

Thèse
Pour obtenir le grade de
Docteur de l'université Paris 5
Sciences de la Vie et de la Santé
Ecole doctorale GC2ID
Discipline : Neurosciences

TOXICITÉ NEURONALE DU CHOLESTÉROL ET
PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER :
ANALYSE *IN VIVO* DES CONSÉQUENCES DE L'INHIBITION
DE LA CHOLESTÉROL-24-HYDROXYLASE

Présentée et soutenue Publiquement
Par Fathia DJELTI
Le 30 Septembre 2013

Pr Marc Delpech
Pr Jean Noel Octave
Dr Emmanuel Brouillet
Dr Bernadette Allinquant
Dr Marc Dhenain
Pr Charles Duyckaerts
Pr Nathalie Cartier

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examineur
Examineur
Directrice de thèse

Visez toujours la lune même si vous la manquez, vous atterrirez parmi les étoiles.



REMERCIEMENTS :

Je remercie **le Professeur Patrick Aubourg** de m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour son étonnante dualité mêlant réticence (un trou, c'est juste un trou) puis enthousiasme face aux résultats finaux (Science).

J'aimerais également remercier le Professeur **Nathalie Cartier** de m'avoir accordé sa confiance, l'autonomie pour gérer ce projet et de m'avoir permis de réaliser des collaborations diverses et variées.

Je souhaite également remercier sincèrement les rapporteurs de ma thèse, **les Professeurs Emmanuel Brouillet et Jean Noel Octave** d'avoir pris le temps de lire et de commenter mon manuscrit.

Je remercie **le professeur Marc Delpech** d'avoir accepté d'être président de mon jury de thèse et d'avoir pris le temps de lire mon manuscrit.

Je remercie le **Dr Bernadette Allinquant et le Pr Charles Duysckaerts** (et également de son aide pour la lecture des lames de mes souris), d'avoir accepté d'être examinateur de ce travail.

Je tiens à remercier le **Dr Marc Dhenain**, d'avoir accepté d'être examinateur de ma thèse, pour la collaboration sur les IRM et tes relectures très critiques du papier. Cela a été très bénéfique et un réel plaisir de travailler avec toi.

Je remercie également l'université Paris 5 et la fondation de recherche biomédicale pour m'avoir financé pendant cette thèse ainsi que la fondation de l'Avenir et l'ANR pour avoir financé mes travaux de recherche.

Aux Amies du laboratoire

A Eloïse : Merci d'avoir toujours répondu à mes questions même de Boston, Merci d'avoir initié le projet. Et merci de ta gentillesse.

A Karelia : Toujours discrète et dans la lune, tu es une grande personne, gentille avec un côté farfelu que peu de personnes connaissent mais que j'adore.

A Mathieu : Arrivé au laboratoire un peu près en même temps, tu as toujours été présent dans les moments de rire de joies et de galères. Merci de ton amitié et de m'avoir fait découvrir le monde de la génétique.

A Benoit : Tu es un mec un peu nounours adorable, toujours présent, curieux d'esprit. Je te remercie d'avoir été présent pour les galères de relecture d'introduction de thèse, de me faire rire, de ton soutien, de ton amitié, de ta présence et de tes conseils.

A Christian : Merci de ton aide pour la mise au point de l'isolement des rafts et ton incroyable gentillesse.

A Jérôme : Je te remercie de nos discussions sur les projets Alzheimer. Merci pour les pauses cafés ou j'ai apprécié discuter de tout et de rien mais surtout de Sciences. Merci de m'avoir initié au Comportement et aux statistiques.

A Ingrid : Merci pour ton soutien sans faille, tes encouragements, tes conseils qui m'ont bien aidé tout au long de cette thèse. Merci pour nos discussions, ton intérêt pour tout.

A Béatrice : Merci pour ta gentillesse, ton franc-parler et tes blagues toujours très drôles.

A Yvan : Merci d'avoir supervisé l'aspect analyse transcriptionnelle de ce projet. Merci de ta gentillesse et de ton accueil.

A Armelle : Merci pour les fous rires, pour ton intérêt, ta curiosité d'esprit et nos discussions.

A Michel, Dominique et Eric: Merci de votre accueil dans le laboratoire et de votre gentillesse

A l'équipe d'Immunologie : Merci pour votre gentillesse et votre accueil (Sophie, Gerald, Dalila, Aurélie, David, Raja, Virginie). Merci à Louis Bastien d'avoir été présent les week-ends, c'était plus rassurant le laboratoire. Merci à Lyria et ton accent chantant, toujours de bonne humeur. J'espère que tu seras heureuse avec ta petite Ines.

A Julie : Merci pour ta joie de vivre, ton accent du sud, nos discussions, ta gentillesse dépourvue d'intérêt.

A Marie Anne, Mickaël, les deux thésards du laboratoire :

Merci de votre gentillesse. Je vous laisse les rênes du projet Alzheimer. Merci pour votre soutien.

A Françoise, Gaëlle, Caroline: Merci de votre gentillesse de votre écoute et de nos fous rires au cours de cette thèse.



Aux personnes du CEA : Merci de votre accueil et de votre gentillesse (Laetitia, Emilie, Aurélie, Juliette, Fabien, Karine, Mathias, Maria, Marie Claude, Gwen, Noelle, Alexis, Charlène, Chloé, Julien,...)

A Albert, Céline et Virginie : Merci à tous les trois pour votre gentillesse et votre accueil.

A Hassina : petite fée du laboratoire. Merci de ta gentillesse dénuée d'intérêt de ta présence. Tu es une personne formidable et je suis ravie d'avoir fait ta connaissance.

A Jean-Claude le bogosse de la fac : Merci de me faire rire, d'être toi tout simplement, de tes compliments. Ne change pas.

A ma nouvelle équipe de Post doc (Brunoy) : (Fabienne, Martine Fabien, Julia, Lauriane, Camille, Franzeska, Sandrine, Thomas, Eric, Didier, et tous les autres : Merci de me faire découvrir un nouveau monde.

Enfin, **Merci à toutes les personnes avec qui j'ai travaillé dans les différents laboratoires (Hopital Necker, Hopital La pitié salpêtrière, institut Curie, Hopital Saint Louis).** Vous m'avez donné les cartes pour réussir le défi de ma thèse

A mes collaborateurs :

A l'équipe Lipidomique :

Merci à **Mr Olivier Laprevote** de m'avoir accueilli et permis de réaliser les expériences de lipidomique dans son laboratoire

Merci à **Sophie, Nicolas, Mathieu, Anne et Delphine** de m'avoir initié au monde obscur des lipides. Cela a été un vrai plaisir de travailler avec vous.

Un merci particulier à **Nicolas Auzeuil** pour sa gentillesse, son accueil, son côté précis notamment pour m'avoir aidé à corriger un poster à l'IMTCE, poster qui m'a valu un prix. Tu as révolutionné ma façon de faire un poster (très précis et carré).

Merci spécial à **Sophie** pour nos discussions, d'avoir écouté mes hypothèses, de ton écoute, de nos fous rires de ta gentillesse et de ton amitié.

A l'équipe EEG :

Merci à **Mr Richard Miles** de ses questions pertinentes.

Merci à **Vincent Navarro** de m'avoir initié à l'aspect EEG des souris en me permettant de suivre l'implantation de connecteur dans le cerveau des souris

Merci à **Farah Chali** pour son aide sur les enregistrements.

A Marie Claude Potier :

Merci pour sa gentillesse et son aide pour les notions d'endosomes.

A mes Étudiants :

A Jérémy : Merci tu as été un super étudiant toujours souriant qui comprend vite. Tu as été le premier dont je me suis occupé du rapport et de l'oral. Et j'en suis fière.

A Ferid : Tu as été mon tout premier étudiant. J'ai beaucoup appris. Merci

A Emeline : Merci pour les coupes paraffine que tu as réalisées pour moi et pour ta « franchise » quotidienne.

A mes Ami(e)s

A Jennifer :

Eh oui, tu es dans cette section, ma sœur de laboratoire, ma voisine de bureau mais surtout une excellente amie. Tu es la personne la plus franche et entière que je connaisse. Tu es gentille, drôle, une personne sur laquelle on peut compter et avoir confiance.

J'adore nos discussions dans tous les domaines. Tu es une des personnes qui a le mieux compris mon sujet et qui a lu ma thèse (petite fée qui a corrigé mes tournures de phrases et l'orthographe).

Tu es la reine de la PCR quantitative, super efficace, rapide comme Lucky luke.

Tu m'as fait découvrir GP à la fin de ma thèse ce qui m'a permis de me détendre.

Pour toutes ces qualités je t'adore.

A Laurence et à Véronique :

Merci de m'avoir accueilli au Body Moving. Merci de toutes ces années de bénévolat. Merci de votre patience de ces deux dernières années. Merci de votre Amitié et de nos discussions. Merci de votre soutien. Je profite surtout de cette thèse pour vous remercier de m'avoir appris à vaincre ma timidité et aller vers les autres.

Spéciale dédicace à Laurence d'être toujours présente quand je t'appelle, de ton écoute et de tes conseils toujours judicieux.

A mes ami(e)s capoeiristes :

J'ai commencé la capoeira 6 mois après le début de ma thèse. Je cherchai un sport pour me vider la tête et plein de solidarité. Et un lundi j'ai toqué à la porte et vous m'avez accueilli. Depuis je suis accro. Un merci à mon Professeur No pour m'avoir appris les rudiments culturels et sportifs de la capoeira et de me laisser évoluer sans pression.

Merci à Bassula le bogosse de la capoeira, merci de ton calme de ta gentillesse

Merci à Mihlo pour ta confiance,

Merci à Vermehlo et Gaviao pour leur sagesse, merci à Branco pour ta joie de vivre

Merci à Kong car malgré ton jeune âge tu es un sage et un champion.

Merci à Carneiro, Pitangazu, Azulao, Soubrancil, Raiz etc... pour les fous rires

Je ne peux pas tous vous citer car sinon cette thèse serait trop longue mais juste un merci d'avoir assuré la soupe de sécurité de ma thèse.

A ma « sœur » Pimenta, grande capoeiriste :

Non t'inquiètes je ne t'ai pas oublié.

J'ai plein de choses à te dire. Tu es une personne très importante, très sage avec une pointe de délire. Tu sais écouter. Tu es devenue une grande amie. Je te remercie de me faire confiance et de me confier tes secrets dont un qui a été long à tenir (n'est ce pas Mihlo). Je ne sais pas si tu te souviens quand vous m'avez confié la garde de ce secret, tu m'as dit que j'étais une personne en qui tu avais toute confiance. Ça m'a vraiment touchée. Et aujourd'hui je voulais te dire que c'est réciproque.

A Nesrine : Merci de ton écoute, de tes messages et de ta gentillesse.

A Ahmed : On s'est rencontré il y a 11 ans dans le laboratoire du Pr Klatzmann. Malgré les détours que l'on a pu avoir, tu as toujours été présent par téléphone ou autour d'une crêpe. J'apprécie ta gentillesse tes conseils, ton calme. Tu es une personne géniale et un ami.

A Smail : Merci d'être toi, de ta gentillesse, de ton humour et de ton soutien. T'es un as.

A Catherine ma meilleure amie rencontré en BTS pour ton soutien ta gentillesse ton côté enfant. Tu me manques depuis que tu vis à la Rochelle mais je viens te voir après ma thèse.

A ma famille

A mes trois petits anges :

Moadh : Mon premier neveu devenu grand, joueur de foot et pilote d'avion. Merci de t'intéresser à ce que je fais et de ta curiosité d'esprit.

Ilies : Danseur de hip hop discret mais séducteur dans l'âme. Merci pour tes démos, nos discussions et tes questions toujours pertinentes

Ma petite Jihane : Ma petite nièce princesse. Merci pour tes magnifiques dessins, ton innocence qui me fait toujours rire, ton envie d'apprendre et surtout pour cette phrase « Tu sais, je suis belle mais j'ai aussi un cerveau ».

A ma grande sœur Nora :

Merci grande sœur (mère de tout ce petit monde). Tu es mon modèle. Je t'adore. Merci à ton mari aussi.

A ma petite sœur Sabéha:

Merci pour tes textos d'encouragement pour ma thèse (surtout pendant la rédaction). Tu es quelqu'un d'adorable. Je suis super fière de toi. Aie juste confiance en toi et tu décrocheras la lune.

A ma petite sœur Malika:

Une grande danseuse toujours dans la lune, partenaire des galas de danse. Merci de ton soutien de nos trajets RER et de répondre toujours présente

Je vous aime mes 3 sœurs et je vous promets de passer du temps avec vous surtout pour des trucs de filles.

A mon petit frère Bénamar:

Le seul et l'unique. J'adore tes délires ta joie de vivre, tes bonnes nuits à répétition, ton intérêt pour mon travail. Merci d'être présent. Merci à ta femme Rachida et à ton fils Rayane qui est adorable

A ma belle sœur Rachida et à Rayane

Merci de ta gentillesse et de tes rires

Merci à ma grand-mère :

Je tiens à te remercier ma petite Héna même si tu n'es plus là, tu me manques. Tu as été présente dans mon cœur tout au long de ce projet. J'espère que là où tu es, tu es fière de moi. Je t'aime

A mes parents

Merci à mes anges protecteurs

Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir toujours suivi dans mes délires de reprise d'étude.

Merci de votre soutien

Merci d'être fier de moi

Merci de m'avoir donné une excellente éducation et des principes de vie

Je vous adore. Vous êtes tous les deux des personnes formidables exceptionnelles et extraordinaires.

Je n'ai pas les mots pour vous remercier mais sans vous ce travail n'aurait pu aboutir.

Juste Merci.

Le hasard, c'est Dieu qui se promène incognito. –

Albert Einstein

SOMMAIRE

RÉSUMÉ.....	16
ABSTRACT.....	17
ABREVIATIONS.....	18
INTRODUCTION :	22
A. Métabolisme du cholestérol cérébral.....	22
1 Métabolisme du cholestérol :.....	22
1.1 Synthèse du cholestérol :.....	24
1.1.1 Etapes de synthèse.....	24
1.1.2 Mécanismes de la régulation de la synthèse du cholestérol.....	26
1.1.2.1 Régulation transcriptionnelle de la synthèse du cholestérol.....	26
1.1.2.2 Régulation traductionnelle de la synthèse de cholestérol.....	28
1.2 Echanges intercellulaires du cholestérol des astrocytes vers les neurones :	29
1.3 Utilisation du cholestérol dans les neurones.....	29
1.4 Export du cholestérol hors du cerveau : cholestérol-24-hydroxylase et APOE	32
1.4.1 Cholesterol-24-hydroxylase codée par le gène <i>CYP46A1</i>	32
1.4.2 ApoE	35
2 Métabolisme du cholestérol et maladies neurodégénératives.....	36
2.1 Métabolisme du cholestérol et vieillissement.....	36
2.2 Maladies neurodégénératives et métabolisme du cholestérol.....	37
2.2.1 Maladie d'Huntington	37
2.2.2 Maladie de Parkinson	37
2.2.3 Maladie de Niemann Pick de type C.....	38
2.2.4 Cholestérol, épilepsie et excitabilité neuronale.....	38
2.2.4.1 Généralités sur l'épilepsie.....	38
2.2.4.2 Lien entre le cholestérol et les processus épileptiques :.....	41
B. Maladie d'Alzheimer et métabolisme du cholestérol :	42
1 Généralités	42
1.1 Définition	42
1.2 Deux lésions neuropathologiques :.....	42
1.2.1 La composante amyloïde.....	42
1.2.1.1 Voie non amyloïdogénique et amyloïdogénique	42
1.2.1.2 Plaques amyloïdes ou séniles.....	46
1.2.2 La composante Tau :.....	47
1.2.2.1 L'hyperphosphorylation de la protéine Tau	47
1.2.2.2 Les corps neurofibrillaires	47
1.3 Autres caractéristiques neuropathologiques :.....	48
1.3.1 La perte neuronale	48
1.3.2 Astrogliose.....	49
1.3.3 Atrophie cérébrale et hippocampique.....	49
1.4 Deux formes de la maladie d'Alzheimer	50
1.4.1 Formes familiales précoces	50
1.4.1.1 Le gène APP.....	51
1.4.1.2 Le gène PSEN1 et PSEN2	51
1.4.2 Formes sporadiques tardives :	51
2 Etroites connexions entre le métabolisme du cholestérol et la maladie d'Alzheimer :.....	52
2.1 ApoE, principal facteur de risque de la maladie d'Alzheimer.....	52

2.2	Influence du cholestérol périphérique sur la maladie d'Alzheimer	53
2.2.1	Taux du cholestérol dans le plasma des patients atteints de la maladie d'Alzheimer :	53
2.2.2	Statines	54
2.2.3	Régimes hypercholestérolémiantes	56
2.2.3.1	Effets des régimes hypercholestérolémiantes dans les modèles non Alzheimer :	56
2.2.3.2	Effets des régimes hypercholestérolémiantes dans les modèles de la maladie d'Alzheimer	57
2.2.4	Modulation de l'expression du gène <i>ABCA1</i>	57
2.2.5	Modulation de l'expression des récepteurs LDLR :	59
2.3	Influence du cholestérol cérébral dans la maladie d'Alzheimer.	59
2.3.1	Taux de cholestérol dans le cerveau :	59
2.3.2	Modulation de l'expression d'Acyl-coenzyme A: cholesterol Acyltransferase (ACAT):.....	60
2.3.3	Expression et modulation de la cholestérol-24-hydroxylase	60
2.3.3.1	Expression chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer	60
2.3.3.2	Polymorphismes du gène <i>CYP46A1</i> :	61
2.3.3.3	Effet protecteur de la surexpression du gène <i>CYP46A1</i> dans les modèles murins de la maladie d'Alzheimer	63
3	Conclusion :	64
C.	Conséquences d'une accumulation intracellulaire de cholestérol dans la cellule :.....	66
1	Conséquences d'un excès de cholestérol au niveau des membranes et des radeaux lipidiques.....	66
1.1	Le cholestérol module la transduction de voies de signalisation :	66
1.2	Le cholestérol module l'endocytose	68
1.3	Le cholestérol module le métabolisme de la protéine APP :	70
1.3.1	Trafic et métabolisme de la protéine APP :	70
1.3.2	Le cholestérol module le métabolisme de la protéine APP.....	72
1.4	Modulation de l'homéostasie du calcium.....	73
1.5	Cholestérol membranaire et métabolisme des sphingolipides :	73
1.5.1	Les différents types de sphingolipides :	74
1.5.2	Sphingolipides et processus apoptotiques.	74
1.5.3	Augmentation des céramides et du cholestérol dans les régions de stress oxydatif.	75
1.5.4	Influence du cholestérol sur le métabolisme des sphingolipides :	75
1.5.4.1	Trafic et métabolisme des sphingolipides.	75
1.5.4.2	Le cholestérol pourrait moduler le trafic des sphingolipides.	79
1.5.5	Conclusion :	79
2	Processus toxique induit par l'accumulation de cholestérol : réponse UPR	80
2.1	Cholestérol : inducteur d'une réponse UPR	80
2.2	Réponse adaptative :	82
2.2.1	Voie induite par la protéine PERK.....	82
2.2.1.1	Mécanisme d'activation de la protéine PERK :	82
2.2.1.2	Conséquences de l'activation de la protéine PERK	84
2.2.2	Voie dépendante de la protéine ATF-6.....	85
2.2.2.1	Mécanismes d'activation de protéine ATF6 :	85
2.2.2.2	Conséquences de l'activation de la voie.	87
2.2.3	La voie de signalisation dépendante de la protéine IRE1 :	89
2.2.3.1	Mécanisme d'activation de la protéine IRE1 :	89
2.2.3.2	Induction transcriptionnelle de gènes codant l'expression de protéines du complexe ERAD : 89	
2.2.3.3	Induction de la synthèse de phosphatidylcholine :	89
2.3	Engagement vers la voie apoptotique :	92
2.3.1	Voie induite par la protéine CHOP :	94

2.3.1.1	Lien entre l'accumulation de cholestérol et la protéine CHOP	94
2.3.1.2	Mécanisme d'activation induit par la protéine CHOP	94
2.3.1.3	Conséquences de l'activation de la protéine CHOP	96
2.3.2	Voie IRE1/TRAF2 :	98
2.3.3	Activation de la caspase 12 :	99
2.3.3.1	Lien entre stress du réticulum endoplasmique et caspase 12 :	99
2.3.3.2	Voie d'activation de la caspase 12 :	100
2.3.4	Phase d'exécution de l'apoptose :	101
2.4	Conclusion : l'excès de cholestérol induit une réponse UPR.	102
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES		104

TABLE DES FIGURES :

FIGURE 1: LE MÉTABOLISME DU CHOLESTÉROL CÉRÉBRAL À L'ÂGE ADULTE	23
FIGURE 2: VOIE DE SYNTHÈSE DU CHOLESTÉROL	25
FIGURE 3 : RÉGULATION DE LA SYNTHÈSE DU CHOLESTÉROL	27
FIGURE 4 : COMPARTIMENTALISATION INTRACELLULAIRE DU CHOLESTÉROL	30
FIGURE 5 : EXPRESSION DE LA CHOLESTÉROL-24-HYDROXYLASE.	33
FIGURE 6 : LES DEUX VOIES DE CLIVAGE DE LA PROTÉINE APP	43
FIGURE 7 : PLAQUES SÉNILES.....	46
FIGURE 8 : LES CORPS NEUROFIBRILLAIRES.....	47
FIGURE 9: LES DIFFÉRENTES RÉGIONS DE L'HIPPOCAMPE.	48
FIGURE 10: DES MODULATIONS DU CONTENU EN CHOLESTÉROL TOTAL ET MEMBRANAIRE :	58
FIGURE 11 : CONSÉQUENCES D'UNE ACCUMULATION DE CHOLESTÉROL DANS LA CELLULE :	65
FIGURE 12 : LA SURCHARGE EN CHOLESTÉROL EST ASSOCIÉE À UNE AUGMENTATION DE LA TAILLE DES ENDOSOMES PRÉCOCES :	67
FIGURE 13 : ELARGISSEMENT DES ENDOSOMES PRÉCOCES DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER	67
FIGURE 14 : LE CHOLESTÉROL MODULE LE TRAFIC ET LE MÉTABOLISME DE LA PROTÉINE APP :	69
FIGURE 15 : LE CONTENU EN CHOLESTÉROL MEMBRANAIRE MODULE LA LOCALISATION RE DE LA PROTÉINE APP.	71
FIGURE 16: MÉTABOLISME DES SPHINGOMYÉLINES.	76
FIGURE 17: INFLUENCE DU CHOLESTEROL SUR LE MÉTABOLISME DES SPHINGOMYÉLINES.	78
FIGURE 18 : RÉPONSE UPR ADAPTATIVE.....	81
FIGURE 19: VOIE ACTIVÉE PAR LA PROTÉINE PERK DANS LA RÉPONSE UPR.....	83
FIGURE 20: VOIE ACTIVÉE PAR LA PROTÉINE ATF6 DANS LA RÉPONSE UPR :	86
FIGURE 21: VOIE ACTIVÉE PAR LA PROTÉINE IRE1 LORS DE LA RÉPONSE UPR.....	88
FIGURE 22: SYNTHÈSE DES PHOSPHATIDYLCHOLINES	90
FIGURE 23 : ENGAGEMENT VERS UN PROCESSUS APOPTOTIQUE.	92
FIGURE 24: LES TROIS BRANCHES DE LA RÉPONSE UPR INDUIT LA TRANSCRIPTION DU GÈNE DDIT3 CODANT LA PROTÉINE CHOP.	93
FIGURE 25: VOIE D'ACTIVATION LA PROTÉINE CHOP.....	95
FIGURE 26: VOIE D'ACTIVATION DU COMPLEXE IRE1/TRAF2.....	97
FIGURE 27: VOIE D'ACTIVATION DE LA CASPASE 12.....	100
FIGURE 28: VOIE APOPTOTIQUES LORS DU STRESS DU RÉTICULUM ENDOPLASMIQUE.	101

PRODUCTION SCIENTIFIQUE :

Publications en soumission :

♣ **Excess of brain cholesterol sows the seeds of neuronal death and Alzheimer disease**

Fathia Djelti¹, Eloise Hudry¹, Jérôme Braudeau¹, Jennifer Varin², Sophie Ayciriex³, Nicolas Auzeil³, Catherine Marquer⁴, Ivan Bièche², Marie Claude Potier⁴, Charles Duyckaerts⁴, Michel Vidaud², Olivier Laprévote³, Marc Dhenain⁵, Patrick Aubourg¹, Nathalie Cartier^{1*} (en soumission a Science).

♣ **Neuronal cholesterol overload induced by Cyp46A1 gene silencing triggers neurotoxicity and lipid homeostasis perturbation**

Fathia Djelti^{2*}, Sophie Ayciriex^{1*}, Mathieu Gaudin^{1,3}, Anne Regazzetti¹, Jennifer Varin², Ivan Bieche², Eloise Hudry⁶, Delphine Dargère¹, Patrick Aubourg², Nicolas Auzeil¹, Nathalie Cartier^{2,4}, Olivier Laprévote^{1,5} (en soumission a Journal of lipid Research)

Présentation aux congrès internationaux et nationaux :

♣ Congrès de la Société Française de Thérapie Génique et Cellulaire

Du 21 au 22 mars 2013 à Paris.

Lauréate du prix poster

Poster *In vivo* inhibition of cholesterol-24-hydroxylase induces a sequential and progressive neuronal loss in hippocampus of C57BL/6 mice.

♣ *Congrès européen de thérapie cellulaire et génique (ESGCT)*

Du 25 au 29 octobre 2012 à Versailles, Paris

Poster *In vivo* inhibition of cholesterol-24-hydroxylase induces a sequential and progressive neuronal loss in hippocampus of C57BL/6 mice.

♣ *Congrès de la British Society for Gene Therapy*

Du 9 au 10 mars 2012 à Londres (Royaume Uni)

Poster : *In vivo* inhibition of cholesterol-24-hydroxylase induces a sequential and progressive neuronal loss in hippocampus of C57BL/6 mice.

♣ *Journées Scientifiques de l'IMTCE*

Le 27 mai 2011 à Paris (France)

Lauréate du prix poster catégorie biologie cellulaire

Poster : *In vivo* inhibition of cholesterol-24-hydroxylase induces a sequential and progressive neuronal loss in hippocampus of C57BL/6 mice: evaluation of lipid profiles.

♣ *Congrès jeunes chercheurs YLRS-Institut Pasteur.*

Du 9 au 11 mai 2011 à Paris (France)

Poster : *In vivo* inhibition of cholesterol-24-hydroxylase induces a sequential and progressive neuronal loss in hippocampus of C57BL/6 mice.

♣ *Congrès de la Société Française de Thérapie Génique et Cellulaire*

Du 6 au 8 juin 2011 à Nantes.

Poster *In vivo* inhibition of cholesterol-24-hydroxylase induces a sequential and progressive neuronal loss in hippocampus of C57BL/6 mice.

♣ *Congrès de la Société Française de Thérapie Génique et Cellulaire*

Du 13 au 15 juin 2010 à Paris.

Poster *In vivo* inhibition of cholesterol-24-hydroxylase induces a sequential and progressive neuronal loss in hippocampus of C57BL/6 mice.

Présentation et articles avant la thèse :

♣ *Journées des jeunes scientifiques (RJS) de l'Institut Universitaire d'Hématologie*

Mars 2009 à Paris.

Laureate

Présentation orale: Dynamique de l'expression de BSP1 dans les thymocytes humains

♣ **Article: *Frequent PTEN genomic alterations and up-regulated PI3K pathway in basal-like breast cancer*** . Bérengère Marty, Eléonore Gravier, Guillem Rigau, Anne Vincent-Salomon, **Fathia Djelti**, Audrey Tourdès, Virginie Maire, Pierre Gestraud, Mr. Philippe Hupé, Emmanuel Barillot, Ingrid Lebigot, Francisco Cruzalegui, Gordon Tucker, Marc-Henri Stern, Jean-Paul Thiery, John Hickman and Thierry Dubois .Breast Cancer Research 2008 Vol 10 R101

♣ **Article: *Regulatory and effector T cell activation levels are prime determinants of in immune regulation***. Fabienne Billiard, Elena Litvinova, David Saadoun, **Fathia Djelti**, David Klatzmann, José L Cohen, Gilles Marodon et Benoit Salomon. Journal of Immunology 2006 Vol 177 :2167-2174.

♣ **Article: *In vitro selection of functional CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells specific for pancreatic islet antigen***. Sylvain Fisson, **Fathia Djelti**, Aurélie Trénado, Fabienne Billiard, Roland Liblau, David Klatzmann, José L. Cohen et Benoit Salomon. European Journal of Immunology 2006 Vol 36-817-827

Résumé

Le vieillissement normal s'accompagne d'une diminution du contenu du cholestérol cérébral. Au contraire, une accumulation de cholestérol est associée aux processus toxiques dans plusieurs pathologies dégénératives (maladie d'Huntington, maladie de Parkinson, épilepsie, maladie de Niemann Pick de type C, maladie d'Alzheimer). De plus, les parallèles étroits existent entre la physiopathologie moléculaire de la maladie d'Alzheimer et celle de la maladie de Niemann Pick de type C, maladie de l'homéostasie du cholestérol. Ainsi on retrouve dans ces deux pathologies une hyperphosphorylation de la protéine Tau, associée à une augmentation des endosomes élargis et à la production de peptides A β . L'ensemble de ces éléments évoque le rôle potentiel de la surcharge en cholestérol cérébral comme facteur favorisant le développement de la maladie d'Alzheimer.

L'objectif de mon travail de doctorat a été de déterminer si une surcharge en cholestérol *in vivo* dans les neurones de l'hippocampe, région précocement touchée par la maladie d'Alzheimer, pouvait être à l'origine de processus neurotoxiques et de modifications biochimiques et neuropathologiques proches de ceux qui sont observés dans cette pathologie. La quasi-totalité du cholestérol cérébral est synthétisée *in situ*, la barrière hémato-encéphalique ne permettant qu'un apport minime du cholestérol périphérique. L'excès de cholestérol est exporté de la circulation sanguine sous la forme du 24-hydroxycholestérol, un métabolite produit exclusivement dans les neurones par la cholestérol-24-hydroxylase codée par le gène *Cyp46a1*. **La surcharge en cholestérol a été induite *in vivo* par inhibition de la cholestérol-24-hydroxylase, dans l'hippocampe par une stratégie d'ARN interférence délivré par une injection stéréotaxique d'un vecteur AAV5.** Nous avons étudié, d'une part la capacité d'une accumulation de cholestérol à induire chez la souris normale, un phénotype clinique et neuropathologique proche de la maladie d'Alzheimer et d'autre part si cette même accumulation de cholestérol neuronal pouvait aggraver ou compléter le phénotype Alzheimer d'un modèle murin de la maladie, la souris APP23.

L'injection du vecteur AAV5-shCYP46A1 dans la *stratum lacunosum moleculare* de l'hippocampe conduit à une inhibition significative de l'expression du gène *Cyp46a1*, associée à une diminution de la concentration du 24-hydroxycholestérol et une augmentation du contenu en cholestérol dans les neurones de l'hippocampe, 3 semaines après l'injection. En réponse à cet excès de cholestérol, des mécanismes régulateurs permettent de diminuer, d'une part l'import et d'augmenter l'export du cholestérol de la cellule et d'autre part d'augmenter le contenu en phosphatidylcholine afin de rétablir un ratio phospholipide/cholestérol physiologique. Cependant, l'accumulation majeure de cholestérol intracellulaire conduit, 3 semaines après l'injection, à une activation de la réponse UPR (*Unfolded Protein Response* ou stress du réticulum endoplasmique) caractérisée par l'expression des gènes codant les facteurs XBP1s, ATF6, GRP78 associée à celles des protéines PERK phosphorylée, CHOP et caspase 12, entraînant l'activation des caspases 9 et 3. Elle est associée à la phosphorylation des protéines GSK3 β (Tyr216) et Tau (Thr231). En parallèle, l'augmentation du cholestérol induit, 3 semaines après l'injection, une augmentation de l'expression de la protéine Rab5 (marqueur des endosomes précoces) et une relocalisation de la protéine APP dans les fractions de radeaux lipidiques associées à l'activation de la voie amyloïdogénique (production des fragments β -CTF et des peptides A β 42). L'étude lipidomique met en évidence, 4 semaines après l'injection, une augmentation du contenu en céramide à longues chaînes et à une augmentation des gangliosides. Tous ces éléments aboutissent à un processus de perte neuronale associée à un recrutement des astrocytes dès la quatrième semaine après l'injection. Ce processus s'accompagne d'un dérèglement des rythmes theta en rythme beta associée à une hyperactivité, 8 semaines après injection et aboutit à une atrophie de l'hippocampe et des déficits mnésiques 12 semaines après l'injection.

Dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (APP23), l'inhibition de l'expression du gène *Cyp46a1* conduit à une accumulation de cholestérol, une aggravation majeure du phénotype, avec une augmentation de la production de peptides A β . Ces souris développent en plus, une réponse UPR, expriment la protéine Tau phosphorylée aboutissant à une accélération de l'apparition de la perte neuronale suggérant que le cholestérol serait un facteur aggravant de la pathologie amyloïde.

Ainsi, l'accumulation de cholestérol induite par l'inhibition de l'expression du gène *Cyp46a1* entraîne une cascade d'événements caractérisée par l'activation de la réponse UPR, la production de peptides A β , la phosphorylation de la protéine Tau, une augmentation des céramides à longues chaînes, aboutissant à un processus de perte neuronale associé un dérèglement des rythmes theta en rythme beta, à des défauts mnésiques et une atrophie hippocampique.

Ces résultats suggèrent un lien causal *in vivo* entre l'accumulation du cholestérol dans les neurones et les processus neurodégénératifs, en particulier, la maladie d'Alzheimer.

Key words: CYP46A1, cholesterol-24-hydroxylase, accumulation de cholesterol neuronale, réponse UPR, céramide, atrophie de l'hippocampe, Alzheimer's disease

Abstract

An increasing number of arguments suggest a close and complex link between cholesterol metabolism and neurodegenerative diseases, particularly with Alzheimer's disease. Normal ageing is associated with a decrease of brain cholesterol content. Conversely, accumulation of brain cholesterol is associated with several neurodegenerative diseases (Huntington disease, Parkinson disease, epilepsy, Niemann Pick C disease, Alzheimer's disease). Moreover, close connections exist between molecular physiopathology of AD and that of Niemann Pick, a disease of cholesterol homeostasis. Altogether, these results suggest that cholesterol overload might play a role, as an initiating factor for the development of AD.

In the brain, cholesterol metabolism is tightly controlled. In adults, cholesterol is mainly synthesized by astrocytes, then shuttles to neurons where it is used. All cholesterol excess must be eliminated. Cholesterol cannot cross freely the blood-brain-barrier. To be metabolized, brain cholesterol must be converted in 24-hydroxy-cholesterol by the cholesterol-24 hydroxylase enzyme, coded by *CYP46A1* gene.

The objective of my PhD project was to determine if cholesterol accumulation *in vivo* in hippocampal neurons, a region early involved in AD pathology, could trigger neurotoxic processes with biochemical and neuropathological modifications close to what is observed in AD. Cholesterol overload *in vivo* was induced by inhibiting cholesterol 24-hydroxylase enzyme activity, using an RNA interference strategy. Stereotactic injection of an AAV5- shCYP46A1 vector in the *stratum lacunosum moleculare* of the hippocampus led to significant and rapid (as soon as 3 weeks after injection) inhibition of the *Cyp46a1* gene in the hippocampus with an absence of RNA interference off-target effect. This inhibition was associated with a decrease of 24-hydroxycholesterol content and an increase of the cholesterol content. In response to this cholesterol excess, cell control mechanisms were initiated leading to decrease import and increase export of cholesterol, accompanied with an increase of phosphatidylcholine content to restore a physiological ratio of phospholipide/cholesterol. However, major accumulation of cholesterol led to neuronal death with activation of caspases 9 et 3, suggesting an apoptotic process. The cholesterol overload drives to an endoplasmic reticulum stress, with activation of the unfolded protein response (UPR) and expression of spliced XBP1, ATF6, GRP78, phosphorylated PERK, CHOP and caspase 12. These modifications were associated with phosphorylation of GSK3 β (Tyr 216) and tau (Thr 231) proteins. In parallel, cholesterol accumulation led to increased expression of Rab5 (early endosome marker) and relocalization of APP in rafts domains associated to activation of amyloid pathway (production of β -CTF fragments and A β 42 peptides). Lipidomic analysis showed an increase of ceramides and gangliosides content. All these modifications were associated with neuronal death 4 weeks after injection and astrogliosis, leading to an EEG theta rhythm accelerated to beta frequencies, memory deficits and hippocampal atrophy.

In a mouse model of Alzheimer disease, the APP23 mouse, cholesterol accumulation led to major aggravation of the phenotype, with increased production of A β peptides, occurring of tau phosphorylation and UPR response, leading to accelerated neuronal death.

Altogether, these results suggest a direct link between cholesterol accumulation in the brain and Alzheimer's disease. Brain cholesterol accumulation could seed the sows to the development of Alzheimer's pathology. Reducing cerebral cholesterol could thus be a relevant therapeutic strategy to prevent the development, or at least slow down the evolution of the pathology in Alzheimer's disease.

Key words: CYP46A1, cholesterol-24-hydroxylase, neuronal cholesterol overload, UPR response, ceramide, hippocampal atrophy Alzheimer's disease

Abbreviations

A

AARE : Amino Acid Response Element	APP : Protéine précurseur amyloïde ou Amyloid Precursor protein
AAV : Adenovirus Associated Virus.	ARNdb : ARN double brin
Aβ : amyloid beta	ARNi : ARN interference
ABC : ATP Binding Protein	ASK1 : Apoptosis Signal Regulating Kinase 1
AICD : APP Intracellular Domain	ATF : Activating Transcription Factor
APH1 : Anterior Pharynx Defective 1	
ApoE : Apolipoprotéine E	

B/C

BACE : β-site APP Cleaving Enzyme	CK : Choline Kinase
Bcl-2 : B-cell Lymphoma 2	CPT : CDP-choline: 1,2-diacylglycerol cholinephosphotransferase
BMP : bismonoacylglycérophosphate	CT : CTP :phosphocholine CitidylTransferase
CA : Corne d'Ammon	CTP : citidyl triphosphate
CBA : Chicken β actin	
CHOP : C/EBP HOmologous Protein	

D/E

DAG : Diacylglycérol	EPT : CDP-éthanolamine: 1,2-diacylglycerol éthanolaminephosphotransferase
DG : dentate gyrus	ERAD : ER associated degradation
EDEM : ER-Degradation-Enhancing-α-Mannidose-like protein	ERO1α : Endoplasmic Reticulum Oxydase 1
EEA1 : Early Endosome Antigen 1	ERSE : Endoplasmic Reticulum Stress response
eIF2α : eucaryotic Initiation Factor 2 alpha	ET : CTP :phosphoéthanolamine Citidyl Transferase
EK : Ethanolamine kinase	
EOAD : Early Onset Alzheimer Disease	

G/H/I

GD : Gyrus Denté	INSIG : INSulin Induced Gene
GRP78 : Glucose Regulated Protein 78	IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
HDL : High Density Lipoparticules	IP3R : récepteurs Inositol Triphosphate
HMGCR : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A reductase.	IPP isopentenyl 1 phosphate
IDE : Insulin Degrading Enzyme ou enzyme de dégradation de l'insuline	IRE1 : Inositol REquired protein 1

L/M/N

LBPA : acide lysobiphosphatidique	LXR : <i>Liver X receptor</i>
LDL : <i>Low Density Lipoparticules</i>	MbCD : Methyl β cyclodextrine
LDLR : <i>Low Density Lipoparticules Receptor</i>	MCI : <i>Minimal Cognitive Impairment</i>
LOAD : <i>Late Onset Alzheimer Disease</i>	NPC1 : Niemann Pick C1
LRE : <i>LXR Response Element</i>	NPC2 : Niemann Pick C2

P/Q/R

PC : phosphatidylcholine	PS : Phosphatidylsérine
PCR : <i>Polymerase Chain Reaction</i>	PSEN1 : Preseniline 1
PE : Phosphatidyléthanolamine	PSEN2 : Preseniline 2
PEMT : PhosphoEthanolamine N Méthyl Transférase	qPCR : PCR quantitative en temps réel.
PEN2 : <i>Presenilin Enhancer 2</i>	RE : Réticulum endoplasmique
PERK : <i>Protein kinase RNA like ER Kinase</i>	RISC : <i>RNAi Induced Silencing Complex</i>

S

SCAP : <i>SREBP Cleavage Activating Protein</i>	SPT : Serine Palmitoyl Transferase
shARN : <i>short hairpin ARN</i>	SORLA : Sortiline A
siARN : <i>small interfering ARN</i>	SR : <i>stratum radiatum</i>
SLM : <i>stratum lacunosum molecular</i>	SRE : <i>Sterol Regulatory Element</i>
SO : <i>stratum Oriens</i>	SREBP : <i>Sterol Regulatory Element Binding Protein</i>
SM : sphingomyéline	
SNP : Polymorphisme nucleotide simple ou <i>Single Nucelotide Polymorphism</i>	

T/U/V/X

TAG : Triacylglycérol
TRAF2 : <i>Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor 2</i>
UPR : <i>Unfolded Protein Response</i>
VLDL : <i>Very Low Density Lipoparticules</i>
XBP : <i>X-box Binding Protein 1</i>

INTRODUCTION :

INTRODUCTION :

A. Métabolisme du cholestérol cérébral

1 Métabolisme du cholestérol :

Le cholestérol présent dans **le système périphérique**, provient à la fois de l'**apport alimentaire** et d'une **néosynthèse** principalement hépatique.

Dans le sérum, le cholestérol couplé à des lipoprotéines est ensuite transporté aux différents organes. Les lipoprotéines sont des macromolécules sphériques de composition et de tailles variables. Elles peuvent être classées en fonction de leur taille : haute densité (*High Density Lipoparticules* ou HDL), faible densité (*Low Density Lipoparticules* ou LDL) ou de très faible densité (*Very Low Density Lipoparticules* ou VLDL). Elles sont constituées de protéines, les apolipoprotéines et de lipides (cholestérol non estérifié, cholestérol estérifié et phospholipides).

Le système nerveux central, qui représente 2% de la masse corporelle, contient **25%** du cholestérol total de l'organisme. Le cholestérol cérébral comporte 2 pools : d'une part, les membranes plasmiques des cellules gliales et des neurones et d'autre part les gaines de myéline. Du fait de l'isolement du cerveau vis-à-vis du système périphérique par la barrière hémato-encéphalique et des propriétés hydrophobes du cholestérol, le cerveau est **un système cloisonné pour les échanges de cholestérol entre le système périphérique et central**. En effet, aucun apport de lipoparticules LDL ou HDL depuis le plasma vers le cerveau n'a pas pu être mis en évidence (Turley et al., 1996). De plus, si l'utilisation d'une alimentation enrichie en cholestérol contenant du deutérium induit une incorporation importante dans le foie, les poumons ou le sang, l'incorporation est minime dans le cerveau (moins de 1%) (Bjorkhem, 2006). Ces données montrent **qu'en situation physiologique** (impermeabilité de la barrière hémato-encéphalique), le cholestérol cérébral ne provient pas d'un apport périphérique mais quasi-exclusivement d'une **production *in situ* dans le cerveau** (Dietschy and Turley, 2004).

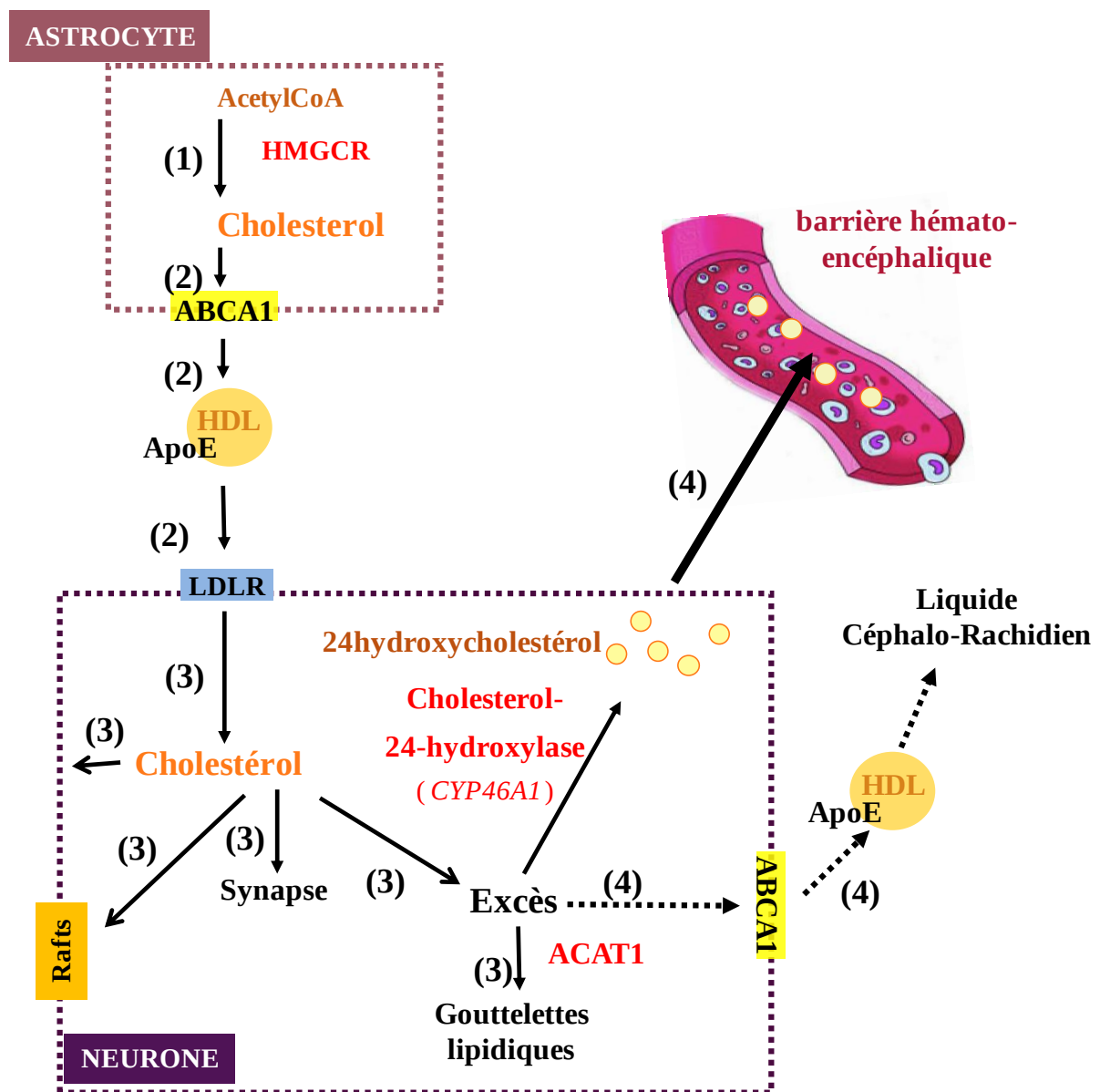


Figure 1: Le métabolisme du cholestérol cérébral à l'âge adulte

Il peut être subdivisé en 4 axes :

L'axe (1) est la synthèse de cholestérol par les astrocytes.

L'axe (2) constitue les échanges intercellulaires de cholestérol entre les astrocytes et les neurones.

L'axe (3) récapitule le trafic et la compartimentalisation du cholestérol dans le neurone.

L'axe (4) représente les voies d'efflux du cholestérol hors du cerveau.

HMGCR : 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA réductase; **ABCA1** : *ATP Binding Cassette A1*; **ApoE** : apolipoprotéine E; **HDL**, High Density Lipoprotéine, **LDL** low density Lipoprotéine, **ACAT**: acetyl-coA cholesterol acyltransférase.

Pendant le développement du système nerveux central, les neurones sont capables de produire le cholestérol nécessaire à la croissance des neurites et la synaptogenèse. De même, les oligodendrocytes synthétisent une grande quantité de cholestérol pour constituer les gaines de myéline (Dietschy and Turley, 2004).

A la naissance, les neurones continuent à produire du cholestérol mais perdent peu à peu cette capacité. Ils deviennent alors **dépendants du cholestérol produit par les cellules gliales** et notamment par **les astrocytes** (Dietschy and Turley, 2004). Le taux de cholestérol produit dans le cerveau de souris passe de 0,28 mg/jour pendant les premières semaines (afin d'achever la myélinisation) à un taux de 0,035mg/jour à l'âge adulte (Quan et al., 2003).

Le métabolisme du cholestérol cérébral, à l'âge adulte, comprend quatre axes (Figure 1) :

- La synthèse du cholestérol par les astrocytes
- Les échanges intercellulaires du cholestérol des astrocytes vers les neurones
- L'utilisation du cholestérol dans les neurones
- L'efflux du cholestérol permettant l'élimination de l'excès du cholestérol hors du cerveau.

1.1 Synthèse du cholestérol :

1.1.1 Etapes de synthèse

Dans le cerveau à l'âge adulte, le cholestérol est produit dans les astrocytes au cours de la **voie du mévalonate**. Cette voie permet, à partir de l'acétyl-coA, **la synthèse du cholestérol mais également des dérivés isoprénoïdes, de l'ubiquinone et du dolichol**.

Cette voie peut être subdivisée en 5 phases (Figure 2) :

➤ **Phase 1 : Formation du mévalonate**

Le mévalonate est formé à partir de trois molécules d'acétyl-coA. Il s'agit d'une série de trois réactions se déroulant au niveau du réticulum endoplasmique. Une des enzymes impliquées dans cette phase est **l'HMG coA-réductase (HMGCR)**, enzyme limitante de la synthèse du cholestérol.

➤ **Phase 2 : formation d'unités isopréniques ou isopentenyl pyrophosphate (IPP)**

La phosphorylation suivie d'une décarboxylation du mévalonate conduit à la formation d'unités isopréniques (IPP) ou isopentényl pyrophosphate.

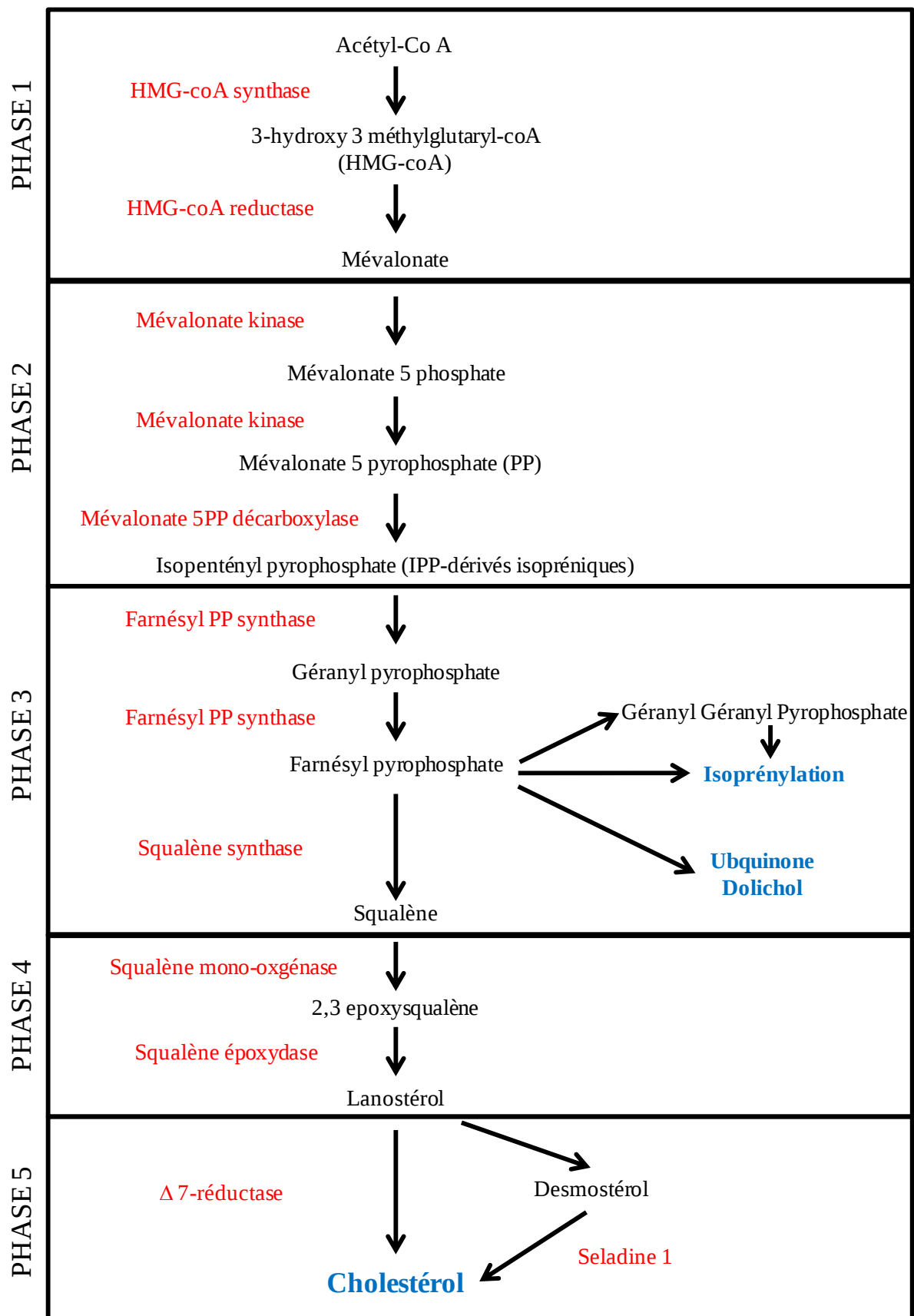


Figure 2: Voie de synthèse du cholestérol

➤ **Phase 3 : Formation de dérivés isoprénoïdes de l'ubiquinone, du dolichol et condensation de six dérivés en squalène.**

La formation des **dérivés isoprénoïdes**, farnésyl-pyrophosphate (FPP) et Géranyl-Pyrophosphate provient d'une isomérisation des dérivés isopréniques. Ces composés isoprénoïdes permettent la formation de plusieurs dérivés :

♣ **le Géranyl Géranyl-Pyrophosphate** impliqués dans l'isoprénylation ou modification post-traductionnelle des petites protéines G permettant leur ancrage à la membrane et leur implication dans les voies de signalisation.

♣ **l'ubiquinone et le dolichol**

♣ **le squalène** synthétisé à partir de deux composés de farnésyl-pyrophosphate par la squalène synthase.

➤ **Phase 4 : Cyclisation du squalène en lanostérol :**

La structure du squalène est linéaire. Après une oxydation par la squalène mono-oxygénase, le squalène subit une cyclisation par la fixation de groupements méthyles, du carbone C14 sur le carbone C13 ou du carbone C8 sur le carbone C12, formant **le lanostérol**.

➤ **Phase 5 : Synthèse du cholestérol (C27) :**

A partir du lanostérol, deux voies sont possibles pour aboutir à la production de cholestérol. Le lanostérol peut être directement réduit au niveau de la double liaison du carbone 7 par la $\Delta 7$ réductase. La seconde voie fait intervenir la formation **du desmostérol** qui sera ensuite réduit au niveau de la double liaison du carbone 24 par la séladine 1.

1.1.2 Mécanismes de la régulation de la synthèse du cholestérol

Le métabolisme du cholestérol dans la cellule est très finement régulé par la concentration en cholestérol de la cellule. La conversion de l'HMG-coA en mévalonate, catalysée par l'enzyme HMGCR, constitue l'étape limitante de la synthèse de cholestérol. L'activité de cette enzyme est régulée par des mécanismes transcriptionnels et traductionnels complexes (figure3).

1.1.2.1 Régulation transcriptionnelle de la synthèse du cholestérol

La régulation transcriptionnelle de la synthèse du cholestérol dépend du facteur de transcription **SREBP** (*Sterol Regulatory Element Binding Protein*). La famille de ce facteur comprend 3 membres : SREBP1a, SREBP1c et SREBP2. Ces protéines, à deux domaines transmembranaires, résident sous forme de précurseurs dans la membrane du réticulum endoplasmique (Horton et al., 2002). Elles sont associées via leur extrémité C-terminale, à la protéine SCAP (*SREBP Cleavage Activating Protein*), laquelle possède un domaine senseur du cholestérol (figure 3A).

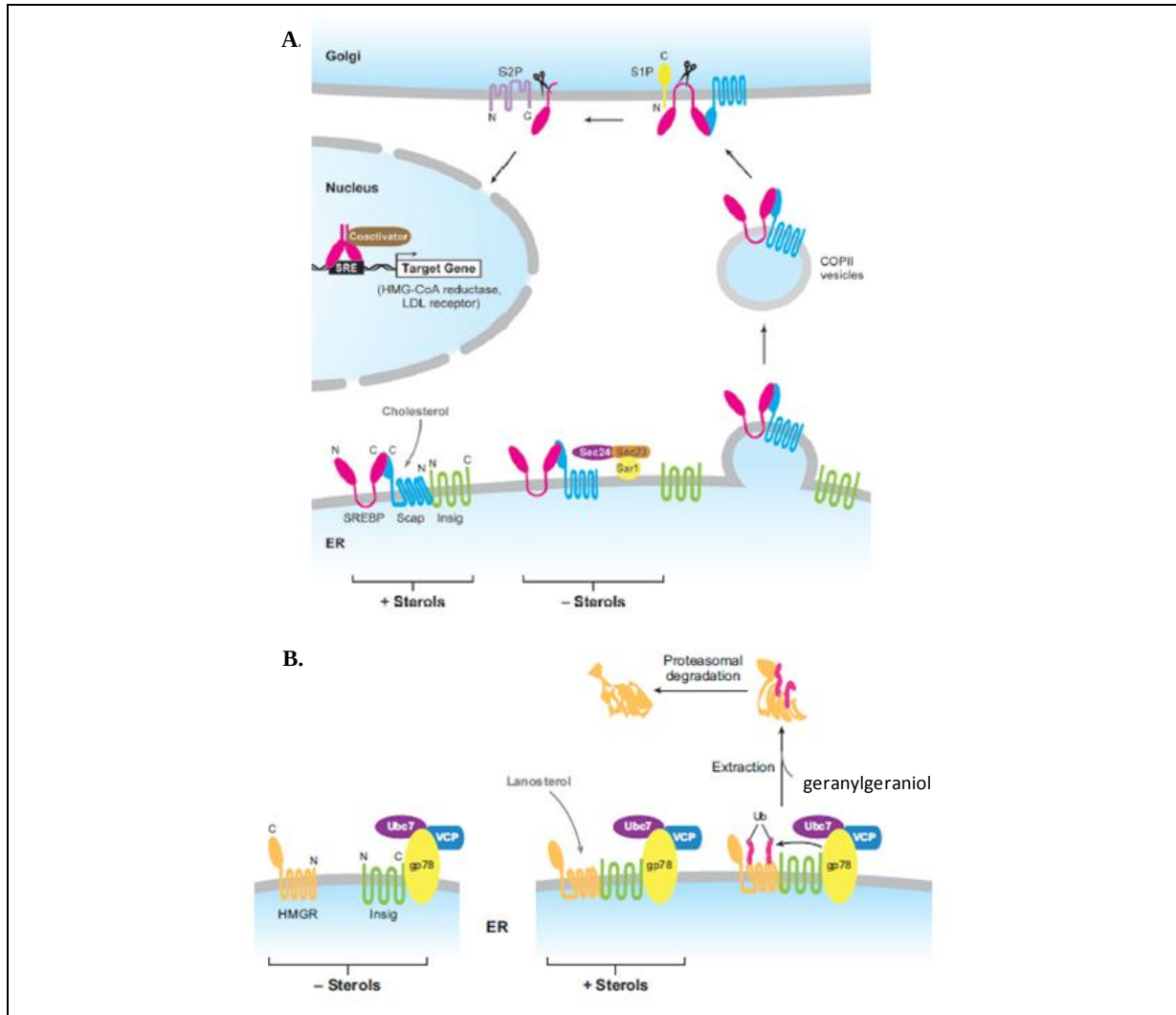


Figure 3 : Régulation de la synthèse du cholestérol.

A. Régulation transcriptionnelle de la protéine HMGCR

En absence de stérols, le complexe protéique SREBP/SCAP migre vers l'appareil de Golgi où la protéine SREBP est clivée pour aboutir à la formation d'un facteur de transcription. Ce facteur induit l'expression d'HMGCR et donc la néosynthèse du cholestérol. En présence de stérols, le complexe protéique SREBP/SCAP est retenu dans le réticulum endoplasmique par une liaison avec la protéine Insig et n'est, par conséquent, plus capable d'induire l'expression d'HMGCR.

B. Régulation traductionnelle de la protéine HMGCR

En absence de stérols, la protéine HMGCR et la protéine Insig ne sont pas associées, laissant libre la protéine HMGCR qui induit la synthèse de cholestérol. En présence de lanostérol, la protéine Insig se lie à la protéine HMGCR, ce qui induit via un complexe protéique, l'ubiquitination et la dégradation de la protéine HMGCR via le protéasome. Le composé géranylgeraniol contribuerait à la dernière étape de cette dégradation.

(D'après l'article de (Espenshade and Hughes, 2007).

En absence de stérols, la protéine SCAP permet le transfert de SREBP du réticulum endoplasmique vers l'appareil de golgi par des vésicules COPII composées des protéines Sec23/24 et d'une petite GTPase Sar1. La protéine SREBP est ensuite clivée en deux au niveau de la séquence consensus RXXL de la boucle luminale par la protéase sérine 1 phosphate (S1P) puis au niveau d'un pont leucine-cystéine situé dans la partie N-terminale par la protéase sérine 1 phosphate (S2P) (figure 3A). Ces deux clivages permettent la libération du facteur de transcription SREBP de l'appareil de Golgi. **Ce facteur peut migrer dans le noyau, se fixer aux séquences ADN de type SRE** (*Sterol Regulatory Response*) et induire, en présence de co-activateurs, la transcription **du gène HMGCR** mais aussi du gène **LDLR** (les récepteurs de lipoprotéines - (figure 3A)).

En présence de stérols, le cholestérol se fixe sur la protéine SCAP changeant sa conformation et induisant la liaison du complexe SCAP-SREBP avec la protéine INSIG (*INSulin Induced Gene*). Cette liaison **empêche** l'insertion du complexe dans les vésicules COPII, son transfert vers l'appareil de Golgi, **l'activation du facteur de transcription SREBP**, de l'expression de ses gènes cibles (HMGCR) et ainsi la synthèse de cholestérol ((figure 3A)-(Goldstein et al., 2006, Espenshade and Hughes, 2007)).

1.1.2.2 Régulation traductionnelle de la synthèse de cholestérol

Dans le même temps, un autre mécanisme induit par les stérols et les dérivés isoprénoïdes est **la dégradation de la protéine HMGCR par une voie dépendante de l'ubiquitination et du protéasome** (Figure 3B). L'enzyme HMGCR est une protéine du réticulum endoplasmique à 8 domaines hélicoïdaux transmembranaires. Son domaine N-terminal permet l'insertion de la protéine dans le réticulum endoplasmique. Ses domaines transmembranaires 2 à 6 constituent **le domaine senseur des stérols** et son domaine C-terminal comprend l'activité catalytique de l'enzyme.

La **demi-vie** de la protéine HMGCR est modulée par **l'absence ou la présence de cholestérol**.

En absence de stérols, la demi-vie de la protéine HMGCR est de **12h**. Elle est capable de fixer l'acétyl coA pour induire la synthèse de cholestérol.

En présence d'une accumulation de stérols et de dérivés isoprénoïdes, la demi vie de la protéine HMGCR est **inférieure à une heure**. Sa dégradation est plus fortement induite par le précurseur lanostérol que par le cholestérol (Song et al., 2005a). L'accumulation de lanostérol induit la fixation de la protéine INSIG sur la séquence YIYF présente dans le deuxième domaine transmembranaire de la protéine HMGCR. D'autre part, la protéine INSIG forme un complexe avec la protéine gp78 (E3 ubiquitine ligase), la protéine Ubc7 (enzyme conjugué à l'ubiquitine) et la protéine VCP (une ATPase impliquée dans la délivrance de la protéine HMGCR ubiquitynilée aux protéasomes) (Song et al., 2005b). La formation de ce complexe permet **l'ubiquitination** sur les lysines 89 et 248 de la protéine HMGCR.

Cependant, l'ubiquitination et la dégradation de la protéine HMGCR induites par le lanostérol n'est complète et rapide qu'en présence de dérivés isoprénoïdes et notamment du composé géranylgéraniol (Sever et al., 2003, Song et al., 2005b). Ce dérivé pourrait agir dans une étape de post-ubiquitination puisqu'il n'est pas suffisant pour induire à lui seul l'ubiquitination. Le géranylgéraniol serait impliqué dans l'isoprenylation de protéines nécessaires pour l'extraction et la dégradation de la protéine HMGCR (Sever et al., 2003).

1.2 Echanges intercellulaires du cholestérol des astrocytes vers les neurones :

Les lipoparticules contenant des apolipoprotéines et du cholestérol (sous forme non estérifiée ou estérifiée) sont transportés des astrocytes vers les neurones. Comme dans le sérum, ces lipoparticules sont classées en fonction de leur taille : haute densité (« High Density Lipoparticules » ou HDL), faible densité (« Low Density Lipoparticules » ou LDL) ou de très faible densité (« Very Low Density Lipoparticules » ou VLDL). L'apolipoprotéine majoritairement impliquée dans le cerveau et dans les échanges entre les astrocytes et les neurones est l'**ApoE**, qui représente le principal facteur de risque génétique de la maladie d'Alzheimer (Mauch et al., 2001).

1.3 Utilisation du cholestérol dans les neurones.

➤ Endocytose des lipoparticules ApoE-cholestérol :

Les lipoparticules ApoE-cholestérol produites par les astrocytes se fixent sur les récepteurs de la famille des **récepteurs LDL** (*LDL Receptor* ou LDLR), localisés au niveau des domaines membranaires riches en clathrines (Pearse, 1976). Elles sont ensuite internalisées dans **des vésicules de clathrine** entraînant **les protéines, les lipoparticules ApoE-cholestérol et la membrane plasmique** (Brown and Goldstein, 1986). Ce mécanisme d'endocytose est dépendant de plusieurs facteurs : **le contenu en cholestérol/phosphoinositides** dans le feuillet interne de la membrane plasmique, les protéines impliquées dans l'endocytose et les forces exercées par le cytosquelette. La fission de la vésicule et de la membrane plasmique est induite par la dynamine 2. (Figure 4-étape 1).

➤ Recyclage des vésicules :

Les vésicules peuvent être **directement recyclées à la membrane plasmique** sans entrer dans les compartiments d'endosomes tardifs/lysosomes. La voie de recyclage des lipides, très rapide (figure 4-étape 2) concerne les molécules de cholestérol non estérifié et de sphingomyéline issue des membranes endocytées en même temps que les lipoparticules (Hornick et al., 1997, Hao and Maxfield, 2000). La voie de recyclage des protéines, un peu plus lente concerne les récepteurs LDLR, les protéines de clathrines, la protéine ApoE, etc... (Figure 4-étape 2 bis-(Hao and Maxfield, 2000)).

Si elles ne sont pas recyclées, les vésicules sont des endosomes précoces exprimant les protéines Rab5 et EEA1 (*Early Endosome Antigen*) (Simonsen et al., 1998) (Figure 4-étape 3).

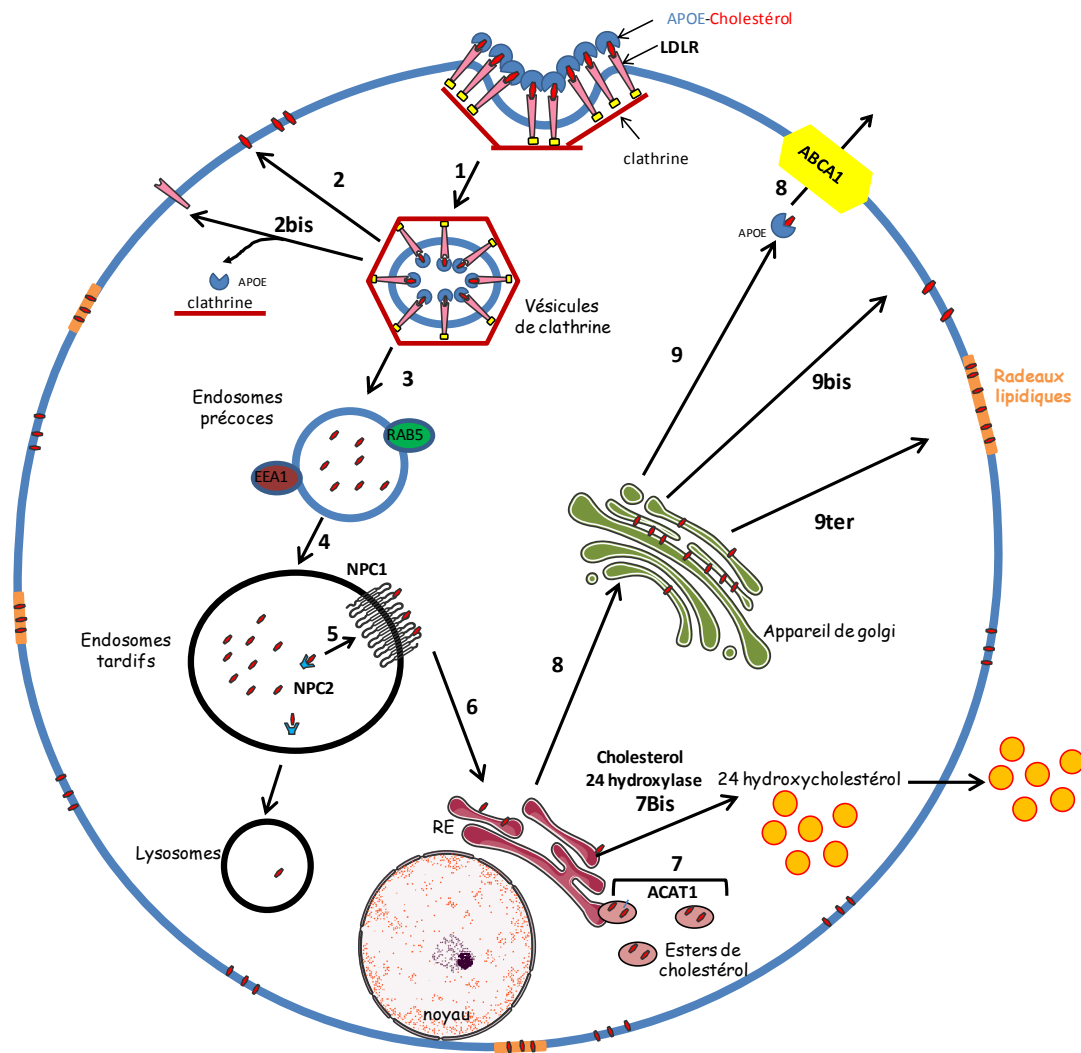


Figure 4 : Compartimentalisation intracellulaire du cholestérol

1 : Internalisation des lipoparticules ApoE-cholestérol après fixation sur le récepteur LDLR via des vésicules de clathrine

2 et 2 bis : Recyclage des lipides (2) et des protéines (2Bis)

3 et 4 Engagement dans le compartiment endosomal/lysosomal

5 : Export du cholestérol des endosomes tardifs avant le stade lysosome

6 : Export du cholestérol vers le réticulum endoplasmique (RE)

7 Stockage sous forme d'esters de cholestérol

7bis : Conversion en 24 hydroxycholestérol

8 : Transfert vers l'appareil de Golgi (7)

9 : Efflux hors de la cellule (ABCA1/ApoE)

9bis et 9 ter : Transfert à la membrane ou aux radeaux lipidiques

ABCA1 : ATP Binding Cassette A1; **ApoE** : apolipoprotéine E, **LDLR** récepteurs Lipoprotéine, **ACAT**: acetyl-coA cholesterol acyltransferase, NPC: protein Niemann Pick de type C

➤ Endosomes précoces/Endosomes tardifs/Lysosomes :

Les endosomes précoces fusionnent pour former les corps multivésiculaires ou endosomes tardifs puis les lysosomes (Figure 4-étape 4).

Les lysosomes sont constitués d'un environnement pauvre en cholestérol (Liscum and Munn, 1999), suggérant que la plus grande partie du cholestérol **est exportée hors des endosomes tardifs avant de former les lysosomes** (Figure 4-étape 5). Les protéines Niemann Pick 1 (**NPC1**) et Niemann Pick 2 (**NPC2**) sont cruciales pour l'export du cholestérol hors du compartiment endosomal. La déficience de la protéine NPC1 ou de la protéine NPC2 conduit à une accumulation de cholestérol non estérifié dans les endosomes tardifs et à la maladie de Niemann Pick de type C (Sleat et al., 2004) (maladie autosomale récessive associée à une surcharge lipidique fatale). L'étude de souris dont le gène *Npc1* et/ou *Npc2* est invalidé, suggère que les protéines NPC1 et NPC2 participent à différentes étapes de la même voie et que l'une ne compense pas l'autre (Sleat et al., 2004). La protéine NPC2 est une petite protéine soluble qui fonctionne *in vitro* comme une protéine de transfert du cholestérol. Ce transfert est favorisé par un pH acide et la présence d'acide lysobiphosphatidique (LBPA) (Cheruku et al., 2006). En revanche, la protéine NPC1 est une grande glycoprotéine avec 13 boucles transmembranaires dont cinq constituent le domaine de liaison au stérol similaire à celui des protéines SCAP (Davies and Ioannou, 2000). Le mécanisme d'export du cholestérol des endosomes tardifs n'est pas encore complètement élucidé. Une des hypothèses possibles est que la protéine NPC2 transférerait le cholestérol directement des membranes (mobilisé par LBPA) ou après hydrolyse des esters à la protéine NPC1, laquelle induirait son export hors du lysosome (Cheruku et al., 2006).

A partir des endosomes tardifs, le cholestérol va se répartir dans différents compartiments intracellulaires : le réticulum endoplasmique, l'appareil de golgi et la membrane plasmique (notamment dans les radeaux lipidiques).

➤ Stockage au niveau du réticulum endoplasmique :

Un tiers du cholestérol des endosomes tardifs est directement transféré au réticulum endoplasmique (Schroeder et al., 2001). Cependant, le réticulum endoplasmique étant **un organe pauvre en cholestérol** (0.5% à 1% du contenu de cholestérol cellulaire) (Lange et al., 1999), l'excès de cholestérol du réticulum endoplasmique est stocké sous forme de micro-gouttelettes lipidiques intracytoplasmiques ou esters de cholestérol (Figure 4-étape 7). Cette conversion est catalysée par l'enzyme acyl-CoA acyltransférase (**ACAT**) dont deux isoformes ont été décrites. La distribution de l'ACAT1 est ubiquitaire alors que l'ACAT2 est exclusivement exprimée au niveau du foie et de l'intestin (Joyce et al., 1999). Ces esters de cholestérol présentent moins de toxicité que le cholestérol libre (Tabas, 2002). **L'estérification pourrait jouerait donc un rôle protecteur pour réguler l'excès de cholestérol.**

➤ **Répartition dans l'appareil de golgi et au niveau de la membrane/radeaux lipidiques :**

Deux tiers du cholestérol **exporté des endosomes tardifs** est transféré à l'appareil de golgi puis à la membrane plasmique (Liscum and Munn, 1999).

La membrane plasmique représente **60 à 80% du cholestérol cellulaire** (Liscum and Munn, 1999). Elle est constituée d'une bicouche lipidique. Le feuillet exoplasmique (externe) contient essentiellement de la sphingomyéline et des phosphatidylcholines tandis que le feuillet cytoplasmique est enrichi en glycérolipides : phosphatidylsérine et phosphatidyléthanolamine. **Le cholestérol, présent au niveau des deux feuillets, contribue à la stabilisation de la membrane** (Ikonen, 2008). **Le maintien du ratio phospholipides/cholestérol dans la membrane est important pour la fonction cellulaire.** En se liant aux autres lipides, le cholestérol augmente la cohésion de la membrane et diminue sa fluidité et sa perméabilité. Plusieurs phases peuvent être distinguées: des domaines **non ordonnées** et des domaines membranaires rigides ou **radeaux lipidiques**. Les radeaux lipidiques sont de **petits microdomaines dynamiques** (de 100nm) enrichis en **cholestérol** (Simons and Toomre, 2000). Historiquement, ces structures ont été définies par leur faible densité (en gradient de sucrose) et leur insolubilité en triton X100 (détergents) à 4°C. Ces propriétés leur ont conféré le nom de DRM (*Detergent Resistant Membrane*). De plus, ils contiennent **peu de protéines** (Simons and Toomre, 2000). Les radeaux lipidiques, formés de dimères de flotilline 1, sont dispersés au long de la membrane plasmique. Ils constituent des plateformes de signalisation initiée par des facteurs neurotrophiques, des récepteurs aux neurotransmetteurs (NMDA, AMPA, glutamate, etc...). Les radeaux lipidiques jouent également un rôle essentiel dans la maladie d'Alzheimer en favorisant la production des peptides Aβ.

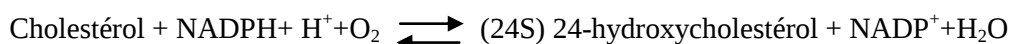
1.4 Export du cholestérol hors du cerveau : cholestérol-24-hydroxylase et APOE

Malgré la présence d'une régulation fine de la synthèse et des échanges intercellulaires du cholestérol, l'excès de cholestérol doit continuellement être exporté pour maintenir une concentration constante de cholestérol dans le cerveau. De par son caractère hydrophobe, le cholestérol est incapable de traverser la barrière hémato-encéphalique. L'efflux de cholestérol est réalisée selon deux voies :

- **Une voie majoritaire induite par la cholestérol-24-hydroxylase**
- **Une voie minoritaire mettant en jeu l'ApoE.**

1.4.1 Cholesterol-24-hydroxylase codée par le gène *CYP46A1*

La voie majeure d'efflux du cholestérol hors du cerveau est sa conversion en 24-hydroxycholestérol, composé plus hydrophile capable de traverser librement la barrière hémato-encéphalique pour être ensuite dégradé dans le foie. Cette réaction est catalysée par **la cholestérol-24-hydroxylase codée par le gène *CYP46A1*** selon la réaction suivante :



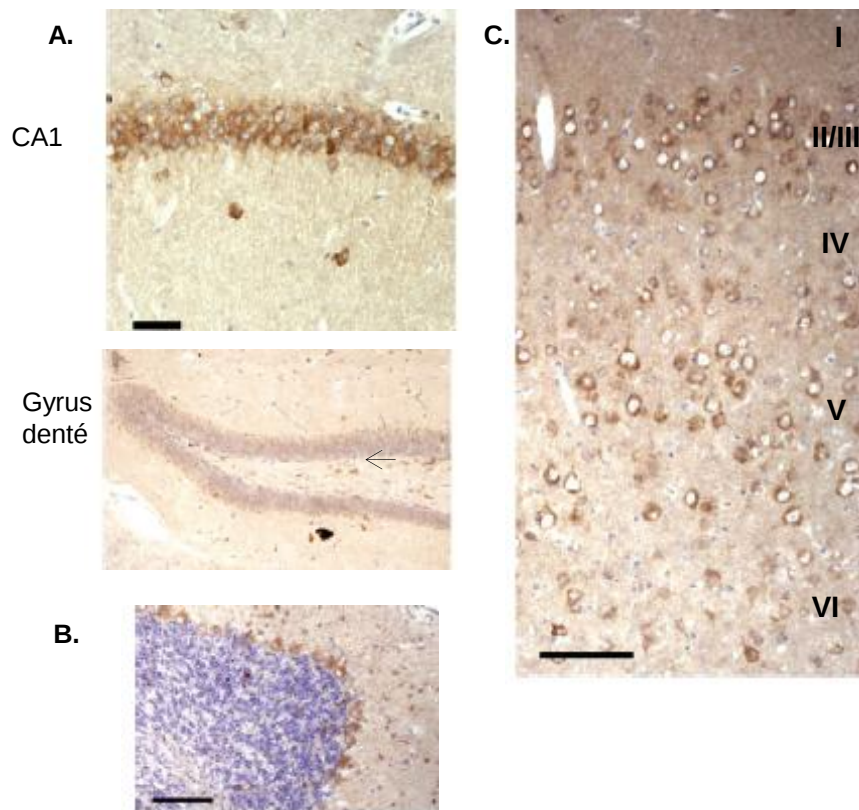


Figure 5 : Expression de la cholestérol-24-hydroxylase.

Expression de la cholestérol-24-hydroxylase, après un immunomarquage avec un anticorps monoclonal de la région CA1, du gyrus denté (A), du cervelet (B) et du cortex (C). Sur l'image A du bas, la flèche noire représente les cellules du hilus. Barre d'échelle : 100µM.

Figure inspirée de (Ramirez et al, 2008)

Chez l'homme, le cholestérol cérébral est converti en 24-hydroxycholestérol (0,02% par heure). Ce taux correspond approximativement à la moitié de la synthèse de cholestérol indiquant que la cholestérol-24-hydroxylase est responsable de la moitié du renouvellement du cholestérol (Russell et al., 2009). Le flux du 24-hydroxycholestérol vers la circulation périphérique est de 6 à 7 mg/24 heures.

Chez la souris, l'expression du transcrit du gène *Cyp46a1* est **majoritairement** retrouvée dans **le cerveau** et très minoritairement dans le foie et les testicules. Au niveau protéique, la concentration de l'enzyme cholestérol 24-hydroxylase hépatique est 100 fois plus faible que dans le cerveau et n'est pas détectée dans les testicules. Chez l'homme, seul le cerveau présente une expression de la cholestérol-24-hydroxylase (Lund et al, 1999).

De plus, l'expression de la cholestérol-24-hydroxylase, dans le cerveau **augmente en fonction de l'âge** (Lund et al., 1999, Martin et al., 2011). Au niveau cérébral, l'expression est restreinte aux neurones et n'est pas présente dans les cellules gliales. La cholestérol-24-hydroxylase est localisée au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique dans le corps cellulaire et les dendrites des neurones, et est absente des axones (Ramirez et al, 2008).

Cette enzyme est fortement exprimée dans l'hippocampe, le cortex cérébral et le cervelet. Dans l'hippocampe, **les neurones pyramidaux de la région CA1, CA3 (corps cellulaires et dendrites), ainsi que les interneurons de la couche « stratum radiatum » expriment la cholestérol-24-hydroxylase.** Une faible expression est retrouvée dans les cellules granulaires du gyrus denté et une expression plus forte est détectée dans les interneurons du hilus (figure 5A (Ramirez et al, 2008 ; Lund et al 1999)). Dans le cervelet, peu de transcrits sont détectés. Néanmoins, une expression dans les corps cellulaires et les dendrites des cellules de purkinje ainsi que dans la couche de noyaux profonds du cervelet (figure 5B). Dans le cortex cérébral, une forte expression est mise en évidence au niveau des corps cellulaires des neurones pyramidaux des couches II,III,V et VI. En revanche, les neurones pyramidaux de la couche IV ont une expression plus faible (figure 5C- (Ramirez et al, 2008)).

Enfin, la cholestérol-24-hydroxylase est fortement exprimée dans les neurones de la couche des cellules ganglionnaires et plus faiblement dans les cellules de l'épithélium pigmenté rétinien (Ramirez et al, 2008).

L'expression sélective de la cholestérol-24-hydroxylase dans les neurones permet l'élimination de l'excès de cholestérol dans les neurones.

1.4.2 ApoE

Une seconde voie, mineure, implique le flux de lipoparticules via le liquide céphalorachidien pour rejoindre la circulation sanguine. Dans ce cas, le cholestérol est excrété des neurones sous forme de complexe associé aux lipoprotéines (**ApoE**) par les récepteurs de la famille ABC (« ATP Binding Cassette »). Ce flux est de faible amplitude (1mg/24heures).

2 Métabolisme du cholestérol et maladies neurodégénératives

Le cholestérol, lipide de la famille des stérols, joue un rôle essentiel dans la structure et la fonction des membranes cellulaires. **Des modifications de l'homéostasie du cholestérol au niveau périphérique et/ou cérébral ont été mises en évidence au cours du vieillissement et dans de nombreuses maladies neurodégénératives, dont la maladie d'Alzheimer.**

2.1 Métabolisme du cholestérol et vieillissement

Le vieillissement est défini par différents changements physiques, sociaux et cognitifs, lesquels peuvent différer de manière inter et intra-individuelle. Des modifications du métabolisme cérébral du cholestérol sont mises en évidence au cours du vieillissement.

➤ Diminution de la concentration du cholestérol membranaire :

Au cours du vieillissement, chez un individu sain, des travaux montrent, que même si la synthèse de cholestérol diminue, le niveau de cholestérol cérébral n'est pas modifié en fonction de l'âge (Soderberg et al., 1990, Thelen et al., 2006). En revanche, **une diminution du contenu en cholestérol membranaire** est mise en évidence dans les synaptosomes de souris âgées de 24 mois (Sodero et al., 2011). L'équipe de Martin et al montre que les cultures de neurones primaires de l'hippocampe présentent un phénotype dit « jeunes » au stade 10 DIV (division ou jours de culture) et dit « vieux » au stade 26 DIV (Martin et al., 2011). Les neurones 26 DIV présentent une diminution du cholestérol membranaire (Martin et al., 2011). Dans ces neurones 26 DIV, **la perte de cholestérol membranaire est nécessaire pour la mise en place d'un processus de survie**. Un enrichissement en cholestérol dans les membranes de neurones 10 DIV conduit à des processus apoptotiques (Martin et al., 2011).

➤ Augmentation de l'expression de la cholestérol-24-hydroxylase :

En parallèle de cette diminution de cholestérol, l'expression du gène *Cyp46a1* codant la cholestérol-24-hydroxylase augmente en fonction de l'âge (Lund et al., 1999, Martin et al., 2011), suggérant que cette augmentation entraînerait la perte de cholestérol. L'expression du gène *Cyp46a1* augmente également avec la différenciation des neurones en culture (de 10 DIV à 26 DIV). La diminution de l'expression du gène *Cyp46a1* par une stratégie d'ARN interférence dans les neurones primaires 17 DIV induit une forte induction d'un processus apoptotique. En revanche, cette diminution n'a pas d'effet dans les neurones 10 DIV (dit « jeunes »). Ces résultats suggèrent que l'augmentation de l'expression de la cholestérol-24-hydroxylase dans les neurones dits « vieux » conduirait à une perte du contenu en cholestérol membranaire favorisant la survie des neurones (Martin et al., 2011).

2.2 Maladies neurodégénératives et métabolisme du cholestérol

2.2.1 Maladie d'Huntington

La maladie d'Huntington est une maladie neurodégénérative, autosomale dominante qui se caractérise par une dégénérescence progressive provoquant d'importants troubles cognitifs et moteurs. Cette maladie est induite par une augmentation, supérieure à la normale, de répétition de trois acides nucléiques (CAG) au sein du gène de la huntingtine. En situation physiologique, le triplet CAG se répète 20 fois. La maladie d'Huntington se développe à partir de 40 répétitions.

Plusieurs études mettent en évidence des changements de l'homéostasie du cholestérol dans la maladie d'Huntington.

Le contenu en précurseurs du cholestérol est significativement diminué dans le plasma de patients atteints de la maladie d'Huntington (Leoni et al., 2011). De plus, une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse de cholestérol est mise en évidence dans le striatum et le cortex de patients atteints de la maladie d'Huntington, de modèles murins ou de cellules striatales surexprimant la protéine huntingtine mutée (Sipione et al., 2002, Valenza et al., 2005). **La biosynthèse du cholestérol est donc diminuée dans la maladie d'Huntington.**

Une augmentation du contenu en cholestérol est néanmoins observée dans les neurones de cerveau de patients ou des modèles murins de la maladie d'Huntington. Le cholestérol **s'accumule au niveau des membranes plasmiques** et notamment des radeaux lipidiques. Cette surcharge membranaire **contribue au processus d'excitotoxicité** induit par les récepteurs aux glutamates (NMDA). Les membranes de neurones striaux surexprimant la protéine huntingtine mutée expriment une plus grande quantité de récepteurs NMDA (del Toro et al., 2010). L'augmentation du cholestérol pourrait donc contribuer aux processus neurotoxiques dans la maladie d'Huntington.

2.2.2 Maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est un processus neurodégénératif, progressif caractérisé par des troubles essentiellement moteur. Elle est due à l'agrégation de l' α -synucléine dans les corps de Lewis et à la perte des neurones dopaminergiques de la substance grise (Gazewood et al., 2013).

Le rôle du cholestérol dans cette maladie reste controversé. Un index élevé de masse corporelle et un régime enrichi en cholestérol sont associés à un risque plus important de développer la maladie de Parkinson (Hu et al., 2006, Hu et al., 2008). Au niveau moléculaire, le contenu en cholestérol semble moduler l'agrégation de l' α -synucléine, laquelle contient deux domaines de liaison au cholestérol (Fantini et al., 2011). L' α -synucléine et le cholestérol interagissent notamment au niveau des radeaux lipidiques (domaines membranaires riches en cholestérol) (Fortin et al., 2004).

L'utilisation du composé méthyl- β -cyclodextrin (déplétion du cholestérol membranaire) ou de statines (inhibiteurs de la synthèse de cholestérol) induit *in vitro* une délocalisation hors des radeaux lipidiques et une diminution de l'agrégation de l' α -synucléine. L'ajout de cholestérol reverse le processus (Bar-On et al., 2006, Bar-On et al., 2008). De même, l'administration du composé méthyl- β -cyclodextrin *in vivo* entraîne une réduction de l'accumulation de l' α -synucléine, associée à une diminution du processus neurodégénératif (Bar-On et al., 2006).

2.2.3 Maladie de Niemann Pick de type C

La maladie de Niemann Pick de type C est une maladie lysosomale complexe avec une hépatosplénomégalie et une atteinte neuronale progressive. Une des caractéristiques de cette pathologie est une perte massive des neurones (en particulier des cellules de Purkinje du cervelet).

Cette maladie est induite par des mutations des protéines NPC1 et NPC2, impliquées dans l'export du cholestérol hors des endosomes tardifs/lysosomes (organites pauvres en cholestérol). Dans les cellules déficientes pour les protéines NPC1 et NPC2, le cholestérol est séquestré dans les endosomes tardifs/lysosomes entraînant des processus toxiques. L'expression des protéines NPC1 et NPC2 est ubiquitaire. Une délétion ciblée dans les neurones du gène NPC1 chez la souris, conduit à des altérations comportementales, des caractéristiques neuropathologiques. A l'inverse, une délétion ciblée dans les astrocytes n'a pas d'effet sur le phénotype (Yu et al., 2011). Ces données suggèrent que la déficience neuronale de la protéine NPC1, et donc l'accumulation de cholestérol dans les neurones est suffisante pour induire ces modifications.

2.2.4 Cholestérol, épilepsie et excitabilité neuronale

2.2.4.1 Généralités sur l'épilepsie

L'épilepsie est caractérisée par **la répétition de décharges électriques paroxystiques, spontanées, synchrones et transitoires au niveau d'un groupe significatif de neurones**. Elle résulte d'une **hyperexcitabilité** des neurones conduisant à des décharges anormales de potentiel d'action de tout ou d'une partie des neurones (synchronisation d'un réseau de neurones). L'information provenant des neurones est transmise sous forme d'une série de potentiel d'action, se propageant le long de l'axone jusque la synapse. A ce niveau, il entraîne la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique qui vont ensuite en se fixant sur leur récepteur, induire des potentiels post-synaptiques excitateur ou des potentiels post-synaptiques inhibiteurs.

Un **déséquilibre entre l'activité du système inhibiteur GABAergique** (le neurotransmetteur GABA se fixe sur les récepteurs GABA impliqués dans cette réponse) et **celui du système excitateur glutamatergique** (le neurotransmetteur Glutamate se fixe sur les récepteurs NMDA, AMPA et Kainate impliqués dans cette réponse) est à l'origine de l'hyperexcitabilité neuronale. Une autre cause de cette hyperexcitation peut être **un processus de perte neuronale**.

Le diagnostic d'épilepsie repose principalement sur l'électroencéphalogramme (ou EEG). L'EEG **permet l'enregistrement avec une grande précision temporelle (milliseconde par milliseconde) de l'activité cérébrale en mesurant une différence de potentiel électrique entre des électrodes extracellulaires**. Elle évalue les émissions de courant survenant au cours de l'activité synaptique des dendrites de nombreux neurones. Si les neurones déchargent à intervalles irréguliers, la somme de l'activité détectée par l'électrode sera de faible amplitude. En revanche, si les neurones déchargent de manière quasi spontanée, le signal EEG en résultant sera de plus haute amplitude.

La variation des enregistrements EEG au cours du temps donne **une vision globale des rythmes cérébraux et des anomalies d'activité et de synchronie**. Les décharges synchronisées des neurones entraînent, à la fois une activité inter-ictale et une activité de type « crises » (Wong et al., 1986).

➤ Rythmes physiologiques :

Les rythmes cérébraux enregistrés en EEG varient et sont **corrélés à des comportements** (état de vigilance, exploration versus sommeil). Elles sont classifiées selon leur fréquence.

Activité rythmique	Fréquence	Etat de vigilance
Alpha	8-12 Hz	Sommeil lent
Delta	< 4 Hz	Sommeil lent
Theta	4-8 Hz	Exploration, sommeil paradoxal
Beta	13-30 Hz	Activité intense, anxiété
Gamma	30-60 Hz	Perception, liaison

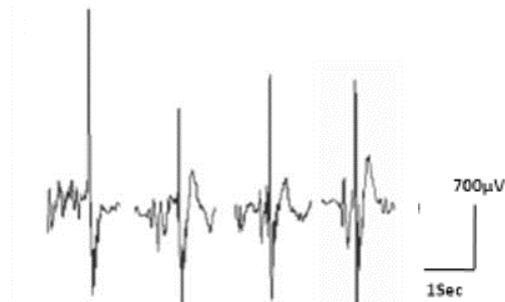
➤ Anomalies :

Les activités de décharges se distinguent suivant qu'elles surviennent au cours ou en dehors d'une crise.

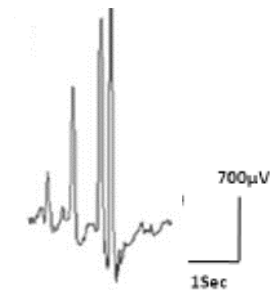
➤ Anomalies intercritiques:

Les anomalies interictales sont des activités, survenant **en dehors des crises d'épilepsies**, caractérisées par un potentiel électrique **plus ample** que l'activité normale du tracé EEG, avec une **apparition et une disparition brusque et une durée brève (20-500 ms)**. Ces anomalies ou grapho-éléments présentent différents aspects :

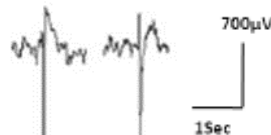
♣ **Pointes** : Ondes très aigües, distinctes de l'activité de base par son amplitude et sa durée de 20 à 70 ms.



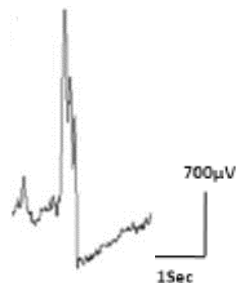
♣ **Polypointes** : Les pointes arrivent en bouffées de 5 à 6 pointes



♣ **Pointe-ondes** : Pointe suivie d'une onde lente de même polarité de durée comprise entre 300-400 ms. Elles peuvent apparaître sous forme de décharges rythmiques.



♣ **Pointe lentes** : Pointe de grande amplitude d'une durée de 20 à 70 ms, présentant un aspect moins aigüe (plus arrondie) qu'une pointe. Elles surviennent de manière pseudopériodique avec un intervalle de temps de 0.5 à 3 secondes.



➤ Anomalies de type critiques ou crises :

Une décharge de type critique se caractérise en EEG par une activité rythmique dont la durée est **plus longue** que les décharges inter-critiques, typiquement de plusieurs secondes et qui consiste en **une progression de composantes stéréotypées**. Elle peut s'accompagner ou non de mouvements convulsifs.

2.2.4.2 Lien entre le cholestérol et les processus épileptiques :

Les processus épileptiques et l'hyperexcitabilité neuronale sont associés à des modifications du contenu cérébral de cholestérol.

En effet, l'épilepsie induit par l'implantation de cobalt (métaux aux propriétés épileptogènes) au niveau du cortex de rat, s'accompagne d'une augmentation du contenu en cholestérol estérifié dans l'aire cérébrale lésée mais aussi adjacente à la lésion. Cette accumulation de cholestérol n'est pas retrouvée en présence de métaux non épileptogènes (cuivre et acier). Dans ce modèle, **les modifications du contenu en cholestérol précèdent les premières décharges épileptiques** (Bierkamper and Cenedella, 1978). De plus, une injection intra-hippocampique de **kainate**, un analogue du glutamate, entraîne un processus de perte neuronale associé à un syndrome épileptique. Elle entraîne également une **accumulation de cholestérol** dans les neurones de l'hippocampe et de produits toxiques dérivés de l'oxydation du cholestérol (le 7-kétocholestérol) (Ong et al., 2003, He et al., 2006, Kim et al., 2010, Ong et al., 2010). L'administration de statines dans ce modèle diminue la perte neuronale et le contenu en cholestérol (He et al., 2006). De même, le syndrome épileptique induit par l'administration de **picROTOXINE** (inhibiteurs des récepteurs canaux ionique du GABA) est associée à une augmentation de **25% du contenu cérébral de cholestérol** (notamment au niveau des membranes) (Acharya and Katyare, 2006). La maladie de Niemann Pick de type C, présentant une accumulation de cholestérol, peut être associée à la survenue de syndromes épileptiques (Sevin et al., 2007). De plus, l'administration du composé U18666A (molécules mimant la perte de fonction de la protéine NPC inhibant ainsi la sortie du cholestérol hors des lysosomes) permet d'établir un modèle chronique d'épilepsie (Cenedella, 2009).

Toutes ces études établissent un lien entre les syndromes épileptiques et une accumulation cérébral de cholestérol. Toutefois, la notion d'augmentation du cholestérol comme cause ou conséquence d'une hyperexcitabilité et d'un syndrome épileptique n'est pas clarifiée.

Dans toutes ces maladies, une accumulation de cholestérol est associée à des processus neurodégénératifs. Une autre maladie sur laquelle nous nous intéressons au laboratoire, la maladie d'Alzheimer est associé à des anomalies du métabolisme du cholestérol.

B.Maladie d'Alzheimer et métabolisme du cholestérol :

1 Généralités

1.1 Définition

La maladie d'Alzheimer résulte d'un processus neurodégénératif incurable du tissu cérébral. Elle induit une perte progressive des fonctions cognitives et notamment de la mémoire. L'âge moyen de découverte de cette maladie est 65 ans. Elle touche environ 25 millions de personnes dans le monde et concernera, environ 80 millions de personnes d'ici 2040. Cette maladie est devenue un problème de santé publique majeur.

Cette maladie fut décrite pour la première fois, par le Dr Alois Alzheimer chez Mme Auguste D, âgée de 51 ans qui présentait des altérations cognitives et des hallucinations (Maurer et al., 1997). En 1906, l'analyse post-mortem de son cerveau permit de mettre en évidence deux lésions caractéristiques : les plaques séniles, extracellulaires et les corps neurofibrillaires, intracellulaires (Maurer et al., 1997).

1.2 Deux lésions neuropathologiques :

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par deux lésions neuropathologiques :

- **les plaques séniles ou amyloïdes**, extracellulaires issues de l'agrégation des peptides A β
- **les corps neurofibrillaires** intracellulaires provenant d'une accumulation de fibrilles de protéines tau hyperphosphorylées.

1.2.1 La composante amyloïde

La composante amyloïde de la maladie d'Alzheimer résulte d'un déséquilibre de la voie non amyloïdogénique vers la voie amyloïdogénique, entraînant une accumulation de peptides A β s'agréant pour former des plaques amyloïdes extracellulaires.

1.2.1.1 Voie non amyloïdogénique et amyloïdogénique

a. La protéine précurseur amyloïde ou APP :

La protéine précurseur amyloïde (APP), glycoprotéine transmembranaire de type I, appartient à une famille composée de trois membres qui inclut deux paralogues chez les eucaryotes, nommés APLP1 et APLP2 (*Amyloid Precursor Like Protein*).

Suite à un épissage alternatif, le pré-ARNm APP peut donner trois isoformes, variant par leur nombre d'acides aminés; APP₆₉₅, APP₇₅₁ et APP₇₇₀, dont les ratios varient en fonction du tissu. L'isoforme APP₆₉₅ est majoritaire dans le cerveau.

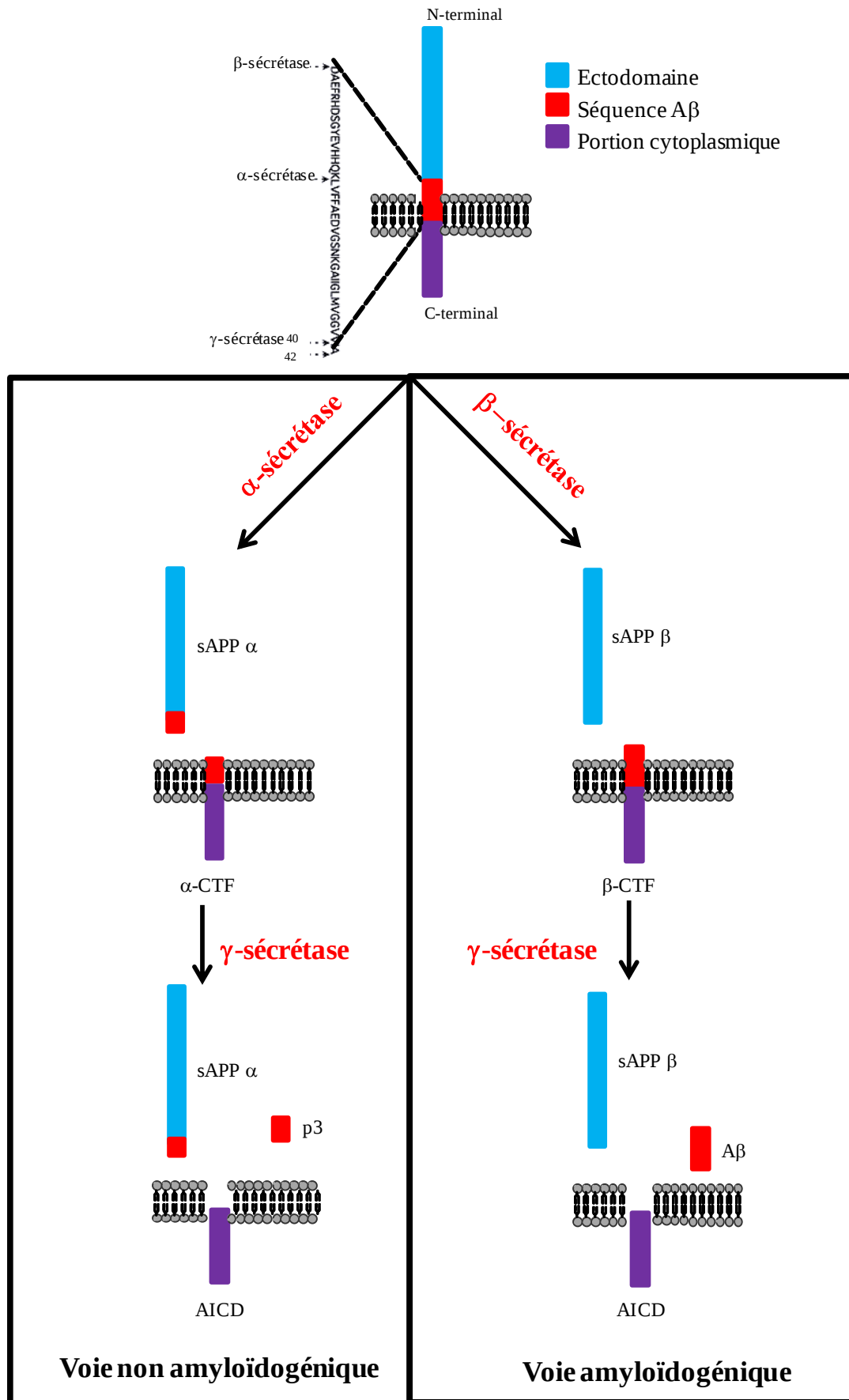


Figure 6 : Les deux voies de clivage de la protéine APP

La protéine APP peut être clivée selon deux voies (figure 6) :

➤ La **voie non amyloïdogénique**, physiologiquement majoritaire et neuroprotectrice dont la première étape est catalysée par l' **α -sécrétase**.

➤ La **voie amyloïdogénique**, minoritaire et délétère dont la première étape est catalysée par la **β -sécrétase**.

Ces deux voies nécessitent une étape de protéolyse finale induite par le **complexe γ -sécrétase**.

b. Clivage de la protéine APP

➤ **Le clivage par l' α -sécrétase : 1^{ère} étape de la voie non amyloïdogénique (figure 6) :**

La **voie non amyloïdogénique physiologiquement majoritaire** met en jeu dans sa première étape, un clivage par l' **α -sécrétase**, (entre les résidus 613 et 614 de l'isoforme APP₆₉₅), situés au niveau du 17^{ème} acide aminé de la séquence putative du peptide A β (Esch et al., 1990, Sisodia, 1992). Cette étape est réalisée, préférentiellement, au niveau **de la membrane plasmique** (Kojro et al., 2001) libérant un fragment N-terminal soluble **sAPP α** et un fragment transmembranaire C-terminal **α -CTF** (Figure 6). Trois enzymes ADAM10, ADAM17 et ADAM9, appartenant à la famille des métalloprotéases dépendantes du zinc (Buxbaum et al., 1998), possèdent une activité du type α -sécrétase.

De nombreuses études suggèrent que le fragment sAPP α serait un facteur neuroprotecteur et neurotrophique. *In vitro*, le traitement avec le fragment sAPP α entraîne une extension neuritique dans les neurones corticaux (Araki et al., 1991). De plus, **un prétraitement** avec ce fragment augmente la résistance à un stress oxydatif induit par des ions ferreux (Fe²⁺) ou des peptides A β , dans des cultures primaires de neurones (Mattson et al., 1999).

Sur des tranches organotypiques d'hippocampe, le fragment sAPP α augmente l'expression de plusieurs gènes neuroprotecteurs dont *Igf2* (*Insulin like growth factor 2*) et protège contre la mort neuronale induite par le peptide A β (Stein et al., 2004). *In vivo*, l'injection du fragment sAPP α dans le cerveau induit une augmentation du nombre de synapses et de la mémoire à court et à long terme (Roch et al., 1994).

Enfin, les souris transgéniques surexprimant la protéine α -sécrétase ADAM10 présentent une augmentation de la synaptogénèse corticale (Bell et al., 2008). Un effet similaire est retrouvé dans les cerveaux des souris ayant reçues une injection de fragment sAPP α (Bell et al., 2008). Ces résultats confirment les **effets neurotrophiques du fragment sAPP α** .

➤ **Le clivage par la β -sécrétase : 1^{ère} étape de la voie amyloïdogénique (figure 6) :**

La protéine APP peut être clivée selon une **deuxième voie minoritaire, la voie amyloïdogénique**. Le clivage par la β -sécrétase constitue la première étape de cette voie (Seubert et al., 1993). La β -sécrétase coupe au niveau de l'extrémité N-terminale (entre les résidus 596 et 597 de l'isoforme APP₆₉₅), permettant ainsi la libération d'une forme soluble **sAPP β** et la formation du fragment transmembranaire C-terminal, **β -CTF** (Figure 6). Plusieurs études ont mis en évidence que la protéine BACE1 (*β APP Cleaving Enzyme*) possédait une activité β secrétase (Hussain et al., 1999, Sinha et al., 1999, Vassar et al., 1999, Yan et al., 1999). L'expression et l'activité de cette protéine sont augmentées dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Holsinger et al., 2002, Yang et al., 2003). Les souris invalidées pour le gène *Bace1* ne présentent pas d'activité β -sécrétase ni de production de peptides A β (Cai et al., 2001, Luo et al., 2001). L'invalidation du gène *Bace1* prévient la pathologie amyloïde dans les souris sur-exprimant une forme mutée du gène APP humain (mutations suédoises) ou dans des souris sur-exprimant une protéine APP humaine portant la mutation suédoise associée à une mutation de la préséniline 1 (γ -sécrétase) (Ohno et al., 2004, Laird et al., 2005). L'activité de la protéine BACE1 est **optimale dans le compartiment endosomal acide**. Le clivage par la β -sécrétase (BACE1) se déroule au niveau **des endosomes** (Ehehalt et al., 2003, Carey et al., 2005, Cirrito et al., 2008).

L'équipe de Furukawa *et al* montre que le fragment sAPP α est 100 fois plus protecteur que le fragment sAPP β sur des cultures de neurones hippocampiques soumises à une dose toxique de peptides A β (Furukawa et al., 1996). De plus, une étude récente met en évidence que le fragment sAPP β agirait comme un ligand du récepteur DR6 (*Death Receptor 6*), induisant le clivage et l'activation de la caspase 6 associée à une désintégration des axones (Nikolaev et al., 2009).

Les fragments β -CTF exercent, eux aussi, des effets neurotoxiques. En effet, ils induisent **une inhibition de la capture du calcium par le réticulum endoplasmique et donc perturberaient l'homéostasie du calcium intracellulaire, contribuant à des processus neurotoxiques** (Kim et al., 1998). Les souris sur-exprimant le fragment **β -CTF** présentent, progressivement au cours du temps, un processus de perte neuronale associé à des déficits mnésiques et une hyperanxiété, caractéristiques physiopathologiques proches de la maladie d'Alzheimer (Lee et al., 2006). Ces données mettent en évidence le rôle des fragments β -CTF dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer.

➤ **Le clivage par la γ -sécrétase : étape finale des deux voies :**

Le clivage par la γ -sécrétase correspond à l'étape **finale de la voie non amyloïdogénique et de la voie amyloïdogénique** (Figure 6). L'activité γ -sécrétase génère à partir du fragment **α -CTF**, le peptide **p3** et le fragment **AICD** (*APP Intracellular Domain*) et à partir du fragment **β -CTF**, le peptide **A β** et le fragment **AICD** (Figure 6).

Cette activité est exercée par un complexe composé de quatre protéines : la protéine préséniline 1 (PS1) ou préséniline 2 (PS2), la nicastrine, la protéine PEN2 (*Presenilin Enhancer 2*) et la protéine APH1 (*Anterior Pharynx Defective 1*) (Edbauer et al., 2003, Fraering et al., 2004, Sato et al., 2007). Les protéines PS1 et PS2 stabilisent le complexe (Pitsi and Octave, 2004) et permettent le clivage du fragment C-terminal (α -CTF ou β -CTF) (Haass and Steiner, 2002). Le complexe γ -sécrétase est capable de cliver d'autres substrats comme la protéine NOTCH (Kimberly et al., 2003).

L'activité de ce complexe a été mise en évidence au **niveau de la membrane plasmique** mais aussi dans **les membranes intracellulaires du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi et des endosomes** (Thinakaran and Koo, 2008).

A l'état physiologique, la voie non amyloïdogénique est majoritaire. Le développement de la maladie d'Alzheimer résulte d'un déséquilibre en faveur de la voie amyloïdogénique.

1.2.1.2 Plaques amyloïdes ou séniles

Le peptide **A β 42**, possède un potentiel d'agrégation en fibrilles **plus important**, le rendant plus toxique (Jarrett et al., 1993a, b). Ces peptides s'agrègent pour former des plaques amyloïdes. Les plaques amyloïdes sont retrouvées dans le néocortex et l'hippocampe des patients atteints de la maladie d'Alzheimer et des patients porteurs d'une trisomie 21, lesquelles présentent trois copies du gène APP (chromosome 21) et développent précocement une maladie d'Alzheimer. Un nombre plus faible de plaques sont observés chez des individus âgés, sains.

A l'échelle de la microscopie optique, les plaques séniles sont des masses sphériques extracellulaires. Leur aspect est diffus à des stades précoces de la maladie (Figure 7A) et évolue en dépôts focaux (Figure 7B) pouvant s'accumuler au niveau des neurites (dendrites et axones) et entraîner ainsi une perturbation du réseau synaptique (Duyckaerts et al., 2009). De plus, les plaques induisent un recrutement de cellules microgliales et astrogliales, engendrant ainsi une importante réaction inflammatoire. Ces plaques sont également retrouvées au niveau des vaisseaux sanguins des méninges et du cortex où elles s'accumulent, aboutissant à une angiopathie amyloïde cérébrale (Verbeek et al., 2000).

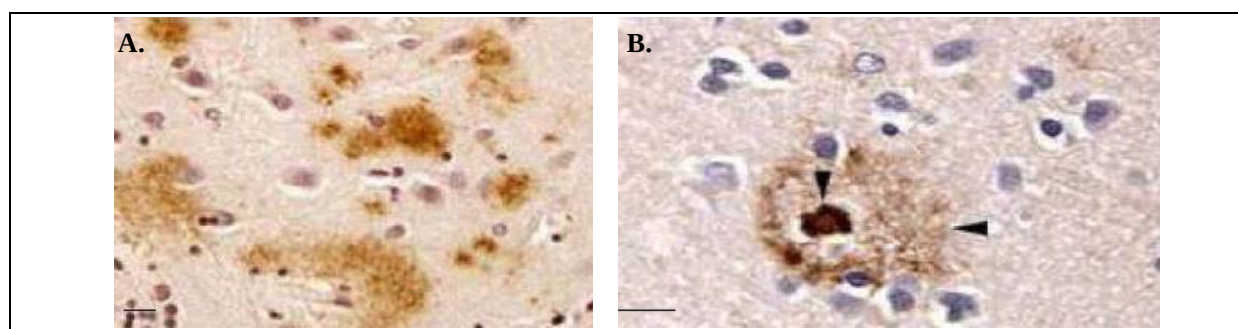


Figure 7 : Plaques séniles

Dépôts diffus de peptides A β (A) et plaque sénile composée d'un dépôt focal et d'une couronne de peptides A β , (B) révélés par un anticorps dirigé contre le peptide A β . Barre d'échelle : 10 μ M (Duyckaerts et al., 2009).

Les plaques amyloïdes ne sont pas mises en évidence dans le cerveau de souris normales (non transgéniques). Le peptide A β murin n'est, en effet, pas capable de s'agréger.

1.2.2 La composante Tau :

Les corps neurofibrillaires, composés d'agrégats de protéines Tau hyperphosphorylées constituent la deuxième lésion neuropathologique retrouvée dans la maladie d'Alzheimer.

1.2.2.1 L'hyperphosphorylation de la protéine Tau

La protéine tau, principalement exprimée dans les cellules nerveuses, est physiologiquement associée aux microtubules permettant ainsi leur assemblage et leur stabilisation et contribuant ainsi au maintien des transports axonaux (Drubin and Kirschner, 1986).

Une hyperphosphorylation de la protéine tau diminue son affinité pour les microtubules et conduit à la formation de filaments hélicoïdaux puis de corps neurofibrillaires (Iqbal et al., 1986). Ces formes hyperphosphorylées peuvent entraîner des perturbations du transport axonal et un dysfonctionnement synaptique.

1.2.2.2 Les corps neurofibrillaires

Les corps neurofibrillaires retrouvés dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer ne sont **pas spécifiques** de cette maladie. En effet, ils sont mis en évidence dans d'autres processus neurodégénératifs, appelés tauopathies, telles que la **maladie de Niemann Pick ou la démence fronto-temporale** (Buee et al., 2000, Hernandez and Avila, 2007).

Les corps neurofibrillaires, constitués de filaments appariés en hélice d'un diamètre de 10 nm et d'un pas d'hélice de 80 nm, résultent d'une accumulation de fibrilles pathologiques dans le cytoplasme et les neurites des neurones. Les régions les plus touchées sont les **cellules pyramidales du cortex cérébral associatif et de l'hippocampe** (figure 8).

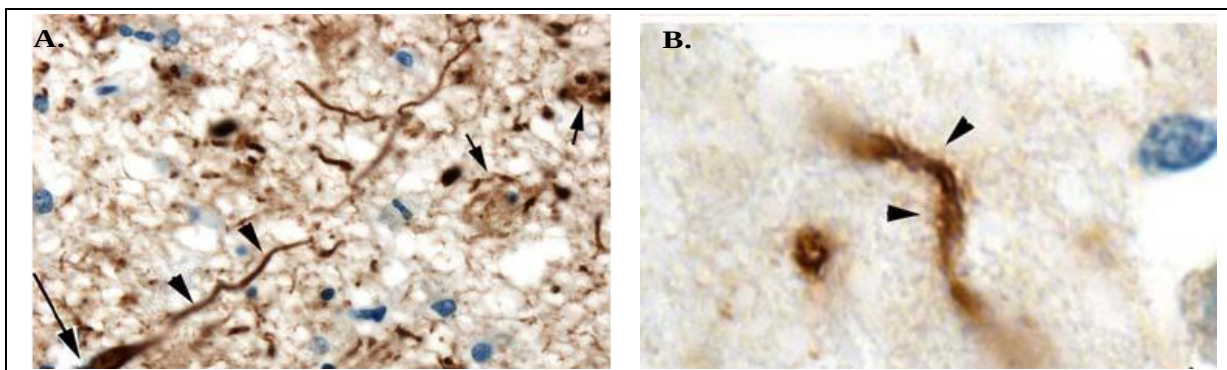


Figure 8 : Les corps neurofibrillaires

Ils s'accumulent au niveau des dendrites et sont révélés par un anticorps dirigé contre la protéine TAU. Les flèches noires représentent les dendrites et les axones des neurones (Duyckaerts et al., 2009).

Comme pour les plaques amyloïdes, les corps neurofibrillaires ne sont pas mis en évidence dans le cerveau de souris normales car la protéine tau murine n'est pas capable de former des fibrilles et des corps neurofibrillaires.

1.3 Autres caractéristiques neuropathologiques :

En plus de ces deux composantes, d'autres caractéristiques neuropathologiques : la perte neuronale, l'astrogliose et l'atrophie de l'hippocampe sont retrouvées dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

1.3.1 La perte neuronale

Une des régions cibles de la maladie d'Alzheimer est la formation hippocampique qui est composée (figure 9 (Amaral and Witter, 1989)) :

- **du cortex entorhinal** qui transfère les informations sensorielles du cortex à l'hippocampe.
 - **du complexe subiculaire** comprenant le *présubiculum* et le *parasubiculum* d'où émergent les principales efférences de l'hippocampe.
 - **et de l'hippocampe** subdivisé en deux régions : les cornes d'Ammon (CA) et le gyrus denté.
- La corne d'Ammon (incluant les aires CA1, CA2 et CA3) est composée de neurones pyramidaux et d'interneurones. Les dendrites basales de ces neurones sont organisées en réseaux denses dans une couche appelées *stratum oriens* (SO). Les dendrites apicales des cellules de la région CA1, CA2 et CA3a passent dans le *stratum radiatum* (SR-couche supérieure) puis dans le *stratum lacunosum moléculaire* (SLM-couche profonde. Les dendrites apicales de la région CA3b passent dans les fibres moussues (Figure 9).

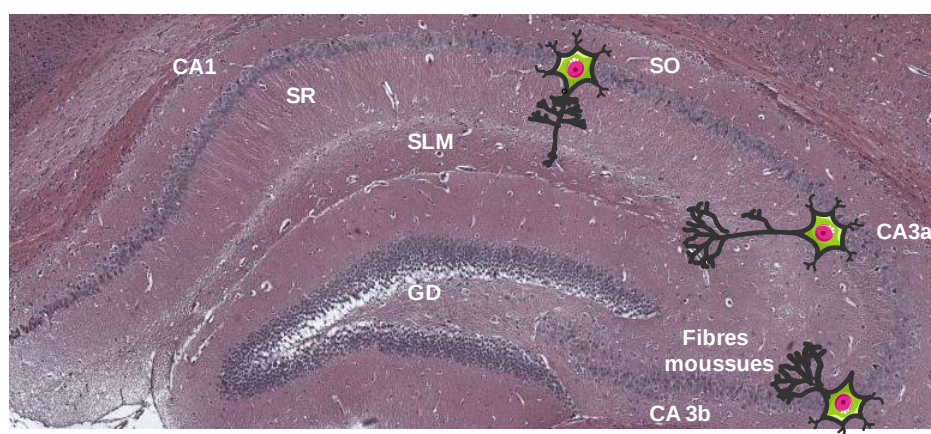


Figure 9: Les différentes régions de l'hippocampe.

CA : Corne d'Ammon, SO : *stratum oriens*, SR : *stratum radiatum*, SLM : *stratum lacunosum moléculaire*, GD : gyrus denté.

La perte neuronale est détecté seulement **au niveau de la région CA1 et du subiculum** chez les patients à un stade **modéré**. En revanche, dans le cerveau de patients présentant un stade sévère, la perte neuronale est observée au niveau du *subiculum* et de la région CA1 (86% de perte) mais aussi dans **la région CA3** (53% de perte). **Le gyrus denté** est la seule subdivision de l'hippocampe sans perte neuronale significative (Bobinski et al., 1997).

1.3.2 Astroglie

Le processus de mort neuronale s'accompagne d'un recrutement massif des astrocytes ou astroglie. L'astroglie se définit comme **une augmentation anormale du nombre et de l'activation des astrocytes en réponse à un processus de perte neuronale ou de lésions cérébrales** (Eng and Ghimikar, 1994). Elle se caractérise, notamment par une augmentation de l'expression des transcrits et de la protéine GFAP

La densité des astrocytes est augmentée dans le cortex des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Schechter et al., 1981). La concentration de la protéine GFAP, mesurée en ELISA, y est augmentée d'un facteur supérieur à 10 dans le cortex ou le thalamus. L'astroglie est corrélée à la densité des corps neurofibrillaires et des plaques amyloïdes (Cairns et al., 1992).

1.3.3 Atrophie cérébrale et hippocampique.

L'atrophie, une des caractéristiques de la maladie d'Alzheimer, implique **les régions où la pathologie tau ainsi que la perte neuronale sont prédominantes** : le cortex entorhinal, l'hippocampe.

Une étude de De Léon a évalué la fréquence d'atrophie de l'hippocampe, chez des sujets âgés non déments, des sujets présentant un syndrome de MCI (*Minimal Cognitive Impairment*) et des sujets atteints d'une démence de type Alzheimer. Dans le syndrome de MCI, les patients présentent des symptômes de déficits cognitifs mais ceux-ci sont insuffisants pour définir une démence. La fréquence de l'atrophie de l'hippocampe est de 29% chez les sujets âgés non déments et augmente avec l'âge des individus. Pour les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, la fréquence s'étend de 78% pour les patients présentant un stade léger de démence à 96% pour les patients avec un stade plus sévère (De Leon et al., 1997b). Parmi les sujets contrôles, le suivi longitudinal des examens de 15 individus présentant une atrophie hippocampique, révèle que quatre individus ont évolué vers un syndrome MCI et 11 vers une probable maladie d'Alzheimer (De Leon et al., 1997b). Cette équipe a également réalisé une étude longitudinale démontrant que, 70% des sujets présentant une atrophie de l'hippocampe, ont développé une démence de type Alzheimer en l'espace de quatre ans. **Ces données suggèrent que l'atrophie de l'hippocampe pourrait permettre de prédire l'évolution des sujets vers une démence de type Alzheimer** (de Leon et al., 1997a).

Plusieurs études ont permis de déterminer s'il existait des corrélations entre **l'atrophie de l'hippocampe et la neuropathologie** de la maladie d'Alzheimer. L'atrophie de l'hippocampe ne semble pas corrélée avec la charge amyloïde (peptides ou plaques séniles) (Josephs et al., 2008) mais à la **présence de corps neurofibrillaires** (stade de Braak), à l'âge de l'individu (Bobinski et al., 1996, Whitwell et al., 2008) et de **déficits cognitifs** (Jack et al., 2002). Enfin, l'atrophie de l'hippocampe a été corrélée à la perte neuronale au niveau de la formation hippocampique et particulièrement au **niveau de la région CA1 de l'hippocampe** (Bobinski et al., 1997, Bobinski et al., 1998).

Sur un plan **neuropathologique**, la maladie d'Alzheimer est caractérisée par:

- Une **composante amyloïde** avec une augmentation de la production de peptides A β et des plaques amyloïdes
- Une **composante tau** avec une hyperphosphorylation de la protéine TAU et des corps neurofibrillaires
- **Des défauts cognitifs et mnésiques**
- **Un processus de perte neuronale, une astroglie et une atrophie de l'hippocampe.**

1.4 Deux formes de la maladie d'Alzheimer

Génétiquement, la maladie d'Alzheimer peut être subdivisée en deux groupes :

- Les formes familiales précoces de la maladie d'Alzheimer ou EOAD (*Early Onset Alzheimer Disease*)
- Les formes sporadiques tardives de la maladie d'Alzheimer ou LOAD (*Late Onset Alzheimer Disease*).

1.4.1 Formes familiales précoces

Les formes familiales de la maladie d'Alzheimer représentent environ 5% des patients. Elles se développent précocement avant l'âge de 60 ans et leur transmission autosomale est dominante à pénétrance complète (Campion et al., 1999). Trois gènes, et plus de 160 mutations, ont été décrits dans ces formes familiales : le gène *APP* codant la protéine APP sur le chromosome 21, le gène *PSEN1* codant la protéine préséniline 1 (PS1) sur le chromosome 14, et le gène *PSEN2* codant la protéine préséniline 2 (PS2) sur le chromosome 1.

Les mutations de ces gènes favorisent le clivage par la voie amyloïdogénique et donc la production de peptides A β .

1.4.1.1 Le gène APP

Après la découverte de la présence de peptides A β , comme composant principal des plaques séniles (Glennner et al, 1984), le gène *APP* a été proposé comme gène candidat dans la maladie d'Alzheimer (Van Broeckhoven, 1990).

La première mutation identifiée est une substitution acide Glutamine → Glutamate en position 22 du peptide A β , chez une famille atteinte d'hémorragies cérébrales associées à une amyloïdose (mutations hollandaises, (Levy et al., 1990)). De nombreux variants de ce gène, dont les mutations londoniennes et suédoises, sont impliqués dans les formes précoces. Ces deux dernières mutations ont permis d'établir des modèles murins de la maladie d'Alzheimer (Selkoe and Podlisny, 2002).

Toutes ces mutations, situées à proximité du domaine A β de la protéine APP, près des sites de clivage par la β ou γ sécrétase (Eckman et al., 1997), **favorisent la production de peptides toxiques A β 42** (Citron et al., 1992, Ancolio et al., 1999, De Jonghe et al., 2001).

1.4.1.2 Le gène PSEN1 et PSEN2

Les deux autres gènes responsables des formes familiales sont les gènes *PSEN1* et *PSEN2*. Pour le gène *PSEN1*, 142 mutations ont été retrouvées à ce jour correspondant à environ 50% des formes familiales et conduisant à des formes agressives qui se développent parfois chez des patients de moins de 30 ans. En revanche, les mutations du gène *PSEN2* (une dizaine) ne sont retrouvées que dans des cas minoritaires de la maladie d'Alzheimer.

Les protéines PS1 et PS2 constituent le cœur catalytique de la γ sécrétase, impliquée dans la production des peptides A β . Les variants entraînent une augmentation du ratio A β 42/A β 40. En effet, une augmentation sélective des peptides A β 42, forme la plus toxique, est retrouvée dans le plasma de patients porteurs de ces mutations (Scheuner et al., 1996).

1.4.2 Formes sporadiques tardives :

Les formes sporadiques représentent 95% des cas et se développent plus tardivement, après 65 ans. Elles résultent d'une **pathologie complexe multifactorielle** impliquant plusieurs facteurs de risque (Richard and Amouyel, 2001).

L'âge est le premier facteur de risque impliqué dans les formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer. Les personnes âgées de plus de 85 ans ont une incidence 14 fois plus importante de développer la maladie d'Alzheimer que les personnes âgées de 65 à 69 ans (Hebert et al., 1995).

Le sexe semble également jouer un rôle dans le développement de cette pathologie. En effet, pour un âge donné, les femmes sont 1,5 fois plus atteintes que les hommes (Gao et al., 1998). Cet effet pourrait résulter d'une concentration en œstrogènes plus faible. Une méta-analyse de 12 études utilisant des traitements substitutifs hormonaux indique que ces traitements diminueraient le risque de développer la maladie d'Alzheimer (Fillit, 2002).

Parmi les autres facteurs impliqués, le métabolisme du cholestérol est un facteur de risque des formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer.

2 Etroites connexions entre le métabolisme du cholestérol et la maladie d'Alzheimer :

2.1 ApoE, principal facteur de risque de la maladie d'Alzheimer.

Parmi les nombreux gènes associés au développement des formes sporadiques, seul le gène de l'apolipoprotéine E (*APOE*), a été mis en évidence de manière robuste dans des études indépendantes (Strittmatter et al., 1993). La protéine ApoE, **principalement** synthétisée dans les astrocytes et secondairement dans les neurones (Pitas et al., 1987), est le principal transporteur du cholestérol et des phospholipides dans le cerveau (Puglielli et al., 2003b).

Le gène *APOE* existe sous trois formes alléliques : **l'allèle ε2, ε3 et ε4** (Puglielli et al., 2003b). Les trois isoformes issues de ces allèles diffèrent dans leur séquence en acides aminés en position 112 et/ou 158 : ε2 (Cys 112/Cys 158), ε3 (Cys 112/Arg 158), ε4 (Arg 112/Arg 158). L'allèle ε3 est le plus fréquent. De plus, environ 25% de la population exprime au moins un allèle ε4 du gène *APOE*.

L'allèle ε2 semble conférer un effet protecteur. Il est associé à une diminution du risque de développer la maladie d'Alzheimer et à une apparition plus tardive des signes de démence (Nagy et al., 1995). De plus, cet allèle est sur-représenté chez les individus centenaires (Blanche et al., 2001).

L'allèle ε4 du gène *APOE* est considéré comme un facteur de risque génétique de la maladie d'Alzheimer. Le risque de développer cette pathologie augmente de manière dose dépendante du nombre d'allèles ε4. En effet, les personnes hétérozygotes ou homozygotes pour cet allèle présentent respectivement un risque de développer la maladie, 3 à 8 fois supérieur aux personnes n'exprimant pas l'allèle ε4 (Polvikoski et al., 1995, Mahley et al., 2006). Le premier effet de l'isoforme ε4 de la protéine ApoE est **une apparition plus précoce des signes cliniques** chez les individus porteurs de cet allèle (Hyman et al., 1996, Farrer et al., 1997), **indiquant que l'allèle ε4 affecterait plus spécifiquement l'âge du début d'apparition.** Au niveau neuropathologique, la présence d'un allèle ε4 aurait un impact important sur le nombre de plaques amyloïdes (Hyman et al., 1996).

La protéine ApoE exerce **des effets multiples** sur la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer :

➤ **Production de peptides Aβ et formation des plaques amyloïdes :**

La surexpression de l'isoforme ε4 dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (PDAPP, surexprimant la protéine APP humaine mutée) induit une augmentation du contenu en peptides Aβ42 à un âge précoce (3mois) et du nombre de plaques amyloïdes à un temps tardifs (18mois). La majorité des isoformes ε4 de la protéine ApoE, mesurée en immunohistochimie (environ 90%), est retrouvée dans les plaques amyloïdes (Bales et al., 2009).

➤ **Maintenance de la plasticité synaptique :**

La protéine ApoE est également **impliquée dans le maintien des connections synaptiques et dans les processus de réparation** (Mahley et al., 1996). Une augmentation de l'expression de la protéine ApoE est mise en évidence après une ischémie cérébrale (Hayashi et al., 2006). De plus, l'isoforme ε3 induit *in vitro* une croissance neuritique en comparaison de l'isoforme ε4. De même, les complexes lipoprotéines-isoforme ε3 permet d'induire une protection plus efficace contre l'apoptose des neurones que le complexe lipoprotéines-isoforme ε4 (Nathan et al., 1994, Holtzman et al., 1995, Fagan et al., 1996). Ces données suggèrent que chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, l'isoforme ε4 serait moins efficace pour induire des processus de réparation et de maintenance synaptique en réponse aux peptides Aβ ou au stress oxydatif (Weisgraber and Mahley, 1996).

➤ **Efflux du cholestérol :**

L'isoforme ε4 de la protéine ApoE induit *in vitro* une diminution de l'efflux du cholestérol (Michikawa et al., 2000, Minagawa et al., 2009) et pourrait ainsi induire une augmentation du contenu en cholestérol favorisant la production de peptides Aβ et des processus neurotoxiques.

2.2 Influence du cholestérol périphérique sur la maladie d'Alzheimer

2.2.1 Taux du cholestérol dans le plasma des patients atteints de la maladie d'Alzheimer :

Plusieurs études longitudinales ont cherché à déterminer si le contenu en cholestérol périphérique était un facteur de risque du développement de la maladie d'Alzheimer. Elles montrent que le lien entre le cholestérol du plasma et l'incidence de la maladie d'Alzheimer évolue en fonction du temps et de la progression de la maladie.

Deux d'entre elles concluent qu'une concentration de cholestérol élevée à l'âge de 40-50 ans conduit à un risque accru de développer la maladie d'Alzheimer, **20 ans, plus tard** (Notkola et al., 1998, Kivipelto et al., 2001).

En revanche, trois autres rapportent une association inverse entre la concentration de cholestérol total et l'incidence de la maladie d'Alzheimer chez des patients plus âgés (65 ans) (Romas et al., 1999, Reitz et al., 2004, Mielke et al., 2005).

Ainsi, une concentration de cholestérol élevée à l'âge de 40-50 ans pourrait être un facteur de risque de la maladie d'Alzheimer. En revanche, chez des personnes âgées, il semblerait être protecteur (Sjogren et al., 2006).

2.2.2 Statines

Les statines sont des **inhibiteurs pharmacologiques de la protéine HMGCR**, enzyme limitante de la synthèse de cholestérol (Lennernas and Fager, 1997). Elles sont utilisées depuis de nombreuses années pour traiter l'hypercholestérolémie.

➤ **Etudes épidémiologiques :**

Des études rétrospectives suggèrent que l'utilisation de statines est associée à une réduction de la prévalence de la maladie d'Alzheimer. Elles montrent une diminution d'environ 70% de la prévalence chez des patients présentant une pathologie cardiovasculaire et traités par des statines (lovastatine, simvastatine et pravastatine). D'autres traitements comme les β -bloquants qui agissent au niveau des récepteurs adrénergiques ou d'autres hypocholestérolémiants ne sont pas associés aux modifications de prévalence de la maladie d'Alzheimer (Jick et al., 2000, Wolozin et al., 2000, Green et al., 2006).

Une étude, sur des femmes, en post-ménopause, rapporte que la prévalence de la maladie d'Alzheimer est diminuée chez des patientes traitées avec des statines et, en particulier, celles présentant des concentrations élevées de cholestérol (Yaffe et al., 2002).

L'administration de statines chez des sujets âgés de 65 à 79 ans, réduit l'incidence de développer la maladie d'Alzheimer, mais n'a pas d'effet chez les personnes de plus de 80 ans (Rockwood et al., 2002).

➤ **Essais cliniques :**

Deux études cliniques, randomisées en double aveugle, ont été réalisées à ce jour. Pour la première, un traitement de 12 mois par les statines prévient les déficits cognitifs (Sparks et al., 2010). La deuxième met en évidence qu'un traitement de 26 semaines avec la simvastatine est associé à une diminution du contenu en peptides A β 40 dans le liquide céphalo-rachidien de patients à un stade modéré de la maladie d'Alzheimer mais pas chez les sujets les plus sévèrement atteints (Simons et al., 2002).

Du fait de la petite taille des échantillons, ces analyses doivent cependant être considérées comme des études pilotes. Si des études sur une plus grande cohorte confirment les effets bénéfiques des statines sur le métabolisme des peptides A β et l'amélioration des performances cognitives, il sera important d'évaluer la capacité de ces traitements à ralentir la progression de la pathologie chez des patients à un stade modéré de la maladie.

➤ **Effets pleiotropiques des statines :**

Les statines inhibent l'enzyme **HMGCR**, enzyme limitante permettant la conversion de l'acyl-coA en mévalonate. Le mévalonate est ensuite catabolisé selon deux voies: **l'une conduisant à la production de cholestérol et l'autre à la production de dérivés isoprénoïdes nécessaires à l'isoprénnylation** (figure 2 partie A de l'introduction). L'isoprénnylation est une modification post-traductionnelle entraînant la fixation d'un résidu farnésyl ou géranyl-géranyl sur des protéines et permettant leur ancrage aux membranes cellulaires. Cette modification est impliquée dans différents processus tels que le métabolisme de la protéine APP (Zhou et al., 2003, Cole et al., 2005, Pedrini et al., 2005), la phosphorylation de la protéine tau (Meske et al., 2003), l'inflammation (Cordle et al., 2005, Cordle and Landreth, 2005).

Les mécanismes protecteurs des statines pourraient donc reposer à la fois sur **une diminution de la concentration en cholestérol mais aussi de l'isoprénnylation**.

L'administration de simvastatine induit **une diminution du cholestérol total, du cholestérol-LDL associée à une augmentation du cholestérol-HDL** (correspondant à la fraction dite « protectrice » du cholestérol) chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Bonn et al., 2002, Julia et al., 2002).

Parallèlement, les statines exercent un effet anti-inflammatoire, dépendant de la **modulation du processus d'isoprénnylation**. Les protéines isoprénnylées sont notamment impliquées dans les voies de signalisation de l'inflammation. Les statines induisent une inhibition de la neuro-inflammation induite par les peptides A β . La production d'interleukine 6, d'interleukine 1 β ou de protéines iNOS (*inductible Nitric Oxide Synthase*) par des cellules microgliales, *in vitro*, en présence de peptides A β est diminuée par l'administration de statines (atorvastatine ou simvastatine) (Cordle and Landreth, 2005, Lindberg et al., 2005). Cet effet serait lié à l'inhibition de la production du composé géranyl-géranyl-pyrophosphate (Cordle and Landreth, 2005). De même, *in vivo*, l'administration de simvastatine, un jour après l'induction d'une lésion cérébrale traumatique, diminue significativement le contenu en interleukine 6 et inhibe l'activation des cellules microgliales et astrogliales (Li et al., 2009a).

2.2.3 Régimes hypercholestérolémiants

Des données expérimentales ont également mis en évidence un lien entre **les régimes hypercholestérolémiants et le développement de la maladie d'Alzheimer** à la fois chez les modèles murins de la maladie d'Alzheimer et chez les modèles non transgéniques.

2.2.3.1 Effets des régimes hypercholestérolémiants dans les modèles non Alzheimer :

Chez la **souris (C57Bl/6)**, un régime enrichi en cholestérol de 2 mois induit au niveau de l'hippocampe, une accumulation des **fragments β -CTF** (suggérant une augmentation de la voie amyloïdogénique) associée à une neuro-inflammation caractérisée par une activation des cellules gliales et une augmentation des cytokines (Thirumangalakudi et al., 2008).

Les lapins soumis à un régime **enrichi en cholestérol** présentent des anomalies physiopathologiques **proches de la maladie d'Alzheimer** (Sparks, 2008). Une alimentation enrichie avec 2% de cholestérol, chez le lapin, pendant 8 semaines, induit **une rupture de la barrière hémato-encéphalique**, associée à un recrutement de monocytes au niveau périvasculaire, une infiltration de lymphocytes et une activation des cellules microgliales (Sparks et al., 1994, Sparks, 1996, Chen et al., 2008, Sparks, 2008). Elle s'accompagne également d'une augmentation du cholestérol cérébral (Sparks et al., 1994, Sparks, 1996, Chen et al., 2008, Sparks, 2008). Dans les neurones des bulbes olfactifs, une accumulation du nombre et de la taille endolysomes enrichis en protéines ApoB, protéine non présente dans le cerveau, suggère **une endocytose du cholestérol périphérique**. De plus, ce régime conduit à une accumulation de cholestérol dans les neurones de l'hippocampe sans modification du cholestérol cérébral total. Cette surcharge de cholestérol neuronal s'accompagne d'une augmentation de l'expression des protéines APP et BACE1 (β -sécrétase), de l'activité β -sécrétase, de la production de fragments β -CTF, de peptides A β et des plaques amyloïdes (Chen et al., 2010). En plus, ce régime induit une phosphorylation de la protéine tau sans cependant modifier la phosphorylation de la protéine GSK3 β sur le résidu tyrosine en position 216 (Ghribi et al., 2006).

Les lapins soumis à une alimentation enrichie en cholestérol présente des dysfonctionnements de la barrière hémato-encéphalique (avec notamment une perméabilisation de la barrière) (Takechi et al., 2012, Takechi et al., 2013). **Dans ce modèle, il est donc difficile de distinguer les effets du cholestérol périphérique, du cholestérol cérébral.**

2.2.3.2 Effets des régimes hypercholestérolémiants dans les modèles de la maladie d'Alzheimer

De nombreuses études mettent en évidence que l'administration d'un régime **hypercholestérolémiant à un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (modèle de la pathologie amyloïde) conduit à une aggravation de la pathologie.**

Ce régime induit une **augmentation de la concentration de cholestérol** plasmatique et **cérébral** (hippocampe), **du contenu de peptides A β et du nombre de plaques amyloïdes**. Chez ces souris, la diminution des fragments sAPP α (issu de la voie non amyloïdogénique) associée à l'augmentation des fragments β -CTF (C99, de la voie amyloïdogénique) et des fragments AICD, suggèrent que l'hypercholestérolémie favorise la voie amyloïdogénique. Enfin, ce régime conduit à une augmentation de la **phosphorylation de la protéine Tau** et une exacerbation **des déficits mnésiques** (Refolo et al., 2000, George et al., 2004, Fitz et al., 2010, Umeda et al., 2012).

2.2.4 Modulation de l'expression du gène *ABCA1*

La protéine ABCA1 est impliquée dans la formation de lipoparticules associant le cholestérol et la protéine ApoE et par conséquent dans le mécanisme d'efflux du cholestérol hors de la cellule. L'inactivation du gène *Abca1* induit une forte diminution de l'expression de la concentration plasmatique en lipoprotéines HDL-cholestérol (fraction dite protectrice) associé à une diminution de l'expression de la protéine ApoE dans le liquide céphalo-rachidien (-98%) et dans le cortex (-80%). La diminution du contenu en cholestérol et de la taille des lipoparticules suggère que la protéine ABCA1 est nécessaire pour lipider la protéine ApoE (Wahrle et al., 2004).

Dans un modèle de la pathologie amyloïde de la maladie d'Alzheimer, l'inactivation du gène *Abca1* entraîne une augmentation des dépôts comprenant des peptides A β insoluble et la protéine ApoE faiblement lipidée (Wahrle et al., 2004, Koldamova et al., 2005, Wahrle et al., 2005). A l'inverse, la surexpression du gène *Abca1* dans le cerveau d'un modèle murin de pathologie amyloïde conduit à une diminution importante de la quantité des plaques amyloïdes qui s'accompagne **d'une augmentation du nombre de lipoparticules ApoE** dans le liquide céphalo-rachidien (Wahrle et al., 2008).

Le rôle potentiel de la protéine ABCA1 dans la maladie d'Alzheimer pourrait être dépendant du rôle de cette protéine dans la stabilité de la protéine APOE.

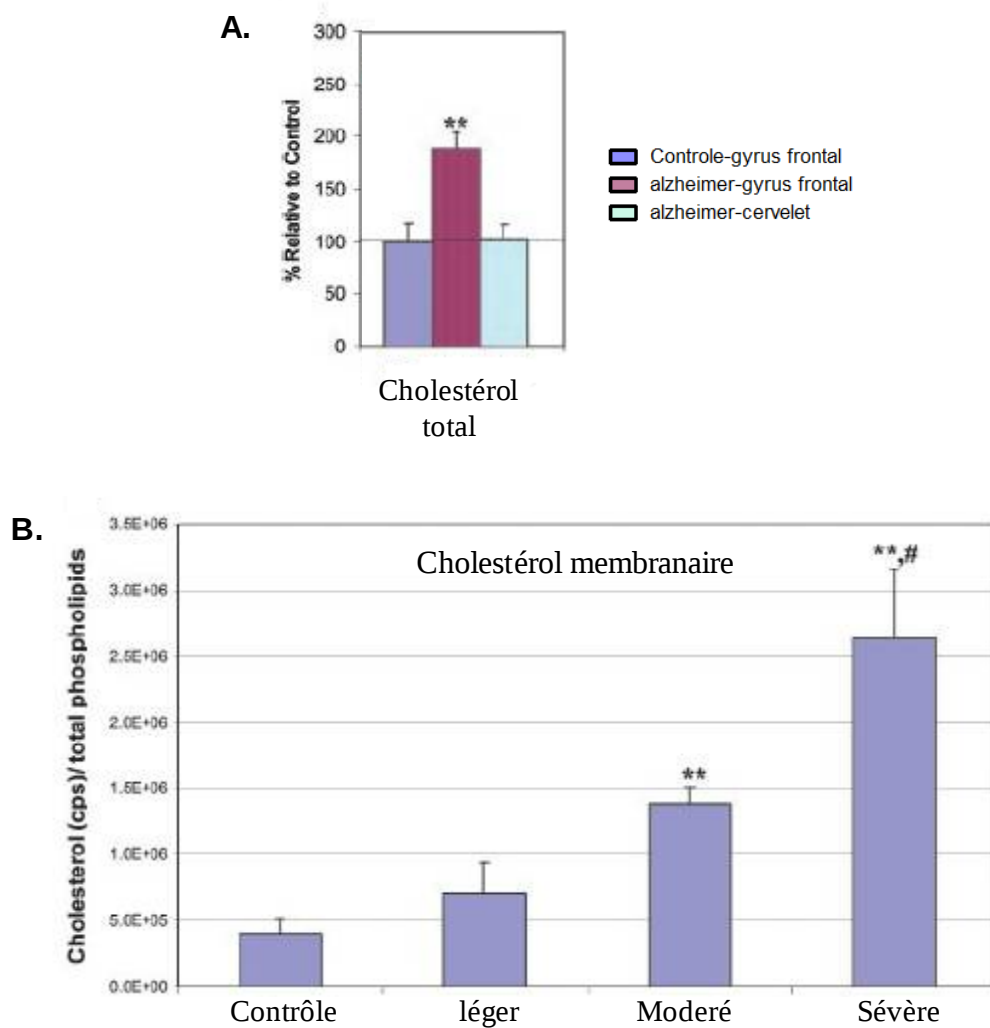


Figure 10: Des modulations du contenu en cholestérol total et membranaire :

A. Une augmentation du contenu en cholestérol total est mise en évidence dans le gyrus frontal des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (région présentant des signes neuropathologiques) et non dans le cervelet.

B. Le contenu en cholestérol membranaire augmente avec la sévérité de la maladie.

Figure inspirée de (Cutler et al., 2004)

2.2.5 Modulation de l'expression des récepteurs LDLR :

Le récepteur LDLR permet l'internalisation du cholestérol dans les cellules. L'invalidation du gène *Ldlr* dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (Tg2576) induit une **hypercholestérolémie** associée à une augmentation du nombre de plaques amyloïdes. Ces souris présentent également une hyperactivité, une diminution de l'anxiété et des déficits d'apprentissage (Cao et al., 2006). A l'inverse, la surexpression du gène *Ldlr* dans les modèles murins de la maladie d'Alzheimer induit une réduction drastique des agrégats amyloïdes, un efflux des peptides A β dans le liquide céphalo-rachidien et une diminution de la neuro-inflammation (Kim et al., 2009).

Enfin, l'inactivation de ce gène dans des souris normales suffit à engendrer une augmentation de l'expression de la protéine BACE1 et de la quantité de fragments β -CTF (Thirumangalakudi et al., 2008).

2.3 Influence du cholestérol cérébral dans la maladie d'Alzheimer.

2.3.1 Taux de cholestérol dans le cerveau :

Du fait de la barrière hémato-encéphalique, l'homéostasie du cholestérol cérébral et l'effet du taux de cholestérol cérébral sur le risque d'incidence de la maladie d'Alzheimer sont plus difficiles à évaluer. Peu d'études ont analysé précisément le contenu en cholestérol du cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

Une augmentation du contenu global cholestérol (facteur 2) a récemment été mise en évidence dans le gyrus frontal (région où est détectée la présence de plaques séniles et de corps neurofibrillaires), mais n'est pas retrouvée dans les régions non atteintes par la pathologie (cervelet). (figure 10A-(Cutler et al., 2004)). De plus, le contenu membranaire de cholestérol augmente avec la sévérité de la maladie (figure 10B) (Cutler et al., 2004).

L'augmentation du cholestérol est donc localisée dans les régions présentant un stress oxydatif et des caractéristiques neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer (plaques amyloïdes et corps neurofibrillaires).

Enfin, un enrichissement du cholestérol est également retrouvé autour des plaques séniles et des neurites dystrophiques (Xiong et al., 2008). Plus récemment, une évaluation par spectrophotométrie de masse du contenu en cholestérol des plaques séniles, de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, montre un enrichissement du cholestérol. La quantité équimolaire de cholestérol et de peptides A β dans ces plaques suggère une possible interaction mole à mole (Panchal et al., 2010).

Ces augmentations sont observées au moment où la maladie d'Alzheimer est déjà à un stade modéré. Par conséquent, la notion de la surcharge en cholestérol comme cause ou conséquence de la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer est difficile à aborder chez les patients atteints de cette maladie.

2.3.2 Modulation de l'expression d'Acyl-coenzyme A: cholesterol Acyltransferase (ACAT):

La protéine ACAT1 est l'enzyme responsable du stockage du cholestérol sous forme de gouttelettes d'esters de cholestérol. Les études menées sur cette enzyme ont mis en évidence **l'importance de la répartition intracellulaire du cholestérol dans la régulation des voies de clivage de la protéine APP**. En effet, l'administration d'un inhibiteur pharmacologique de la protéine ACAT (CP-113,818) à un modèle murin de la pathologie amyloïde, pendant deux mois, induit une diminution drastique du contenu de cholestérol estérifiée (86%), une inhibition quasi-complète de la production de peptides A β et de la formation des plaques amyloïdes (83-99%) ainsi qu'une amélioration des fonctions cognitives (Hutter-Paier et al., 2004).

De plus, un polymorphisme du gène *SOAT1*, codant la protéine ACAT1 est associé à une faible charge amyloïde dans le cerveau, un faible contenu en cholestérol du liquide céphalo-rachidien et à un risque réduit de développer la maladie d'Alzheimer (Wollmer et al., 2003).

2.3.3 Expression et modulation de la cholestérol-24-hydroxylase

La cholestérol-24-hydroxylase codée par le gène *CYP46A1* est l'enzyme responsable de **la voie majeure** de l'efflux de cholestérol hors du cerveau.

2.3.3.1 Expression chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer

L'expression physiologique de la cholestérol-24-hydroxylase est **exclusivement neuronale** et **augmente avec l'âge** (Figure 4, partie A-(Lund et al., 1999, Martin et al., 2011).

L'expression de cette enzyme est **diminuée dans les neurones** des cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et **augmentée dans leurs astrocytes** (Bogdanovic et al., 2001, Brown et al., 2004). Ces résultats suggèrent **que la diminution de l'expression de la cholestérol-24-hydroxylase dans les neurones de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, pourrait être à l'origine de la surcharge en cholestérol de ces neurones** et que les cellules astrogliales activées seraient impliquées dans l'élimination du cholestérol en excès pour compenser le défaut des cellules neuronales.

2.3.3.2 Polymorphismes du gène *CYP46A1* :

Des analyses génétiques ont montré une association entre certains polymorphismes de type SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) du gène *CYP46A1* et le processus pathologique de la maladie d'Alzheimer.

➤ Polymorphismes situés dans le promoteur du gène *CYP46A1* :

Deux SNPs associés à la pathologie et localisés à 3000 paires de bases en amont du site d'initiation de la traduction (ATG) du gène *CYP46A1* ont été identifiés (Li et al., 2010). Il s'agit de deux variants C-1794T>C (rs8003602) et C-1297A>G (rs3783320) associés au même phénotype dans deux études indépendantes incluant des patients d'origine asiatique (chinoises et mongoles).

Pour le polymorphisme rs8003602, l'allèle C semble plus fréquent chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer ($P=0,0589$). Pour le SNP rs3783320, l'allèle G est plus fréquent chez les sujets présentant les symptômes de la maladie d'Alzheimer ($P=0,0346$) (Li et al., 2010). Ces deux polymorphismes apparaissent ainsi comme des facteurs de prédisposition.

Une étude d'association a identifié deux haplotypes au sein de ces deux populations : l'haplotype CG et TA (Li et al., 2010). **L'haplotype CG est plus fréquent chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer** indiquant une plus grande susceptibilité pour cette pathologie ($p=0,0358$). **L'haplotype TA** est plus représenté dans la **population contrôle** ($p=0,02$) (Li et al., 2010). La présence de ces polymorphismes pourrait influencer l'expression du gène *CYP46A1* en modifiant notamment les sites de fixations des facteurs de transcription sur le promoteur. Afin de déterminer l'influence de ces SNPs sur l'expression du gène *CYP46A1*, cette même équipe a cloné la région promotrice du gène *CYP46A1* comprenant l'un ou l'autre des deux haplotypes en amont du gène rapporteur luciférase. La présence de l'haplotype TA entraîne une expression de la luciférase, 25 à 30% plus importante que celle de l'haplotype CG (Li et al., 2010). De plus, des expériences de retard sur gel ont montré que la fixation de protéines issues d'un extrait nucléaire est plus importante sur un promoteur porteur de l'allèle T du SNP (rs8003602) que sur un promoteur porteur de l'allèle C du SNP (rs8003602).

Ces résultats suggèrent que la présence de l'haplotype CG sur le promoteur, plus fréquent chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, pourrait induire une diminution de l'expression du gène *CYP46A1*.

➤ Polymorphisme localisé dans l'intron 2 : rs754203

Le polymorphisme rs754203 est associé, d'une part, à un risque plus important de développer la maladie d'Alzheimer et d'autre part à une modulation du volume de l'hippocampe chez les sujets jeunes.

♣ Association dans la maladie d'Alzheimer :

La répartition des allèles C et T du polymorphisme intronique rs754203 a été étudiée dans une population de 94 patients atteints de la maladie d'Alzheimer et de 172 sujets contrôles d'origine suisse. Les sujets homozygotes pour l'allèle mineur TT présentent **une augmentation de 27% du cholestérol** dans le liquide céphalo-rachidien, **suggérant une diminution de la fonction de la cholestérol-24-hydroxylase**. Ce polymorphisme TT est également associé à une augmentation d'un **facteur 2** de la prévalence de la maladie d'Alzheimer, des peptides A β 42 et de la phosphorylation de la protéine Tau dans le liquide céphalo-rachidien. De plus, la présence additionnelle d'un ou deux allèles ϵ 4 du gène ApoE accentue ces anomalies (Papassotiropoulos et al., 2003).

♣ Association avec le volume de l'hippocampe chez des sujets jeunes :

L'influence de ce polymorphisme **sur la morphologie hippocampique et parahippocampique** a également été étudiée dans une population **d'individus contrôles jeunes** (suisse/caucasien, âge 23,3 ans en moyenne), ne présentant pas de variations alléliques de gènes connus pour moduler la morphologie du cerveau ou les fonctions mnésiques (Hanggi et al., 2011). **Ces structures sont plus petites chez les personnes homozygotes TT que celles homozygotes CC**. Les personnes hétérozygotes CT présentent un phénotype intermédiaire (Hanggi et al., 2011). Le SNP T/C du gène *CYP46A1* module le volume hippocampique et parahippocampique chez des sujets jeunes.

L'effet de ce polymorphisme sur l'expression du gène *CYP46A1* n'ayant pas été caractérisé dans ces études, le mécanisme expliquant l'association de ce polymorphisme à un risque accru de développer la maladie d'Alzheimer ou à une diminution du volume hippocampique est à ce jour inconnu.

2.3.3.3 Effet protecteur de la surexpression du gène *CYP46A1* dans les modèles murins de la maladie d'Alzheimer

a. Effet protecteur contre la pathologie amyloïde :

Nous avons démontré que la surexpression de la cholestérol-24-hydroxylase dans l'hippocampe et le cortex induit un effet protecteur vis-à-vis de la pathologie amyloïde dans deux modèles murins, les souris APP23 et les souris APP/PS (Hudry et al., 2010).

➤ Mécanisme :

L'effet protecteur de la surexpression du gène *CYP46A1* vis-à-vis de la pathologie amyloïde serait dû à une **diminution du contenu en cholestérol dans les radeaux lipidiques**, entraînant une délocalisation des protéines APP et BACE1 (β -sécrétase) hors des radeaux lipidiques et une diminution de la production de peptides A β .

➤ Effet préventif :

Les souris APP23 constituent un modèle de la pathologie amyloïde de la maladie d'Alzheimer (Sturchler-Pierrat and Staufenbiel, 2000). Ces souris surexpriment la protéine humaine APP₇₅₁ portant la double mutation suédoise (K670N/M671L) sous le contrôle du promoteur Thy1.2. Les peptides Ab sont détectés dès l'âge de trois mois et leur production augmente avec l'âge. Ils sont associés à des déficits de mémoire de référence spatiale (piscine de Morris) (Kelly et al., 2003). Les premières plaques amyloïdes apparaissent à l'âge de 6 mois. La formation de ces plaques débute dans le cortex frontal et le subiculum puis s'étend rapidement vers le néocortex et l'hippocampe. A l'âge de 12 mois, le thalamus et l'amygdale contiennent des plaques amyloïdes alors que les dépôts dans le striatum et le prosencéphale basal sont rares. A l'âge de 24 mois, les plaques amyloïdes envahissent toutes les régions cérébrales à l'exception du cervelet (Sturchler-Pierrat and Staufenbiel, 2000).

Des injections stéréotaxiques d'un vecteur AAV (*Adenovirus Associated Virus*) de sérotype 5 codant le gène humain *CYP46A1*, ont été utilisées afin d'induire la surexpression de la cholestérol-24-hydroxylase dans le cortex et l'hippocampe de souris APP23 âgées de 2,5 mois **afin d'évaluer le rôle de la surexpression du gène *CYP46A1* comme thérapie préventive de la pathologie amyloïde**. Ces injections induisent une expression du transgène exclusivement dans les neurones et une augmentation d'un facteur 2 du produit de cette enzyme, le 24 hydroxycholestérol. A l'âge de 6 mois, la surexpression du gène induit une **amélioration des fonctions mnésiques** (piscine de morris). A l'âge de 12 mois, la surexpression de ce gène s'accompagne **d'une diminution importante** de la quantité de dépôts amyloïdes (de 63 à 71%), associée à **une diminution** de la production de peptides A β 40/A β 42 (-50%) et de la réponse microgliale et astrocytaire. **Ces résultats indiquent un effet préventif de la pathologie amyloïde** (Hudry et al., 2010).

➤ Effet curatif :

La thérapie par injection du vecteur AAV5-shCYP46A1, a ensuite été testée dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer plus agressif afin d'évaluer **son potentiel curatif**. Ce modèle est la souris APP/PS qui surexprime à la fois le gène humain de la présénilline 1 mutée (M146L) et le gène humain codant l'isoforme APP₆₉₅ présentant la double mutation suédoise/londonienne développent, **des l'âge de 3 mois, des plaques amyloïdes** (Blanchard et al., 2003). La surexpression du gène *CYP46A1* à l'âge de 3 mois, est associée à **une diminution de 54% du nombre de plaques amyloïdes dans l'hippocampe, suggérant un effet curatif** (Hudry et al., 2010).

b.Effet protecteur vis-à-vis de la pathologie TAU

Les souris TAU22, développées par l'équipe de Luc Buée, surexpriment la protéine Tau humaine présentant les mutations G272V et P301S (Schindowski et al., 2006). Elles développent une hyperphosphorylation et une phosphorylation anormale de la protéine Tau sur des sites similaires à ceux principalement impliqués dans la maladie d'Alzheimer.

La surexpression du gène *CYP46A1* dans le cortex et l'hippocampe de souris Thy TAU22, au tout début de la pathologie (3.5 mois) induit **une amélioration de leurs fonctions cognitives** (données non publiées). L'analyse des mécanismes est en cours d'évaluation dans le laboratoire.

3 Conclusion :

Le contenu en cholestérol diminue au cours du vieillissement (Soderberg et al., 1990, Abildayeva et al., 2006, Thelen et al., 2006, Sodero et al., 2011).

Une augmentation du cholestérol est mise en évidence dans la physiopathologie de nombreuses pathologies neurodégénératives : maladie de Huntington, maladie de Parkinson, maladie de Niemann Pick de type C, épilepsie, maladie d'Alzheimer,

Cependant, la question de cette accumulation de cholestérol comme cause ou conséquence de ces processus neurodégénératives n'est pas encore élucidé.

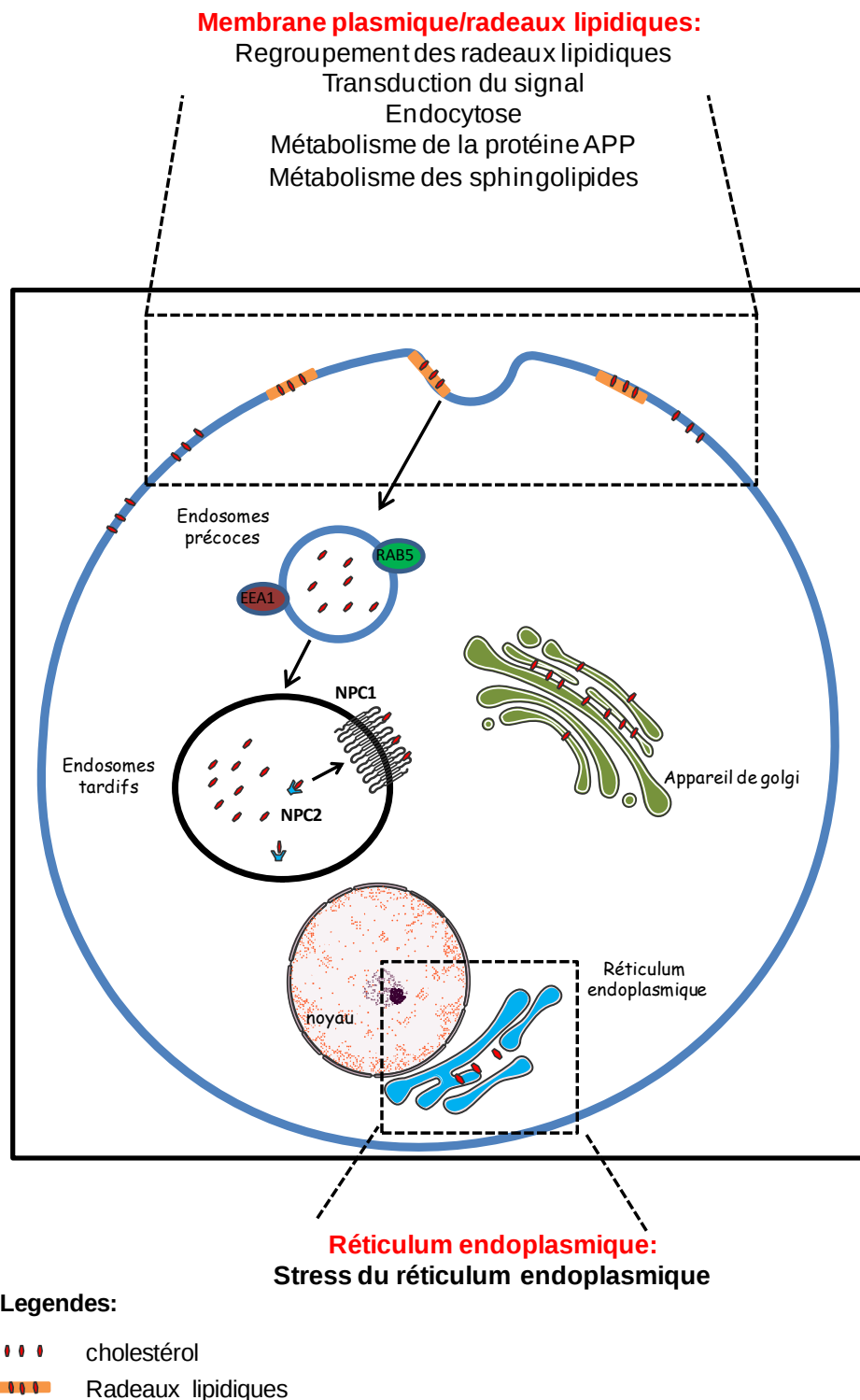


Figure 11 : Conséquences d'une accumulation de cholestérol dans la cellule :

L'accumulation de cholestérol membranaire entraîne le regroupement des radeaux lipidiques favorisant la transduction du signal induit par des récepteurs, les processus d'endocytose, le métabolisme de la protéine APP. Elle pourrait également moduler le métabolisme des sphingolipides.

La surcharge en cholestérol dans le réticulum endoplasmique induit une réponse UPR (Unfolded Protein Response) ou stress du réticulum endoplasmique aboutissant à un processus apoptotiques.

C. Conséquences d'une accumulation intracellulaire de cholestérol dans la cellule :

La distribution intracellulaire du cholestérol joue un rôle essentiel dans de nombreux processus biologiques. Le cholestérol n'est pas distribué de manière hétérogène dans la cellule. Les organites riches en cholestérol sont la membrane plasmique, l'appareil de golgi et le compartiment des endosomes. En revanche, le réticulum endoplasmique et les lysosomes contiennent peu de cholestérol (moins de 1% du cholestérol cellulaire).

Des modifications de la quantité ou de la localisation subcellulaire du cholestérol ont des conséquences toxiques pour la cellule (figure 11).

1 Conséquences d'un excès de cholestérol au niveau des membranes et des radeaux lipidiques

Le cholestérol, composant essentiel des membranes (60 à 80% du cholestérol cellulaire), permet à la fois, de maintenir la cohésion et de diminuer la fluidité et la perméabilité des membranes. Le cholestérol est, de plus, enrichi dans les radeaux lipidiques.

Des modifications du contenu et de la répartition du cholestérol dans la membrane et en particulier dans les radeaux lipidiques sont à l'origine de perturbations des fonctions membranaires. En effet, le contenu en cholestérol membranaire intervient dans la modulation :

➤ **de la transduction de voies de signalisation induit par le regroupement des radeaux lipidiques.**

➤ **de l'endocytose**

➤ **du métabolisme de la protéine APP**

➤ **de l'homéostasie du calcium**

➤ **métabolisme des sphingolipides**

1.1 Le cholestérol module la transduction de voies de signalisation :

Les radeaux lipidiques, domaines riches en cholestérol, constituent une **plateforme de transduction de voies de signalisation**. Cette notion a été mise en évidence lors de l'activation des lymphocytes T par les cellules présentatrices d'antigène (Hiltbold et al., 2003). Les radeaux lipidiques **favorisent le regroupement et l'interaction de protéines, facilitant la transduction du signal** induit par la fixation de l'antigène sur les récepteurs TCR dans la cellule.

La déplétion en cholestérol membranaire induit **une déstabilisation des radeaux lipidiques**, un efflux des protéines hors de ces radeaux (Kabouridis et al., 2000, Predescu et al., 2005) et ainsi une inhibition de la transduction du signal (Harder et al., 1998). Par exemple, la déplétion de cholestérol membranaire dans des cultures primaires de neurones induit une délocalisation des récepteurs NMDA (récepteurs du glutamate pouvant initier une réponse toxique) hors des radeaux lipidiques, inhibant ainsi la réponse cytotoxique.

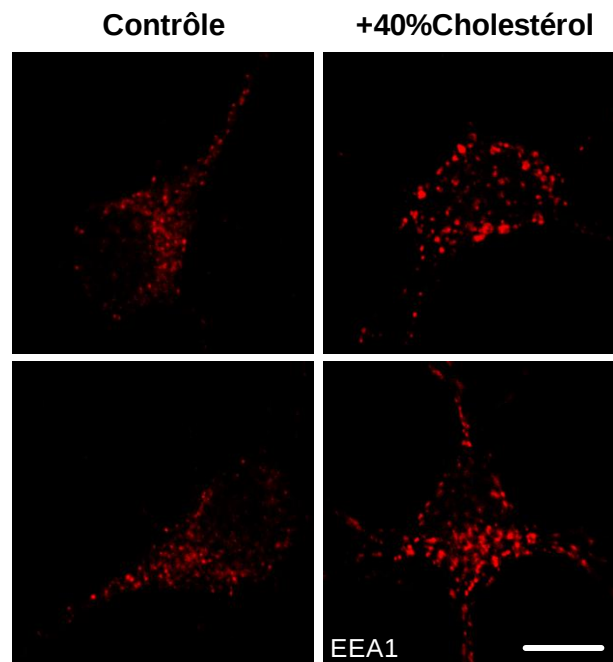


Figure 12 : La surcharge en cholestérol est associée à une augmentation de la taille des endosomes précoces :

Immunofluorescence dirigé contre la protéine EEA1 en microscopie de cellules HEK293T après un traitement de 30 minutes avec la M β CD-cholestérol (barre d'échelle : 10 μ M)

Figure inspiré de (Cossec et al., 2010)

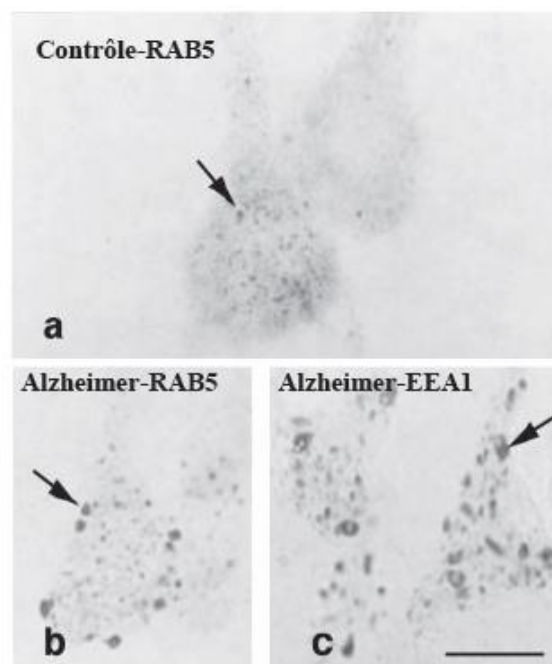


Figure 13 : Elargissement des endosomes précoces dans la maladie d'Alzheimer

Les neurones pyramidaux du cortex préfrontal de sujets contrôles ou de patients atteints de la maladie d'Alzheimer présentent des endosomes élargis visualisés par des anticorps dirigés contre deux marqueurs des endosomes précoces, Rab5 et EEA1 (Grbovic et al., 2003).

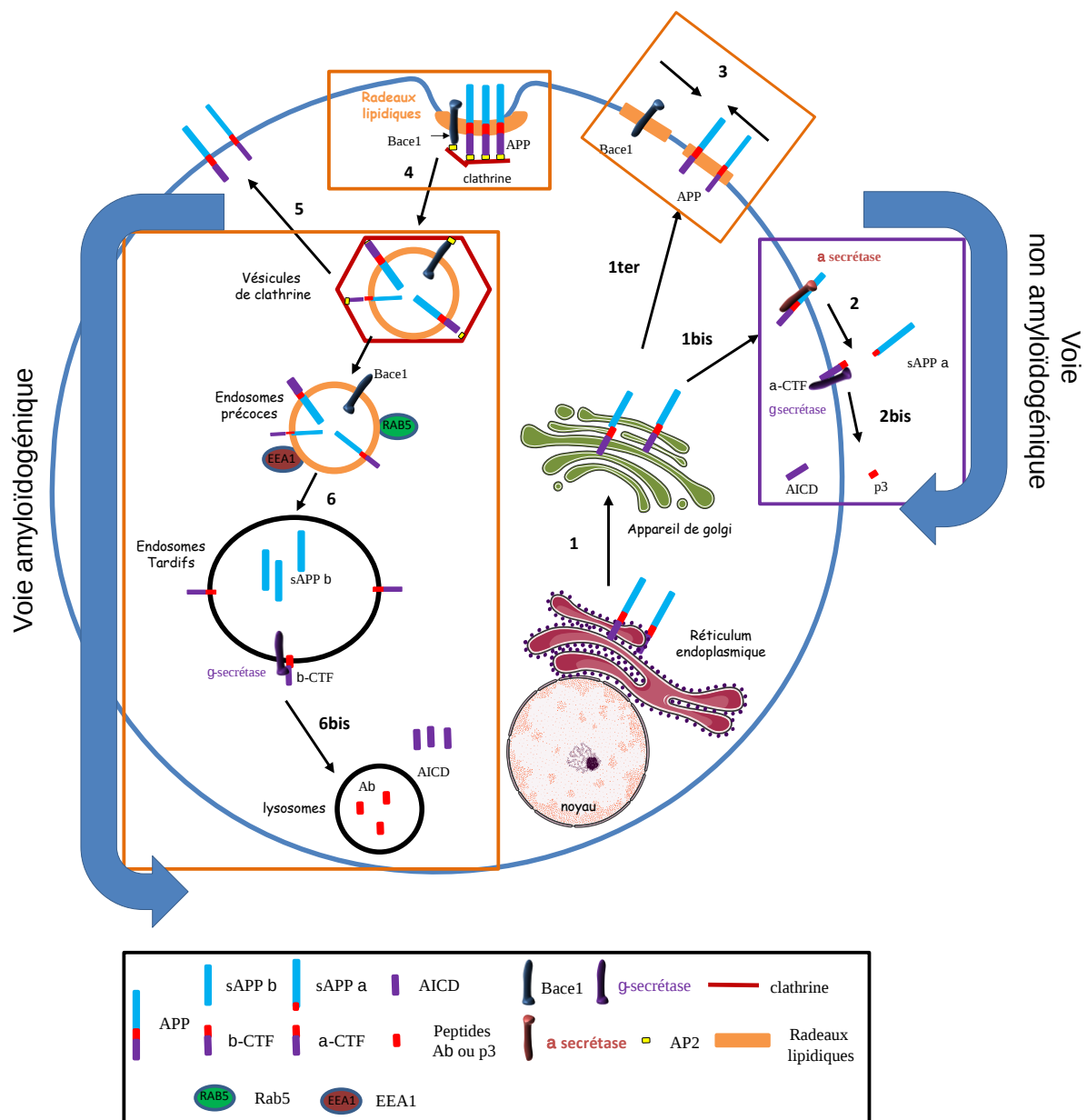
A l'inverse, un enrichissement en cholestérol des membranes entraîne un regroupement des radeaux lipidiques favorisant l'interaction des protéines et la transduction du signal dans la cellule (Marquer et al., 2011). L'augmentation du cholestérol dans les membranes favorise par exemple le recrutement des récepteurs NMDA dans les radeaux lipidiques et par conséquent la transduction de la réponse cytotoxique (Abulrob et al., 2005, Ponce et al., 2008). L'excès en cholestérol membranaire favorise l'excitotoxicité induit par les récepteurs NMDA.

1.2 Le cholestérol module l'endocytose

L'endocytose, processus membranaire permettant l'internalisation, de protéines membranaires dans des vésicules est modulé par le contenu en cholestérol membranaire.

La **diminution du cholestérol** de la membrane plasmique induit **une diminution du processus d'endocytose** (Heiniger et al., 1976). Plus récemment, plusieurs équipes ont montré que la déplétion en cholestérol de la membrane plasmique (par la méthyl β cyclodextrine) inhibe très fortement (85%) l'endocytose des récepteurs (transferrine, récepteurs de l'EGF, la protéine APP (Rodal et al., 1999, Subtil et al., 1999, Cossec et al., 2010). Ce processus est restauré après ajout de cholestérol (Heiniger et al., 1976, Rodal et al., 1999, Cossec et al., 2010).

A l'inverse, **l'enrichissement en cholestérol de la membrane plasmique** induit par un traitement de 30 minutes avec le complexe méthyl- β -cyclodextrine-cholestérol, est associé à une **augmentation du nombre et de la taille des endosomes** (Figure 12). (Cossec et al., 2010). Les endosomes élargis, caractérisés par l'expression des protéines Rab5 et EEA1 sont 32 fois plus grand. Leur volume moyen des endosomes dans les neurones est augmenté d'un facteur 2,5 (Cataldo et al., 1997). Ces endosomes dits élargis sont mis en évidence dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, ou de patients porteurs de trisomie 21, qui développent une neuropathologie de type Alzheimer à partir de l'âge de 40 ans. L'apparition de ces endosomes constitue **un évènement précoce de la pathologie** puisqu'elle survient bien avant l'apparition des plaques amyloïdes et des corps neurofibrillaires (figure 13-(Cataldo et al., 1997)). Ils sont, de plus, retrouvés uniquement dans les régions cibles de la maladie d'Alzheimer (hippocampe, cortex-(Grbovic et al., 2003)), lesquelles présentent également une augmentation du cholestérol membranaires dans la maladie d'Alzheimer (Cutler et al., 2004).



1.3 Le cholestérol module le métabolisme de la protéine APP :

La protéine APP est soumise à différents clivages selon la voie non amyloïdogénique ou la voie amyloïdogénique (Partie B de l'introduction). Ce métabolisme est finement régulé par la localisation des différents acteurs de ces voies : la protéine APP et les α -, β -, et γ -sécrétases.

1.3.1 Trafic et métabolisme de la protéine APP :

La protéine APP est synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique puis est soumise à différentes modifications post-traductionnelles dans l'appareil de Golgi. La plus grande partie des protéines APP réside au niveau de l'appareil de Golgi et du réseau trans-Golgien. Une petite fraction des protéines APP produites, est cependant acheminée à la membrane plasmique où elle se répartit entre les fractions radeaux lipidiques et non-radeaux lipidiques (Selkoe et al., 1996).

Au niveau de la **membrane plasmique** (et hors des radeaux lipidiques), la protéine APP est préférentiellement **clivée par l' α sécrétase selon la voie non amyloïdogénique** (Figure 14) (Kojro et al., 2001). L'activité de l' α -sécrétase est en effet, principalement localisée hors des radeaux lipidiques (Ehehalt et al., 2003). De plus, l'utilisation d'un dominant négatif de la dynamine 2 ou de la protéine Rab5 (impliquées dans le processus d'endocytose) induit une diminution de l'endocytose de la protéine APP accompagnée d'une augmentation de la production des fragments sAPP α , α -CTF et des peptides p3 (Carey et al., 2005, Laifenfeld et al., 2007, Cossec et al., 2010). **La localisation membranaire de la protéine APP favorise donc la voie non amyloïdogénique.**

La protéine APP est endocytée en quelques minutes grâce à la présence d'un motif d'internalisation YENPTY près de l'extrémité C-terminale (résidus 682-687 de l'isoforme APP₆₉₅) (Lai et al., 1995, Marquez-Sterling et al., 1997) par une voie dépendante des clathrines (Yamazaki et al., 1996, Cossec et al., 2010). La protéine APP transite ensuite vers les compartiments endosomaux/lysosomaux (figure 14). La protéine BACE1 a, en effet, une activité optimale à pH acide. L'endocytose de la protéine APP favorise le clivage par la β sécrétase, BACE1 et ainsi la production de peptides A β . L'inhibition de l'endocytose de la protéine APP et de la protéine BACE1 induit une diminution de la production de peptides A β (Ehehalt et al., 2003, Cossec et al., 2010). A contrario, la surexpression d'un dominant positif de la protéine Rab5 favorise la production de peptides A β (Grbovic et al., 2003). **Les clivages de la voie amyloïdogénique se déroulent donc au cours du cheminement des endosomes précoces vers les endosomes tardifs.**

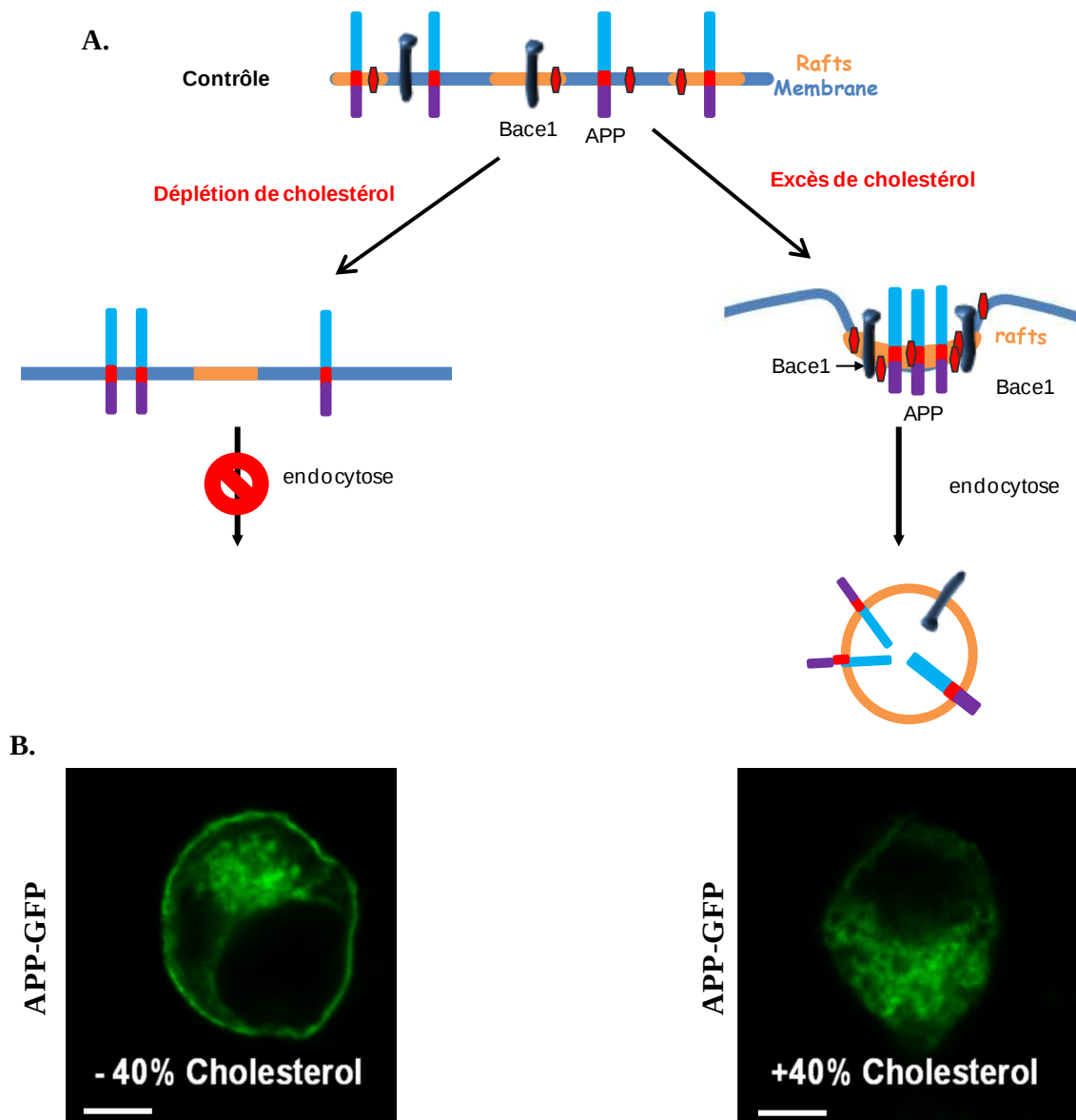


Figure 15 : Le contenu en cholestérol membranaire module la localisation re de la protéine APP.

A. Une déplétion en cholestérol membranaire conduit à une localisation préférentielle de la protéine au niveau de la membrane et une inhibition de l'endocytose de la protéine APP. Un enrichissement du cholestérol entraîne un regroupement des radeaux, une relocalisation des protéines APP et BACE1 dans les mêmes radeaux entraînant leur endocytose et favorisant la voie amyloïdogénique.

B. Immunofluorescence en confocale montrant des cellules transfectées avec une forme mutée (suédoises) de l'APP couplée à la GFP (APP^{sw}-GFP) après un traitement de 30 minutes avec la M β CD ou le complexe M β CD-cholestérol (barre d'échelle 3 μ M). *Figure inspiré de (Cossec et al., 2010)*

1.3.2 Le cholestérol module le métabolisme de la protéine APP.

Les voies non amyloïdogénique ou amyloïdogénique sont finement régulées par la localisation des protéines APP et des sécrétases, laquelle peut être modulée par le contenu en cholestérol.

➤ La déplétion en cholestérol favorise la voie non amyloïdogénique :

Une diminution du cholestérol induite par l'utilisation du composé méthyl- β -cyclodextrine ou de statines, entraîne une **relocalisation à la membrane plasmique de la protéine APP** (figure 15) associée à **une augmentation de la fraction soluble sAPP α et donc de l'activité α sécrétase** (Simons et al., 1998, Buxbaum et al., 2001, Fassbender et al., 2001, Kojro et al., 2001, Ehehalt et al., 2003, Guardia-Laguarta et al., 2009, Cossec et al., 2010). De plus, la diminution du cholestérol à la membrane plasmique **réduit le nombre et/ou la taille des radeaux lipidiques**, diminuant les possibilités d'interaction entre les protéines APP et BACE1 et la production de peptides A β (Ehehalt et al., 2003).

➤ L'excès en cholestérol favorise la voie amyloïdogénique :

La surcharge en cholestérol favorise la voie amyloïdogénique aux dépens de la voie non amyloïdogénique. En effet, celle-ci induit une diminution de la sécrétion du fragment soluble sAPP α (Kojro et al., 2001, von Arnim et al., 2008) tout en entraînant une élévation des activités β et γ sécrétases et de la sécrétion de peptides A β (von Arnim et al., 2008, Xiong et al., 2008).

L'augmentation du contenu en cholestérol **dans les radeaux lipidiques** favorise la relocalisation des protéines APP et BACE1 dans les radeaux lipidiques et ainsi leur internalisation dans des compartiments endosomaux communs. En effet, l'équipe de Marquer et al, met en évidence, par des techniques d'imagerie, qu'une exposition au cholestérol de moins de 10 minutes induit **une interaction plus importante entre les protéines APP et BACE1 à la membrane et une relocalisation de l'APP dans les radeaux lipidiques, précédant son endocytose**. Une exposition plus longue au cholestérol montre que la protéine **APP co-localise au niveau intracellulaire avec la protéine BACE1** (Marquer et al., 2011), suggérant une endocytose plus importante de la protéine APP (Figure 15). L'internalisation d'autres protéines membranaires, telles que le récepteur de la transferrine ou les récepteurs aux cannabinoïdes, n'est pas autant affectée par l'accumulation de cholestérol dans la membrane (Cossec et al., 2010). De plus, l'enrichissement du cholestérol dans la membrane plasmique par un traitement de 30 minutes avec le complexe méthyl β cyclodextrine - cholestérol, est associé à une augmentation du nombre et de la taille des endosomes (Figure 12). (Cossec et al., 2010). Dans ces endosomes, la présence des protéines APP, β -sécrétase (BACE1), γ -sécrétase (PS1) et du fragment β CTF (issu du β clivage de la voie amyloïdogénique) a été mise en évidence (Cataldo et al., 2004).

De plus, les cellules déficientes pour le gène *NPC1*, présentent une augmentation du cholestérol, une relocalisation de la protéine APP dans les radeaux lipidiques, de la production des fragments β -CTF et donc de la voie amyloïdogénique (Kosicek et al., 2010).

1.4 Modulation de l'homéostasie du calcium

L'homéostasie du calcium intracellulaire, critique notamment pour la fonction des neurones, est finement régulée (Orrenius et al., 1996). La concentration cytoplasmique du calcium est, en effet, **très faible** (1 μ M). Une **augmentation** du calcium intracellulaire peut entraîner des processus **cytotoxiques** et déclencher un processus de perte neuronale (Orrenius et al., 2003).

De nombreuses études mettent en évidence **un lien entre l'accumulation de cholestérol au niveau de la membrane et l'augmentation du calcium intracellulaire**. L'enrichissement en cholestérol au niveau de la membrane des cellules musculaires, induit, en effet, une augmentation de l'import de calcium dans la cellule et par conséquent de sa concentration intracellulaire (Gleason et al., 1991). **Le niveau de l'augmentation du calcium intracytoplasmique est corrélé avec le niveau d'enrichissement du cholestérol membranaire**. Ce processus est aboli par la suppression de cholestérol ou par l'utilisation d'un inhibiteur des canaux calciques impliqué dans l'import de calcium (Bialecki et al., 1991, Gleason et al., 1991). De même, un régime enrichi en cholestérol chez le lapin, responsable d'une accumulation du cholestérol membranaire, entraîne une augmentation de l'influx de calcium dans les cellules aortiques (Tulenکو et al., 1997).

L'augmentation du calcium intracellulaire induit l'activation des calpaïnes, protéases cytoplasmiques dont l'activation est dépendante du calcium (Orrenius et al., 2003). Les calpaïnes, synthétisées sous forme de pro-enzyme, sont activées par une augmentation du calcium cytoplasmique. De nombreux substrats de ces calpaïnes sont impliqués dans les processus apoptotiques. Un de ces substrats est la pro-caspase 12, qui à son tour active les caspases 9 et 3 (Morishima et al., 2002, Rao et al., 2002).

1.5 Cholestérol membranaire et métabolisme des sphingolipides :

Les sphingolipides sont des constituants essentiels des membranes cellulaires et notamment des radeaux lipidiques. Ils forment un complexe avec le cholestérol, formant un « **duo bénéfique** » afin de maintenir l'intégrité des membranes, la signalisation intracellulaire, etc...

Cependant, ils sont aussi « **partenaires de crimes** » lorsque leur homéostasie est modifiée, notamment dans de nombreux désordres neurologiques incluant les lésions cérébrales, les désordres bipolaires et les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Niemann-Pick, la maladie de Huntington (Adibhatla and Hatcher, 2007).

1.5.1 Les différents types de sphingolipides :

Leur structure de base est celle d'un squelette sphingosine ou sphinganine, comportant une fonction alcool primaire. Les chaînes d'acide gras observées chez les sphingolipides sont à chaîne courte C16 et C18 (16 ou 18 carbones) ou à longue chaîne (C24, C26:0).

Les **céramides** (Cer) sont les **sphingolipides les plus simples** dont ils constituent l'architecture de base. Un acide gras est lié aux squelettes sphingosine ou sphinganine par une liaison amide

L'association entre le céramide et la phosphocholine donnera la **sphingomyéline**.

L'ajout du galactose ou du glucose à une céramide donnera respectivement le **galactosylcéramide et le glucosylcéramide**.

Enfin, les céramides peuvent s'associer avec des sucres plus complexes pour former des glycosphingolipides (**gangliosides**).

1.5.2 Sphingolipides et processus apoptotiques.

➤ **Céramide :**

Les céramides peuvent favoriser l'apoptose à plusieurs niveaux. Ils peuvent, par exemple, induire des modifications de l'activité de la cathepsine D d'origine lysosomale permettant le clivage de la protéine BID, lequel ensuite entraîne une libération du cytochrome c et la formation de l'apoptosome (caspase 9). De plus, plusieurs études démontrent une association entre une augmentation de la concentration des céramides et l'activation de la caspase 3 (Levade et al., 2002, Heinrich et al., 2004). Enfin, l'augmentation de la production des céramides peut induire des perturbations de l'homéostasie du calcium ou des protéines mitochondriales de la chaîne respiratoire entraînant la génération de molécules du stress oxydatif (Bionda et al., 2004, Birbes et al., 2005)

Les céramides sont de plus, impliqués dans la stabilisation de la protéine BACE1 ou β secrétase intervenant dans la première étape de la voie amyloïdogénique (partie B de l'introduction) au niveau des radeaux lipidiques, favorisant la voie amyloïdogénique (Puglielli et al., 2003a).

➤ **Gangliosides :**

Les gangliosides présents au niveau de la membrane plasmique et notamment des radeaux, peuvent constituer des points d'ancrage pour des récepteurs de nombreux ligands (hormones, facteurs de croissance, etc.). Ils peuvent également réguler l'homéostasie du calcium en modulant l'activité des canaux calciques de la membrane plasmique et du réticulum endoplasmique. Néanmoins, la modulation (activation ou inhibition) semble dépendre du type de gangliosides (Wang et al., 1999).

1.5.3 Augmentation des céramides et du cholestérol dans les régions de stress oxydatif.

Une augmentation du contenu **en céramide à longues chaînes**, des galactosylcéramide et d'une diminution de la concentration en sphingomyéline a été rapporté dès les stades précoces, dans dans le gyrus frontal (région où est détectée la présence de plaques séniles et de corps neurofibrillaires), mais n'est pas retrouvée dans les régions non atteintes par la pathologie (cervelet) (Han et al., 2002, Cutler et al., 2004, Katsel et al., 2007, He et al., 2010). Cette élévation corrèle positivement avec la sévérité de la pathologie (Cutler et al., 2004). De plus, l'équipe de Han et al montre une élévation du taux de céramide dans les stades précoces de la maladie et une diminution à des stades plus avancés (Han et al., 2002), **suggérant un shift du métabolisme des sphingolipides vers une accumulation de céramides à des temps précoces de la maladie d'Alzheimer**. Elle s'accompagne **d'une augmentation du contenu en cholestérol** dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

Ces données suggèrent un lien entre l'accumulation de cholestérol et de céramides dans les régions présentant un stress oxydatif.

1.5.4 Influence du cholestérol sur le métabolisme des sphingolipides :

1.5.4.1 Trafic et métabolisme des sphingolipides.

Les céramides sont à l'interface de la synthèse et du catabolisme des sphingolipides. Ce métabolisme est assez complexe (figure 16).

a. Synthèse des sphingolipides

La synthèse débute au niveau du réticulum endoplasmique par la production de **céramides**. Tout d'abord, la Serine Palmitoyl Transferase (SPT) induit la condensation d'une sérine et d'un palmitate (palmitoyl coA) pour former la 3 keto-dihydrosphingosine (3KdhSph) (Mandon et al., 1992). Celle-ci est ensuite réduite en dihydrosphingosine (DhSph) qui subit une acylation par une **céramide synthase** pour donner le dihydrocéramide (dhCer) (Hirschberg et al., 1993).

La céramide-dénaturase conduit enfin à la formation du céramide (Cer) ((Hannun and Obeid, 2008)- étape 1 de la figure 16).

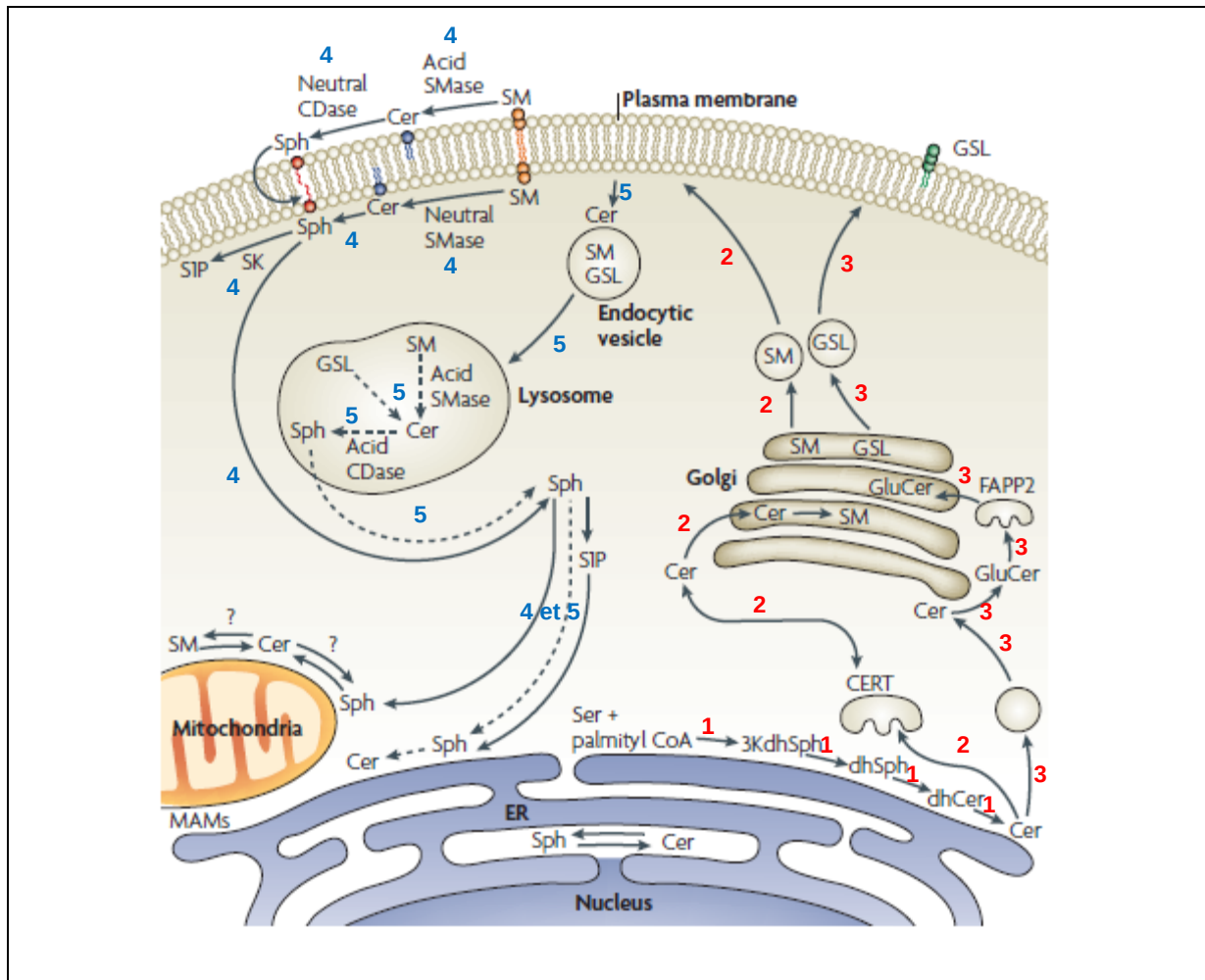


Figure 16: Métabolisme des sphingomyélines.

Les étapes **1** correspondent à la synthèse de céramide dans le réticulum endoplasmique à partir d'une sérine et d'un palmitate.

Les étapes **2** représentent la synthèse de sphingomyéline tandis que les étapes **3** sont celles de la synthèse de glycosphingolipides (et gangliosides).

Les étapes **4** correspondent à la dégradation des sphingomyéline au niveau de la membrane plasmique et les étapes **5** décrivent la dégradation lysosomale des sphingomyéline et des glycosphingolipides.

Figure inspiré de (Hannun and Obeid, 2008)

Les céramides sont ensuite transportés vers l'appareil de golgi où ils peuvent dériver en **sphingomyélines ou en glucosylcéramides**.

➤ **Synthèse des sphingomyélines :**

Les céramides sont transportés au niveau de la face interne de l'appareil de golgi par l'intermédiaire de la protéine de transfert CERT. La sphingomyéline synthase transfère la phosphocholine d'une phosphatidylcholine au céramide pour former la sphingomyéline et le diacylglycérol. Les molécules de sphingomyéline quittent l'appareil de golgi dans des vésicules qui fusionnent avec la membrane plasmique. Les sphingomyélines se répartissent sur les feuillettes internes et externes de la membrane plasmique (étape 2 de la figure 16).

➤ **Synthèse des glucosylcéramide, précurseurs des gangliosides :**

Pour cette étape, le céramide est transporté du réticulum endoplasmique vers la face externe de l'appareil de golgi. La fixation d'une molécule de glucose sur des céramides par l'UDP Glucose Ceramide Glucosyltransférase forment les glucosylcéramides qui sont ensuite transférés *via* un flip de la membrane par la protéine FAPP2 à l'intérieur de l'appareil de golgi et rapidement convertis en **lactosylcéramides**. Ceux-ci sont les **précurseurs communs des glycosphingolipides complexes et des gangliosides** (d'Azzo et al., 2006). Pour former ces lipides, la galactosyltransférase I transfère une molécule de galactose provenant d'une UDP galactose.

Les **gangliosides** sont ensuite formés à partir de l'ajout successif de sucres au lactosylcéramide. Le produit final du métabolisme des gangliosides est inséré dans des vésicules pour ensuite fusionner à la membrane plasmique. Les gangliosides se situent sur le feuillet externe de la membrane (étape 3 de la figure 16).

b. Dégradation des sphingolipides :

Au niveau de la membrane plasmique, deux mécanismes de dégradation sont possibles. Ils se déroulent dans des compartiments cellulaires particuliers.

➤ **Dégradation au niveau de la membrane plasmique :**

La première voie met en jeu les **sphingomyélinases**. La réaction induite par ces enzymes consiste à dissocier le groupement phosphocholine des sphingomyélines, pour générer des céramides. Deux types de sphingomyélinases sont mis en évidence au niveau de la membrane plasmique. La **sphingomyélinase acide** (pH optimal acide) est située sur le feuillet externe de la membrane plasmique tandis que la **sphingomyélinase neutre** (pH optimal neutre) se trouve au niveau du feuillet interne. Les céramides sont ensuite convertis en sphingosine par une céramidase. La sphingosine pourra alors servir pour synthétiser de nouveau des céramides ou être phosphorylée pour former la sphingosine 1 phosphate. La sphingosine 1 phosphate peut ensuite être déphosphorylée pour redonner de la sphingosine et redonner des céramides (étape 4 de la figure 16).

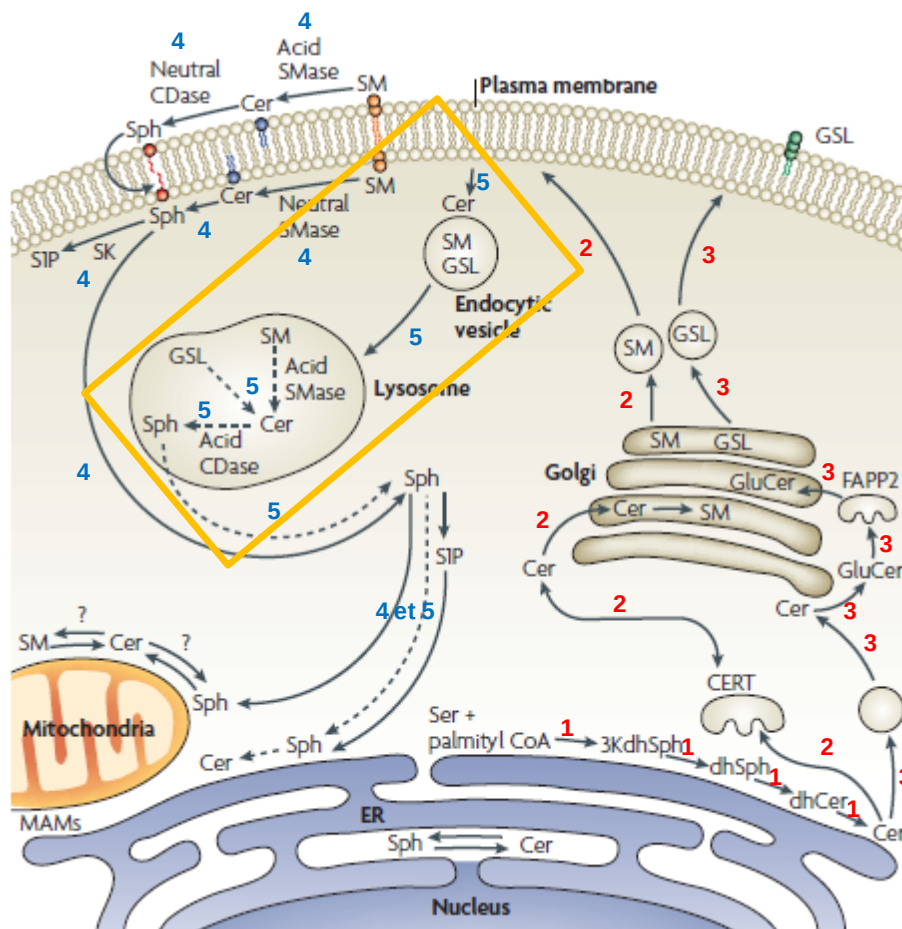


Figure 17: Influence du cholestérol sur le métabolisme des sphingomyélines.

Les étapes **1** correspondent à la synthèse de céramide dans le réticulum endoplasmique à partir d'une sérine et d'un palmitate.

Les étapes **2** représentent la synthèse de sphingomyéline tandis que les étapes **3** sont celles de la synthèse de glycosphingolipides (et gangliosides).

Les étapes **4** correspondent à la dégradation des sphingomyéline au niveau de la membrane plasmique et les étapes **5** décrivent la dégradation lysosomale des sphingomyéline et des glycosphingolipides.

Figure inspiré de (Hannun and Obeid, 2008)

➤ **Dégradation dans les compartiments endosomaux :**

La deuxième voie consiste en **une internalisation de la sphingomyéline et des glycosphingolipides complexes** (gangliosides) dans le compartiment endosomal/lysosomal. Les lysosomes offrent un milieu optimal pour la dégradation de ces deux lipides. La sphingomyéline est dégradée en céramide par la **sphingomyélinase acide** de manière similaire à la réaction observée au niveau de la membrane plasmique. Les gangliosides exposent leur chaîne glycanique au niveau de la phase luminale du lysosome où elles sont accessibles à des exoglycosidases spécifiques.

Ces réactions aboutissent à la formation de lactosylcéramide qui est ensuite converti en céramide par l'action séquentielle d'une β galactosidase et d'une β glucosidase. Le céramide est ensuite transformé en sphingosine qui peut ensuite être exportée du lysosome et redonnée de nouveau des céramides ou être convertie en sphingosine 1 phosphate (étape 5 de la figure 16).

1.5.4.2 Le cholestérol pourrait moduler le trafic des sphingolipides.

L'utilisation de lactosylcéramide couplé à une sonde fluorescente permet d'évaluer l'effet du cholestérol sur le trafic intracellulaire de ce lipide. **La surcharge en cholestérol membranaire déclenche un switch du trafic des sphingolipides de la voie de biosynthèse (appareil de Golgi) vers la voie de dégradation lysosomale** (Puri et al., 1999, Pagano, 2003, Hortsch et al., 2010). Ce switch pourrait entraîner une dégradation plus importante des sphingolipides en céramide (figure 17).

1.5.5 Conclusion :

Une accumulation de cholestérol et de céramide est uniquement retrouvée dans les régions cérébrales présentant un stress oxydatif suggérant que ce stress induirait ces accumulations.

En parallèle, une surcharge en cholestérol membranaire semble favoriser une localisation des sphingolipides dans les lysosomes et leur dégradation en céramide.

Ces données posent la question de la surcharge de cholestérol membranaire comme cause ou conséquence de l'accumulation de céramide.

2 Processus toxique induit par l'accumulation de cholestérol : réponse UPR

2.1 Cholestérol : inducteur d'une réponse UPR

Le réticulum endoplasmique (RE) assure de nombreuses fonctions nécessaires à l'homéostasie et à la survie de la cellule :

- **Synthèse de lipides** : cholestérol, phospholipides, sphingomyéline et glycosphingolipides.
- **Homéostasie du calcium** (stockage) : La concentration en calcium dans le RE est de 2 à 5mM pour 1µM dans le cytoplasme (Orrenius et al., 1996).
- **Synthèse des protéines et contrôle qualité des protéines** :

Les protéines synthétisées sous forme de chaînes polypeptidiques, sont soumises à un processus de repliement et de maturation des protéines. Ceui-ci permet le passage d'un état déplié (protéines inactives) à un état replié correspondant à **la conformation biologiquement active** de la protéine.

Ce système moléculaire met en jeu des protéines chaperonnes (*Glucose Related Protein* GRP78 ou GRP94, calnexine, calréticuline), des enzymes spécialisées dans le repliement de protéines, (PDI pour *Protein Disulfide Isomérase*) (Gaut et Hendershot, 1993). Celles-ci représentent des points de contrôles à partir desquels les protéines correctement repliées poursuivent leur progression et les protéines non conformes sont aiguillées vers le processus de dégradation (système ERAD-*Endoplasmic Reticulum Associated Degradation*). Ce système induit l'export des protéines « incorrectes » vers le cytoplasme où elles sont dégradées par le protéasome.

Dans diverses conditions de stress, les protéines de conformations anormales s'accumulent dans le RE, et conduisent à une réponse aux protéines mal repliées ou réponse UPR («Unfolded Protein Response»), qui possède deux composantes. La première consiste à **activer la transcription de gènes impliqués dans le repliement des protéines** (protéines chaperonnes) et à **dégrader plus activement les protéines incorrectement repliées** (du système ERAD). La seconde composante de la réponse UPR est une **répression rapide et intense de la synthèse protéique** qui limite l'afflux de nouvelles protéines dans le RE et évite ainsi la surcharge de cet organe (Kaufman, 2002, Schroder and Kaufman, 2005). Lorsque ces deux composantes ne peuvent remédier à une situation de stress trop intense ou de trop longue durée, la réponse UPR aboutit à **l'apoptose** (Breckenridge et al., 2003).

Le RE est un organe physiologiquement pauvre en cholestérol. L'accumulation de cholestérol dans le RE est à l'origine **d'une déplétion des stocks calciques du RE**. (Treiman, 2002, Feng et al., 2003) perturbant la fonction de la majorité des protéines chaperonnes du RE (Zhang and Kaufman, 2003) et induisant une réponse UPR. Le mécanisme à l'origine de cette déplétion n'est pas complètement élucidé. Cependant, un enrichissement en cholestérol de la membrane du réticulum endoplasmique entraîne l'inhibition de la fonction de la protéine SERCA2b (Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase 2b).

Réponse adaptative

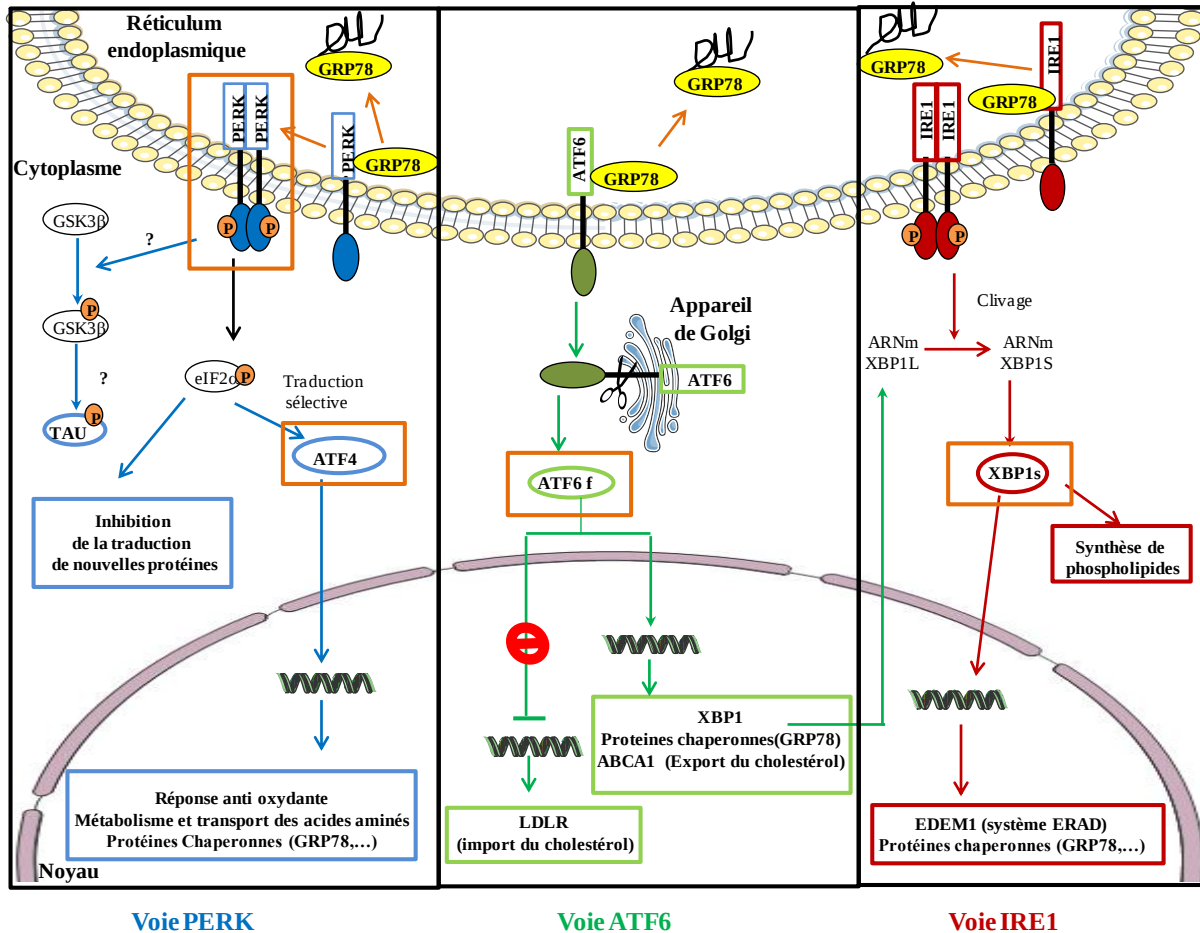


Figure 18 : Réponse UPR adaptative

Voie activée par la protéine PERK : En présence d'un stress cellulaire, la protéine Grp78 se dissocie de la protéine PERK permettant sa dimérisation et son activation. La protéine PERK activée phosphoryle la protéine eIF2α induisant l'inhibition de la traduction de nouvelles protéines et une traduction sélective de la protéine ATF4. En parallèle, la protéine pPERK phosphoryle la protéine GSK3β qui peut, elle-même, phosphoryler la protéine Tau. Cependant, le lien entre ces trois protéines n'est pas clairement établi.

Voie activée par la protéine ATF6 : La dissociation des protéines GRP78 et ATF6 entraîne la translocation de cette protéine vers l'appareil de golgi où il sera clivé pour former le facteur de transcription ATF6f. Ce facteur induit l'expression de gènes codant la protéine XBP1, les protéines chaperonnes GRP78 et la protéine ABCA1 contrôlant l'export cellulaire du cholestérol. De plus, il inhibe l'expression du gène LDLR impliqué dans l'import intracellulaire de cholestérol.

Voie activée par la protéine IRE1 : La dissociation du complexe GRP78-IRE1 induit la dimérisation et l'activation de la protéine IRE1. Cette endoribonucléase clive le transcrit XBP1 pour former un facteur de transcription, XBP1s, qui va ensuite induire l'expression des gènes codant les protéines EDEM1 impliquées dans le système ERAD (dégradation des protéines). La surexpression du facteur XBP1s a également été associée à une augmentation de la synthèse des phospholipides.

Les carrés oranges correspondent aux éléments activés par une accumulation de cholestérol dans les macrophages durant l'athérosclérose.

Cette protéine est impliquée dans la séquestration du calcium dans le RE. L'inhibition de cette pompe induit une augmentation du calcium cytoplasmique et **est corrélée avec le niveau d'enrichissement en cholestérol** (Li et al., 2004, Liang et al., 2012).

2.2 Réponse adaptative :

Au niveau du RE, trois protéines servent de senseurs pour la réponse UPR (Xu et al., 2005, Ron and Walter, 2007) (figure 18) :

➤ La protéine **PERK** (*Protein kinase RNA like ER Kinase*) impliquée dans **l'atténuation de la traduction** afin de réduire l'apport de nouvelles protéines dans le RE et ainsi limiter l'accumulation de protéines mal repliées.

➤ la protéine **ATF6** (*Activating Transcription Factor 6*) impliquée dans le mécanisme de **repliement des protéines** permettant ainsi une capacité plus importante de la gestion des protéines mal repliées.

➤ la protéine **IRE1** (*Inositol REquired protein 1*) impliquée dans l'augmentation du système de dégradation des protéines mal repliées ou **système ERAD**.

Ces trois voies sont activées dans les macrophages en réponse à une surcharge en cholestérol (figure 18).

Ces trois protéines sont, **physiologiquement, associées à la protéine chaperonne GRP78, les rendant inactives**. La protéine GRP78 est impliquée dans l'assistance aux protéines néosynthétisées pour se replier et acquérir leur structure. L'accumulation de protéines mal repliées entraîne la réquisition de la protéine GRP78. De plus, l'association de la protéine GRP78 et des senseurs de la réponse UPR est dépendante du calcium présent dans le réticulum endoplasmique. Une déplétion des stocks calciques pourrait entraîner une dissociation de ces complexes, induisant l'activation des trois senseurs de la réponse UPR (Lievremont et al., 1997, Schroder and Kaufman, 2005)..

2.2.1 Voie induite par la protéine PERK

2.2.1.1 Mécanisme d'activation de la protéine PERK :

A l'état basal, la portion luminale N-terminal de **la protéine PERK est associée à la protéine chaperonne GRP78** (*Glucose Regulated Protein 78*) (Schroder and Kaufman, 2005).

En situation de stress, la **protéine PERK se dissocie de la protéine GRP78**, permettant sa dimérisation et son activation par trans-autophosphorylation (Schroder and Kaufman, 2005). La voie induite par l'activation de la protéine PERK conduit à une atténuation de la synthèse protéique, une traduction sélective du facteur ATF4 induisant l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse des acides aminés, dans la synthèse du glutathion et la résistance au stress oxydatif. Cette voie serait également associée à la phosphorylation de la protéine GSK3β.

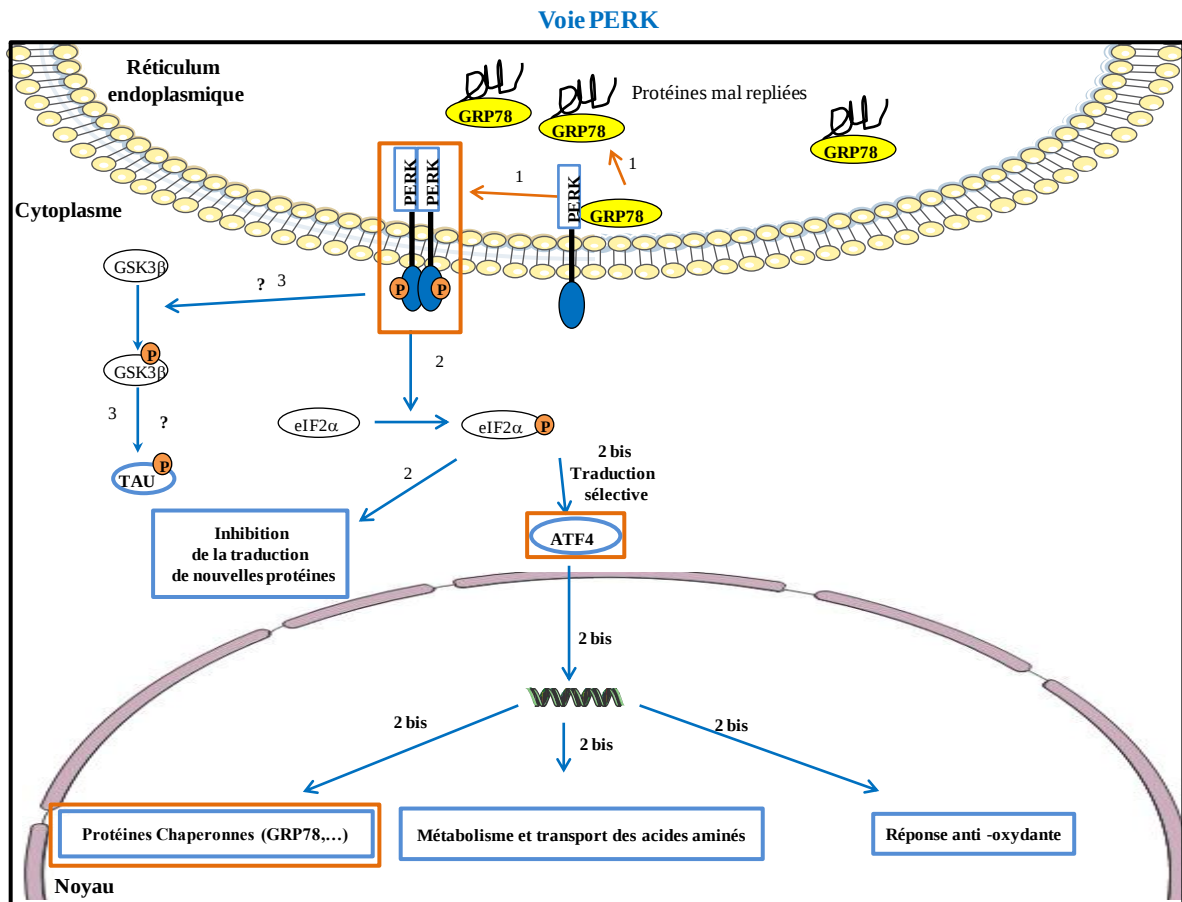


Figure 19: Voie activée par la protéine PERK dans la réponse UPR

(1) La réponse UPR induit la dissociation de la protéine GRP78 et de la protéine PERK, permettant sa dimérisation et sa phosphorylation. (2) La protéine phosphoPERK phosphoryle la protéine eIF2α entraînant l'inhibition de la traduction de nouvelles protéines. (2bis) En parallèle, la traduction sélective de la protéine ATF4 induit l'expression de gènes codant des protéines chaperonnes, des protéines impliquées dans le métabolisme des acides aminés ou la réponse oxydante. (3) La protéine phosphoPERK peut également induire la phosphorylation de la protéine GSK3β puis de la protéine Tau. La relation entre ces trois éléments n'est pas clairement établie.

Les carrés oranges correspondent aux éléments activés par une accumulation de cholestérol dans les macrophages durant l'athérosclérose.

2.2.1.2 Conséquences de l'activation de la protéine PERK

➤ Atténuation de la synthèse protéique :

L'activation de la protéine PERK permet d'induire **l'atténuation de la synthèse protéique** afin de réduire l'apport de nouvelles protéines dans le RE et donc l'accumulation de protéines mal repliées. La protéine pPERK phosphoryle la sous unité α de la protéine eIF2 α (*eucaryotic Initiation Factor 2 alpha*) au niveau de la serine 51, la rendant inactive (figure 19). En effet, des cellules exprimant dix fois moins de protéines PERK abolissent la phosphorylation de la protéine eIF2 α en réponse à une réponse UPR, et présentent une sensibilité plus importante à ce stress (Harding et al., 2000b).

La protéine eIF2 α est un **facteur d'initiation de la traduction** des transcrits en protéines et intervient dans les étapes précoces de la synthèse des protéines. La protéine eIF2 α couplée à une molécule GDP correspond à la forme inactive tandis que la protéine couplée à une molécule de GTP est la forme active. Le complexe eIF2 α /eIF2 β /GTP se lie à une sous unité ribosomale 40s puis à l'extrémité 5' du transcrit pour donner un complexe de pré-initiation 43s. Ce complexe scanne l'ARNm jusqu'à arriver au premier triplet AUG de l'ARNm, codant pour l'acide aminé méthionine. La jonction de la sous unité 60s sur ce complexe 43s constitue le complexe 80s.

La phosphorylation de la protéine eIF2 α entraîne une plus grande stabilité de la forme inactive eIF2 α /GDP/eIF2 β , empêchant l'échange entre la molécule GDP et GTP (figure 19). La phosphorylation de la protéine eIF2 α réduit donc la formation du complexe de pré-initiation 43s et par conséquent diminue la synthèse de la majorité des protéines (Harding et al., 1999).

➤ Traduction de la protéine ATF4 :

Paradoxalement, la diminution globale de la synthèse des protéines entraîne la **traduction préférentielle du facteur de transcription ATF-4** (*Activating Transcription Factor 4*-(Scheuner et al., 2001)) (Figure 19). L'extrémité 5' des transcrits ATF4 contient des petites séquences uORF, lesquelles, en condition physiologique, répriment la traduction des transcrits codant ATF-4. L'inhibition de la protéine eIF2 α inhibe ces uORFs favorisant sélectivement la traduction des transcrits codant le facteur de transcription ATF-4 (Harding et al., 2000a, Scheuner et al., 2001). La protéine ATF-4 est un facteur de transcription avec un motif de type leucine-zipper. Les gènes cibles de ce facteur interviennent **dans la biosynthèse des acides aminés, dans la synthèse du glutathion et la résistance au stress oxydatif** (Scheuner et al., 2001). Il contrôle l'expression du gène codant pour les protéines **CHOP, GADD34 et ATF3** (Harding et al., 2000a).

Une augmentation de l'expression de la protéine ATF4 a été rapportée dans les macrophages présentant une surcharge en cholestérol (Feng et al., 2003).

➤ Phosphorylation des protéines GSK3 β et TAU :

Une autre cible de la protéine kinase PERK semble être la protéine **GSK3 β** . En effet, un inducteur du stress du RE, la thapsinargine, induit une phosphorylation de la protéine GSK3 β sur le **site Tyrosine 216**, la rendant active. Cet effet n'est pas observé dans les cellules invalidées pour le gène codant la protéine kinase PERK (Baltzis et al., 2007).

D'autre part, la protéine pPERK **co-localise** avec la protéine **Tau phosphorylée** sur la sérine 202 (AT8), sur les résidus Serine 212/Thréonine 214 (AT100) ou sur le site Thréonine 181 (AT270). La protéine pPERK est **très peu exprimée** dans les neurones présentant **des corps neurofibrillaires** (Hoozemans et al., 2009). Une corrélation **inverse** est observée entre l'activation de la réponse UPR et la présence de corps neurofibrillaires, suggérant que l'activation de la réponse UPR est associée à la pathologie précoce de la composante Tau. L'association entre les marqueurs de la réponse UPR et la phosphorylation de la protéine Tau est également retrouvée dans les tauopathies (en absence de pathologie amyloïde) et dans la maladie de Niemann Pick (accumulation intracellulaire de cholestérol).

En parallèle, une augmentation de la forme active de la protéine GSK3 β est retrouvée dans le cortex frontal de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Cette forme active est détectée dans les neurones présentant un marquage diffus de la protéine Tau phosphorylée avant la formation de corps neurofibrillaires (Leroy et al., 2007).

Ces études mettent en évidence un lien entre l'expression de la protéine pPERK, d'une part, avec la protéine TAU phosphorylée et d'autre part avec la protéine GSK3 β . Néanmoins, l'interaction directe entre ces trois éléments reste encore à déterminer.

2.2.2 Voie dépendante de la protéine ATF-6

2.2.2.1 Mécanismes d'activation de protéine ATF6 :

Le facteur ATF-6 est une protéine transmembranaire du RE. La dissociation de la protéine GRP78, de la protéine ATF-6 entraîne sa translocation vers l'appareil de Golgi où elle sera clivée, dans un premier temps, par la protéase S1P puis par la protéase S2P au niveau de la région intramembranaire. Ces clivages permettent la libération dans le cytoplasme d'un fragment nommé ATF-6f (f pour fragment) (Hong et al., 2004, Nakanaka et al., 2006). L'ATF-6f migre ensuite dans le noyau, se fixe sur l'ADN afin de réguler l'expression des gènes cibles présentant une séquence du stress du RE (ERSE) dans leur promoteur (Figure 20 (Schroder and Kaufman, 2005)).

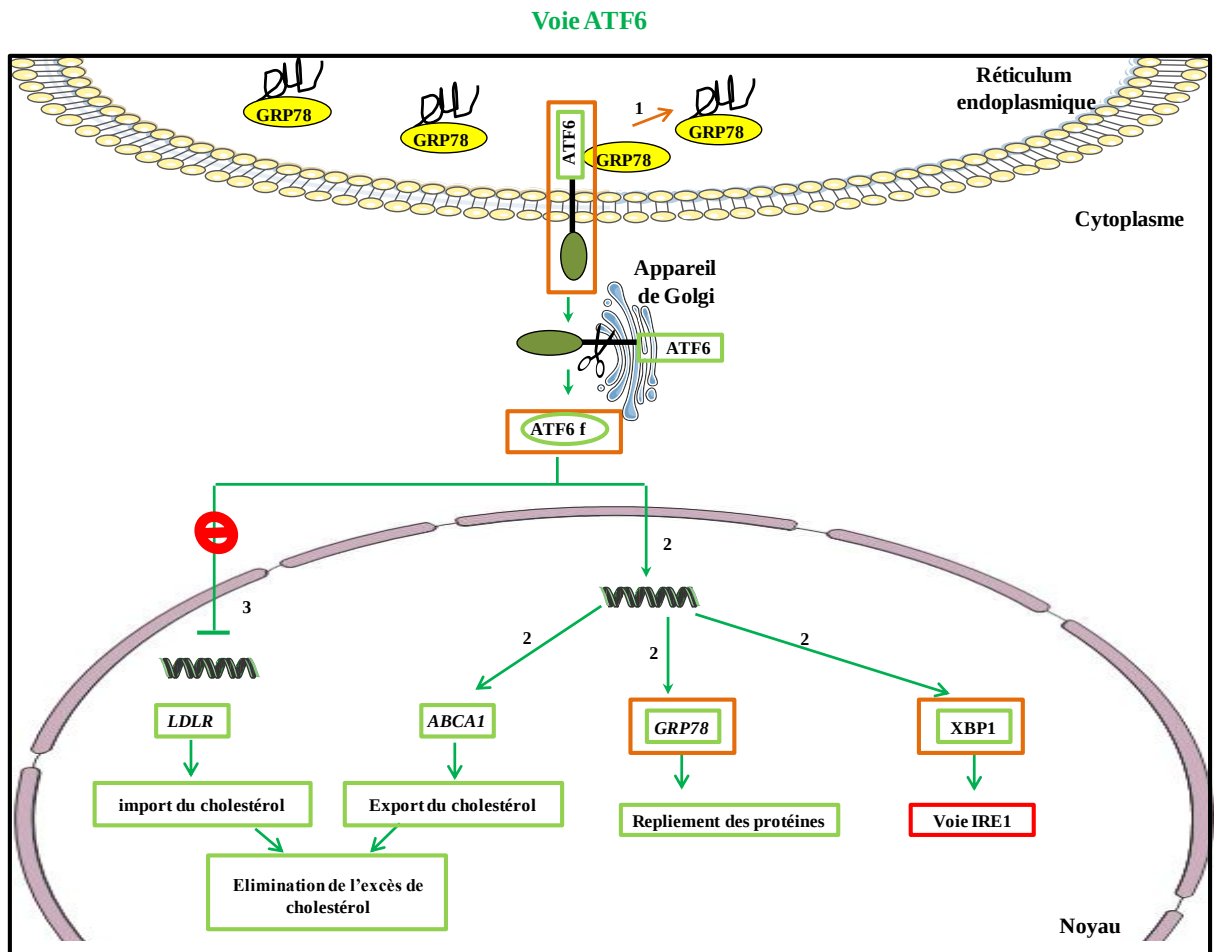


Figure 20: Voie activée par la protéine ATF6 dans la réponse UPR :

(1) La réponse UPR induit la dissociation des protéines GRP78-ATF6 entraînant la migration de la protéine ATF6 vers l'appareil de Golgi et son clivage par deux protéases S1P et S2P pour former le facteur de transcription ATF6f. (2) Ce facteur conduit à une augmentation de l'expression des gènes codant la protéine XBP1 impliquée dans la voie activée par la protéine IRE1 (troisième senseur de la réponse UPR), les protéines chaperonnes (GRP78) et la protéine ABCA1 contrôlant l'export du cholestérol. (3) En parallèle, il inhibe l'expression du gène *Ldlr* permettant l'import du cholestérol dans la cellule.

Les carrés oranges correspondent aux éléments modulés par une accumulation de cholestérol dans les macrophages présentant une surcharge en cholestérol.

2.2.2.2 Conséquences de l'activation de la voie.

➤ **Induction transcriptionnelle de gènes codant l'expression de protéines chaperonnes :**

Les gènes cibles du fragment ATF6f codent des protéines chaperonnes telles que **GRP78**, **GRP94** et la **protéine disulfide kinase** ainsi que le facteur **XPB1** (*X-box binding protein 1*) impliqué dans la voie activée par le troisième senseur (IRE1) de la réponse UPR.

➤ **Régulation de l'import intracellulaire de cholestérol par inhibition de l'expression du gène *LDLR* :**

La protéine ATF6 est soumise au même type de clivage protéolytique que la protéine SREBP2 (*Sterol Regulatory Element Binding Protein 2*, régulateur du métabolisme du cholestérol) au niveau de l'appareil de Golgi. La protéine ATF-6f peut donc s'associer avec la forme active du facteur de transcription SREBP2, migrer dans le noyau, se fixer sur la séquence SRE (*Sterol Regulatory Element*) du promoteur du gène *LDLR* (*Low Density Lipoparticles Receptor*), recruter un répresseur de la transcription, HDAC1 (*Histone Déacétylase*) sur ce promoteur et **ainsi inhiber l'expression du gène *LDLR*** (Zeng et al., 2004).

➤ **Régulation de l'export extracellulaire du cholestérol par l'activation de l'expression du gène *ABCA1* :**

La protéine ATF6 peut également se fixer sur le promoteur du gène *ABCA1* (premier membre de la famille des transporteurs ABC, *ATP Binding Protein*) et **activer l'expression** de ce gène. La surexpression de la forme active du facteur de transcription ATF6 par l'injection d'un adénovirus dans le foie de souris C57Bl/6, conduit à une augmentation des transcrits du gène *Abca1* (Hongling, Li, 2006).

Par conséquent, la protéine ATF6 pourrait donc diminuer l'import et augmenter l'export du cholestérol de la cellule. Ces deux processus permettraient de réguler l'excès de cholestérol dans la cellule.

Voie IRE1

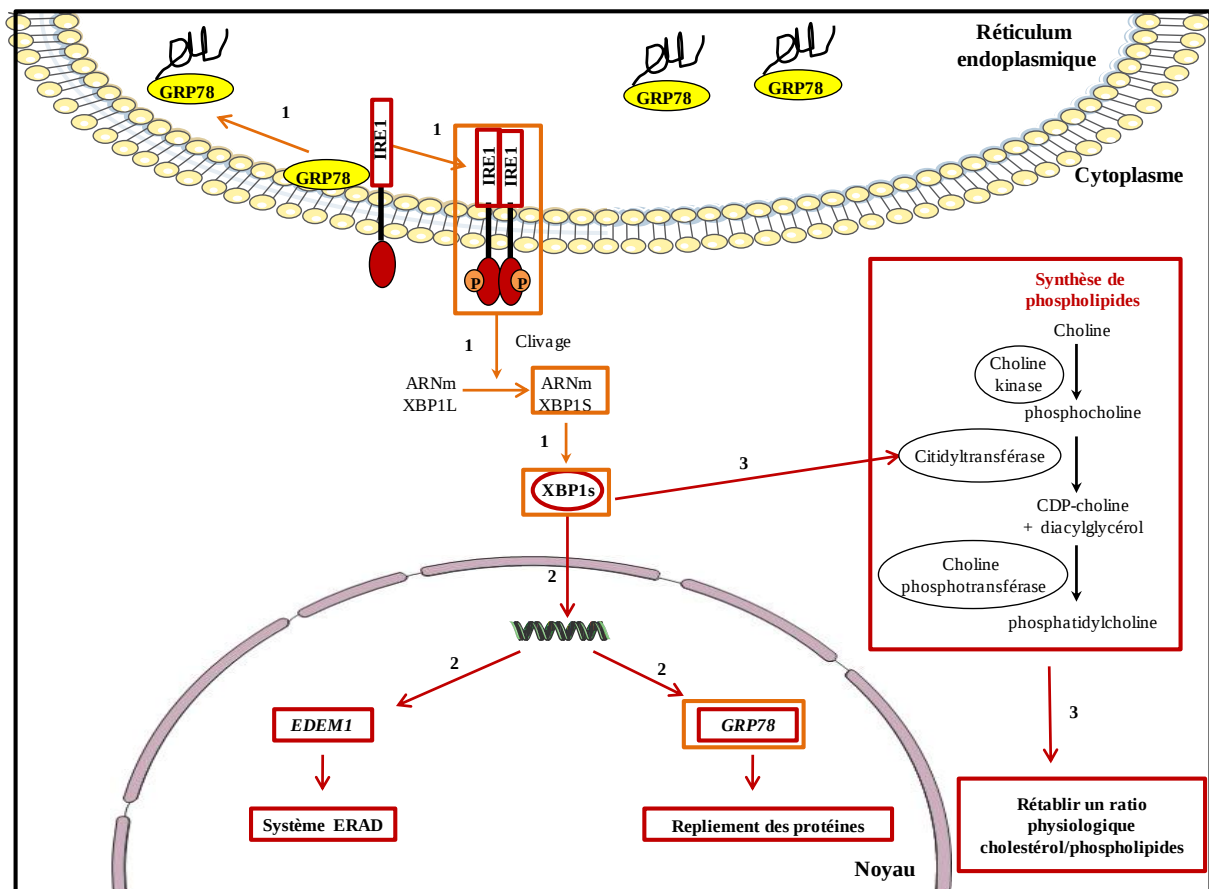


Figure 21: Voie activée par la protéine IRE1 lors de la réponse UPR.

(1) Lors d'une réponse UPR, après dissociation avec la protéine GRP78, les dimères de protéine IRE1 phosphorylée clivent le transcrit XBP1 pour former le facteur de transcription XBP1s, plus actif. (2) Ce facteur induit l'expression de gènes codant des protéines chaperonnes GRP78 et EDEM1 impliquée respectivement dans le repliement des protéines et le système ERAD (dégradation des protéines mal repliées par le protéasome). (3) En plus, la surexpression du facteur XBP1s induit une augmentation de la synthèse de phosphatidylcholine permettant de rétablir un ratio cholestérol/phospholipides membranaire physiologique.

Les carrés oranges correspondent aux éléments modulés par une accumulation de cholestérol dans les macrophages présentant une surcharge en cholestérol.

2.2.3 La voie de signalisation dépendante de la protéine IRE1 :

2.2.3.1 Mécanisme d'activation de la protéine IRE1 :

En présence d'un stress, la dissociation de la protéine IRE1 de la protéine GRP78 conduit à sa dimérisation, son trans-autophosphorylation et ainsi son activation (Zhou et al., 2006). La protéine IRE1 est la seule cible de l'activité kinase de cette protéine (Schroder and Kaufman, 2005). Une fois activées, le domaine endoribonucléasique de la protéine IRE1 coupe spécifiquement un intron de 26 nucléotides du transcrit codant le facteur de transcription XBP1, générant ainsi la formation d'une forme clivée **XBP1s**. Le facteur XBP1, dont l'expression est également induite par la protéine ATF-6, est **un facteur de transcription** avec un motif leucine zipper (Figure 21). **Le facteur clivé XBP1s est plus stable et est un meilleur activateur de l'expression de gènes impliqués dans la réponse UPR** (Yoshida et al., 2001)

2.2.3.2 Induction transcriptionnelle de gènes codant l'expression de protéines du complexe ERAD :

Les gènes cibles de ce facteur interviennent dans **le processus ERAD** (gène codant pour la protéine EDEM, *ER-Degradation-Enhancing- α -Mannidose-like protein*-(Yoshida et al., 2003)) mais aussi dans les processus de repliements des protéines telles que la **protéine GRP78** ou la protéine disulfide isomérase (figure 21 (Lee et al., 2003)).

2.2.3.3 Induction de la synthèse de phosphatidylcholine :

Les phospholipides sont des composés importants des membranes biologiques permettant ainsi leurs structurations en bicouche lipidique (Vance and Vance, 1996).

Le maintien du ratio cholestérol/phospholipides dans la membrane est crucial pour les fonctions cellulaires. En réponse à un excès de cholestérol intracellulaire, la cellule met en place une réponse adaptative visant à augmenter la synthèse des phospholipides et notamment des phosphatidylcholines permettant de rétablir un ratio cholestérol/phospholipides physiologique.

a. Synthèse des phosphatidylcholines

La voie majeure de synthèse des phosphatidylcholine (PC) est la **voie CDP-choline**, reposant sur trois réactions enzymatiques (figure 22). La première, catalysée par la choline kinase (CK), est une phosphorylation ATP-dépendante de la choline pour donner la phosphocholine. La deuxième enzyme impliquée dans cette voie, la **CTP :phosphocholine CitidylTransferase (CT)**, enzyme limitante de la réaction, facilite la réaction entre la phosphocholine et le citidyl triphosphate (CTP) pour former la CDP choline.

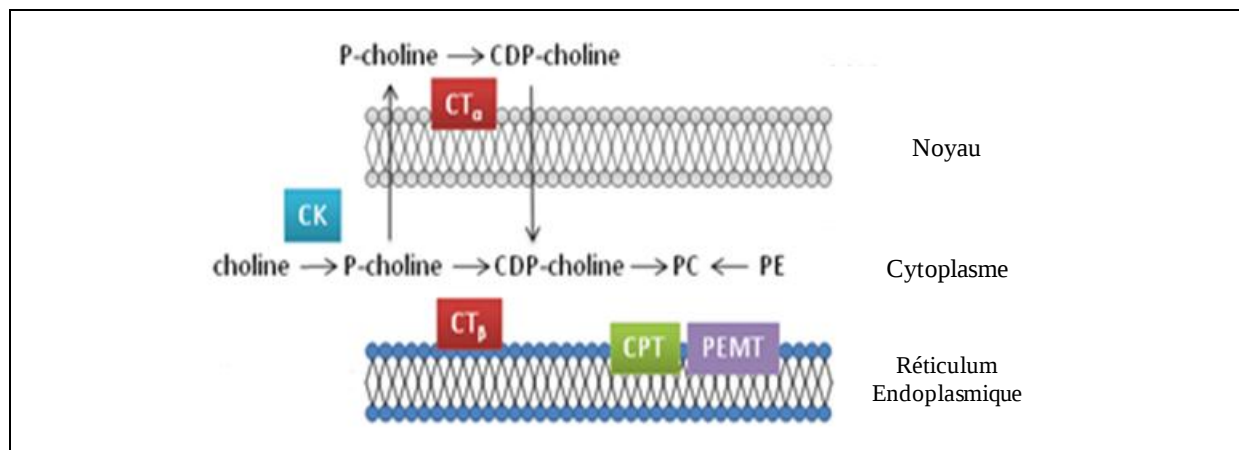


Figure 22: Synthèse des phosphatidylcholines

Inspiré du site <http://lipidlibrary.aocs.org/animbio/phospholipids/index.html>

Il existe deux isoformes : CT α et CT β localisées respectivement dans le noyau et dans le cytoplasme. En effet, la protéine CT α contient un domaine de localisation nucléaire tandis que la protéine CT β en est dépourvue. L'addition de diacylglycérol, catalysée par la CDP-choline: 1,2-diacylglycérol cholinephosphotransférase (CPT), finalise la synthèse de PC (figure 22). Une voie mineure de synthèse de PC, principalement **dans le foie**, met en jeu une série de trois réactions de méthylations de la phosphatidyléthanolamine (PE) induites par la PhosphoEthanolamine N Méthyl Transférase (PEMT) au niveau du RE (figure 22).

b.Lien entre la synthèse de phospholipides, accumulation de cholestérol et XBP1s

La surexpression de la forme active du facteur de transcription **XBP1s** dans des fibroblastes induit **une augmentation de la production de phosphatidylcholine (PC) et de phosphatidyléthanolamine (PE), les deux principaux lipides membranaires du RE** (Sriburi et al., 2004, Sriburi et al., 2007). La mesure de l'activité de ces enzymes dans les fibroblastes surexprimant le facteur XBP1s met en évidence **une activité basale de l'enzyme CK et une augmentation de l'activité des enzymes CT et CPT** (Sriburi et al., 2004, Sriburi et al., 2007). Ces données sont corrélées avec la mesure des produits de ces enzymes : pas de modification du contenu en phosphocholine et une quantité plus importante de CDP-choline et donc de phosphatidylcholine (Sriburi et al., 2004, Sriburi et al., 2007). Dans ces cellules, il n'y a pas de modification de l'expression du transcrit mais une augmentation de la synthèse de la protéine CT (Sriburi et al., 2007). La surexpression d'ATF6 (autre facteur de transcription impliqué dans la réponse UPR) n'a pas d'effet sur la synthèse de phosphatidylcholine.

En parallèle, des études montrent que la surcharge en cholestérol dans les macrophages induit une augmentation de la synthèse et du contenu de phosphatidylcholine par **l'activation de la CTP :phosphocholine CitidylTransférase**, enzyme limitante de la réaction (Shiratori et al., 1994, Tabas et al., 1996).

Cependant, **l'interaction directe entre l'accumulation du cholestérol intracellulaire, la surexpression du facteur de transcription XBP1s et la synthèse de phosphatidylcholine** n'est pas établie.

2.3 Engagement vers la voie apoptotique :

En situation d'une réponse UPR prolongée trop intense ou de trop longue durée, les voies de signalisation induites par les protéines ATF-6, IRE1 et PERK peuvent déclencher des voies de signalisation apoptotique. L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, résulte d'un processus durant lequel les cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal (Breckenridge et al., 2003).

Trois voies apoptotiques sont connues pour être activées pendant le stress du RE. La première implique l'activation de l'expression de la protéine CHOP. **Cette voie est activée en présence d'une surcharge en cholestérol.** La seconde concerne l'activation de la voie IRE1/TRAF2/ASK1 aboutissant à l'activation de la protéine JNK et p38MAPkinase.. La troisième voie fait intervenir l'activation de la caspase 12.

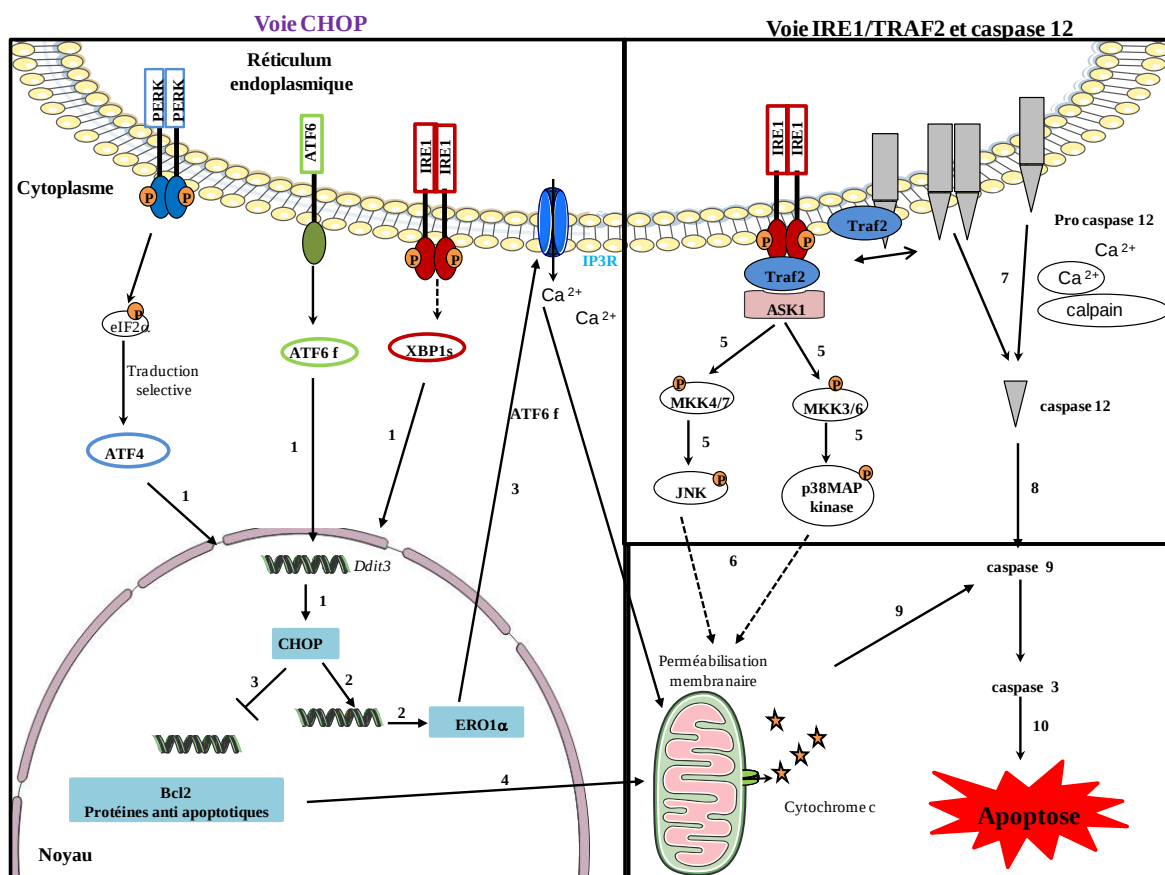


Figure 23 : Engagement vers un processus apoptotique.

Les trois voies activées lors de la réponse UPR (PERK, ATF6 et IRE1) induisent l'expression du gène *Ddit3* codant le facteur de transcription CHOP (1). Le facteur CHOP induit l'expression des gènes codant la protéine ERO1 α et inhibe l'expression du gène *Bcl2* (2). La protéine ERO1 α entraîne un relargage du calcium du réticulum vers le cytoplasmique, induisant une perméabilisation de la membrane mitochondriale laquelle relargue le cytochrome c (3). De même, la diminution de la protéine Bcl2 module la perméabilité de la membrane mitochondriale (4). Les dimères de la protéine IRE1 recrute la protéine TRAF2 puis ASK1, permettant la phosphorylation des protéines JNK et p38MAPkinase (5) et la perméabilisation de la membrane mitochondriale (6). Enfin le recrutement de la protéine TRAF2 sur la protéine IRE1 entraîne l'oligomérisation de la procaspase 12 et son autoactivation (7). En parallèle, le calcium cytoplasmique peut également activer la calpaïne et la caspase 12 (7). La caspase 9 activée par la caspase 12 (8) ou par le cytochrome c relargué de la mitochondrie (9), va ensuite clivée la procaspase 3 en caspase 3 déclenchant un processus apoptotique (10).

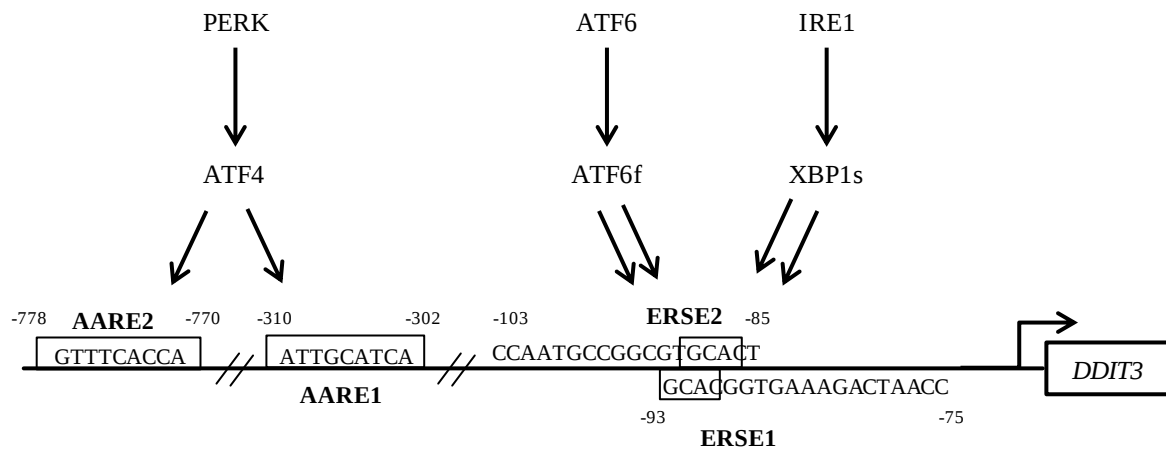


Figure 24: Les trois branches de la réponse UPR induit la transcription du gène *Ddit3* codant la protéine CHOP.

Lors d'un stress du réticulum endoplasmique, l'activation des protéines PERK, ATF6 et IRE1 induisent l'expression du gène *Ddit3* codant la protéine CHOP.

La protéine pPERK activée, entraîne une traduction préférentielle de la protéine ATF-4, laquelle se fixe au niveau des séquences AARE et induit l'expression du gène *DDIT3*.

L'activation des voies ATF6 et IRE1 conduit, respectivement, à la fixation des facteurs de transcription ATF6f et XBP1s sur la séquence CACG des éléments ERSE1 et ERSE2 entraînant une augmentation de l'expression du gène *DDIT3*.

D'après (Oyadomari and Mori, 2004)

2.3.1 Voie induite par la protéine CHOP :

2.3.1.1 Lien entre l'accumulation de cholestérol et la protéine CHOP

La protéine CHOP (*C/EBP HOmologous Protein*) codée par le gène *DDIT3* est ubiquitaire, faiblement exprimée en condition physiologique. Un stress soutenu conduit à une augmentation de son expression et son accumulation dans le noyau (Ron and Habener, 1992). Initialement, identifié comme impliqué dans les lésions de l'ADN, l'expression du gène *DDIT3* et de la protéine CHOP est induite de façon majeure par une réponse UPR prolongée (Zinszner et al., 1998, Okada et al., 2002). De plus, ces cellules sont protégées vis-à-vis du processus apoptotiques induit par une accumulation de cholestérol. Enfin, les macrophages présentant une surcharge en cholestérol expriment fortement la protéine CHOP (Feng et al., 2003). **Ces données suggèrent que la protéine CHOP est activée en présence d'un excès de cholestérol.**

2.3.1.2 Mécanisme d'activation induit par la protéine CHOP

L'expression du facteur CHOP est induit au **niveau transcriptionnelle et traductionnelle** lors d'un stress du réticulum endoplasmique.

a. Induction transcriptionnelle du gène *Ddit3*

L'expression du gène *DDIT3* codant la protéine CHOP peut être induite par les 3 senseurs impliqués dans la réponse UPR. Le promoteur humain contient, en effet, 2 éléments de réponse au stress du réticulum endoplasmique (*ERSE-Endoplasmic Reticulum Stress response*) localisé en sens opposé avec une superposition de 9 paires de bases (Ubeda et al., 1996, Yoshida et al., 2000). Ces deux séquences CHOP ERSE1 et CHOP ERSE2 peuvent fixer les facteurs de transcription XBP1s et ATF-6f provenant respectivement de l'activation des voies IRE1 et ATF-6 (figure 24).

Le promoteur contient également un motif AARE (*Amino Acid Response Element*) essentiel à l'activation par le facteur ATF4 (figure 24) (Bruhat et al., 2000).

Les cellules déficientes en protéines PERK ou présentant une mutation de la serine 51 de la protéine eIF2 α montrent une atténuation presque complète de l'induction du facteur ATF4 et de la protéine CHOP suggérant que cette voie joue un rôle important dans l'induction de l'expression du gène *DDIT3* et semble dominante sur les 2 autres voies (IRE1 et ATF-6) (Harding et al., 2000b, Scheuner et al., 2001). **Néanmoins, l'activation des trois voies est nécessaire afin d'avoir une induction maximale de l'expression du gène *Ddit3*.**

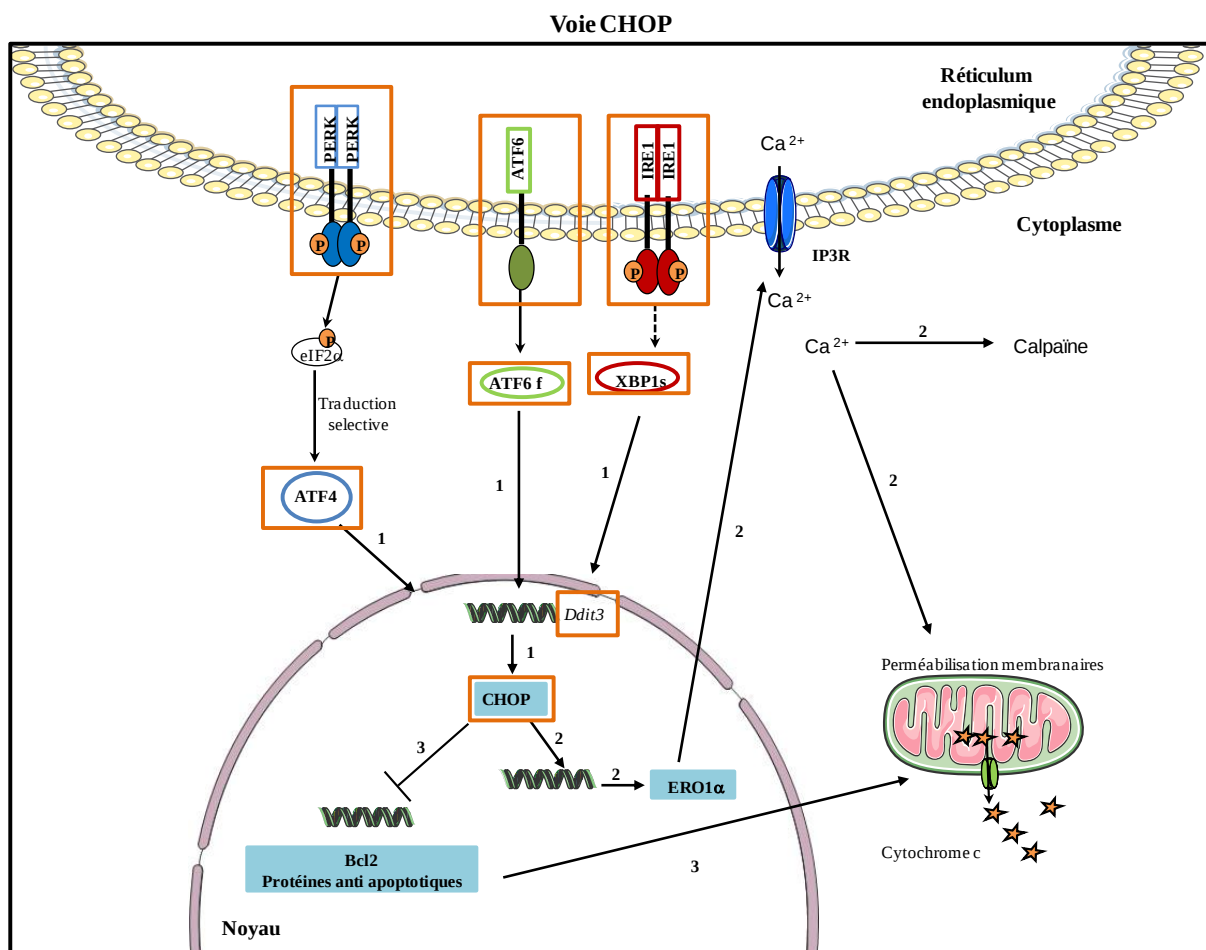


Figure 25: Voie d'activation la protéine CHOP.

L'expression du gène *Ddit3* codant la protéine CHOP est activée par les trois senseurs (PERK, ATF6 et IRE1) de la réponse UPR. (1). Le facteur de transcription CHOP induit la transcription du gène *ERO1α*, laquelle va entraîner, via les récepteurs Inositol Triphosphate (IP3R) une libération du calcium du réticulum endoplasmique vers le cytoplasme. L'augmentation du calcium est impliquée dans l'activation des calapines et dans la perméabilisation de la membrane mitochondriale (2). En parallèle, la protéine CHOP induit une répression de l'expression du gène *Bcl-2*. Cette diminution peut induire une translocation des protéines BAD et BAX au niveau de la membrane mitochondriale, une perméabilisation de cette membrane libérant le cytochrome c (3).

Les carrés oranges correspondent aux éléments modulés par une accumulation de cholestérol dans les macrophages présentant une surcharge en cholestérol.

b. Induction de l'expression de la protéine CHOP par le facteur ATF4 :

La stabilité de la protéine CHOP est augmentée. De même que pour la protéine ATF-4, l'extrémité 5'UTR du transcrit de la protéine CHOP contient des séquences uORF entraînant, en situation de stress, une traduction sélective de la protéine CHOP.

De plus, l'activité de cette protéine CHOP est augmentée par sa phosphorylation sur les résidus serines en position 79 et 82 par la protéine p38MAP kinase. Cette kinase est un substrat de la protéine ASK1, elle-même activée par le complexe IRE1/TRAF2.

2.3.1.3 Conséquences de l'activation de la protéine CHOP

a. Diminution de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2.

Les cellules surexprimant la protéine CHOP présentent **une diminution de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2** (*B-cell Lymphoma 2*) accompagnée d'une réduction des molécules de glutathion, d'une forte augmentation du stress oxydatif et d'une mort cellulaire par apoptose (McCullough et al., 2001). Le mécanisme de diminution de l'expression de Bcl-2 pourrait résulter d'une interaction du facteur CHOP avec un ou plusieurs répresseurs transcriptionnels (McCullough et al., 2001) (figure 25).

La protéine Bcl-2 induit la survie cellulaire par la séquestration de protéines pro apoptotiques telles que les protéines BAD, BIM, Noxa et PUMA. Une diminution de l'expression de ce facteur entraîne **une translocation des protéines BAD et BAX au niveau de la membrane mitochondriale** induisant sa perméabilisation, la libération du cytochrome c et ainsi l'activation de la caspase 9 et de la caspase 3.

b. Induction de l'expression du gène codant l'oxydase 1 du réticulum endoplasmique

De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont pu établir un lien entre **l'induction de l'expression du gène codant l'oxydase 1 du RE** (ERO1 α , *Endoplasmic Reticulum Oxydase 1*) et le processus apoptotique induit par la protéine CHOP. De plus, **la surcharge *in vitro* en cholestérol de macrophages conduit à l'expression des transcrits et de la protéine ERO1 α** , laquelle est inhibée dans des cellules invalidées pour le gène *Ddit3* codant la protéine CHOP (Li et al., 2009b).

La protéine ERO1 α , peut entraîner une libération du calcium du réticulum endoplasmique vers le cytoplasme par les récepteurs Inositol Triphosphate ou IP3R (Li et al., 2009b). Cette activation pourrait impliquer la formation d'un pont disulfure dans la boucle luminale du récepteur IP3R (Marciniak et al., 2004, Higo et al., 2005). L'inhibition de l'expression de la protéine ERO1 α ou des mutations entraînant une perte de fonction des protéines ERO1 α ou CHOP bloque **libération du calcium du réticulum endoplasmique vers le cytoplasme** et l'activation de signaux pro-apoptotiques dépendants du calcium cytoplasmique (figure 25) (Li et al., 2009b, Timmins et al., 2009).

Voie IRE1/TRAF2

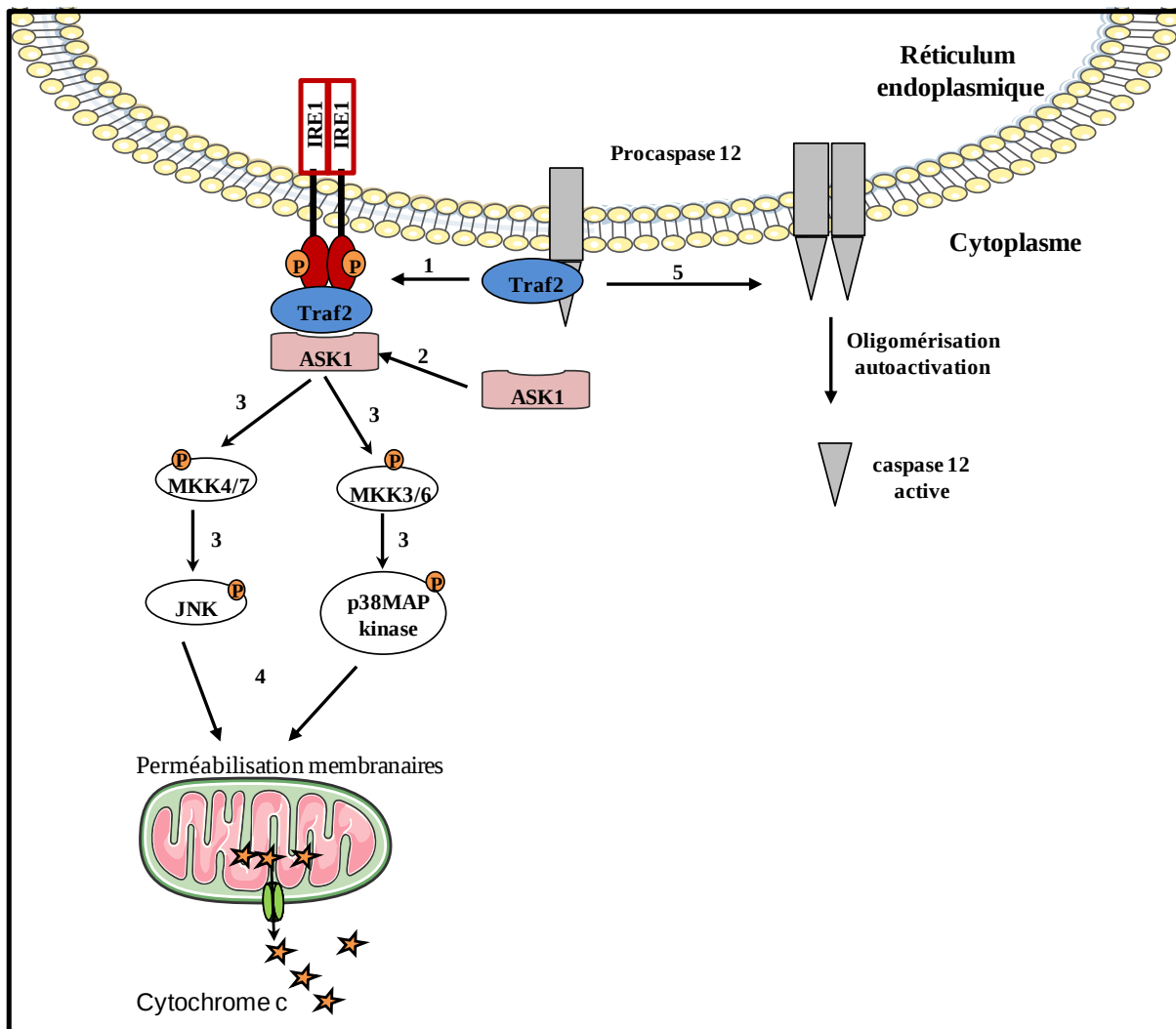


Figure 26: Voie d'activation du complexe IRE1/TRAF2.

En condition physiologique, la protéine TRAF2 est couplée à la procaspase 12. Sous l'influence d'un stress du réticulum endoplasmique, la protéine TRAF2 est recrutée par la protéine IRE1 (1), laquelle recrute ensuite la protéine ASK1 (2). La protéine ASK1 phosphoryle les protéines MKK4 et MKK7 (*Mitogen Activating Protein kinase kinase*) afin d'activer la protéine JNK et les protéines MKK3 et MKK6 afin d'activer la protéine p38MAPK (3). Ces deux protéines sont capables d'induire une perméabilisation de la membrane mitochondriale et un relargage du cytochrome c (4). Le recrutement de la protéine TRAF2 par la protéine IRE1 entraîne l'oligomérisation de la procaspase 12 et son auto-activation en caspase 12 (5).

Lors d'un stress continu, deux autres voies (IRE1/TRAF2 et caspase 12) sont impliquées dans la réponse apoptotique induite lors d'un stress du réticulum endoplasmique. Cependant, à l'heure actuelle, le lien entre l'accumulation de cholestérol et l'activation de ces deux voies n'a pas été établi.

2.3.2 Voie IRE1/TRAF2 :

Une étude récente met en évidence une activation la voie ASK1-JNK par la formation du complexe IRE1/TRAF2/ASK1 lors d'un stress du réticulum endoplasmique (réponse UPR). Cette activation est considérablement diminuée dans les fibroblastes de souris invalidées pour le gène codant la protéine ASK1 (Nishitoh et al., 2002). **Cette voie n'a pas été décrite induite par l'accumulation de cholestérol.**

En parallèle du clivage du facteur de transcription XBP-1, l'activation de la protéine IRE-1 peut conduire à sa dimérisation avec la protéine TRAF2 (*Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor 2*) (Urano et al., 2000). La dimérisation IRE1/TRAF2 induit une liaison de la protéine ASK1 (*Apoptosis Signal Regulating Kinase 1*) à la protéine TRAF2, entraînant son activation (Nishitoh et al., 2002). La protéine ASK1, exprimée ubiquitairement, appartient à la famille des MAP3K (*Mitogen Activating Protein kinase kinase kinase*). Elle phosphoryle les protéines MKK4 et MKK7 (*Mitogen Activating Protein kinase kinase*) afin d'activer la protéine JNK (*c-jun N terminal kinase*) et les protéines MKK3 et MKK6 afin d'activer la protéine p38MAPK (*Mitogen Activating Protein kinase*) (figure 26). La protéine JNK peut induire l'apoptose par deux mécanismes distincts. Elle peut entraîner une augmentation de l'expression de gènes pro-apoptotiques ou directement moduler l'activité de protéines pro et anti apoptotiques mitochondriales (Dhanasekaran and Reddy, 2008). La protéine p38MAPK module également l'activité de protéines pro et anti apoptotiques mitochondriales. Elle inhibe également les voies de survie cellulaire induite par la protéine ERK et par la protéine AK1 (Matsukawa et al., 2004). Cependant, cette voie n'a pas été décrite induit par l'accumulation de cholestérol.

2.3.3 Activation de la caspase 12 :

2.3.3.1 Lien entre stress du réticulum endoplasmique et caspase 12 :

La caspase 12, ubiquitairement exprimée dans les tissus murins (Nakagawa and Yuan, 2000), est synthétisée sous la forme d'une pro-enzyme inactive, la pro-caspase 12. Elle contient un domaine régulateur inséré dans la membrane du RE et deux sous unités catalytiques p20 et p10 (Nakagawa and Yuan, 2000). En condition physiologique, elle est associée à différentes protéines dont TRAF2 dans la membrane du réticulum endoplasmique.

Au contraire des autres caspases, la caspase 12 est spécifiquement activée lors d'un stress du réticulum endoplasmique (Nakagawa et al., 2000). Les souris invalidées pour le gène codant la caspase 12, sont viables et présentent un phénotype normal. Cependant, les fibroblastes issus d'embryon de ces souris sont plus résistants aux signaux induits par un stress du réticulum endoplasmique, tout en étant aussi sensibles à d'autres stimuli apoptotiques (Nakagawa et al., 2000).

Chez l'homme, la séquence homologue de la caspase 12 a été identifiée sur le chromosome 11q22.3 (Fischer et al., 2002). Ce gène présente néanmoins un décalage du cadre de lecture et un codon stop prématuré entraînant la traduction d'une protéine plus courte. Par conséquent, la caspase 12 chez l'homme est inactive (Fischer et al., 2002). Cependant, la caspase 4 situé dans le même cluster de gènes que la caspase 12, présente des caractéristiques similaires (Hitomi et al., 2004). En effet, la caspase 4, comme la caspase 12 est localisée au niveau du réticulum endoplasmique et est spécifiquement activée par l'utilisation de deux agents inducteurs d'un stress du réticulum endoplasmique, la tunicamycine ou la thapsigargine, (Hitomi et al., 2004, Matsuzaki et al., 2010). Ce clivage n'est pas observé en présence d'autres agents induisant l'apoptose (eposide, staurosporine, UV,...). Enfin, les cellules présentant une diminution d'expression de la caspase 4, par une stratégie d'ARN interférence, sont plus résistantes à l'apoptose induite par un agent du stress du réticulum endoplasmique (Hitomi et al., 2004). Ces données indiquent donc une spécificité d'activation de la caspase 4 en présence d'un stress du réticulum endoplasmique.

A l'heure actuelle, le lien entre l'accumulation de cholestérol et l'activation de la caspase 12 n'a pas été clairement établi (Zhang and Kaufman, 2003).

2.3.3.2 Voie d'activation de la caspase 12 :

La caspase 12 peut être activée selon plusieurs voies (figure 27).

La première voie consiste **en une augmentation de la transcription de la pro-caspase 12**. En effet, une augmentation de l'expression de la caspase 12 est observée dans l'hippocampe, 6 heures après l'induction d'une lésion traumatique (Larner et al., 2004).

La deuxième voie est **une activation par les calpaïnes**. Le flux de calcium du réticulum endoplasmique vers le cytoplasme (mécanisme décrit plus haut) induit **l'activation des m-calpaïnes**, protéases dépendantes du calcium cytoplasmique. Ces protéases, par la suite, **clivent la pro-caspase 12 pour libérer la forme active, la caspase 12** (Nakagawa et al., 2000). De même que pour la caspase 12, le clivage de la caspase 4 induit lors d'un stress du RE est diminué en présence d'un chélateur du calcium ou d'un inhibiteur des calpaïnes, suggérant que la caspase 4 est activée par les calpaïnes dont l'activité dépend de la concentration du calcium intracellulaire (Matsuzaki et al., 2010).

En condition physiologique, la protéine TRAF2 forme un complexe stable avec la procaspase 12. En situation de stress du RE, la protéine IRE1 est capable de recruter la protéine TRAF2 et d'activer la voie JNK/MAPkinase (décrite plus haut). Ce recrutement entraîne la dissociation de la protéine TRAF2 et de la procaspase 12 menant à **son oligomérisation et son auto activation** (Yoneda et al., 2001).

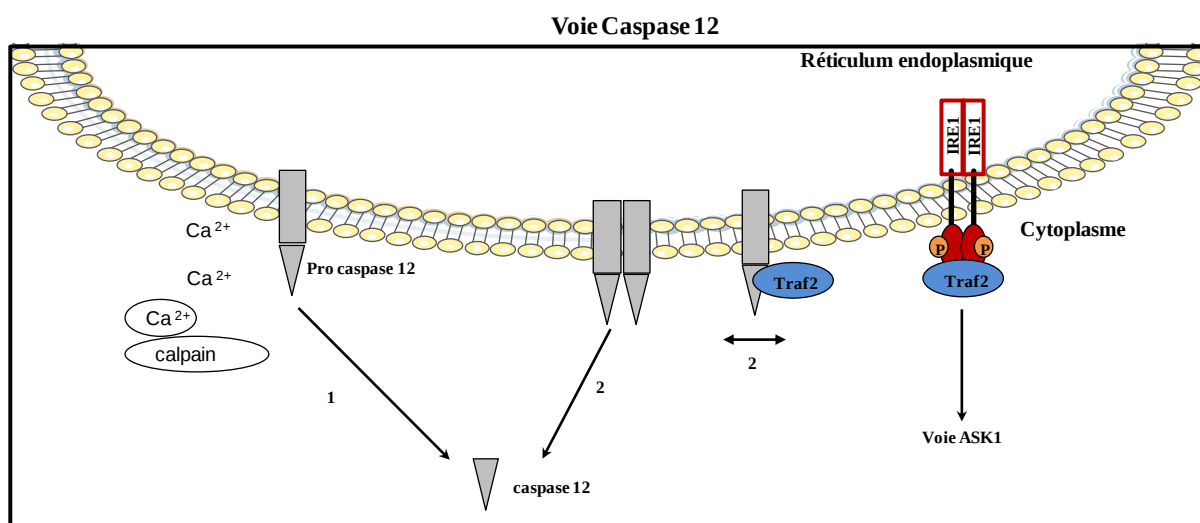


Figure 27: Voie d'activation de la caspase 12

La procaspase 12 peut être clivée par la calpaïne activée par l'augmentation du calcium cytoplasmique (1). Elle peut également s'autoactiver lors du recrutement de la protéine TRAF2 par le dimère IRE1 (2).

2.3.4 Phase d'exécution de l'apoptose :

La phase terminale de l'apoptose consiste en l'activation de la caspase 9 suivi de la caspase 3. Deux groupes ont montré que la caspase 12 peut directement, *in vitro*, cliver la procaspase 9 en caspase 9 (active) qui ensuite clive la procaspase 3 en caspase 3 (Morishima et al., 2002, Rao et al., 2002). De plus, l'utilisation d'inhibiteurs de la caspase 12 bloque l'activation de la caspase 9 et de la caspase 3 induite lors d'un stress du réticulum endoplasmique (Morishima et al., 2002). Enfin, ces deux équipes mettent en évidence que le clivage de la caspase 9 en réponse à un stress du RE peut apparaître en absence de cytochrome c ou dans des fibroblastes dont le gène *Apaf1* est invalidé (Morishima et al., 2002, Rao et al., 2002). Ces résultats suggèrent que la caspase 12 peut directement induire l'activation de la caspase 9 de manière indépendante à la voie mitochondriale APAF1/Cytochrome c (figure 28).

Cependant, l'activation de la voie mitochondriale peut constituer un événement secondaire, important induit notamment par l'inhibition de la protéine Bcl-2 et par l'augmentation du calcium cytoplasmique (figure 28).

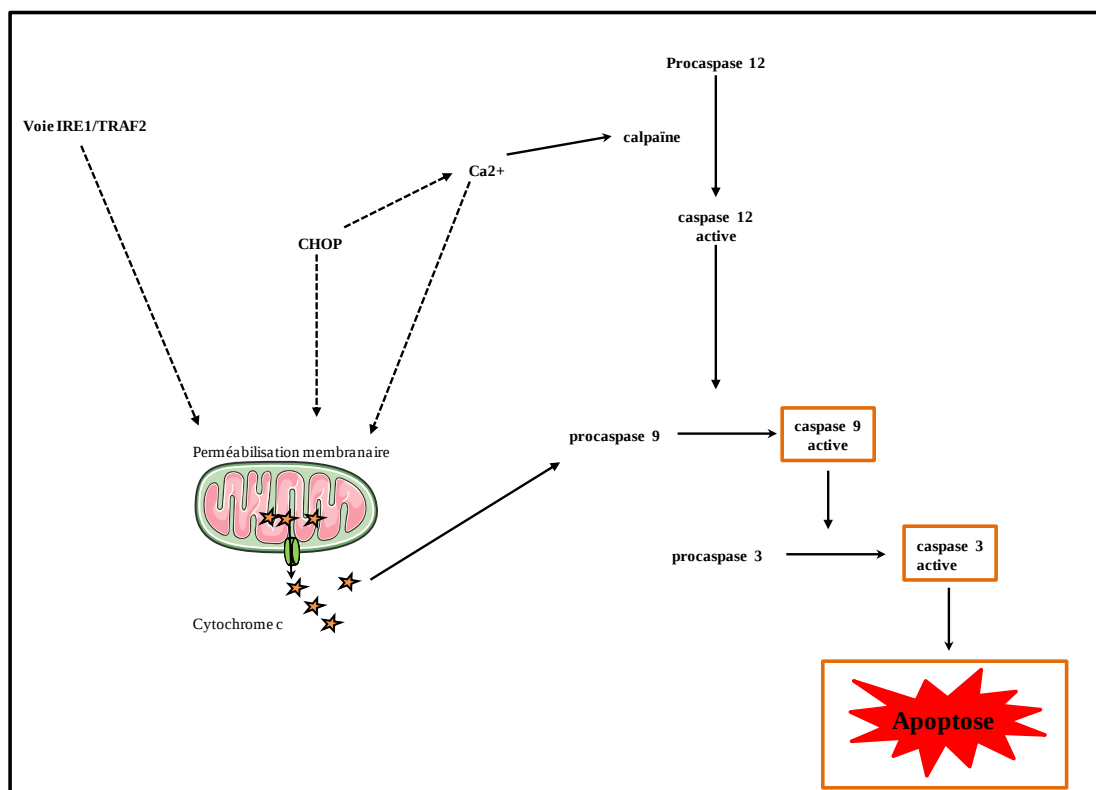


Figure 28: Voie apoptotiques lors du stress du réticulum endoplasmique.

La caspase 12 est capable d'activer la caspase 9 qui ensuite clive la caspase 3 et induit l'apoptose des cellules. En parallèle, les voies activées par le complexe IRE1/TRAF2 ou par la protéine CHOP induit une perméabilisation de la mitochondrie induisant l'activation de la caspase 9 et l'apoptose.

Les carrés oranges correspondent aux éléments modulés par une accumulation de cholestérol dans les macrophages présentant une surcharge en cholestérol.

2.4 Conclusion : l'excès de cholestérol induit une réponse UPR.

L'accumulation de cholestérol dans le réticulum endoplasmique induit une déplétion des stocks de calcium, entraînant une activation des trois voies **PERK, IRE1 et ATF6** (décrites ci-dessous), une augmentation de l'expression de **la protéine CHOP, de la caspase 3 activée** conduisant à un processus apoptotique (Feng et al., 2003, Yao et al., 2013).

L'augmentation de la synthèse des phosphatidylcholines est induite par l'accumulation de cholestérol mais le lien entre la surcharge en cholestérol, la réponse UPR et la synthèse de phosphatidylcholine n'a pas encore été évalué. Enfin, les voies IRE1/TRAF2 et caspase 12 n'ont pas été décrites, associées à une accumulation de cholestérol.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Abildayeva K, Jansen PJ, Hirsch-Reinshagen V, Bloks VW, Bakker AH, Ramaekers FC, de Vente J, Groen AK, Wellington CL, Kuipers F, Mulder M (24(S)-hydroxycholesterol participates in a liver X receptor-controlled pathway in astrocytes that regulates apolipoprotein E-mediated cholesterol efflux. *J Biol Chem* 281:12799-12808.2006).
- Abulrob A, Tauskela JS, Mealing G, Brunette E, Faid K, Stanimirovic D (Protection by cholesterol-extracting cyclodextrins: a role for N-methyl-D-aspartate receptor redistribution. *J Neurochem* 92:1477-1486.2005).
- Acharya MM, Katyare SS (Picrotoxin-induced convulsions alters rat brain microsomal membrane structural properties. *Neurosci Lett* 394:9-12.2006).
- Adibhatla RM, Hatcher JF (Role of Lipids in Brain Injury and Diseases. *Future Lipidol* 2:403-422.2007).
- Amaral DG, Witter MP (The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31:571-591.1989).
- Ancolio K, Dumanchin C, Barelli H, Warter JM, Brice A, Campion D, Frebourg T, Checler F (Unusual phenotypic alteration of beta amyloid precursor protein (betaAPP) maturation by a new Val-715 --> Met betaAPP-770 mutation responsible for probable early-onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4119-4124.1999).
- Araki W, Kitaguchi N, Tokushima Y, Ishii K, Aratake H, Shimohama S, Nakamura S, Kimura J (Trophic effect of beta-amyloid precursor protein on cerebral cortical neurons in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 181:265-271.1991).
- Bales KR, Liu F, Wu S, Lin S, Koger D, DeLong C, Hansen JC, Sullivan PM, Paul SM (Human APOE isoform-dependent effects on brain beta-amyloid levels in PDAPP transgenic mice. *J Neurosci* 29:6771-6779.2009).
- Baltzis D, Pluquet O, Papadakis AI, Kazemi S, Qu LK, Koromilas AE (The eIF2alpha kinases PERK and PKR activate glycogen synthase kinase 3 to promote the proteasomal degradation of p53. *J Biol Chem* 282:31675-31687.2007).
- Bar-On P, Crews L, Koob AO, Mizuno H, Adame A, Spencer B, Masliah E (Statins reduce neuronal alpha-synuclein aggregation in in vitro models of Parkinson's disease. *J Neurochem* 105:1656-1667.2008).
- Bar-On P, Rockenstein E, Adame A, Ho G, Hashimoto M, Masliah E (Effects of the cholesterol-lowering compound methyl-beta-cyclodextrin in models of alpha-synucleinopathy. *J Neurochem* 98:1032-1045.2006).
- Bell KF, Zheng L, Fahrenholz F, Cuellar AC (ADAM-10 over-expression increases cortical synaptogenesis. *Neurobiol Aging* 29:554-565.2008).
- Bialecki RA, Tulenko TN, Colucci WS (Cholesterol enrichment increases basal and agonist-stimulated calcium influx in rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 88:1894-1900.1991).
- Bierkamper GG, Cenedella RJ (Cerebral cortical cholesterol changes in cobalt-induced epilepsy. *Epilepsia* 19:155-167.1978).
- Bionda C, Portoukalian J, Schmitt D, Rodriguez-Lafrasse C, Ardail D (Subcellular compartmentalization of ceramide metabolism: MAM (mitochondria-associated membrane) and/or mitochondria? *Biochem J* 382:527-533.2004).
- Birbes H, Luberto C, Hsu YT, El Bawab S, Hannun YA, Obeid LM (A mitochondrial pool of sphingomyelin is involved in TNFalpha-induced Bax translocation to mitochondria. *Biochem J* 386:445-451.2005).
- Bjorkhem I (Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. *J Intern Med* 260:493-508.2006).
- Blanchard V, Moussaoui S, Czech C, Touchet N, Bonici B, Planche M, Canton T, Jedidi I, Gohin M, Wirths O, Bayer TA, Langui D, Duyckaerts C, Tremp G, Pradier L (Time sequence of

- maturation of dystrophic neurites associated with Abeta deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Exp Neurol* 184:247-263.2003).
- Blanche H, Cabanne L, Sahbatou M, Thomas G (A study of French centenarians: are ACE and APOE associated with longevity? *C R Acad Sci III* 324:129-135.2001).
- Bobinski M, de Leon MJ, Tarnawski M, Wegiel J, Reisberg B, Miller DC, Wisniewski HM (Neuronal and volume loss in CA1 of the hippocampal formation uniquely predicts duration and severity of Alzheimer disease. *Brain Res* 805:267-269.1998).
- Bobinski M, Wegiel J, Tarnawski M, Reisberg B, de Leon MJ, Miller DC, Wisniewski HM (Relationships between regional neuronal loss and neurofibrillary changes in the hippocampal formation and duration and severity of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:414-420.1997).
- Bobinski M, Wegiel J, Wisniewski HM, Tarnawski M, Reisberg B, De Leon MJ, Miller DC (Neurofibrillary pathology--correlation with hippocampal formation atrophy in Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* 17:909-919.1996).
- Bogdanovic N, Bretillon L, Lund EG, Diczfalusy U, Lannfelt L, Winblad B, Russell DW, Bjorkhem I (On the turnover of brain cholesterol in patients with Alzheimer's disease. Abnormal induction of the cholesterol-catabolic enzyme CYP46 in glial cells. *Neurosci Lett* 314:45-48.2001).
- Bonn V, Cheung RC, Chen B, Taghibiglou C, Van Iderstine SC, Adeli K (Simvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, induces the synthesis and secretion of apolipoprotein AI in HepG2 cells and primary hamster hepatocytes. *Atherosclerosis* 163:59-68.2002).
- Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP, Nguyen M, Shore GC (Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 22:8608-8618.2003).
- Brown J, 3rd, Theisler C, Silberman S, Magnuson D, Gottardi-Littell N, Lee JM, Yager D, Crowley J, Sambamurti K, Rahman MM, Reiss AB, Eckman CB, Wolozin B (Differential expression of cholesterol hydroxylases in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 279:34674-34681.2004).
- Brown MS, Goldstein JL (A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232:34-47.1986).
- Bruhat A, Jousse C, Carraro V, Reimold AM, Ferrara M, Fafournoux P (Amino acids control mammalian gene transcription: activating transcription factor 2 is essential for the amino acid responsiveness of the CHOP promoter. *Mol Cell Biol* 20:7192-7204.2000).
- Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR (Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 33:95-130.2000).
- Buxbaum JD, Geoghegan NS, Friedhoff LT (Cholesterol depletion with physiological concentrations of a statin decreases the formation of the Alzheimer amyloid Abeta peptide. *J Alzheimers Dis* 3:221-229.2001).
- Buxbaum JD, Thinakaran G, Koliatsos V, O'Callahan J, Slunt HH, Price DL, Sisodia SS (Alzheimer amyloid protein precursor in the rat hippocampus: transport and processing through the perforant path. *J Neurosci* 18:9629-9637.1998).
- Cai H, Wang Y, McCarthy D, Wen H, Borchelt DR, Price DL, Wong PC (BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nat Neurosci* 4:233-234.2001).
- Cairns NJ, Chadwick A, Luthert PJ, Lantos PL (Astrocytosis, beta A4-protein deposition and paired helical filament formation in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 112:68-75.1992).
- Campion D, Dumanchin C, Hannequin D, Dubois B, Belliard S, Puel M, Thomas-Anterion C, Michon A, Martin C, Charbonnier F, Raux G, Camuzat A, Penet C, Mesnage V, Martinez M, Clerget-Darpoux F, Brice A, Frebourg T (Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Hum Genet* 65:664-670.1999).
- Cao D, Fukuchi K, Wan H, Kim H, Li L (Lack of LDL receptor aggravates learning deficits and amyloid deposits in Alzheimer transgenic mice. *Neurobiol Aging* 27:1632-1643.2006).
- Carey RM, Balcz BA, Lopez-Coviella I, Slack BE (Inhibition of dynamin-dependent endocytosis increases shedding of the amyloid precursor protein ectodomain and reduces generation of amyloid beta protein. *BMC Cell Biol* 6:30.2005).

- Cataldo AM, Barnett JL, Pieroni C, Nixon RA (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* 17:6142-6151.1997).
- Cataldo AM, Petanceska S, Terio NB, Peterhoff CM, Durham R, Mercken M, Mehta PD, Buxbaum J, Haroutunian V, Nixon RA (Abeta localization in abnormal endosomes: association with earliest Abeta elevations in AD and Down syndrome. *Neurobiol Aging* 25:1263-1272.2004).
- Cenedella RJ (Cholesterol synthesis inhibitor U18666A and the role of sterol metabolism and trafficking in numerous pathophysiological processes. *Lipids* 44:477-487.2009).
- Chen X, Gawryluk JW, Wagener JF, Ghribi O, Geiger JD (Caffeine blocks disruption of blood brain barrier in a rabbit model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 5:12.2008).
- Chen X, Wagener JF, Morgan DH, Hui L, Ghribi O, Geiger JD (Endolysosome mechanisms associated with Alzheimer's disease-like pathology in rabbits ingesting cholesterol-enriched diet. *J Alzheimers Dis* 22:1289-1303.2010).
- Cheruku SR, Xu Z, Dutia R, Lobel P, Storch J (Mechanism of cholesterol transfer from the Niemann-Pick type C2 protein to model membranes supports a role in lysosomal cholesterol transport. *J Biol Chem* 281:31594-31604.2006).
- Cirrito JR, Kang JE, Lee J, Stewart FR, Verges DK, Silverio LM, Bu G, Mennerick S, Holtzman DM (Endocytosis is required for synaptic activity-dependent release of amyloid-beta in vivo. *Neuron* 58:42-51.2008).
- Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ (Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360:672-674.1992).
- Cole SL, Grudzien A, Manhart IO, Kelly BL, Oakley H, Vassar R (Statins cause intracellular accumulation of amyloid precursor protein, beta-secretase-cleaved fragments, and amyloid beta-peptide via an isoprenoid-dependent mechanism. *J Biol Chem* 280:18755-18770.2005).
- Cordle A, Koenigsknecht-Talboo J, Wilkinson B, Limpert A, Landreth G (Mechanisms of statin-mediated inhibition of small G-protein function. *J Biol Chem* 280:34202-34209.2005).
- Cordle A, Landreth G (3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors attenuate beta-amyloid-induced microglial inflammatory responses. *J Neurosci* 25:299-307.2005).
- Cossec JC, Simon A, Marquer C, Moldrich RX, Leterrier C, Rossier J, Duyckaerts C, Lenkei Z, Potier MC (Clathrin-dependent APP endocytosis and Abeta secretion are highly sensitive to the level of plasma membrane cholesterol. *Biochim Biophys Acta* 1801:846-852.2010).
- Cutler RG, Kelly J, Storie K, Pedersen WA, Tammara A, Hatanpaa K, Troncoso JC, Mattson MP (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* 101:2070-2075.2004).
- d'Azzo A, Tessitore A, Sano R (Gangliosides as apoptotic signals in ER stress response. *Cell Death Differ* 13:404-414.2006).
- Davies JP, Ioannou YA (Topological analysis of Niemann-Pick C1 protein reveals that the membrane orientation of the putative sterol-sensing domain is identical to those of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and sterol regulatory element binding protein cleavage-activating protein. *J Biol Chem* 275:24367-24374.2000).
- De Jonghe C, Esselens C, Kumar-Singh S, Craessaerts K, Serneels S, Checler F, Annaert W, Van Broeckhoven C, De Strooper B (Pathogenic APP mutations near the gamma-secretase cleavage site differentially affect Abeta secretion and APP C-terminal fragment stability. *Hum Mol Genet* 10:1665-1671.2001).
- de Leon MJ, Convit A, DeSanti S, Bobinski M, George AE, Wisniewski HM, Rusinek H, Carroll R, Saint Louis LA (Contribution of structural neuroimaging to the early diagnosis of Alzheimer's disease. *Int Psychogeriatr* 9 Suppl 1:183-190; discussion 247-152.1997a).
- De Leon MJ, George AE, Golomb J, Tarshish C, Convit A, Kluger A, De Santi S, McRae T, Ferris SH, Reisberg B, Ince C, Rusinek H, Bobinski M, Quinn B, Miller DC, Wisniewski HM (Frequency of

- hippocampal formation atrophy in normal aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 18:1-11.1997b).
- del Toro D, Xifro X, Pol A, Humbert S, Saudou F, Canals JM, Alberch J (Altered cholesterol homeostasis contributes to enhanced excitotoxicity in Huntington's disease. *J Neurochem* 115:153-167.2010).
- Dhanasekaran DN, Reddy EP (JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 27:6245-6251.2008).
- Dietschy JM, Turley SD (Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res* 45:1375-1397.2004).
- Drubin DG, Kirschner MW (Tau protein function in living cells. *J Cell Biol* 103:2739-2746.1986).
- Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC (Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* 118:5-36.2009).
- Eckman CB, Mehta ND, Crook R, Perez-tur J, Prihar G, Pfeiffer E, Graff-Radford N, Hinder P, Yager D, Zenk B, Refolo LM, Prada CM, Younkin SG, Hutton M, Hardy J (A new pathogenic mutation in the APP gene (I716V) increases the relative proportion of A beta 42(43). *Hum Mol Genet* 6:2087-2089.1997).
- Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesold B, Steiner H, Haass C (Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol* 5:486-488.2003).
- Ehehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K (Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol* 160:113-123.2003).
- Eng LF, Ghirnikar RS (GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol* 4:229-237.1994).
- Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T, McClure D, Ward PJ (Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248:1122-1124.1990).
- Espenshade PJ, Hughes AL (Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Annu Rev Genet* 41:401-427.2007).
- Fagan AM, Bu G, Sun Y, Daugherty A, Holtzman DM (Apolipoprotein E-containing high density lipoprotein promotes neurite outgrowth and is a ligand for the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 271:30121-30125.1996).
- Fantini J, Carlus D, Yahi N (The fusogenic tilted peptide (67-78) of alpha-synuclein is a cholesterol binding domain. *Biochim Biophys Acta* 1808:2343-2351.2011).
- Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM (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* 278:1349-1356.1997).
- 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, Hartmann T (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* 98:5856-5861.2001).
- Feng B, Yao PM, Li Y, Devlin CM, Zhang D, Harding HP, Sweeney M, Rong JX, Kuriakose G, Fisher EA, Marks AR, Ron D, Tabas I (The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat Cell Biol* 5:781-792.2003).
- Fillit HM (The role of hormone replacement therapy in the prevention of Alzheimer disease. *Arch Intern Med* 162:1934-1942.2002).
- Fischer H, Koenig U, Eckhart L, Tschachler E (Human caspase 12 has acquired deleterious mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 293:722-726.2002).
- Fitz NF, Cronican A, Pham T, Fogg A, Fauq AH, Chapman R, Lefterov I, Koldamova R (Liver X receptor agonist treatment ameliorates amyloid pathology and memory deficits caused by high-fat diet in APP23 mice. *J Neurosci* 30:6862-6872.2010).
- Fortin DL, Troyer MD, Nakamura K, Kubo S, Anthony MD, Edwards RH (Lipid rafts mediate the synaptic localization of alpha-synuclein. *J Neurosci* 24:6715-6723.2004).

- Fraering PC, Ye W, Strub JM, Dolios G, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, van Dorsselaer A, Wang R, Selkoe DJ, Wolfe MS (Purification and characterization of the human gamma-secretase complex. *Biochemistry* 43:9774-9789.2004).
- Furukawa K, Barger SW, Blalock EM, Mattson MP (Activation of K⁺ channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein. *Nature* 379:74-78.1996).
- Gao S, Hendrie HC, Hall KS, Hui S (The relationships between age, sex, and the incidence of dementia and Alzheimer disease: a meta-analysis. *Arch Gen Psychiatry* 55:809-815.1998).
- Gazewood JD, Richards DR, Clebak K (Parkinson disease: an update. *Am Fam Physician* 87:267-273.2013).
- George AJ, Holsinger RM, McLean CA, Laughton KM, Beyreuther K, Evin G, Masters CL, Li QX (APP intracellular domain is increased and soluble Abeta is reduced with diet-induced hypercholesterolemia in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol Dis* 16:124-132.2004).
- Ghribi O, Larsen B, Schrag M, Herman MM (High cholesterol content in neurons increases BACE, beta-amyloid, and phosphorylated tau levels in rabbit hippocampus. *Exp Neurol* 200:460-467.2006).
- Gleason MM, Medow MS, Tulenko TN (Excess membrane cholesterol alters calcium movements, cytosolic calcium levels, and membrane fluidity in arterial smooth muscle cells. *Circ Res* 69:216-227.1991).
- Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS (Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 124:35-46.2006).
- Grbovic OM, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, Dinakar R, Summers-Terio NB, Ceresa BP, Nixon RA, Cataldo AM (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* 278:31261-31268.2003).
- Green RC, McNagny SE, Jayakumar P, Cupples LA, Benke K, Farrer LA (Statin use and the risk of Alzheimer's disease: the MIRAGE study. *Alzheimers Dement* 2:96-103.2006).
- Guardia-Laguarta C, Coma M, Pera M, Clarimon J, Sereno L, Agullo JM, Molina-Porcel L, Gallardo E, Deng A, Berezovska O, Hyman BT, Blesa R, Gomez-Isla T, Lleo A (Mild cholesterol depletion reduces amyloid-beta production by impairing APP trafficking to the cell surface. *J Neurochem* 110:220-230.2009).
- Haass C, Steiner H (Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases. *Trends Cell Biol* 12:556-562.2002).
- Han X, D MH, McKeel DW, Jr., Kelley J, Morris JC (Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease: potential role in disease pathogenesis. *J Neurochem* 82:809-818.2002).
- Hanggi J, Mondadori CR, Buchmann A, Henke K, Hock C (A CYP46 T/C SNP modulates parahippocampal and hippocampal morphology in young subjects. *Neurobiol Aging* 32:1023-1032.2011).
- Hannun YA, Obeid LM (Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:139-150.2008).
- Hao M, Maxfield FR (Characterization of rapid membrane internalization and recycling. *J Biol Chem* 275:15279-15286.2000).
- Harder T, Scheiffele P, Verkade P, Simons K (Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol* 141:929-942.1998).
- Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D (Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 6:1099-1108.2000a).
- Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D (Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* 5:897-904.2000b).
- Harding HP, Zhang Y, Ron D (Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397:271-274.1999).

- Hayashi T, Kamada H, Jin G, Deguchi K, Nagotani S, Sehara Y, Zhang H, Nagano I, Shoji M, Abe K (Different expression of low density lipoprotein receptor and ApoE between young adult and old rat brains after ischemia. *Neurol Res* 28:822-825.2006).
- He X, Huang Y, Li B, Gong CX, Schuchman EH (Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 31:398-408.2010).
- He X, Jenner AM, Ong WY, Farooqui AA, Patel SC (Lovastatin modulates increased cholesterol and oxysterol levels and has a neuroprotective effect on rat hippocampal neurons after kainate injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:652-663.2006).
- Hebert LE, Scherr PA, Beckett LA, Albert MS, Pilgrim DM, Chown MJ, Funkenstein HH, Evans DA (Age-specific incidence of Alzheimer's disease in a community population. *JAMA* 273:1354-1359.1995).
- Heiniger HJ, Kandutsch AA, Chen HW (Depletion of L-cell sterol depresses endocytosis. *Nature* 263:515-517.1976).
- Heinrich M, Neumeyer J, Jakob M, Hallas C, Tchikov V, Winoto-Morbach S, Wickel M, Schneider-Brachert W, Trauzold A, Hethke A, Schutze S (Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death Differ* 11:550-563.2004).
- Hernandez F, Avila J (Tauopathies. *Cell Mol Life Sci* 64:2219-2233.2007).
- Higo T, Hattori M, Nakamura T, Natsume T, Michikawa T, Mikoshiba K (Subtype-specific and ER lumenal environment-dependent regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 by ERp44. *Cell* 120:85-98.2005).
- Hiltbold EM, Poloso NJ, Roche PA (MHC class II-peptide complexes and APC lipid rafts accumulate at the immunological synapse. *J Immunol* 170:1329-1338.2003).
- Hirschberg K, Rodger J, Futerman AH (The long-chain sphingoid base of sphingolipids is acylated at the cytosolic surface of the endoplasmic reticulum in rat liver. *Biochem J* 290 (Pt 3):751-757.1993).
- Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, Kudo T, Taniguchi M, Koyama Y, Manabe T, Yamagishi S, Bando Y, Imaizumi K, Tsujimoto Y, Tohyama M (Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol* 165:347-356.2004).
- Holsinger RM, McLean CA, Beyreuther K, Masters CL, Evin G (Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 51:783-786.2002).
- Holtzman DM, Pitas RE, Kilbridge J, Nathan B, Mahley RW, Bu G, Schwartz AL (Low density lipoprotein receptor-related protein mediates apolipoprotein E-dependent neurite outgrowth in a central nervous system-derived neuronal cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9480-9484.1995).
- Hong M, Luo S, Baumeister P, Huang JM, Gogia RK, Li M, Lee AS (Underglycosylation of ATF6 as a novel sensing mechanism for activation of the unfolded protein response. *J Biol Chem* 279:11354-11363.2004).
- Hoozemans JJ, van Haastert ES, Nijholt DA, Rozemuller AJ, Eikelenboom P, Scheper W (The unfolded protein response is activated in pretangle neurons in Alzheimer's disease hippocampus. *Am J Pathol* 174:1241-1251.2009).
- Hornick CA, Hui DY, DeLamatre JG (A role for retosomes in intracellular cholesterol transport from endosomes to the plasma membrane. *Am J Physiol* 273:C1075-1081.1997).
- Horton JD, Goldstein JL, Brown MS (SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 109:1125-1131.2002).
- Hortsch R, Lee E, Erathodiyil N, Hebbar S, Steinert S, Lee JY, Chua DS, Kraut R (Glycolipid trafficking in *Drosophila* undergoes pathway switching in response to aberrant cholesterol levels. *Mol Biol Cell* 21:778-790.2010).
- Hu G, Antikainen R, Jousilahti P, Kivipelto M, Tuomilehto J (Total cholesterol and the risk of Parkinson disease. *Neurology* 70:1972-1979.2008).
- Hu G, Jousilahti P, Nissinen A, Antikainen R, Kivipelto M, Tuomilehto J (Body mass index and the risk of Parkinson disease. *Neurology* 67:1955-1959.2006).

- Hudry E, Van Dam D, Kulik W, De Deyn PP, Stet FS, Ahouansou O, Benraiss A, Delacourte A, Bougnères P, Aubourg P, Cartier N (Adeno-associated virus gene therapy with cholesterol 24-hydroxylase reduces the amyloid pathology before or after the onset of amyloid plaques in mouse models of Alzheimer's disease. *Mol Ther* 18:44-53.2010).
- Hussain I, Powell D, Howlett DR, Tew DG, Meek TD, Chapman C, Gloger IS, Murphy KE, Southan CD, Ryan DM, Smith TS, Simmons DL, Walsh FS, Dingwall C, Christie G (Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci* 14:419-427.1999).
- Hutter-Paier B, Huttunen HJ, Puglielli L, Eckman CB, Kim DY, Hofmeister A, Moir RD, Domnitz SB, Frosch MP, Windisch M, Kovacs DM (The ACAT inhibitor CP-113,818 markedly reduces amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron* 44:227-238.2004).
- Hyman BT, Gomez-Isla T, West H, Briggs M, Chung H, Growdon JH, Rebeck GW (Clinical and neuropathological correlates of apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease. Window on molecular epidemiology. *Ann N Y Acad Sci* 777:158-165.1996).
- Ikonen E (Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:125-138.2008).
- Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Zaidi T, Merz PA, Wen GY, Shaikh SS, Wisniewski HM, Alafuzoff I, Winblad B (Defective brain microtubule assembly in Alzheimer's disease. *Lancet* 2:421-426.1986).
- Jack CR, Jr., Dickson DW, Parisi JE, Xu YC, Cha RH, O'Brien PC, Edland SD, Smith GE, Boeve BF, Tangalos EG, Kokmen E, Petersen RC (Antemortem MRI findings correlate with hippocampal neuropathology in typical aging and dementia. *Neurology* 58:750-757.2002).
- Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT, Jr. (The C-terminus of the beta protein is critical in amyloidogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 695:144-148.1993a).
- Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT, Jr. (The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 32:4693-4697.1993b).
- Jick H, Zornberg GL, Jick SS, Seshadri S, Drachman DA (Statins and the risk of dementia. *Lancet* 356:1627-1631.2000).
- Josephs KA, Whitwell JL, Ahmed Z, Shiung MM, Weigand SD, Knopman DS, Boeve BF, Parisi JE, Petersen RC, Dickson DW, Jack CR, Jr. (Beta-amyloid burden is not associated with rates of brain atrophy. *Ann Neurol* 63:204-212.2008).
- Joyce C, Skinner K, Anderson RA, Rudel LL (Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 2. *Curr Opin Lipidol* 10:89-95.1999).
- Jula A, Marniemi J, Huupponen R, Virtanen A, Rastas M, Ronnema T (Effects of diet and simvastatin on serum lipids, insulin, and antioxidants in hypercholesterolemic men: a randomized controlled trial. *JAMA* 287:598-605.2002).
- Kabouridis PS, Janzen J, Magee AL, Ley SC (Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes. *Eur J Immunol* 30:954-963.2000).
- Katsel P, Li C, Haroutunian V (Gene expression alterations in the sphingolipid metabolism pathways during progression of dementia and Alzheimer's disease: a shift toward ceramide accumulation at the earliest recognizable stages of Alzheimer's disease? *Neurochem Res* 32:845-856.2007).
- Kaufman RJ (Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest* 110:1389-1398.2002).
- Kelly PH, Bondolfi L, Hunziker D, Schlecht HP, Carver K, Maguire E, Abramowski D, Wiederhold KH, Sturchler-Pierrat C, Jucker M, Bergmann R, Staufenbiel M, Sommer B (Progressive age-related impairment of cognitive behavior in APP23 transgenic mice. *Neurobiol Aging* 24:365-378.2003).
- Kim HS, Park CH, Suh YH (C-terminal fragment of amyloid precursor protein inhibits calcium uptake into rat brain microsomes by Mg²⁺-Ca²⁺ ATPase. *Neuroreport* 9:3875-3879.1998).

- Kim J, Castellano JM, Jiang H, Basak JM, Parsadanian M, Pham V, Mason SM, Paul SM, Holtzman DM (Overexpression of low-density lipoprotein receptor in the brain markedly inhibits amyloid deposition and increases extracellular A beta clearance. *Neuron* 64:632-644.2009).
- Kim JH, Jittiwat J, Ong WY, Farooqui AA, Jenner AM (Changes in cholesterol biosynthetic and transport pathways after excitotoxicity. *J Neurochem* 112:34-41.2010).
- Kimberly WT, Esler WP, Ye W, Ostaszewski BL, Gao J, Diehl T, Selkoe DJ, Wolfe MS (Notch and the amyloid precursor protein are cleaved by similar gamma-secretase(s). *Biochemistry* 42:137-144.2003).
- Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, Hanninen T, Hallikainen M, Alhainen K, Soininen H, Tuomilehto J, Nissinen A (Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *BMJ* 322:1447-1451.2001).
- Kojro E, Gimpl G, Lammich S, Marz W, Fahrenholz F (Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5815-5820.2001).
- Koldamova R, Staufenbiel M, Lefterov I (Lack of ABCA1 considerably decreases brain ApoE level and increases amyloid deposition in APP23 mice. *J Biol Chem* 280:43224-43235.2005).
- Kosicek M, Malnar M, Goate A, Hecimovic S (Cholesterol accumulation in Niemann Pick type C (NPC) model cells causes a shift in APP localization to lipid rafts. *Biochem Biophys Res Commun* 393:404-409.2010).
- Lai A, Sisodia SS, Trowbridge IS (Characterization of sorting signals in the beta-amyloid precursor protein cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 270:3565-3573.1995).
- Laifenfeld D, Patzek LJ, McPhie DL, Chen Y, Levites Y, Cataldo AM, Neve RL (Rab5 mediates an amyloid precursor protein signaling pathway that leads to apoptosis. *J Neurosci* 27:7141-7153.2007).
- Laird FM, Cai H, Savonenko AV, Farah MH, He K, Melnikova T, Wen H, Chiang HC, Xu G, Koliatsos VE, Borchelt DR, Price DL, Lee HK, Wong PC (BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *J Neurosci* 25:11693-11709.2005).
- Lange Y, Ye J, Rigney M, Steck TL (Regulation of endoplasmic reticulum cholesterol by plasma membrane cholesterol. *J Lipid Res* 40:2264-2270.1999).
- Larner SF, Hayes RL, McKinsey DM, Pike BR, Wang KK (Increased expression and processing of caspase-12 after traumatic brain injury in rats. *J Neurochem* 88:78-90.2004).
- Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH (XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 23:7448-7459.2003).
- Lee KW, Im JY, Song JS, Lee SH, Lee HJ, Ha HY, Koh JY, Gwag BJ, Yang SD, Paik SG, Han PL (Progressive neuronal loss and behavioral impairments of transgenic C57BL/6 inbred mice expressing the carboxy terminus of amyloid precursor protein. *Neurobiol Dis* 22:10-24.2006).
- Lennernas H, Fager G (Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. Similarities and differences. *Clin Pharmacokinet* 32:403-425.1997).
- Leoni V, Mariotti C, Nanetti L, Salvatore E, Squitieri F, Bentivoglio AR, Bandettini di Poggio M, Piacentini S, Monza D, Valenza M, Cattaneo E, Di Donato S (Whole body cholesterol metabolism is impaired in Huntington's disease. *Neurosci Lett* 494:245-249.2011).
- Leroy K, Yilmaz Z, Brion JP (Increased level of active GSK-3beta in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33:43-55.2007).
- Levade T, Malagarie-Cazenave S, Gouaze V, Segui B, Tardy C, Betito S, Andrieu-Abadie N, Cuvillier O (Ceramide in apoptosis: a revisited role. *Neurochem Res* 27:601-607.2002).
- Levy E, Carman MD, Fernandez-Madrid IJ, Power MD, Lieberburg I, van Duinen SG, Bots GT, Luyendijk W, Frangione B (Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science* 248:1124-1126.1990).

- Li B, Mahmood A, Lu D, Wu H, Xiong Y, Qu C, Chopp M (Simvastatin attenuates microglial cells and astrocyte activation and decreases interleukin-1 β level after traumatic brain injury. *Neurosurgery* 65:179-185; discussion 185-176.2009a).
- Li G, Mongillo M, Chin KT, Harding H, Ron D, Marks AR, Tabas I (Role of ERO1- α -mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Cell Biol* 186:783-792.2009b).
- Li Y, Chu LW, Wang B, Yik PY, Huriletemuer, Jin DY, Ma X, Song YQ (CYP46A1 functional promoter haplotypes decipher genetic susceptibility to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 21:1311-1323.2010).
- Li Y, Ge M, Ciani L, Kuriakose G, Westover EJ, Dura M, Covey DF, Freed JH, Maxfield FR, Lytton J, Tabas I (Enrichment of endoplasmic reticulum with cholesterol inhibits sarcoplasmic-endoplasmic reticulum calcium ATPase-2b activity in parallel with increased order of membrane lipids: implications for depletion of endoplasmic reticulum calcium stores and apoptosis in cholesterol-loaded macrophages. *J Biol Chem* 279:37030-37039.2004).
- Liang CP, Han S, Li G, Tabas I, Tall AR (Impaired MEK signaling and SERCA expression promote ER stress and apoptosis in insulin-resistant macrophages and are reversed by exenatide treatment. *Diabetes* 61:2609-2620.2012).
- Lievremont JP, Rizzuto R, Hendershot L, Meldolesi J (BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca²⁺. *J Biol Chem* 272:30873-30879.1997).
- Lindberg C, Crisby M, Winblad B, Schultzberg M (Effects of statins on microglia. *J Neurosci Res* 82:10-19.2005).
- Liscum L, Munn NJ (Intracellular cholesterol transport. *Biochim Biophys Acta* 1438:19-37.1999).
- Lund EG, Guileyardo JM, Russell DW (cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7238-7243.1999).
- Luo Y, Bolon B, Kahn S, Bennett BD, Babu-Khan S, Denis P, Fan W, Kha H, Zhang J, Gong Y, Martin L, Louis JC, Yan Q, Richards WG, Citron M, Vassar R (Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat Neurosci* 4:231-232.2001).
- Mahley RW, Nathan BP, Pitas RE (Apolipoprotein E. Structure, function, and possible roles in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 777:139-145.1996).
- Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y (Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5644-5651.2006).
- Mandon EC, Ehses I, Rother J, van Echten G, Sandhoff K (Subcellular localization and membrane topology of serine palmitoyltransferase, 3-dehydrosphinganine reductase, and sphinganine N-acyltransferase in mouse liver. *J Biol Chem* 267:11144-11148.1992).
- Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, Nagata K, Harding HP, Ron D (CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 18:3066-3077.2004).
- Marquer C, Devauges V, Cossec JC, Liot G, Lecart S, Saudou F, Duyckaerts C, Leveque-Fort S, Potier MC (Local cholesterol increase triggers amyloid precursor protein-Bace1 clustering in lipid rafts and rapid endocytosis. *FASEB J* 25:1295-1305.2011).
- Marquez-Sterling NR, Lo AC, Sisodia SS, Koo EH (Trafficking of cell-surface beta-amyloid precursor protein: evidence that a sorting intermediate participates in synaptic vesicle recycling. *J Neurosci* 17:140-151.1997).
- Martin MG, Trovo L, Perga S, Sadowska A, Rasola A, Chiara F, Dotti CG (Cyp46-mediated cholesterol loss promotes survival in stressed hippocampal neurons. *Neurobiol Aging* 32:933-943.2011).
- Matsukawa J, Matsuzawa A, Takeda K, Ichijo H (The ASK1-MAP kinase cascades in mammalian stress response. *J Biochem* 136:261-265.2004).

- Matsuzaki S, Hiratsuka T, Kuwahara R, Katayama T, Tohyama M (Caspase-4 is partially cleaved by calpain via the impairment of Ca²⁺ homeostasis under the ER stress. *Neurochem Int* 56:352-356.2010).
- Mattson MP, Pedersen WA, Duan W, Culmsee C, Camandola S (Cellular and molecular mechanisms underlying perturbed energy metabolism and neuronal degeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Ann N Y Acad Sci* 893:154-175.1999).
- Mauch DH, Nagler K, Schumacher S, Goritz C, Muller EC, Otto A, Pfrieder FW (CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* 294:1354-1357.2001).
- Maurer K, Volk S, Gerbaldo H (Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet* 349:1546-1549.1997).
- McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ (Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* 21:1249-1259.2001).
- Meske V, Albert F, Richter D, Schwarze J, Ohm TG (Blockade of HMG-CoA reductase activity causes changes in microtubule-stabilizing protein tau via suppression of geranylgeranylpyrophosphate formation: implications for Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* 17:93-102.2003).
- Michikawa M, Fan QW, Isobe I, Yanagisawa K (Apolipoprotein E exhibits isoform-specific promotion of lipid efflux from astrocytes and neurons in culture. *J Neurochem* 74:1008-1016.2000).
- Mielke MM, Zandi PP, Sjogren M, Gustafson D, Ostling S, Steen B, Skoog I (High total cholesterol levels in late life associated with a reduced risk of dementia. *Neurology* 64:1689-1695.2005).
- Minagawa H, Gong JS, Jung CG, Watanabe A, Lund-Katz S, Phillips MC, Saito H, Michikawa M (Mechanism underlying apolipoprotein E (ApoE) isoform-dependent lipid efflux from neural cells in culture. *J Neurosci Res* 87:2498-2508.2009).
- Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y (An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 277:34287-34294.2002).
- Nadanaka S, Yoshida H, Mori K (Reduction of disulfide bridges in the luminal domain of ATF6 in response to glucose starvation. *Cell Struct Funct* 31:127-134.2006).
- Nagy Z, Esiri MM, Jobst KA, Johnston C, Litchfield S, Sim E, Smith AD (Influence of the apolipoprotein E genotype on amyloid deposition and neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 69:757-761.1995).
- Nakagawa T, Yuan J (Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 150:887-894.2000).
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J (Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403:98-103.2000).
- Nathan BP, Bellosta S, Sanan DA, Weisgraber KH, Mahley RW, Pitas RE (Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Science* 264:850-852.1994).
- Nikolaev A, McLaughlin T, O'Leary DD, Tessier-Lavigne M (APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* 457:981-989.2009).
- Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, Hori S, Kakizuka A, Ichijo H (ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev* 16:1345-1355.2002).
- Notkola IL, Sulkava R, Pekkanen J, Erkinjuntti T, Ehnholm C, Kivinen P, Tuomilehto J, Nissinen A (Serum total cholesterol, apolipoprotein E epsilon 4 allele, and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology* 17:14-20.1998).
- Ohno M, Sametsky EA, Younkin LH, Oakley H, Younkin SG, Citron M, Vassar R, Disterhoft JF (BACE1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron* 41:27-33.2004).
- Okada T, Yoshida H, Akazawa R, Negishi M, Mori K (Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem J* 366:585-594.2002).

- Ong WY, Goh EW, Lu XR, Farooqui AA, Patel SC, Halliwell B (Increase in cholesterol and cholesterol oxidation products, and role of cholesterol oxidation products in kainate-induced neuronal injury. *Brain Pathol* 13:250-262.2003).
- Ong WY, Kim JH, He X, Chen P, Farooqui AA, Jenner AM (Changes in brain cholesterol metabolome after excitotoxicity. *Mol Neurobiol* 41:299-313.2010).
- Orrenius S, Ankarcrona M, Nicotera P (Mechanisms of calcium-related cell death. *Adv Neurol* 71:137-149; discussion 149-151.1996).
- Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P (Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:552-565.2003).
- Oyadomari S, Mori M (Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 11:381-389.2004).
- Pagano RE (Endocytic trafficking of glycosphingolipids in sphingolipid storage diseases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:885-891.2003).
- Panchal M, Loeper J, Cossec JC, Perruchini C, Lazar A, Pompon D, Duyckaerts C (Enrichment of cholesterol in microdissected Alzheimer's disease senile plaques as assessed by mass spectrometry. *J Lipid Res* 51:598-605.2010).
- Papassotiropoulos A, Streffer JR, Tsolaki M, Schmid S, Thal D, Nicosia F, Iakovidou V, Maddalena A, Lutjohann D, Ghebremedhin E, Hegi T, Pasch T, Traxler M, Bruhl A, Benussi L, Binetti G, Braak H, Nitsch RM, Hock C (Increased brain beta-amyloid load, phosphorylated tau, and risk of Alzheimer disease associated with an intronic CYP46 polymorphism. *Arch Neurol* 60:29-35.2003).
- Pearse BM (Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:1255-1259.1976).
- Pedrini S, Carter TL, Prendergast G, Petanceska S, Ehrlich ME, Gandy S (Modulation of statin-activated shedding of Alzheimer APP ectodomain by ROCK. *PLoS Med* 2:e18.2005).
- Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Foss D, Mahley RW (Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 917:148-161.1987).
- Pitsi D, Octave JN (Presenilin 1 stabilizes the C-terminal fragment of the amyloid precursor protein independently of gamma-secretase activity. *J Biol Chem* 279:25333-25338.2004).
- Polvikoski T, Sulkava R, Haltia M, Kainulainen K, Vuorio A, Verkkoniemi A, Niinisto L, Halonen P, Kontula K (Apolipoprotein E, dementia, and cortical deposition of beta-amyloid protein. *N Engl J Med* 333:1242-1247.1995).
- Ponce J, de la Ossa NP, Hurtado O, Millan M, Arenillas JF, Davalos A, Gasull T (Simvastatin reduces the association of NMDA receptors to lipid rafts: a cholesterol-mediated effect in neuroprotection. *Stroke* 39:1269-1275.2008).
- Predescu SA, Predescu DN, Shimizu K, Klein IK, Malik AB (Cholesterol-dependent syntaxin-4 and SNAP-23 clustering regulates caveolar fusion with the endothelial plasma membrane. *J Biol Chem* 280:37130-37138.2005).
- Puglielli L, Ellis BC, Saunders AJ, Kovacs DM (Ceramide stabilizes beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and promotes amyloid beta-peptide biogenesis. *J Biol Chem* 278:19777-19783.2003a).
- Puglielli L, Tanzi RE, Kovacs DM (Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat Neurosci* 6:345-351.2003b).
- Puri V, Watanabe R, Dominguez M, Sun X, Wheatley CL, Marks DL, Pagano RE (Cholesterol modulates membrane traffic along the endocytic pathway in sphingolipid-storage diseases. *Nat Cell Biol* 1:386-388.1999).
- Quan G, Xie C, Dietschy JM, Turley SD (Ontogenesis and regulation of cholesterol metabolism in the central nervous system of the mouse. *Brain Res Dev Brain Res* 146:87-98.2003).
- Rao RV, Castro-Obregon S, Frankowski H, Schuler M, Stoka V, del Rio G, Bredesen DE, Ellerby HM (Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *J Biol Chem* 277:21836-21842.2002).

- Refolo LM, Malester B, LaFrancois J, Bryant-Thomas T, Wang R, Tint GS, Sambamurti K, Duff K, Pappolla MA (Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis* 7:321-331.2000).
- Reitz C, Tang MX, Luchsinger J, Mayeux R (Relation of plasma lipids to Alzheimer disease and vascular dementia. *Arch Neurol* 61:705-714.2004).
- Richard F, Amouyel P (Genetic susceptibility factors for Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* 412:1-12.2001).
- Roch JM, Masliah E, Roch-Levecq AC, Sundsmo MP, Otero DA, Veinbergs I, Saitoh T (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* 91:7450-7454.1994).
- Rockwood K, Kirkland S, Hogan DB, MacKnight C, Merry H, Verreault R, Wolfson C, McDowell I (Use of lipid-lowering agents, indication bias, and the risk of dementia in community-dwelling elderly people. *Arch Neurol* 59:223-227.2002).
- Rodal SK, Skretting G, Garred O, Vilhardt F, van Deurs B, Sandvig K (Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell* 10:961-974.1999).
- Romas SN, Tang MX, Berglund L, Mayeux R (APOE genotype, plasma lipids, lipoproteins, and AD in community elderly. *Neurology* 53:517-521.1999).
- Ron D, Habener JF (CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev* 6:439-453.1992).
- Ron D, Walter P (Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:519-529.2007).
- Russell DW, Halford RW, Ramirez DM, Shah R, Kotti T (Cholesterol 24-hydroxylase: an enzyme of cholesterol turnover in the brain. *Annu Rev Biochem* 78:1017-1040.2009).
- Sato T, Diehl TS, Narayanan S, Funamoto S, Ihara Y, De Strooper B, Steiner H, Haass C, Wolfe MS (Active gamma-secretase complexes contain only one of each component. *J Biol Chem* 282:33985-33993.2007).
- Schechter R, Yen SH, Terry RD (Fibrous Astrocytes in senile dementia of the Alzheimer type. *J Neuropathol Exp Neurol* 40:95-101.1981).
- Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, Larson E, Levy-Lahad E, Viitanen M, Peskind E, Poorkaj P, Schellenberg G, Tanzi R, Wasco W, Lannfelt L, Selkoe D, Younkin S (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* 2:864-870.1996).
- Scheuner D, Song B, McEwen E, Liu C, Laybutt R, Gillespie P, Saunders T, Bonner-Weir S, Kaufman RJ (Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell* 7:1165-1176.2001).
- Schindowski K, Bretteville A, Leroy K, Begard S, Brion JP, Hamdane M, Buee L (Alzheimer's disease-like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated tau transgenic mouse without any motor deficits. *Am J Pathol* 169:599-616.2006).
- Schroder M, Kaufman RJ (The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 74:739-789.2005).
- Schroeder F, Gallegos AM, Atshaves BP, Storey SM, McIntosh AL, Petrescu AD, Huang H, Starodub O, Chao H, Yang H, Frolov A, Kier AB (Recent advances in membrane microdomains: rafts, caveolae, and intracellular cholesterol trafficking. *Exp Biol Med (Maywood)* 226:873-890.2001).
- Selkoe DJ, Podlisny MB (Deciphering the genetic basis of Alzheimer's disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 3:67-99.2002).
- Selkoe DJ, Yamazaki T, Citron M, Podlisny MB, Koo EH, Teplow DB, Haass C (The role of APP processing and trafficking pathways in the formation of amyloid beta-protein. *Ann N Y Acad Sci* 777:57-64.1996).

- Seubert P, Oltersdorf T, Lee MG, Barbour R, Blomquist C, Davis DL, Bryant K, Fritz LC, Galasko D, Thal LJ, et al. (Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide. *Nature* 361:260-263.1993).
- Sever N, Song BL, Yabe D, Goldstein JL, Brown MS, DeBose-Boyd RA (Insig-dependent ubiquitination and degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase stimulated by sterols and geranylgeraniol. *J Biol Chem* 278:52479-52490.2003).
- Sevin M, Lesca G, Baumann N, Millat G, Lyon-Caen O, Vanier MT, Sedel F (The adult form of Niemann-Pick disease type C. *Brain* 130:120-133.2007).
- Shiratori Y, Okwu AK, Tabas I (Free cholesterol loading of macrophages stimulates phosphatidylcholine biosynthesis and up-regulation of CTP: phosphocholine cytidyltransferase. *J Biol Chem* 269:11337-11348.1994).
- Simons K, Toomre D (Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:31-39.2000).
- Simons M, Keller P, De Strooper B, Beyreuther K, Dotti CG, Simons K (Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6460-6464.1998).
- Simons M, Schwarzler F, Lutjohann D, von Bergmann K, Beyreuther K, Dichgans J, Wormstall H, Hartmann T, Schulz JB (Treatment with simvastatin in normocholesterolemic patients with Alzheimer's disease: A 26-week randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Ann Neurol* 52:346-350.2002).
- Simonsen A, Lippe R, Christoforidis S, Gaullier JM, Brech A, Callaghan J, Toh BH, Murphy C, Zerial M, Stenmark H (EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* 394:494-498.1998).
- Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J, Jacobson-Croak K, Jewett N, Keim P, Knops J, Lieberburg I, Power M, Tan H, Tatsuno G, Tung J, Schenk D, Seubert P, Suomensaaari SM, Wang S, Walker D, Zhao J, McConlogue L, John V (Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402:537-540.1999).
- Sipione S, Rigamonti D, Valenza M, Zuccato C, Conti L, Pritchard J, Kooperberg C, Olson JM, Cattaneo E (Early transcriptional profiles in huntingtin-inducible striatal cells by microarray analyses. *Hum Mol Genet* 11:1953-1965.2002).
- Sisodia SS (Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6075-6079.1992).
- Sjogren M, Mielke M, Gustafson D, Zandi P, Skoog I (Cholesterol and Alzheimer's disease--is there a relation? *Mech Ageing Dev* 127:138-147.2006).
- Sleat DE, Wiseman JA, El-Banna M, Price SM, Verot L, Shen MM, Tint GS, Vanier MT, Walkley SU, Lobel P (Genetic evidence for nonredundant functional cooperativity between NPC1 and NPC2 in lipid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:5886-5891.2004).
- Soderberg M, Edlund C, Kristensson K, Dallner G (Lipid compositions of different regions of the human brain during aging. *J Neurochem* 54:415-423.1990).
- Sodero AO, Trovo L, Iannilli F, Van Veldhoven P, Dotti CG, Martin MG (Regulation of tyrosine kinase B activity by the Cyp46/cholesterol loss pathway in mature hippocampal neurons: relevance for neuronal survival under stress and in aging. *J Neurochem* 116:747-755.2011).
- Song BL, Javitt NB, DeBose-Boyd RA (Insig-mediated degradation of HMG CoA reductase stimulated by lanosterol, an intermediate in the synthesis of cholesterol. *Cell Metab* 1:179-189.2005a).
- Song BL, Sever N, DeBose-Boyd RA (Gp78, a membrane-anchored ubiquitin ligase, associates with Insig-1 and couples sterol-regulated ubiquitination to degradation of HMG CoA reductase. *Mol Cell* 19:829-840.2005b).
- Sparks DL (Intraneuronal beta-amyloid immunoreactivity in the CNS. *Neurobiol Aging* 17:291-299.1996).
- Sparks DL (The early and ongoing experience with the cholesterol-fed rabbit as a model of Alzheimer's disease: the old, the new and the pilot. *J Alzheimers Dis* 15:641-656.2008).

- Sparks DL, Kryscio RJ, Connor DJ, Sabbagh MN, Sparks LM, Lin Y, Liebsack C (Cholesterol and cognitive performance in normal controls and the influence of elective statin use after conversion to mild cognitive impairment: results in a clinical trial cohort. *Neurodegener Dis* 7:183-186.2010).
- Sparks DL, Scheff SW, Hunsaker JC, 3rd, Liu H, Landers T, Gross DR (Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. *Exp Neurol* 126:88-94.1994).
- Sriburi R, Bommiasamy H, Buldak GL, Robbins GR, Frank M, Jackowski S, Brewer JW (Coordinate regulation of phospholipid biosynthesis and secretory pathway gene expression in XBP-1(S)-induced endoplasmic reticulum biogenesis. *J Biol Chem* 282:7024-7034.2007).
- Sriburi R, Jackowski S, Mori K, Brewer JW (XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 167:35-41.2004).
- Stein TD, Anders NJ, DeCarli C, Chan SL, Mattson MP, Johnson JA (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* 24:7707-7717.2004).
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD (Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1977-1981.1993).
- Sturchler-Pierrat C, Staudenbiel M (Pathogenic mechanisms of Alzheimer's disease analyzed in the APP23 transgenic mouse model. *Ann N Y Acad Sci* 920:134-139.2000).
- Subtil A, Gaidarov I, Kobylarz K, Lampson MA, Keen JH, McGraw TE (Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6775-6780.1999).
- Tabas I (Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J Clin Invest* 110:905-911.2002).
- Tabas I, Marathe S, Keesler GA, Beatini N, Shiratori Y (Evidence that the initial up-regulation of phosphatidylcholine biosynthesis in free cholesterol-loaded macrophages is an adaptive response that prevents cholesterol-induced cellular necrosis. Proposed role of an eventual failure of this response in foam cell necrosis in advanced atherosclerosis. *J Biol Chem* 271:22773-22781.1996).
- Takechi R, Galloway S, Pallegage-Gamarallage MM, Lam V, Dhaliwal SS, Mamo JC (Probucol prevents blood-brain barrier dysfunction in wild-type mice induced by saturated fat or cholesterol feeding. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 40:45-52.2013).
- Takechi R, Pallegage-Gamarallage MM, Lam V, Giles C, Mamo JC (Aging-Related Changes in Blood-Brain Barrier Integrity and the Effect of Dietary Fat. *Neurodegener Dis*.2012).
- Thelen KM, Falkai P, Bayer TA, Lutjohann D (Cholesterol synthesis rate in human hippocampus declines with aging. *Neurosci Lett* 403:15-19.2006).
- Thinakaran G, Koo EH (Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem* 283:29615-29619.2008).
- Thirumangalakudi L, Prakasam A, Zhang R, Bimonte-Nelson H, Sambamurti K, Kindy MS, Bhat NR (High cholesterol-induced neuroinflammation and amyloid precursor protein processing correlate with loss of working memory in mice. *J Neurochem* 106:475-485.2008).
- Timmins JM, Ozcan L, Seimon TA, Li G, Malagelada C, Backs J, Backs T, Bassel-Duby R, Olson EN, Anderson ME, Tabas I (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II links ER stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways. *J Clin Invest* 119:2925-2941.2009).
- Treiman M (Regulation of the endoplasmic reticulum calcium storage during the unfolded protein response--significance in tissue ischemia? *Trends Cardiovasc Med* 12:57-62.2002).
- Tulenko TN, Laury-Kleintop L, Walter MF, Mason RP (Cholesterol, calcium and atherosclerosis: is there a role for calcium channel blockers in atheroprotection? *Int J Cardiol* 62 Suppl 2:S55-66.1997).

- Turley SD, Burns DK, Rosenfeld CR, Dietschy JM (Brain does not utilize low density lipoprotein-cholesterol during fetal and neonatal development in the sheep. *J Lipid Res* 37:1953-1961.1996).
- Ubeda M, Wang XZ, Zinszner H, Wu I, Habener JF, Ron D (Stress-induced binding of the transcriptional factor CHOP to a novel DNA control element. *Mol Cell Biol* 16:1479-1489.1996).
- Umeda T, Tomiyama T, Kitajima E, Idomoto T, Nomura S, Lambert MP, Klein WL, Mori H (Hypercholesterolemia accelerates intraneuronal accumulation of Abeta oligomers resulting in memory impairment in Alzheimer's disease model mice. *Life Sci* 91:1169-1176.2012).
- Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D (Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287:664-666.2000).
- Valenza M, Rigamonti D, Goffredo D, Zuccato C, Fenu S, Jamot L, Strand A, Tarditi A, Woodman B, Racchi M, Mariotti C, Di Donato S, Corsini A, Bates G, Pruss R, Olson JM, Sipione S, Tartari M, Cattaneo E (Dysfunction of the cholesterol biosynthetic pathway in Huntington's disease. *J Neurosci* 25:9932-9939.2005).
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M (Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286:735-741.1999).
- Verbeek MM, Van Nostrand WE, Otte-Holler I, Wesseling P, De Waal RM (Amyloid-beta-induced degeneration of human brain pericytes is dependent on the apolipoprotein E genotype. *Ann N Y Acad Sci* 903:187-199.2000).
- von Arnim CA, von Einem B, Weber P, Wagner M, Schwanzar D, Spoelgen R, Strauss WL, Schneckenburger H (Impact of cholesterol level upon APP and BACE proximity and APP cleavage. *Biochem Biophys Res Commun* 370:207-212.2008).
- Wahrle SE, Jiang H, Parsadanian M, Hartman RE, Bales KR, Paul SM, Holtzman DM (Deletion of Abca1 increases Abeta deposition in the PDAPP transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 280:43236-43242.2005).
- Wahrle SE, Jiang H, Parsadanian M, Kim J, Li A, Knoten A, Jain S, Hirsch-Reinshagen V, Wellington CL, Bales KR, Paul SM, Holtzman DM (Overexpression of ABCA1 reduces amyloid deposition in the PDAPP mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest* 118:671-682.2008).
- Wahrle SE, Jiang H, Parsadanian M, Legleiter J, Han X, Fryer JD, Kowalewski T, Holtzman DM (ABCA1 is required for normal central nervous system ApoE levels and for lipidation of astrocyte-secreted apoE. *J Biol Chem* 279:40987-40993.2004).
- Wang Y, Tsui Z, Yang F (Mechanistic study of modulation of SR Ca²⁺-ATPase activity by gangliosides GM1 and GM3 through some biophysical measurements. *Glycoconj J* 16:781-786.1999).
- Weisgraber KH, Mahley RW (Human apolipoprotein E: the Alzheimer's disease connection. *FASEB J* 10:1485-1494.1996).
- Whitwell JL, Josephs KA, Murray ME, Kantarci K, Przybelski SA, Weigand SD, Vemuri P, Senjem ML, Parisi JE, Knopman DS, Boeve BF, Petersen RC, Dickson DW, Jack CR, Jr. (MRI correlates of neurofibrillary tangle pathology at autopsy: a voxel-based morphometry study. *Neurology* 71:743-749.2008).
- Wollmer MA, Streffer JR, Tsolaki M, Grimaldi LM, Lutjohann D, Thal D, von Bergmann K, Nitsch RM, Hock C, Papassotiropoulos A (Genetic association of acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase with cerebrospinal fluid cholesterol levels, brain amyloid load, and risk for Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* 8:635-638.2003).
- Wolozin B, Kellman W, Ruosseau P, Celesia GG, Siegel G (Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol* 57:1439-1443.2000).

- Wong RK, Traub RD, Miles R (Cellular basis of neuronal synchrony in epilepsy. *Adv Neurol* 44:583-592.1986).
- Xiong H, Callaghan D, Jones A, Walker DG, Lue LF, Beach TG, Sue LI, Woulfe J, Xu H, Stanimirovic DB, Zhang W (Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high beta- and gamma-secretase activities and Abeta production. *Neurobiol Dis* 29:422-437.2008).
- Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC (Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 115:2656-2664.2005).
- Yaffe K, Barrett-Connor E, Lin F, Grady D (Serum lipoprotein levels, statin use, and cognitive function in older women. *Arch Neurol* 59:378-384.2002).
- Yamazaki T, Koo EH, Selkoe DJ (Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. II. Endocytosis, recycling and lysosomal targeting detected by immunolocalization. *J Cell Sci* 109 (Pt 5):999-1008.1996).
- Yan R, Bienkowski MJ, Shuck ME, Miao H, Tory MC, Pauley AM, Brashier JR, Stratman NC, Mathews WR, Buhl AE, Carter DB, Tomasselli AG, Parodi LA, Heinrichson RL, Gurney ME (Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402:533-537.1999).
- Yang LB, Lindholm K, Yan R, Citron M, Xia W, Yang XL, Beach T, Sue L, Wong P, Price D, Li R, Shen Y (Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nat Med* 9:3-4.2003).
- Yao S, Zong C, Zhang Y, Sang H, Yang M, Jiao P, Fang Y, Yang N, Song G, Qin S (Activating transcription factor 6 mediates oxidized LDL-induced cholesterol accumulation and apoptosis in macrophages by up-regulating CHOP expression. *J Atheroscler Thromb* 20:94-107.2013).
- Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M (Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem* 276:13935-13940.2001).
- Yoshida H, Matsui T, Hosokawa N, Kaufman RJ, Nagata K, Mori K (A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Dev Cell* 4:265-271.2003).
- Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K (XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107:881-891.2001).
- Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K (ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 20:6755-6767.2000).
- Yu T, Shakkottai VG, Chung C, Lieberman AP (Temporal and cell-specific deletion establishes that neuronal Npc1 deficiency is sufficient to mediate neurodegeneration. *Hum Mol Genet* 20:4440-4451.2011).
- Zeng L, Lu M, Mori K, Luo S, Lee AS, Zhu Y, Shyy JY (ATF6 modulates SREBP2-mediated lipogenesis. *EMBO J* 23:950-958.2004).
- Zhang K, Kaufman RJ (Unfolding the toxicity of cholesterol. *Nat Cell Biol* 5:769-770.2003).
- Zhou J, Liu CY, Back SH, Clark RL, Peisach D, Xu Z, Kaufman RJ (The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:14343-14348.2006).
- Zhou Y, Su Y, Li B, Liu F, Ryder JW, Wu X, Gonzalez-DeWhitt PA, Gelfanova V, Hale JE, May PC, Paul SM, Ni B (Nonsteroidal anti-inflammatory drugs can lower amyloidogenic Abeta42 by inhibiting Rho. *Science* 302:1215-1217.2003).
- Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D (CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 12:982-995.1998).