytosis of other membrane proteins is not as much affected by cholesterol.

As levels of total cholesterol are increased (between 20% and 40% depending on the method used) in the brains of AD patients we postulate that this raise could be responsible for the enhanced internalization of APP in enlarged endosomes and the overproduction of A β .

RESULTS

Excess of plasma membrane cholesterol increases the size of early endosomes:

The effects of cholesterol were initially studied on HEK293 cells. Cells were treated with methyl beta cyclodextrin (MBCD)-cholesterol complex for 30 min, cholesterol was extracted and quantified. Treatment with 0.5 mM and 1.4 mM of MBCD-cholesterol complex produced a 15% and a 40% elevation of cholesterol at the plasma membrane respectively. Cells were fixed and early endosomes were labelled using an anti EEA1 antibody. A 40% increase of cholesterol at the plasma membrane induced a 64% significant increase ($p=0.0162$, Anova) of the size of EEA1 positive early endosomes (Fig. 1A-1B).

Because HEK293 cells are not from neuronal origin, we investigated the effects of cholesterol on cultured primary neurons from rat hippocampus. Hippocampal neuronal cultures were treated with MBCD-cholesterol complex (0.5 mM and 1.4 mM) for 30 min, cells were fixed and early endosomes were labelled using an anti EEA1 antibody. A 40% increase of cholesterol at the plasma membrane induced a 31% significant increase ($p=0.024$, Anova) of the size of EEA1 positive early endosomes (Fig. 1B-1C).

The enlarged endosomes immunoreactive for EEA1 observed after acute cholesterol loading resembled the endosome morphology detected in affected neurons from AD and Down syndrome patients (réf Cataldo?). Since these enlarged endosomes contained APP, we hypothesized that it could lead to an increase in APP processing and thus studied the mechanism by which cholesterol increased APP endocytosis.

Plasma membrane cholesterol modulates APP endocytosis

To study the effects of cholesterol increase at the plasma membrane on the size of APP containing early endosomes, we visualized APP endocytosis using the antibody-feeding technique. We tested HEK293 and SHSY5Y cell lines for the presence of APP at the plasma membrane as detected in neurons (Yamazaki et al., 1995). In SH-SY5Y cells stably transfected with APP₆₉₅ carrying the Swedish mutation, APP could not be detected at the plasma membrane using either N-terminal or C-terminal APP antibodies and confocal microscopy (Supp Fig. 1). We thus used HEK293 cells stably transfected with APP₇₅₁ with the Swedish mutation (APP_{sw}) fused to green fluorescence protein (GFP) at the C-terminal (Supp Fig. 2). We first validated our cellular model by showing that neither the GFP tag nor the Swedish mutation did alter the subcellular localization of APP (Supp Fig. 2). The GFP signal corresponded to full length APP since it overlapped with APP labelled with either N-terminal or C-terminal APP antibodies in permeabilized cells (Supp Fig. 2). Thus in the following experiments we used APP_{sw}-GFP that produces higher levels of A β (Citron et al., 1992).

Living HEK293 cells transfected with APP_{sw}-GFP were incubated at 37°C for 5 or 20 min with the APP N-terminal antibody. Cells were fixed, permeabilized and internalized APP N-terminal antibody was revealed with a secondary antibody coupled to Alexa568. In contrast to the 5 min incubation time after which APP N-terminal antibody was mainly localized at the plasma membrane, after 20 min a significant amount of APP N-terminal immunoreactivity was also visible in GFP positive intracellular vesicles (Supplementary Fig.3).

We then performed the APP N-terminal antibody-feeding experiments while increasing plasma membrane cholesterol. HEK293 cells expressing APP_{sw}-GFP were incubated for 12 minutes with 1.4 mM MBCD-cholesterol and the APP N-terminal antibody. Non-internalized antibodies were stripped from the plasma membrane by trypsin treatment (0.05%, 5min). Cells were fixed, permeabilized and internalized APP N-terminal antibody was revealed with a secondary antibody coupled to Alexa568. Increase of plasma membrane cholesterol promoted APP_{sw} endocytosis as shown by elevated levels of N-terminal APP antibody internalization as compared to control cells (Fig. 2A). The labelled intracellular structures corresponded to early endosomes since more than 90% co-localized with an antibody against EEA1, the early endosome associated protein 1 (Supplementary Fig. 4). Surprisingly, in cholesterol treated cells, the size and the number of EEA1 positive vesicles were significantly increased (Fig.2B; +59,3%; p=0.003 for the size and +35%; p=0.0359 for the number; t-test).

In order to confirm this result we performed APP N-terminal antibody-feeding experiments in HEK293 cells stably expressing APPsw-GFP while increasing cholesterol followed by quantification using a flow cytometry analyzer. HEK293 cells were incubated for 30 min with various concentrations of MBCD-cholesterol and the APP N-terminal antibody directly coupled to Alexa647. Non-internalized antibodies were stripped from the plasma membrane by trypsin treatment (0.05%, 5min) that also served to detach cells, and Alexa647 fluorescence of individual cells was quantified in a flow cytometry analyzer. Noticeably, a 40% overload of plasma membrane cholesterol significantly increased APPsw endocytosis as compared to untreated cells (Fig 2C; $p=0.022$).

We then wondered whether this effect of cholesterol was selective of APP. We thus analyzed two different transmembrane receptors: the transferrin receptor and the type 1 cannabinoid (CB1) receptor, a constitutively active seven transmembrane receptor.

Transferrin and the CB1 receptors are internalized through the clathrin dependent endocytic pathway (Leterrier et al., 2004). HEK293 cells expressing either APPsw-GFP, CB1-Flag, the endogenous transferrin receptors were incubated for 30 minutes with various concentrations of MBCD-cholesterol and either an APP N-terminal antibody, a Flag antibody (clone M1), the holo-transferrin all directly coupled to Alexa647. Non-internalized antibodies and holo-proteins were stripped from the plasma membrane by trypsin treatment (0.05%, 5min) and Alexa647 fluorescence of individual cells was quantified.

A 15% to 40% increase in membrane cholesterol did not alter the level of endocytosis for both the transferrin and the CB1 receptors.

Cholesterol modulates APP endocytosis through the dynamin2 and Rab5-dependent pathway

We next studied the effects of a wide range of cholesterol changes (increase or decrease) on APP endocytosis in HEK293 cells transfected with APPsw-GFP. Cells were treated for 30 minutes at 37°C with increasing concentrations of drugs inducing either acute depletion (MBCD) or enrichment (MBCD-cholesterol complex) of plasma membrane cholesterol. Treatment with 1.75 mM or 10 mM of MBCD induced a decrease of 15% and 40% respectively while 15% and 40% overloads were obtained after treatment with 0.5 mM or 1.4 mM of MBCD-cholesterol respectively (Fig. 3A). The subcellular distribution of APP (membrane/intracellular GFP fluorescence ratio: MFR) was measured by confocal microscopy in equatorial optical sections of individual cells (Fig. 3B).

At steady-state about 95% of both APP-GFP and APPsw-GFP was intracellular while the remaining 5% was localized at the plasma membrane or just beneath it, indicating that the

Swedish mutation did not alter the subcellular localization of APP (Supplementary Fig. 5A). Thus in the following experiments we used APP^{sw}-GFP that produces higher levels of A β (Citron et al., 1992).

A depletion of plasma membrane cholesterol favoured APP^{sw} localization at the plasma membrane while an increase of plasma membrane cholesterol significantly enhanced the intracellular pool of APP^{sw} as shown by a decrease of membrane/intracellular GFP fluorescence (Fig. 3A, 3B). Similar results were obtained with WT APP fused to GFP (Supplementary Fig.5B). These results indicated that cholesterol extraction from the plasma membrane decreased APP endocytosis and that conversely, excess of cholesterol enhanced APP endocytosis.

We then investigated whether we could modulate APP endocytosis by targeting proteins involved in early endosome formation (dynamin2 and the small GTPase Rab5). Dominant-negative (DN) mutants of these proteins are known to induce a deficit in endocytosis, while dominant-positive (DP) Rab5 increases endocytosis. HEK293 cells were transfected with APP^{sw} (detected with an APP C-terminal antibody) and wild type (WT) or mutant dynamin2 and Rab5 fused to GFP. DN mutants of dynamin2 or Rab5 induced an accumulation of APP^{sw} at the plasma membrane (Fig. 3C, 3D). Quantification showed a 50% and 42% significant increase of the MFR using dynamin2 and Rab5 DN mutants, respectively (Fig 3E). Mirroring the effect of DN Rab5, over-expression of DP Rab5 increased APP^{sw} endocytosis and resulted in the formation of unusually large vesicles, leading to a significant MFR decrease (Fig. 3D 3E).

In order to find whether the increase of APP endocytosis by cholesterol occurs through the upregulation of dynamin2 and Rab5-dependent APP internalization, we compared the effects of acute cholesterol loading between cells transfected with WT or DN mutants of dynamin2 or Rab5. Over-expression of WT dynamin2 or Rab5 did not modify the concentration-dependent effects of cholesterol on APP endocytosis (Fig. 4A, 4B versus 3B). However DN mutants blocked the effects of cholesterol (Fig. 4A, 4B). The slopes of the curves (MFR vs cholesterol variations) obtained with DN mutants were not significantly different from 0 ($p > 0.08$) (Fig. 4A, 4B), indicating that in these conditions APP internalization became insensitive to cholesterol changes at the plasma membrane. Mirroring these results, over-expression of DP Rab5 induced the formation of characteristic large vesicles containing APP^{sw} leading to lower MFRs (Fig.3E). However, cholesterol addition did not decrease the

MFR further, suggesting that endocytosis was maximal when DP Rab5 was over-expressed (Fig.4B).

Cholesterol modulates APP endocytosis through the clathrin-dependent pathway

Next, in order to confirm the implication of clathrin in the upregulation of APP endocytosis by plasma membrane cholesterol overload, we directly targeted endogenous clathrin using siRNA against the clathrin heavy chain (Motley et al., 2003). Control experiments indicated that HEK293 cells co-transfected with APP^{sw} and anti-clathrin siRNA, but not with the control anti-luciferase siRNA, expressed the clathrin protein at a very low level (Fig. 4C). Knock-down of clathrin increased APP^{sw} at the plasma membrane as revealed with an APP C-terminal antibody (Fig. 4D) and as demonstrated by the elevated MFR (Fig. 4E). Increase of cholesterol at the plasma membrane decreased the MFR (Fig. 4E, $p=0.034$, One-way ANOVA) while it did not change the inhibition of APP endocytosis by clathrin siRNA (Fig. 4E, $p=0.71$).

Taken together, we concluded that cholesterol content of the plasma membrane controls APP internalization by a tight regulation of the clathrin-, dynamin2- and Rab5-dependent endocytosis of APP.

Plasma membrane cholesterol controls A β ₄₂ secretion through a direct regulation of the clathrin-dependent endocytosis of APP.

APP endocytosis is a key step in A β production (Koo and Squazzo, 1994). We thus investigated how the above-described direct regulation of APP endocytosis by plasma membrane cholesterol was coupled to A β secretion. Therefore, HEK293 cells stably overexpressing APP^{sw}-GFP were acutely loaded with cholesterol for 30 min. Eight hours after culture medium change, accumulation of secreted A β ₄₀ and A β ₄₂ were measured by ELISA. Strikingly, we observed a dose-dependent effect of cholesterol levels at the plasma membrane and both A β ₄₀ and A β ₄₂ content (Fig.5A). In order to confirm that elevated A β secretion after cholesterol loading was indeed due to the increase of APP endocytosis, we tested the effects of clathrin siRNA on A β ₄₂ secretion in HEK293 cells overexpressing APP^{sw}-GFP. A 45% decrease of A β ₄₂ secretion by clathrin siRNA was observed in normal cholesterol condition, indicating that the steady-state production of A β ₄₂ is critically dependent on the constitutive clathrin-dependent endocytosis of APP. Importantly, the elevated A β ₄₂ secretion response to cholesterol increase at the plasma membrane was impaired in clathrin siRNA treated, but not in luciferase siRNA treated control cells (Fig.5B).

The difference in A β ₄₂ secretion between cells transfected with clathrin siRNA treated or not with cholesterol may be due to the incomplete knockdown of clathrin and to the APP processing activity at the plasma membrane (Ehehalt et al., 2003).

Since cholesterol is also enriched in caveolas containing caveolins and because caveolin-1 was shown to be expressed in the brain of elderly individuals (Kang et al., 2006), we wondered whether the effects of cholesterol on APP endocytosis was dependent on caveolin-1. We found in HEK293 cells transfected with APP_{sw} that siRNA against caveolin-1 did not significantly inhibit the effects of cholesterol on APP endocytosis and A β production (data not shown).

Lastly we showed that increased endocytosis of APP following cholesterol loads was followed by an increase of APP cleavage by BACE1. HEK293 cells treated with an inhibitor of gamma secretase and various concentrations of MBCD-cholesterol complex for 30 min were incubated with compound E for another 8 hours, cells were collected and proteins analysed by western blot using an anti-GFP antibody. Fig. 5C shows that cholesterol increased the beta cleavage of APP since C99 fragment was impaired.

Thus, we concluded that cholesterol content of the plasma membrane tightly controls A β ₄₂ secretion through a direct regulation of the clathrin-dependent endocytosis of APP.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies, plasmids and reagents

C-terminal APP antibody was purchased from Calbiochem and N-terminal APP antibody from Chemicon. β -actin antibody was from Abcam, anti-GFP and anti-Flag (clone M1) were from Sigma, EEA1 antibody from Affinity Bioreagents and clathrin heavy chain antibody from BD Bioscience. Alexa-labelled secondary antibodies were from Molecular Probes. HRP-conjugated anti-rabbit IgG and anti-mouse IgG were respectively from Jackson and Molecular Probes. MBCD and MBCD-cholesterol complex were from Sigma. Rab5-GFP plasmids were generously provided by Dr. Robert Lodge and dynamin2-GFP by Dr. M. McNiven. APP₇₅₁ plasmid was a gift of Dr. Frederic Checler. The Swedish double mutations (APP_{751sw}: K651N and M652L) were obtained using the Quikchange mutagenesis kit (Stratagene). The siRNA target sequence for the clathrin heavy chain was UAAUCCAAUUCGAAGACCAAU (Motley et al., 2003).

Hippocampal neuronal cultures.

Hippocampal neuronal cultures were performed essentially as described by Goslin et al. (Goslin and Banker, 1989) with some modifications (Jolimay et al., 2000). Briefly, hippocampi of rat embryos were dissected at embryonic days 18–19. After trypsinization, dissociation was achieved with a fire-polished Pasteur pipette. Cells were counted and plated on poly-L-lysine-coated 12-mm-diameter glass coverslips or 15-mm-diameter Thermanox coverslips (for electron microscopy), at a density of 300–400 cells/mm². The plating medium was Neurobasal supplemented with 2% B27 and containing Glutamax I (0.5 mM) and penicillin G (10 U/ml)/streptomycin (10 µg/ml). Four hours after plating, the coverslips were transferred into Petri dishes containing supplemented Neurobasal medium that had been conditioned for 24 h on a confluent glia layer.

Cell transfections and cholesterol treatments

HEK293 cells were grown in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum. Cells were transfected with plasmids using the DNA/Effectene mixture (Qiagen) except for the siRNA experiments in which cells were incubated with 100 pmoles of siRNA and 4µl of lipofectamine 2000 (Invitrogen) for 4 h at 37°C. Stable HEK293 clones over-expressing APP^{sw}-GFP or Flag-CB1-GFP were selected on G418 containing medium.

Levels of cholesterol were measured using the Amplex Red Cholesterol Assay kit (Molecular Probes) after extraction with chloroform-methanol solution (2:1) for 45 min. Treatment with 1.75 mM or 10 mM of MBCD induced a decrease of 15% and 40% respectively while 15% and 40% overloads were obtained after treatment with 0.5 mM or 1.4 mM of MBCD-cholesterol respectively.

For the Aβ₄₂ and Aβ₄₀ dosages, 50 µl of cell culture medium was collected. Aβ₄₂ and Aβ₄₀ levels were determined using the Biosource ELISA kit.

Image Quantification

Images (1024 x 1024 pixels) of individual cells were obtained on a Leica TCS NT confocal microscope using a x63, numerical aperture 1.4 oil immersion objective and x6 zoom. Each image was obtained on the equatorial cross-section through the cell that maximized nuclear diameter. Co-detection of GFP and Alexa568 fluorescence was done by excitation at 488 and 568 nm, using sequential detection. Membrane/intracellular Fluorescence Ratios (MFR) were calculated for each cell analyzed according to Leterrier et al. (Leterrier et al., 2004).

Antibody feeding experiments

HEK293 cells transfected with the APP^{sw} plasmid were incubated for 30 min at 37°C with the N-terminal APP antibody directly coupled to Alexa-Fluor® 647 (Invitrogen). Treatment with trypsin (5 min, 0.05%) was used to remove all membrane bound antibody. Cells were analyzed using the flow cytometry analyzer CyAn ADP LX 7 Color (Dako) (up to 5 000 cells for each condition). For studying the effects of cholesterol, HEK293 cells expressing either APP^{sw}-GFP, or CB1-GFP, or the endogenous transferrin receptor were incubated for 30 minutes with various concentrations of MBCD-cholesterol and an APP N-terminal antibody, or a Flag antibody (clone M1) or the holo-transferrin respectively, all directly coupled to Alexa647. Non-internalized antibodies and holo-transferrin were stripped from the plasma membrane by trypsin (0.05%, 5min) treatment that also served to detach cells, and Alexa647 fluorescence of individual cells was quantified.

For characterization of the endosomes, cells transfected with the APP^{sw} plasmid were incubated with an APP N-terminal antibody for 12 minutes. The membrane-bound antibody was removed as described above and intracellular APP was revealed using an Alexa568 secondary antibody. Quantifications were performed using ImageJ.

Protein extraction and western blot

Cells were washed twice, and extracted for 2 hours in a Tris buffer 0,05M containing 0,1M NaCl, 5mM EDTA, 1% Nonidet P-40 and a protease inhibitor cocktail (Roche). Cells debris were removed by centrifugation at 13000g. Protein concentration was determined using the Dc protein assay kit (BIO-RAD). For western blot analysis, 50µg of total protein per lane were loaded on a 4-12% gradient Bis-Tris gels under reducing conditions. Nitrocellulose membrane (Whatman) were probed with anti-GFP, clathrin heavy chain or actin antibodies. After incubation with horseradish-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes) the signal was revealed using Immobilon Western chemoluminescent HRP substrate (Millipore).

DISCUSSION

Previous studies by the group of Cataldo and Nixon have convincingly shown the presence of enlarged endosomes in the brain of patients with sporadic AD before the apparition of neuropathological hallmarks and in DS patients not only in the brain but also in cultured fibroblasts (Cataldo et al., 1997; Cataldo et al., 2008; Cataldo et al., 2000). The same phenotype was shown to be present in familial AD cases with mutations in APP only with the ApoE4 allele but not in cases with mutations in the presenilins thus suggesting that altered

endocytosis was not a consequence of A β deposition (Cataldo et al., 2001; Cataldo et al., 2000). It should be mentioned that cases with the Swedish mutation had enlarged endosomes only if they carried the ϵ 4 allele of the ApoE gene (Cataldo et al., 2001). Similarly since we could not observe any effect of neither APP nor APP_{sw} overexpression in cell lines on the size of early endosomes, it thus seemed that APP overexpression was not solely responsible for altered endocytosis in AD and DS where the APP gene is present in three copies.

We unexpectedly found that cholesterol induced the formation of enlarged early endosomes that resembled those described in affected neurons from AD and DS brains (Fig. 1). Cholesterol is essential in membrane organization and is more concentrated in domains termed lipid rafts (Simons and Ikonen, 1997). These lipid rafts are required for cell functions such as mobility and capping of membrane proteins, receptor mediated signalling, passage of pathogens such as viruses and membrane trafficking. Most studies have explored the effects of cholesterol extraction from the plasma membrane using MBCD, a surface-acting agent that produces the dispersion of lipid rafts within a short period of time. As an example cholesterol depletion decreased the infectivity of Influenza A virus and caused an enhancement of virus particle release (Barman and Nayak, 2007). It was shown previously that depletion of membrane cholesterol using MBCD resulted in a decrease of A β production in cell cultures (Eehalt et al., 2003; Guardia-Laguarta et al., 2009; Kojro et al., 2001; Simons et al., 1998). In addition Grimm et al demonstrated that MBCD inhibited in parallel the activity of β - and γ -secretases (Grimm et al., 2008). In the present work we studied the effects of a wide range of acute cholesterol changes (30 min) at the plasma membrane: from -40% to +40%. In these conditions, a 40% increase of cholesterol induced a specific increase of cholesterol concentration in the lipid rafts as we have demonstrated after purification by ultracentrifugation (data not shown). We showed that plasma membrane cholesterol regulates APP endocytosis and A β secretion in cell lines. These effects are dose-dependent and mediated through the clathrin-dependent and caveolin independent endocytosis pathway. In addition we show that modulation of APP endocytosis by cholesterol is impaired by dominant negative mutants of dynamin2 and Rab5 that inhibit clathrin dependent endocytosis. Since the majority of A β secreted into the brain interstitial fluid is generated through endocytosis of APP (Cirrito et al., 2008), enhancement of clathrin-dependent APP endocytosis by cholesterol is likely the direct cause of the increased A β ₄₂ secretion observed in our study.

We suggest that several clathrin-dependent endocytosis pathways exist with one more sensitive to cholesterol that regulates APP endocytosis. The existence of specific endocytosis markers such as epsin for APP was also described recently (Schneider et al., 2008). In addition endocytosis motifs are variable and the one for APP is different from the one for transferrin (Collawn et al., 1993; Lai et al., 1995). Finally the localization within or outside rafts could play an important role: indeed APP has been shown to be partly localized in lipid rafts while the transferrin receptor is exclusively present outside the rafts (Bouillot et al., 1996).

Recently, two papers proposed a strong interaction between APP and cholesterol: either directly on residues localized close to the transmembrane domain of APP (Beel et al., 2008), or indirectly by interacting with flotillin2 (Schneider et al., 2008), thus facilitating APP clustering to raft microdomains. We thus suggest that APP associated to lipid rafts internalizes through clathrin-mediated endocytosis, a mechanism that is accelerated with an excess of cholesterol at the plasma membrane.

Enlarged endosomes have been described in cortical neurons expressing APP(V642I) or APP-binding protein 1 (APP-BP1) (Laifenfeld et al., 2007). Also, Grbovic et al. showed that key regulators of endocytosis are recruited to enlarged endocytic vesicles of AD neurons. Moreover they found higher levels of Rab5 that participated in the increase of both APP β -cleavage in early endosomes and of A β secretion. Similarly, in neurons overexpressing APP(V642I) or APP-BP1 the levels of Rab5 and EEA1 were both impaired (Laifenfeld et al., 2007). Endosome fusion leading to giant endosomes has been observed in living cells overexpressing Rab5 or a dominant positive form of Rab5 (Bucci et al., 1992; Roberts et al., 1999). It now remains to be established whether Rab5 is a consequence of endosome enlargement or vice versa.

Increased cholesterol levels have been demonstrated in vulnerable brain regions of AD patients (Cutler et al., 2004). Moreover cholesterol staining overlapped with β -secretase and A β suggesting that cholesterol increase could be responsible for elevated A β deposition (Xiong et al., 2008). Cholesterol was also shown to contribute to increased A β production and accumulation in nerve terminals from AD brains (Gyls et al., 2007).

The *in vivo* mechanisms underlying A β accumulation in sporadic AD are not well understood and we propose here a scenario whereby increased cholesterol in AD brains could be

responsible for increased APP endocytosis. It remains to be shown whether endocytosed APP by itself produces enlarged endosomes or regulate proteins that control the size of early endosomes such as Rab5.

Acknowledgments:

The authors wish to thank Dr. I. Rivals for her suggestions on the statistical analysis; Dr. B. Allinquant for helpful discussions on the results; Dr. B. Delatour for his comments on the manuscript. A.S. had a fellowship from the Ministère de la Recherche, J.C.C. had a fellowship from the Ministère de la Recherche and from the Fondation pour la Recherche Médicale, and R.X.M. was a CJ Martin Fellow of the NHMRC (Australia). This work was supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ChoAD) and by the Fondation Jérôme Lejeune.

FIGURES

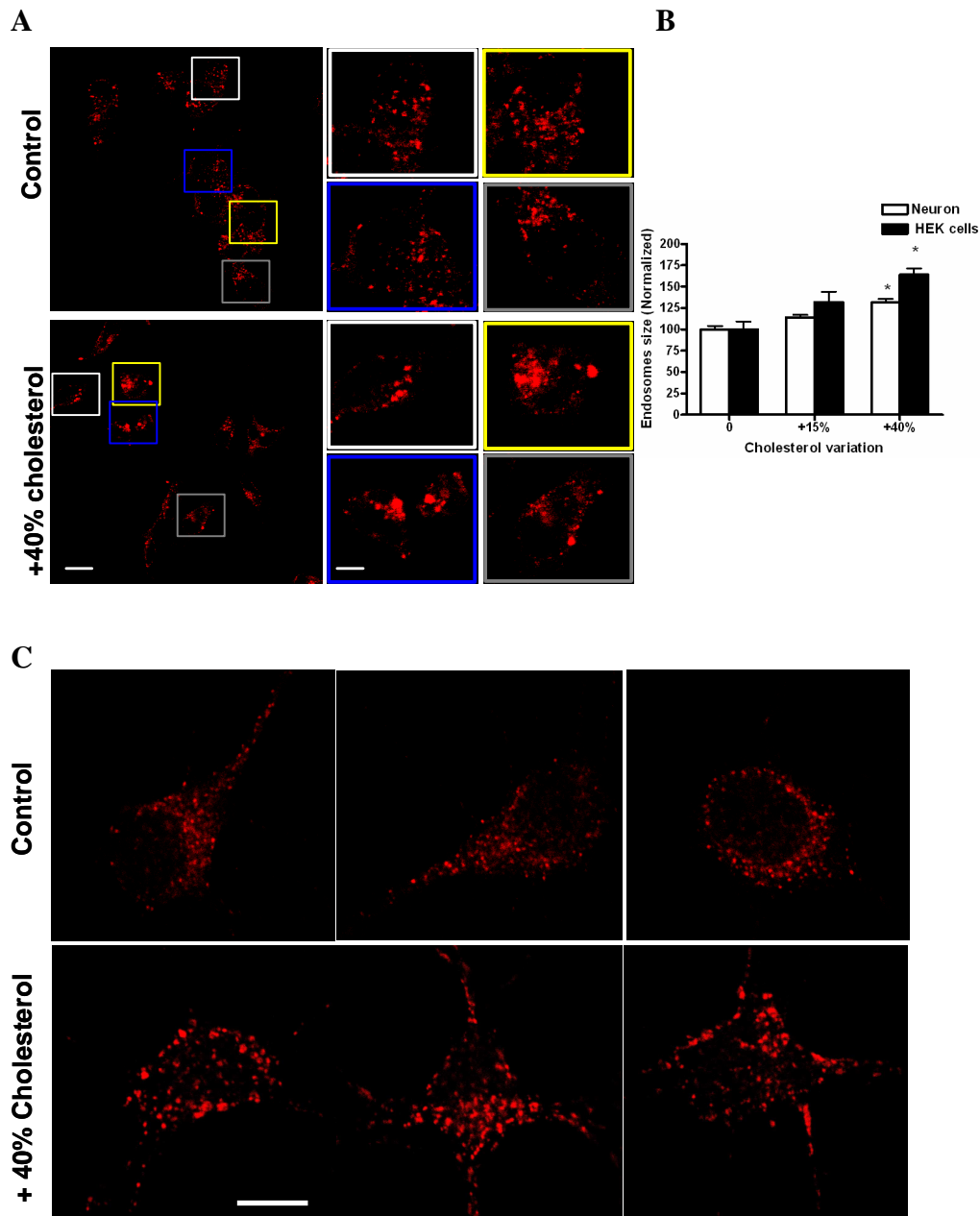


Fig1. Enlargment of early endosomes in HEK cells and in primary cultured neurons after MBCD-cholesterol treatment.

(A) Endosomes of HEK293 cells were labelled with an anti-EEA1 antibody (red) after treatment with MBCD-cholesterol for 30 min. Scale bar : 10 μ m (left pannel), 4 μ m (right pannel) (B) Quantification of the size of endosomes (EEA1 positive-vesicles) in 40 untreated and in 40 cholesterol treated cells in 2 independent experiments. (C) Endosomes of neurons were labelled with an anti-EEA1 antibody after treatment with MBCD-cholesterol for 30 min. Scale bar : 10 μ m

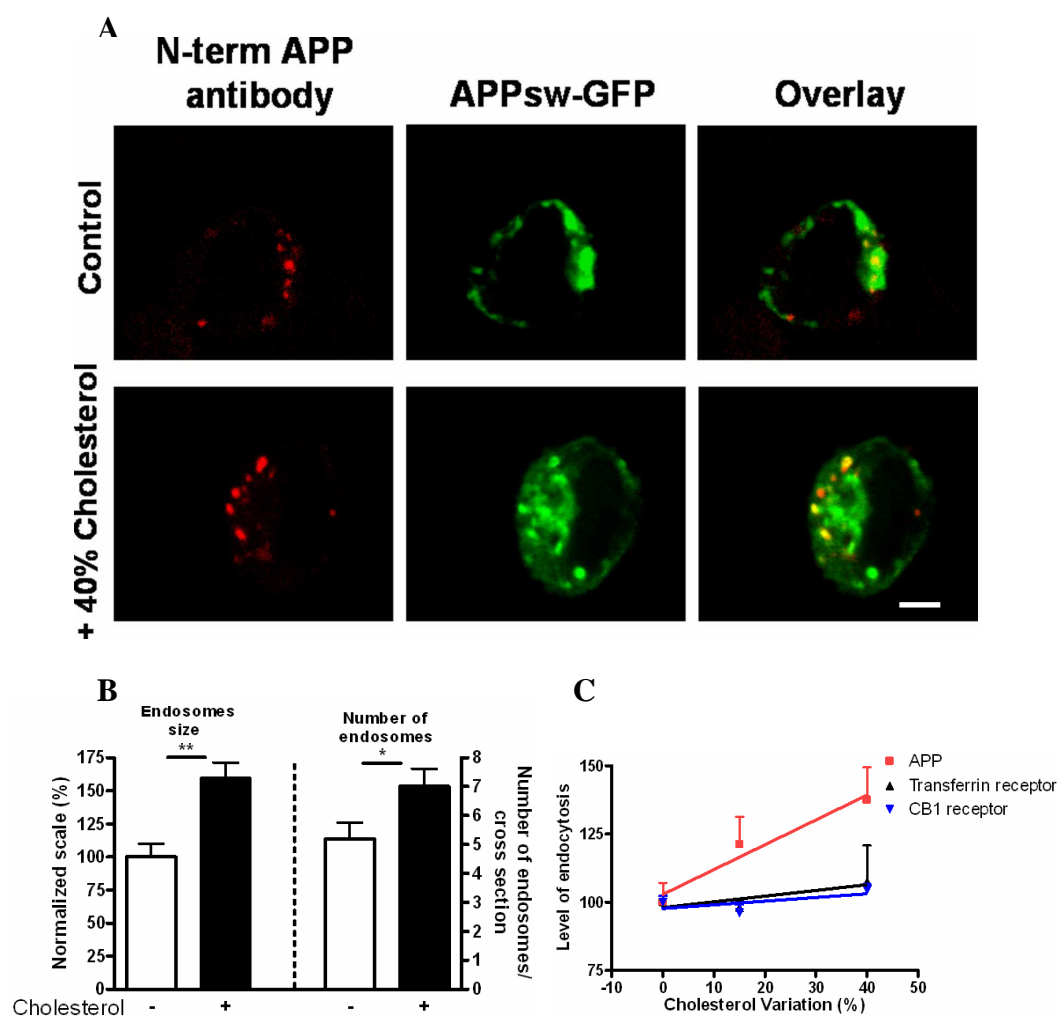


Fig2. Enlargment of APP-positive early endosomes in HEK cells after MBCD-cholesterol treatment.

(A) Confocal images of HEK293 cells transfected with APPsw-GFP incubated 12 min at 37°C with an APP N-terminal antibody; (B) Quantification of the number ($p=0.0359$, t-test), the size ($p=0.003$, t-test) of APP-positive vesicles in 22 untreated and in 22 cholesterol treated cells as revealed with the N-terminal APP antibody in 2 independent experiments; (C) Effect of cholesterol on the level of endocytosis of APP ($p=0.022$, one-way ANOVA), transferrin receptor and cannabinoid receptor as measured by flow cytometry from 3 independent experiments. Scalebar: 3 μ m

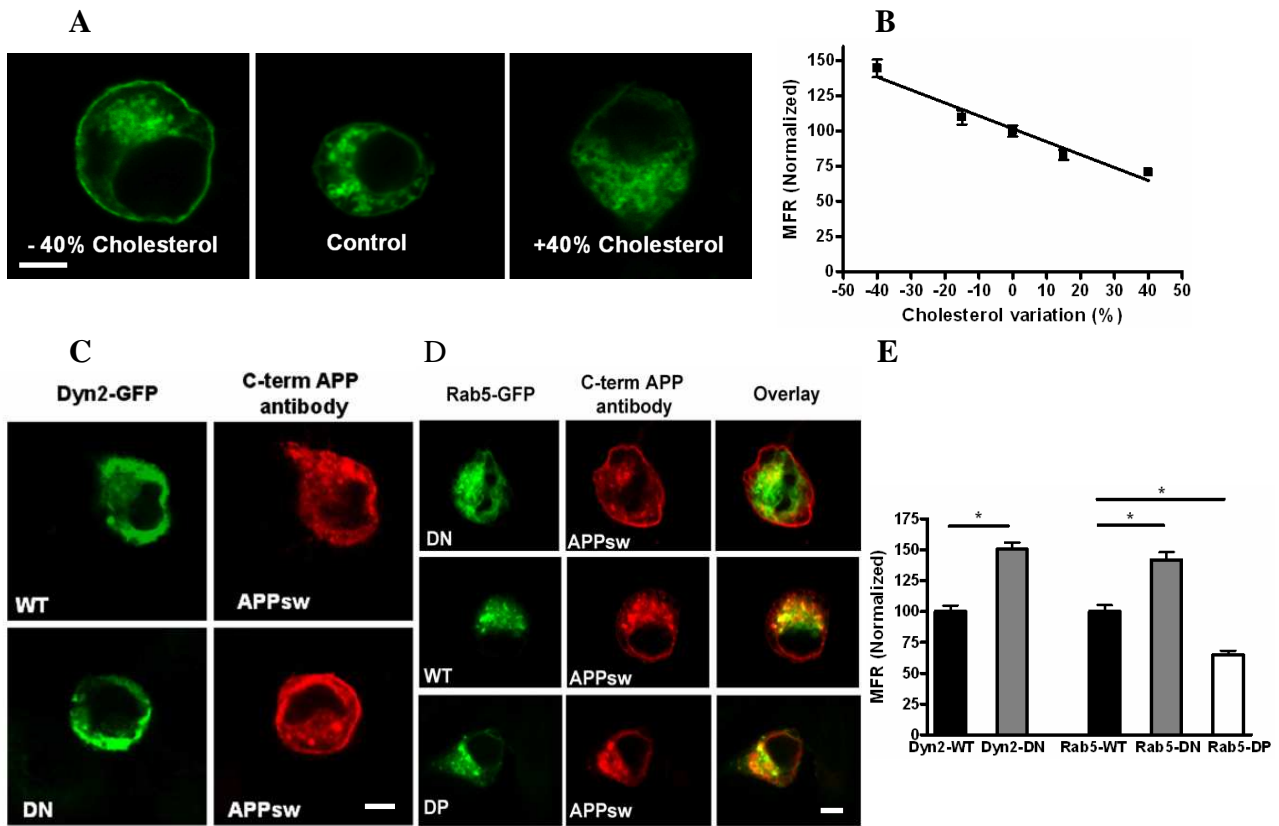


Fig 3. Effects of plasma membrane cholesterol variations on APP endocytosis.

(A) Confocal images of HEK293 cells transfected with APPsw-GFP and treated with MBCD or MBCD-cholesterol for 30 minutes, Scale bar : 3 μ m; (B) Dose dependent effect of cholesterol on the membrane/intracellular fluorescence ratio (MFR); for HEK293 cells, 84 cells in 3 independent experiments were analyzed for each cholesterol concentration ($p=0.0015$, one-way ANOVA); (C) HEK293 cells were co-transfected with the APPsw plasmid and wild type (WT) or dominant negative (DN) mutant of Dyn2-GFP. APP was revealed using a C-terminal polyclonal APP antibody and an anti-rabbit secondary antibody labelled with Alexa568, Scale bar : 3 μ m; (D) Quantification of the membrane/intracellular fluorescence ratio (MFR) after transfection of Dyn2-GFP (30 cells analyzed in 2 independent experiments) or Rab5-GFP (75 cells analyzed in 3 independent experiments). * corresponds to p values <0.05 in one-way ANOVA. (E) Confocal images of HEK293 cells co-transfected with the APPsw plasmid and WT, DN or dominant positive (DP) mutants of Rab5-GFP, Scale bar:3 μ m.

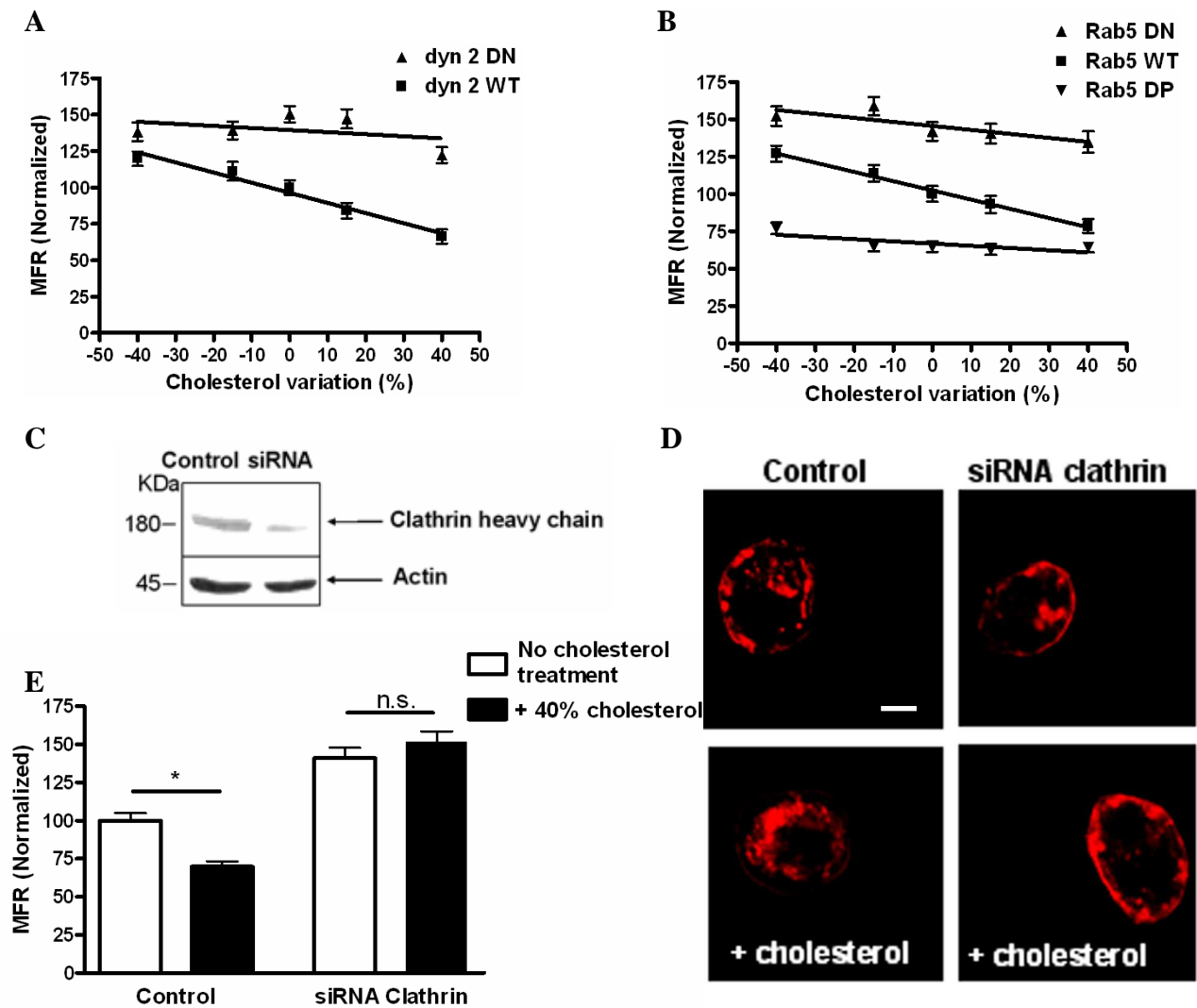


Fig4. Plasma membrane cholesterol promotes APP endocytosis through the clathrin-dependent pathway. HEK293 cells were co-transfected with APPsw plasmid and wild type (WT) or dominant-negative (DN) and -positive (DP) mutants of Dyn2-GFP and Rab5-GFP. Cells were incubated for 30 min in the presence of MBCD or MBCD-cholesterol and immunostained for APP using a C-terminal polyclonal APP antibody. (A) Quantification of the membrane/intracellular fluorescence ratio (MFR) of APP in Dyn 2 WT and DN transfected cells treated with various concentration of cholesterol modulating drugs (30 cells analyzed in 2 independent experiments). (B) MFR of APP in HEK293 cells transfected with the WT or mutants of Rab5 (40 cells analyzed in 2 independent experiments). (C) Measurement of clathrin expression in cells treated with siRNA against luciferase (control) or clathrin heavy chain (siRNA) using western blot; (D) Confocal images of cells co-transfected with APPsw and clathrin siRNA treated or not with cholesterol Scale bar : 3 μ m; (E) Quantification of the membrane/intracellular fluorescence ratio (MFR) of HEK293 cells as in D. MFR were compared using one-way ANOVA for 48 cells analyzed in 3 independent experiments.*p<0.05.

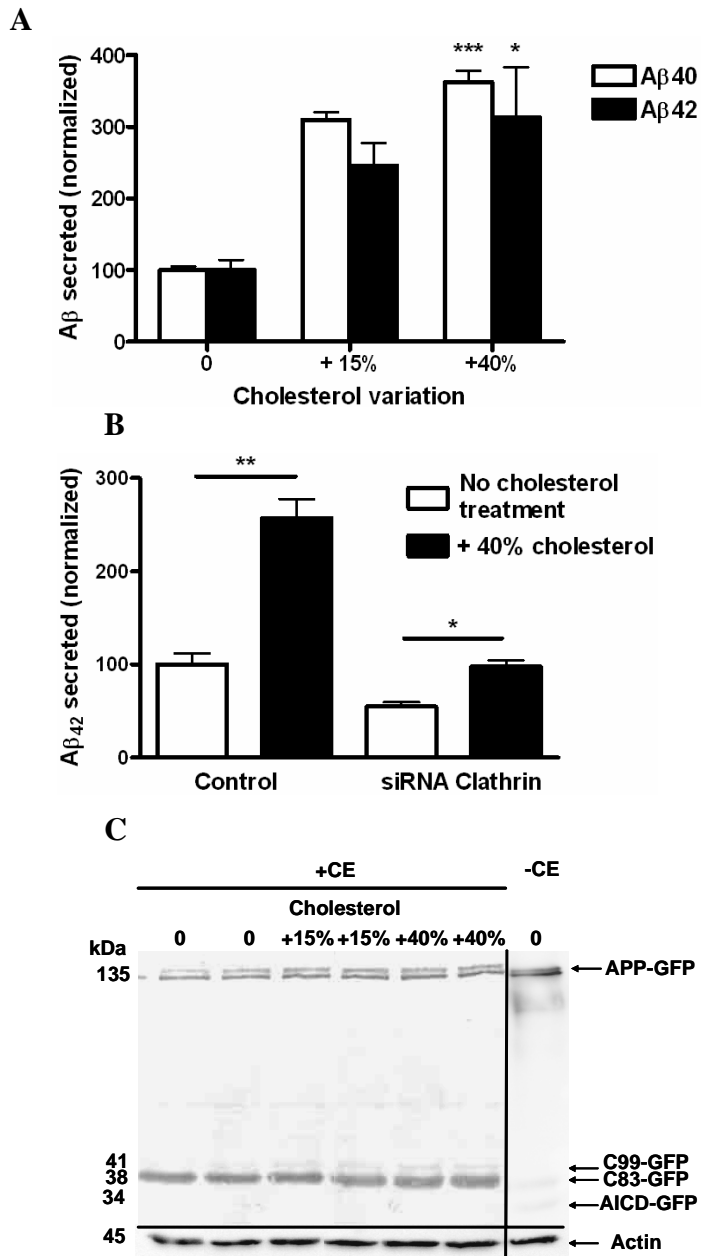
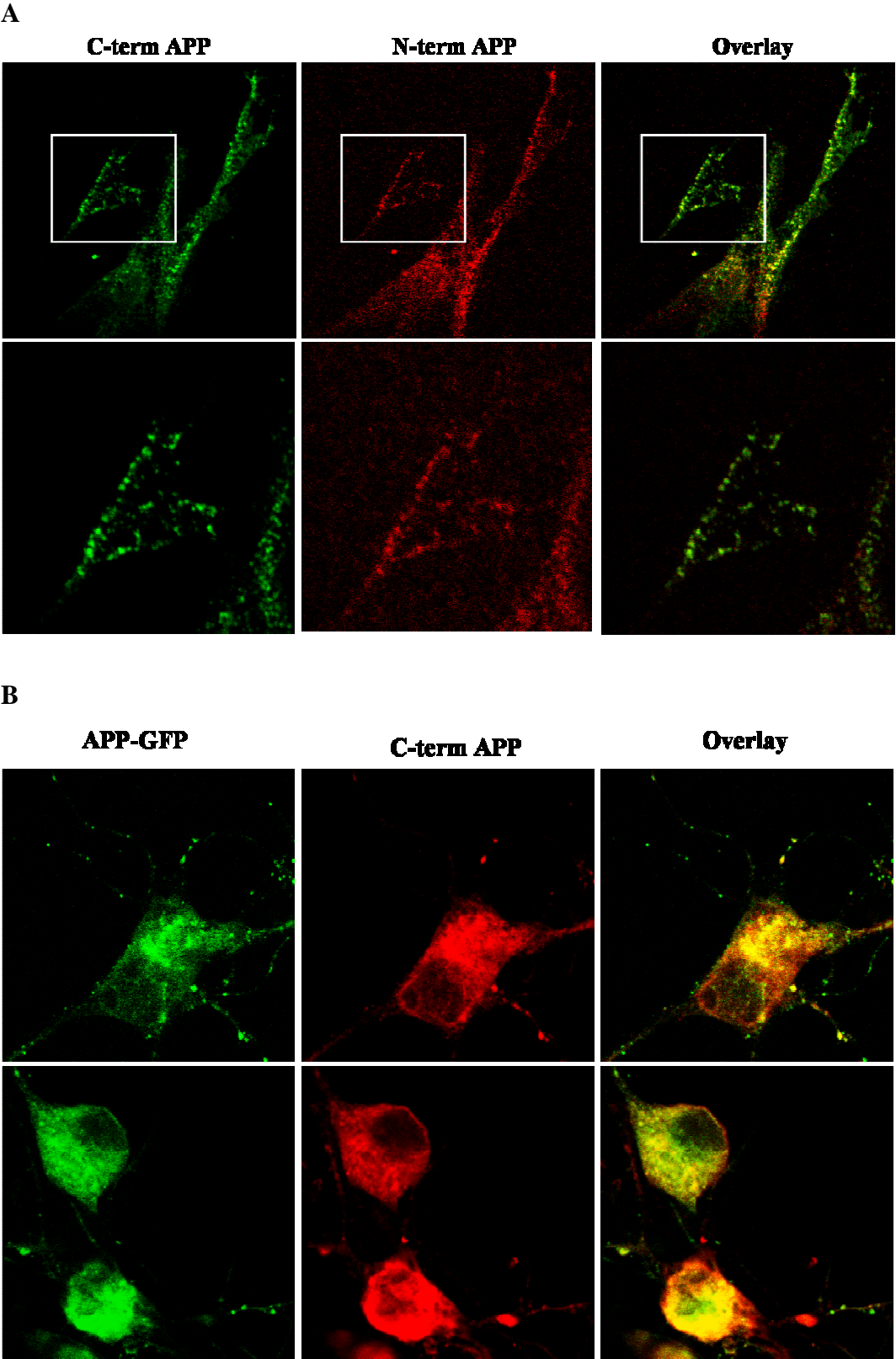


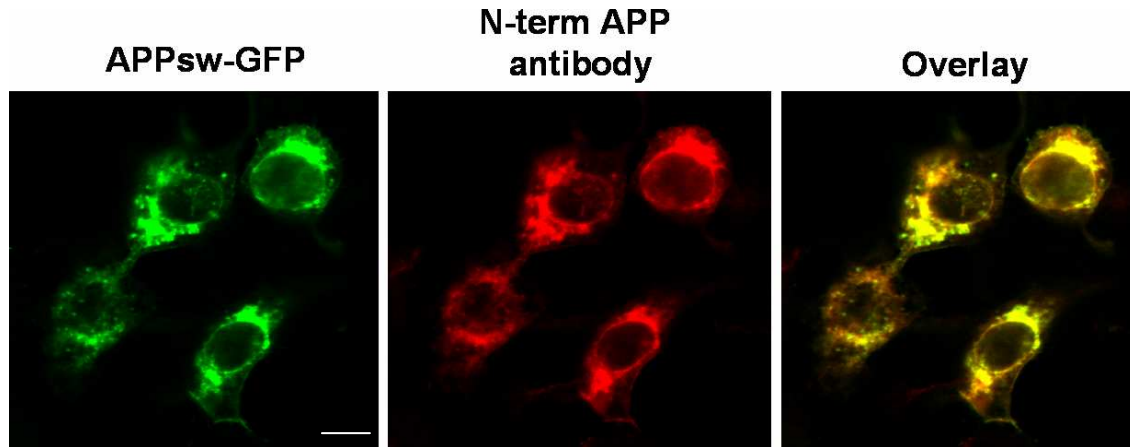
Fig5. Effect of plasma membrane cholesterol variations on A β secretion and APP clivage. HEK293 cells stably transfected with APP_{sw}-GFP were treated with MBCD-cholesterol (30 min at 37°C). A β ₄₂ and A β ₄₀ secretions were quantified from the cell culture medium. (A) A β ₄₂ and A β ₄₀ secretions after 8 hours following treatment with cholesterol modulating drugs (n=3 for HEK293 cells; 3 replicates in each experiment). A β ₄₂ and A β ₄₀ secretions were compared between different conditions using one-way ANOVA (p<0.001 for A β ₄₀ p<0.05 for and A β ₄₂) (B) A β ₄₂ and A β ₄₀ after 12 hours following MBCD-cholesterol treatment in HEK293 cells transfected with siRNA against luciferase (control) or clathrin heavy chain (siRNA) in 2 independent experiments; (* p<0.05). (C) HEK cells transfected with APP-GFP were treated with MBCD-cholesterol (+15%, +40%) or not (0) for 30 min and then incubated 6 hours with an inhibitor of γ -secretase (compound E : +CE), except for one condition (-CE). After protein extraction, expression of APP-GFP, C99-GFP, C83-GFP and AICD-GFP were observed using western blot.

SUPPLEMENTARY FIGURES

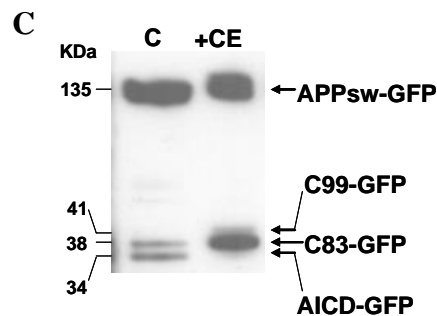
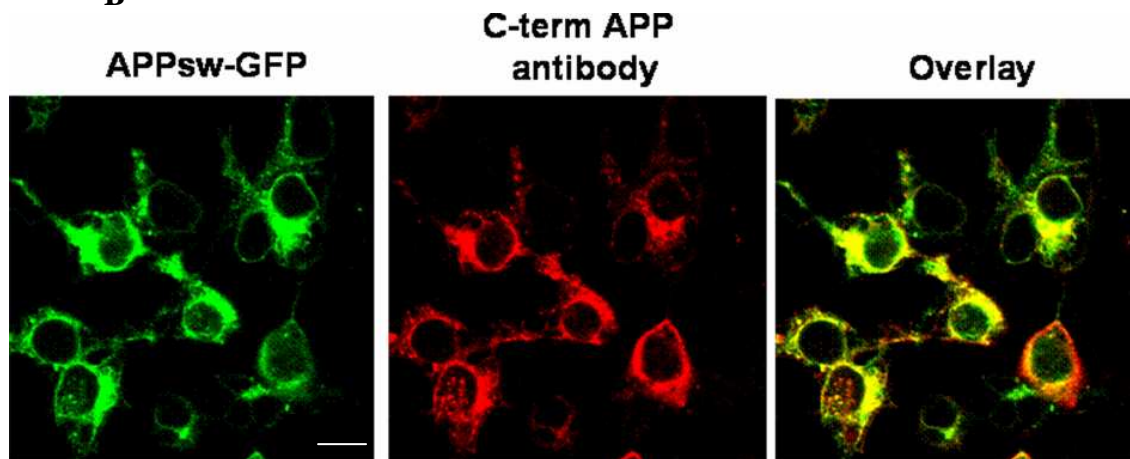


Supplementary Fig1. Comparison of APP localisation in SH-SY5Y (A) and in primary neurons (B).

A

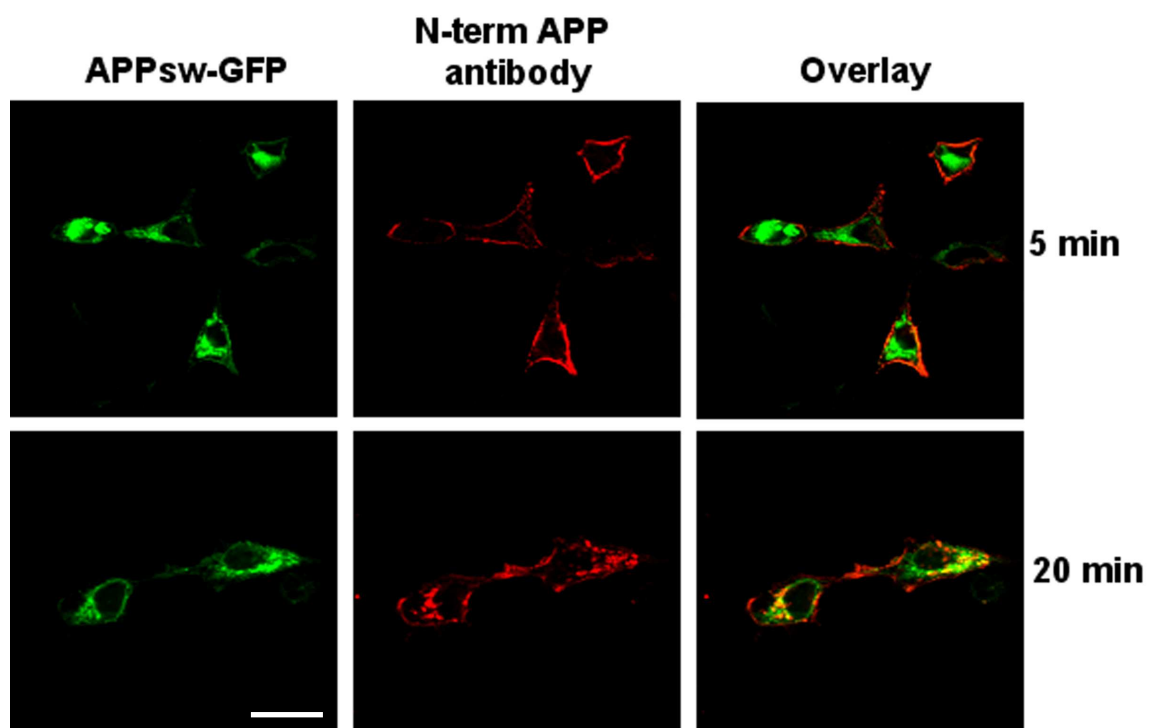


B

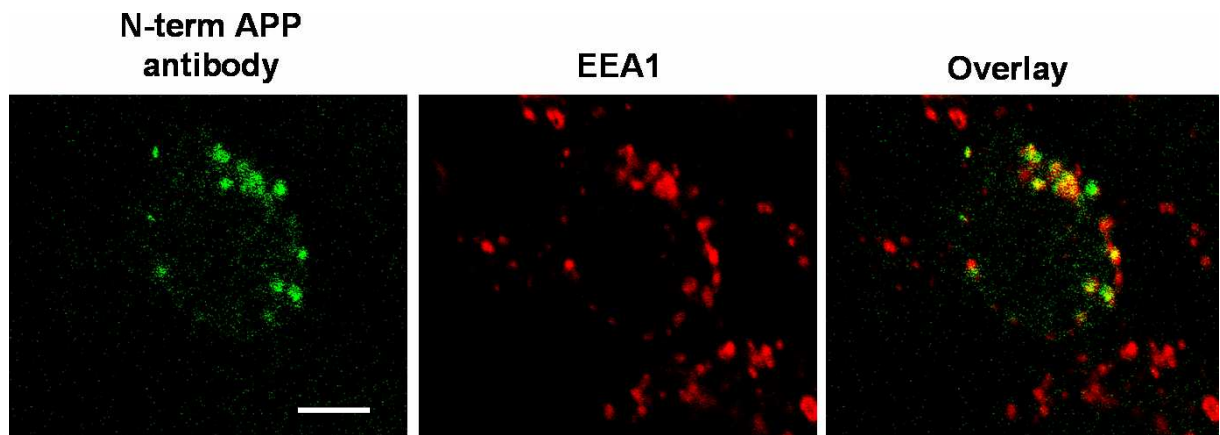


Supplementary Fig2. In HEK293 cells over-expressing APPsw-GFP, the majority of GFP fluorescence corresponds to full length APPsw.

Confocal images of HEK293 cells transfected with APPsw-GFP. The overlays show that GFP fluorescence (green) mostly overlaps with APP full length as revealed with an APP N-terminal antibody (A) and an APP C-terminal antibody (B) Scale bar, 10 μ m. (C) SDS PAGE of protein extracts from HEK293 cells overexpressing APPsw-GFP treated (CE) or not (C) with an inhibitor of γ -secretase (compound E from Alexis Biochemicals for 6 hours at 1 μ M). Western blot was hybridized to a GFP mouse antibody revealed with a secondary anti mouse antibody coupled to HRP. HRP was revealed with the SuperSignal West Pico Chemiluminescence from Pierce. Most of the GFP fluorescence corresponded to full length APPsw. The remaining bands were issued from β - and/or γ -cleavage. Compound E inhibited γ -cleavage of APPsw thus increasing the amount of fragments from β -cleavage.

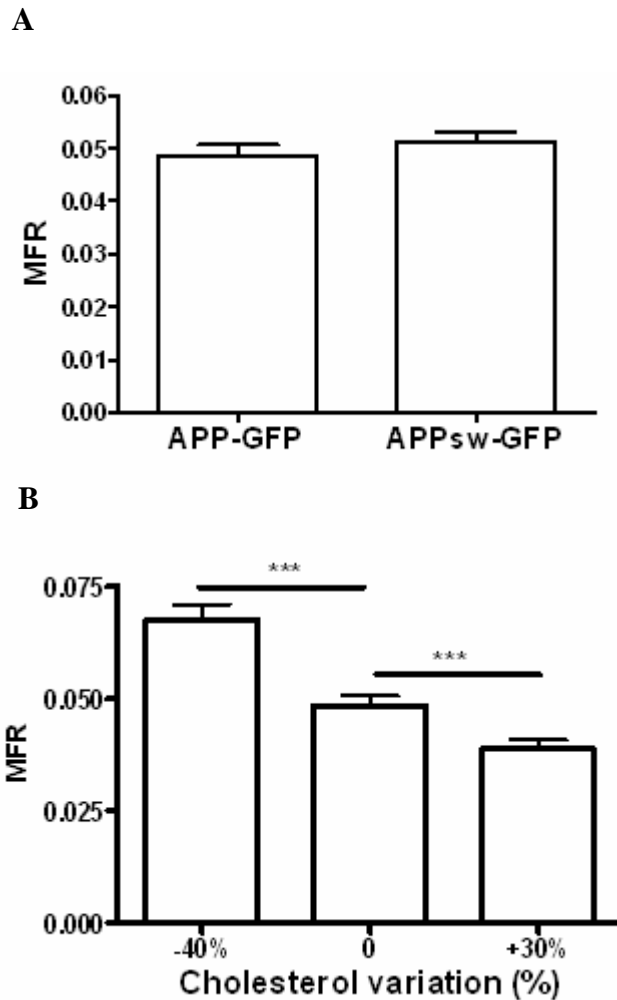


Supplementary Fig3. Endocytosis of APP in HEK293 cells.
 Confocal images of HEK293 cells transfected with APP-GFP and incubated at 37°C for 5 and 20 min with an APP N-terminal antibody (scale Scale bar, 10 μm)



Supplementary Fig4. Colocalization of APP positive endocytosed vesicles with EEA1 antibody.

HEK293 cells transfected with the APP^{sw} plasmid were incubated with an APP N-terminal antibody for 12 min. The membrane bound antibody was removed by treatment with trypsin and cells were fixed. Cells were incubated with a rabbit antibody against the early endosome antigen protein 1 (EEA1). Both APP N-terminal antibody and EEA1 antibody were revealed with two different secondary antibodies. The overlay shows an example of cells transfected with APP^{sw} in which the majority of APP positive vesicles correspond to early endosomes. Scale bar, 4 μ m



Supplementary Fig5. Comparison of the GFP fluorescence in HEK293 cells transfected with APP-GFP and APP_{sw}-GFP. Effects of cholesterol on the membrane/intracellular GFP fluorescence ratio (MFR) in HEK293 cells transfected with APP-GFP.

(A) The membrane/intracellular ratio of GFP fluorescence is similar in HEK293 cells transfected with APP-GFP or APP_{sw}-GFP. (B) The effects of cholesterol modulating drugs on the membrane/intracellular ratio (MFR) are similar for APP-GFP and APP_{sw}-GFP (here APP-GFP and Fig. 2B for APP_{sw}-GFP).

References

1. Cataldo, A. M., Barnett, J. L., Pieroni, C., and Nixon, R. A. (1997) *J Neurosci* **17**, 6142-6151
2. Cataldo, A., Rebeck, G. W., Ghetri, B., Hulette, C., Lippa, C., Van Broeckhoven, C., van Duijn, C., Cras, P., Bogdanovic, N., Bird, T., Peterhoff, C., and Nixon, R. (2001) *Ann Neurol* **50**, 661-665
3. Cataldo, A. M., Peterhoff, C. M., Troncoso, J. C., Gomez-Isla, T., Hyman, B. T., and Nixon, R. A. (2000) *Am J Pathol* **157**, 277-286
4. Cataldo, A. M., Petanceska, S., Terio, N. B., Peterhoff, C. M., Durham, R., Mercken, M., Mehta, P. D., Buxbaum, J., Haroutunian, V., and Nixon, R. A. (2004) *Neurobiol Aging* **25**, 1263-1272
5. Koo, E. H., and Squazzo, S. L. (1994) *J Biol Chem* **269**, 17386-17389
6. Ehehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C., and Simons, K. (2003) *J Cell Biol* **160**, 113-123
7. Grbovic, O. M., Mathews, P. M., Jiang, Y., Schmidt, S. D., Dinakar, R., Summers-Terio, N. B., Ceresa, B. P., Nixon, R. A., and Cataldo, A. M. (2003) *J Biol Chem* **278**, 31261-31268
8. Carey, R. M., Balcz, B. A., Lopez-Coviella, I., and Slack, B. E. (2005) *BMC Cell Biol* **6**, 30
9. Simons, M., Keller, P., De Strooper, B., Beyreuther, K., Dotti, C. G., and Simons, K. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6460-6464
10. Kojro, E., Gimpl, G., Lammich, S., Marz, W., and Fahrenholz, F. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5815-5820
11. Guardia-Laguarta, C., Coma, M., Pera, M., Clarimon, J., Sereno, L., Agullo, J. M., Molina-Porcel, L., Gallardo, E., Deng, A., Berezovska, O., Hyman, B. T., Blesa, R., Gomez-Isla, T., and Lleó, A. (2009) *J Neurochem*
12. Carter, C. J. (2007) *Neurochem Int* **50**, 12-38
13. Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Roses, A. D., Haines, J. L., and Pericak-Vance, M. A. (1993) *Science* **261**, 921-923
14. Kalmijn, S., Launer, L. J., Ott, A., Witteman, J. C., Hofman, A., and Breteler, M. M. (1997) *Ann Neurol* **42**, 776-782

15. Wolozin, B., Kellman, W., Ruosseau, P., Celesia, G. G., and Siegel, G. (2000) *Arch Neurol* **57**, 1439-1443
16. Fassbender, K., Simons, M., Bergmann, C., Stroick, M., Lutjohann, D., Keller, P., Runz, H., Kuhl, S., Bertsch, T., von Bergmann, K., Hennerici, M., Beyreuther, K., and Hartmann, T. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5856-5861
17. Yamazaki, T., Selkoe, D. J., and Koo, E. H. (1995) *J Cell Biol* **129**, 431-442
18. Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A. Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I., and Selkoe, D. J. (1992) *Nature* **360**, 672-674
19. Letierrier, C., Bonnard, D., Carrel, D., Rossier, J., and Lenkei, Z. (2004) *J Biol Chem* **279**, 36013-36021
20. Motley, A., Bright, N. A., Seaman, M. N., and Robinson, M. S. (2003) *J Cell Biol* **162**, 909-918
21. Kang, M. J., Chung, Y. H., Hwang, C. I., Murata, M., Fujimoto, T., Mook-Jung, I. H., Cha, C. I., and Park, W. Y. (2006) *Exp Mol Med* **38**, 126-133
22. Goslin, K., and Banker, G. (1989) *J Cell Biol* **108**, 1507-1516
23. Jolimay, N., Franck, L., Langlois, X., Hamon, M., and Darmon, M. (2000) *J Neurosci* **20**, 9111-9118
24. Cataldo, A. M., Mathews, P. M., Boiteau, A. B., Hassinger, L. C., Peterhoff, C. M., Jiang, Y., Mullaney, K., Neve, R. L., Gruenberg, J., and Nixon, R. A. (2008) *Am J Pathol* **173**, 370-384
25. Simons, K., and Ikonen, E. (1997) *Nature* **387**, 569-572
26. Barman, S., and Nayak, D. P. (2007) *J Virol* **81**, 12169-12178
27. Grimm, M. O., Grimm, H. S., Tomic, I., Beyreuther, K., Hartmann, T., and Bergmann, C. (2008) *J Biol Chem* **283**, 11302-11311
28. Cirrito, J. R., Kang, J. E., Lee, J., Stewart, F. R., Verges, D. K., Silverio, L. M., Bu, G., Mennerick, S., and Holtzman, D. M. (2008) *Neuron* **58**, 42-51
29. Schneider, A., Rajendran, L., Honsho, M., Gralle, M., Donnert, G., Wouters, F., Hell, S. W., and Simons, M. (2008) *J Neurosci* **28**, 2874-2882
30. Collawn, J. F., Lai, A., Domingo, D., Fitch, M., Hatton, S., and Trowbridge, I. S. (1993) *J Biol Chem* **268**, 21686-21692
31. Lai, A., Sisodia, S. S., and Trowbridge, I. S. (1995) *J Biol Chem* **270**, 3565-3573
32. Bouillot, C., Prochiantz, A., Rougon, G., and Allinquant, B. (1996) *J Biol Chem* **271**, 7640-7644

33. Beel, A. J., Mobley, C. K., Kim, H. J., Tian, F., Hadziselimovic, A., Jap, B., Prestegard, J. H., and Sanders, C. R. (2008) *Biochemistry* **47**, 9428-9446
34. Laifenfeld, D., Patzek, L. J., McPhie, D. L., Chen, Y., Levites, Y., Cataldo, A. M., and Neve, R. L. (2007) *J Neurosci* **27**, 7141-7153
35. Bucci, C., Parton, R. G., Mather, I. H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B., and Zerial, M. (1992) *Cell* **70**, 715-728
36. Roberts, R. L., Barbieri, M. A., Pryse, K. M., Chua, M., Morisaki, J. H., and Stahl, P. D. (1999) *J Cell Sci* **112 (Pt 21)**, 3667-3675
37. Cutler, R. G., Kelly, J., Storie, K., Pedersen, W. A., Tammara, A., Hatanpaa, K., Troncoso, J. C., and Mattson, M. P. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2070-2075
38. Xiong, H., Callaghan, D., Jones, A., Walker, D. G., Lue, L. F., Beach, T. G., Sue, L. I., Woulfe, J., Xu, H., Stanimirovic, D. B., and Zhang, W. (2008) *Neurobiol Dis* **29**, 422-437
39. Gylys, K. H., Fein, J. A., Yang, F., Miller, C. A., and Cole, G. M. (2007) *Neurobiol Aging* **28**, 8-17

1.2 Résumé des résultats

Un traitement de 30 minutes aux concentrations de 0.5mM et 1.4mM avec le complexe MBCD-cholestérol augmente respectivement le taux de cholestérol membranaire de 15% et 40% dans les lignées cellulaires non-neuronales HEK293. Ce traitement cause une augmentation de la taille des vésicules positives pour EEA1 (un marqueur des endosomes précoces) dans les cellules HEK et dans les cultures primaires de neurones.

Parce que la morphologie des endosomes élargis retrouvés dans la maladie d'Alzheimer ressemble à celle observée après traitement au cholestérol et que l'APP est présent dans ces endosomes élargis, nous avons fait l'hypothèse qu'il pourrait y avoir une augmentation de la présence et du clivage de l'APP dans ces structures endosomales.

Pour valider notre hypothèse, nous avons établi des lignées stables surexprimant l'APP couplé à une protéine fluorescente GFP en C-terminal. Après incubation d'un anticorps dirigé contre la partie extracellulaire N-terminal de l'APP à 37°C sur ces cellules HEK, nous avons mis en évidence une augmentation de la taille des endosomes précoces positifs pour l'APP quand la membrane plasmique était enrichie en cholestérol. L'augmentation de la taille des endosomes est corrélée à une endocytose accrue puisque l'on détecte par cytométrie en flux une augmentation de l'APP endocyté. Pour confirmer ces résultats, nous avons mesuré le rapport de la fluorescence de la GFP à la membrane plasmique par rapport à la GFP intracellulaire. Une charge en cholestérol diminue ce rapport de manière significative.

Cet excès d'endocytose de l'APP après traitement au MBCD-cholestérol passe par la voie dépendante de Rab5, de la dynamine-2 et finalement de la clathrine. En effet, les mutants dominants négatifs de la dynamine et de la petite GTPase Rab5 ainsi que l'ARN interférence contre l'ARNm de la clathrine bloquent l'excès d'endocytose de l'APP après traitement avec le complexe MBCD-cholestérol.

Enfin, nous confirmons une augmentation de la sécrétion du peptide amyloïde après traitement avec le complexe MBCD-cholestérol. Cette augmentation passe au moins par l'augmentation de la production du fragment C99 issu du clivage par la β -sécrétase. Cette sécrétion accrue de peptide amyloïde causée par l'excès de cholestérol est inhibée par la transfection du siRNA contre l'ARNm de la chaîne lourde de clathrine.

Nous avons donc démontré qu'une charge de cholestérol comprise entre +15% et +40% conduit à l'augmentation de l'endocytose de l'APP dépendante de la clathrine. Cet excès d'APP dans les endosomes précoces est corrélé avec une augmentation de la taille des endosomes, du clivage β -sécrétase et de la sécrétion du peptide amyloïde. Il semble également

que l'effet du cholestérol sur l'endocytose soit sélectif puisqu'un excès de cholestérol à la membrane plasmique ne modifie pas le taux d'endocytose des récepteurs à la transferrine et cannabinoïde de type 1.

1.3 Données supplémentaires

1.3.1 L'excès de cholestérol à la membrane plasmique va dans les radeaux lipidiques où l'APP se concentre

Les microdomaines de la membrane plasmique enrichis en cholestérol, appelés radeaux lipidiques sont considérés comme des plates-formes de regroupement et de concentration de l'APP (Ehehalt et al., 2003). L'APP est présent dans les régions membranaires résistantes aux détergents, correspondant aux radeaux lipidiques (Bouillot et al., 1996). Nous nous sommes demandés si une charge en cholestérol à la membrane plasmique modifiait la distribution de l'APP.

Protocole d'isolation des radeaux lipidiques :

Notre méthode n'utilise pas de détergent pour isoler les radeaux lipidiques (Song et al., 1996). Les cellules surexprimant l'APPsw-GFP de manière stable ont été collectées après un traitement avec la MBCD-cholestérol (1.4mM) pendant 30 minutes (+40%) ou sans traitement, puis lysées dans 1ml de carbonate de sodium (0.5M) et diluées dans du tampon MBS (25mM d'acide morpholinethanesulfonique, 150mM de chlorure de sodium, 2mM d'EDTA et avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases de Roche). Après une étape de sonication, les protéines sont séparées sur un gradient de iodixanol par ultracentrifugation à 200000g pendant 20 heures. Les fractions sont analysées par western blot SDS PAGE. Les membranes ont été hybridées avec un anticorps qui détectait la GFP (Sigma), la flotilline-2 (Santa Cruz) ou la β -actine (Abcam). Les quantifications ont été réalisées en utilisant le logiciel ImageJ.

Les fractions 1 et 4 positives pour la flotilline-2 correspondent aux radeaux lipidiques. 25% de l'APPsw-GFP total est présent dans les fractions 1 et 4 dans les cellules contrôles (Fig 21A). En mesurant le taux de cholestérol dans les différentes fractions, nous avons trouvé que l'excès de cholestérol à la membrane plasmique après traitement se localisait préférentiellement dans les fractions 1 et 4 ($p=0.0222$, One-way ANOVA) (Fig. 21C). La charge en cholestérol induit une augmentation de 50% de la présence d'APPsw dans les fractions positives pour la flotilline-2 et une diminution dans les fractions négatives pour la flotilline-2 (2, 3, 5, 6 et 7) (Fig 21A et 21B).

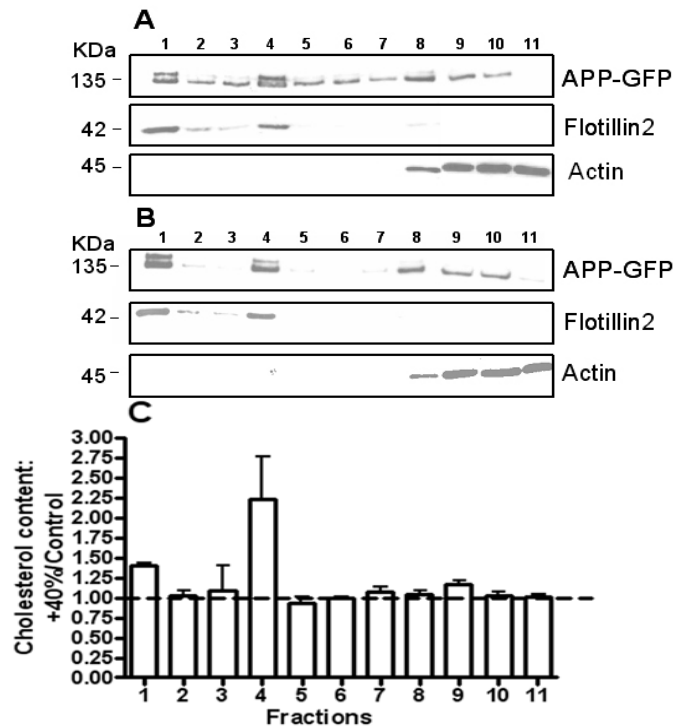


Figure 21 : Relocalisation de l'APPsw-GFP dans les fractions positives pour la flotilline-2 après traitement au cholestérol

(A) Western blot des cellules HEK293 contrôles, (B) Western blot des cellules HEK293 traitées avec la MBCD-cholestérol (+40%), (C) Ratios des concentrations en cholestérol entre les fractions des cellules enrichies en cholestérol et les fractions non traitées. 2 expériences indépendantes.

Nous concluons donc que l'excès de cholestérol apporté par la MBCD va préférentiellement dans les régions déjà riches en cholestérol et relocalise l'APPsw-GFP vers les fractions positives pour la flotilline -2, qui correspondraient aux radeaux lipidiques.

1.3.2 Dimérisation de l'APP à la surface cellulaire

Afin d'aller plus loin dans l'analyse de l'effet du cholestérol sur la redistribution de l'APP à la membrane plasmique nous avons décidé d'analyser la dimérisation de l'APP. En effet, si l'APP se concentre dans les radeaux lipidiques sous l'effet du cholestérol, nous devrions observer une augmentation de l'homodimérisation de l'APP par les techniques de FRET (Förster Resonance Energy Transfer). Il s'agit d'un processus dans lequel l'énergie d'un fluorophore dans un état excité (le donneur) est transférée de façon non radiative à un autre chromophore (l'accepteur), qui peut être fluorescent (Jares-Erijman and Jovin, 2003) (Fig. 22A). Le couplage des dipôles de transition (dipôle d'émission pour le donneur et dipôle

d'absorption pour l'accepteur) des deux fluorophores provoque une désexcitation du donneur et une excitation de l'accepteur. Le transfert va dépendre du recouvrement des spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur, de l'orientation relative des moments des dipôles, et bien sûr de la distance entre donneur et accepteur. Ainsi, un transfert d'énergie indique que les deux protéines d'intérêt sont à proximité. Lorsqu'un transfert FRET se produit, l'intensité de fluorescence du donneur diminue alors que celle de l'accepteur augmente. Mais les mesures d'intensité sont gênées par des artefacts expérimentaux dus au recouvrement des spectres d'excitation et des spectres de détection des deux fluorophores. Ainsi, la mesure du temps de vie de fluorescence semble être la technique la plus commune pour quantifier le FRET (Wallrabe and Periasamy, 2005) car le transfert d'énergie du fluorophore donneur conduit à un déclin plus rapide de son état excité. De plus la mesure du temps de vie de fluorescence conserve ses avantages, à savoir notamment son indépendance vis-à-vis de la concentration du fluorophore et du chemin optique suivi par la fluorescence (Pelet et al., 2006). Cette méthode de détection du FRET est appelée FLIM pour « Fluorescent Lifetime Imaging Microscopy ».

Afin de mesurer la dimérisation de l'APP spécifiquement à la membrane plasmique, nous avons établi une collaboration avec l'équipe de Sandrine Lévêque-Fort à Orsay (centre de photonique Biomédicale) qui maîtrise la technologie de microscopie TIRF (total internal reflection fluorescence) couplée à la détection de FRET par FLIM (TIRFLIM). Le principe de la microscopie TIRF est l'utilisation de l'onde évanescente pour recueillir la fluorescence d'une région restreinte de l'échantillon immédiatement adjacente à l'interface air/verre. L'onde évanescente est générée seulement quand le rayon incident est totalement réfléchi à l'interface. Le champ électromagnétique évanescent décroît exponentiellement à partir de l'interface et pénètre seulement d'environ 100nm dans l'échantillon. Donc, la microscopie TIRF permet de visualiser la surface de la cellule.

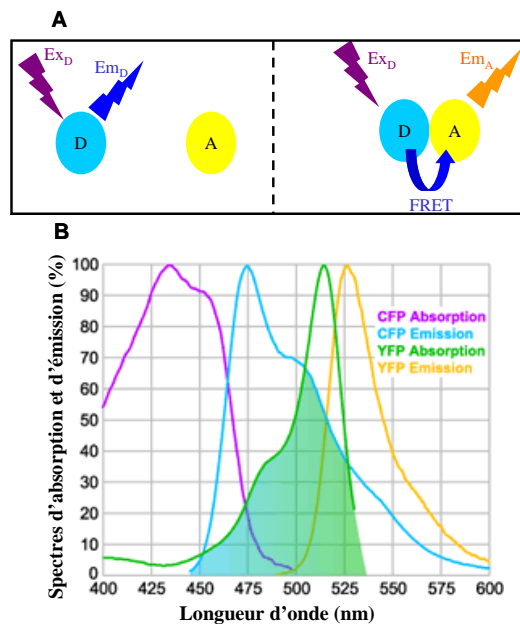


Figure 22 : (A) schéma de principe du FRET. D est l'indice pour le donneur et A celui de l'accepteur. Ex signifie excitation, et Em émission. A gauche, la distance entre donneur et accepteur est trop importante pour qu'il y ait du FRET : ainsi, en excitant l'accepteur, on observe l'émission de l'accepteur. A droite, un transfert FRET est possible, et en excitant le donneur, nous observons la fluorescence de l'accepteur. (B) Recouvrement entre les spectres d'émission du donneur (CFP) et d'absorption de l'accepteur (YFP).

Le montage du dispositif microscopique a été réalisé par Pierre Blandin, à l'époque doctorant dans l'équipe de Sandrine Lévêque-Fort (Blandin et al., 2009), voir annexe). Nous avons apporté l'application biologique, validée par Pierre Blandin et moi-même. Catherine Marquer, post-doctorante dans notre laboratoire et Vivianne Devauges, doctorante dans l'équipe de Sandrine Lévêque-Fort ont pris la relève. Le protocole mis en place est simple. Les cellules HEK sont co-transfectées avec les plasmides APP-GFP et APP-mCherry en utilisant le kit Effecten (Qiagen). Notons que nous avons d'abord tenté le couple APP-CFP/APP-YFP, mais il s'est révélé instable (Tramier et al., 2006). Les spectres d'absorbance de la CFP et l'YFP sont représentés sur la figure 22B. 48h après la transfection les cellules sont observées au microscope. Les contrôles négatifs sont les transfections suivantes : APP-GFP seul, APP-GFP/mcherry, et les contrôles positifs : un plasmide qui code pour une protéine tandem avec la GFP à une extrémité et la mcherry de l'autre et les plasmides APPmuté-GFP/APPmuté-mCherry. Cette mutation dans l'APP (L17C : 17^{ème} résidu du peptide amyloïde) que j'ai inséré par mutagenèse dirigée (Quikchange) permet la création d'un pont disulfure entre les deux cystéines et stabilise ainsi la dimérisation de l'APPmuté (fig. 23) (Munter et al., 2007).

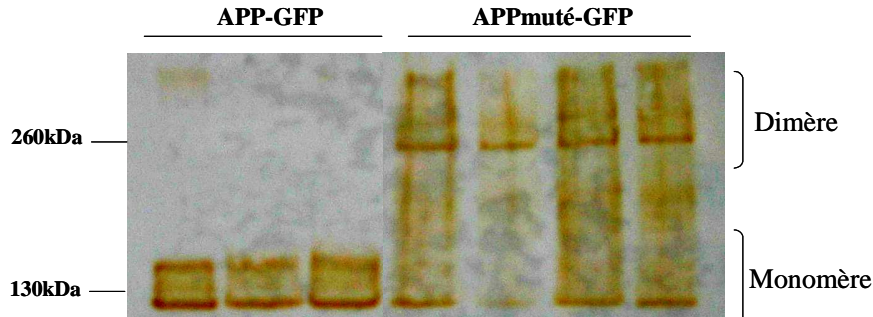


Figure 23 : Augmentation de l'homodimérisation de l'APPmuté observée par western blot

Voici les premiers résultats obtenus :

Le tableau 4 résume les temps de vie des contrôles négatifs. Alors que le temps de vie de l'APP-GFP (ou APPmuté-GFP) est de l'ordre de 2300ps, la cotransfection APP-GFP/mCherry diminue le temps de vie indiquant un FRET entre ces deux molécules. Cette diminution peut s'expliquer par un bruit de fond occasionné par une abondance de protéine mCherry diffuse dans le cytoplasme. Il serait sans doute préférable d'utiliser une protéine membranaire couplée à la mCherry qui n'interagit pas avec l'APP comme contrôle négatif.

Contrôles négatifs	APP-GFP	Mutant APP-GFP	APP-GFP/mCherry
Moyenne du temps de vie (ps)	2340	2335	2040
Ecart-type moyen (ps)	39	32	69
Cellules (N)	12	12	12

Tableau 4 : Temps de vie et écart type moyen de 12 cellules HEK-293 transfectées avec l'APP-GFP, l'APPmuté-GFP ou cotransfectées avec l'APP-GFP et le plasmide mCherry.

Le tableau 5 résume les temps de vie des expériences menées pour mesurer une dimérisation de l'APP. Après analyses statistiques, nous pouvons affirmer qu'il y a du FRET entre APP-GFP/APP-mCherry ($p=0.0114$ par rapport au couple APP-GFP/mCherry, t-test) ; et davantage entre APPmuté-GFP/APPmuté-mCherry ($p<0.0001$ par rapport au couple APP-GFP/APP-mCherry, t-test). La figure 24 représente une situation contrôle sans FRET (APPmuté-GFP) et une situation avec FRET (APPmuté-GFP/APPmuté-mCherry) mesurées par FLIM.

Nous concluons donc que deux molécules d'APP semblent capables de dimériser à la membrane plasmique. La prochaine étape sera de faire varier le cholestérol à la membrane plasmique de la cellule pour tenter d'observer une modulation du FRET et donc des interactions entre molécules d'APP. Notons qu'il serait préférable de valider la dimérisation de l'APP par une autre technique. Comme la dimérisation entre deux molécules d'APP n'est pas visible par western blot, la mesure par anisotropie de fluorescence semble la plus adaptée.

Mesures	APP-GFP/APP-mCherry	Mutant APP-GFP/Mutant APP-mCherry
Moyenne du temps de vie (ps)	1946.2	1816
Ecart-type moyen (ps)	77	49
Cellules (N)	8	22

Tableau 5 : Temps de vie et écart-type moyen de cellules HEK-293 cotransfectées avec l'APP-GFP (ou APPmuté-GFP) et APP-mCherry (ou APPmuté-mCherry)

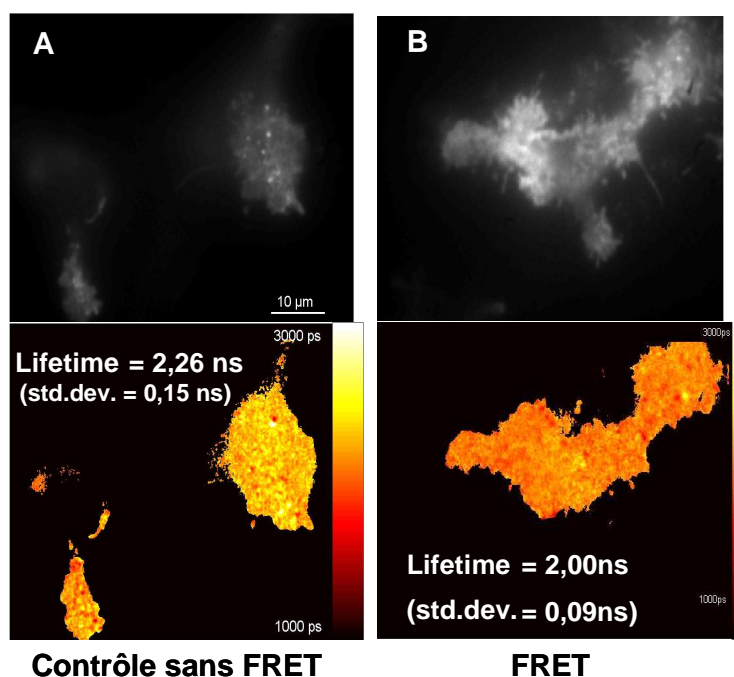


Figure 24: Images d'intensité de fluorescence par microscopie TIRF (haut) et représentations du temps de vie (TIRFLIM) de la GFP (bas) de cellules HEK-293 transfectées avec l'APPmuté-GFP (A) ou cotransfectées avec l'APPmuté-GFP et l'APPmuté-mCherry (B).

2. La synaptojanine-1 est le gène responsable de l'élargissement des endosomes précoces dans les lymphocytes de patients porteur d'une trisomie 21

2.1 Article (en anglais)

Trisomy for synaptojanin1 in Down syndrome is functionally linked to the enlargement of early endosomes, the first morphological evidence of Alzheimer's disease.

J.-C. Cossec¹, A. Hoischen², S. Stora³, C. Ripoll⁴, M. Lecourtois⁵, C. Mircher³, Y. Grattau³, C. Duyckaerts¹, S.E. Antonarakis⁶, J.A. Veltman², J. Delabar⁴, and M.-C. Potier¹

¹CRICM CNRS UMR7225, INSERM UMR975, UPMC, Pitié-Salpêtrière Hospital, 47, Bd de l'Hôpital 75013 Paris, France; ²Dept. of Human Genet., Radboud Univ. Nijmegen Med. Centre, Nijmegen, Netherlands; ³Institut Jérôme Lejeune, France ; ⁴BFA, CNRS EAC7059, Paris, France ; ⁵INSERM U614, Rouen, France; ⁶Univ. of Geneva Med. Sch., Geneva, Switzerland.

Enlarged endosomes are the first morphological change observed in the brain of Alzheimer's disease and Down syndrome patients. Here we demonstrate their presence in blood mononuclear and lymphoblastoid cells from Down syndrome patients and found that triplication of a 1.3 Mb locus from chromosome 21 containing the synaptojanin 1 gene is associated with the phenotype. Synaptojanin 1 overexpression in neuroblastoma cells is involved in this phenotype.

Enlarged endosomes are believed to be the first morphological change observed in Alzheimer's disease brains (AD) even preceding the deposition of amyloid- β peptide (A β) (Cataldo et al., 1997). They are found in sporadic cases with no pathological evidence of AD yet and in Down syndrome (DS) as early as 28 weeks of gestation (Cataldo et al., 2000). Since amyloid- β peptide (A β) deposits are found in the brains of AD and DS patients, and the gene encoding for the amyloid precursor protein (APP) from which A β is produced by enzymatic processing, maps to 21q21, it is tempting to hypothesize that the APP locus is the major genetic determinant of AD neuropathology in DS. However in familial AD where A β overproduction is associated with mutations in the presenilin genes, the endosomal compartment appears to be unchanged (Cataldo et al., 2001). We thus searched for other factors that could modify the endosome morphology in DS, focusing on chromosome 21 (Hsa21). In primary fibroblasts from DS patients, enlarged endosomes, late endocytic defects and an acceleration of endocytosis accompanied with an apparent increase in endosomal proteins such as Rab5 have been demonstrated (Cataldo et al., 2008). We first searched for the

presence of enlarged endosomes in blood cells and in transformed lymphocytes from DS patients.

Blood mononuclear cells were isolated on a Ficoll gradient and cultured for a few hours at 37°C to let them recover. Early endosomes were labelled by immunofluorescence with an antibody against the early endosome antigen protein EEA1 (Supplementary file 1). Using confocal microscopy, we showed that the mean size of the endosomes observed at the equatorial section was significantly increased (30%; $p < 0.001$; $n = 10$ for DS and controls) in cells from DS patients as compared to age matched controls (Fig. 1A-C). The increase in the mean size was in fact due to the presence of a higher number of very large endosomes (size > 300nm) in cells from DS patients as shown on Fig. 1E-F.

We then measured the size of early endosomes in lymphoblastoid cell lines (LCL) generated by transformation of lymphocytes with the Epstein Bar virus. As in mononuclear blood cells, LCLs from DS patients contained large endosomes (Fig. 1E). The mean size as measured by immunofluorescence was 30% higher ($p < 0.001$; $n = 11$ for DS and $n = 8$ for controls). The levels of Rab5 were increased in LCLs from DS patients as shown by western blot (Supplementary file 2). We thus confirmed the presence of endocytic defects in blood cells from DS patients.

In order to identify the Hsa21 locus inducing these endocytic defects, we analyzed LCLs from 10 patients carrying either partial trisomies 21 or APP microduplications (Rovelet-Lecrux et al., 2006). The extend of the partial trisomies of all these cell lines (7 partial trisomies 21 and 3 APP microduplications) were characterized in detail by high resolution comparative genomic hybridization using chromosome 21 specific NimbleGen microarrays (Supplementary file 1).

Enlarged endosomes were absent in the 3 LCLs carrying APP microduplications. This result suggested that APP, although not very highly expressed in LCLs (Ait Yahya-Graison et al., 2007), is not involved in the enlargement of early endosomes in this cell type. In four out of seven LCLs from DS patients carrying partial trisomy 21 we could very clearly identify enlarged endosomes using immunofluorescence and confocal microscopy (Fig. 2A). By correlating the presence of enlarged endosomes to the genomic segment from Hsa21 triplicated we identified a 1.3Mb DNA segment containing 10 genes among which only 6 are expressed in LCLs: SOD1, SFRS15, C21orf45, C21orf59, C21orf66 and SYNJ1 (Ait Yahya-Graison et al., 2007). From this short list, one gene (SYNJ1) appeared as a good candidate. SYNJ1 gene codes for the phosphoinositide phosphatase synaptojanin 1 protein, a key regulator of the signalling phospholipids phosphatidylinositol-4,5-biphosphate

[PtdIns(4,5)P₂]. Over-expression of Synj1 gene in transgenic mice induces cognitive deficits suggesting that PtdIns(4,5)P₂ is involved in brain dysfunction in DS (Voronov et al., 2008). In addition PtdIns(4,5)P₂ has been shown to interact with clathrin coated pits and to regulate endocytosis (Kim et al., 2002) (Perera et al., 2006) (Mani et al., 2007) (Gong and De Camilli, 2008). Recently it was shown to play a key role in astroglialogenesis (Herrera et al., 2009). We showed previously that SYNJ1 transcripts are overexpressed in LCL from DS patients (Ait Yahya-Graison et al., 2007) (Prandini et al., 2007). We thus transfected SHSY5Y neuroblastoma cells with the human SYNJ1 cDNA. Using immunofluorescence and confocal microscopy, we observed abnormally large endosomes in transfected cells as compared to non transfected cells (Fig. 2B). SOD1 over-expression in SHSY5Y cells did not change the apparent endosome morphology (Supplementary file 3). We thus concluded that synpatojanine1 over-expression, unlike SOD1 over-expression, leads to defects in endocytosis associated with morphological changes of the endosomes.

In conclusion, although we cannot exclude a putative role of SFRS15, C21orf45, C21orf59 or C21orf66, our preliminary results suggest that synpatojanine1 but not SOD1 is involved in the “enlarged endosome” phenotype. Since A β is mainly produced within the endosomal compartment, in DS APP overexpression combined with a modification of early endosomal compartment due to synpatojanine1 overexpression could be responsible for the early AD neuropathology observed in these patients. Interestingly the elderly DS patient with no sign of AD pathology carrying a partial trisomy had two genomic copies of APP and of SYNJ1 (Prasher et al., 1998).

1. Cataldo, A.M., Barnett, J.L., Pieroni, C. & Nixon, R.A. *J Neurosci* 17, 6142-51 (1997).
2. Cataldo, A.M. et al. *Am J Pathol* 157, 277-86 (2000).
3. Cataldo, A. et al. *Ann Neurol* 50, 661-5 (2001).
4. Cataldo, A.M. et al. *Am J Pathol* 173, 370-84 (2008).
5. Rovelet-Lecrux, A. et al. *Nat Genet* 38, 24-6 (2006).
6. Ait Yahya-Graison, E. et al. *Am J Hum Genet* 81, 475-91 (2007).
7. Voronov, S.V. et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 9415-20 (2008).
8. Kim, W.T. et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 17143-8 (2002).
9. Perera, R.M., Zoncu, R., Lucast, L., De Camilli, P. & Toomre, D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19332-7 (2006).

10. Mani, M. et al. *Neuron* 56, 1004-18 (2007).
11. Gong, L.W. & De Camilli, P. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 17561-6 (2008).
12. Herrera, F., Chen, Q., Fischer, W.H., Maher, P. & Schubert, D.R. *Cell Death Differ* (2009).
13. Prandini, P. et al. *Am J Hum Genet* 81, 252-63 (2007).
14. Prasher, V.P. et al. *Ann Neurol* 43, 380-3 (1998).

Acknowledgments: The authors wish to thank Dr. Menten from the Department of Pediatrics and Medical Genetics, Gent University, Belgium for providing material of case 5, Drs. Di Paolo and Groner for their gifts of synaptojanin 1 and Sod 1 plasmids respectively, Dr. Campion for very helpful discussions on the manuscript, the EU AnEUploidy grant, the Fondation Jérôme Lejeune, the ANR ChoAD and the ICM Fondation for their financial support. JCC had a fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale.

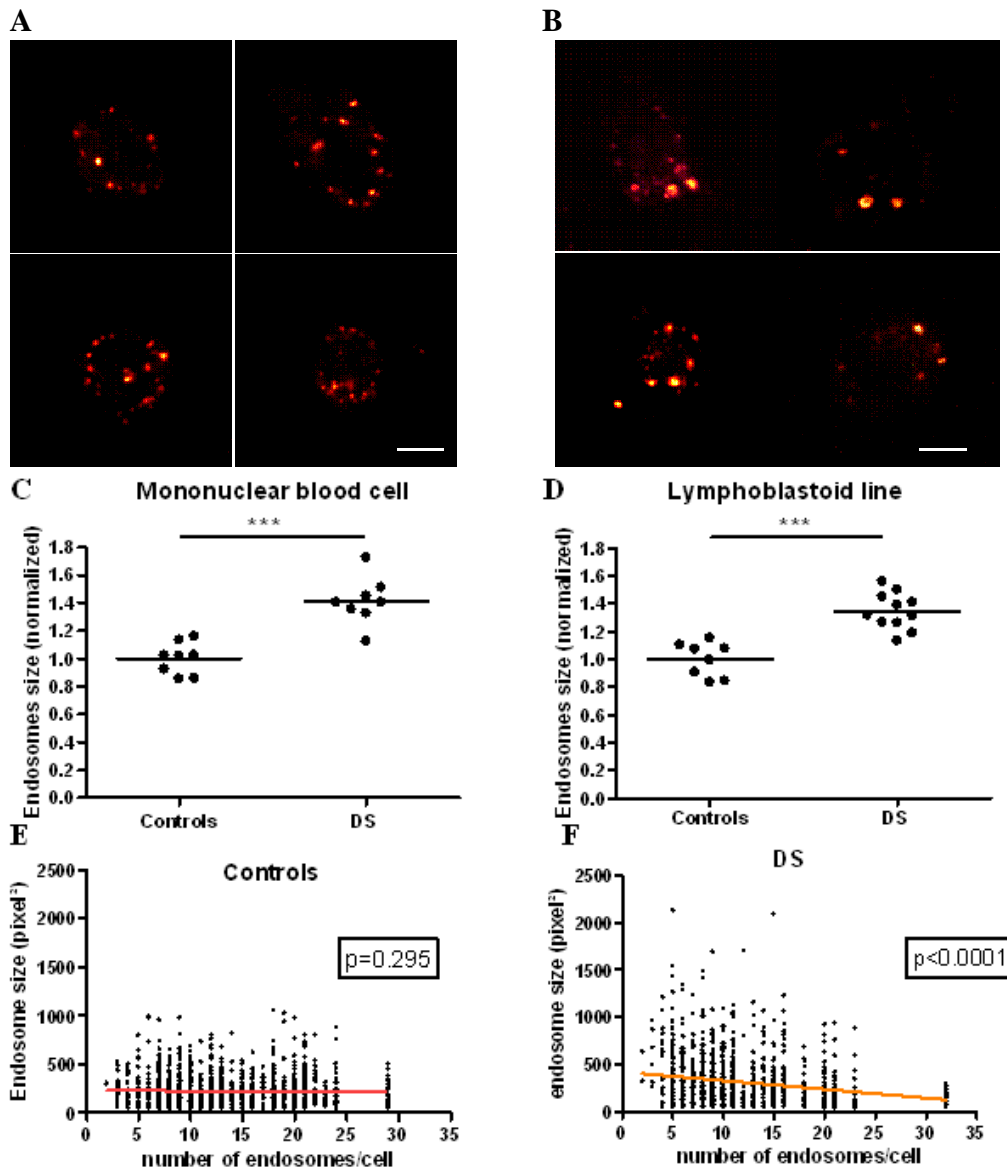


Figure 1: Endosome enlargement in lymphoblastoid cell lines and in mononuclear blood cells from DS patients.

Early endosomes of cells from healthy volunteers (A) or DS patients (B) were labelled with an anti-EEA1 antibody. Endosome size was measured on 12 individual cells from lymphoblastoid cell lines (LCL) of 8 controls and 11 DS patients. The same protocol was applied to mononuclear blood cells of 8 controls and 8 DS patients. The size of endosomes was significantly increased in DS both in LCLs (D, $p<0.001$) and in mononuclear blood cells (C, $p<0.001$). In control LCLs (E) the endosomes were evenly distributed according to their size (the slope of the red line was not different from 0, $p=0.295$). On the contrary, in LCLs from DS patients, enlarged endosomes were more frequently present in cells containing fewer endosomes (F, $p<0.001$) suggesting an increase of endosomal fusion. Scale bar = 4 μ m.

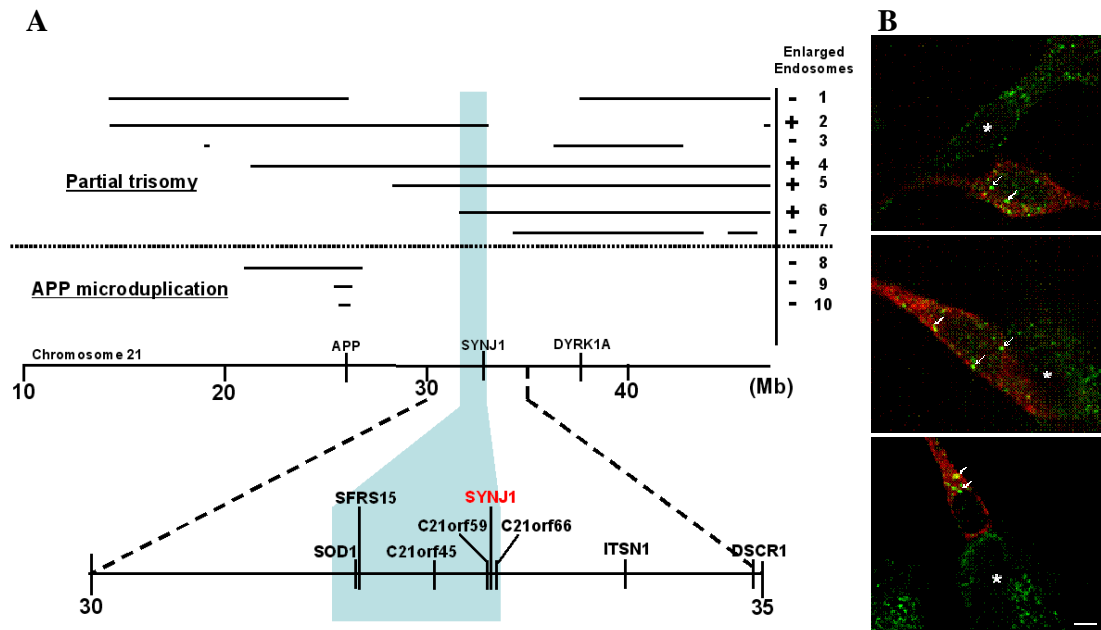


Figure 2: Mapping of the locus from chromosome 21 responsible for the enlargement of endosomes in DS.

(A) LCLs from 7 partial trisomies and 3 APP microduplications, characterized by CGH, were analyzed for their endosome size. Only cell lines 2, 4, 5 and 6 showed enlarged endosomes thus shrinking the genetic interval to 1.3Mb on chromosome 21. Six genes expressed in LCLs were present on the region of interest (A, bottom). (B) SH-SY5Y neuronal cells were transfected with the Flag-synaptojanin 1 plasmid and the endosomes were detected using an anti-EEA1 antibody (green); transfected cells were visualized using an anti-Flag monoclonal antibody (red). * nucleus of untransfected cells. White arrows indicate enlarged endosomes in cells overexpressing Flag-synaptojanin-1. Scale bar = 4µm.

Supplementary file 1:

Cell cultures:

Mononuclear blood cells

Heparinized blood samples were obtained from 10 healthy volunteers and 10 patients with DS. All blood donors gave their informed consent for the participation in this study. The mononuclear cell fraction (MNCF) was isolated by carefully loading 4 ml of blood diluted in 8 ml of PBS onto 3 ml of Pancoll Separating Solution (PANTMBIOTECH GmbH) at room temperature. After centrifugation 10 min at room temperature at 1000 g, the MNCF was collected with a pipette (a membrane prevented contamination with the granulocytes/erythrocytes). The MNCF was washed twice with PBS by centrifugation at 250 g for 10 minutes. Three millions cells per blood sample were re-suspended in RPMI 1640-GlutaMAXTM (Invitrogen) supplemented with 10% FBS (Invitrogen) and transferred to culture dishes for 2 hours.

Lymphoblastoïde cells lines (LCL)

LCLs were derived from the B lymphocytes of patients with DS collected from the cytogenetic service of the hospital Necker Enfants Malades and the Institut Jérôme Lejeune. Parents of patients from the Institut Jérôme Lejeune gave their informed consent, and the French biomedical ethics committee gave its approval for this study (Comité de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale number 03025). Written informed consent was obtained from the participants or from their families by the cytogenetic service of Hôpital Necker Enfants Malades. Cell lines from control individuals were also obtained with their written informed consent, for comparison of chromosome 21 gene-expression profiles. All cell lines were karyotyped, to confirm their trisomic or euploid status and also to verify that immortalization by the Epstein-Barr virus (EBV) did not produce any visible chromosomal rearrangement other than trisomy 21. Cells were harvested by centrifugation, washed in 5 ml PBS and stored at -80°C. Lymphoblastoid cells were grown in Opti-MEM supplemented with 10% fetal bovin serum (PAA).

Neuroblastoma cells SH-SY5Y

SH-SY5Y cells grown in DMEM medium F12 supplemented with 10% fetal bovin serum were transfected with the Flag-synnaptojanin-1 long isoform plasmid (gift of Dr. Di Paolo) or the SOD1 plasmid (gift of Dr. Groner) using lipofectamin LTX and Plus reagent (Invitrogen) and maintained 48 hours.

Immunofluorescence

After fixation (paraformaldehyde 4%), cells were washed with PBS, permeabilized using triton (0,1%) and incubated 1 hour with the rabbit polyclonal EEA1 antibody (1/200, Affinity Bioreagents), the sheep polyclonal SOD-1 antibody or the mouse monoclonal Flag M2 antibody (Sigma). Alexa-568 or Alexa-488 labelled secondary antibodies (Molecular Probes) were used to reveal the primary antibody (30 minutes, 1/400). Images (1024 x 1024 pixels) of individual cells were obtained on a Leica TCS NT confocal microscope using a x63, numerical aperture 1.4 oil immersion objective and x6 zoom. Each picture was obtained from the equatorial cross-section through the cell that maximized nuclear diameter. Co-detection of Alexa-488 and Alexa-568 fluorescence was done by excitation at 488 and 568 nm, using sequential detection. Endosomes were counted and analyzed using ImageJ.

Protein extraction and Immunoblot

Cells were washed twice, and extracted for 2 hours in a Tris buffer 0,05M containing 0,1M NaCl, 5mM EDTA, 1% Nonidet P-40 and a protease inhibitor cocktail (Roche). Cells debris were removed by centrifugation at 13000g. Protein concentration was determined using the Dc protein assay kit (BIO-RAD). For western blot analysis, 50µg of total protein per lane were loaded on a 4-12% gradient Bis-Tris gels under reducing conditions. Nitrocellulose membrane (Whatman) were probed with Rab5a (Santa Cruz) or Actin (Abcam) antibodies. After incubation with horseradish-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes) the signal was revealed using Immobilon Western chemoluminescent HRP substrate (Millipore).

Mapping the partial trisomies using ultra-high comparative genomic hybridization:

For detailed structural HSA 21 aberration detection, high resolution NimbleGen HG18 chromosome 21 specific 385K arrays were used (B3752001-00-01; Roche NimbleGen Systems, Madison, Wisconsin, USA). The 385K average probe distance was 70bp. DNA labeling, array hybridization, post-hybridization washes and scanning were essentially performed according to the manufacturer's instructions (Roche NimbleGen). The acquired images were analyzed using NimbleScan V2.4 extraction software (Roche NimbleGen). For each spot on the array, \log_2 Cy3/Cy5 ratio (relative intensity of the Cy3 labeled patient DNA vs. the Cy5 labeled male DNA reference pool of 5 healthy male individuals), was calculated using the segMNT algorithm, which also applied an automatic segment detection. A 50x averaging window was generated, resulting in 3500 bp segments for this array. Previously

determined breakpoints (e.g. by cytogenic or other array-CGH means), were re-analyzed and fine-mapped using the 3.5kb averaging window accuracy. Data were visualized in SignalMap V1.9 software (Roche NimbleGen).

Results of ultra-high resolution array CGH

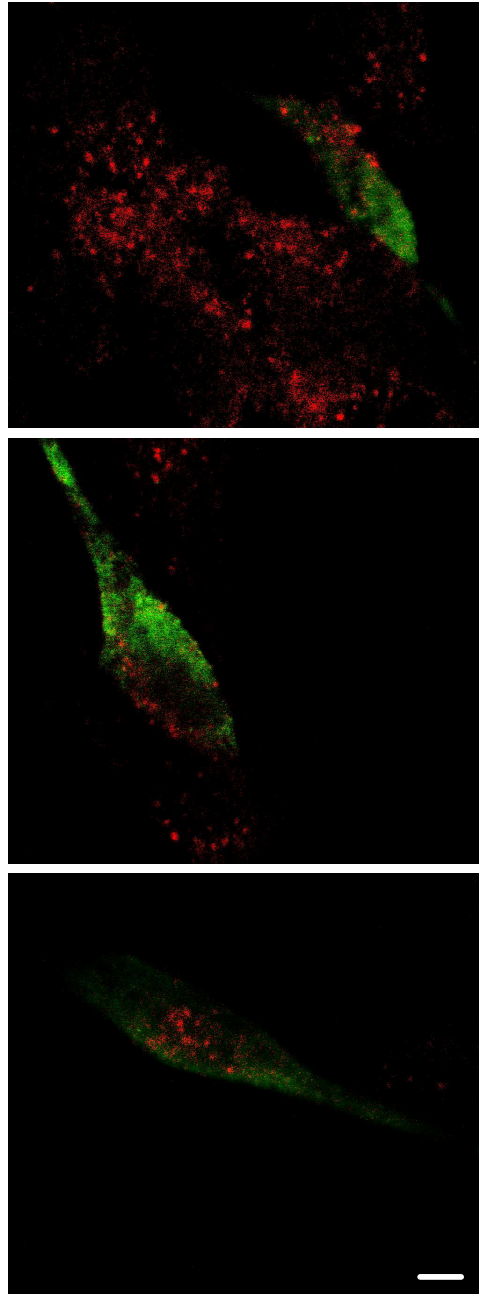
Present ID	Aberration 1		Aberration 2		Aberration size [Mb]
	Start [bp]	End [bp]	Start [bp]	End [bp]	
9, F037*	25,614,750	26,605,250	-	-	0.991
10, F028*	25,922,750	26,489,750	-	-	0.567
8, F229*	20,539,750	27,739,250	-	-	7.200
1	14,400,000	29,128,750	37,843,750	qter	23.829
2	14,400,000	33,094,250	46,719,750	qter	18.919
3	18,982,250	18,999,750	36,426,250	42,589,750	6.181
4	21,047,250	qter	-	-	25.897
5	28,390,250	qter	-	-	18.554
6	31,778,250	qter			15.166
7	34,343,750	43,706,250	44,896,250	46,422,250	10.889

*From Rovelet-Lecrux et al. Nat Genet 38, 24-6 (2006)

Supplementary file 2:

Effect of SOD1 overexpression on the size of early endosomes:

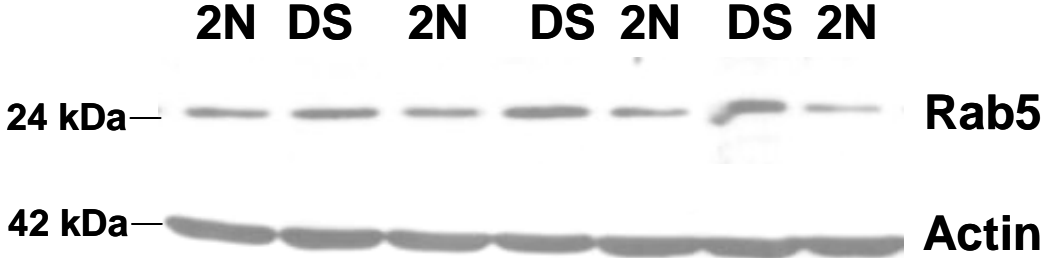
Endosomes were detected using an anti-EEA1 polyclonal antibody and Alexa-568 secondary antibody (red); transfected cells were visualized using an anti-SOD1 polyclonal antibody and Alexa-488 secondary antibody (green). The endosome size was not significantly different between transfected and untransfected cells. Scale bar = 4 μ m.



Supplementary file 3:

Overexpression of Rab5 in lymphoblastoid cell lines (LCL) from DS patients:

SDS PAGE of protein extracts from LCL of controls (2N) and DS patients. Rab5 was detected using specific polyclonal antibody (Santa Cruz). An anti-actin antibody (Abcam) was used to normalize samples.



2.2 Résumé des résultats

Après isolation des cellules mononucléaires sanguines de 8 individus porteurs de trisomie 21 et de 8 témoins, une immunocytochimie a été réalisée contre la protéine EEA1 pour mettre en évidence les endosomes précoces. L'analyse de la taille des endosomes montre une augmentation de l'aire des endosomes dans les cellules trisomiques (+35% $p < 0.001$). Le même phénotype est retrouvé dans les lignées immortalisées de lymphoblastoïdes trisomiques (+30%, $p < 0.001$). Ainsi, nous avons pu mettre en évidence dans des cellules périphériques, l'élargissement des endosomes retrouvé dans le cerveau des patients porteurs de trisomie 21.

Afin de réduire l'intervalle génétique expliquant l'élargissement des endosomes, nous avons utilisé 7 lignées lymphoblastoïdes de trisomie partielles et 3 microduplications du locus de l'APP. Aucune des microduplications n'a présenté d'endosomes élargis, contrairement à 4 lignées de trisomies partielles. Ceci a permis de limiter notre région d'intérêt à 1.3Mb.

Six gènes sont exprimés dans cette région dans les lignées dont deux très connus : la super oxyde dismutase 1 (SOD1) et la synaptojanine-1. Si la surexpression de SOD1 dans une lignée de type neuronale (cellules SH-SY5Y) ne conduit pas à la présence d'endosomes de tailles anormales, la surexpression de la synaptojanine-1 entraîne le phénotype recherché.

La présence en trois copies du gène de la synaptojanine-1 dans les cellules mononucléaires trisomiques semble donc élargir la taille des endosomes, première anomalie observée dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

2.3 Données supplémentaires

2.3.1 Création du modèle APPxTs1Cje et validation de l'élargissement des endosomes dans le modèle Ts65Dn

Les souris trisomiques 21 Ts65Dn présentent des endosomes élargis dans les neurones. Les modèles trisomiques 21 Ts1Cje (Fig. 6) et Ts65Dn^{APP +/+/-} (APP en 2 copies) ainsi que les souris transgéniques surexprimant l'APP (TgAPP) ne présentent pas le phénotype. Trois copies d'APP sont donc nécessaires mais pas suffisantes pour obtenir le phénotype. Afin de réduire l'intervalle responsable de l'élargissement des endosomes dans le cerveau de souris trisomiques 21 Ts65Dn, nous avons entrepris de croiser la lignée trisomique 21 Ts1Cje avec les souris TgAPP. Les souris Ts1Cje sont maintenues par croisement des mâles Ts1Cje avec des femelles sauvages sur un fond mixte B6C3SnF1/Orl. Les souris TgAPP (fond génétique FVN/N) possèdent 28 copies du transgène de l'APP humain (sous le promoteur de la protéine prion) conduisant à une surexpression de l'APP d'un facteur 1.6 par rapport à l'expression de l'APP endogène des souris sauvages (Hsiao et al., 1995).

Il est certain que les fonds génétiques différents peuvent influencer les résultats, mais pour un premier essai, il est tout de même intéressant d'observer la différence de taille des endosomes.

Nous avons sélectionné 6 souris Ts1Cje/TgAPP, 4 souris Ts1Cje/-, 4 souris -/TgAPP et 3 souris sauvages pour 4 croisements réalisés. Toutes les souris ont été génotypées par PCR (polymerase chain reaction) quantitative avec des amorces spécifiques du gène codant pour la Néomycine. En effet, les souris Ts1Cje possèdent une cassette Néo qui a été insérée dans la séquence codante du gène *Sod1* situé sur la partie dupliquée du chromosome 16.

Les amorces utilisées sont les suivantes :

5'-TATTCGCTATGACTGGGCACAAC-3'

5'-TTCAGTGACAACGTCGAGCACA-3'

Chaque réaction de PCR a été faite dans un capillaire en verre dans un volume de 20 μ l en utilisant le kit QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen). Le SYBR green est un intercalant de l'ADN qui émet une fluorescence lorsqu'il se fixe à l'ADN double brin. Le niveau de fluorescence dans chaque capillaire est donc proportionnel à la quantité d'ADN synthétisé. Le LightCycler mesure le niveau de fluorescence dans chaque capillaire à la fin de chaque cycle de PCR. La phase exponentielle de réplification des échantillons d'ADN contenant la cassette Neo, correspondant aux animaux Ts1Cje, se situe autour de 24 cycles de PCR. Les échantillons contrôles ne possédant pas la cassette Néo ne présentent pas d'élévation de

fluorescence avant 35 cycles (cette fluorescence témoigne d'une réaction non spécifique due aux complexes d'amorces). Toutes les mesures ont été faites en triplicat.

La présence du transgène APP chez les souris a été détectée par PCR classique en utilisant les amorces :

5'-CTGACCACTCGACCAGGTTCTGGGT-3'

5'GTGGATAACCCCTCCCCCAGCCTAGACCA-3'

localisées dans la région 3' de l'APP et dans la région 3' non transcrite de PrP, respectivement. La polymérase utilisée était la « hotstar taq polymérase » (Qiagen).

Les souris ont été sacrifiées à 2 mois pour être dans les mêmes conditions que Cataldo et *al.* (Cataldo et al., 2003). Les souris ont été anesthésiées puis les tissus sont fixés avec une solution de paraformaldéhyde à 4% par perfusion intra cardiaque dans du tampon phosphate 0,12M, pH 7,2. Après dissection, les cerveaux ont été postfixés 1 nuit dans le paraformaldéhyde à 4% et cryoprotégés dans une solution de sucrose à 30% dans du tampon phosphate à 4°C pendant 48h puis congelés à -80°C.

Avant de couper les cerveaux et de mesurer la taille des endosomes, la mise au point de la technique a été réalisée sur des cerveaux de 3 souris Ts65Dn (contrôle positif) et 4 souris sauvages issues des portées et généreusement fournies par l'équipe de Benoît Delatour de notre laboratoire. Ces expériences ont été menées par Cyril Basquin, étudiant en master 2 dans notre équipe d'Octobre 2008 à juin 2009. Ci-dessous ces principaux résultats.

Les coupes flottantes de 40µm d'épaisseur des cerveaux de souris obtenues au microtome à congélation ont été immunomarquées avec l'anticorps polyclonal de lapin anti-EEA1 (1/1000) pour mettre en évidence les endosomes. Les photographies de neurones ont été prises au microscope confocal (40X, zoom x6) dans le noyau du septum médian, région qui présente les premières pertes neuronales chez la souris Ts65Dn. Le traitement des images et les quantifications ont été réalisés avec le logiciel ImageJ. La moyenne de la taille des endosomes ne diffèrent pas significativement ($m=0.139\mu\text{m}^2$ pour les Ts65Dn et $m=0.130\mu\text{m}^2$ pour les sauvages). Néanmoins, la distribution de la taille des endosomes en % cumulé (Fig 25C, 25D) permet de mettre en évidence une augmentation significative de leurs tailles chez les souris Ts65Dn (Fig 25B) par rapport aux contrôles (Fig 25A).

Avec une analyse fine, Cyril Basquin a pu observer une augmentation de la taille des endosomes précoces dans le modèle murin de trisomie 21 Ts65Dn. En utilisant le même

protocole, nous devrions être capable de dire si les souris Ts1Cje/TgAPP présentent ou non le phénotype.

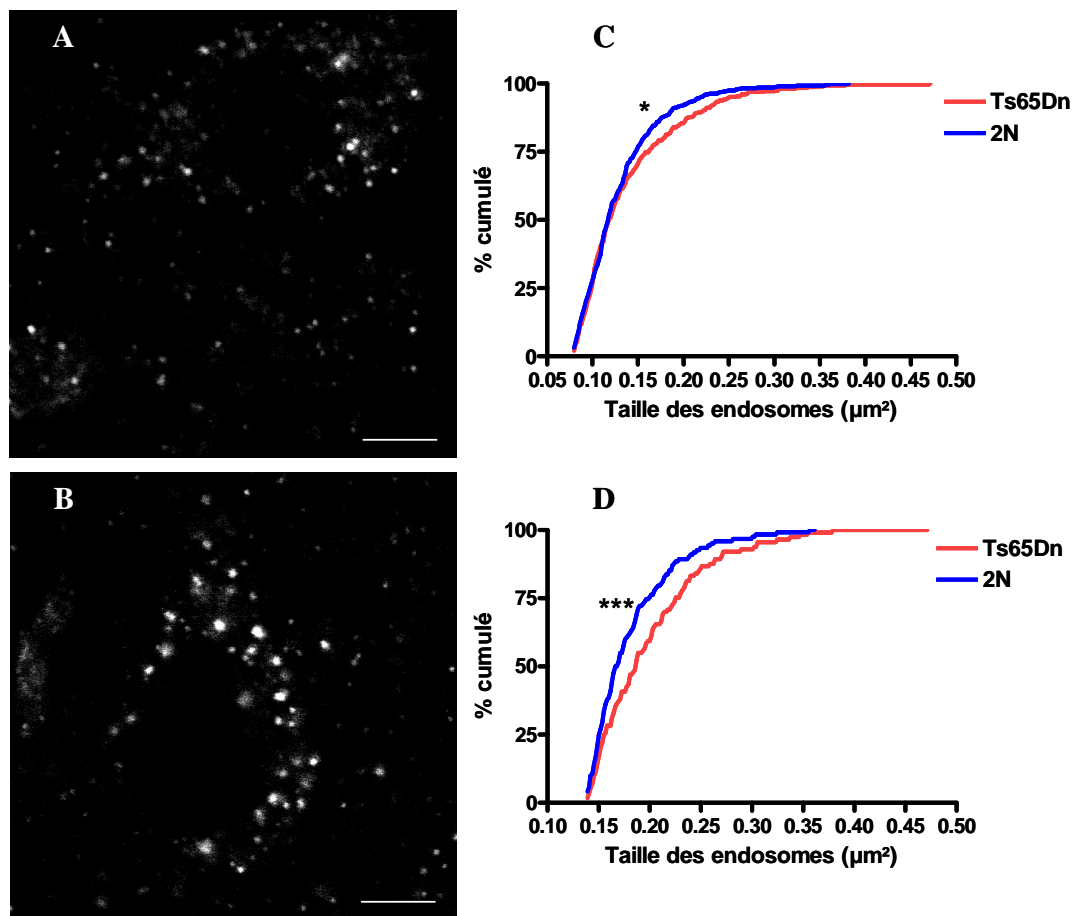


Figure 25: Elargissement des endosomes précoces dans les neurones de cerveaux de souris Ts65Dn

Les endosomes précoces de coupes de 40µm de cerveau de souris Ts65Dn (B) et sauvages (A) ont été immunomarquées avec l'anticorps polyclonal EEA1. La distribution de la taille des endosomes en % cumulé montre un biais pour les endosomes les plus larges ($p=0.014$, test de kolmogorov-smirnov) (C)(73 neurones analysés chez 3 souris Ts65Dn, 86 chez les quatre sauvages). La distribution en % cumulé des endosomes dont la taille est supérieure à la moyenne des endosomes totaux (D) permet de mettre en évidence une augmentation significative chez les souris Ts65Dn ($p<0.001$, test de kolmogorov-smirnov). Bar = 5µm.

III. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1. Discussion de la partie 1 des résultats

1.1 Pertinence du modèle cellulaire et du traitement hyper- et hypocholestérolémiant

La première question que l'on peut se poser est quelle est la pertinence de notre modèle (augmentation du cholestérol à la membrane plasmique dans une lignée cellulaire HEK et des cultures de neurones primaires) afin de proposer des mécanismes conduisant à la pathologie Alzheimer ? Il est évident que la cellule HEK n'est pas un neurone ! Comme la Souris n'est pas un Homme ! Néanmoins certaines données sont extrapolables d'une espèce à une autre et d'un type cellulaire à un autre. L'augmentation de la taille des endosomes a été validée dans le modèle HEK et dans les cultures primaires de neurones de rat. Afin d'expliquer le mécanisme moléculaire de l'ajout de cholestérol, des expériences sur des cellules d'origine neuronale SH-SY5Y ont été tentées mais se sont révélées infructueuses car dans ces cellules, l'APP n'était pas visible à la membrane plasmique (non visible en microscopie confocale avec un anticorps C-terminal et N-terminal contre l'APP et non détectable en cytométrie en flux après un marquage membranaire fluorescent contre l'APP). Il est probable que l'APP soit clivé dans la voie de sécrétion avant son arrivée à la membrane plasmique. Une autre possibilité serait que l'APP, à peine arrivé à la membrane plasmique, soit internalisé très rapidement. Dans les deux cas, l'augmentation du cholestérol à la membrane plasmique ne peut pas avoir d'effet car soit l'APP est absent soit la vitesse d'endocytose de l'APP est déjà maximale et l'excès de cholestérol ne peut donc pas l'accélérer davantage. J'ai donc conclu que la distribution de l'APP observée à l'équilibre dans les cellules SH-SY5Y était différente de celle observée à l'équilibre dans des neurones en culture (de l'ordre de 10% à la surface de la cellule). Le modèle HEK me paraît donc plus pertinent malgré son origine non neuronale. Notons, *a posteriori*, que la lignée neuronale N2a eut été préférable car l'APP est présent à la membrane plasmique des cellules. Toutes les expériences n'ont pas été réalisées dans des cultures primaires de neurones de rat car il est plus difficile d'y transfecter des plasmides et il n'est pas possible de doser le peptide amyloïde sans transfecter l'APP humaine mutée dans les neurones. Une tentative de construction de lentivirus APP-IRES-dsRED pour infecter une large population de neurones n'a pas abouti (Hong et al., 2006).

Nous avons décidé d'utiliser la MBCD pour diminuer le cholestérol à la membrane plasmique et le complexe MBCD-cholestérol pour l'augmenter. Une autre façon aurait été d'utiliser des

statines. Cependant, les statines ont des effets pléiotropes inhibant la synthèse du cholestérol mais également la voie des isoprénoïdes. Des stratégies antisens aurait pu être envisagées contre la HMGCR mais de même que les statines, la voie des isoprénoïdes aurait été inhibée. De plus, avec la MBCD (ou MBCD-cholestérol) la déplétion (ou la charge) en cholestérol est localisée à la membrane plasmique facilitant la compréhension des conséquences sous-jacentes, alors que l'utilisation de statines conduit à une diminution du cholestérol généralisée à tous les compartiments sub-cellulaires. Enfin, le traitement est rapide (de quelques dizaines de minutes) évitant ainsi des effets secondaires liés à la dérégulation de l'homéostasie du cholestérol.

Pour conclure, il a été montré que des souris transgéniques pour l'allèle humain ApoE4 présentent une augmentation localisée du cholestérol dans le feuillet externe de la membrane plasmique par rapport à une souris ApoE3 (Hayashi et al., 2002). Cette observation renforce notre modèle d'étude de la dérégulation du métabolisme du cholestérol dans la maladie d'Alzheimer.

1.2 Le cholestérol augmente l'endocytose de l'APP. Un effet spécifique ?

Malgré de nombreuses données mettant en cause le cholestérol dans la pathologie Alzheimer, aucune étude approfondie n'avait été réalisée sur l'impact d'une augmentation contrôlée (+15 à +40%) du cholestérol à la membrane plasmique sur l'endocytose de l'APP. Nous avons montré qu'une charge en cholestérol localisée à la membrane plasmique par l'action du complexe MBCD-cholestérol augmentait l'endocytose de l'APP. Dans les mêmes conditions, on ne mesure pas d'augmentation de l'endocytose du récepteur à la transferrine ou du récepteur aux cannabinoïdes. Il paraît donc probable que l'APP soit plus sensible à la variation du cholestérol membranaire. Deux récentes publications permettent de proposer un effet soit direct soit indirect du cholestérol sur l'APP. Beel et *al.* ont montré que l'ajout de cholestérol conduisait à une perturbation des spectres des résidus G696, S697 et K699 de C99 par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire. Ces variations sont saturables et apparaissent comme le résultat d'une interaction spécifique entre le cholestérol et C99 plutôt que d'un changement de conformation ou de dynamique de C99 (Beel et al., 2008). Ces résidus sont localisés dans une boucle connectant l'hélice- α extracellulaire au domaine transmembranaire (Fig. 26). C99 apparaît donc avoir une affinité spécifique pour le cholestérol pouvant conduire C99 à être associé de manière préférentielle aux radeaux lipidiques enrichis en cholestérol. C99 étant un produit de clivage de l'APP, on peut supposer

que les résidus G696, S697 et K699 de l'APP sont toujours capables de lier le cholestérol. Ces trois résidus n'ont jamais été trouvés mutés dans les formes familiales de la maladie d'Alzheimer, et il n'existe pas non plus de polymorphismes associés. Il serait intéressant de savoir si des mutations ponctuelles localisées sur ces résidus pourraient avoir un rôle protecteur contre la maladie d'Alzheimer en diminuant l'interaction entre le cholestérol et l'APP.

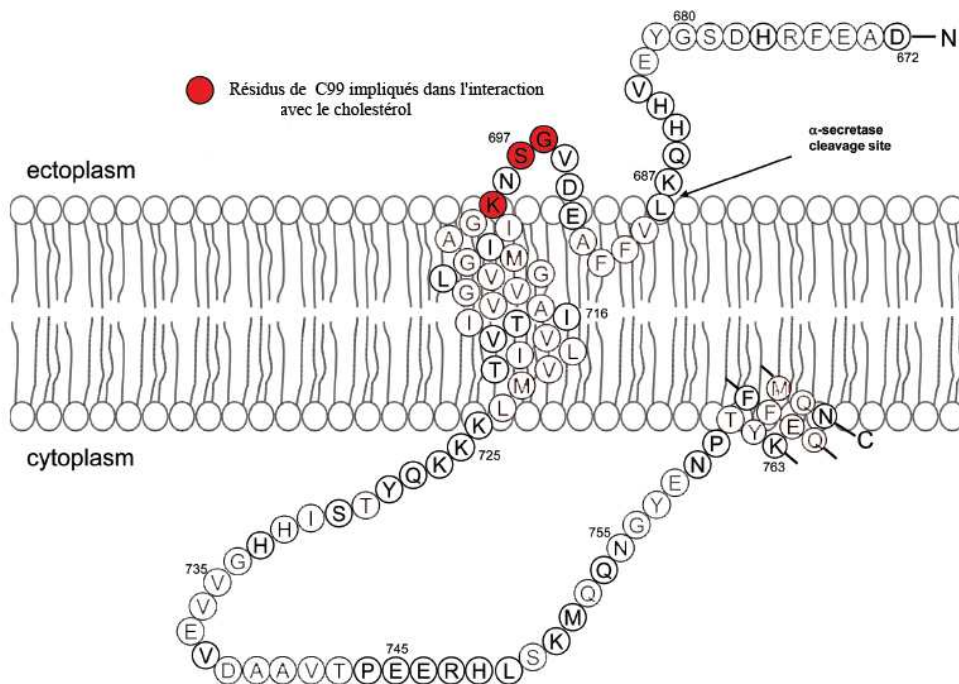


Figure 26: Représentation de C99 et des 3 résidus (en rouge) impliqués dans l'interaction supposée avec le cholestérol. Modifié d'après Beel et al.

Schneider et *al.* ont proposé que l'APP interagisse avec la flotilline-1, une protéine très conservée associée aux radeaux lipidiques. Cette publication corrobore en partie nos résultats. Ainsi, les modulations de l'expression de la flotilline (Schneider et al., 2008) ou du cholestérol à la membrane plasmique (nos résultats) conduisent toutes deux à une concentration de l'APP dans les radeaux, et à une augmentation de son endocytose dépendante de la clathrine sans variation de l'endocytose du récepteur à la transferrine. Un excès de cholestérol à la membrane plasmique pourrait donc faciliter l'interaction entre la flotilline-1 et l'APP, concentrant l'APP dans les radeaux lipidiques, favorisant ensuite son endocytose et la production du peptide amyloïde.

La modulation de l'endocytose de type clathrine-dépendante par le cholestérol mise en évidence au cours de mes travaux de thèse était plutôt surprenante. En effet, il est admis que le cholestérol module l'endocytose cavéoline-dépendante. Néanmoins, de récentes études montrent une relation entre cholestérol et la voie d'endocytose dépendante de la clathrine. Les

toxines de l'anthrax ou du choléra entrent via les radeaux lipidiques avec un mécanisme dépendant de la clathrine (Abrami et al., 2003; Hansen et al., 2005). En outre, deux protéines associées aux radeaux lipidiques (CD317 et le récepteur adrénergique $\alpha 1a$) sont internalisées dans des puits recouverts de clathrine (Morris et al., 2008; Rollason et al., 2007). Enfin, comme il l'a été proposé pour la protéine du prion (Walmsley et al., 2003), l'APP pourrait se concentrer brièvement dans les radeaux pour être ensuite éjecté hors des radeaux afin d'être endocyté par la voie dépendante de la clathrine.

Le paragraphe précédent laisse à penser qu'il pourrait exister différentes voies d'internalisation dépendante de la clathrine permettant des régulations cellulaires différentielles suivant la voie empruntée. Est-il envisageable que l'APP d'un côté et la transferrine et CB1 de l'autre entrent dans la cellule par des voies dépendantes de la clathrine distinctes ; le cholestérol accélérant spécifiquement la première et pas la seconde ? Au moins trois arguments vont dans le sens de voies parallèles d'internalisation entre la transferrine et l'APP. 1/ Le motif protéique d'internalisation reconnu par AP-2 n'est pas le même entre la transferrine (YTRF) et l'APP (YENPTY), ce qui pourrait conduire à des recrutements de protéines adaptatrices différentes pour la formation des puits de clathrine. Il est par exemple connu que l'internalisation des récepteurs couplés aux protéines G dont fait partie CB1 nécessite des molécules adaptatrices supplémentaires que sont les β -arrestines (Ferguson et al., 1996). 2/ Schneider et *al.* ont comparé l'endocytose de l'APP et de la transferrine dans des conditions de surexpression de mutants dominants négatifs contre AP180, la dynamine, l'epsin (protéines de l'endocytose dépendante de la clathrine) et ils ont également transfecté des ARN interférences contre AP-2. Ils ont conclu que l'APP et la transferrine passaient par des voies dépendantes d'AP-2, d'AP180 et de la dynamine mais que contrairement à la transferrine, l'internalisation de l'APP n'était pas sensible à la surexpression du mutant epsin (Schneider et al., 2008). Il existe donc bien une différence suggérant une voie spécifique d'internalisation pour l'APP. Cette hypothétique voie ressemble étrangement à celle empruntée par la toxine du tétanos pour infecter les neurones moteurs : dépendant de la clathrine, d'AP-2 mais pas de l'epsin (Deinhardt et al., 2006). Cependant, un récent papier montre que la transfection d'un ARN interférant contre l'epsin bloque l'entrée du virus de la grippe mais pas des récepteurs à la transferrine, à l'EGF et aux LDL (Chen and Zhuang, 2008). Ces données contradictoires sur l'internalisation du récepteur à la transferrine dépendante ou non de l'epsin peuvent s'expliquer par l'utilisation de lignées cellulaires différentes mais plus certainement par des effets secondaires occasionnés par la surexpression du mutant dominant négatif de l'epsin. 3/ Le récepteur à la transferrine n'est jamais présent

dans les radeaux lipidiques contrairement à une petite fraction de l'APP. Le cholestérol pourrait donc jouer sur cette localisation particulière de l'APP. L'ensemble de ces données et d'autres (Benmerah and Lamaze, 2007) arguent en faveur de voies différentes d'internalisation dépendantes de la clathrine. Les techniques d'imagerie cellulaire rendent désormais possible de visualiser de manière dynamique le processus d'endocytose, il serait donc intéressant de comparer celle du récepteur à la transferrine et de l'APP afin de valider nos hypothèses.

Si nous avons bien discuté ci-dessus de l'effet spécifique ou non de l'interaction entre le cholestérol et l'APP, nous pouvons également nous poser la question de l'effet spécifique du cholestérol sur l'endocytose de l'APP ? En d'autres termes, les facteurs qui augmentent l'endocytose de l'APP induisent-ils tous une surproduction de peptide amyloïde, et peuvent-ils être considérés comme des facteurs aggravants pour développer la maladie d'Alzheimer ? L'APP est une protéine qui possède une endocytose constitutive, c'est-à-dire qu'elle n'a apparemment pas besoin de ligand pour entrer dans le milieu intracellulaire. Ensuite, une partie de l'APP est recyclée à la membrane plasmique pour être de nouveau endocytée et ainsi de suite. A chaque tour du cycle « endocytose/recyclage », l'APP a une probabilité d'être clivée et de générer du peptide amyloïde. De manière très intéressante, il a été montré que l'interaction à la membrane plasmique de l'APP et du récepteur LRP (une protéine de la famille des récepteurs aux LDL) augmentait l'endocytose de l'APP et parallèlement la production du peptide amyloïde (Kounnas et al., 1995). Récemment, un article paru dans le journal Science montre par un crible de surexpression sur 1905 gènes que le récepteur couplé aux protéines G GPR3 augmente de manière drastique la production du peptide amyloïde. L'hypothèse retenue par les auteurs est que GPR3 augmenterait la formation du complexe γ -sécrétase à la surface de la cellule, favorisant ainsi la production de peptide amyloïde (Thathiah et al., 2009). GPR3 est une protéine qui comme l'APP a une endocytose constitutive et est constitutivement active (élève le taux d'AMP cyclique). N'est-il pas envisageable que l'action de GPR3 passe davantage par l'augmentation de l'endocytose de l'APP comme pour LRP, favorisant ainsi la production du peptide amyloïde ? Quoiqu'il en soit, il est clair que l'augmentation de la protéine Rab5 retrouvée dans les cerveaux des formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer puisse participer à l'augmentation d'endocytose de l'APP, la production du peptide amyloïde et à l'élargissement des endosomes précoces. Ces trois caractéristiques sont également retrouvées quand on ajoute du cholestérol

à la membrane plasmique. C'est pourquoi nous proposons que l'élévation du cholestérol puisse être responsable de l'augmentation de Rab5 (partie 3 de la discussion).

1.3 Modèles des effets du cholestérol sur la répartition de l'APP à la membrane plasmique et sur l'endocytose.

En collaboration avec l'équipe du centre de photonique Biomédicale à Orsay de Sandrine Lévêque-Fort, nous avons tenté de comprendre l'impact que pouvait avoir le cholestérol sur les interactions entre deux molécules d'APP et entre l'APP et Bace1 par des techniques de FLIM couplées à une microscopie TIRF. Nous avons cherché en particulier à savoir si l'excès de cholestérol membranaire relocalise et concentre l'APP et Bace1 dans les radeaux lipidiques, augmentant alors leurs interactions. Les études sont en cours. Une équipe allemande a déjà publiée sur ce sujet (von Arnim et al., 2008). Ils ont réalisé des déplétions ou des enrichissements en cholestérol à la membrane plasmique de lignée humaine de glioblastome (U373 MG) et ont mesuré le temps de vie de la GFP après la co-transfection de bace1-GFP et d'APP-mRFP. Alors qu'ils observent bien une augmentation du temps de vie de la GFP (diminution des interactions entre APP et bace1) corrélée à la diminution du cholestérol, ils ont la même tendance avec une surcharge de cholestérol à la membrane plasmique. Cela signifie que l'APP et bace1 sont moins proches malgré l'augmentation de sAPP β , produit de clivage de l'APP par bace1. Ces données sont donc contradictoires, surtout si on les confronte avec une très récente publication qui montre une augmentation de l'activité β -sécrétase de bace-1 quand le cholestérol est enrichi à la membrane plasmique (Liu et al., 2009) et à nos propres résultats. En effet nous notons une augmentation de C99 après traitement au cholestérol (Fig 5C, article1). Cette augmentation provient forcément de l'augmentation de l'activité de la β -sécrétase Elle passe soit par un changement de conformation de l'enzyme conduisant à une augmentation de sa vitesse de clivage en présence de cholestérol, soit elle a davantage de substrat à cliver, en l'occurrence l'APP. Nous privilégions la seconde hypothèse, en accord avec l'augmentation de l'APP après traitement au cholestérol dans les endosomes précoces, lieu de clivage de l'APP par la β -sécrétase.

Pour revenir à la publication de von Arnim et al., plusieurs problèmes sont à soulever quant à la pertinence de leurs résultats. Premièrement, ils ne dosent pas le cholestérol après traitement, quelle est donc l'augmentation 1%?, 50%?, 300%? Deuxièmement, aucune analyse statistique des résultats n'a été publiée. Troisièmement, ils n'ont pas de système de régulation de pH quand ils mesurent le FLIM sur les cultures cellulaires. Le pH modifie le temps de vie des fluorophores. Enfin, ils incubent les cellules une heure avec le complexe

MBCD-cholestérol puis effectuent leurs mesures. D'après nos résultats, le cholestérol augmente l'endocytose de l'APP, les mesures de temps de vie de la GFP à la membrane plasmique par microscopie TIRF doivent donc être réalisées très rapidement après l'ajout du cholestérol avant le processus d'endocytose (dans les quelques minutes après ajout du cholestérol). D'ailleurs, eux-mêmes s'interrogent sur la dérégulation de l'endocytose après leur traitement au cholestérol.

Tout cela pour en venir à nos propres questionnements sur le lien entre le modèle de concentration de l'APP dans les radeaux lipidiques sous l'action du cholestérol proposé par Eehalt et *al.* et l'augmentation de l'endocytose d'APP observée après traitement au cholestérol (Eehalt et al., 2003). La figure 27 résume les différentes possibilités.

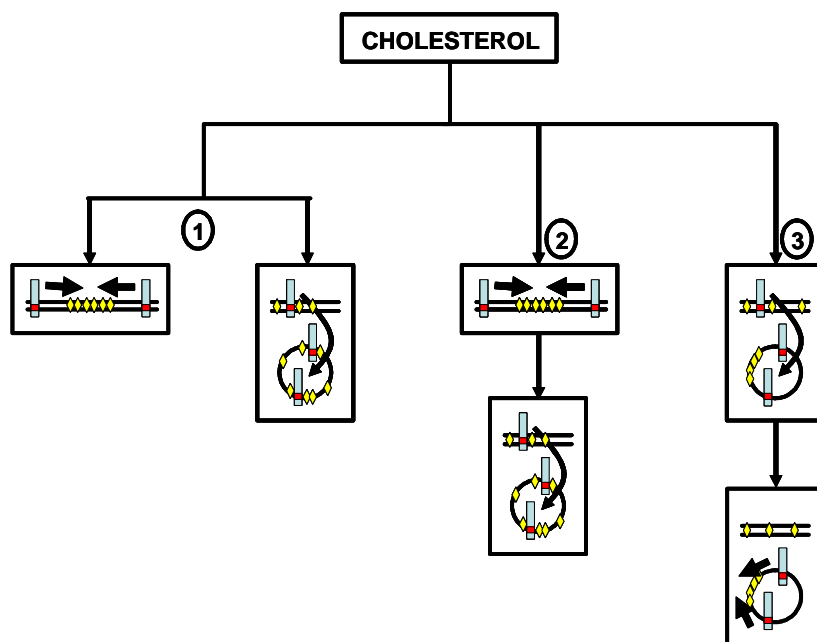


Figure 27 : Hypothèses reliant la relocalisation et l'internalisation de l'APP dépendantes du cholestérol

1/ Les deux phénomènes sont indépendants.

2/ L'augmentation de la concentration de l'APP dans les radeaux lipidiques conduit à l'excès d'endocytose, suivis par les clivages de l'APP et une production du peptide amyloïde augmentée.

3/ Il y a d'abord un excès d'endocytose et la relocalisation de l'APP dans les radeaux se réalise ultérieurement dans les vésicules d'endocytose. Dernière possibilité, non représentée sur le schéma, on ne mesure pas de différence de temps de vie de la GFP après traitement. Soit le cholestérol ne concentre ni l'APP ni Bace1 dans les radeaux et l'augmentation de la production du peptide amyloïde n'est causée que par l'excès d'endocytose, soit techniquement, nous ne sommes pas assez résolutifs pour observer les variations de temps de vie. L'hypothèse 2 paraît plus probable que la 3 car la vitesse de diffusion d'une protéine dans

la membrane plasmique de l'ordre du micromètre par seconde est bien plus rapide que le processus d'endocytose qui prend des minutes. La méthode pour valider un des modèles sera discutée dans la partie « perspectives ».

1.4 L'APP : rôle de senseur du cholestérol cellulaire ?

Il a été proposé qu'un excès de cholestérol à la membrane plasmique conduirait une fraction de l'APP à se lier au cholestérol dans les radeaux lipidiques. Cet APP contenu dans les radeaux seraient internalisés dans les endosomes où l'APP subirait un clivage par Bace1, puis C99 par la γ -sécrétase libérant AICD et le peptide amyloïde. AICD est ensuite capable de diminuer la transcription de LRP1 conduisant à une diminution du nombre de récepteur LRP1 à la membrane plasmique capable de capter le cholestérol exogène (Liu et al., 2007). De plus $\alpha\beta 40$ inhibe HMGCR, l'enzyme limitante de la biosynthèse du cholestérol (Grimm et al., 2005). La cellule diminue à la fois la prise de cholestérol exogène par LRP1 et sa synthèse endogène de cholestérol. Ainsi, comme le récapitule la figure 28, l'interaction de départ entre le cholestérol et l'APP conduit *in fine* à une diminution du taux de cholestérol cellulaire, l'APP serait donc dans ce modèle un senseur de cholestérol. En outre, il a été montré qu'une diminution drastique du peptide amyloïde (fibroblastes issus de souris délétées pour les gènes des présénilines) cause une augmentation du cholestérol cellulaire (Grimm et al., 2005).

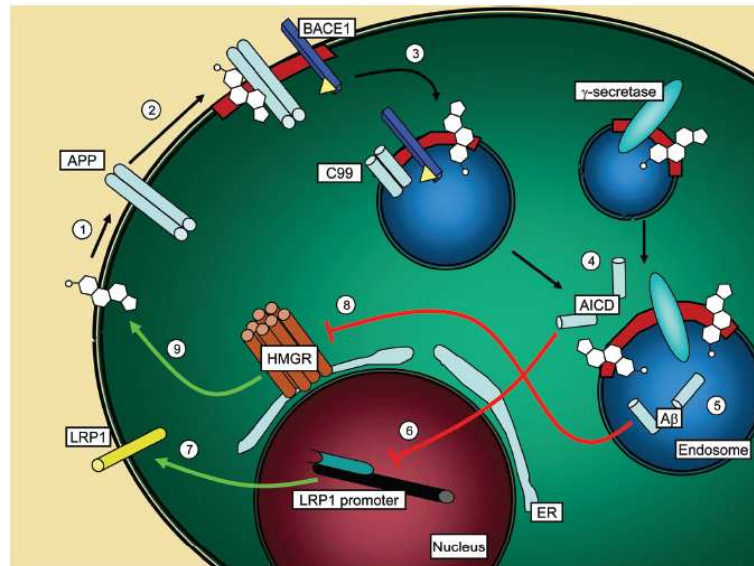


Figure 28: Représentation schématique des effets des produits de clivage de l'APP sur le métabolisme du cholestérol

L'APP est capable de se dimériser à la membrane plasmique (cylindres bleus). La liaison du cholestérol (structure polycyclique blanche) avec l'APP induit une translocation de l'APP dans les radeaux lipidiques (segment membranaire en rouge) (1). Ces radeaux peuvent contenir Bace-1 (prisme rectangulaire bleu) (2). L'internalisation de l'APP contenu dans les radeaux active Bace-1 en raison de l'acidité des compartiments endosomaux. Il y a donc libération de l'ectodomaine soluble de l'APP (3). La g-sécrétase également présente dans les endosomes clive C99 pour libérer AICD (4) et le peptide amyloïde (5). AICD forme un complexe ternaire avec Fe65 et Tip60, capable de transloquer dans le noyau et de bloquer la transcription du gène LRP1 (cylindre noir)(6). La diminution de la protéine LRP1 (cylindre jaune), un récepteur majeur des apolipoprotéines du cerveau, conduit à une diminution d'entrée de cholestérol exogène dans la cellule (7). Simultanément, le peptide amyloïde inhibe l'HMG-Coa Réductase (HMGR, cylindre marron), l'enzyme limitante de la biosynthèse du cholestérol, par une interaction directe ou indirecte par d'autres mécanismes (8)(9). En fin de compte, les sources exogènes et endogènes de cholestérol sont diminuées après clivage de l'APP, stimulé en amont par l'interaction APP-cholestérol. D'après Beel et al. 2008.

Ces résultats sont en accord avec nos résultats où une augmentation du cholestérol à la membrane plasmique augmente l'endocytose de l'APP favorisant ainsi la production du peptide amyloïde et d'AICD qui peuvent dès lors diminuer le taux de cholestérol cellulaire. Pour valider le modèle, j'ai dosé le cholestérol dans des lignées stables HEK surexprimant à différents niveaux l'APP. Comme le montre la figure 29A, la surexpression d'APP entraîne une augmentation du cholestérol cellulaire. Par contre, je n'ai pas retrouvé d'augmentation du cholestérol cellulaire en inhibant la γ -sécrétase par le composé E (fig 29B) excepté dans une condition (Incubation de 24 heures du composé E sur les cellules SH-SY5Y). D'après mes

données, il semble bien qu'il y ait une relation entre l'APP et le cholestérol mais qui ne passerait pas forcément par le peptide amyloïde. Des études complémentaires doivent être réalisées.

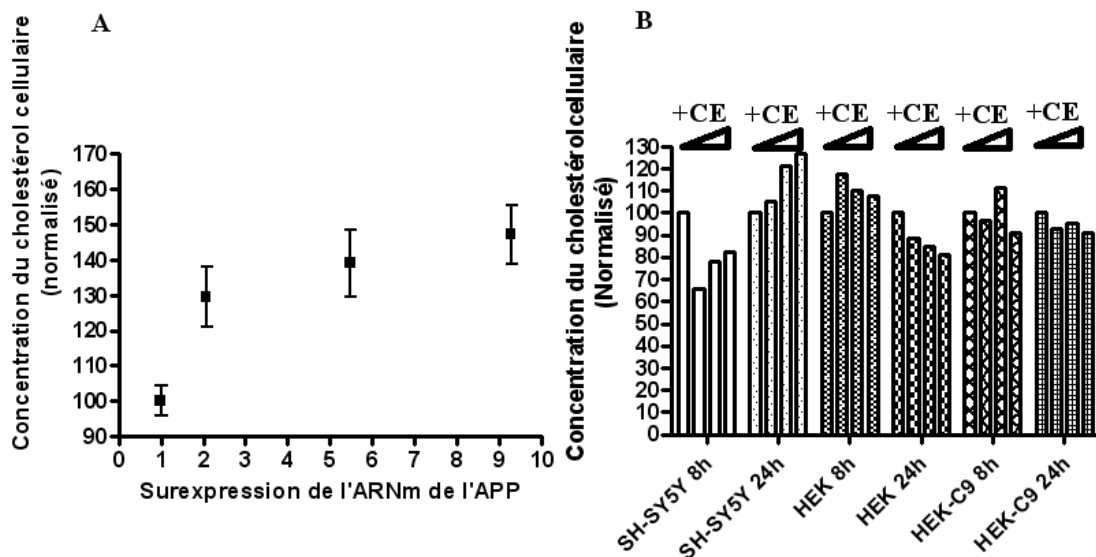


Figure 29: Effet de la surexpression de l'APP et du peptide amyloïde sur le taux de cholestérol cellulaire

(A) Trois clones stables de cellules HEK293 surexprimant à différents taux l'ARNm de l'APP ont été générés. Les taux de cholestérol augmentent significativement ($p=0.007$, ANOVA) avec la surexpression de l'APP ($n=4$, réalisé en triplicates). (B) Le composé E, un inhibiteur de la g-sécrétase a été incubé 8 heures ou 24 heures à différentes concentrations (0, 0.3, 1, 3 μM) sur des lignées cellulaires neuronales SH-SY5Y, non-neuronales HEK293 et HEK293 surexprimant l'APP (lignée C9 surexprimant plus de 9 fois l'ARNm de l'APP). Aucune tendance ne se dégage sur des variations du taux de cholestérol quand on inhibe la production d'AICD et du peptide amyloïde

Remise dans le contexte de la maladie d'Alzheimer, l'interaction entre le métabolisme du cholestérol et le clivage du senseur de cholestérol APP, pourrait conduire à une dérégulation du système occasionnant une augmentation du cholestérol et du peptide amyloïde. Par exemple, le peptide amyloïde oligomérisé ne pourrait plus jouer son rôle d'inhibiteur de l'HMGR causant une augmentation du cholestérol cellulaire, du clivage de l'APP et tel un cercle vicieux une hausse de la production du peptide amyloïde.

1.5 La maladie d'Alzheimer : une pathologie de la dérégulation de l'homéostasie du cholestérol ?

Malgré des différences ethniques, géographiques, et culturelles des patients, les caractéristiques histopathologiques communes de la maladie d'Alzheimer suggèreraient une unique voie responsable de la pathologie. Cette voie est principalement reliée au clivage de

l'APP, et est clairement validée par de nombreuses études (Hardy and Selkoe, 2002; St George-Hyslop, 2000). Mais de nombreux gènes affectant le clivage de l'APP ou la dégradation du peptide amyloïde convergent avec le métabolisme lipidique. Les gènes qui régulent l'APP apparaissent impliqués dans un réseau plus large de régulation de l'homéostasie lipidique cérébrale. Les études d'associations génétiques semblent avoir mis en évidence un processus physiologique spécifique dont le dysfonctionnement pourrait jouer un rôle dans le développement de la maladie d'Alzheimer. Bien que l'âge soit le déterminant-clé de l'expression de la maladie d'Alzheimer, les voies biochimiques impliquées dans la pathologie peuvent être reliées sous une hypothèse unique d'une dérégulation de l'homéostasie du cholestérol, basées sur la cascade amyloïde. Ce modèle proposé par Judes Poirier (Fig. 30) incorpore la contribution d'ApoE, d'HMGCR et les liens possibles entre le métabolisme du cholestérol et celui de l'APP dans la maladie d'Alzheimer (Poirier, 2003). Notre étude conforte une partie du modèle en montrant pour la première fois que le cholestérol à la membrane plasmique régule l'endocytose dépendante de la clathrine de l'APP.

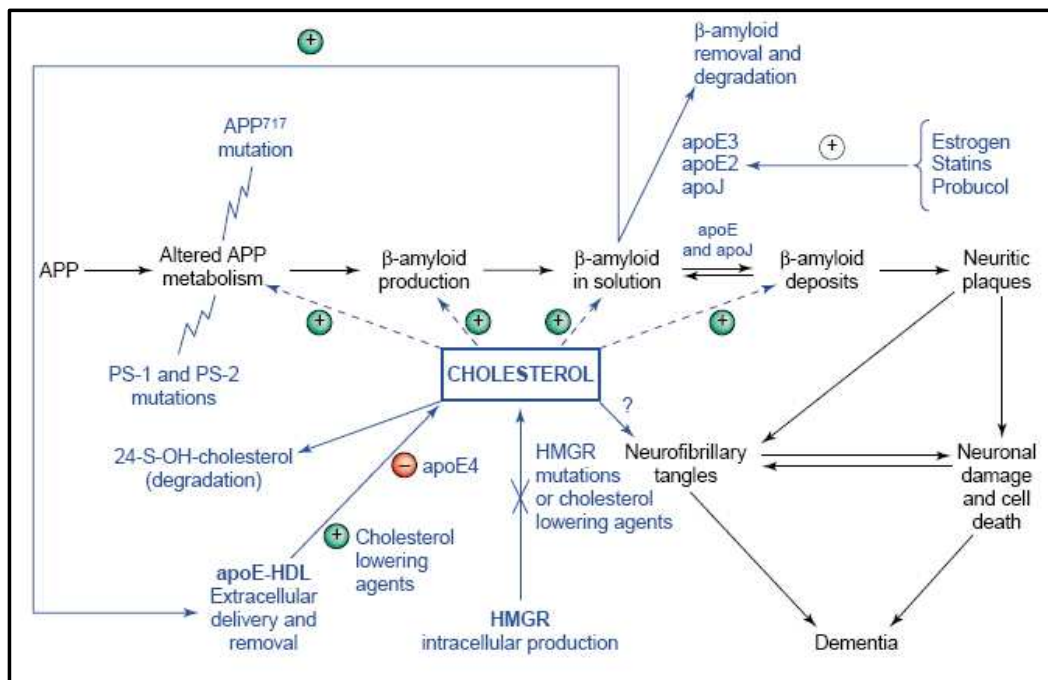


Figure 30: Modèle des rôles du cholestérol au cours de l'hypothèse de la cascade amyloïde. D'après Poirier 2003.

2. Discussion de la partie 2 des résultats

2.1 La synaptojanine : rôles et fonctions. Implication dans la trisomie 21 et la maladie d'Alzheimer.

Nos résultats montrent que le locus de 1.3Mb contenant le gène codant pour la protéine synaptojanine-1 dans les lignées lymphoblastoïdes et dans les cellules mononucléaires de sang de patients porteurs de trisomie 21 augmentent la taille des endosomes précoces. La surexpression de la synaptojanine-1 dans les lignées SH-SY5Y présente le même phénotype. Précisons qu'une trop forte surexpression de la protéine inhibe presque entièrement l'endocytose du récepteur à la transferrine comme observé précédemment (Haffner et al., 2000). La synaptojanine-1 est une phosphatase qui enlève un phosphate aux molécules de phosphatidyl-inositol (4,5)-biphosphates (PtdIns(4,5)P₂) pour former des phosphatidyl-4-phosphates (PtdIns-4P). Les phosphoinositols sont des phospholipides trouvés en faible quantité dans les cellules eucaryotes. PtdIns(4,5)P₂ et PtdIns-4P sont les plus abondants bien qu'ils ne représentent que 0.5% de tous les lipides membranaires d'une cellule (Fig. 31).

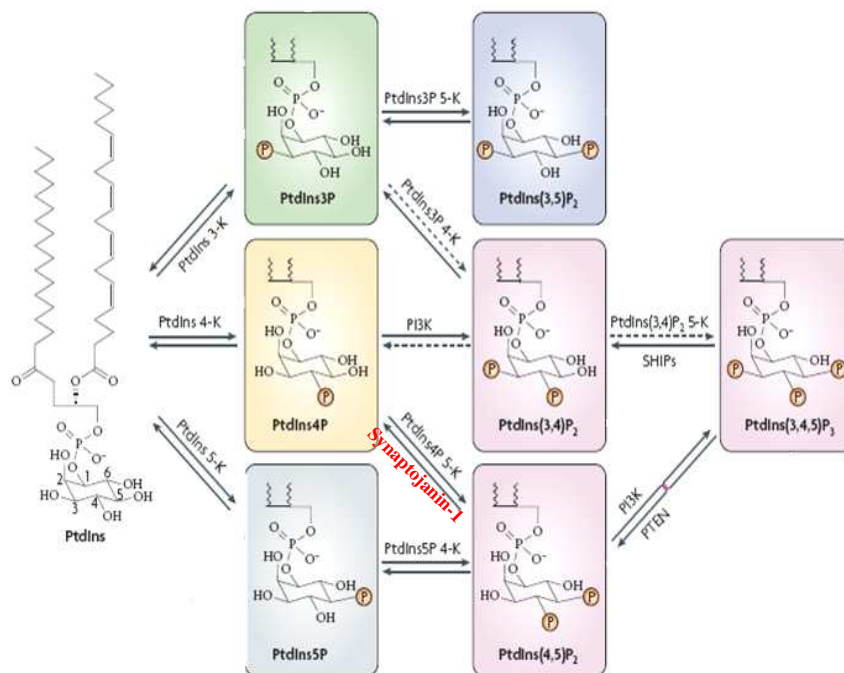


Figure 31: Structure et synthèse des phosphatidylinositols (PtdIns).

Cette molécule (à gauche sur la figure) est composée d'un groupement phosphatidyl (deux acides gras estérifiés sur une molécule de glycérol, elle-même liée de façon covalente à un acide phosphorique) dont le groupement phosphate est associé à une molécule d'inositol, un polyol cyclique. Les 7 variants de la PtdIns (rectangles colorés) sont régulés par des kinases et des phosphatases dont la synaptojanine-1 en rouge sur la figure. Modifié d'après Lemmon 2008.

Les PtdIns(4,5)P₂ ont historiquement été associés à la formation de deux seconds messagers : l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et le diacylglycérol (DAG) en réponse à des stimuli extracellulaires. IP₃ mobilise l'ion calcium provenant du réticulum endoplasmique, alors que DAG active la protéine kinase C, conduisant à une variété de réponses cellulaires. Cependant, le PtdIns(4,5)P₂ est maintenant largement reconnu comme un important régulateur de la transduction du signal. Les phosphoinositols sont extrêmement bien régulés dans la cellule car ils contrôlent l'organisation du cytosquelette et le trafic intracellulaire (fig 32). Seul ce dernier point sera ici discuté.

Le PtdIns(4,5)P₂ est localisé à la membrane plasmique et lie les domaines ENTH (epsin N-terminal homology) de protéines telles que l'epsin, AP180 et CALM (clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia protein) qui sont des protéines accessoires essentielles pour la formation des puits de clathrines (Ford et al., 2001; Itoh et al., 2001). En outre, AP-2, les β-arrestines et la dynamine sont également capables de se fixer aux PtdIns(4,5)P₂ (Gaidarov and Keen, 1999). Un nombre important de protéines impliquées dans l'endocytose dépendante de la clathrine interagissent avec les PtdIns(4,5)P₂. Le premier rôle de la synaptojanine-1 est donc de réguler le pool de PtdIns(4,5)P₂ impliqué dans le recrutement des protéines pour former les puits de clathrine.

Les souris déficientes pour la synaptojanine-1 présentent une accumulation de vésicules entourées du manteau de clathrine juste en dessous de la membrane plasmique (Cremona et al., 1999). Ce résultat montre que la fonction principale de la synaptojanine-1 est d'enlever la clathrine des vésicules. Ainsi, un taux élevé de PtdIns(4,5)P₂ dans les vésicules empêche la dissociation du manteau de clathrine alors qu'un taux faible de PtdIns(4,5)P₂ permet de dépolymériser la clathrine, les vésicules peuvent ensuite fusionner avec les endosomes précoces.

Deux isoformes de la synaptojanine-1 sont exprimées dans les neurones. Alors que l'isoforme de 170 kDa est présent tout au long de la formation et de la maturation des vésicules d'endocytose, l'isoforme de 145 kDa est recrutée rapidement au stade terminal de la formation de la vésicule très près de la dynamine suggérant un rôle dans la fission entre la vésicule et la membrane plasmique (Perera et al., 2006). Notons que les deux isoformes sont exprimées dans la plupart des tissus (cerveau, foie, poumon, cœur, sang), cependant, l'isoforme de 145 kDa est davantage exprimé dans les neurones suggérant que cette isoforme est plus spécialisée dans l'endocytose des vésicules synaptiques (Ramjaun and McPherson, 1996).

Enfin, la synaptojanine-1 a également un rôle dans le recyclage des protéines endocytées à la membrane plasmique dans des cellules non-neuronales. La diminution des PtdIns(4,5)P₂ intracellulaires par la surexpression du domaine 5-phosphatase de la synaptojanine-1 conduit à des défauts de recyclage du récepteur à la transferrine à la membrane plasmique et ce défaut n'est pas lié en amont à la diminution d'endocytose (Kim et al., 2006).

Les endosomes élargis observés en présence de trois copies du gène synaptojanine-1 proviennent certainement de la dérégulation de l'homéostasie des phosphoinositols. Nous avons montré que la présence d'endosomes élargis est corrélée à une diminution d'endosomes totaux dans la cellule. Les endosomes élargis sont donc peut-être issus d'une fusion plus importante entre endosomes précoces plutôt qu'à un excès d'endocytose. Nous pouvons imaginer que trois copies de la synaptojanine-1 ne dérégulent pas les premières étapes d'internalisation mais davantage le recyclage. L'accumulation de vésicules intracellulaires pourrait occasionner une augmentation de la fusion des endosomes précoces d'où l'élargissement de ces derniers.

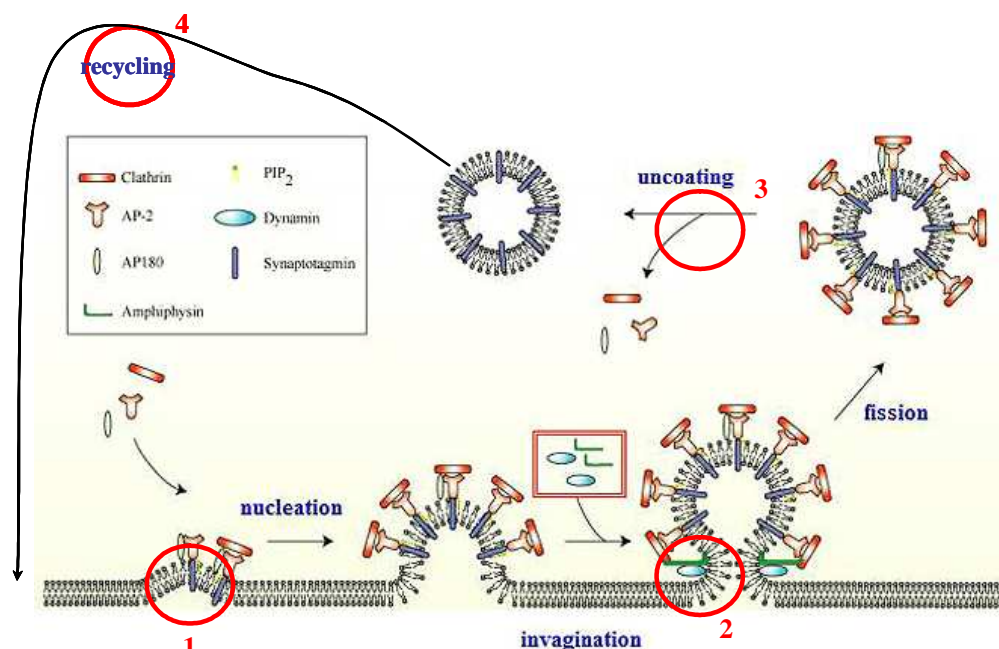


Figure 32: Rôles connus de la synaptojanine-1 dans le trafic vésiculaire.

1 : La synaptojanine-1 régule le pool des PtdIns-(4,5)P₂ impliqué dans le recrutement des protéines pour former le puits de clathrine.

2 : L'isoforme de 145 kDa de la synaptojanine-1 est recruté rapidement au stade terminal de la formation de la vésicule très près de la dynamine suggérant un rôle dans la fission entre la vésicule et la membrane plasmique

3 : La synaptojanine-1 est essentielle pour dépolymériser le manteau de clathrine entourant la vésicule d'endocytose.

4 : La synaptojanine-1 a un rôle dans le processus de recyclage mais encore mal

La figure 33 propose un modèle pour expliquer l'élargissement des endosomes et la production du peptide amyloïde dans la trisomie 21 et la maladie d'Alzheimer.

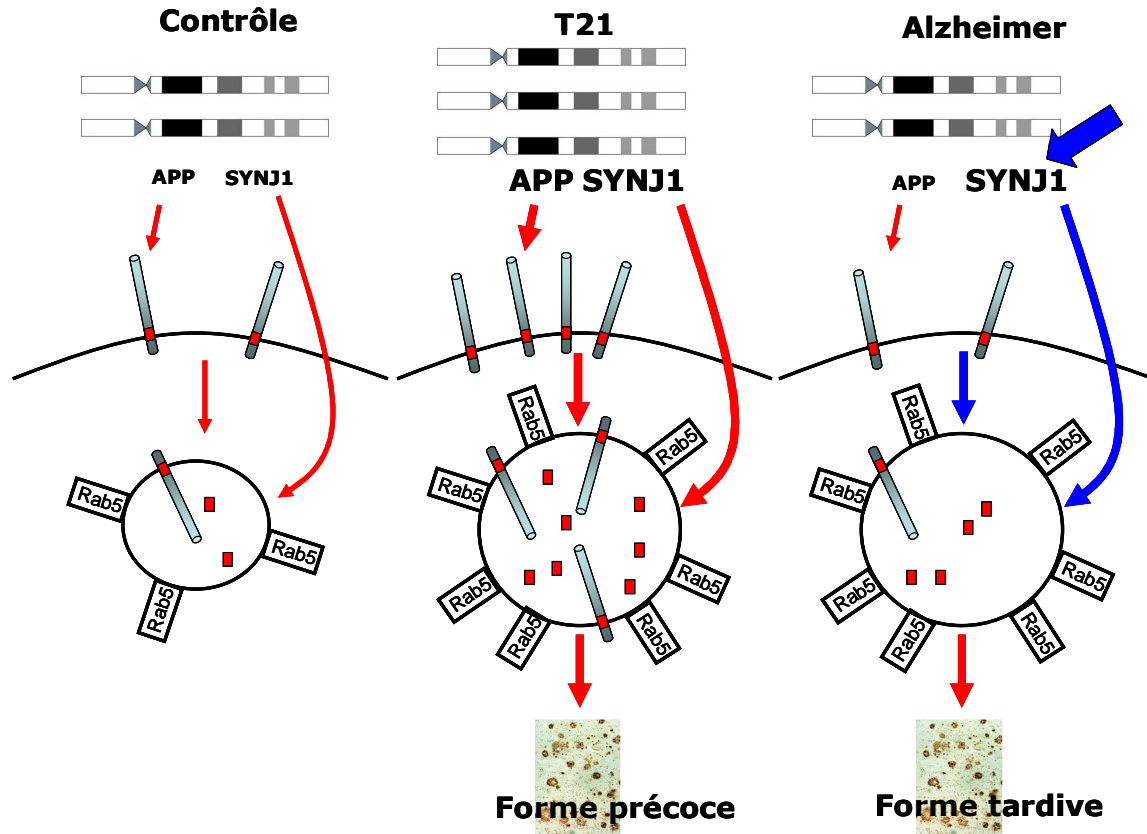


Figure 33 : Hypothèses des conséquences de la surexpression de la synaptojanine-1 (SYNJ1) sur la taille des endosomes et le clivage de l'APP dans la trisomie 21 et la maladie d'Alzheimer.

Gauche : Expressions normales de l'APP et de SYNJ1, endosomes non élargis avec une production physiologique du peptide amyloïde.

Milieu : Présence en 3 copies de l'APP et de SYNJ1 dans la trisomie 21. Augmentation de la taille des endosomes et de la protéine Rab5. Surproduction du peptide amyloïde conduisant à une forme précoce de la maladie.

Droite : Présence en deux copies de l'APP et de SYNJ1, mais un facteur « X » augmenterait le taux de synaptojanine-1 conduisant à un élargissement des endosomes. Cet environnement particulier favoriserait le clivage amyloïdogénique conduisant à une forme tardive de la maladie d'Alzheimer.

Chez un individu témoin, les gènes codant l'APP et la synaptojanine-1 sont en deux copies. La taille des endosomes est normale et la production du peptide amyloïde est physiologique. Chez un patient porteur d'une trisomie 21, les gènes de l'APP et de la synaptojanine-1 sont en trois copies, conduisant à l'élargissement des endosomes et à une production accrue de peptide amyloïde. Le patient va développer une forme précoce de la

maladie d'Alzheimer dès l'âge de 40 ans. Dans le cas d'une maladie d'Alzheimer de forme tardive (signes cliniques apparaissant après 65 ans), le gène de l'APP et de la synaptojanine-1 sont en deux copies. Nous pouvons imaginer qu'un facteur indéterminé augmente le taux de synaptojanine-1 conduisant à un élargissement des endosomes. Nous savons que le compartiment endosomal est un des sièges du clivage de l'APP vers la voie amyloïdogénique. Cet environnement particulier « endosomes élargis » serait ainsi favorable à la formation en excès de peptide amyloïde. Evidemment, la production du peptide amyloïde serait moins importante que dans le cas d'une trisomie 21 puisque l'APP n'est ici présent qu'en deux copies.

Existe-t-il dans la littérature des éléments permettant d'appuyer notre hypothèse ? Il est tout d'abord intéressant de noter qu'en moyenne les individus porteurs d'une microduplication du locus de l'APP développent la maladie d'Alzheimer à 52 ans (Rovelet-Lecrux et al., 2006). Il existe donc au moins un gène (la synaptojanine-1 ?) sur le chromosome 21 qui explique la différence d'une douzaine d'années entre l'apparition des signes cliniques chez les malades d'Alzheimer porteurs d'une trisomie 21 (développent la maladie d'Alzheimer en moyenne à 40 ans) et les porteurs de la microduplication de l'APP. Notre laboratoire, en collaboration avec celui de Dominique Campion, tente d'estimer la taille des endosomes dans les cerveaux de patients porteurs de microduplications du locus de l'APP. Notons également que la femme de 78 ans présentant les caractéristiques phénotypiques de la trisomie 21 mais non démente ne possédait ni la troisième copie du gène de l'APP ni la troisième copie du gène synaptojanine-1 (Prasher et al., 1998). Une ancienne étude a montré que le taux d'inositols était réduit dans les cerveaux de patients Alzheimer (Stokes and Hawthorne, 1987). Plus récemment, il a été démontré que les mutations des gènes codant pour la préséniline 1 et la préséniline 2 impliquées dans les formes familiales de la pathologie Alzheimer perturbent le métabolisme des PtdIns(4,5)P₂ affectant les courants calciques et la synthèse du peptide amyloïde. Plus précisément, la diminution des taux de PtdIns(4,5)P₂, indirectement par les mutants des présénilines ou directement par la surexpression du domaine 5-phosphatase de la synaptojanine-1 augmente la production du peptide amyloïde (Landman et al., 2006). Enfin, une dernière étude montre que le peptide amyloïde lui-même est capable de diminuer le taux de PtdIns(4,5)P₂ dans des cultures de neurones primaires corticaux. L'effet du peptide amyloïde n'est pas observé dans les neurones dérivés de souris haploinsuffisantes pour le gène de la synaptojanine-1 et permet de rétablir la LTP à un niveau contrôle suggérant l'effet bénéfique de diminuer l'activité de la synaptojanine-1 (Berman et al., 2008). Les patients porteurs d'une trisomie 21 subissent donc

un « double choc » sur les PtdIns(4,5)P₂ via la trisomie de l'APP et celle de la synaptojanine-1, accélérant ainsi le déclin cognitif des adultes porteurs d'une trisomie 21. Le déclin cognitif pourrait être occasionné exclusivement par les trois copies du gène de la synaptojanine-1. En effet, des souris trisomiques pour le gène de la synaptojanine-1 présentent un déficit d'apprentissage dans le test de la piscine de Morris par rapport aux souris contrôles (Voronov et al., 2008). L'ensemble de ces données suggère que la présence en trois copies de la synaptojanine-1 dans la trisomie 21 ou sa surexpression dans la maladie d'Alzheimer pourraient entraîner le déclin cognitif relié à la dérégulation des PtdIns(4,5)P₂ et au phénotype des endosomes élargis. Par exemple, un trafic axonal perturbé par la taille des endosomes induirait un dysfonctionnement synaptique et une diminution des capacités cognitives.

S'il semble que la synaptojanine-1 soit le gène candidat le plus robuste dans notre intervalle de 1.3Mb, les 5 autres gènes exprimés dans la région génétique ne doivent pas pour autant être négligés. A ma connaissance, aucune donnée n'est disponible sur une fonction potentielle de C21orf66 et C21orf59. SFRFS15 (« splicing factor, arginine/serine-rich 15 ») code pour un facteur d'épissage et semble lier l'ARN polymérase II chez le rat (yuryev 1996). Le gène SOD1 code pour la superoxyde dismutase 1, une enzyme anti-oxydante cytoplasmique qui métabolise les radicaux superoxydes en molécules d'oxygène et de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). La transfection du plasmide codant SOD1 ne modifie pas la taille des endosomes dans des lignées SH-5YSY de neuroblastomes. Enfin, le gène le plus intéressant est C21orf45 également connu sous le terme de FASP1 (« Phosphatidylinositol-four-phosphate adaptator protein1 ASociated Protein1»). La protéine FASP1 interagit avec les PtdIns4P, le précurseur majeur des PtdIns(4,5)P₂ et donc indirectement reliée avec le rôle de phosphatase de la synaptojanine1 (ye 2005). Notons que C21orf45 (appelé hMis18α dans l'étude) a également un rôle durant la télophase mais encore mal identifié (fujita 2007).

2.2 Explication de l'élargissement des endosomes dans le modèle murin Ts65Dn

Nous tentons de montrer la présence ou non d'endosomes élargis dans le cerveau de souris issues de croisement entre des souris trisomiques partielles Ts1Cje (pas d'endosomes élargis) et des souris TgAPP (pas d'endosomes élargis), ceci afin de réduire l'intervalle génétique par rapport au souris Ts65Dn (endosomes élargis selon les résultats de Cataldo et al.) (Cataldo et al., 2003). Cyril Basquin étudiant en Master2 dans notre laboratoire a confirmé un élargissement des endosomes statistiquement significatif dans le cerveau des souris Ts65Dn, alors que Cataldo et al. s'étaient basés sur des clichés de cellules sans analyse.

Visuellement, il n'était pas possible de différencier entre les cas contrôles et les cas trisomiques, ces données statistiques sont donc essentielles. Il en ressort un plus grand nombre de petits endosomes et de gros endosomes chez les Ts65Dn et un plus grand nombre d'endosomes de tailles moyennes chez les contrôles. Pour expliquer ce paradoxe, nous pouvons faire l'hypothèse qu'il y a une augmentation des vésicules d'endocytoses (endosomes de petites tailles) qui viennent ensuite fusionner pour former des endosomes précoces élargis. Dans le cas contrôle, le nombre de petites vésicules d'endocytose est plus faible conduisant à des endosomes précoces de tailles moyennes. Quoiqu'il en soit, il est désormais intéressant de continuer les expériences et les analyses sur les souris issues des croisements.

3. Tentative d'unification des deux voies aboutissant à l'élargissement des endosomes précoces.

Nous avons montré que l'excès de cholestérol à la membrane plasmique et l'excès de synaptojanine-1 sont capables d'augmenter la taille des endosomes précoces respectivement *in vitro* et *ex vivo* dans les cellules sanguines. Ce phénotype retrouvé dans la maladie d'Alzheimer et la trisomie 21 est corrélé à l'augmentation des protéines Rab5, un marqueur des endosomes précoces. Le schéma 34 tente de résumer les deux voies et de soulever les questions suivantes :

- 1/ Est-ce que l'augmentation du cholestérol ou de la synaptojanine-1 entraîne une augmentation de Rab5 élargissant alors les endosomes précoces comme démontré par Grbovic (Grbovic et al., 2003) ? A l'inverse sont-ce des voies indépendantes de Rab5 ?
- 2/ Existe-t-il un lien entre le cholestérol et la synaptojanine-1 unifiant les deux voies ?
- 3/ Quel est le rôle de l'APP dans le dysfonctionnement de l'endocytose ?

Des résultats préliminaires et la bibliographie peuvent en partie répondre à ces questions.

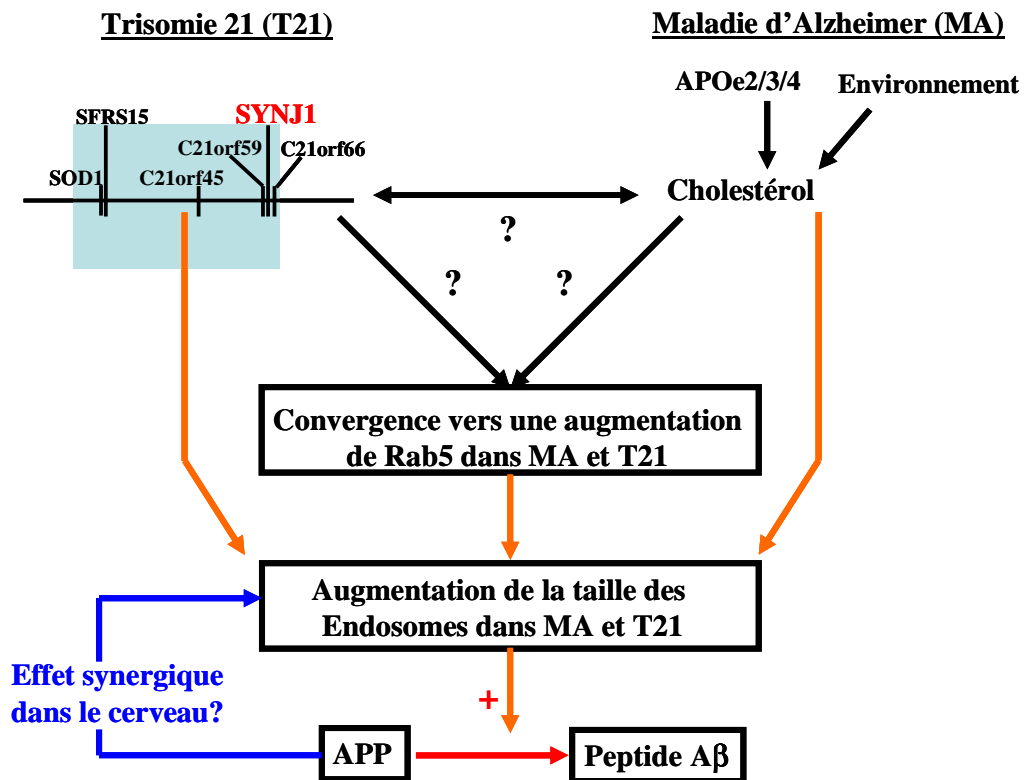


Figure 34 : Représentation schématique des différents intervenants et de leurs interactions potentielles dans l'établissement du phénotype « endosomes précoces élargis » dans la trisomie 21 et la maladie d'Alzheimer.

1/ Des puces à ADN ont été réalisées et analysées dans notre laboratoire comparant 8 lignées lymphoblastoïdes contrôles à 10 lignées trisomiques, il en est sorti une surexpression significative de 20% de l'ARN messager de Rab5. Cette surexpression a été validée par western blot (voir figure supplémentaire de l'article 2). Au vu de l'ensemble des données, il est possible que ce soit la surexpression de la synaptojanine-1 seule qui soit responsable de cette augmentation de Rab5. L'étude des résultats des puces à ADN des trisomies partielles nous apportera sans doute la réponse. En attendant, deux récents papiers suggèrent une interaction entre Rab5 et les PtdIns(4,5)P₂. Premièrement, il y a davantage de colocalisation entre PtdIns(4,5)P₂ et les vésicules d'endocytose positive pour la transferrine dans des cellules surexprimant le mutant dominant négatif de Rab5 comparé aux cellules surexprimant la forme sauvage de Rab5. Ces données indiquent que modifier l'activité de Rab5 affecte le turnover des PtdIns(4,5)P₂ dans les vésicules d'endocytose (Semerdjieva et al., 2008). Deuxièmement, chez la Drosophile, PtdIns(4,5)P₂ est requis pour la formation des vésicules d'endocytose, le recrutement de Rab5 et pour le processus d'endocytose. La surexpression de l'enzyme de synthèse des PtdIns(4,5)P₂ (Skittles) conduit à des défauts d'endocytose similaires à ceux

observés chez le mutant perte de fonction de Rab5 (Compagnon et al., 2009). Notons également que Rab5 contrôle de nombreuses enzymes impliquées dans le métabolisme des phosphoinositides. Rab5 recrute ainsi, le complexe phosphoinositide-3-kinase de classe III pour produire les PtdIns3P au niveau des membranes endosomales, la sous-unité p110 β du complexe phosphoinositide-3-kinase de classe I impliquée dans la formation de PtdIns(3,4,5)P₃ à la membrane plasmique. Rab5 interagit également directement avec les enzymes phosphoinositides 5-phosphatase et 4-phosphatase pour stimuler leurs activités (Shin et al., 2005; Stenmark, 2009).

Après traitement des cellules HEK au MBCD-cholestérol (+40%) puis six heures d'incubation, j'ai extrait les protéines du culot cellulaire et réalisé un western blot avec un anticorps dirigé contre la protéine Rab5 (Santa Cruz). La figure 35 montre que la protéine Rab5 est augmentée par rapport aux cellules non traitées. Il semble que l'excès de cholestérol conduise bien à une augmentation de Rab5 et serait donc en amont de la dérégulation de Rab5.

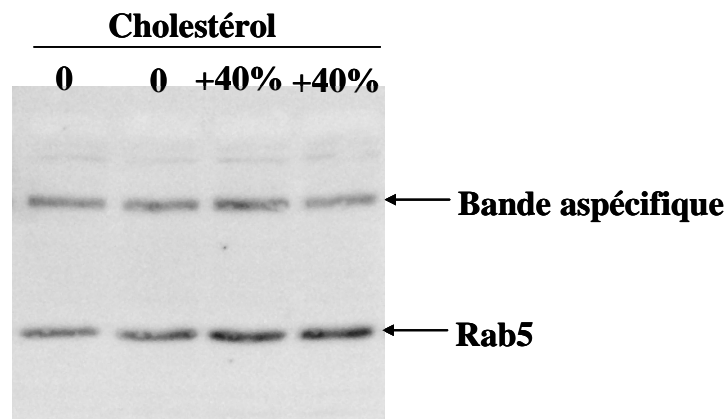


Figure 35: Augmentation de la protéine Rab5 après traitement au MBCD-cholestérol (+40%) puis 6 heures d'incubation.

Ainsi, les deux voies paraissent converger vers une augmentation de la protéine Rab5. Rab5 étant augmentée dans le cerveau des patients Alzheimer et ceux porteurs de trisomie 21, cela confirme l'intérêt qui doit être porté aux dérégulations du cholestérol et de la synaptojanine-1.

2/ Je n'ai pas trouvé de relation directe entre le cholestérol et la synaptojanine-1. Cependant, certaines relations existent entre le cholestérol et les PtdIns(4,5)P₂. Spontanément les PtdIns(4,5)P₂ ne se regroupent pas dans des régions riches en cholestérol (Wassall et al.,

2004), les PtdIns(4,5)P₂ préfèrent se répartir dans des domaines désordonnés à cause de leurs chaînes polyinsaturées. Cependant, des protéines sont capables de recruter les PtdIns(4,5)P₂ dans des domaines riches en cholestérol comme NAP-22 (Epanand et al., 2004). Des études doivent être réalisées sur l'impact d'une modification du cholestérol sur le taux de phosphoinositols et inversement.

3/ Les publications de Cataldo et *al.* chez la souris ont montré que le gène de l'APP en trois copies était nécessaire mais pas suffisant pour expliquer la formation des endosomes élargis (Cataldo et al., 2003). La surexpression de la synaptojanine-1 dans les lignées lymphoblastoïdes et dans les lignées cellulaires neuronales SH-SY5Y permet à elle seule de modifier la taille des endosomes précoces. Il apparaît donc que la surexpression de l'APP dans ces cellules ne soit pas nécessaire pour observer le phénotype. Parmi les quatre lignées de trisomies partielles positives pour l'élargissement des endosomes (2, 4, 5, 6 voir fig 2 de l'article 2), la 2 et la 4 ont à la fois l'APP et la synaptojanine-1 en trois copies alors que la 5 et la 6 ne présentent que le gène de la synaptojanine-1 tripliqué. Les lignées 2 et 4 ne présentent pas d'endosomes plus larges que les lignées 5 et 6, il ne semble donc pas y avoir un effet synergique de l'APP sur le phénotype établi par la surexpression de la synaptojanine-1 dans ces lignées. Pour conclure définitivement, il faudrait surexprimer la synaptojanine-1 dans une lignée cellulaire déficiente en APP. L'APP étant très faiblement exprimé dans les lignées lymphoblastoïdes (pas de différence significative d'expression entre les lignées contrôles et trisomiques des ARNm sur puce à ADN), il est possible qu'un effet synergique soit observé dans le cerveau chez l'Homme comme chez la Souris. Pour compliquer le modèle, il semble que les mutations de l'APP retrouvées dans les formes familiales de la maladie d'Alzheimer puissent *in vitro* augmenter la taille des endosomes (Laifenfeld et al., 2007). Il est également possible que les résultats retrouvés chez le modèle murin Ts65Dn de trisomie 21 murin ne concordent pas chez les individus porteurs d'une trisomie 21 et que chez ces derniers tout le phénotype soit dû exclusivement à la surexpression de la synaptojanine-1. Le rôle de l'APP sur le phénotype d'élargissement des endosomes est donc encore débattu, une analyse systématique de la taille des endosomes dans le cerveau des cas familiaux (APP, PS1, PS2, microduplication) et sporadiques avec ou sans l'allèle ApoE4 permettra de confirmer ou d'infirmer la nécessité du gène APP.

4. Perspectives

4.1 Mutation du domaine de liaison de l'APP au cholestérol

Nous avons synthétisé deux amorces : (GTTCTTTGCAGAAGATGTGGcTgCAAA CgcAGGTGCAATCATTGGACTCATGGTG et le complémentaire) présentant quatre mutations (bases en minuscules) afin de remplacer par mutagenèse dirigée les trois acides aminés putatifs impliqués dans le site de liaison de l'APP au cholestérol par des alanines : G696A, S697A et K699A. Après avoir vérifié la distribution de l'APP dans la cellule (HEK, N2A) transfectée par le plasmide, nous allons doser le peptide amyloïde ($\alpha\beta 40$ et $\alpha\beta 42$) et observer par western blot les différents fragments de l'APP (C99, C83, AICD). Une fois ces contrôles réalisés, l'objectif sera de traiter les cellules au cholestérol et de regarder l'effet d'un excès de cholestérol sur l'endocytose de l'APP muté et son clivage en peptide amyloïde. Les techniques utilisées seront la quantification de la fluorescence internalisée par cytométrie en flux, la quantification de la distribution de l'APP dans la cellule par un marquage par immunofluorescence, le western blot comme dans l'article 1. Si le cholestérol interagit directement avec l'APP pour augmenter le taux d'endocytose nous devrions observer une inhibition de l'effet dans le cas « APP muté ». Si le résultat est positif, une dissection de l'effet peut être entreprise en ne mutant que l'un des trois résidus du site de liaison de l'APP pour le cholestérol. Si le résultat est négatif, l'effet de l'excès de cholestérol passe par un autre motif sur l'APP ou vraisemblablement indirectement comme par l'interaction avec la flotilline (Schneider et al., 2008).

4.2 Analyse de la répartition de l'APP à la membrane plasmique par spectroscopie de corrélation de fluorescence

J'ai observé une redistribution de l'APP vers les fractions positives pour la flotilline considérées comme représentatives des radeaux lipidiques après traitement au cholestérol (Fig 21). Cette augmentation de l'APP dans les radeaux peut être due soit à une concentration de l'APP dans les radeaux soit à une augmentation du nombre de radeaux donc en proportion à une augmentation de l'APP dans ces microdomaines de la membrane plasmique. Etant donné la diversité des techniques biochimiques permettant d'isoler les membranes résistantes aux détergents, le laboratoire a développé en collaboration avec l'équipe de Sandrine Lévêque-Fort d'Orsay une méthode permettant de discriminer entre les protéines présentes dans les

radeaux et en dehors des radeaux spécifiquement à la membrane plasmique. Cette technique de microscopie appelée FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy) permet d'analyser les fluctuations de fluorescences de molécules diffusant à l'intérieur d'un très petit volume de l'ordre du femtolitre (Kim and Schwille, 2003). Les variations de l'intensité de fluorescence sont enregistrées en fonction du temps. Chaque enregistrement permet de calculer une fonction d'autocorrélation qui correspond schématiquement à la probabilité qu'une protéine émettrice fluorescente présente à l'instant t_0 soit encore présente à l'instant t_1 dans le même point focal d'analyse. Ainsi, à la membrane, la molécule étudiée peut diffuser lentement (environnement stable de type « radeau lipidique ») ou rapidement (phase fluide de la membrane). Cette méthode couplée à la microscopie confocale permet à Catherine Marquer, post-doctorante dans le laboratoire, d'analyser le nombre de particules d'APP-YFP et de Bace1-GFP qui diffusent lentement ou rapidement dans les cellules HEK et dans des cultures de neurones primaires d'hippocampe de rat avec ou sans traitement au MBCD-cholestérol. Ainsi, elle pourra confirmer ou infirmer l'hypothèse selon laquelle l'APP est relocalisé dans les radeaux lipidiques après enrichissement en cholestérol de la membrane plasmique (Fig 27).

En parallèle, Catherine Marquer et Viviane Devauges (Doctorante dans l'équipe de Sandrine Lévêque-Fort) continuent les mesures en FLIM que nous avons mises au point dans le laboratoire à Orsay avec Pierre Blandin pour regarder l'effet d'un excès de cholestérol sur l'homodimérisation de l'APP et l'hétérodimérisation d'APP et Bace1 dans les cellules HEK et les neurones. Les mesures seront réalisées à la fois à la membrane plasmique par microscopie TIRF et plus globalement en épifluorescence peu de temps après l'ajout du cholestérol pour observer la redistribution de l'APP et de Bace-1.

L'ensemble de ces données permettra d'affiner le modèle (Fig 27) pour mieux comprendre le rôle du cholestérol sur la répartition de l'APP et Bace-1 dans les radeaux lipidiques et sur leur interaction.

Enfin, il est prévu de développer de nouvelles stratégies de microscopie pour améliorer notre résolution afin de tenter de discerner les radeaux lipidiques avec par exemple la microscopie STED (STimulated Emission Depletion) couplée au FLIM ou à la FCS.

4.3 Etude du trafic des endosomes élargis

Les neurones sont des cellules polarisées avec un axone pouvant mesurer jusqu'à plusieurs centimètres. Le trafic vésiculaire devient dès lors extrêmement important pour amener les molécules aux extrémités synaptiques. Il serait intéressant de moduler le cholestérol plasmatique ou de surexprimer la synaptojanine-1 dans les neurones pour observer le déplacement des vésicules élargies. Va-t-on mettre en évidence un engorgement de la voie axonale conduisant aux renflements détectés dans les cerveaux de patients Alzheimer (Stokin et al., 2005) ?

L'équipe de Bernard Brugg (équipe Différentiation et mort neuronale, Université Pierre et Marie Curie à Paris 6) nous a proposé d'utiliser leur « set-up » composé de deux chambres, l'une pour les somas des neurones et l'autre pour les parties distales des axones. Entre les deux, les parties proximales des axones sont linéaires et parallèles entre elles grâce à un astucieux réseau de capillaires (les axones poussent dans des microcanaux fluidiques). Il est alors facile de quantifier la vitesse, la direction, la taille et le nombre de vésicules qui transitent dans la partie proximale de l'axone par vidéomicroscopie. En outre, le traitement à la MBCD-cholestérol peut se faire dans une des chambres ou dans les deux. Ce projet est en cours de réflexion.

4.4 Confirmation que la surexpression de la synaptojanine-1 est responsable de l'élargissement des endosomes

Plusieurs expériences complémentaires seraient intéressantes à réaliser pour confirmer l'ensemble des résultats.

Premièrement, valider par une seconde méthode que l'anticorps EEA1 se fixe bien sur des structures endosomales et que celles-ci soient bien élargies dans les cellules issues de trisomies 21. Pour cela, nous pourrions regarder le marquage endosomal par microscopie électronique.

Deuxièmement, afin de valider le phénotype « endosomes élargis » causé par la présence de trois copies de la synaptojanine-1, un petit ARN interférence contre la synaptojanine-1 pourrait être transfecté dans les lignées lymphoblastoïdes issues de patients porteurs de trisomie 21 afin d'annuler le phénotype. Le problème rencontré sera sans doute une trop importante baisse de la protéine synaptojanine-1 conduisant à un blocage de l'endocytose dépendante de la clathrine (les vésicules d'endocytose ne peuvent pas dépolymériser leurs manteaux de clathrine). Il faut donc seulement détruire 1/3 du nombre

total d'ARN messager de la synaptojanine-1 d'une cellule trisomique pour revenir dans un cas contrôle. Pour cela deux possibilités : soit on utilise un ARN interférent qui n'est pas très efficace, soit on utilise un ARN interférent très efficace dirigé contre l'allèle d'un des parents transmis à sa descendance. Par exemple, si sur les 3 chromosomes 21 de la lignée trisomique, 2 proviennent de la mère (95% des cas) et 1 du père, il faudrait séquencer et trouver un polymorphisme dans la portion transcrite du gène codant pour la synaptojanine-1 entre les 2 parents permettant de construire un ARN interférant spécifique à l'ARN messager du père. Si cette dernière idée est longue et laborieuse, la première est également périlleuse sachant qu'aujourd'hui il n'y a pas d'anticorps très spécifique de la synaptojanine-1 en western blot pour valider une diminution de 33% de la quantité de protéine.

Troisièmement, nous pourrions surexprimer la synaptojanine-1 dans des lignées cellulaires, extraire les protéines et analyser la quantité de Rab5.

Quatrièmement, des tests d'endocytose par des marquages de protéines membranaires avec la HRP pourraient être effectués pour comprendre si dans les lignées les endosomes élargis sont dus à un excès d'endocytose.

Cinquièmement, nous allons demander le plasmide codant pour la kinase qui phosphoryle les PtdIns(4)P pour former les PtdIns(4,5)P₂. Quelle sera la taille des endosomes, une fois la protéine surexprimée ?

Sixièmement, le rôle de la synaptojanine-1 sur l'établissement du phénotype « endosome élargis » passe-t-il par l'activité phosphatase de la synaptojanine-1 ? D'autant plus qu'il n'existe pas un mais deux domaines possédant une activité phosphatase dans la synaptojanine-1 : 5-phosphatase et Sac-1 like phosphatase (Mani et al., 2007)! Il semble que les deux soient importants pour le processus d'endocytose, qu'en est-il pour la taille des endosomes ?

Enfin, nous souhaiterions récupérer quelques cerveaux de souris contrôles et trisomiques pour la synaptojanine-1 pour valider in vivo l'augmentation de la taille des endosomes dans les neurones. Il n'est pas évident que l'on observe un phénotype dans les cerveaux de souris trisomiques pour la synaptojanine-1 car si les études de Cataldo et *al.* se révèlent justes, l'APP est nécessaire (mais pas suffisant) pour obtenir le phénotype d'élargissement des endosomes. Il faudrait donc croiser des souris trisomiques pour les gènes APP et synaptojanine-1 pour obtenir le phénotype recherché (Cataldo et al., 2003).

4.5 Expression et localisation de la synaptojanine-1 dans le cerveau des patients Alzheimer

Nous avons utilisé un anticorps polyclonal de chez Abcam dirigé contre la synaptojanine-1 pour observer son expression dans le cortex de 5 cerveaux de malades Alzheimer (Braak VI) et 5 sujets âgés non déments. Ce travail a été réalisé par José Diaz, étudiant en Master 2 dans l'équipe. Un marquage vésiculaire nettement plus intense dans les neurones de patients Alzheimer est noté en utilisant le kit de détection DAB de Dako (Fig 36). Il semble donc que la synaptojanine-1 soit surexprimée dans le cerveau des patients Alzheimer par rapport aux contrôles. Ces résultats doivent être validés en confirmant que l'anticorps soit bien spécifique de la protéine synaptojanine-1. Nous souhaitons également quantifier cette augmentation par western-blot sur des échantillons de cerveaux Alzheimer et contrôles. Une première tentative n'a pas donné de résultats concluants car de nombreuses bandes ont été révélées avec l'anticorps Abcam. Si l'augmentation de la synaptojanine-1 est confirmée dans les cas sporadique de la maladie d'Alzheimer, le modèle de la figure 33 serait renforcé.

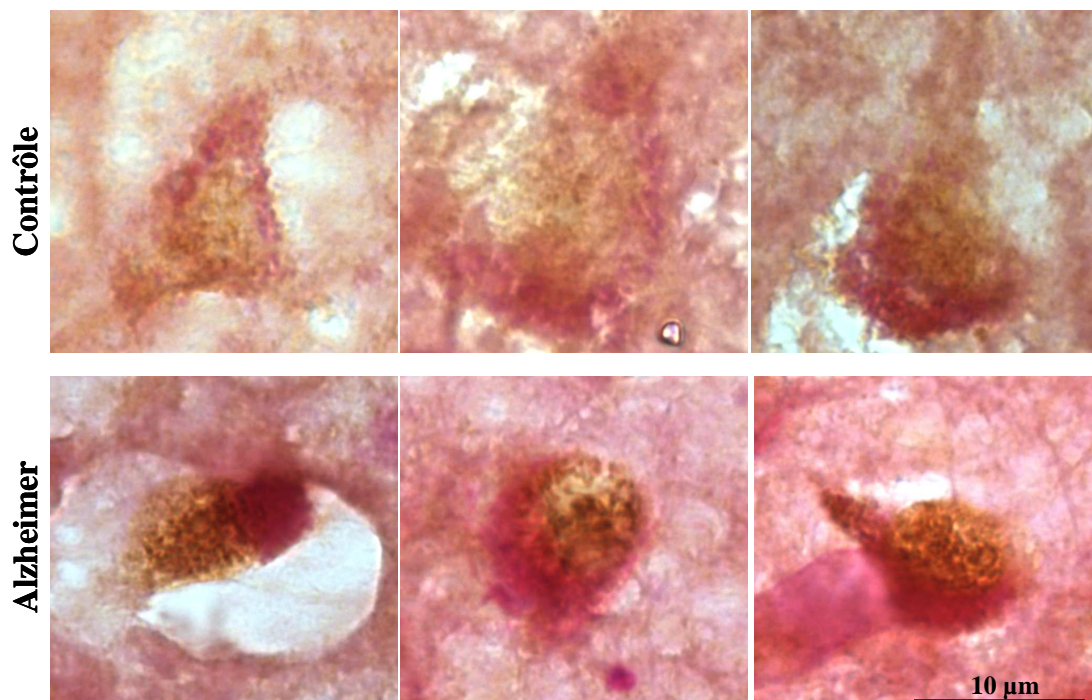


Figure 36 : Marquages par immunohistochimie de coupes de cortex cérébral humain contrôles (haut) et Alzheimer (bas) avec un anticorps polyclonal anti-synaptojanine-1 (Abcam).

Le marquage marron correspond au précipité de l'oxydation de la DAB à l'emplacement de l'anticorps secondaire dirigé contre l'anti-synaptojanine-1. Le marquage rouge est une coloration à l'acide périodique de Schiff qui met en évidence la lipofuscine, un pigment qui s'accumule avec l'âge dans les cellules.

4.6 Amélioration de la détection des endosomes élargis dans les lignées lymphoblastoïdes trisomiques et dans le sang de patients porteurs d'une trisomie 21

La méthode actuelle que j'utilise pour visualiser les endosomes est une simple immunofluorescence contre la protéine EEA1. Après avoir pris des photographies par microscopie confocale, j'analyse la taille des endosomes par ImageJ. Je souhaite pouvoir discriminer entre les cellules témoins et les cellules trisomiques plus rapidement et sans biais. Pour cela, je vais tenter d'utiliser la même technique d'immunofluorescence mais couplée cette fois-ci à une analyse par cytométrie en flux pour mesurer la fluorescence totale de la cellule. Voici quelques problèmes auxquels je vais être confronté et comment je vais essayer de les résoudre :

1/ Toutes les cellules ne possèdent pas d'endosomes élargis. Il faudra donc analyser finement le signal.

2/ Des petits endosomes sont aussi fluorescents que des gros endosomes par le marquage EEA1. La fluorescence émise n'est donc pas corrélée à la taille des endosomes. Pour éviter cet écueil, je pense utiliser de la transferrine directement couplée à un fluorophore en espérant que les gros endosomes contiennent davantage de marquage.

3/ Si notre hypothèse se révèle juste, les gros endosomes sont le résultat de la fusion de petits endosomes. Il est alors probable que la quantité de fluorescence d'une cellule avec un gros endosome et quelques normaux soit équivalente à la fluorescence d'une cellule sans endosomes élargis mais avec beaucoup d'endosomes de tailles normales. Dans ce cas là, il me sera délicat de séparer les lignées témoins des lignées trisomiques. Pour remédier à ce problème, je ne vois actuellement aucune solution en analysant la fluorescence des cellules entières par cytométrie. Par contre, on pourrait imaginer lyser les cellules et réaliser un gradient afin d'isoler la population endosomale puis de mesurer la fluorescence de chaque endosome individuellement. La mesure serait alors directe et permettrait, en outre, de connaître la taille de l'endosome et sa granulosité. La taille d'un endosome, de l'ordre de 100 à 250 nanomètres, n'est apparemment pas un problème pour la mesure puisque des virus fluorescents (même ordre d'échelle que les endosomes) peuvent être analysés. Il suffit juste d'avoir un laser suffisamment puissant. Dernière précaution, pour éviter que plusieurs endosomes ne soient détectés en même temps par le laser, une dilution adéquate de la solution

devra être trouvée pour que statistiquement la fluorescence ne soit émise que par un endosome unique.

4/ Après un premier test d'endocytose de la transferrine fluoromarkée, des différences ont été observées mais très variables d'une lignée à l'autre. Les lignées ne poussent pas de la même manière (petites ou grosses grappes de cellules, plus ou moins adhérentes à la surface de la boîte de culture) et pas à la même vitesse. Des expériences complémentaires doivent être réalisées.

Même si des doutes persistent sur le succès de séparation des lignées contrôles versus trisomiques par cette technique, il est tout de même nécessaire de continuer dans cette voie.

4.7 Exploration de la taille des endosomes dans les lignées lymphoblastoïdes de patients atteints de la maladie Alzheimer

Il paraît évident que la prochaine étape est la recherche d'endosomes élargis dans le sang de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Un premier test peut être réalisé sur des lignées lymphoblastoïdes. Il sera également intéressant de quantifier les ARNm et les protéines de la synaptotagmine-1 ainsi que de doser les PtdIns(4,5)P₂ entre contrôles et patients. Certaines modifications du transcriptome ont été rapportées (Kalman et al., 2005) dans les lymphocytes de patients ainsi que des modifications de la fluidité de leurs membranes (Scott et al., 1994). La diffusion de peptides ou de protéines à travers la barrière hémato-encéphalique pourrait expliquer l'impact des dérégulations de l'homéostasie neuronale sur les cellules périphériques.

A ce jour, aucun diagnostic fiable ne permet de déceler une maladie Alzheimer. Aucun signe biologique précoce ne peut donc prévenir l'apparition des signes cliniques. La découverte d'endosomes élargis en périphérie chez les patients porteurs d'une trisomie 21 (phénotype précoce dans le cerveau de patients Alzheimer) paraît donc une piste intéressante pour la recherche future d'un diagnostic.

Ce n'est pas la fin.
Ce n'est même pas le commencement de la fin.
Mais, c'est peut-être la fin du commencement.
Winston Churchill

IV. REFERENCES

- Abad-Rodriguez, J., M.D. Ledesma, K. Craessaerts, S. Perga, M. Medina, A. Delacourte, C. Dingwall, B. De Strooper, and C.G. Dotti. 2004. Neuronal membrane cholesterol loss enhances amyloid peptide generation. *J Cell Biol.* 167:953-60.
- Abrami, L., S. Liu, P. Cosson, S.H. Leppla, and F.G. van der Goot. 2003. Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process. *J Cell Biol.* 160:321-8.
- Ait Yahya-Graison, E., J. Aubert, L. Dauphinot, I. Rivals, M. Prieur, G. Golfier, J. Rossier, L. Personnaz, N. Creau, H. Blehaut, S. Robin, J.M. Delabar, and M.C. Potier. 2007. Classification of human chromosome 21 gene-expression variations in Down syndrome: impact on disease phenotypes. *Am J Hum Genet.* 81:475-91.
- Allinquant, B., P. Hantraye, P. Mailleux, K. Moya, C. Bouillot, and A. Prochiantz. 1995. Downregulation of amyloid precursor protein inhibits neurite outgrowth in vitro. *J Cell Biol.* 128:919-27.
- Alzheimer, A. 1907. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Z Psychiat.* 64:146-148
- Andersen, O.M., J. Reiche, V. Schmidt, M. Gotthardt, R. Spoelgen, J. Behlke, C.A. von Arnim, T. Breiderhoff, P. Jansen, X. Wu, K.R. Bales, R. Cappai, C.L. Masters, J. Gliemann, E.J. Mufson, B.T. Hyman, S.M. Paul, A. Nykjaer, and T.E. Willnow. 2005. Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:13461-6.
- Antonarakis, S.E., R. Lyle, E.T. Dermitzakis, A. Reymond, and S. Deutsch. 2004. Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nat Rev Genet.* 5:725-38.
- Araki, W., N. Kitaguchi, Y. Tokushima, K. Ishii, H. Aratake, S. Shimohama, S. Nakamura, and J. Kimura. 1991. Trophic effect of beta-amyloid precursor protein on cerebral cortical neurons in culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 181:265-71.
- Arendt, T., M.K. Bruckner, H.J. Gertz, and L. Marcova. 1998. Cortical distribution of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease matches the pattern of neurons that retain their capacity of plastic remodelling in the adult brain. *Neuroscience.* 83:991-1002.
- Armogida, M., A. Petit, B. Vincent, S. Scarzello, C.A. da Costa, and F. Checler. 2001. Endogenous beta-amyloid production in presenilin-deficient embryonic mouse fibroblasts. *Nat Cell Biol.* 3:1030-3.

- Arosio, B., D. Trabattoni, L. Galimberti, P. Bucciarelli, F. Fasano, C. Calabresi, C.L. Cazzullo, C. Vergani, G. Annoni, and M. Clerici. 2004. Interleukin-10 and interleukin-6 gene polymorphisms as risk factors for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 25:1009-15.
- Attems, J., M. Quass, K.A. Jellinger, and F. Lintner. 2007. Topographical distribution of cerebral amyloid angiopathy and its effect on cognitive decline are influenced by Alzheimer disease pathology. *J Neurol Sci*. 257:49-55.
- Atwood, C.S., S.R. Robinson, and M.A. Smith. 2002. Amyloid-beta: redox-metal chelator and antioxidant. *J Alzheimers Dis*. 4:203-14.
- Ayme, S. 1996. [Value of registries in decision making in public health: the example of trisomy 21]. *Rev Epidemiol Sante Publique*. 44 Suppl 1:S82-9.
- Balasubramanian, N., D.W. Scott, J.D. Castle, J.E. Casanova, and M.A. Schwartz. 2007. Arf6 and microtubules in adhesion-dependent trafficking of lipid rafts. *Nat Cell Biol*. 9:1381-91.
- Ballatore, C., V.M. Lee, and J.Q. Trojanowski. 2007. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci*. 8:663-72.
- Ballerini, C., B. Nacmias, G. Rombola, G. Marcon, L. Massacesi, and S. Sorbi. 1999. HLA A2 allele is associated with age at onset of Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 45:397-400.
- Barman, S., and D.P. Nayak. 2007. Lipid raft disruption by cholesterol depletion enhances influenza A virus budding from MDCK cells. *J Virol*. 81:12169-78.
- Baum, L., L. Chen, E. Masliah, Y.S. Chan, H.K. Ng, and C.P. Pang. 1999. Lipoprotein lipase mutations and Alzheimer's disease. *Am J Med Genet*. 88:136-9.
- Baxter, L.L., T.H. Moran, J.T. Richtsmeier, J. Troncoso, and R.H. Reeves. 2000. Discovery and genetic localization of Down syndrome cerebellar phenotypes using the Ts65Dn mouse. *Hum Mol Genet*. 9:195-202.
- Beel, A.J., C.K. Mobley, H.J. Kim, F. Tian, A. Hadziselimovic, B. Jap, J.H. Prestegard, and C.R. Sanders. 2008. Structural studies of the transmembrane C-terminal domain of the amyloid precursor protein (APP): does APP function as a cholesterol sensor? *Biochemistry*. 47:9428-46.
- Belinson, H., D. Lev, E. Masliah, and D.M. Michaelson. 2008. Activation of the amyloid cascade in apolipoprotein E4 transgenic mice induces lysosomal activation and neurodegeneration resulting in marked cognitive deficits. *J Neurosci*. 28:4690-701.

- Bell, K.F., L. Zheng, F. Fahrenholz, and A.C. Cuello. 2008. ADAM-10 over-expression increases cortical synaptogenesis. *Neurobiol Aging*. 29:554-65.
- Benmerah, A., and C. Lamaze. 2007. Clathrin-coated pits: vive la difference? *Traffic*. 8:970-82.
- Berman, D.E., C. Dall'Armi, S.V. Voronov, L.B. McIntire, H. Zhang, A.Z. Moore, A. Staniszewski, O. Arancio, T.W. Kim, and G. Di Paolo. 2008. Oligomeric amyloid-beta peptide disrupts phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate metabolism. *Nat Neurosci*. 11:547-54.
- Bertram, L., M.B. McQueen, K. Mullin, D. Blacker, and R.E. Tanzi. 2007. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet*. 39:17-23.
- Bertrand, E., E. Brouillet, I. Caille, C. Bouillot, G.M. Cole, A. Prochiantz, and B. Allinquant. 2001. A short cytoplasmic domain of the amyloid precursor protein induces apoptosis in vitro and in vivo. *Mol Cell Neurosci*. 18:503-11.
- Bian, L., J.D. Yang, T.W. Guo, Y. Sun, S.W. Duan, W.Y. Chen, Y.X. Pan, G.Y. Feng, and L. He. 2004. Insulin-degrading enzyme and Alzheimer disease: a genetic association study in the Han Chinese. *Neurology*. 63:241-5.
- Bjorkhem, I. 2006. Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. *J Intern Med*. 260:493-508.
- Bjorkhem, I., D. Lutjohann, O. Breuer, A. Sakinis, and A. Wennmalm. 1997. Importance of a novel oxidative mechanism for elimination of brain cholesterol. Turnover of cholesterol and 24(S)-hydroxycholesterol in rat brain as measured with ¹⁸O₂ techniques in vivo and in vitro. *J Biol Chem*. 272:30178-84.
- Blanche, H., L. Cabanne, M. Sahbatou, and G. Thomas. 2001. A study of French centenarians: are ACE and APOE associated with longevity? *C R Acad Sci III*. 324:129-35.
- Blandin, P., S. Leveque-Fort, S. Lecart, J.C. Cossec, M.C. Potier, Z. Lenkei, F. Druon, and P. Georges. 2009. Time-gated total internal reflection fluorescence microscopy with a supercontinuum excitation source. *Appl Opt*. 48:553-9.
- Bolmont, T., F. Clavaguera, M. Meyer-Luehmann, M.C. Herzog, R. Radde, M. Staufenbiel, J. Lewis, M. Hutton, M. Tolnay, and M. Jucker. 2007. Induction of tau pathology by intracerebral infusion of amyloid-beta -containing brain extract and by amyloid-beta deposition in APP x Tau transgenic mice. *Am J Pathol*. 171:2012-20.

- Bos, J.L. 1998. All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral. *EMBO J.* 17:6776-82.
- Bouillot, C., A. Prochiantz, G. Rougon, and B. Allinquant. 1996. Axonal amyloid precursor protein expressed by neurons in vitro is present in a membrane fraction with caveolae-like properties. *J Biol Chem.* 271:7640-4.
- Braak, H., and E. Braak. 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82:239-59.
- Brecht, W.J., F.M. Harris, S. Chang, I. Tesseur, G.Q. Yu, Q. Xu, J. Dee Fish, T. Wyss-Coray, M. Buttini, L. Mucke, R.W. Mahley, and Y. Huang. 2004. Neuron-specific apolipoprotein e4 proteolysis is associated with increased tau phosphorylation in brains of transgenic mice. *J Neurosci.* 24:2527-34.
- Breteler, M.M. 2000. Vascular involvement in cognitive decline and dementia. Epidemiologic evidence from the Rotterdam Study and the Rotterdam Scan Study. *Ann N Y Acad Sci.* 903:457-65.
- Brion, J.P., H. Passareiro, J. Nunez, J. Flament-Durand. 1985. Mise en évidence immunologique de la protéine tau au niveau des lésions de dégénérescence neurofibrillaire de la maladie d'Alzheimer. *Arch Biol.* 95:229-235.
- Bu, G. 2009. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci.* 10:333-44.
- Bucci, C., R.G. Parton, I.H. Mather, H. Stunnenberg, K. Simons, B. Hoflack, and M. Zerial. 1992. The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell.* 70:715-28.
- Buee, L., T. Bussiere, V. Buee-Scherrer, A. Delacourte, and P.R. Hof. 2000. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev.* 33:95-130.
- Burgos, J.S., C. Ramirez, I. Sastre, M.J. Bullido, and F. Valdivieso. 2003. ApoE4 is more efficient than E3 in brain access by herpes simplex virus type 1. *Neuroreport.* 14:1825-7.
- Busche, M.A., G. Eichhoff, H. Adelsberger, D. Abramowski, K.H. Wiederhold, C. Haass, M. Staufenbiel, A. Konnerth, and O. Garaschuk. 2008. Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science.* 321:1686-9.
- Buxbaum, J.D., N.S. Geoghagen, and L.T. Friedhoff. 2001. Cholesterol depletion with physiological concentrations of a statin decreases the formation of the Alzheimer amyloid Abeta peptide. *J Alzheimers Dis.* 3:221-229.

- Buxbaum, J.D., G. Thinakaran, V. Koliatsos, J. O'Callahan, H.H. Slunt, D.L. Price, and S.S. Sisodia. 1998. Alzheimer amyloid protein precursor in the rat hippocampus: transport and processing through the perforant path. *J Neurosci.* 18:9629-37.
- Caille, I., B. Allinquant, E. Dupont, C. Bouillot, A. Langer, U. Muller, and A. Prochiantz. 2004. Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development.* 131:2173-81.
- Cam, J.A., C.V. Zerbinatti, J.M. Knisely, S. Hecimovic, Y. Li, and G. Bu. 2004. The low density lipoprotein receptor-related protein 1B retains beta-amyloid precursor protein at the cell surface and reduces amyloid-beta peptide production. *J Biol Chem.* 279:29639-46.
- Canevari, L., and J.B. Clark. 2007. Alzheimer's disease and cholesterol: the fat connection. *Neurochem Res.* 32:739-50.
- Cao, X., and T.C. Sudhof. 2001. A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science.* 293:115-20.
- Carey, R.M., B.A. Balcz, I. Lopez-Coviella, and B.E. Slack. 2005. Inhibition of dynamin-dependent endocytosis increases shedding of the amyloid precursor protein ectodomain and reduces generation of amyloid beta protein. *BMC Cell Biol.* 6:30.
- Carter, C.J. 2007. Convergence of genes implicated in Alzheimer's disease on the cerebral cholesterol shuttle: APP, cholesterol, lipoproteins, and atherosclerosis. *Neurochem Int.* 50:12-38.
- Cataldo, A., G.W. Rebeck, B. Ghetti, C. Hulette, C. Lippa, C. Van Broeckhoven, C. van Duijn, P. Cras, N. Bogdanovic, T. Bird, C. Peterhoff, and R. Nixon. 2001. Endocytic disturbances distinguish among subtypes of Alzheimer's disease and related disorders. *Ann Neurol.* 50:661-5.
- Cataldo, A.M., J.L. Barnett, C. Pieroni, and R.A. Nixon. 1997. Increased neuronal endocytosis and protease delivery to early endosomes in sporadic Alzheimer's disease: neuropathologic evidence for a mechanism of increased beta-amyloidogenesis. *J Neurosci.* 17:6142-51.
- Cataldo, A.M., D.J. Hamilton, J.L. Barnett, P.A. Paskevich, and R.A. Nixon. 1996. Properties of the endosomal-lysosomal system in the human central nervous system: disturbances mark most neurons in populations at risk to degenerate in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 16:186-99.
- Cataldo, A.M., P.M. Mathews, A.B. Boiteau, L.C. Hassinger, C.M. Peterhoff, Y. Jiang, K. Mullaney, R.L. Neve, J. Gruenberg, and R.A. Nixon. 2008. Down syndrome fibroblast

- model of Alzheimer-related endosome pathology: accelerated endocytosis promotes late endocytic defects. *Am J Pathol.* 173:370-84.
- Cataldo, A.M., S. Petanceska, C.M. Peterhoff, N.B. Terio, C.J. Epstein, A. Villar, E.J. Carlson, M. Staufenbiel, and R.A. Nixon. 2003. App gene dosage modulates endosomal abnormalities of Alzheimer's disease in a segmental trisomy 16 mouse model of down syndrome. *J Neurosci.* 23:6788-92.
- Cataldo, A.M., S. Petanceska, N.B. Terio, C.M. Peterhoff, R. Durham, M. Mercken, P.D. Mehta, J. Buxbaum, V. Haroutunian, and R.A. Nixon. 2004. Abeta localization in abnormal endosomes: association with earliest Abeta elevations in AD and Down syndrome. *Neurobiol Aging.* 25:1263-72.
- Cataldo, A.M., C.M. Peterhoff, J.C. Troncoso, T. Gomez-Isla, B.T. Hyman, and R.A. Nixon. 2000. Endocytic pathway abnormalities precede amyloid beta deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome: differential effects of APOE genotype and presenilin mutations. *Am J Pathol.* 157:277-86.
- Cecchi, C., F. Rosati, A. Pensalfini, L. Formigli, D. Nosi, G. Liguri, F. Dichiaro, M. Morello, G. Danza, G. Pieraccini, A. Peri, M. Serio, and M. Stefani. 2008. Seladin-1/DHCR24 protects neuroblastoma cells against Abeta toxicity by increasing membrane cholesterol content. *J Cell Mol Med.* 12:1990-2002.
- Chang, C., R. Dong, A. Miyazaki, N. Sakashita, Y. Zhang, J. Liu, M. Guo, B.L. Li, and T.Y. Chang. 2006. Human acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) and its potential as a target for pharmaceutical intervention against atherosclerosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 38:151-6.
- Chang, T.Y., P.C. Reid, S. Sugii, N. Ohgami, J.C. Cruz, and C.C. Chang. 2005. Niemann-Pick type C disease and intracellular cholesterol trafficking. *J Biol Chem.* 280:20917-20.
- Chavrier, P., J.P. Gorvel, E. Stelzer, K. Simons, J. Gruenberg, and M. Zerial. 1991. Hypervariable C-terminal domain of rab proteins acts as a targeting signal. *Nature.* 353:769-72.
- Chen, C., and X. Zhuang. 2008. Epsin 1 is a cargo-specific adaptor for the clathrin-mediated endocytosis of the influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:11790-5.
- Chen, Q., A. Nakajima, S.H. Choi, X. Xiong, and Y.P. Tang. 2008. Loss of presenilin function causes Alzheimer's disease-like neurodegeneration in the mouse. *J Neurosci Res.* 86:1615-25.

- Chen, Y., and C. Dong. 2009. Abeta40 promotes neuronal cell fate in neural progenitor cells. *Cell Death Differ.* 16:386-94.
- Cheng, Z.J., R.D. Singh, D.L. Marks, and R.E. Pagano. 2006. Membrane microdomains, caveolae, and caveolar endocytosis of sphingolipids. *Mol Membr Biol.* 23:101-10.
- Choudhury, R., A. Diao, F. Zhang, E. Eisenberg, A. Saint-Pol, C. Williams, A. Konstantakopoulos, J. Lucocq, L. Johannes, C. Rabouille, L.E. Greene, and M. Lowe. 2005. Lowe syndrome protein OCRL1 interacts with clathrin and regulates protein trafficking between endosomes and the trans-Golgi network. *Mol Biol Cell.* 16:3467-79.
- Chu, L.W., Y. Li, Z. Li, A.Y. Tang, B.M. Cheung, R.Y. Leung, P.Y. Yik, D.Y. Jin, and Y.Q. Song. 2007. A novel intronic polymorphism of ABCA1 gene reveals risk for sporadic Alzheimer's disease in Chinese. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 144B:1007-13.
- Cirrito, J.R., J.E. Kang, J. Lee, F.R. Stewart, D.K. Verges, L.M. Silverio, G. Bu, S. Mennerick, and D.M. Holtzman. 2008. Endocytosis is required for synaptic activity-dependent release of amyloid-beta in vivo. *Neuron.* 58:42-51.
- Citron, M., T. Oltersdorf, C. Haass, L. McConlogue, A.Y. Hung, P. Seubert, C. Vigo-Pelfrey, I. Lieberburg, and D.J. Selkoe. 1992. Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature.* 360:672-4.
- Collawn, J.F., A. Lai, D. Domingo, M. Fitch, S. Hatton, and I.S. Trowbridge. 1993. YTRF is the conserved internalization signal of the transferrin receptor, and a second YTRF signal at position 31-34 enhances endocytosis. *J Biol Chem.* 268:21686-92.
- Compagnon, J., L. Gervais, M.S. Roman, S. Chamot-Boeuf, and A. Guichet. 2009. Interplay between Rab5 and PtdIns(4,5)P2 controls early endocytosis in the Drosophila germline. *J Cell Sci.* 122:25-35.
- Confaloni, A., L. Terreni, P. Piscopo, A. Crestini, L.M. Campeggi, C.S. Frigerio, I. Blotta, M. Perri, M. Di Natale, R. Maletta, G. Marcon, M. Franceschi, A.C. Bruni, G. Forloni, and A. Cantafora. 2003. Nicastrin gene in familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 353:61-5.
- Conner, S.D., and S.L. Schmid. 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature.* 422:37-44.
- Cook, L.J., L.W. Ho, A.E. Taylor, C. Brayne, J.G. Evans, J. Xuereb, N.J. Cairns, A. Pritchard, H. Lemmon, D. Mann, D. St Clair, D. Turic, P. Hollingworth, P.J. Moore, L. Jehu, N. Archer, S. Walter, C. Foy, A. Edmondson, J. Powell, S. Lovestone, M.J. Owen, J.

- Williams, C. Lendon, and D.C. Rubinsztein. 2004. Candidate gene association studies of the alpha 4 (CHRNA4) and beta 2 (CHRNA2) neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit genes in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 358:142-6.
- Coppede, F., M. Mancuso, G. Siciliano, L. Migliore, and L. Murri. 2006. Genes and the environment in neurodegeneration. *Biosci Rep.* 26:341-67.
- Corbo, R.M., G. Gambina, M. Ruggeri, and R. Scacchi. 2006. Association of estrogen receptor alpha (ESR1) PvuII and XbaI polymorphisms with sporadic Alzheimer's disease and their effect on apolipoprotein E concentrations. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 22:67-72.
- Corder, E.H., A.M. Saunders, N.J. Risch, W.J. Strittmatter, D.E. Schmechel, P.C. Gaskell, Jr., J.B. Rimmer, P.A. Locke, P.M. Conneally, K.E. Schmader, and et al. 1994. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet.* 7:180-4.
- Corder, E.H., A.M. Saunders, W.J. Strittmatter, D.E. Schmechel, P.C. Gaskell, G.W. Small, A.D. Roses, J.L. Haines, and M.A. Pericak-Vance. 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 261:921-3.
- Cremona, O., G. Di Paolo, M.R. Wenk, A. Luthi, W.T. Kim, K. Takei, L. Daniell, Y. Nemoto, S.B. Shears, R.A. Flavell, D.A. McCormick, and P. De Camilli. 1999. Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell.* 99:179-88.
- Cutler, R.G., J. Kelly, K. Storie, W.A. Pedersen, A. Tammara, K. Hatanpaa, J.C. Troncoso, and M.P. Mattson. 2004. Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:2070-5.
- Davisson, M.T., C. Schmidt, and E.C. Akeson. 1990. Segmental trisomy of murine chromosome 16: a new model system for studying Down syndrome. *Prog Clin Biol Res.* 360:263-80.
- 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.

- Deinhardt, K., O. Berninghausen, H.J. Willison, C.R. Hopkins, and G. Schiavo. 2006. Tetanus toxin is internalized by a sequential clathrin-dependent mechanism initiated within lipid microdomains and independent of epsin1. *J Cell Biol.* 174:459-71.
- Delabar, J.M., D. Theophile, Z. Rahmani, Z. Chettouh, J.L. Blouin, M. Prieur, B. Noel, and P.M. Sinet. 1993. Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. *Eur J Hum Genet.* 1:114-24.
- Delaere, P., C. Duyckaerts, C. Masters, K. Beyreuther, F. Piette, and J.J. Hauw. 1990. Large amounts of neocortical beta A4 deposits without neuritic plaques nor tangles in a psychometrically assessed, non-demented person. *Neurosci Lett.* 116:87-93.
- Di Fede, G., M. Catania, M. Morbin, G. Rossi, S. Suardi, G. Mazzoleni, M. Merlin, A.R. Giovagnoli, S. Prioni, A. Erbetta, C. Falcone, M. Gobbi, L. Colombo, A. Bastone, M. Beeg, C. Manzoni, B. Francescucci, A. Spagnoli, L. Cantu, E. Del Favero, E. Levy, M. Salmona, and F. Tagliavini. 2009. A recessive mutation in the APP gene with dominant-negative effect on amyloidogenesis. *Science.* 323:1473-7.
- Dickson, D.W. 1997. The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol.* 56:321-39.
- Dietschy, J.M., and S.D. Turley. 2004. Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res.* 45:1375-97.
- Doxsey, S.J., F.M. Brodsky, G.S. Blank, and A. Helenius. 1987. Inhibition of endocytosis by anti-clathrin antibodies. *Cell.* 50:453-63.
- Drubin, D.G., and M.W. Kirschner. 1986. Tau protein function in living cells. *J Cell Biol.* 103:2739-46.
- Du, Y., R. Dodel, H. Hampel, K. Buerger, S. Lin, B. Eastwood, K. Bales, F. Gao, H.J. Moeller, W. Oertel, M. Farlow, and S. Paul. 2001. Reduced levels of amyloid beta-peptide antibody in Alzheimer disease. *Neurology.* 57:801-5.
- Dulin, F., F. Leveille, J.B. Ortega, J.P. Mornon, A. Buisson, I. Callebaut, and N. Colloc'h. 2008. P3 peptide, a truncated form of A beta devoid of synaptotoxic effect, does not assemble into soluble oligomers. *FEBS Lett.* 582:1865-70.
- Duyckaerts, C., M.A. Colle, B. Delatour, and J.J. Hauw. 1999. [Alzheimer's disease: lesions and their progression]. *Rev Neurol (Paris).* 155 Suppl 4:S17-27.
- Duyckaerts, C., B. Delatour, and M.C. Potier. 2009. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol.* 118:5-36.

- Edbauer, D., E. Winkler, J.T. Regula, B. Pesold, H. Steiner, and C. Haass. 2003. Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol.* 5:486-8.
- Eggert, S., B. Midthune, B. Cottrell, and E.H. Koo. 2009. Induced dimerization of the amyloid precursor protein (APP) leads to decreased amyloid-beta protein (A β) production. *J Biol Chem.*
- Eehalt, R., P. Keller, C. Haass, C. Thiele, and K. Simons. 2003. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol.* 160:113-23.
- Epand, R.M., P. Vuong, C.M. Yip, S. Maekawa, and R.F. Epand. 2004. Cholesterol-dependent partitioning of PtdIns(4,5)P₂ into membrane domains by the N-terminal fragment of NAP-22 (neuronal axonal myristoylated membrane protein of 22 kDa). *Biochem J.* 379:527-32.
- Epstein, C.J. 2002. 2001 William Allan Award Address. From Down syndrome to the "human" in "human genetics". *Am J Hum Genet.* 70:300-13.
- Epstein, C.J., D.R. Cox, and L.B. Epstein. 1985. Mouse trisomy 16: an animal model of human trisomy 21 (Down syndrome). *Ann N Y Acad Sci.* 450:157-68.
- Esch, F.S., P.S. Keim, E.C. Beattie, R.W. Blacher, A.R. Culwell, T. Oltersdorf, D. McClure, and P.J. Ward. 1990. Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science.* 248:1122-4.
- Evans, D.A., H.H. Funkenstein, M.S. Albert, P.A. Scherr, N.R. Cook, M.J. Chown, L.E. Hebert, C.H. Hennekens, and J.O. Taylor. 1989. Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. *JAMA.* 262:2551-6.
- Faghihi, M.A., F. Modarresi, A.M. Khalil, D.E. Wood, B.G. Sahagan, T.E. Morgan, C.E. Finch, G. St Laurent, 3rd, P.J. Kenny, and C. Wahlestedt. 2008. Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase. *Nat Med.* 14:723-30.
- Farrer, L.A., L.A. Cupples, J.L. Haines, B. Hyman, W.A. Kukull, R. Mayeux, R.H. Myers, M.A. Pericak-Vance, N. Risch, and C.M. van Duijn. 1997. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA.* 278:1349-56.
- Fassbender, K., M. Simons, C. Bergmann, M. Stroick, D. Lutjohann, P. Keller, H. Runz, S. Kuhl, T. Bertsch, K. von Bergmann, M. Hennerici, K. Beyreuther, and T. Hartmann.

2001. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:5856-61.
- Feng, Y., B. Press, and A. Wandinger-Ness. 1995. Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *J Cell Biol*. 131:1435-52.
- Ferguson, S.S., W.E. Downey, 3rd, A.M. Colapietro, L.S. Barak, L. Menard, and M.G. Caron. 1996. Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science*. 271:363-6.
- Fidani, L., D. Compton, J. Hardy, R.C. Petersen, E. Tangalos, V. Mirtsou, A. Goulas, and F.W. De Vrieze. 2002. No association between the lipoprotein lipase S447X polymorphism and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 322:192-4.
- Fillit, H.M. 2002. The role of hormone replacement therapy in the prevention of Alzheimer disease. *Arch Intern Med*. 162:1934-42.
- Folstein, M.F., S.E. Folstein, and P.R. McHugh. 1975. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*. 12:189-98.
- Ford, M.G., B.M. Pearse, M.K. Higgins, Y. Vallis, D.J. Owen, A. Gibson, C.R. Hopkins, P.R. Evans, and H.T. McMahon. 2001. Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P₂ and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes. *Science*. 291:1051-5.
- Fraering, P.C., W. Ye, J.M. Strub, G. Dolios, M.J. LaVoie, B.L. Ostaszewski, A. van Dorsselaer, R. Wang, D.J. Selkoe, and M.S. Wolfe. 2004. Purification and characterization of the human gamma-secretase complex. *Biochemistry*. 43:9774-89.
- Fukumoto, H., B.S. Cheung, B.T. Hyman, and M.C. Irizarry. 2002. Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 59:1381-9.
- Furukawa, K., B.L. Sopher, R.E. Rydel, J.G. Begley, D.G. Pham, G.M. Martin, M. Fox, and M.P. Mattson. 1996. Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J Neurochem*. 67:1882-96.
- Gaidarov, I., and J.H. Keen. 1999. Phosphoinositide-AP-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits. *J Cell Biol*. 146:755-64.
- Gallop, J.L., and H.T. McMahon. 2005. BAR domains and membrane curvature: bringing your curves to the BAR. *Biochem Soc Symp*:223-31.
- Galvan, V., O.F. Gorostiza, S. Banwait, M. Ataie, A.V. Logvinova, S. Sitaraman, E. Carlson, S.A. Sagi, N. Chevallier, K. Jin, D.A. Greenberg, and D.E. Bredesen. 2006. Reversal

- of Alzheimer's-like pathology and behavior in human APP transgenic mice by mutation of Asp664. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:7130-5.
- Gandy, S., A.J. Czernik, and P. Greengard. 1988. Phosphorylation of Alzheimer disease amyloid precursor peptide by protein kinase C and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85:6218-21.
- Gao, S., H.C. Hendrie, K.S. Hall, and S. Hui. 1998. The relationships between age, sex, and the incidence of dementia and Alzheimer disease: a meta-analysis. *Arch Gen Psychiatry*. 55:809-15.
- Garcia-Osta, A., and C.M. Alberini. 2009. Amyloid beta mediates memory formation. *Learn Mem*. 16:267-72.
- Gervais, F.G., D. Xu, G.S. Robertson, J.P. Vaillancourt, Y. Zhu, J. Huang, A. LeBlanc, D. Smith, M. Rigby, M.S. Shearman, E.E. Clarke, H. Zheng, L.H. Van Der Ploeg, S.C. Ruffolo, N.A. Thornberry, S. Xanthoudakis, R.J. Zamboni, S. Roy, and D.W. Nicholson. 1999. Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation. *Cell*. 97:395-406.
- Glenner, G.G., and C.W. Wong. 1984a. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 122:1131-5.
- Glenner, G.G., and C.W. Wong. 1984b. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 120:885-90.
- Goddard, K.A., J.M. Olson, H. Payami, M. van der Voet, H. Kuivaniemi, and G. Tromp. 2004. Evidence of linkage and association on chromosome 20 for late-onset Alzheimer disease. *Neurogenetics*. 5:121-8.
- Golde, T.E., S. Estus, M. Usiak, L.H. Younkin, and S.G. Younkin. 1990. Expression of beta amyloid protein precursor mRNAs: recognition of a novel alternatively spliced form and quantitation in Alzheimer's disease using PCR. *Neuron*. 4:253-67.
- Goldstein, J.L., R.A. DeBose-Boyd, and M.S. Brown. 2006. Protein sensors for membrane sterols. *Cell*. 124:35-46.
- Gong, L.W., and P. De Camilli. 2008. Regulation of postsynaptic AMPA responses by synaptojanin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:17561-6.
- Gong, Y., L. Chang, K.L. Viola, P.N. Lacor, M.P. Lambert, C.E. Finch, G.A. Krafft, and W.L. Klein. 2003. Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta

- ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:10417-22.
- Gorvel, J.P., P. Chavrier, M. Zerial, and J. Gruenberg. 1991. rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell*. 64:915-25.
- Goslin, K., and G. Banker. 1989. Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Cell Biol*. 108:1507-16.
- Granholt, A.C., L.A. Sanders, and L.S. Crnic. 2000. Loss of cholinergic phenotype in basal forebrain coincides with cognitive decline in a mouse model of Down's syndrome. *Exp Neurol*. 161:647-63.
- Grbovic, O.M., P.M. Mathews, Y. Jiang, S.D. Schmidt, R. Dinakar, N.B. Summers-Terio, B.P. Ceresa, R.A. Nixon, and A.M. Cataldo. 2003. Rab5-stimulated up-regulation of the endocytic pathway increases intracellular beta-cleaved amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment levels and Abeta production. *J Biol Chem*. 278:31261-8.
- Greeve, I., I. Hermans-Borgmeyer, C. Brellinger, D. Kasper, T. Gomez-Isla, C. Behl, B. Levkau, and R.M. Nitsch. 2000. The human DIMINUTO/DWARF1 homolog seladin-1 confers resistance to Alzheimer's disease-associated neurodegeneration and oxidative stress. *J Neurosci*. 20:7345-52.
- Grimaldi, L.M., V.M. Casadei, C. Ferri, F. Veglia, F. Licastro, G. Annoni, I. Biunno, G. De Bellis, S. Sorbi, C. Mariani, N. Canal, W.S. Griffin, and M. Franceschi. 2000. Association of early-onset Alzheimer's disease with an interleukin-1alpha gene polymorphism. *Ann Neurol*. 47:361-5.
- Grimm, M.O., H.S. Grimm, and T. Hartmann. 2007. Amyloid beta as a regulator of lipid homeostasis. *Trends Mol Med*. 13:337-44.
- Grimm, M.O., H.S. Grimm, A.J. Patzold, E.G. Zinser, R. Halonen, M. Duering, J.A. Tschape, B. De Strooper, U. Muller, J. Shen, and T. Hartmann. 2005. Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-beta and presenilin. *Nat Cell Biol*. 7:1118-23.
- Grimm, M.O., H.S. Grimm, I. Tomic, K. Beyreuther, T. Hartmann, and C. Bergmann. 2008. Independent inhibition of Alzheimer disease beta- and gamma-secretase cleavage by lowered cholesterol levels. *J Biol Chem*. 283:11302-11.
- Grossman, H. 2003. Does diabetes protect or provoke Alzheimer's disease? Insights into the pathobiology and future treatment of Alzheimer's disease. *CNS Spectr*. 8:815-23.

- Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, Y.C. Tung, M. Quinlan, H.M. Wisniewski, and L.I. Binder. 1986. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83:4913-7.
- Guardia-Laguarta, C., M. Coma, M. Pera, J. Clarimon, L. Sereno, J.M. Agullo, L. Molina-Porcel, E. Gallardo, A. Deng, O. Berezovska, B.T. Hyman, R. Blesa, T. Gomez-Isla, and A. Lleó. 2009. Mild cholesterol depletion reduces amyloid-beta production by impairing APP trafficking to the cell surface. *J Neurochem*.
- Gunstad, J., R.H. Paul, R.A. Cohen, D.F. Tate, and E. Gordon. 2006. Obesity is associated with memory deficits in young and middle-aged adults. *Eat Weight Disord*. 11:e15-9.
- Gunther, C., K. von Hadeln, T. Muller-Thomsen, A. Alberici, G. Binetti, C. Hock, R.M. Nitsch, G. Stoppe, J. Reiss, A. Gal, and U. Finckh. 2004. Possible association of mitochondrial transcription factor A (TFAM) genotype with sporadic Alzheimer disease. *Neurosci Lett*. 369:219-23.
- Guo, J.P., T. Arai, J. Miklossy, and P.L. McGeer. 2006. Abeta and tau form soluble complexes that may promote self aggregation of both into the insoluble forms observed in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:1953-8.
- Gylys, K.H., J.A. Fein, F. Yang, C.A. Miller, and G.M. Cole. 2007. Increased cholesterol in Abeta-positive nerve terminals from Alzheimer's disease cortex. *Neurobiol Aging*. 28:8-17.
- Haag, M.D., A. Hofman, P.J. Koudstaal, B.H. Stricker, and M.M. Breteler. 2009. Statins are associated with a reduced risk of Alzheimer disease regardless of lipophilicity. The Rotterdam Study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 80:13-7.
- Haass, C., M.G. Schlossmacher, A.Y. Hung, C. Vigo-Pelfrey, A. Mellon, B.L. Ostaszewski, I. Lieberburg, E.H. Koo, D. Schenk, D.B. Teplow, and et al. 1992. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*. 359:322-5.
- Haass, C., and H. Steiner. 2002. Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases. *Trends Cell Biol*. 12:556-62.
- Haffner, C., G. Di Paolo, J.A. Rosenthal, and P. de Camilli. 2000. Direct interaction of the 170 kDa isoform of synaptotagmin 1 with clathrin and with the clathrin adaptor AP-2. *Curr Biol*. 10:471-4.
- Halford, R.W., and D.W. Russell. 2009. Reduction of cholesterol synthesis in the mouse brain does not affect amyloid formation in Alzheimer's disease, but does extend lifespan. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:3502-6.

- Hansen, G.H., S.M. Dalskov, C.R. Rasmussen, L. Immerdal, L.L. Niels-Christiansen, and E.M. Danielsen. 2005. Cholera toxin entry into pig enterocytes occurs via a lipid raft- and clathrin-dependent mechanism. *Biochemistry*. 44:873-82.
- Hardy, J. 1992. An 'anatomical cascade hypothesis' for Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*. 15:200-1.
- Hardy, J., and D. Allsop. 1991. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci*. 12:383-8.
- Hardy, J., and D.J. Selkoe. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 297:353-6.
- Hasegawa, H., N. Sanjo, F. Chen, Y.J. Gu, C. Shier, A. Petit, T. Kawarai, T. Katayama, S.D. Schmidt, P.M. Mathews, G. Schmitt-Ulms, P.E. Fraser, and P. St George-Hyslop. 2004. Both the sequence and length of the C terminus of PEN-2 are critical for intermolecular interactions and function of presenilin complexes. *J Biol Chem*. 279:46455-63.
- Hayashi, H., R.B. Campenot, D.E. Vance, and J.E. Vance. 2004. Glial lipoproteins stimulate axon growth of central nervous system neurons in compartmented cultures. *J Biol Chem*. 279:14009-15.
- Hayashi, H., U. Igbavboa, H. Hamanaka, M. Kobayashi, S.C. Fujita, W.G. Wood, and K. Yanagisawa. 2002. Cholesterol is increased in the exofacial leaflet of synaptic plasma membranes of human apolipoprotein E4 knock-in mice. *Neuroreport*. 13:383-6.
- Henley, J.R., E.W. Krueger, B.J. Oswald, and M.A. McNiven. 1998. Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol*. 141:85-99.
- Herms, J., B. Anliker, S. Heber, S. Ring, M. Fuhrmann, H. Kretzschmar, S. Sisodia, and U. Muller. 2004. Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *EMBO J*. 23:4106-15.
- Herrera, F., Q. Chen, W.H. Fischer, P. Maher, and D.R. Schubert. 2009. Synaptojanin-1 plays a key role in astroglialogenesis: possible relevance for Down's syndrome. *Cell Death Differ*.
- Herzog, V., G. Kirfel, C. Siemes, and A. Schmitz. 2004. Biological roles of APP in the epidermis. *Eur J Cell Biol*. 83:613-24.
- Hesse, L., D. Beher, C.L. Masters, and G. Multhaup. 1994. The beta A4 amyloid precursor protein binding to copper. *FEBS Lett*. 349:109-16.
- Hinrichsen, L., A. Meyerholz, S. Groos, and E.J. Ungewickell. 2006. Bending a membrane: how clathrin affects budding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:8715-20.

- Ho, A., and T.C. Sudhof. 2004. Binding of F-spondin to amyloid-beta precursor protein: a candidate amyloid-beta precursor protein ligand that modulates amyloid-beta precursor protein cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:2548-53.
- Ho, L., K. Fukuchi, and S.G. Younkin. 1996. The alternatively spliced Kunitz protease inhibitor domain alters amyloid beta protein precursor processing and amyloid beta protein production in cultured cells. *J Biol Chem*. 271:30929-34.
- Holmes, C., D. Boche, D. Wilkinson, G. Yadegarfar, V. Hopkins, A. Bayer, R.W. Jones, R. Bullock, S. Love, J.W. Neal, E. Zotova, and J.A. Nicoll. 2008. Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet*. 372:216-23.
- Holsinger, R.M., C.A. McLean, K. Beyreuther, C.L. Masters, and G. Evin. 2002. Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 51:783-6.
- Hong, C.S., W.F. Goins, J.R. Goss, E.A. Burton, and J.C. Glorioso. 2006. Herpes simplex virus RNAi and neprilysin gene transfer vectors reduce accumulation of Alzheimer's disease-related amyloid-beta peptide in vivo. *Gene Ther*. 13:1068-79.
- Honing, S., D. Ricotta, M. Krauss, K. Spate, B. Spolaore, A. Motley, M. Robinson, C. Robinson, V. Haucke, and D.J. Owen. 2005. Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates sorting signal recognition by the clathrin-associated adaptor complex AP2. *Mol Cell*. 18:519-31.
- Hsiao, K.K., D.R. Borchelt, K. Olson, R. Johannsdottir, C. Kitt, W. Yunis, S. Xu, C. Eckman, S. Younkin, D. Price, and et al. 1995. Age-related CNS disorder and early death in transgenic FVB/N mice overexpressing Alzheimer amyloid precursor proteins. *Neuron*. 15:1203-18.
- Hung, A.Y., E.H. Koo, C. Haass, and D.J. Selkoe. 1992. Increased expression of beta-amyloid precursor protein during neuronal differentiation is not accompanied by secretory cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:9439-43.
- Hussain, I., D. Powell, D.R. Howlett, D.G. Tew, T.D. Meek, C. Chapman, I.S. Gloger, K.E. Murphy, C.D. Southan, D.M. Ryan, T.S. Smith, D.L. Simmons, F.S. Walsh, C. Dingwall, and G. Christie. 1999. Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci*. 14:419-27.
- Hutter-Paier, B., H.J. Huttunen, L. Puglielli, C.B. Eckman, D.Y. Kim, A. Hofmeister, R.D. Moir, S.B. Domnitz, M.P. Frosch, M. Windisch, and D.M. Kovacs. 2004. The ACAT

- inhibitor CP-113,818 markedly reduces amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron*. 44:227-38.
- Hutton, M., C.L. Lendon, P. Rizzu, M. Baker, S. Froelich, H. Houlden, S. Pickering-Brown, S. Chakraverty, A. Isaacs, A. Grover, J. Hackett, J. Adamson, S. Lincoln, D. Dickson, P. Davies, R.C. Petersen, M. Stevens, E. de Graaff, E. Wauters, J. van Baren, M. Hillebrand, M. Joosse, J.M. Kwon, P. Nowotny, L.K. Che, J. Norton, J.C. Morris, L.A. Reed, J. Trojanowski, H. Basun, L. Lannfelt, M. Neystat, S. Fahn, F. Dark, T. Tannenberg, P.R. Dodd, N. Hayward, J.B. Kwok, P.R. Schofield, A. Andreadis, J. Snowden, D. Craufurd, D. Neary, F. Owen, B.A. Oostra, J. Hardy, A. Goate, J. van Swieten, D. Mann, T. Lynch, and P. Heutink. 1998. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*. 393:702-5.
- Huttunen, H.J., L. Puglielli, B.C. Ellis, L.A. MacKenzie Ingano, and D.M. Kovacs. 2009. Novel N-terminal cleavage of APP precludes Abeta generation in ACAT-defective AC29 cells. *J Mol Neurosci*. 37:6-15.
- Ihara, Y., N. Nukina, R. Miura, and M. Ogawara. 1986. Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J Biochem*. 99:1807-10.
- Ikonomov, O.C., D. Sbrissa, and A. Shisheva. 2006. Localized PtdIns 3,5-P2 synthesis to regulate early endosome dynamics and fusion. *Am J Physiol Cell Physiol*. 291:C393-404.
- Insausti, A.M., M. Megias, D. Crespo, L.M. Cruz-Orive, M. Dierssen, I.F. Vallina, R. Insausti, and J. Florez. 1998. Hippocampal volume and neuronal number in Ts65Dn mice: a murine model of Down syndrome. *Neurosci Lett*. 253:175-8.
- Inzitari, M., C. Pozzi, L.A. Rinaldi, G. Masotti, N. Marchionni, and M. Di Bari. 2007. Cognitive and functional impairment in hypertensive brain microangiopathy. *J Neurol Sci*. 257:166-73.
- Iqbal, K., I. Grundke-Iqbal, T. Zaidi, P.A. Merz, G.Y. Wen, S.S. Shaikh, H.M. Wisniewski, I. Alafuzoff, and B. Winblad. 1986. Defective brain microtubule assembly in Alzheimer's disease. *Lancet*. 2:421-6.
- Ishihara, T., M. Hong, B. Zhang, Y. Nakagawa, M.K. Lee, J.Q. Trojanowski, and V.M. Lee. 1999. Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform. *Neuron*. 24:751-62.
- Itoh, K., K. Shimono, and V. Lemmon. 2005. Dephosphorylation and internalization of cell adhesion molecule L1 induced by theta burst stimulation in rat hippocampus. *Mol Cell Neurosci*. 29:245-9.

- Itoh, T., S. Koshihara, T. Kigawa, A. Kikuchi, S. Yokoyama, and T. Takenawa. 2001. Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis. *Science*. 291:1047-51.
- Jares-Erijman, E.A., and T.M. Jovin. 2003. FRET imaging. *Nat Biotechnol*. 21:1387-95.
- Jolimay, N., L. Franck, X. Langlois, M. Hamon, and M. Darmon. 2000. Dominant role of the cytosolic C-terminal domain of the rat 5-HT1B receptor in axonal-apical targeting. *J Neurosci*. 20:9111-8.
- Kalman, J., K. Kitajka, M. Pakaski, A. Zvara, A. Juhasz, G. Vincze, Z. Janka, and L.G. Puskas. 2005. Gene expression profile analysis of lymphocytes from Alzheimer's patients. *Psychiatr Genet*. 15:1-6.
- Kalmijn, S., L.J. Launer, A. Ott, J.C. Witteman, A. Hofman, and M.M. Breteler. 1997. Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. *Ann Neurol*. 42:776-82.
- Kamboh, M.I. 2004. Molecular genetics of late-onset Alzheimer's disease. *Ann Hum Genet*. 68:381-404.
- Kang, J., H.G. Lemaire, A. Unterbeck, J.M. Salbaum, C.L. Masters, K.H. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther, and B. Muller-Hill. 1987. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*. 325:733-6.
- Kang, M.J., Y.H. Chung, C.I. Hwang, M. Murata, T. Fujimoto, I.H. Mook-Jung, C.I. Cha, and W.Y. Park. 2006. Caveolin-1 upregulation in senescent neurons alters amyloid precursor protein processing. *Exp Mol Med*. 38:126-33.
- Katzov, H., K. Chalmers, J. Palmgren, N. Andreasen, B. Johansson, N.J. Cairns, M. Gatz, G.K. Wilcock, S. Love, N.L. Pedersen, A.J. Brookes, K. Blennow, P.G. Kehoe, and J.A. Prince. 2004. Genetic variants of ABCA1 modify Alzheimer disease risk and quantitative traits related to beta-amyloid metabolism. *Hum Mutat*. 23:358-67.
- Kehoe, P.G., C. Russ, S. McIlory, H. Williams, P. Holmans, C. Holmes, D. Liolitsa, D. Vahidassr, J. Powell, B. McGleenon, M. Liddell, R. Plomin, K. Dynan, N. Williams, J. Neal, N.J. Cairns, G. Wilcock, P. Passmore, S. Lovestone, J. Williams, and M.J. Owen. 1999. Variation in DCP1, encoding ACE, is associated with susceptibility to Alzheimer disease. *Nat Genet*. 21:71-2.
- Kibbey, M.C., M. Jucker, B.S. Weeks, R.L. Neve, W.E. Van Nostrand, and H.K. Kleinman. 1993. beta-Amyloid precursor protein binds to the neurite-promoting IKVAV site of laminin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:10150-3.

- Kienlen-Campard, P., B. Tasiaux, J. Van Hees, M. Li, S. Huysseune, T. Sato, J.Z. Fei, S. Aimoto, P.J. Courtoy, S.O. Smith, S.N. Constantinescu, and J.N. Octave. 2008. Amyloidogenic processing but not amyloid precursor protein (APP) intracellular C-terminal domain production requires a precisely oriented APP dimer assembled by transmembrane GXXXG motifs. *J Biol Chem.* 283:7733-44.
- Kim, S., H. Kim, B. Chang, N. Ahn, S. Hwang, G. Di Paolo, and S. Chang. 2006. Regulation of transferrin recycling kinetics by PtdIns[4,5]P2 availability. *FASEB J.* 20:2399-401.
- Kim, S.A., and P. Schwille. 2003. Intracellular applications of fluorescence correlation spectroscopy: prospects for neuroscience. *Curr Opin Neurobiol.* 13:583-90.
- Kim, W.T., S. Chang, L. Daniell, O. Cremona, G. Di Paolo, and P. De Camilli. 2002. Delayed reentry of recycling vesicles into the fusion-competent synaptic vesicle pool in synaptotagmin 1 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:17143-8.
- Kimberly, W.T., W.P. Esler, W. Ye, B.L. Ostaszewski, J. Gao, T. Diehl, D.J. Selkoe, and M.S. Wolfe. 2003. Notch and the amyloid precursor protein are cleaved by similar gamma-secretase(s). *Biochemistry.* 42:137-44.
- Kinoshita, A., C.M. Whelan, O. Berezovska, and B.T. Hyman. 2002. The gamma secretase-generated carboxyl-terminal domain of the amyloid precursor protein induces apoptosis via Tip60 in H4 cells. *J Biol Chem.* 277:28530-6.
- Kirsch, C., G.P. Eckert, and W.E. Mueller. 2003. Statin effects on cholesterol micro-domains in brain plasma membranes. *Biochem Pharmacol.* 65:843-56.
- Kivipelto, M., E.L. Helkala, M.P. Laakso, T. Hanninen, M. Hallikainen, K. Alhainen, H. Soininen, J. Tuomilehto, and A. Nissinen. 2001. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *BMJ.* 322:1447-51.
- Kivipelto, M., M.P. Laakso, J. Tuomilehto, A. Nissinen, and H. Soininen. 2002. Hypertension and hypercholesterolaemia as risk factors for Alzheimer's disease: potential for pharmacological intervention. *CNS Drugs.* 16:435-44.
- Klunk, W.E., H. Engler, A. Nordberg, Y. Wang, G. Blomqvist, D.P. Holt, M. Bergstrom, I. Savitcheva, G.F. Huang, S. Estrada, B. Ausen, M.L. Debnath, J. Barletta, J.C. Price, J. Sandell, B.J. Lopresti, A. Wall, P. Koivisto, G. Antoni, C.A. Mathis, and B. Langstrom. 2004. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol.* 55:306-19.

- Knops, J., S. Gandy, P. Greengard, I. Lieberburg, and S. Sinha. 1993. Serine phosphorylation of the secreted extracellular domain of APP. *Biochem Biophys Res Commun.* 197:380-5.
- Knowles, R.B., C. Wyart, S.V. Buldyrev, L. Cruz, B. Urbanc, M.E. Hasselmo, H.E. Stanley, and B.T. Hyman. 1999. Plaque-induced neurite abnormalities: implications for disruption of neural networks in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:5274-9.
- Kobayashi, T., M.H. Beuchat, M. Lindsay, S. Frias, R.D. Palmiter, H. Sakuraba, R.G. Parton, and J. Gruenberg. 1999. Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nat Cell Biol.* 1:113-8.
- Kojro, E., G. Gimpl, S. Lammich, W. Marz, and F. Fahrenholz. 2001. Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:5815-20.
- Koo, E.H., and S.L. Squazzo. 1994. Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem.* 269:17386-9.
- Kosik, K.S., S.F. Bakalis, D.J. Selkoe, M.W. Pierce, and L.K. Duffy. 1986. High molecular weight microtubule-associated proteins: purification by electro-elution and amino acid compositions. *J Neurosci Res.* 15:543-51.
- Kounnas, M.Z., R.D. Moir, G.W. Rebeck, A.I. Bush, W.S. Argraves, R.E. Tanzi, B.T. Hyman, and D.K. Strickland. 1995. LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation. *Cell.* 82:331-40.
- Krendel, M., E.K. Osterweil, and M.S. Mooseker. 2007. Myosin 1E interacts with synaptojanin-1 and dynamin and is involved in endocytosis. *FEBS Lett.* 581:644-50.
- Kumar-Singh, S., D. Pirici, E. McGowan, S. Serneels, C. Ceuterick, J. Hardy, K. Duff, D. Dickson, and C. Van Broeckhoven. 2005. Dense-core plaques in Tg2576 and PSAPP mouse models of Alzheimer's disease are centered on vessel walls. *Am J Pathol.* 167:527-43.
- Kunugi, H., A. Ueki, M. Otsuka, K. Isse, H. Hirasawa, N. Kato, T. Nabika, S. Kobayashi, and S. Nanko. 2001. A novel polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene associated with late-onset Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry.* 6:83-6.
- Kurinami, H., N. Sato, M. Shinohara, D. Takeuchi, S. Takeda, M. Shimamura, T. Ogihara, and R. Morishita. 2008. Prevention of amyloid beta-induced memory impairment by

- fluvastatin, associated with the decrease in amyloid beta accumulation and oxidative stress in amyloid beta injection mouse model. *Int J Mol Med*. 21:531-7.
- Kurt, M.A., M.I. Kafa, M. Dierssen, and D.C. Davies. 2004. Deficits of neuronal density in CA1 and synaptic density in the dentate gyrus, CA3 and CA1, in a mouse model of Down syndrome. *Brain Res*. 1022:101-9.
- Kuwano, R., A. Miyashita, H. Arai, T. Asada, M. Imagawa, M. Shoji, S. Higuchi, K. Urakami, A. Kakita, H. Takahashi, T. Tsukie, S. Toyabe, K. Akazawa, I. Kanazawa, and Y. Ihara. 2006. Dynamin-binding protein gene on chromosome 10q is associated with late-onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*. 15:2170-82.
- Kwak, Y.D., C.L. Brannen, T. Qu, H.M. Kim, X. Dong, P. Soba, A. Majumdar, A. Kaplan, K. Beyreuther, and K. Sugaya. 2006. Amyloid precursor protein regulates differentiation of human neural stem cells. *Stem Cells Dev*. 15:381-9.
- Lacor, P.N., M.C. Buniel, L. Chang, S.J. Fernandez, Y. Gong, K.L. Viola, M.P. Lambert, P.T. Velasco, E.H. Bigio, C.E. Finch, G.A. Krafft, and W.L. Klein. 2004. Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci*. 24:10191-200.
- LaDu, M.J., M.T. Falduto, A.M. Manelli, C.A. Reardon, G.S. Getz, and D.E. Frail. 1994. Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid. *J Biol Chem*. 269:23403-6.
- Laffaire, J., I. Rivals, L. Dauphinot, F. Pasteau, R. Wehrle, B. Larrat, T. Vitalis, R.X. Moldrich, J. Rossier, R. Sinkus, Y. Herault, I. Dusart, and M.C. Potier. 2009. Gene expression signature of cerebellar hypoplasia in a mouse model of Down syndrome during postnatal development. *BMC Genomics*. 10:138.
- Lai, A., S.S. Sisodia, and I.S. Trowbridge. 1995. Characterization of sorting signals in the beta-amyloid precursor protein cytoplasmic domain. *J Biol Chem*. 270:3565-73.
- Lai, F., and R.S. Williams. 1989. A prospective study of Alzheimer disease in Down syndrome. *Arch Neurol*. 46:849-53.
- Laifenfeld, D., L.J. Patzek, D.L. McPhie, Y. Chen, Y. Levites, A.M. Cataldo, and R.L. Neve. 2007. Rab5 mediates an amyloid precursor protein signaling pathway that leads to apoptosis. *J Neurosci*. 27:7141-53.
- Lambert, M.P., K.L. Viola, B.A. Chromy, L. Chang, T.E. Morgan, J. Yu, D.L. Venton, G.A. Krafft, C.E. Finch, and W.L. Klein. 2001. Vaccination with soluble Abeta oligomers generates toxicity-neutralizing antibodies. *J Neurochem*. 79:595-605.
- Landman, N., S.Y. Jeong, S.Y. Shin, S.V. Voronov, G. Serban, M.S. Kang, M.K. Park, G. Di Paolo, S. Chung, and T.W. Kim. 2006. Presenilin mutations linked to familial

- Alzheimer's disease cause an imbalance in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:19524-9.
- Lashuel, H.A., D. Hartley, B.M. Petre, T. Walz, and P.T. Lansbury, Jr. 2002. Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature*. 418:291.
- Lazarov, V.K., P.C. Fraering, W. Ye, M.S. Wolfe, D.J. Selkoe, and H. Li. 2006. Electron microscopic structure of purified, active gamma-secretase reveals an aqueous intramembrane chamber and two pores. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:6889-94.
- Le, P.U., G. Guay, Y. Altschuler, and I.R. Nabi. 2002. Caveolin-1 is a negative regulator of caveolae-mediated endocytosis to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 277:3371-9.
- Lee, H., L. Xie, Y. Luo, S.Y. Lee, D.S. Lawrence, X.B. Wang, F. Sotgia, M.P. Lisanti, and Z.Y. Zhang. 2006. Identification of phosphocaveolin-1 as a novel protein tyrosine phosphatase 1B substrate. *Biochemistry*. 45:234-40.
- Lee, H.G., G. Perry, P.I. Moreira, M.R. Garrett, Q. Liu, X. Zhu, A. Takeda, A. Nunomura, and M.A. Smith. 2005. Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector? *Trends Mol Med*. 11:164-9.
- Lejeune, J., R. Turpin, and M. Gautier. 1959. [Mongolism; a chromosomal disease (trisomy)]. *Bull Acad Natl Med*. 143:256-65.
- Lemmon, M.A. 2008. Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9:99-111.
- Lesne, S., M.T. Koh, L. Kotilinek, R. Kaye, C.G. Glabe, A. Yang, M. Gallagher, and K.H. Ashe. 2006. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature*. 440:352-7.
- Leterrier, C., D. Bonnard, D. Carrel, J. Rossier, and Z. Lenkei. 2004. Constitutive endocytic cycle of the CB1 cannabinoid receptor. *J Biol Chem*. 279:36013-21.
- Levy-Lahad, E., W. Wasco, P. Poorkaj, D.M. Romano, J. Oshima, W.H. Pettingell, C.E. Yu, P.D. Jondro, S.D. Schmidt, K. Wang, and et al. 1995. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*. 269:973-7.
- Levy, E., M.D. Carman, I.J. Fernandez-Madrid, M.D. Power, I. Lieberburg, S.G. van Duinen, G.T. Bots, W. Luyendijk, and B. Frangione. 1990. Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science*. 248:1124-6.
- Li, G., R. Higdon, W.A. Kukull, E. Peskind, K. Van Valen Moore, D. Tsuang, G. van Belle, W. McCormick, J.D. Bowen, L. Teri, G.D. Schellenberg, and E.B. Larson. 2004a.

- Statin therapy and risk of dementia in the elderly: a community-based prospective cohort study. *Neurology*. 63:1624-8.
- Li, L., D. Cao, H. Kim, R. Lester, and K. Fukuchi. 2006a. Simvastatin enhances learning and memory independent of amyloid load in mice. *Ann Neurol*. 60:729-39.
- Li, R., K. Lindholm, L.B. Yang, X. Yue, M. Citron, R. Yan, T. Beach, L. Sue, M. Sabbagh, H. Cai, P. Wong, D. Price, and Y. Shen. 2004b. Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:3632-7.
- Li, Y., L.S. Chin, A.I. Levey, and L. Li. 2002. Huntingtin-associated protein 1 interacts with hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate and functions in endosomal trafficking. *J Biol Chem*. 277:28212-21.
- Li, Y., L.W. Chu, Y.Q. Chen, B.M. Cheung, R.Y. Leung, P.Y. Yik, K.M. Ng, W. Mak, D.Y. Jin, P. St George-Hyslop, and Y.Q. Song. 2006b. Intron 2 (T/C) CYP46 polymorphism is associated with Alzheimer's disease in Chinese patients. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 22:399-404.
- Licastro, F., L.M. Grimaldi, M. Bonafe, C. Martina, F. Olivieri, L. Cavallone, S. Giovanietti, E. Masliah, and C. Franceschi. 2003. Interleukin-6 gene alleles affect the risk of Alzheimer's disease and levels of the cytokine in blood and brain. *Neurobiol Aging*. 24:921-6.
- Lin, W.R., M.A. Wozniak, R.J. Cooper, G.K. Wilcock, and R.F. Itzhaki. 2002. Herpesviruses in brain and Alzheimer's disease. *J Pathol*. 197:395-402.
- Lin, X., G. Koelsch, S. Wu, D. Downs, A. Dashti, and J. Tang. 2000. Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:1456-60.
- Liu, F., Z. Liang, J. Wegiel, Y.W. Hwang, K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, N. Ramakrishna, and C.X. Gong. 2008. Overexpression of Dyrk1A contributes to neurofibrillary degeneration in Down syndrome. *FASEB J*. 22:3224-33.
- Liu, Q., C.V. Zerbinatti, J. Zhang, H.S. Hoe, B. Wang, S.L. Cole, J. Herz, L. Muglia, and G. Bu. 2007. Amyloid precursor protein regulates brain apolipoprotein E and cholesterol metabolism through lipoprotein receptor LRP1. *Neuron*. 56:66-78.
- Liu, W.W., S. Todd, D.T. Coulson, G.B. Irvine, A.P. Passmore, B. McGuinness, M. McConville, D. Craig, and J.A. Johnston. 2009. A novel reciprocal and biphasic relationship between membrane cholesterol and beta-secretase activity in SH-SY5Y cells and in human platelets. *J Neurochem*. 108:341-9.

- Llado, A., P. Timpson, S. Vila de Muga, J. Moreto, A. Pol, T. Grewal, R.J. Daly, C. Enrich, and F. Tebar. 2008. Protein kinase Cdelta and calmodulin regulate epidermal growth factor receptor recycling from early endosomes through Arp2/3 complex and cortactin. *Mol Biol Cell*. 19:17-29.
- Lu, D.C., S. Rabizadeh, S. Chandra, R.F. Shayya, L.M. Ellerby, X. Ye, G.S. Salvesen, E.H. Koo, and D.E. Bredesen. 2000. A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid beta-protein precursor. *Nat Med*. 6:397-404.
- Luedecking, E.K., S.T. DeKosky, H. Mehdi, M. Ganguli, and M.I. Kamboh. 2000. Analysis of genetic polymorphisms in the transforming growth factor-beta1 gene and the risk of Alzheimer's disease. *Hum Genet*. 106:565-9.
- Lund, E.G., C. Xie, T. Kotti, S.D. Turley, J.M. Dietschy, and D.W. Russell. 2003. Knockout of the cholesterol 24-hydroxylase gene in mice reveals a brain-specific mechanism of cholesterol turnover. *J Biol Chem*. 278:22980-8.
- Lye, T.C., and E.A. Shores. 2000. Traumatic brain injury as a risk factor for Alzheimer's disease: a review. *Neuropsychol Rev*. 10:115-29.
- Ma, S.L., N.L. Tang, L.C. Lam, and H.F. Chiu. 2006. Polymorphisms of the cholesterol 24-hydroxylase (CYP46A1) gene and the risk of Alzheimer's disease in a Chinese population. *Int Psychogeriatr*. 18:37-45.
- Madeira, A., J.M. Pommet, A. Prochiantz, and B. Allinquant. 2005. SET protein (TAF1beta, I2PP2A) is involved in neuronal apoptosis induced by an amyloid precursor protein cytoplasmic subdomain. *FASEB J*. 19:1905-7.
- Manelli, A.M., L.C. Bulfinch, P.M. Sullivan, and M.J. LaDu. 2007. Abeta42 neurotoxicity in primary co-cultures: effect of apoE isoform and Abeta conformation. *Neurobiol Aging*. 28:1139-47.
- Mani, M., S.Y. Lee, L. Lucast, O. Cremona, G. Di Paolo, P. De Camilli, and T.A. Ryan. 2007. The dual phosphatase activity of synaptojanin1 is required for both efficient synaptic vesicle endocytosis and reavailability at nerve terminals. *Neuron*. 56:1004-18.
- Mattson, M.P., W.A. Pedersen, W. Duan, C. Culmsee, and S. Camandola. 1999. Cellular and molecular mechanisms underlying perturbed energy metabolism and neuronal degeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 893:154-75.
- Mauch, D.H., K. Nagler, S. Schumacher, C. Goritz, E.C. Muller, A. Otto, and F.W. Pfrieger. 2001. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science*. 294:1354-7.

- Mayeux, R., S.A. Small, M. Tang, B. Tycko, and Y. Stern. 2001. Memory performance in healthy elderly without Alzheimer's disease: effects of time and apolipoprotein-E. *Neurobiol Aging*. 22:683-9.
- Mayor, S., and R.E. Pagano. 2007. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:603-12.
- McCarron, M.O., and J.A. Nicoll. 1998. High frequency of apolipoprotein E epsilon 2 allele is specific for patients with cerebral amyloid angiopathy-related haemorrhage. *Neurosci Lett*. 247:45-8.
- McGowan, E., F. Pickford, J. Kim, L. Onstead, J. Eriksen, C. Yu, L. Skipper, M.P. Murphy, J. Beard, P. Das, K. Jansen, M. Delucia, W.L. Lin, G. Dolios, R. Wang, C.B. Eckman, D.W. Dickson, M. Hutton, J. Hardy, and T. Golde. 2005. Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice. *Neuron*. 47:191-9.
- Mellman, I. 1996. Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 12:575-625.
- Merched, A., Y. Xia, S. Visvikis, J.M. Serot, and G. Siest. 2000. Decreased high-density lipoprotein cholesterol and serum apolipoprotein AI concentrations are highly correlated with the severity of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 21:27-30.
- Merrifield, C.J., D. Perrais, and D. Zenisek. 2005. Coupling between clathrin-coated-pit invagination, cortactin recruitment, and membrane scission observed in live cells. *Cell*. 121:593-606.
- Meyer-Luehmann, M., T.L. Spires-Jones, C. Prada, M. Garcia-Alloza, A. de Calignon, A. Rozkalne, J. Koenigsknecht-Talboo, D.M. Holtzman, B.J. Bacskai, and B.T. Hyman. 2008. Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature*. 451:720-4.
- Meziane, H., J.C. Dodart, C. Mathis, S. Little, J. Clemens, S.M. Paul, and A. Ungerer. 1998. Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:12683-8.
- Michikawa, M., Q.W. Fan, I. Isobe, and K. Yanagisawa. 2000. Apolipoprotein E exhibits isoform-specific promotion of lipid efflux from astrocytes and neurons in culture. *J Neurochem*. 74:1008-16.
- Mielke, M.M., P.P. Zandi, M. Sjogren, D. Gustafson, S. Ostling, B. Steen, and I. Skoog. 2005. High total cholesterol levels in late life associated with a reduced risk of dementia. *Neurology*. 64:1689-95.
- Moir, R.D., T. Lynch, A.I. Bush, S. Whyte, A. Henry, S. Portbury, G. Multhaup, D.H. Small, R.E. Tanzi, K. Beyreuther, and C.L. Masters. 1998. Relative increase in Alzheimer's

- disease of soluble forms of cerebral Abeta amyloid protein precursor containing the Kunitz protease inhibitory domain. *J Biol Chem.* 273:5013-9.
- Monier, S., D.J. Dietzen, W.R. Hastings, D.M. Lublin, and T.V. Kurzchalia. 1996. Oligomerization of VIP21-caveolin in vitro is stabilized by long chain fatty acylation or cholesterol. *FEBS Lett.* 388:143-9.
- Morris, D.P., B. Lei, Y.X. Wu, G.A. Michelotti, and D.A. Schwinn. 2008. The alpha1-adrenergic receptor occupies membrane rafts with its G protein effectors but internalizes via clathrin-coated pits. *J Biol Chem.* 283:2973-85.
- Motley, A., N.A. Bright, M.N. Seaman, and M.S. Robinson. 2003. Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *J Cell Biol.* 162:909-18.
- Mukherjee, S., X. Zha, I. Tabas, and F.R. Maxfield. 1998. Cholesterol distribution in living cells: fluorescence imaging using dehydroergosterol as a fluorescent cholesterol analog. *Biophys J.* 75:1915-25.
- Mullan, M., F. Crawford, K. Axelman, H. Houlden, L. Lilius, B. Winblad, and L. Lannfelt. 1992. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet.* 1:345-7.
- Muller, T., H.E. Meyer, R. Egensperger, and K. Marcus. 2008. The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics-relevance for Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol.* 85:393-406.
- Munter, L.M., P. Voigt, A. Harmeier, D. Kaden, K.E. Gottschalk, C. Weise, R. Pipkorn, M. Schaefer, D. Langosch, and G. Multhaup. 2007. GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of Abeta42. *Embo J.* 26:1702-12.
- Myers, A.J., M. Kaleem, L. Marlowe, A.M. Pittman, A.J. Lees, H.C. Fung, J. Duckworth, D. Leung, A. Gibson, C.M. Morris, R. de Silva, and J. Hardy. 2005. The H1c haplotype at the MAPT locus is associated with Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* 14:2399-404.
- Nagy, Z., M.M. Esiri, K.A. Jobst, J.H. Morris, E.M. King, B. McDonald, S. Litchfield, A. Smith, L. Barnettson, and A.D. Smith. 1995. Relative roles of plaques and tangles in the dementia of Alzheimer's disease: correlations using three sets of neuropathological criteria. *Dementia.* 6:21-31.
- Nakaya, T., T. Kawai, and T. Suzuki. 2008. Regulation of FE65 nuclear translocation and function by amyloid beta-protein precursor in osmotically stressed cells. *J Biol Chem.* 283:19119-31.

- Naslavsky, N., J. McKenzie, N. Altan-Bonnet, D. Sheff, and S. Caplan. 2009. EHD3 regulates early-endosome-to-Golgi transport and preserves Golgi morphology. *J Cell Sci.* 122:389-400.
- Netzer, W.J., F. Dou, D. Cai, D. Veach, S. Jean, Y. Li, W.G. Bornmann, B. Clarkson, H. Xu, and P. Greengard. 2003. Gleevec inhibits beta-amyloid production but not Notch cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:12444-9.
- Nikolaev, A., T. McLaughlin, D.D. O'Leary, and M. Tessier-Lavigne. 2009. APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature.* 457:981-9.
- Nunan, J., M.S. Shearman, F. Checler, R. Cappai, G. Evin, K. Beyreuther, C.L. Masters, and D.H. Small. 2001. The C-terminal fragment of the Alzheimer's disease amyloid protein precursor is degraded by a proteasome-dependent mechanism distinct from gamma-secretase. *Eur J Biochem.* 268:5329-36.
- Oltersdorf, T., P.J. Ward, T. Henriksson, E.C. Beattie, R. Neve, I. Lieberburg, and L.C. Fritz. 1990. The Alzheimer amyloid precursor protein. Identification of a stable intermediate in the biosynthetic/degradative pathway. *J Biol Chem.* 265:4492-7.
- Oram, J.F. 2002. Molecular basis of cholesterol homeostasis: lessons from Tangier disease and ABCA1. *Trends Mol Med.* 8:168-73.
- Osono, Y., L.A. Woollett, J. Herz, and J.M. Dietschy. 1995. Role of the low density lipoprotein receptor in the flux of cholesterol through the plasma and across the tissues of the mouse. *J Clin Invest.* 95:1124-32.
- Ostrowski, S.M., B.L. Wilkinson, T.E. Golde, and G. Landreth. 2007. Statins reduce amyloid-beta production through inhibition of protein isoprenylation. *J Biol Chem.* 282:26832-44.
- Papassotiropoulos, A., J.C. Lambert, F. Wavrant-De Vrieze, M.A. Wollmer, H. von der Kammer, J.R. Streffer, A. Maddalena, K.D. Huynh, S. Wolleb, D. Lutjohann, B. Schneider, D.R. Thal, L.M. Grimaldi, M. Tsolaki, E. Kapaki, R. Ravid, U. Konietzko, T. Hegi, T. Pasch, H. Jung, H. Braak, P. Amouyel, E.I. Rogae, J. Hardy, C. Hock, and R.M. Nitsch. 2005. Cholesterol 25-hydroxylase on chromosome 10q is a susceptibility gene for sporadic Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis.* 2:233-41.
- Paris, D., K.P. Townsend, J. Humphrey, D.F. Obregon, K. Yokota, and M. Mullan. 2002. Statins inhibit A beta-neurotoxicity in vitro and A beta-induced vasoconstriction and inflammation in rat aortae. *Atherosclerosis.* 161:293-9.
- Parton, R.G., B. Joggerst, and K. Simons. 1994. Regulated internalization of caveolae. *J Cell Biol.* 127:1199-215.

- Parton, R.G., J.C. Molero, M. Floetenmeyer, K.M. Green, and D.E. James. 2002. Characterization of a distinct plasma membrane macrodomain in differentiated adipocytes. *J Biol Chem.* 277:46769-78.
- Pearse, B.M. 1976. Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 73:1255-9.
- Pelet, S., M.J. Preville, and P.T. So. 2006. Comparing the quantification of Forster resonance energy transfer measurement accuracies based on intensity, spectral, and lifetime imaging. *J Biomed Opt.* 11:34017.
- Pelkmans, L., E. Fava, H. Grabner, M. Hannus, B. Habermann, E. Krausz, and M. Zerial. 2005. Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis. *Nature.* 436:78-86.
- Pelkmans, L., D. Puntener, and A. Helenius. 2002. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science.* 296:535-9.
- Perera, R.M., R. Zoncu, L. Lucast, P. De Camilli, and D. Toomre. 2006. Two synaptojanin 1 isoforms are recruited to clathrin-coated pits at different stages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:19332-7.
- Peri, A., and M. Serio. 2008. Neuroprotective effects of the Alzheimer's disease-related gene seladin-1. *J Mol Endocrinol.* 41:251-61.
- Petanceska, S.S., S. DeRosa, V. Olm, N. Diaz, A. Sharma, T. Thomas-Bryant, K. Duff, M. Pappolla, and L.M. Refolo. 2002. Statin therapy for Alzheimer's disease: will it work? *J Mol Neurosci.* 19:155-61.
- Petit, A., F. Bihel, C. Alves da Costa, O. Pourquie, F. Checler, and J.L. Kraus. 2001. New protease inhibitors prevent gamma-secretase-mediated production of Abeta40/42 without affecting Notch cleavage. *Nat Cell Biol.* 3:507-11.
- Petit, A., A. Pasini, C. Alves Da Costa, E. Ayral, J.F. Hernandez, C. Dumanchin-Njock, C.J. Phiel, P. Marambaud, S. Wilk, M. Farzan, P. Fulcrand, J. Martinez, D. Andrau, and F. Checler. 2003. JLN isocoumarin inhibitors: selective gamma-secretase inhibitors that do not interfere with notch pathway in vitro or in vivo. *J Neurosci Res.* 74:370-7.
- Petrovitch, H., L.R. White, G. Izmirlian, G.W. Ross, R.J. Havlik, W. Markesbery, J. Nelson, D.G. Davis, J. Hardman, D.J. Foley, and L.J. Launer. 2000. Midlife blood pressure and neuritic plaques, neurofibrillary tangles, and brain weight at death: the HAAS. Honolulu-Asia aging Study. *Neurobiol Aging.* 21:57-62.
- Pfeffer, S. 2005. Filling the Rab GAP. *Nat Cell Biol.* 7:856-7.

- Pfeffer, S., and D. Aivazian. 2004. Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:886-96.
- Pitsi, D., and J.N. Octave. 2004. Presenilin 1 stabilizes the C-terminal fragment of the amyloid precursor protein independently of gamma-secretase activity. *J Biol Chem.* 279:25333-8.
- Poirier, J. 2003. Apolipoprotein E and cholesterol metabolism in the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease. *Trends Mol Med.* 9:94-101.
- Prandini, P., S. Deutsch, R. Lyle, M. Gagnebin, C. Delucinge Vivier, M. Delorenzi, C. Gehrig, P. Descombes, S. Sherman, F. Dagna Bricarelli, C. Baldo, A. Novelli, B. Dallapiccola, and S.E. Antonarakis. 2007. Natural gene-expression variation in Down syndrome modulates the outcome of gene-dosage imbalance. *Am J Hum Genet.* 81:252-63.
- Prasher, V.P., M.J. Farrer, A.M. Kessling, E.M. Fisher, R.J. West, P.C. Barber, and A.C. Butler. 1998. Molecular mapping of Alzheimer-type dementia in Down's syndrome. *Ann Neurol.* 43:380-3.
- Predescu, S.A., D.N. Predescu, B.K. Timblin, R.V. Stan, and A.B. Malik. 2003. Intersectin regulates fission and internalization of caveolae in endothelial cells. *Mol Biol Cell.* 14:4997-5010.
- Prokop, S., K. Shirotani, D. Edbauer, C. Haass, and H. Steiner. 2004. Requirement of PEN-2 for stabilization of the presenilin N-/C-terminal fragment heterodimer within the gamma-secretase complex. *J Biol Chem.* 279:23255-61.
- Puglielli, L., B.C. Ellis, L.A. Ingano, and D.M. Kovacs. 2004. Role of acyl-coenzyme a: cholesterol acyltransferase activity in the processing of the amyloid precursor protein. *J Mol Neurosci.* 24:93-6.
- Qi-Takahara, Y., M. Morishima-Kawashima, Y. Tanimura, G. Dolios, N. Hirotsu, Y. Horikoshi, F. Kametani, M. Maeda, T.C. Saido, R. Wang, and Y. Ihara. 2005. Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase. *J Neurosci.* 25:436-45.
- Qi, Y., M. Morishima-Kawashima, T. Sato, R. Mitsumori, and Y. Ihara. 2003. Distinct mechanisms by mutant presenilin 1 and 2 leading to increased intracellular levels of amyloid beta-protein 42 in Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry.* 42:1042-52.
- Quan, G., C. Xie, J.M. Dietschy, and S.D. Turley. 2003. Ontogenesis and regulation of cholesterol metabolism in the central nervous system of the mouse. *Brain Res Dev Brain Res.* 146:87-98.

- Ramaroson, H., C. Helmer, P. Barberger-Gateau, L. Letenneur, and J.F. Dartigues. 2003. [Prevalence of dementia and Alzheimer's disease among subjects aged 75 years or over: updated results of the PAQUID cohort]. *Rev Neurol (Paris)*. 159:405-11.
- Ramjaun, A.R., and P.S. McPherson. 1996. Tissue-specific alternative splicing generates two synaptotagmin isoforms with differential membrane binding properties. *J Biol Chem*. 271:24856-61.
- Ramos, M.C., R. Tenorio, A. Martinez-Garcia, I. Sastre, E. Vilella-Cuadrada, A. Frank, M. Rosich-Estrago, F. Valdivieso, and M.J. Bullido. 2006. Association of DSC1, a gene modulated by adrenergic stimulation, with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 408:203-8.
- Rapp, A., B. Gmeiner, and M. Hutterer. 2006. Implication of apoE isoforms in cholesterol metabolism by primary rat hippocampal neurons and astrocytes. *Biochimie*. 88:473-83.
- Reeves, R.H., N.G. Irving, T.H. Moran, A. Wohn, C. Kitt, S.S. Sisodia, C. Schmidt, R.T. Bronson, and M.T. Davisson. 1995. A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nat Genet*. 11:177-84.
- Refolo, L.M., B. Malester, J. LaFrancois, T. Bryant-Thomas, R. Wang, G.S. Tint, K. Sambamurti, K. Duff, and M.A. Pappolla. 2000. Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis*. 7:321-31.
- Reitz, C., M.X. Tang, J. Luchsinger, and R. Mayeux. 2004. Relation of plasma lipids to Alzheimer disease and vascular dementia. *Arch Neurol*. 61:705-14.
- Retz, W., J. Thome, N. Durany, A. Harsanyi, P. Retz-Junginger, J. Kornhuber, P. Riederer, and M. Rosler. 2001. Potential genetic markers of sporadic Alzheimer's dementia. *Psychiatr Genet*. 11:115-22.
- Richtsmeier, J.T., L.L. Baxter, and R.H. Reeves. 2000. Parallels of craniofacial maldevelopment in Down syndrome and Ts65Dn mice. *Dev Dyn*. 217:137-45.
- Richtsmeier, J.T., A. Zumwalt, E.J. Carlson, C.J. Epstein, and R.H. Reeves. 2002. Craniofacial phenotypes in segmentally trisomic mouse models for Down syndrome. *Am J Med Genet*. 107:317-24.
- Riemenschneider, M., S. Mahmoodzadeh, T. Eisele, N. Klopp, S. Schwarz, S. Wagenpfeil, J. Diehl, U. Mueller, H. Foerstl, T. Illig, and A. Kurz. 2004. Association analysis of genes involved in cholesterol metabolism located within the linkage region on chromosome 10 and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 25:1305-8.

- Rink, J., E. Ghigo, Y. Kalaidzidis, and M. Zerial. 2005. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell*. 122:735-49.
- Roberson, E.D., K. Scarce-Levie, J.J. Palop, F. Yan, I.H. Cheng, T. Wu, H. Gerstein, G.Q. Yu, and L. Mucke. 2007. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science*. 316:750-4.
- Roberts, R.L., M.A. Barbieri, K.M. Pryse, M. Chua, J.H. Morisaki, and P.D. Stahl. 1999. Endosome fusion in living cells overexpressing GFP-rab5. *J Cell Sci*. 112 (Pt 21):3667-75.
- Roch, J.M., E. Masliah, A.C. Roch-Levecq, M.P. Sundsmo, D.A. Otero, I. Veinbergs, and T. Saitoh. 1994. Increase of synaptic density and memory retention by a peptide representing the trophic domain of the amyloid beta/A4 protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:7450-4.
- Rockwood, K., S. Kirkland, D.B. Hogan, C. MacKnight, H. Merry, R. Verreault, C. Wolfson, and I. McDowell. 2002. Use of lipid-lowering agents, indication bias, and the risk of dementia in community-dwelling elderly people. *Arch Neurol*. 59:223-7.
- Rogaev, E.I., R. Sherrington, E.A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, Y. Liang, H. Chi, C. Lin, K. Holman, T. Tsuda, and et al. 1995. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature*. 376:775-8.
- Rollason, R., V. Korolchuk, C. Hamilton, P. Schu, and G. Banting. 2007. Clathrin-mediated endocytosis of a lipid-raft-associated protein is mediated through a dual tyrosine motif. *J Cell Sci*. 120:3850-8.
- Ross, C.A., and M.A. Poirier. 2005. Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6:891-8.
- Roux, A.F., V. Faugere, S. Le Guedard, N. Pallares-Ruiz, A. Vielle, S. Chambert, S. Marlin, C. Hamel, B. Gilbert, S. Malcolm, and M. Claustres. 2006. Survey of the frequency of USH1 gene mutations in a cohort of Usher patients shows the importance of cadherin 23 and protocadherin 15 genes and establishes a detection rate of above 90%. *J Med Genet*. 43:763-8.
- Rovelet-Lecrux, A., D. Hannequin, G. Raux, N. Le Meur, A. Laquerriere, A. Vital, C. Dumanchin, S. Feuillet, A. Brice, M. Vercelletto, F. Dubas, T. Frebourg, and D. Campion. 2006. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet*. 38:24-6.

- Russo, C., V. Venezia, E. Repetto, M. Nizzari, E. Violani, P. Carlo, and G. Schettini. 2005. The amyloid precursor protein and its network of interacting proteins: physiological and pathological implications. *Brain Res Brain Res Rev.* 48:257-64.
- Sadowski, M.J., J. Pankiewicz, H. Scholtzova, P.D. Mehta, F. Prelli, D. Quartermain, and T. Wisniewski. 2006. Blocking the apolipoprotein E/amyloid-beta interaction as a potential therapeutic approach for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:18787-92.
- Sago, H., E.J. Carlson, D.J. Smith, E.M. Rubin, L.S. Crnic, T.T. Huang, and C.J. Epstein. 2000. Genetic dissection of region associated with behavioral abnormalities in mouse models for Down syndrome. *Pediatr Res.* 48:606-13.
- Sakurai, T., K. Kaneko, M. Okuno, K. Wada, T. Kashiyama, H. Shimizu, T. Akagi, T. Hashikawa, and N. Nukina. 2008. Membrane microdomain switching: a regulatory mechanism of amyloid precursor protein processing. *J Cell Biol.* 183:339-52.
- Salehi, A., J.D. Delcroix, P.V. Belichenko, K. Zhan, C. Wu, J.S. Valletta, R. Takimoto-Kimura, A.M. Kleschevnikov, K. Sambamurti, P.P. Chung, W. Xia, A. Villar, W.A. Campbell, L.S. Kulnane, R.A. Nixon, B.T. Lamb, C.J. Epstein, G.B. Stokin, L.S. Goldstein, and W.C. Mobley. 2006. Increased App expression in a mouse model of Down's syndrome disrupts NGF transport and causes cholinergic neuron degeneration. *Neuron.* 51:29-42.
- Sambamurti, K., A. Suram, C. Venugopal, A. Prakasam, Y. Zhou, D.K. Lahiri, and N.H. Greig. 2006. A partial failure of membrane protein turnover may cause Alzheimer's disease: a new hypothesis. *Curr Alzheimer Res.* 3:81-90.
- Sandvig, K., M.L. Torgersen, H.A. Raa, and B. van Deurs. 2008. Clathrin-independent endocytosis: from nonexistent to an extreme degree of complexity. *Histochem Cell Biol.* 129:267-76.
- Sato, T., T.S. Diehl, S. Narayanan, S. Funamoto, Y. Ihara, B. De Strooper, H. Steiner, C. Haass, and M.S. Wolfe. 2007. Active gamma-secretase complexes contain only one of each component. *J Biol Chem.* 282:33985-93.
- Savage, M.J., Y.G. Lin, J.R. Ciallella, D.G. Flood, and R.W. Scott. 2002. Activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 in an Alzheimer's disease model is associated with amyloid deposition. *J Neurosci.* 22:3376-85.
- Scacchi, R., G. Gambina, E. Broggio, G. Moretto, M. Ruggeri, and R.M. Corbo. 2004. The H⁺ allele of the lipoprotein lipase (LPL) HindIII intronic polymorphism and the risk for sporadic late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 367:177-80.

- Scheuner, D., C. Eckman, M. Jensen, X. Song, M. Citron, N. Suzuki, T.D. Bird, J. Hardy, M. Hutton, W. Kukull, E. Larson, E. Levy-Lahad, M. Viitanen, E. Peskind, P. Poorkaj, G. Schellenberg, R. Tanzi, W. Wasco, L. Lannfelt, D. Selkoe, and S. Younkin. 1996. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med.* 2:864-70.
- Schneider, A., L. Rajendran, M. Honscho, M. Gralle, G. Donnert, F. Wouters, S.W. Hell, and M. Simons. 2008. Flotillin-dependent clustering of the amyloid precursor protein regulates its endocytosis and amyloidogenic processing in neurons. *J Neurosci.* 28:2874-82.
- Scott, R.B., J.M. Collins, and P.A. Hunt. 1994. Alzheimer's disease and Down syndrome: leukocyte membrane fluidity alterations. *Mech Ageing Dev.* 75:1-10.
- Selkoe, D.J. 2001. Presenilin, Notch, and the genesis and treatment of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:11039-41.
- Semerdjieva, S., B. Shortt, E. Maxwell, S. Singh, P. Fonarev, J. Hansen, G. Schiavo, B.D. Grant, and E. Smythe. 2008. Coordinated regulation of AP2 uncoating from clathrin-coated vesicles by rab5 and hRME-6. *J Cell Biol.* 183:499-511.
- Senechal, Y., L. Prut, P.H. Kelly, M. Staufenbiel, F. Natt, D. Hoyer, C. Wiessner, and K.K. Dev. 2008. Increased exploratory activity of APP23 mice in a novel environment is reversed by siRNA. *Brain Res.* 1243:124-33.
- Serneels, L., J. Van Biervliet, K. Craessaerts, T. Dejaegere, K. Horre, T. Van Houtvin, H. Esselmann, S. Paul, M.K. Schafer, O. Berezovska, B.T. Hyman, B. Sprangers, R. Sciot, L. Moons, M. Jucker, Z. Yang, P.C. May, E. Karran, J. Wiltfang, R. D'Hooge, and B. De Strooper. 2009. gamma-Secretase heterogeneity in the Aph1 subunit: relevance for Alzheimer's disease. *Science.* 324:639-42.
- Seubert, P., T. Oltersdorf, M.G. Lee, R. Barbour, C. Blomquist, D.L. Davis, K. Bryant, L.C. Fritz, D. Galasko, L.J. Thal, and et al. 1993. Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide. *Nature.* 361:260-3.
- Sevalle, J., E. Ayril, J.F. Hernandez, J. Martinez, and F. Checler. 2009. Pharmacological evidences for DFK167-sensitive presenilin-independent gamma-secretase-like activity. *J Neurochem.* 110:275-83.
- Sever, S., J. Skoch, S. Newmyer, R. Ramachandran, D. Ko, M. McKee, R. Bouley, D. Ausiello, B.T. Hyman, and B.J. Bacskai. 2006. Physical and functional connection between auxilin and dynamin during endocytosis. *EMBO J.* 25:4163-74.

- Shah, S., S.F. Lee, K. Tabuchi, Y.H. Hao, C. Yu, Q. LaPlant, H. Ball, C.E. Dann, 3rd, T. Sudhof, and G. Yu. 2005. Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell*. 122:435-47.
- Sharma, D.K., J.C. Brown, A. Choudhury, T.E. Peterson, E. Holicky, D.L. Marks, R. Simari, R.G. Parton, and R.E. Pagano. 2004. Selective stimulation of caveolar endocytosis by glycosphingolipids and cholesterol. *Mol Biol Cell*. 15:3114-22.
- Sharma, M., N. Naslavsky, and S. Caplan. 2008. A role for EHD4 in the regulation of early endosomal transport. *Traffic*. 9:995-1018.
- Shenoy, S.K., and R.J. Lefkowitz. 2003. Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination. *J Biol Chem*. 278:14498-506.
- Shepherd, J., G.J. Blauw, M.B. Murphy, E.L. Bollen, B.M. Buckley, S.M. Cobbe, I. Ford, A. Gaw, M. Hyland, J.W. Jukema, A.M. Kamper, P.W. Macfarlane, A.E. Meinders, J. Norrie, C.J. Packard, I.J. Perry, D.J. Stott, B.J. Sweeney, C. Twomey, and R.G. Westendorp. 2002. Pravastatin in elderly individuals at risk of vascular disease (PROSPER): a randomised controlled trial. *Lancet*. 360:1623-30.
- Shibata, N., T. Kawarai, J.H. Lee, H.S. Lee, E. Shibata, C. Sato, Y. Liang, R. Duara, R.P. Mayeux, P.H. St George-Hyslop, and E. Rogaeva. 2006. Association studies of cholesterol metabolism genes (CH25H, ABCA1 and CH24H) in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 391:142-6.
- Shie, F.S., L.W. Jin, D.G. Cook, J.B. Leverenz, and R.C. LeBoeuf. 2002. Diet-induced hypercholesterolemia enhances brain A beta accumulation in transgenic mice. *Neuroreport*. 13:455-9.
- Shin, H.W., M. Hayashi, S. Christoforidis, S. Lacas-Gervais, S. Hoepfner, M.R. Wenk, J. Modregger, S. Uttenweiler-Joseph, M. Wilm, A. Nystuen, W.N. Frankel, M. Solimena, P. De Camilli, and M. Zerial. 2005. An enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway. *J Cell Biol*. 170:607-18.
- Shobab, L.A., G.Y. Hsiung, and H.H. Feldman. 2005. Cholesterol in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 4:841-52.
- Simons, K., and E. Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 387:569-72.
- Simons, M., P. Keller, B. De Strooper, K. Beyreuther, C.G. Dotti, and K. Simons. 1998. Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:6460-4.

- Simonsen, A., R. Lippe, S. Christoforidis, J.M. Gaullier, A. Brech, J. Callaghan, B.H. Toh, C. Murphy, M. Zerial, and H. Stenmark. 1998. EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature*. 394:494-8.
- Sinha, S., J.P. Anderson, R. Barbour, G.S. Basi, R. Caccavello, D. Davis, M. Doan, H.F. Dovey, N. Frigon, J. Hong, K. Jacobson-Croak, N. Jewett, P. Keim, J. Knops, I. Lieberburg, M. Power, H. Tan, G. Tatsuno, J. Tung, D. Schenk, P. Seubert, S.M. Suomensaaari, S. Wang, D. Walker, J. Zhao, L. McConlogue, and V. John. 1999. Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature*. 402:537-40.
- Sisodia, S.S. 1992. Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:6075-9.
- Small, D.H., V. Nurcombe, R. Moir, S. Michaelson, D. Monard, K. Beyreuther, and C.L. Masters. 1992. Association and release of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease from chick brain extracellular matrix. *J Neurosci*. 12:4143-50.
- Small, D.H., V. Nurcombe, G. Reed, H. Clarris, R. Moir, K. Beyreuther, and C.L. Masters. 1994. A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *J Neurosci*. 14:2117-27.
- Small, S.A., and K. Duff. 2008. Linking A β and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. *Neuron*. 60:534-42.
- Song, K.S., S. Li, T. Okamoto, L.A. Quilliam, M. Sargiacomo, and M.P. Lisanti. 1996. Copurification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. *J Biol Chem*. 271:9690-7.
- Spasic, D., T. Raemaekers, K. Dillen, I. Declerck, V. Baert, L. Serneels, J. Fullekrug, and W. Annaert. 2007. Rer1p competes with APH-1 for binding to nicastrin and regulates gamma-secretase complex assembly in the early secretory pathway. *J Cell Biol*. 176:629-40.
- Spudich, G., M.V. Chibalina, J.S. Au, S.D. Arden, F. Buss, and J. Kendrick-Jones. 2007. Myosin VI targeting to clathrin-coated structures and dimerization is mediated by binding to Disabled-2 and PtdIns(4,5)P₂. *Nat Cell Biol*. 9:176-83.
- St George-Hyslop, P.H. 2000. Genetic factors in the genesis of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 924:1-7.
- Stein, T.D., N.J. Anders, C. DeCarli, S.L. Chan, M.P. Mattson, and J.A. Johnson. 2004. Neutralization of transthyretin reverses the neuroprotective effects of secreted amyloid

- precursor protein (APP) in APPSW mice resulting in tau phosphorylation and loss of hippocampal neurons: support for the amyloid hypothesis. *J Neurosci.* 24:7707-17.
- Stenmark, H. 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:513-25.
- Stenmark, H., R.G. Parton, O. Steele-Mortimer, A. Lutcke, J. Gruenberg, and M. Zerial. 1994. Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *EMBO J.* 13:1287-96.
- Stenmark, H., G. Vitale, O. Ullrich, and M. Zerial. 1995. Rabaptin-5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion. *Cell.* 83:423-32.
- Stockley, J.H., R. Ravid, and C. O'Neill. 2006. Altered beta-secretase enzyme kinetics and levels of both BACE1 and BACE2 in the Alzheimer's disease brain. *FEBS Lett.* 580:6550-60.
- Stokes, C.E., and J.N. Hawthorne. 1987. Reduced phosphoinositide concentrations in anterior temporal cortex of Alzheimer-diseased brains. *J Neurochem.* 48:1018-21.
- Stokin, G.B., C. Lillo, T.L. Falzone, R.G. Brush, E. Rockenstein, S.L. Mount, R. Raman, P. Davies, E. Masliah, D.S. Williams, and L.S. Goldstein. 2005. Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science.* 307:1282-8.
- Storey, E., K. Beyreuther, and C.L. Masters. 1996. Alzheimer's disease amyloid precursor protein on the surface of cortical neurons in primary culture co-localizes with adhesion patch components. *Brain Res.* 735:217-31.
- Stuve, O., S. Youssef, L. Steinman, and S.S. Zamvil. 2003. Statins as potential therapeutic agents in neuroinflammatory disorders. *Curr Opin Neurol.* 16:393-401.
- Subasinghe, S., S. Unabia, C.J. Barrow, S.S. Mok, M.I. Aguilar, and D.H. Small. 2003. Cholesterol is necessary both for the toxic effect of Abeta peptides on vascular smooth muscle cells and for Abeta binding to vascular smooth muscle cell membranes. *J Neurochem.* 84:471-9.
- Subtil, A., I. Gaidarov, K. Kobylarz, M.A. Lampson, J.H. Keen, and T.E. McGraw. 1999. Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:6775-80.
- Suzuki, N., T.T. Cheung, X.D. Cai, A. Odaka, L. Otvos, Jr., C. Eckman, T.E. Golde, and S.G. Younkin. 1994. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science.* 264:1336-40.

- Szczygielski, J., A. Mautes, W.I. Steudel, P. Falkai, T.A. Bayer, and O. Wirths. 2005. Traumatic brain injury: cause or risk of Alzheimer's disease? A review of experimental studies. *J Neural Transm.* 112:1547-64.
- Tabas, I. 2002. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J Clin Invest.* 110:905-11.
- Tamamizu-Kato, S., J.K. Cohen, C.B. Drake, M.G. Kosaraju, J. Drury, and V. Narayanaswami. 2008. Interaction with amyloid beta peptide compromises the lipid binding function of apolipoprotein E. *Biochemistry.* 47:5225-34.
- Tannenberg, R.K., H.L. Scott, A.E. Tannenberg, and P.R. Dodd. 2006. Selective loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease: evidence for an increased severity with APOE varepsilon4. *Neurochem Int.* 49:631-9.
- Taru, H., and T. Suzuki. 2004. Facilitation of stress-induced phosphorylation of beta-amyloid precursor protein family members by X11-like/Mint2 protein. *J Biol Chem.* 279:21628-36.
- Taubes, G. 2003. Neuroscience. Insulin insults may spur Alzheimer's disease. *Science.* 301:40-1.
- Thathiah, A., K. Spittaels, M. Hoffmann, M. Staes, A. Cohen, K. Horre, M. Vanbrabant, F. Coun, V. Baekelandt, A. Delacourte, D.F. Fischer, D. Pollet, B. De Strooper, and P. Merchiers. 2009. The orphan G protein-coupled receptor 3 modulates amyloid-beta peptide generation in neurons. *Science.* 323:946-51.
- Thinakaran, G., and E.H. Koo. 2008. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem.* 283:29615-9.
- Tomita, S., Y. Kirino, and T. Suzuki. 1998. Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein (APP) by secretases occurs after O-glycosylation of APP in the protein secretory pathway. Identification of intracellular compartments in which APP cleavage occurs without using toxic agents that interfere with protein metabolism. *J Biol Chem.* 273:6277-84.
- Tramier, M., M. Zahid, J.C. Mevel, M.J. Masse, and M. Coppey-Moisan. 2006. Sensitivity of CFP/YFP and GFP/mCherry pairs to donor photobleaching on FRET determination by fluorescence lifetime imaging microscopy in living cells. *Microsc Res Tech.* 69:933-9.
- Tyler, S.J., D. Dawbarn, G.K. Wilcock, and S.J. Allen. 2002. alpha- and beta-secretase: profound changes in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 299:373-6.

- Van Broeckhoven, C., J. Haan, E. Bakker, J.A. Hardy, W. Van Hul, A. Wehnert, M. Vegter-Van der Vlis, and R.A. Roos. 1990. Amyloid beta protein precursor gene and hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch). *Science*. 248:1120-2.
- van der Sluijs, P., M. Hull, P. Webster, P. Male, B. Goud, and I. Mellman. 1992. The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell*. 70:729-40.
- Vassar, R. 2004. BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci*. 23:105-14.
- 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.
- Verreault, R., D. Laurin, J. Lindsay, and G. De Serres. 2001. Past exposure to vaccines and subsequent risk of Alzheimer's disease. *CMAJ*. 165:1495-8.
- Vieira, A.V., C. Lamaze, and S.L. Schmid. 1996. Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science*. 274:2086-9.
- Viola, A., and N. Gupta. 2007. Tether and trap: regulation of membrane-raft dynamics by actin-binding proteins. *Nat Rev Immunol*. 7:889-96.
- von Arnim, C.A., B. von Einem, P. Weber, M. Wagner, D. Schwanzar, R. Spoelgen, W.L. Strauss, and H. Schneckenburger. 2008. Impact of cholesterol level upon APP and BACE proximity and APP cleavage. *Biochem Biophys Res Commun*. 370:207-12.
- Voronov, S.V., S.G. Frere, S. Giovedi, E.A. Pollina, C. Borel, H. Zhang, C. Schmidt, E.C. Akeson, M.R. Wenk, L. Cimasoni, O. Arancio, M.T. Davisson, S.E. Antonarakis, K. Gardiner, P. De Camilli, and G. Di Paolo. 2008. Synaptojanin 1-linked phosphoinositide dyshomeostasis and cognitive deficits in mouse models of Down's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:9415-20.
- Wainszelbaum, M.J., B.M. Proctor, S.E. Pontow, P.D. Stahl, and M.A. Barbieri. 2006. IL4/PGE2 induction of an enlarged early endosomal compartment in mouse macrophages is Rab5-dependent. *Exp Cell Res*. 312:2238-51.
- Waldman, A., and L. Kritharides. 2003. The pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors: their role in osteoporosis and dementia. *Drugs*. 63:139-52.
- Wallrabe, H., and A. Periasamy. 2005. Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy. *Curr Opin Biotechnol*. 16:19-27.

- Walmsley, A.R., F. Zeng, and N.M. Hooper. 2003. The N-terminal region of the prion protein ectodomain contains a lipid raft targeting determinant. *J Biol Chem.* 278:37241-8.
- Walsh, D.M., I. Klyubin, J.V. Fadeeva, W.K. Cullen, R. Anwyl, M.S. Wolfe, M.J. Rowan, and D.J. Selkoe. 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature.* 416:535-9.
- Wang, F., and J. Jia. 2007. Polymorphisms of cholesterol metabolism genes CYP46 and ABCA1 and the risk of sporadic Alzheimer's disease in Chinese. *Brain Res.* 1147:34-8.
- Wang, H.Y., W. Li, N.J. Benedetti, and D.H. Lee. 2003. Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors mediate beta-amyloid peptide-induced tau protein phosphorylation. *J Biol Chem.* 278:31547-53.
- Wasling, P., J. Daborg, I. Riebe, M. Andersson, E. Portelius, K. Blennow, E. Hanse, and H. Zetterberg. 2009. Synaptic retrogenesis and amyloid-beta in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 16:1-14.
- Wassall, S.R., M.R. Brzustowicz, S.R. Shaikh, V. Cherezov, M. Caffrey, and W. Stillwell. 2004. Order from disorder, corralling cholesterol with chaotic lipids. The role of polyunsaturated lipids in membrane raft formation. *Chem Phys Lipids.* 132:79-88.
- Watson, G.S., and S. Craft. 2003. The role of insulin resistance in the pathogenesis of Alzheimer's disease: implications for treatment. *CNS Drugs.* 17:27-45.
- Weggen, S., J.L. Eriksen, P. Das, S.A. Sagi, R. Wang, C.U. Pietrzik, K.A. Findlay, T.E. Smith, M.P. Murphy, T. Bulter, D.E. Kang, N. Marquez-Sterling, T.E. Golde, and E.H. Koo. 2001. A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature.* 414:212-6.
- Weller, R.O., M. Subash, S.D. Preston, I. Mazanti, and R.O. Carare. 2008. Perivascular drainage of amyloid-beta peptides from the brain and its failure in cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 18:253-66.
- 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.
- Whitmer, R.A., E.P. Gunderson, E. Barrett-Connor, C.P. Quesenberry, Jr., and K. Yaffe. 2005. Obesity in middle age and future risk of dementia: a 27 year longitudinal population based study. *BMJ.* 330:1360.
- Wilson, C.A., R.W. Doms, H. Zheng, and V.M. Lee. 2002. Presenilins are not required for A beta 42 production in the early secretory pathway. *Nat Neurosci.* 5:849-55.

- Wolfe, M.S., and R. Kopan. 2004. Intramembrane proteolysis: theme and variations. *Science*. 305:1119-23.
- Wolozin, B., W. Kellman, P. Ruosseau, G.G. Celesia, and G. Siegel. 2000. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol*. 57:1439-43.
- Wood, J.G., S.S. Mirra, N.J. Pollock, and L.I. Binder. 1986. Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83:4040-3.
- Xiong, H., D. Callaghan, A. Jones, D.G. Walker, L.F. Lue, T.G. Beach, L.I. Sue, J. Woulfe, H. Xu, D.B. Stanimirovic, and W. Zhang. 2008. Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high beta- and gamma-secretase activities and A beta production. *Neurobiol Dis*. 29:422-37.
- Yaffe, K., E. Barrett-Connor, F. Lin, and D. Grady. 2002. Serum lipoprotein levels, statin use, and cognitive function in older women. *Arch Neurol*. 59:378-84.
- Yagishita, S., M. Morishima-Kawashima, Y. Tanimura, S. Ishiura, and Y. Ihara. 2006. DAPT-induced intracellular accumulations of longer amyloid beta-proteins: further implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase. *Biochemistry*. 45:3952-60.
- Yamazaki, T., T.Y. Chang, C. Haass, and Y. Ihara. 2001. Accumulation and aggregation of amyloid beta-protein in late endosomes of Niemann-pick type C cells. *J Biol Chem*. 276:4454-60.
- Yamazaki, T., E.H. Koo, and D.J. Selkoe. 1996. Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. II. Endocytosis, recycling and lysosomal targeting detected by immunolocalization. *J Cell Sci*. 109 (Pt 5):999-1008.
- Yamazaki, T., D.J. Selkoe, and E.H. Koo. 1995. Trafficking of cell surface beta-amyloid precursor protein: retrograde and transcytotic transport in cultured neurons. *J Cell Biol*. 129:431-42.
- Yan, R., M.J. Bienkowski, M.E. Shuck, H. Miao, M.C. Tory, A.M. Pauley, J.R. Brashier, N.C. Stratman, W.R. Mathews, A.E. Buhl, D.B. Carter, A.G. Tomasselli, L.A. Parodi, R.L. Heinrikson, and M.E. Gurney. 1999. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature*. 402:533-7.
- Yang, L.B., K. Lindholm, R. Yan, M. Citron, W. Xia, X.L. Yang, T. Beach, L. Sue, P. Wong, D. Price, R. Li, and Y. Shen. 2003. Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nat Med*. 9:3-4.

- Yokoyama, S. 2005. Assembly of high density lipoprotein by the ABCA1/apolipoprotein pathway. *Curr Opin Lipidol.* 16:269-79.
- Yu, Y., P.Y. Chu, D.N. Bowser, D.J. Keating, D. Dubach, I. Harper, J. Tkalcevic, D.I. Finkelstein, and M.A. Pritchard. 2008. Mice deficient for the chromosome 21 ortholog *Its1n1* exhibit vesicle-trafficking abnormalities. *Hum Mol Genet.* 17:3281-90.
- Zandi, P.P., D.L. Sparks, A.S. Khachaturian, J. Tschanz, M. Norton, M. Steinberg, K.A. Welsh-Bohmer, and J.C. Breitner. 2005. Do statins reduce risk of incident dementia and Alzheimer disease? The Cache County Study. *Arch Gen Psychiatry.* 62:217-24.
- Zerial, M., and H. McBride. 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:107-17.
- Zheng, H., M. Jiang, M.E. Trumbauer, D.J. Sirinathsinghji, R. Hopkins, D.W. Smith, R.P. Heavens, G.R. Dawson, S. Boyce, M.W. Conner, K.A. Stevens, H.H. Slunt, S.S. Sisoda, H.Y. Chen, and L.H. Van der Ploeg. 1995. beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell.* 81:525-31.

V. ANNEXE