



HAL
open science

Implication du récepteur LSR (lipolysis stimulated lipoprotein receptor) dans le contrôle de l'homéostasie du cholestérol cérébral et les capacités cognitives au cours du vieillissement

Anthony Pinçon

► **To cite this version:**

Anthony Pinçon. Implication du récepteur LSR (lipolysis stimulated lipoprotein receptor) dans le contrôle de l'homéostasie du cholestérol cérébral et les capacités cognitives au cours du vieillissement. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2014. Français. NNT : 2014LORR0141 . tel-01751001

HAL Id: tel-01751001

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751001v1>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE



UNIVERSITÉ DE LORRAINE

École doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources, Procédés, Produits, Environnement

THÈSE

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine

Discipline « Procédés Biotechnologiques et alimentaires »

par

Anthony PINÇON

Implication du récepteur LSR (*lipolysis stimulated lipoprotein receptor*) dans le contrôle de l'homéostasie du cholestérol cérébral et les capacités cognitives au cours du vieillissement

Soutenue publiquement le 05 Novembre 2014

Membres du jury

Rapporteurs	M. Philippe CARDOT	Professeur des Universités, Université Pierre et Marie Curie, Paris
	Mme Marie–Claude POTIER	Directeur de Recherche CNRS, Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière, Paris
Examineurs	M. Jean-Noël OCTAVE	Professeur des Universités, Université catholique de Louvain, Bruxelles
	M. Jean-Luc DAVAL	Directeur de Recherche INSERM, Université de Lorraine
	Mme Frances YEN POTIN	Directrice de Recherche INSERM, Université de Lorraine, Directrice de thèse
	M. Jean–Luc OLIVIER	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Université de Lorraine, Co-directeur de Thèse

Remerciements

J'adresse en premier lieu mes vifs remerciements au Docteur Marie-Claude Potier (directeur de recherche CNRS) et au Professeur Philippe Cardot pour m'avoir fait l'honneur d'examiner mon travail en tant que rapporteurs et pour le temps qu'ils y ont consacré. Je tiens également à remercier chaleureusement le professeur Jean-Noël Octave pour avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examinateur ainsi que Jean-Luc Daval (directeur de recherche INSERM) pour avoir eu la gentillesse de présider mon jury. Un grand merci à ces personnes pour l'intérêt bienveillant qu'ils ont manifesté à l'égard de ce travail.

Mes remerciements vont également à l'ensemble des statutaires de l'équipe BFLA. Un grand MERCI tout particulier à mes encadrants, Frances Yen Potin et Jean-Luc Olivier. Frances, j'ai beaucoup apprécié ces 3 années de thèse passées sous votre encadrement, aux cours desquelles vous m'avez donné votre pleine confiance et une grande liberté quant à la manière de faire avancer ce projet qui m'a été confié. Merci de m'avoir fait découvrir le monde de la recherche et ses subtilités et de m'avoir inculqué le savoir nécessaire pour poursuivre ma carrière. Jean-Luc, je tiens tout particulièrement à vous remercier pour votre précieuse implication dans l'élaboration de ce manuscrit et la rédaction des publications scientifiques. Nos discussions et vos conseils auront été très enrichissants. J'espère que nous aurons l'occasion de nous recroiser par la suite.

Je remercie mes collègues (dans un ordre alphabétique pour ne pas faire de jaloux) : Ahmad, Annabelle, Dorine, Julie, Hamed, Laurent, Marine, Marion, Martial, Mélanie, Mylène, Nicolas, Pierre, Samina, Sandra et Violette. J'ai été très heureux de vous compter dans mon entourage professionnel et personnel. Je n'oublierai jamais cette ambiance si particulière et unique qu'il me sera sûrement impossible de retrouver ailleurs et toutes ces soirées passées ensemble. Un merci spécial à Laurent (alias « l'autiste »), pour ton amitié et cette complicité construites au fil du temps. Un autre merci particulier à Annabelle et Marion pour leur précieuse aide technique et surtout pour les bons moments passés. Il m'a été fort agréable de travailler avec vous dans une si bonne humeur et délire en tout genre. Ce serait une erreur de ma part de ne pas associer le mot

« délire » à Sandra, qui a eu l'aimable gentillesse de relire ce manuscrit.

Je tiens également à remercier le professeur Catherine Corbier *et* Alain Georges, sans qui les études complémentaires demandées pour la publication d'une partie de ces travaux n'auraient pu être réalisées.

Une dédicace toute particulière au Docteur Christophe Stenger, pour m'avoir donné la possibilité de réaliser mon stage de deuxième année de master au sein de ce laboratoire et de rejoindre cette aventure toute particulière qu'est la thèse. Je n'oublierai pas ton encadrement aussi atypique qu'efficace et la complicité existante entre nous. Sans toi, je ne serais pas là où je suis aujourd'hui.

Pour terminer, je tiens à remercier les personnes qui me sont le plus chères. Tout d'abord, ma famille et tout particulièrement mes parents, qui m'auront tout donné pendant ces années et qui auront permis de me construire dans un environnement plus que parfait. Sans vous, je n'aurais pu arriver là où j'en suis aujourd'hui. Cette thèse est aussi la vôtre et l'accomplissement de toutes ces années pendant lesquelles vous m'aurez toujours soutenu dans mes choix et décisions.

Enfin, le plus important pour moi, merci à toi Mélanie, pour ton soutien indéfectible et ton amour apportés au quotidien ces deux dernières années. Sans toi, le chemin menant à la concrétisation de cette thèse aurait été bien plus difficile. Par ta tendresse et ta douceur, tu as su m'apaiser et me rassurer dans mes moments de doute et d'inquiétudes. Je te serai également éternellement reconnaissant de m'avoir soutenu dans mon projet postdoctoral au Canada, qui sera malheureusement synonyme d'éloignement pendant une année, et surtout de me rejoindre là-bas pour vivre ensemble une toute nouvelle aventure, et ouvrir un tout nouveau chapitre dans notre relation.

Sommaire

Liste des illustrations.....	1
Liste des tableaux.....	4
Liste des abréviations.....	5
Avant-propos	10
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique	12
I. Présentation de la maladie d'Alzheimer (MA)	14
A. Les différents stades cliniques et le polymorphisme de la MA.....	14
B. Formes monogéniques et sporadiques de la MA.....	16
C. Acteurs cellulaires et moléculaires de la physiopathologie de la MA.....	16
1. <i>Les dégénérescences neurofibrillaires (DNF)</i>	16
2. <i>Les dépôts amyloïdes</i>	18
D. Le peptide A β : l'acteur central de l'hypothèse de la cascade amyloïde	18
E. La toxicité du peptide A β soluble	20
F. Production, dégradation et clairance du peptide A β	22
1. <i>Structure et fonction d'APP</i>	22
2. <i>Synthèse, maturation et trafic d'APP</i>	23
3. <i>De l'APP au peptide Aβ</i>	23
4. <i>Clairance des peptides Aβ</i>	26
G. Les modèles murins de la MA.....	27
H. Facteurs de risque de la MA	31
1. <i>Facteurs de risque généraux</i>	31
2. <i>Association avec d'autres pathologies</i>	32
3. <i>Facteurs de risque génétiques et biologiques</i>	32
II. Métabolisme cérébral du cholestérol et ses régulations.....	35
A. Rôles généraux du cholestérol dans le cerveau	35
B. Synthèse du cholestérol.....	36
1. <i>Voie de synthèse du cholestérol</i>	37
2. <i>Régulation de la synthèse de cholestérol</i>	38
C. Transport intracellulaire, stockage et métabolisation du cholestérol.....	43
1. <i>Transport intracellulaire du cholestérol : rôle de NPC1</i>	43
2. <i>Stockage du cholestérol : formation de cholestérol estérifié</i>	46
3. <i>Métabolisation du cholestérol : formation des oxystérols</i>	47
D. Les transports intercellulaires et transcellulaires du cholestérol.....	52
1. <i>Les lipoprotéines cérébrales et l'ApoE</i>	52
2. <i>Les transporteurs de la famille ABC</i>	56
3. <i>Les récepteurs aux apoE</i>	60
III. Métabolisme cérébral du cholestérol et maladie d'Alzheimer.....	64
A. Impact des régimes hyperlipidique et enrichi en cholestérol chez l'animal.....	64
B. Cholestérol et production du peptide A β	72
1. <i>Cholestérol, radeaux lipidiques et production du peptide Aβ</i>	72

2.	<i>Transports du cholestérol et production du peptide Aβ</i>	74
C.	Cholestérol et toxicité du peptide.....	81
D.	Cholestérol et clairance du peptide A β	82
1.	<i>ApoE et clairance du peptide Aβ</i>	82
2.	<i>Le rôle fondamental de LRP1 dans la clairance du peptide Aβ</i>	85
3.	<i>Transporteur ABCA1 et clairance du peptide Aβ</i>	87
4.	<i>Régulation de LXR par ses agonistes ou les oxystérols et clairance du peptide Aβ</i>	88
IV.	Lipolysis stimulated lipoprotein receptor (LSR)	93
V.	Résumé de la synthèse bibliographique	99
VI.	Hypothèses et objectifs de travail	101
	Chapitre II : Matériels et méthodes	104
I.	Etudes <i>in vivo</i>	106
A.	Animaux et conditions d'hébergement.....	106
B.	Le génotypage.....	106
C.	Chirurgie stéréotaxique.....	107
1.	<i>Anesthésie</i>	107
2.	<i>Injections intracérébrales</i>	107
D.	Analyses comportementales.....	108
1.	<i>Système de capture vidéo</i>	108
2.	<i>Etude de la mémoire de travail à court terme : le labyrinthe en Y</i>	110
3.	<i>Etude des capacités d'apprentissage et de la mémoire à long terme : la piscine de Morris où le labyrinthe aquatique</i>	111
4.	<i>Test du champ ouvert</i>	113
E.	Dissections et prélèvements tissulaires.....	113
F.	Prélèvements sanguins.....	114
II.	Analyses biochimiques	114
A.	Extraction lipidique.....	114
B.	Dosages lipidiques.....	114
1.	<i>Dosage des triglycérides</i>	115
2.	<i>Dosage du cholestérol total</i>	115
3.	<i>Dosage des phospholipides</i>	116
4.	<i>Dosage de la leptine plasmatique</i>	116
C.	Extractions protéiques sur neurones primaires.....	116
D.	Extraction protéique sur structures cérébrales.....	116
E.	Préparation des synaptosomes.....	117
F.	Dosage des protéines :.....	117
G.	Immunoblot.....	117
1.	<i>Electrophorèse</i>	117
2.	<i>Électrotransfert et révélation</i>	118
III.	Biologie cellulaire	118
A.	Culture des neurones primaires.....	118
B.	Traitements par les oligonucéotides antisens.....	121
C.	Traitement par les siRNA.....	122

Sommaire

1. INTERFERin®.....	122
2. Lipofectamine.....	122
3. TransIT-TKO	122
D. Préparation des peptides	122
E. Traitement par le peptide Aβ soluble.....	123
F. Test d'activité mitochondriale au MTT.....	124
1. Principe	124
2. Protocole.....	124
IV. Biologie moléculaire	124
A. Extraction des ARN sur tissus	124
B. Quantification des ARN et gel d'électrophorèse	125
C. Transcription inverse	126
D. PCR quantitative à temps réel.....	126
V. Analyses statistiques	127
Chapitre III : Résultats et discussions	128
I. Brain region-specific immunolocalization of the lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) and altered cholesterol distribution in aged LSR^{+/-} mice	130
II. Résultats complémentaires	141
III. Increased susceptibility of dyslipidemic LSR^{+/-} mice to amyloid stress is associated with changes in cortical cholesterol levels	151
IV. Impacts de régimes hyperlipidique et enrichi en cholestérol sur le métabolisme du cholestérol cérébral et périphérique et les capacités cognitives chez le modèle de souris LSR^{+/-}	178
A. Introduction.....	179
B. Composition et modalités d'application des régimes.....	182
C. Résultats.....	184
1. Prise alimentaire et masse corporelle.....	184
2. Dosages de cholestérol, de triglycérides et de leptine plasmatiques.....	188
3. Dosages lipidiques hépatiques.....	193
4. Dosages lipidiques dans les structures cérébrales (hypothalamus, cortex, hippocampe, cervelet)	194
5. Evaluation des capacités cognitives	198
6. Caractérisation des acteurs du métabolisme du cholestérol central hypothalamique	202
D. Discussion.....	206
Chapitre IV : Conclusions et perspectives.....	212
Appendice : Développement d'un système <i>in vitro</i>	218
Bibliographie.....	230

Liste des illustrations

Figure 1 : Illustrations de plaques amyloïdes (a) et de dégénérescences neurofibrillaires (b)	14
Figure 2 : Les étapes de détermination du MCI	15
Figure 3 : Protéine tau et tauopathie	17
Figure 4 : Hypothèse de la cascade amyloïde	20
Figure 5 : Impact des peptides amyloïdes sur le stress oxydant	22
Figure 6 : Maturation et transport d'APP.	23
Figure 7 : Métabolisme d'APP	26
Figure 8 : Implication de l'apoE4 dans la MA	33
Figure 9 : Structure du cholestérol	35
Figure 10 : Voie de synthèse du cholestérol	37
Figure 11 : Régulation du transport de SREBP2 via les stérols	39
Figure 12 : Régulation de la synthèse des stérols (d'après Goldstein et al. 2006)	40
Figure 13 : Régulation de l'HMGCoAR (d'après Goldstein et al. 2006)	41
Figure 14 : Régulation de LXR (d'après Zelcer et al. 2006).	43
Figure 15 : Transport intracellulaire du cholestérol	44
Figure 16 : Structures du 24S-hydroxycholestérol (A) et du 27-hydroxycholestérol (B)	48
Figure 17 : Métabolisme des oxystérols	49
Figure 18 : Métabolisme du cholestérol cérébral chez des souris déficientes pour la 24S-hydroxylase	51
Figure 19 : Transport du cholestérol entre les astrocytes et les neurones	53
Figure 20 : Rôles de l'apoE dans le cerveau	54
Figure 21 : Structures de l'ApoE3 et de l'ApoE4	55
Figure 22 : Expressions des transporteurs du cholestérol dans le système nerveux central	57
Figure 23 : Implications des transporteurs ABCG1 et ABCG4 dans le métabolisme du cholestérol cérébral	60
Figure 24 : Structure des radeaux lipidiques	73
Figure 25 : Localisation des domaines d'interaction au cholestérol de l'APP et du peptide A β	81
Figure 26 : Implications des apoE3 et apoE4 dans le métabolisme du peptide amyloïde	83
Figure 27 : Régulation du récepteur LSR	95
Figure 28 : Régulation de l'expression de LSR et de la lipémie postprandiale via la leptine	96
Figure 29 : Schéma récapitulatif du métabolisme du cholestérol cérébral	100
Figure 30 : Capture d'écran du logiciel de capture vidéo	109
Figure 31 : Planification de la démarche expérimentale permettant d'évaluer l'impact d'oligomères solubles A β (A β Os) sur les capacités cognitives	110
Figure 32 : Schéma du dispositif du labyrinthe en Y	111
Figure 33 : Schéma du dispositif du labyrinthe aquatique	112
Figure 34 : Contrôle d'une préparation d'oligomères de peptide A β	123
Figure 35 : Evolution de la masse corporelle de souris mâles LSR ^{+/+} et LSR ^{+/-} au cours du vieillissement	142

<i>Figure 36 : Nuage de points représentant les deux delta Ct (Ct gènes d'intérêts-moyenne Ct des gènes de référence) d'hippocampes de souris mâles LSR^{+/+} et LSR^{+/-} âgées de 19 mois</i>	143
<i>Figure 37 : Expressions protéiques de divers acteurs du métabolisme du cholestérol cérébral dans l'hippocampe de souris LSR^{+/+} (barres bleues) et LSR^{+/-} (barres rouges) âgées de 19 mois</i>	150
<i>Figure 38 : Composition du régime alimentaire standard</i>	182
<i>Figure 39 : Composition du régime alimentaire hyperlipidique (HF)</i>	183
<i>Figure 40 : Composition du régime alimentaire enrichi en cholestérol (2 %)</i>	183
<i>Figure 41 : Evolution de la masse corporelle de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} placées sous des régimes STD et HF</i>	185
<i>Figure 42 : Evolution de la masse corporelle de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} placées sous des régimes STD et CHOL</i>	186
<i>Figure 43 : Evolution de la prise alimentaire de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} placées sous des régimes STD et HF</i>	187
<i>Figure 44 : Evolution de la prise alimentaire de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} placées sous des régimes STD et CHOL</i>	188
<i>Figure 45 : Cholestérolémies postprandiales et à-jeun de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} placées sous des régimes STD, HF et CHOL</i>	190
<i>Figure 46 : Triglycéridémies postprandiale et à-jeun de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} placées sous des régimes STD, HF et CHOL</i>	191
<i>Figure 47 : Quantités de leptine plasmatiques de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} placées sous des régimes STD, HF et CHOL</i>	192
<i>Figure 48 : Corrélation de Spearman entre la masse et les quantités de leptine plasmatique chez des souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} sous des régimes STD, HF et CHOL</i>	193
<i>Figure 49 : Quantités de cholestérol par mg de tissu sec hépatique de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} placées sous des régimes STD, HF et CHOL</i>	194
<i>Figure 50 : Ratios de cholestérol/phospholipides par mg de tissu sec d'hypothalamus de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} placées sous des régimes STD, HF et CHOL</i>	195
<i>Figure 51 : Ratios de cholestérol/phospholipides par mg de tissu sec de cervelet de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} placées sous des régimes STD, HF et CHOL</i>	196
<i>Figure 52 : Ratios de cholestérol/phospholipides par mg de tissu sec de cortex de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} placées sous des régimes STD, HF et CHOL</i>	197
<i>Figure 53 : Ratios de cholestérol/phospholipides par mg de tissu sec d'hippocampe de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} placées sous des régimes STD, HF et CHOL</i>	197
<i>Figure 54 : Pourcentages d'alternances (A) et nombres d'entrées (B) réalisés par des souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} soumises à des régimes STD, HF et CHOL</i>	199
<i>Figure 55 : Distances parcourues par des souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} soumises à des régimes STD, HF et CHOL</i>	200
<i>Figure 56 : Temps passés dans la zone centrale et d'immobilisation de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} soumises à des régimes STD, HF et CHOL</i>	201
<i>Figure 57 : Vitesses moyennes globale et dans la zone centrale de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} soumises à des régimes STD, HF et CHOL</i>	202
<i>Figure 58 : Expressions de l'HMGCoAR dans l'hypothalamus de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} placées sous des régimes STD, HF et CHOL</i>	203
<i>Figure 59 : Expression d'ABCA1 dans l'hypothalamus de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} placées sous des régimes STD, HF et CHOL</i>	204

<i>Figure 60 : Expressions du récepteur à la ghréline dans l'hypothalamus de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} placées sous des régimes STD, HF et CHOL</i>	205
<i>Figure 61 : Immunolocalisation du récepteur LSR dans des neurones primaires corticaux embryonnaires de rats</i>	221
<i>Figure 62 : Neurones primaires corticaux embryonnaires de rats après transfection de siRNA avec les vecteurs de transfection INTERFERin et TransIT-TKO</i>	222
<i>Figure 63 : Neurones primaires corticaux embryonnaires de rats après transfection de siRNA avec la lipofectamine</i>	223
<i>Figure 64 : Expressions du marqueur présynaptique SNAP25 après transfection de siRNA avec la lipofectamine</i>	224
<i>Figure 65 : Neurones primaires corticaux embryonnaires de rats après transfection de siRNA avec lipofectamine</i>	225
<i>Figure 66 : Viabilité de neurones primaires corticaux embryonnaires de rats après transfection de siRNA avec la lipofectamine</i>	226
<i>Figure 67 : Viabilité de neurones primaires corticaux embryonnaires de rats après transfection d'oligonucléotides et traitement aux oligomères du peptide abeta</i>	227
<i>Figure 68 : Expression du récepteur LSR dans des neurones primaires corticaux embryonnaires de rats après transfection d'oligonucléotides</i>	228
<i>Figure 69 : Immunoblot du récepteur LSR sur des cellules N2A</i>	229

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Impacts de régimes alimentaires sur la cognition chez le rat.....</i>	<i>69</i>
<i>Tableau 2 : Impacts de régimes alimentaires sur la cognition chez le lapin.....</i>	<i>70</i>
<i>Tableau 3 : Impacts de régimes alimentaires sur la cognition chez la souris</i>	<i>71</i>
<i>Tableau 4 : Composition des milieux de culture primaire de neurones corticaux embryonnaires de rats</i>	<i>120</i>
<i>Tableau 5 : Séquences des oligonucléotides antisens</i>	<i>121</i>
<i>Tableau 6 : Profil des changements d'expressions géniques chez les souris LSR^{+/-} par rapport aux souris LSR^{+/+}</i>	<i>144</i>

Liste des abréviations

A	
AAC	Angiopathie amyloïde cérébrale
ABC	<i>ATP-binding cassette transporter</i>
ACAT	AcylCoA cholestérol acyltransférase
AChR	<i>Acetylcholine receptor</i>
ADAM	A disintegrin and metalloprotease
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AgRP	<i>Agouti-related peptide</i>
AICD	<i>Amyloid precursor protein Intracellular Cytoplasmic</i>
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-méthylisol-4-propionate
ANOVA	Analyse de la variance
ApoA1	Apolipoprotéine A1
ApoE	Apolipoprotéine E
ApoER	Apolipoprotein E receptor
ApoJ	Apolipoprotéine J ou clusterine
APP	Amyloid precursor protein
APP swe	Mutation swedish de la protéine APP
ARC	<i>Activity-regulated-cytoskeleton-associated protein</i>
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Aβ	β -amyloïde
B	
BACE1	<i>β-site APP cleaving enzyme 1</i>
BACE2	<i>β-site APP cleaving enzyme 2</i>
BHE	Barrière hémato encéphalique
C	
CART	<i>Cocaine and amphetamine-regulated transcript</i>
CoA	Coenzyme A
CDT	<i>Clostridium difficile transferase</i>
CHO	Chinese hamster ovary
CHOL	Cholestérol
CLU	Clusterine
COPII	Coat protein complex
CTF	C-terminal fragment
D	
DMEM	Milieu de Eagle modifié par Dulbecco

DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNF	Dégénérescence neurofibrillaire
E	
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
G	
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GluR1	<i>Glutamate receptor 1</i>
GSK	<i>Glycogen synthase kinase</i>
H	
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HF	<i>High Fat</i>
HMGCoAR	HMG-CoA-3-Hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme-A reductase
HRP	<i>Horseradish peroxydase (peroxydase du raifort)</i>
I	
Iba-1	<i>Ionized calcium binding protein adaptator molecule 1</i>
ICV	Injection intracérébroventriculaire
IDE	Enzyme de dégradation de l'insuline
IGSK3β	<i>Isoform glycogen synthase kinase 3β</i>
IL6	Interleukine 6
ILβ	Interleukine β
ILDR	<i>Immunoglobulin-like domain containing receptor</i>
iNOS	<i>Inductible nitric oxyde synthase</i>
Insig	<i>Insulin induced gene 1</i>
K	
kDa	Kilodalton
KPI	<i>Kunitz protease inhibitor</i>
L	
LCAT	<i>Lecithin cholesterol acyltransferase</i>
LCR	Liquide céphalorachidien
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LDLR	<i>Low-density lipoprotein Receptor</i>
LRP	<i>LDL receptor-related protein</i>
LSR	<i>Lipolysis stimulated lipoprotein receptor</i>
LTD	<i>Long term depression</i>
LTP	<i>Long term potentiation</i>
LXR	<i>Liver X receptor^{2f}</i>
M	

MA	Maladie d'Alzheimer
MAP	<i>Microtubules associated proteins</i>
MCI	<i>Mild cognitive impairment</i>
MMSE	<i>Mini mental state examination</i>
MP	Maladie de Parkinson
MPTP	1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthyl-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
MβCD	Méthyl- β -cyclodextrine
N	
NAPDH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NeuN	<i>Neuronal nuclei</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NMDAR	<i>N-methyl-D-aspartate receptor</i>
NO	Oxyde nitrique
NPC1	Niemann-Pick type C1
NPC2	Niemann-Pick type C2
NPY	Neuropeptide Y
NPY1R	<i>Neuropeptide Y receptor Y1</i>
P	
P53	<i>Tumor protein 53</i>
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBS	Tampon phosphate salin
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEN2	<i>Presenilin enhancer 2</i>
Peptide Aβ	Peptide β -amyloïde
PHF	<i>Paired helical fragments</i>
PICALM	<i>Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein</i>
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PS1	Préséniline 1
PS2	Préséniline 2
PSD95	<i>Post-synaptic density-95</i>
R	
RAGE	<i>Advanced glycation end-products receptor</i>
RAP	<i>Receptor associated protein</i>
RE	Réticulum endoplasmique
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription - polymerase chain reaction</i>
RXR	<i>Retinoid X receptor</i>
S	
sAPPα	APP α soluble

sAPPβ	APP β soluble
SCAP	<i>SREBP cleavage-activating protein</i>
SDS	Dodécylsulfate de sodium
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
sLRP	<i>Soluble LDL receptor-related protein</i>
SNAP-25	<i>Synaptosomal-associated protein 25</i>
SNC	Système nerveux central
SORL	<i>Sortilin related receptor</i>
SR-B1	<i>Scavenger receptor class B member 1</i>
SREBP	<i>Sterol regulatory element-binding protein</i>
STD	Standard
SVF	Sérum de veau foetal
T	
TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
TG	Triglycérides
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TGN	Réseau trans-golgien
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor</i>
V	
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>
VLDLR	<i>Very low density lipoprotein receptor</i>

Avant-propos

Les études qui ont été réalisées dans le cadre de cette thèse s'intègrent dans la thématique de l'équipe BFLA : biodisponibilité et fonctionnalités des lipides alimentaires. En effet, l'obésité et les dyslipidémies sont des facteurs de risque des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (MA). De nombreuses études démontrent des altérations du métabolisme du cholestérol cérébral chez les patients atteints par la maladie d'Alzheimer. Cependant, les mécanismes par lesquels le cholestérol est régulé et impacte la maladie d'Alzheimer sont encore mal caractérisés. Il semblerait que les récepteurs aux lipoprotéines soient fortement impliqués. Par ailleurs, un certain nombre de travaux ont indiqué que des récepteurs aux lipoprotéines, liant les apolipoprotéines E et J (ApoE et ApoJ) participent à la clairance du peptide β -amyloïde (A β), principal agent impliqué dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer. Néanmoins, différents auteurs critiquent ces travaux qui reposent largement sur des expériences de liaison *in vitro*. De plus les fonctions précises et les régulations des nombreux récepteurs de lipoprotéines impliqués dans le trafic intracérébral du cholestérol restent mal caractérisées et il n'est pas exclu que d'autres récepteurs mal étudiés puissent être impliqués et jouer un rôle important. En 1994, Bihain et Yen ont découvert un nouveau récepteur hépatique aux lipoprotéines, le *lipolysis stimulated lipoprotein receptor* (LSR) impliqué dans la clairance des lipoprotéines riches en triglycérides en phase postprandiale. Le génotype hétérozygote chez la souris provoque une dyslipidémie au cours du vieillissement. De ce fait, nous avons voulu déterminer si le récepteur LSR ne serait pas un nouvel acteur de la régulation de l'homéostasie du cholestérol cérébral au cours du vieillissement et de la maladie d'Alzheimer.

Ce mémoire est composé de 4 parties.

Le premier chapitre de cette thèse est consacré à une synthèse bibliographique, et présente dans un premier temps la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer. La seconde partie de cette synthèse bibliographique porte sur le métabolisme du cholestérol cérébral. La partie suivante discute l'implication du métabolisme du cholestérol cérébral et de ses acteurs dans la maladie d'Alzheimer. La quatrième et dernière partie de ce

chapitre présente le récepteur LSR, qui constitue le cœur de ces travaux de thèse effectués au sein de l'Université de Lorraine.

Le second chapitre de ce manuscrit est consacré aux différentes méthodologies expérimentales utilisées lors de ces travaux de thèse.

Le troisième chapitre détaille et discute les résultats obtenus. La première partie est constituée de la publication issue de la poursuite de mes travaux effectués lors de mon stage de deuxième année de master, qui ont eu pour but de caractériser chez la souris la présence du récepteur LSR dans différentes structures importantes pour les capacités cognitives et la régulation du métabolisme énergétique, ainsi que son implication potentielle dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol cérébral au cours du vieillissement. La seconde partie des résultats est constituée d'un article sous révision qui a permis de démontrer l'effet d'une déficience partielle du récepteur LSR sur la sensibilité au stress amyloïde induit par des injections intracérébroventriculaires (icv) d'oligomères de peptide A β ₄₂. Enfin, la troisième et dernière partie de ce chapitre présente les effets de régimes hyperlipidique et hypercholestérolémique chez le modèle de souris hétérozygotes pour le récepteur LSR sur les capacités cognitives et le métabolisme lipidique central et périphérique.

Le dernier chapitre présente les conclusions et perspectives qui découlent de ce travail.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

I. Présentation de la maladie d'Alzheimer (MA)

En novembre 1907, le neuropsychiatre allemand Alois Alzheimer décrit pour la première fois une nouvelle forme de démence qui sera nommée MA en son hommage. Il a observé chez une de ses patientes des troubles comportementaux importants, notamment des hallucinations auditives, une paranoïa, des troubles de l'orientation, une perte de la mémoire ainsi que les signes d'une démence. L'analyse microscopique de son cerveau a révélé la présence d'une perte neuronale accompagnée d'une gliose et de la présence de deux lésions. La première lésion décrite correspond aux enchevêtrements neurofibrillaires présents au niveau intraneuronal. Ces enchevêtrements sont constitués d'agrégats de protéines tau, qui deviennent anormalement hyperphosphorylées. La seconde altération observée sont les plaques amyloïdes qui sont constituées d'agrégats de petits peptides appelés A β (Alzheimer *et al.*, 1995; Glenner and Wong, 1984; Goedert *et al.*, 1988; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986; Ihara *et al.*, 1986; Kosik *et al.*, 1986; Masters *et al.*, 1985). Nous décrivons ces différentes lésions dans la suite du manuscrit (Figure 1).

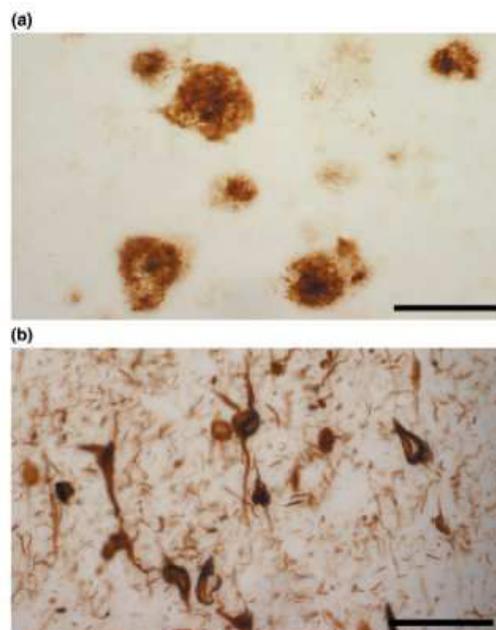


Figure 1 : Illustrations de plaques amyloïdes (a) et de dégénérescences neurofibrillaires (b) (d'après Laferla *et al.* 2005)

A. Les différents stades cliniques et le polymorphisme de la MA

La MA évolue silencieusement durant plusieurs années avant les premiers signes

cliniques, c'est-à-dire des pertes de capacités mnésiques (incapacité à former de nouveaux souvenirs) associées ou non à des troubles du comportement. Des études cliniques ont avancé l'idée d'une phase prodromale chez un groupe de patients désignés sous le terme de MCI (*Mild Cognitive Impairment*) qui présentent des troubles cognitifs légers sans impact important sur la vie quotidienne (Petersen *et al.*, 1997). La moitié de ces patients évolueraient vers une maladie d'Alzheimer après quelques années (Figure 2).

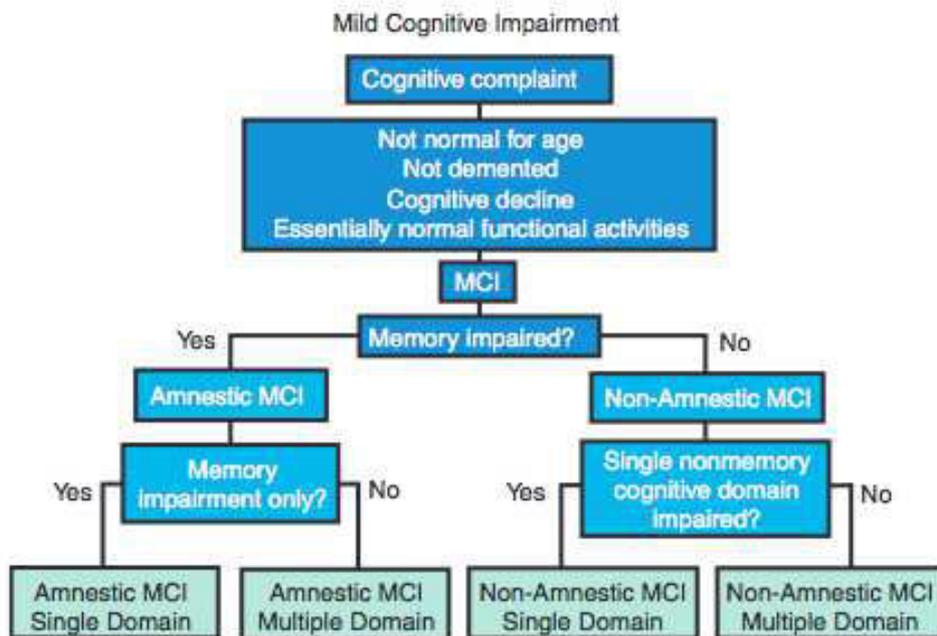


Figure 2 : Les étapes de détermination du MCI (d'après Petersen *et al.* 2004)

Cependant cette notion de MCI est contestée par de nombreux cliniciens qui critiquent l'hétérogénéité de cette population qui peut être séparée en deux sous-groupes. Si le patient souffre uniquement de trouble de la mémoire, il sera considéré comme MCI amnésique. Si le patient a des troubles cognitifs autres que des altérations de la mémoire, il sera considéré comme MCI non amnésique.

Une fois la maladie déclarée, les patients présentent d'abord des altérations modérées de la mémoire. Les capacités cognitives sont appréciées par différents tests neuropsychologiques standardisés qui permettent de chiffrer un score dit MMSE (*Mini Mental Score Evaluation*). Les individus normaux ont un score supérieur à 28. Dans la phase modérée, les individus gardent un score supérieur à 16. En dessous de ce score, les

patients passent, en général entre deux à six ans après le diagnostic initial, dans une phase sévère dans laquelle la perte d'autonomie est importante (Feldman and Woodward, 2005). La vitesse de déclin des capacités cognitives diffère beaucoup selon les patients avec association à des troubles variables de comportement et du langage. Les troubles du comportement dépendent aussi de la qualité de la prise en charge médico-sociale. Il faut surtout souligner que la maladie d'Alzheimer est une pathologie extrêmement variable et polymorphe dans sa symptomatologie. Néanmoins, le rythme de déclin des capacités cognitives reflète des mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents que nous allons maintenant examiner.

B. Formes monogéniques et sporadiques de la MA

Une petite proportion des cas (<1%) correspond à des formes monogéniques ou familiales de la MA (FAD) à transmission autosomique dominante. Dans ce cas les premiers symptômes arrivent avant 65 ans. Des mutations sur les gènes *Amyloid precursor protein* (APP), Préséniline 1 (PS1) et Préséniline 2 (PS2) sont connues pour causer l'apparition des formes familiales de la MA. Ces mutations conduisent à une surproduction du peptide A β (Chartier-Harlin *et al.*, 1991; Chávez-Gutiérrez *et al.*, 2012; Goate *et al.*, 1991; Sherrington *et al.*, 1995).

L'autre forme de la MA, majoritaire, est sporadique et nommée LOAD (*Late Onset alzheimer's Disease*) avec une apparition des premiers symptômes à partir de 65 ans. Les facteurs de risque de cette forme de la pathologie seront développés dans la suite de ce manuscrit.

C. Acteurs cellulaires et moléculaires de la physiopathologie de la MA

1. Les dégénérescences neurofibrillaires (DNF)

La dégénérescence neurofibrillaire correspond à des dépôts filamenteux anormaux dans le cytoplasme des neurones, jusqu'à l'extrémité de leurs prolongements. Ces dépôts sont constitués de filaments appariés en hélice (PHF, *Paired Helical Fragments*), dont le composant majeur est la protéine tau anormalement phosphorylée et agrégée (Figure 3). L'agrégation de la protéine tau dans les neurones débute dans l'hippocampe puis se propage pour atteindre l'ensemble du cortex cérébral. Elle se termine par une mort

neuronale importante, entraînant ainsi l'apparition de pertes de mémoire et de démences (Buée and Delacourte, 2006; Delacourte and Defossez, 1986).

La protéine tau fait partie de la famille des MAP (*Microtubules Associated Proteins*) et a été caractérisée dans le cerveau, majoritairement dans le cortex, l'hippocampe, le cervelet ainsi que dans la moelle épinière et le système nerveux périphérique. Elle est présente majoritairement dans les neurones et dans une très faible proportion dans les astrocytes et oligodendrocytes. Dans les neurones, elle se trouve essentiellement au niveau axonal et très peu dans les corps cellulaires (Binder *et al.*, 1985; Couchie *et al.*, 1988; Drubin and Kirschner, 1986; Goedert *et al.*, 1988; Spillantini *et al.*, 1997; Trojanowski *et al.*, 1989; Weingarten *et al.*, 1975). Elle favorise l'assemblage et la stabilité des microtubules qui sont de longs filaments composés de tubuline α et β instables. Au cours de la MA, la protéine tau est anormalement phosphorylée, ce qui entraîne la dissociation des microtubules et diminue ses capacités à promouvoir la polymérisation de la tubuline (Figure 3). Ces altérations du cytosquelette engendrent des perturbations des transports axonaux et dendritiques, des problèmes de trafic et d'adressage des protéines et une dégénérescence neuronale. L'hyperphosphorylation des protéines tau dans la MA semble liée soit à l'augmentation de l'activation des kinases soit à la diminution de l'activation des phosphatases (Cowan *et al.*, 2010; Lindwall and Cole, 1984; Liu *et al.*, 2005; Trojanowski and Lee, 1995; Weingarten *et al.*, 1975).

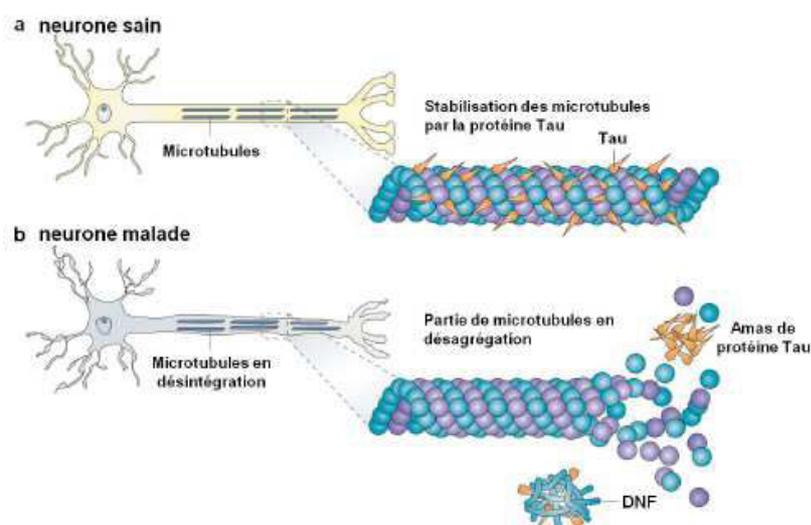


Figure 3 : Protéine tau et tauopathie (d'après Brunden *et al.* 2009)

2. Les dépôts amyloïdes

Physiologiquement, le catabolisme de la protéine APP conduit majoritairement à la formation d'un peptide de 40 acides aminés ($A\beta_{40}$) et minoritairement (10 %) à la formation d'un peptide de 42 acides aminés ($A\beta_{42}$) qui comporte deux acides aminés de plus que le précédent en C-terminal. Ce dernier est plus hydrophobe, est plus susceptible de former des fibrilles et représente la forme dominante dans les plaques amyloïdes (Jarrett *et al.*, 1993; Younkin, 1998).

a. Les plaques diffuses ou primitives

Ce sont les premières lésions à apparaître. Elles sont dues à une accumulation des peptides $A\beta_{42}$ et ont des contours mal délimités. Ces plaques sont retrouvées chez les patients atteints par la MA mais aussi chez les patients sains (Braak and Braak, 1991, 1992; Dickson *et al.*, 1988; Gowing *et al.*, 1994; Lalowski *et al.*, 1996).

b. L'angiopathie amyloïde cérébrale

Les dépôts amyloïdes peuvent également être retrouvés dans les compartiments vasculaires. Ils sont constitués de peptides $A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$ même si ces derniers sont majoritaires. L'angiopathie amyloïde cérébrale (AAC) est présente dans une majorité des cas de MA sporadiques même si elle peut être retrouvée dans d'autres pathologies (Attems *et al.*, 2007; Barelli *et al.*, 1997; Roher *et al.*, 1993; Viswanathan and Greenberg, 2011; Zhang-Nunes *et al.*, 2006).

c. Les plaques (séniles) amyloïdes

Ce sont des dépôts extracellulaires denses de peptides $A\beta$ de forme sphérique composés d'un centre amyloïde où les deux isoformes ($A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$) sont représentées. Autour, se trouvent une couronne constituée de prolongements neuronaux et axonaux en dégénérescence, des protéines tau et des enchevêtrements neurofibrillaires ainsi que des cellules gliales activées (Barelli *et al.*, 1997; Corder *et al.*, 2004; Iwatsubo *et al.*, 1994).

D. Le peptide $A\beta$: l'acteur central de l'hypothèse de la cascade amyloïde

L'hypothèse de la cascade amyloïde prétend que des fibrilles composées du peptide $A\beta$ insoluble, autrement appelées dépôts ou plaques amyloïdes dans le parenchyme cérébral, sont responsables des symptômes observés (Hardy and Higgins,

1992; Hardy and Selkoe, 2002; Selkoe, 1989). En effet, différentes études ont démontré que la formation de fibrilles de peptides A β est nécessaire pour entraîner une neurotoxicité que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (Kowall *et al.*, 1991; Lorenzo and Yankner, 1994; Pike *et al.*, 1991a, 1991b). Cette hypothèse a été révisée il y a quelques années suite à l'observation que les accumulations du peptide A β ne corrèlent pas toujours avec les déclinis cognitifs. En effet, des dépôts amyloïdes ont été trouvés chez des patients sains, alors qu'aucun n'a été détecté chez certains patients présentant des phénomènes dégénératifs (Cochran *et al.*, 1991; Delaère *et al.*, 1993). Des pertes synaptiques sont présentes dans les cerveaux de patients Alzheimer et leur importance corrèle très fortement avec les troubles cognitifs (Terry *et al.*, 1991). L'utilisation de différents modèles murins transgéniques mimant la MA a mis en évidence que les pertes synaptiques n'étaient pas dues à la formation de plaques amyloïdes, mais à l'accumulation d'oligomères du peptide A β_{42} (Mucke *et al.*, 2000). De plus, l'utilisation d'anticorps dirigés contre les peptides A β dans des modèles murins de la MA permet de réduire les troubles d'apprentissage et de mémoire à long terme sans affecter les dépôts amyloïdes présents chez ces souris (Dodart *et al.*, 2002; Kotilinek *et al.*, 2002). Selon ces observations, l'hypothèse modifiée de la cascade amyloïde suppose maintenant que ce sont les excès d'oligomères du peptide A β solubles qui sont responsables de la neurotoxicité et de la synaptotoxicité présente dans la MA et non plus les plaques amyloïdes (Glabe, 2006; Price *et al.*, 2009; Walsh *et al.*, 2002). Ainsi, une surproduction et/ou une diminution de la clairance des peptides A β sont responsables d'une accumulation de peptides A β dans le cerveau, entraînant l'apparition et le développement de la MA (Figure 4).



Figure 4 : Hypothèse de la cascade amyloïde (d'après Haass *et al.* 2007)

E. La toxicité du peptide Aβ soluble

Grâce à leur propriété fusogène, les oligomères solubles du peptide Aβ interagissent avec les membranes lipidiques des cellules. Il semblerait que c'est par cette liaison que les oligomères peuvent induire leurs effets toxiques, mais les mécanismes sont encore mal compris. Les oligomères solubles du peptide Aβ peuvent soit générer des pores membranaires altérant l'homéostasie calcique des neurones (Glabe, 2006; Hirakura *et al.*, 1999; Kagan *et al.*, 2004), soit interagir avec des récepteurs provoquant l'activation ou l'inactivation de voies de signalisations cellulaires (Lambert *et al.*, 1998; Verdier and Penke, 2004). En effet, une liste de protéines partenaires candidates est apparue et comprend notamment le récepteur aux neurotrophines p75 (Coulson, 2006;

Sotthibundhu *et al.*, 2008), le *Advanced Glycation End-products Receptor* (RAGE) (Chaney *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 1996), N-Méthyl-D-aspartate (NDMA) (De Felice *et al.*, 2007) et Frizzled (Magdesian *et al.*, 2008).

Ainsi, les oligomères solubles du peptide A β induisent des troubles cognitifs en altérant la transmission synaptique qui est régulée par le nombre de récepteurs au NMDA et à l'AMPA (α -amino-3-hydroxyl-5-méthyl-4-isoxazole-propionate) au niveau synaptique. L'activation du NMDAR a un rôle central et peut induire en fonction de la concentration intracellulaire en calcium la potentialisation à long terme (LTP) ou la dépression à long terme (LTD). De ce fait, une activation du NMDAR et une entrée de calcium sont nécessaires pour la LTP, tandis que l'internalisation du NMDAR et une faible entrée de calcium dans la cellule est nécessaire pour induire la LTD. La LTP induit le recrutement de récepteurs à l'AMPA et la croissance des épines dendritiques tandis que la LTD induit un rétrécissement des épines dendritiques et une perte synaptique (Kullmann and Lamsa, 2007). Le peptide A β , en perturbant l'activité des récepteurs au NMDAR, altèrent la LTP et augmentent la LTD entraînant ainsi une perte synaptique (Hsieh *et al.*, 2006; Kamenetz *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2009; Shankar *et al.*, 2007; Walsh *et al.*, 2002).

Par ailleurs, les oligomères solubles du peptide A β peuvent provoquer des altérations morphologiques des synapses et des épines dendritiques qui modifient également l'efficacité de la transmission synaptique (Calabrese *et al.*, 2007; Lacor *et al.*, 2007). Ils peuvent générer la production d'espèces réactives de l'oxygène, provoquant une oxydation des protéines et une peroxydation des lipides (Figure 5). Ceci altère les compositions des membranes induisant des perturbations de l'homéostasie calcique, des processus apoptotiques et une mort neuronale (Butterfield, 2002; De Felice *et al.*, 2007; Varadarajan *et al.*, 2000).

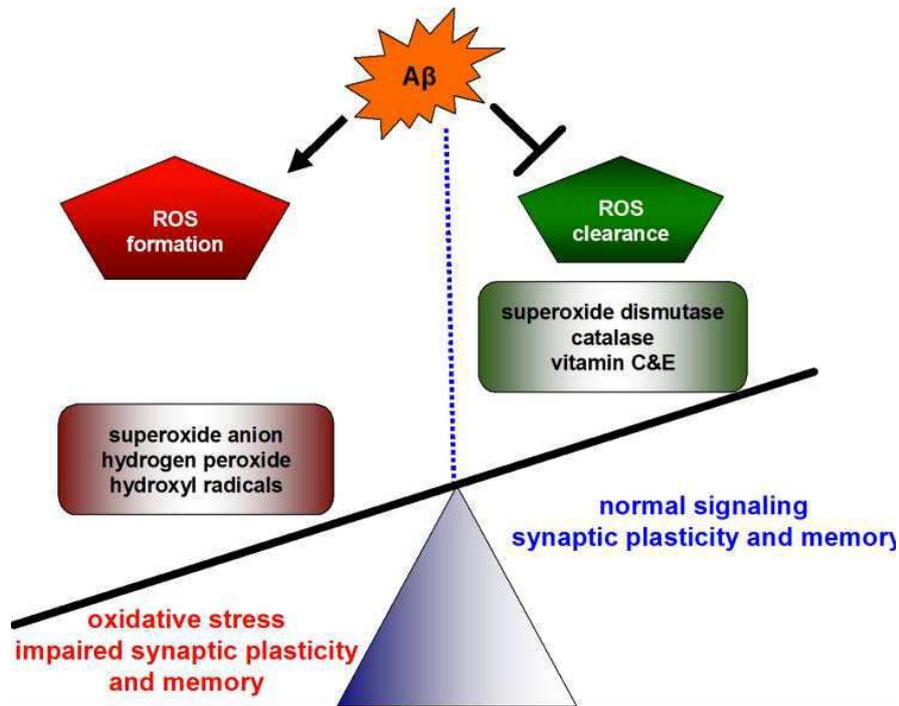


Figure 5 : Impact des peptides amyloïdes sur le stress oxydant (d'après Ma *et al.* 2012)

Différents modèles animaux transgéniques reproduisant la MA ont été développés afin d'étudier le métabolisme et la toxicité du peptide A β et de caractériser des facteurs de risque pour la MA. Dans la partie suivante, nous allons décrire les voies de production, dégradation et clairance du peptide A β , et les principaux modèles animaux développés et utilisés par la communauté scientifique.

F. Production, dégradation et clairance du peptide A β

1. Structure et fonction d'APP

APP est une protéine transmembranaire avec des caractéristiques de récepteur cellulaire qui possède un domaine extracellulaire important, un domaine transmembranaire et un petit domaine cytoplasmique. Le gène APP est soumis à des processus d'épissage qui aboutissent à trois isoformes 695, 751 et 770. Les deux isoformes les plus longues contiennent un domaine de liaison aux inhibiteurs de kinase *Kunitz Protease Inhibitor* (KPI) à proximité de l'extrémité N-terminale de la protéine. APP est exprimée de façon ubiquitaire mais APP695, qui perd le domaine KPI, est la forme prédominante dans les neurones. Le domaine extracellulaire participe à l'adhésion

cellulaire, la croissance des neurites et la synaptogénèse (Zheng and Koo, 2006). Le fragment intracellulaire module la migration cellulaire, le transport axonal et la signalisation cellulaire (Müller *et al.*, 2008).

2. Synthèse, maturation et trafic d'APP

La protéine APP est synthétisée dans le réticulum endoplasmique (RE). Durant son transport du RE à la membrane plasmique, elle subit des N et O-glycosylations. Seule une petite fraction des molécules de protéine APP est présente à la membrane, la majorité se trouvant dans l'appareil de Golgi et dans le réseau trans-golgien (TGN). Quelques minutes après son arrivée à la membrane, APP est ré-internalisée. Suite à son endocytose, APP est délivrée aux endosomes pour rejoindre soit le TGN soit la membrane tandis qu'une faible fraction est dégradée dans les lysosomes (Haass *et al.*, 2012) (Figure 6).

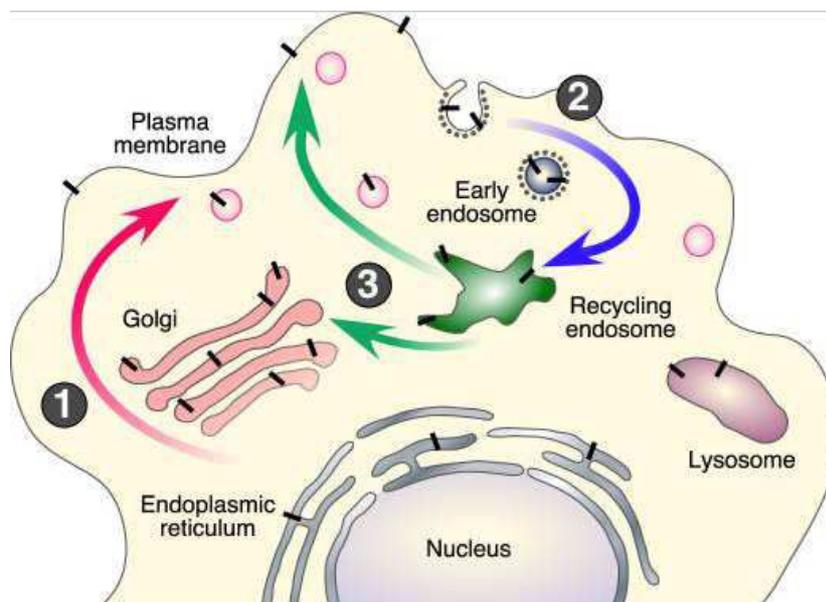


Figure 6 : Maturation et transport d'APP (d'après Thinakaran *et al.* 2008). Les molécules de protéine APP (barres noires) synthétisées subissent un processus de maturation vers la membrane plasmique (1). Lorsqu'une molécule de protéine APP atteint la surface cellulaire, elle est rapidement internalisée (2). Suite à cette endocytose, elle retourne à la membrane ou est dégradée dans les lysosomes (3).

3. De l'APP au peptide A β

Le peptide A β est produit par le clivage d'APP qui est sa protéine précurseur. C'est une protéine ubiquitaire avec un domaine transmembranaire codée par un gène porté par le chromosome 21. C'est pour cette raison que les personnes atteintes par la trisomie

21 sont fortement touchées par la MA (Kang *et al.*, 1987). Le clivage de la protéine APP est réalisé par trois sécrétases (α , β et γ) travaillant deux à deux pour aboutir aux voies non amyloïdogénique et amyloïdogénique (Selkoe, 1994).

a. Clivage α ou non amyloïdogénique

Dans cette voie, la protéine APP est clivée par les α -sécrétase et γ -sécrétase. Les α -sécrétases sont des protéases localisées à la membrane neuronale (Allinson *et al.*, 2003; Chow *et al.*, 2010). Elles appartiennent à la famille ADAM (*α -disintegrin-and metalloproteinases*). Parmi les 21 membres de cette famille, seuls 3 possèdent une activité α -sécrétase : ADAM9, ADAM10 et ADAM 17. Elles clivent l'APP au sein de la séquence du peptide A β et génère deux fragments : le fragment N-terminal sAPP α et le fragment α CTF (*α cleaved-APP C Terminal Fragment*) ou C83 (Figure 7). Le fragment sAPP α est un fragment soluble sécrété qui protège les neurones contre les manques d'oxygène et de glucose et contre l'exotoxicité en régulant les flux calciques et les potentiels membranaires. sAPP α permet également de promouvoir la croissance des neurites, la synaptogénèse et la prolifération des cellules souches neuronales (Furukawa *et al.*, 1996; Gakhar-Koppole *et al.*, 2008; Mattson *et al.*, 1993; Ohsawa *et al.*, 1999). Des injections icv de sAPP α améliorent les fonctions cognitives de souris et de rats en augmentant la LTP (Meziane *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 2008). Le fragment C83 est retenu à la membrane et peut être clivé par la γ sécrétase pour produire un petit fragment appelé p3 au niveau extracellulaire et le fragment AICD (*APP intracellular domain*) dans le cytosol (Chow *et al.*, 2010).

b. Clivage β ou amyloïdogénique

Deux clivages sont nécessaires pour libérer le peptide A β . Le premier est le clivage d'APP par la β -sécrétase (Figure 7). La protéine BACE1 (*site APP-cleaving enzyme 1*), qui est une protéase aspartique avec une activité β -sécrétase, est responsable du clivage β d'APP. Elle est exprimée majoritairement au niveau neuronal et dans une moindre mesure au niveau glial. L'activité de BACE1 est intracellulaire et se fait en milieu acide (pH=5,5), ce qui concorde avec sa localisation lysosomale (Chow *et al.*, 2010; Hussain *et al.*, 1999; Sinha *et al.*, 1999; Vassar *et al.*, 1999). Elle produit un fragment soluble sAPP β et un fragment β CTF (*β cleaved-APP C Terminal Fragment*) ou C99 qui reste

transmembranaire et qui contient la séquence entière du peptide A β (Figure 7). Il est à noter qu'il existe un homologue de BACE1 appelé BACE2 (Farzan *et al.*, 2000) mais qui est faiblement exprimé dans le cerveau (Bennett *et al.*, 2000). Le gène de BACE2 est localisé en 21q22.3, qui est un locus critique pour le développement de la trisomie 21 (Solans *et al.*, 2000). Il pourrait donc exister un lien entre l'augmentation de la production du peptide A β observée dans cette maladie et BACE2. En effet, cette protéine clive *in vitro* la protéine APP sauvage et son mutant Swedish (Hussain *et al.*, 1999).

Le fragment C99 subit ensuite un clivage par la γ -sécrétase, ce qui correspond à la dernière étape de la production du peptide A β . C'est un complexe enzymatique multimérique composé des présénilines (PS1 ou PS2), de la nicastrine, Aph-1 (*Anterior pharynx defective 1*) et PEN2 (*Presenilin Enhancer 2*) (Francis *et al.*, 2002; Hussain *et al.*, 1999; Levitan *et al.*, 2001; Steiner *et al.*, 2002; Wolfe *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2000) (Figure 7). Elle génère le peptide A β et le fragment AICD (Chow *et al.*, 2010). Les clivages du fragment C99 par la γ -sécrétase peuvent avoir lieu à différents sites, aboutissant à la formation des peptides A β ₄₀ et A β ₄₂, ce dernier étant le plus pathogène (Figure 7) (Thinakaran et Koo, 2008).

Les fragments C83 et C99 obtenus par les voies non amyloïdogénique et amyloïdogénique respectivement peuvent être clivés par des clivages γ et ϵ pour produire des fragments AICD (Figure 7). *In vitro*, la fixation des fragments AICD à Fe65 va permettre le recrutement de l'histone deacetylase aboutissant à une translocation nucléaire qui va activer la transcription de gènes cibles tels que p53, néprilysine, EGFR (*Epidermal growth factor receptor*) (Chow *et al.*, 2010).

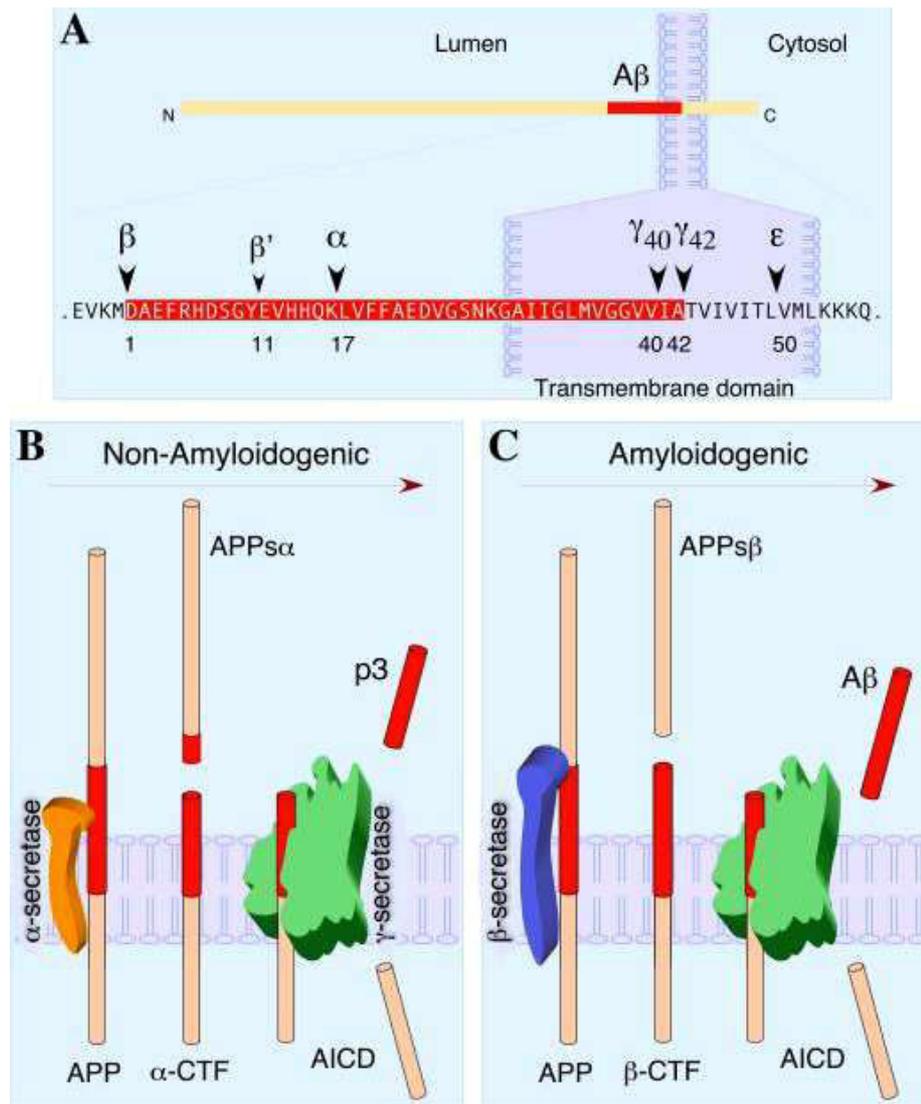


Figure 7 : Métabolisme d'APP (d'après Thinakaran *et al.* 2008). La protéine APP, qui contient la séquence du peptide Aβ (A), est clivée lors des voies non amyloïdogénique (B) et amyloïdogénique (C) produisant respectivement le peptide p3 et le peptide Aβ

4. Clairance des peptides Aβ

Une accumulation d'oligomères de peptides Aβ semble donc être responsable du développement et de la progression de la MA. Cette accumulation serait la conséquence soit d'une surproduction des peptides Aβ₄₀ et Aβ₄₂ soit d'un déficit de leur clairance.

a. Dégradation protéolytique

L'un des mécanismes par lequel le peptide Aβ peut être éliminé est sa dégradation protéolytique. La néprilysine est une enzyme protéolytique importante pour la

dégradation du peptide A β (Iwata *et al.*, 2000). Une autre enzyme, l'IDE (*Insulin-degrading-enzyme*) module la dégradation du peptide A β dans le milieu extracellulaire (Kurochkin and Goto, 1994). La néprilysine est exprimée fortement dans la microglie alors que l'IDE est sécrétée par les astrocytes et la microglie. L'inhibition de ces protéases ou l'extinction de leurs expressions provoque une augmentation significative de la quantité de peptides A β et des dépôts amyloïdes dans le cerveau (Dolev and Michaelson, 2004; Iwata *et al.*, 2000). Au contraire, la surexpression de ces deux protéases diminue les quantités du peptide A β et élimine les dépôts amyloïdes (Hemming *et al.*, 2007).

b. Transport à travers la BHE

Des récepteurs à endocytose tel que le récepteur LRP1 (*LDL receptor-related protein 1*) permettent le transport du peptide A β jusqu'aux lysosomes neuronaux où il y sera dégradé. Ce mécanisme peut s'avérer néfaste puisqu'une accumulation du peptide A β_{42} trop importante peut entraîner un échappement aux processus de dégradation et une fuite du contenu lysosomal entraînant une toxicité (Fuentealba *et al.*, 2010). Nous examinerons plus en détail le rôle de LRP1 dans la troisième partie de ce chapitre.

G. Les modèles murins de la MA

A ce jour, aucun modèle animal n'est capable de reproduire toutes les altérations cognitives, comportementales, biochimiques et histopathologiques observées chez les patients atteints de la MA. Cependant, différents modèles animaux sont capables de reproduire un ou plusieurs aspects caractérisant la MA, aux niveaux cognitif et physiopathologique. Nous allons voir brièvement les principaux modèles utilisés, même si des variantes de ces modèles ont parfois été créées pour des études bien précises.

i) Souris PDAPP

Le premier modèle animal transgénique mimant la MA est le modèle PDAPP qui surexprime une forme humaine mutante d'APP (V717F) couplé au promoteur de PDGF (*platelet-derived growth factor*). Ces souris présentent des quantités de peptides A β_{40} et A β_{42} 5 à 14 fois plus importantes que les quantités de peptides A β murins endogènes. Des pertes synaptiques, une diminution de la taille de différentes structures cérébrales dont l'hippocampe, une activation des astrocytes et de la microglie, des agrégations de

peptides A β dans l'hippocampe et le cortex, des altérations de la transmission synaptique et de la LTP sont observées. La perte de mémoire est similaire à celle retrouvée chez les patients atteints par la MA. En effet, les souris présentent des troubles de l'apprentissage et de la mémorisation à long terme caractérisés à l'aide de différents tests comportementaux tels que la piscine de Morris et le test de reconnaissance d'objet. Cependant, suivant les tests utilisés, les déficits cognitifs sont indépendants ou non de l'âge. Les déficits cognitifs observés chez les souris PDAPP âgées (1 an) corrèlent avec l'augmentation de peptides A β et la réduction de la taille de l'hippocampe. Cependant, ces corrélations ne sont pas retrouvées chez les souris jeunes (3-4 mois) où les augmentations et les agrégations de peptides A β ne sont pas encore présentes (Chen *et al.*, 2000, 1998; Dodart *et al.*, 1999, 2000; Games *et al.*, 1995; Gonzalez-Lima *et al.*, 2001; Irizarry *et al.*, 1997; Kobayashi and Chen, 2005; Larson *et al.*, 1999). Il est possible que l'effet âge indépendant soit dû à une anomalie du développement du cerveau à la suite de la surexpression d'APP.

ii) Souris Tg2576

Un an après l'apparition du modèle PDAPP, un autre modèle de souris exprimant une protéine précurseur amyloïde humaine double mutante d'APP695 (K670N and M671L) identifiée chez une famille suédoise présentant une forme familiale de la MA a été développé et nommé Tg2576 ou APP695SWE. Les Tg2576 sont similaires aux souris PDAPP et expriment cette forme humaine mutée d'APP en 5 fois plus grande quantité que la forme murine. A partir de l'âge de 9 mois, ces souris développent des dépôts de peptides A β_{40} et A β_{42} dans différentes structures telles que le cortex frontal et temporal, l'hippocampe et le cervelet. Contrairement aux souris PDAPP, les Tg2576 n'ont pas de perte synaptique ni de réduction de la taille de l'hippocampe significatives. Les souris Tg2576 présentent des troubles d'apprentissage et de mémoire à long terme âge dépendant. L'augmentation de la quantité des peptides A β_{40} et A β_{42} se fait également de façon âge dépendante et corrèle avec les troubles cognitifs. Ces souris présentent une astroglie et une microglie ainsi que la présence de protéines tau hyperphosphorylées (Hsiao *et al.*, 1996; King and Arendash, 2002a, 2002b; Takeuchi *et al.*, 2000; Tomidokoro *et al.*, 2001).

iii) Souris APP23

La souris APP23 possède la même mutation suédoise que les souris Tg2576 mais sous le contrôle transcriptionnel d'un autre promoteur, et également la mutation V717F retrouvée chez les souris PDAPP. Dans ce modèle et contrairement aux deux précédents, une importante perte neuronale est présente. Ces souris expriment 7 fois plus l'APP humaine que la forme murine, essentiellement dans l'hippocampe et le cortex. A l'âge de 12 mois, des accumulations amyloïdes apparaissent dans les vaisseaux cérébraux, ce qui a pour conséquence de diminuer le flux sanguin cérébral, de provoquer des micro-hémorragies et d'altérer la morphologie des vaisseaux cérébraux. Une activation des astrocytes et des cellules gliales, des déficits cholinergiques, et une hyperphosphorylation de la protéine tau sont présents. Ces souris ont des déficits cognitifs avec des problèmes d'apprentissage et de mémoire à long terme qui se développent de façon âge dépendante, même si des troubles sont déjà présents chez des souris jeunes. L'intérêt du modèle APP23 repose surtout dans la possibilité de l'utiliser pour étudier les angiopathies cérébrales amyloïdes (Beckmann *et al.*, 2003; Bondolfi *et al.*, 2002; Van Dam *et al.*, 2003; Kelly *et al.*, 2003; Mueggler *et al.*, 2002; Sturchler-Pierrat *et al.*, 1997).

iv) Souris PS1

Dans le but d'étudier l'effet d'une mutation PS1, des souris porteuses d'une mutation sur le gène PS1 ont été créées. Bien que ces souris présentent des augmentations de la quantité d'A β ₄₂, aucun dépôt amyloïde n'est présent. Leurs troubles cognitifs sont bien moins importants que ceux observés chez les souris Tg2576 (Borchelt *et al.*, 1996; Nakano *et al.*, 1999).

v) Souris APP/PS1

Le modèle de souris APP/PS1 aussi appelé PSAPP a été développé à partir d'une mutation de la préséniline-1 humaine (A246E) et croisée avec une souris Tg2576. L'augmentation de la quantité des peptides A β ₄₂ et les dépôts amyloïdes apparaissent dès l'âge de 7 mois, donc 2 mois plus tôt que chez les Tg2576. Des troubles d'apprentissage et de mémoire à long terme sont corrélés aux augmentations des peptides A β ₄₂ insolubles

dans l'hippocampe. A l'âge de 9 mois, les dépôts amyloïdes sont plus importants que chez les Tg2576 (Borchelt *et al.*, 1997; Dineley *et al.*, 2002; Holcomb *et al.*, 1998).

vi) Souris Tau (P301L)

Tous les modèles précédemment présentés ne présentent pas de dégénérescences neurofibrillaires. Des modèles animaux transgéniques ont été développés dans ce but. Ainsi sont apparues les souris Tau (P301L) qui développent des dégénérescences neurofibrillaires dans le cortex et l'hippocampe et dans la moelle épinière. Des pertes neuronales et des déficits cognitifs sont observés à partir de 4 mois. Elles ne présentent pas de dépôts amyloïdes mais ont des déficits moteurs dès l'âge de 6 mois (Allen *et al.*, 2002; Götz *et al.*, 2001; Lewis *et al.*, 2000; Ramsden *et al.*, 2005).

vii) Souris 3xTg-AD

Le modèle animal le plus complet combine à la fois la tauopathie et la pathologie amyloïde grâce à 3 mutations APP^{swe}, PS1M146V et TauP301L. Les souris obtenues sont les 3xTg-AD. Elles développent rapidement des plaques amyloïdes, en premier lieu dans le cortex, puis l'hippocampe, et également des agrégats de protéines tau hyperphosphorylées, aussi appelés enchevêtrements neurofibrillaires, dans l'hippocampe peu de temps après l'apparition de la pathologie amyloïde. Les souris 3xTg-AD ont des déficits de la LTP, des troubles de l'apprentissage et de la mémoire dans certains tests comportementaux tel que la piscine de Morris, mais pas dans le test de reconnaissance d'objet (Clinton *et al.*, 2007; Oddo *et al.*, 2003).

viii) Modèles d'injections intracérébrales de peptide A β

Les différents modèles présentés ci-dessus provoquent essentiellement une surproduction du peptide A β mais ne permettent pas d'étudier les facteurs de sensibilité à la toxicité du peptide A β indépendamment d'une augmentation considérable de ses taux intracérébraux. Différents modèles ont été développés afin d'évaluer les mécanismes de toxicité induite par le peptide A β et les corrélés avec les capacités cognitives des animaux et les processus physiopathologiques s'y déroulant. Ces modèles consistent en l'injection icv ou hippocampique des peptides A β ₄₀ et A β ₄₂ chez la souris.

Bien que certaines études utilisent les peptides $A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$ sous forme soluble (Alkam *et al.*, 2008a; Craft *et al.*, 2004; Malm *et al.*, 2006; Sotthibundhu *et al.*, 2008), la majorité d'entre elles utilisent les peptides $A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$ sous forme agrégée (Alkam *et al.*, 2008b; Amaral *et al.*, 2010; Chauhan *et al.*, 2003; Jhoo *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004; Medeiros *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2001). Il est à noter que de nombreuses publications ne mentionnent pas les modalités de préparation du peptide $A\beta$ et ne précisent pas si le peptide $A\beta$ utilisé est sous forme de monomères, d'oligomères ou de fibrilles (Huang *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2008a; Mogi *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2004; Zaheer *et al.*, 2008). Dans ces études, les souris présentent divers troubles cognitifs, tels que des altérations de la mémoire à court terme et à long terme, des troubles d'apprentissage, accompagnés de perturbations de la LTP et du système cholinergique, des hyperphosphorylations de la protéine tau ou encore des processus inflammatoires. Comme nous l'avons vu précédemment, l'hypothèse de la cascade amyloïde revisitée suggère que les oligomères du peptide $A\beta$ sont majoritairement responsables de la toxicité neuronale observée dans la MA, contrairement à la forme agrégée. C'est pour cette raison que nous avons fait le choix d'utiliser des icv d'oligomères de peptides $A\beta_{42}$ pour nos études.

H. Facteurs de risque de la MA

1. Facteurs de risque généraux

L'âge est le facteur de risque le plus important de la MA. En effet, la prévalence est de 12,7 % chez les personnes de 90 à 94 ans, de 21,2 % chez les personnes âgées de 95 ans à 99 ans et enfin de 40,7 % pour les personnes âgées de 100 ans et plus (James and Schneider, 2010). Avec l'amélioration des conditions de vie et l'espérance de vie accrue, le nombre de personnes touchées risque d'augmenter considérablement dans les prochaines décennies.

Le sexe est également un facteur de risque mais avec une importance nettement inférieure. En effet, la MA touche préférentiellement les femmes (Andersen *et al.*, 1999; Letenneur *et al.*, 2000). La diminution des oestrogènes à la ménopause a été incriminée et liée à ce risque (Massart *et al.*, 2001).

Les personnes avec un niveau d'éducation élevé, et de nombreuses activités sociales

faisant appel aux capacités intellectuelles présentent moins de risques de développer cette pathologie. Il en est de même pour les personnes ayant une activité physique et/ou sportive régulière et importante. Cette dernière favoriserait l'apprentissage, les mécanismes de plasticité cérébrale, la vascularisation cérébrale et la neurogénèse (Angevaren *et al.*, 2008; Black *et al.*, 1990; Cotman and Berchtold, 2002; Evans *et al.*, 1993; van Praag *et al.*, 1999; Qiu *et al.*, 2001; Stern *et al.*, 1994).

Enfin, il ne semble pas y avoir de différence de prévalence de la MA selon les pays contrairement à d'autres pathologies comme les maladies cardiovasculaires sauf peut être en Afrique subsaharienne où la MA aurait une prévalence plus faible.

2. Association avec d'autres pathologies

La présence d'un diabète de type II augmente par deux le risque de développer la MA. En effet, l'hyperinsulinémie favorise l'accumulation du peptide A β par un phénomène de compétition avec les enzymes permettant sa dégradation et sa clairance (Luchsinger *et al.*, 2001, 2004).

Différentes études ont démontré qu'un surpoids ou une obésité à l'âge moyen favorisent l'apparition de la MA. Les mécanismes liant la masse corporelle et la maladie ne sont pas vraiment connus, même si cela semble provenir des pathologies secondaires liées à l'obésité telles que le diabète de type II et l'hypertension (Bagger *et al.*, 2004; Goble, 2005; Gustafson *et al.*, 2003; Jeong *et al.*, 2005; Kivipelto *et al.*, 2001; Nourhashémi *et al.*, 2002; Razay, 2005; Whitmer *et al.*, 2005).

Une pression artérielle élevée en milieu de vie augmente également le risque d'apparition de la MA. Au contraire, une pression peu élevée à ce stade de la vie semble aboutir à des meilleures capacités cognitives chez le sujet âgé. Quand l'hypertension apparaît en fin de vie, l'association est par contre plus ambiguë (Elias *et al.*, 2004; Kilander *et al.*, 2000; Launer *et al.*, 2000; Whitmer *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2003).

3. Facteurs de risque génétiques et biologiques

L'allèle apoE4 du gène de l'ApoE est le plus anciennement connu pour augmenter le risque de survenue de la MA (Harold *et al.*, 2009; Lambert *et al.*, 2009). La fréquence d'apparition de la maladie est de 91 % chez les homozygotes apoE4/apoE4, de 47 % chez

les hétérozygotes, et de 20 % chez les non porteurs de cet allèle. De façon intéressante le gène apoE2 semble protecteur (Corder *et al.*, 1993; Rebeck *et al.*, 1993). Des études immunohistologiques démontrent que l'ApoE colocalise avec les plaques amyloïdes chez les patients Alzheimer (Namba *et al.*, 1991). Ces dépôts amyloïdes sont plus importants chez les porteurs de l'allèle apoE4 par rapport aux non porteurs. Chez des individus âgés de 50 à 59 ans, 40,7 % des porteurs apoE4 ont des plaques séniles alors que seuls 8,2 % des non porteurs en ont (Figure 8) (Kok *et al.*, 2009; Polvikoski *et al.*, 1995; Schmechel *et al.*, 1993).

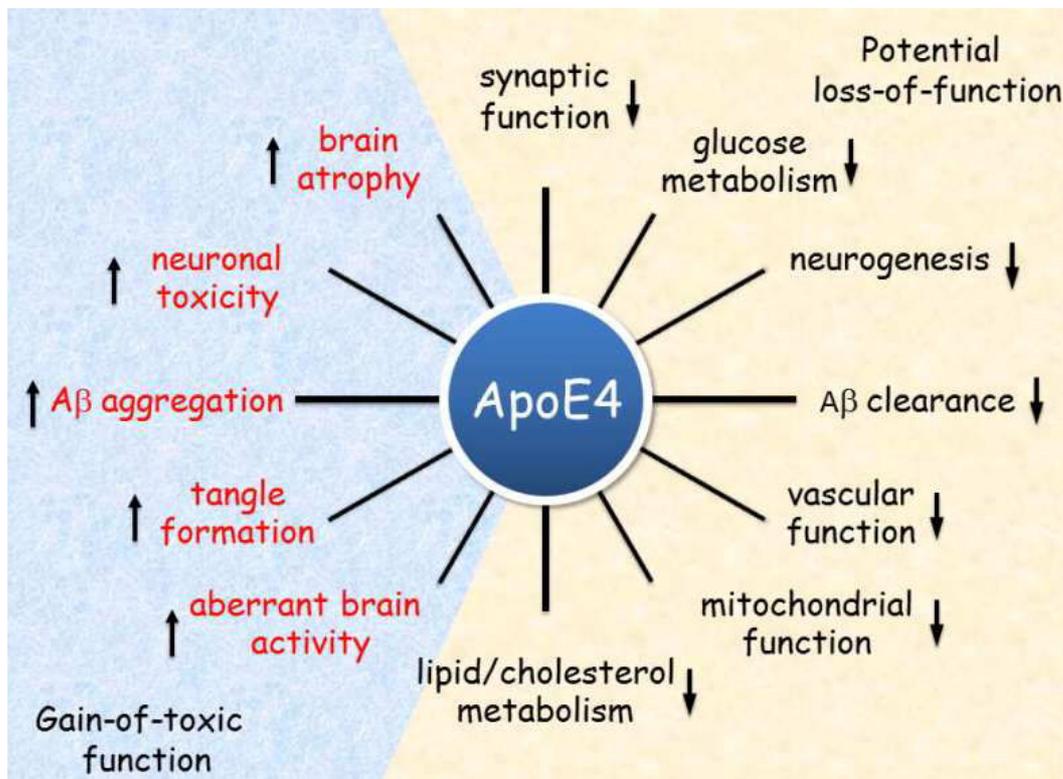


Figure 8 : Implication de l'apoE4 dans la MA (d'après Liu *et al.* 2013)

Les mécanismes exacts impliquant l'ApoE4 dans la MA sont encore sous d'actives investigations et nous les présenterons dans la suite de ce manuscrit.

De plus en plus d'études se focalisent sur l'identification de nouveaux facteurs de risques génétiques. De façon non exhaustive, nous pouvons citer par exemple la clustérine autrement appelée apoJ qui est exprimée dans tous les tissus. Elle pourrait jouer un rôle protecteur contre l'apoptose, le stress oxydant et les dommages cellulaires et préviendrait l'oligomérisation et la fibrillation du peptide Aβ. Son expression est

trouvée augmentée chez les patients MA. De fortes associations entre des mutations du gène clusterine (CLU) localisées sur le chromosome 8 et la forme sporadique de la MA ont été détectées (Calero *et al.*, 2000; Waring and Rosenberg, 2008). Le gène PICALM (*Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein*) localisé sur le chromosome 11 serait également un facteur de risque des formes sporadiques de la MA. PICALM peut jouer un rôle dans l'endocytose d'APP et la production du peptide A β . De plus, sa surexpression peut augmenter le clivage et l'agrégation du peptide A β . Une association entre deux polymorphismes du gène PICALM et la forme sporadique de la MA a été découverte (Harold *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 2012). La protéine « Sortilin-related receptor » (SORL1) pourrait être impliquée dans la production du peptide A β puisque sa sous-expression augmente la production du peptide A β . Un polymorphisme intronique du gène SORL1 a été associé à la MA (Meng *et al.*, 2007; Rogaeva *et al.*, 2007).

Diverses études démontrent qu'une hypercholestérolémie à l'âge moyen augmentent le risque de développer une MA (Kivipelto *et al.*, 2001; Solomon *et al.*, 2007, 2009; Whitmer *et al.*, 2005) tout comme le fait de présenter une teneur en cholestérol plasmatique plus faible à l'âge avancé (Solomon *et al.*, 2007). Au-delà de la cholestérolémie totale, le ratio cholestérol LDL/cholestérol HDL est un indicateur plus utile. Une augmentation des LDL et une diminution des HDL favorisent l'apparition de la MA (van Exel *et al.*, 2002; Lesser *et al.*, 2009; Muldoon *et al.*, 1997; Singh-Manoux *et al.*, 2008; Yaffe *et al.*, 2002). Parallèlement, une augmentation du cholestérol sous forme HDL réduit les risques d'apparition de la MA et corrèle avec de meilleurs scores aux tests cognitifs (Elias *et al.*, 2005; Mielke *et al.*, 2005; Muldoon *et al.*, 1997; West *et al.*, 2008). Une hypercholestérolémie sous forme LDL semble bien être un facteur de risque de la MA même si les études réalisées jusqu'à maintenant méritent d'être confirmées.

Les données épidémiologiques mettent fortement en évidence le rôle du métabolisme de cholestérol en relation avec son transport par l'ApoE. C'est pourquoi nous allons examiner ci-dessous tout d'abord ce métabolisme et ses régulations au niveau cérébral puis les données de la littérature sur ses relations avec la MA.

II. Métabolisme cérébral du cholestérol et ses régulations

A. Rôles généraux du cholestérol dans le cerveau

Le cerveau est constitué de différents lipides tels que les glycérophospholipides, les sphingolipides et le cholestérol (Figure 9) dans des proportions molaires équivalentes (Korade and Kenworthy, 2008). Le cerveau, qui représente 2 à 5 % du poids total de l'organisme, est l'organe le plus riche en cholestérol et contient près de 30 % du cholestérol total soit environ 30 g (Björkhem and Meaney, 2004; Dietschy and Turley, 2001). Tandis que la concentration en cholestérol dans la plupart des tissus est de 2 mg/g de tissu, celle du cerveau est de l'ordre de 15-20 mg/g de tissu (Dietschy and Turley, 2004). Il est majoritairement sous forme libre donc non estérifié (99,5 %) et il se répartit pour 70 % dans les gaines de myéline et pour 30 % dans les membranes plasmatiques des astrocytes et des neurones (Dietschy and Turley, 2004). La composition en lipides et protéines de la myéline diffère de celle des autres membranes cellulaires puisqu'elle est constituée de 70 % de lipides et 30 % de protéines contre 30 % de lipides et 70 % de protéines dans les autres membranes cellulaires. Les constituants lipidiques majeurs de la myéline sont le cholestérol, les phospholipides et les glycosphingolipides dans des proportions molaires 4 : 2 : 2 (Dietschy and Turley, 2004).

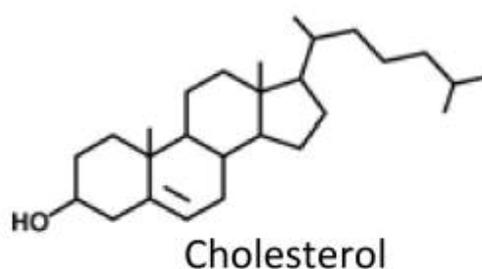


Figure 9 : Structure du cholestérol (d'après Jusakul *et al.* .2011)

Le cholestérol joue des rôles multiples et importants dans le cerveau :

- Il régule de par sa présence dans les gaines de myéline, la propagation des influx nerveux par conduction saltatoire.

- Il forme les membranes cellulaires et les radeaux lipidiques (qui sont des microdomaines membranaires hétérogènes riches en cholestérol et sphingolipides qui régulent les processus cellulaires (Lingwood and Simons, 2010) où il influe directement sur les propriétés physico chimiques et la fluidité, impactant l'activité des récepteurs, des enzymes, des canaux ioniques (Haines, 2001; Korade and Kenworthy, 2008) et l'intégrité des pores membranaires (Jeremic *et al.*, 2006).

- Il régule différentes voies de signalisation, notamment de différenciation et de survie cellulaire (Martin *et al.*, 2008; Parton and Hancock, 2004).

- Il favorise la synaptogénèse et la formation des dendrites (Fester *et al.*, 2009; Pfrieger, 2003a), la régénération axonale (de Chaves *et al.*, 1997), la transmission synaptique via la formation de vésicules synaptiques contenant les neurotransmetteurs, le maintien de la plasticité synaptique et de la fonction neuronale (Pfrieger, 2003a, 2003b).

- Il est précurseur de la synthèse de neurostéroïdes qui jouent le rôle de modulateurs allostériques des récepteurs aux neurotransmetteurs (Agís-Balboa *et al.*, 2006) et d'oxystérols (Gill *et al.*, 2008).

B. Synthèse du cholestérol

La barrière hémato encéphalique, qui sépare le système nerveux central (SNC) du compartiment périphérique, empêche en situation physiologique le cholestérol périphérique d'entrer dans le cerveau. De ce fait, la quasi-totalité du cholestérol cérébral est synthétisé *in situ* (Dietschy and Turley, 2001), et le SNC utilise son propre système de transport qui est séparé de celui du plasma, bien que plusieurs apolipoprotéines impliquées dans le métabolisme périphérique des lipoprotéines soient présentes dans le cerveau (Vance and Hayashi, 2010).

Le taux de synthèse du cholestérol dans le cerveau est élevé durant le développement et la myélinisation. Chez l'adulte, la synthèse de cholestérol cérébral est très fortement réduite mais est toujours présente et diminue avec l'âge (Thelen *et al.*, 2006). Toutes les cellules cérébrales synthétisent du cholestérol durant le développement embryonnaire mais les neurones matures à l'âge adulte ne produisent pas assez de cholestérol pour subvenir aux besoins nécessaires pour la synthèse, la réparation des

membranes, la synaptogénèse et la survie (Dietschy and Turley, 2004; Ignatius *et al.*, 1986; Laskowitz *et al.*, 1998; Poirier *et al.*, 1993; Quan *et al.*, 2003). En effet, les neurones adultes dépendent du cholestérol apporté par les cellules gliales qui sont capables de le synthétiser en grandes quantités (Nieweg *et al.*, 2009). Dans les neurones, la faible synthèse de cholestérol est située au niveau des somas uniquement, et non au niveau des dendrites et axones (Vance *et al.*, 1994).

1. Voie de synthèse du cholestérol

La synthèse de cholestérol nécessite une cascade de plus de 20 étapes. Ici, nous nous intéresserons aux 5 étapes les plus importantes (Figure 10). La première consiste en la synthèse d'hydroxy méthyl glutaryl CoA (HMGCoA) via l'HMGCoA synthase qui condense différents acétyl-CoA. Ensuite, l'HMGCoA est réduit pour former le mévalonate via une réaction catalysée par l'HMGCoA réductase (HMGCoAR). Il s'agit de la réaction limitante de la voie de synthèse du cholestérol. Après cela, grâce à des réactions de phosphorylation et de décarboxylation, le mévalonate est converti en squalène qui subit ensuite une cyclisation en lanostérol qui est le précurseur immédiat du cholestérol. Enfin le lanostérol est transformé dans le RE en cholestérol (Figure 10) (Rauthan and Pilon, 2011).

Figure 10 : Voie de synthèse du cholestérol

2. Régulation de la synthèse de cholestérol

La régulation de la synthèse du cholestérol se fait grâce aux acteurs principaux suivants :

- l'HMGCoAR : enzyme limitante de la synthèse de cholestérol située dans le RE
- SREBP2 (*Sterol Regulatory Element-Binding Protein*) : facteur de transcription qui active les gènes requis pour la synthèse de cholestérol situé dans le RE
- SCAP (*SREBP cleavage-activating protein*) protéine située dans le RE qui permet le transport de SREBP du RE à l'appareil de Golgi.

Les protéines SREBP et SCAP possèdent un domaine sensible aux stérols appelé « *sterol-sensing-domain* » qui va permettre l'interaction entre différentes protéines et la modulation de l'activité de SREBP (Brown and Goldstein, 1997).

Lorsque la synthèse de cholestérol est nécessaire, SREBP est activé par clivage au niveau de l'appareil de Golgi. Le transport de SREBP est régulé par la protéine SCAP. Immédiatement après sa synthèse au niveau de la membrane du RE, SREBP se fixe à SCAP qui va recruter les protéines du complexe COPII (*Coat protein complex II*), permettant la migration de SREBP dans l'appareil de Golgi où il sera clivé afin de générer des fragments qui pourront pénétrer dans le noyau et activer les gènes cibles de la synthèse et de la captation de cholestérol telle que l'HMGCoAR et le récepteur aux LDL (Antonny and Schekman, 2001; Aridor *et al.*, 1998; Barlowe, 2002; Brown and Goldstein, 1999; Espenshade *et al.*, 1999; Nohturfft *et al.*, 2000).

Lorsque le cholestérol s'accumule au niveau du RE, le cholestérol s'immisce dans la membrane du RE, interagit avec le « *sterol-sensing-domain* » de SCAP, provoquant un changement conformationnel de ce dernier favorisant l'interaction entre SCAP et Insig (*Insulin-Induced Gene*) (Janowski, 2002; Lee and Ye, 2004; Sun *et al.*, 2005; Yabe *et al.*, 2002). De ce fait, le complexe SCAP/SREBP ne peut plus se lier aux protéines du complexe COPII, provoquant une accumulation de complexes Insig/SCAP/SREBP stables dans le RE (Adams *et al.*, 2003, 2004). SREBP ne parvient donc pas à sortir du RE et ne peut plus

être clivé dans l'appareil de Golgi, supprimant la transcription des gènes impliqués dans la synthèse de cholestérol (Figure 11) (Goldstein *et al.*, 2002)

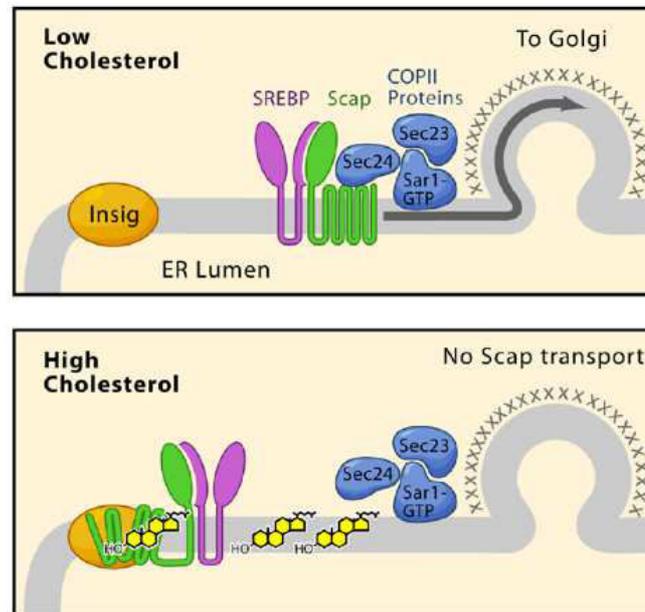


Figure 11 : Régulation du transport de SREBP2 via les stérols (d'après Goldstein *et al.* 2006). Lors d'un déficit en cholestérol, SREBP2 est activé dans l'appareil de Golgi tandis qu'il est retenu dans le RE lors d'un excès de cholestérol

Les complexes Insig/SCAP/SREBP servent de réservoir pour SREBP. Quand les cellules ont un besoin de cholestérol, Insig n'est pas liée au complexe SCAP/SREBP, elle subit alors une ubiquitinylation et est transportée vers le protéasome pour être dégradée et ainsi ne peut pas bloquer la synthèse de cholestérol. Le complexe SREBP/SCAP peut ainsi migrer vers l'appareil de Golgi et le taux de SREBP nucléaire redevient suffisant pour induire la transcription des gènes impliqués dans la synthèse de cholestérol. De plus, SREBP induit la transcription du gène Insig, mais la protéine est rapidement dégradée tant que le taux de cholestérol n'est pas suffisant pour permettre l'interaction avec SCAP, qui stabilise Insig et la protège de l'ubiquitinylation (Figure 12) (Gong *et al.*, 2006)

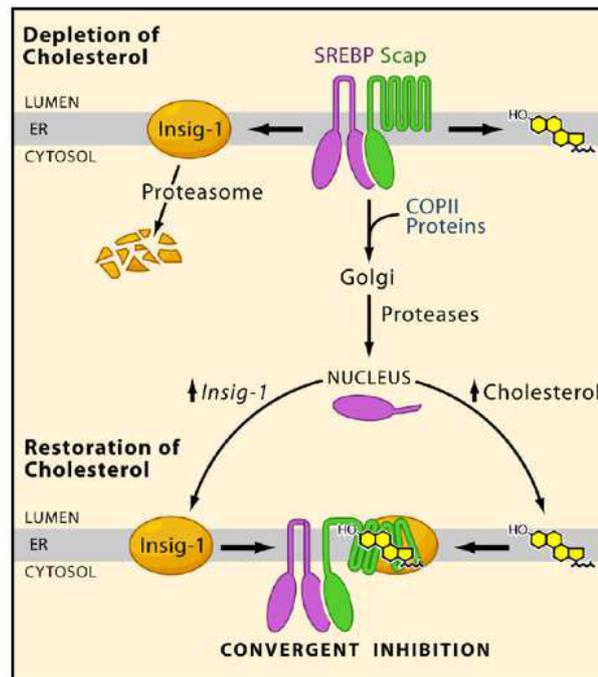


Figure 12 : Régulation de la synthèse des stérols (d'après Goldstein *et al.* 2006). Lors d'un déficit en cholestérol, Insig est ubiquitinylée et dégradée par le protéasome l'empêchant d'inhiber la synthèse de cholestérol

a. Régulation de l'HMGCAR

L'HMGCAR possède également un domaine de détection des stérols semblable à celui de SCAP. Elle est donc régulée au niveau transcriptionnel sous le contrôle de SREBP mais également au niveau post transcriptionnel via les stérols, les deux phénomènes impliquant Insig. En effet, quand les cellules ont une déficience en cholestérol, l'HMGCAR est lentement dégradée avec une demi-vie de 12 heures. Tandis que lorsque le cholestérol s'accumule, l'enzyme est dégradée en moins d'une heure (Ravid *et al.*, 2000). Le lanostérol est l'acteur principal de cette régulation. Lorsque la quantité de lanostérol est suffisante, l'HMGCAR interagit avec Insig, elle-même liée à un complexe gp78/ubc-7/VCP responsable de l'ubiquitinylation et la dégradation de l'HMGCAR par le protéasome (Figure 13) (Sever *et al.*, 2003a, 2003b, 2004; Song *et al.*, 2005).

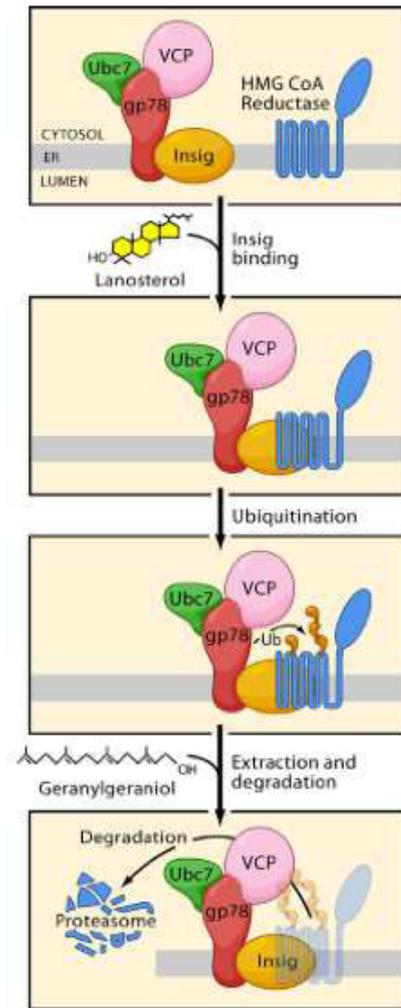


Figure 13 : Régulation de l'HMGCoAR (d'après Goldstein *et al.* 2006). Suite à un excès de cholestérol, l'HMGCoAR est ubiquitinylée et dégradée par le protéasome

b. Régulation de la synthèse de cholestérol via LXR (Liver X Receptor)

Les récepteurs LXR sont des régulateurs transcriptionnels de gènes impliqués dans de nombreux processus physiologiques. LXR est notamment requis pour le maintien du taux de synthèse de cholestérol. En effet, une déplétion de LXR provoque une augmentation de la synthèse de cholestérol en stimulant notamment l'expression et l'activité de l'HMGCoAR (Wang *et al.*, 2008b). LXR existe sous deux isoformes, α et β (Apfel *et al.*, 1994; Willy *et al.*, 1995). LXR α et β peuvent être activés par les mêmes ligands. Cependant, leurs expressions sont différentes suivant les tissus. LXR α est fortement exprimé dans le foie, les tissus adipeux, l'intestin, les reins et les macrophages tandis que

LXR β est exprimé de façon ubiquitaire et est la principale isoforme trouvée dans le SNC. (Bełtowski and Semczuk, 2010; Jamroz-Wiśniewska *et al.*, 2007).

Les ligands naturels des récepteurs LXR sont les oxystérols (Janowski *et al.*, 1996; Lehmann *et al.*, 1997). Comme nous le verrons ci-dessous, les oxystérols sont des produits d'oxydation du cholestérol. Il y a donc des rétro-régulations de la synthèse du cholestérol par ces produits de son catabolisme. Des ligands synthétiques tels que T0901317 et GW3965 capables d'activer LXR α et LXR β ont été développés pour des études précliniques *in vivo*. T0901317 active à la fois LXR α et β de façon similaire, tandis que GW3965 a une plus grande affinité pour LXR β (Lund *et al.*, 2003a; Schultz *et al.*, 2000). Une discussion de leur utilisation dans le cadre de la MA sera développée plus tard dans ce manuscrit.

Les récepteurs LXR fonctionnent comme hétérodimères avec le récepteur rétinoïde X (RXR) (Claudel *et al.*, 2001). RXR est un partenaire de plusieurs récepteurs nucléaires tels que PPAR (*Peroxisome proliferator-activated receptor*) (Chawla *et al.*, 2001). Les hétérodimères LXR/RXR se fixent à des séquences spécifiques d'acide désoxyribonucléique (ADN) appelées « éléments de réponses LXR » dans la région des promoteurs des gènes cibles, aboutissant à des inhibitions ou activations des gènes cibles. Les récepteurs LXR peuvent réguler la transcription des gènes cibles de 2 façons différentes (Figure 14).

- Quand aucun ligand ne se fixe sur l'hétérodimère LXR/RXR, ce dernier fixe des co-répresseurs, qui vont supprimer la transcription des gènes cibles.
- Lorsque des ligands viennent se fixer sur l'hétérodimère LXR/RXR, ce dernier se dissocie des co-répresseurs, et recrute des co-activateurs, provoquant la transcription des gènes cibles (Baranowski, 2008).

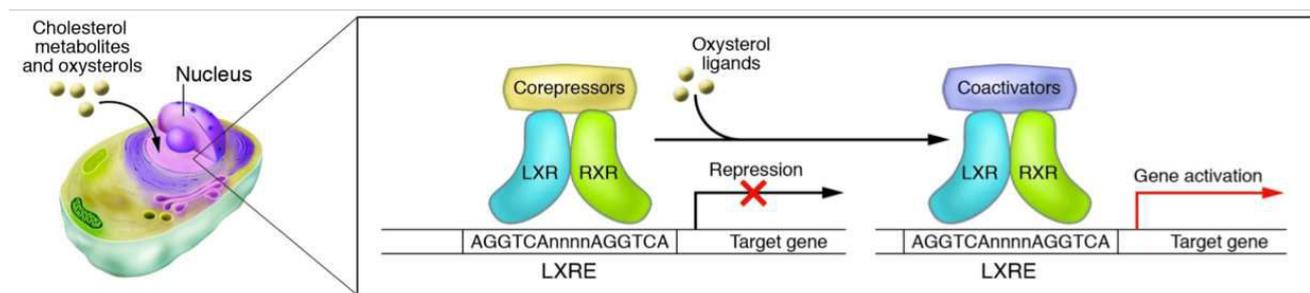


Figure 14 : Régulation de LXR (d'après Zelcer *et al.* 2006). En présence de ligand, l'hétérodimère LXR/RXR recrute des co-activateurs provoquant la transcription de gènes cibles

C. Transport intracellulaire, stockage et métabolisation du cholestérol

1. Transport intracellulaire du cholestérol : rôle de NPC1

Le cholestérol obtenu par les neurones à partir du compartiment extracellulaire quitte les endosomes et lysosomes pour atteindre les compartiments membranaires des différents organites neuronaux. Ce mécanisme est très important pour les neurones et se trouve être perturbé dans la maladie de Niemann-Pick. Cette pathologie autosomale récessive rare est provoquée par des mutations sur les gènes Niemann-Pick type C1 (NPC1) et Niemann-Pick type C2 (NPC2). Les patients atteints de cette pathologie présentent une importante perte neuronale, tout particulièrement des cellules de Purkinje du cervelet, provoquant des troubles neurologiques et moteurs importants (Sarna *et al.*, 2003) ainsi qu'une mort prématurée (Vanier and Millat, 2003). Il s'agit d'une pathologie fatale due à des problèmes de stockage lysosomal du cholestérol (Garver *et al.*, 2007; Karten *et al.*, 2009; Sévin *et al.*, 2007).

La protéine NPC1 est une protéine transmembranaire située dans les endosomes et lysosomes, et possède un domaine sensible aux stérols, alors que NPC2 est une protéine soluble située dans la lumière lysosomale qui fixe le cholestérol. NPC2 transfère le cholestérol non estérifié donc libre des lipoprotéines endocytosées à NPC1 (étapes 1 et 2 de la Figure 15), qui permet ensuite la libération du contenu en cholestérol des endosomes et lysosomes par un mécanisme encore inconnu (Figure 15) (Carstea *et al.*, 1997; Naureckiene *et al.*, 2000; Storch and Xu, 2009). NPC1 et NPC2 agissent donc en

tandem pour permettre la libération du cholestérol non estérifié des lipoprotéines endocytosées (Vance, 2010; Wang *et al.*, 2010).

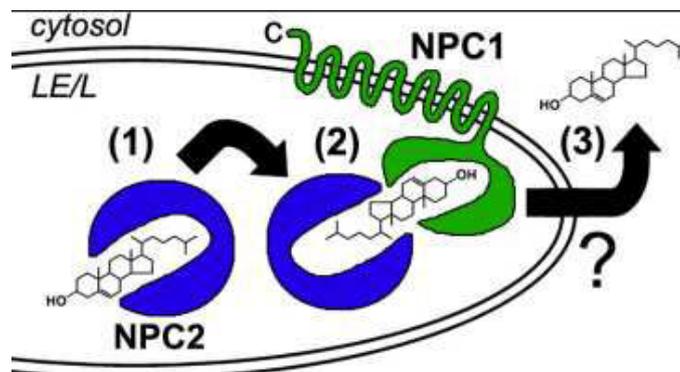


Figure 15 : Transport intracellulaire du cholestérol (d'après Peake *et al.* 2010). La protéine NPC2 fixe le cholestérol et le transfère à la protéine NPC1 qui permet la libération du cholestérol

Le dysfonctionnement d'une de ces deux protéines provoque une accumulation de cholestérol dans le système endosomal/lysosomal qui s'y retrouve séquestré (Reid *et al.*, 2004; Zervas *et al.*, 2001). De ce fait, les quantités de cholestérol au niveau de la membrane plasmique et du RE sont réduites. Dans les neurones déficients pour NPC1, cette altération de l'export du cholestérol à partir du système endosomal et lysosomal aboutit à une teneur plus élevée que la normale de cholestérol dans les corps cellulaires et une quantité diminuée dans les axones distaux (Karten *et al.*, 2003, 2005). Des souris déficientes pour NPC1 montrent des troubles morphologiques des neurites et des dendrites, une dégénérescence axonale, et une perte progressive des cellules neuronales et des cellules de Purkinje ainsi qu'une augmentation des processus inflammatoires (German *et al.*, 2002; Ong *et al.*, 2001; Sarna *et al.*, 2003; Walkley and Suzuki, 2004). NPC1 et NPC2 sont exprimés à la fois dans les neurones et les cellules gliales (Hu *et al.*, 2000; Ong *et al.*, 2001; Patel *et al.*, 1999; Prasad *et al.*, 2000; Reid *et al.*, 2004). Ces processus neurodégénératifs augmentent avec l'âge, et touchent en premier lieu les terminaisons nerveuses des axones pour atteindre les corps cellulaires. Les processus inflammatoires augmentent également au fur et à mesure du vieillissement (Ong *et al.*, 2001; Patel *et al.*, 1999; Reid *et al.*, 2004; Walkley and Suzuki, 2004). Une délétion de NPC1 spécifiquement dans les cellules de Purkinje de souris entraîne une ataxie caractérisée par des troubles

moteurs dont la coordination motrice, ainsi qu'une dégénérescence des cellules de Purkinje qui apparaît de façon âge dépendante (Elrick *et al.*, 2010). Le fait de réinstaurer l'expression de NPC1 dans des neurones déficients pour cette protéine empêche la dégénérescence neuronale. Ce phénomène n'est pas retrouvé dans des cultures d'astrocytes et une déficience pour la protéine NPC1 dans les astrocytes ne perturbe pas la sécrétion de cholestérol par ces derniers (Karten *et al.*, 2005; Lopez *et al.*, 2011; Mutka *et al.*, 2004). A cause de l'accumulation de cholestérol dans les endosomes et lysosomes, les neurones se retrouvent en déficit de cholestérol au niveau membranaire, et un processus de démyélinisation apparaît, ce qui altère la composition des radeaux lipidiques et des membranes synaptiques. De plus, les neurones déficients pour la protéine NPC1 présentent des perturbations des processus nécessitant la fonction des endosomes et lysosomes comme la libération et le recyclage des vésicules présynaptiques qui présentent des morphologies et compositions altérées (Karten *et al.*, 2006a; Wasser *et al.*, 2007). Par ailleurs, la perte de la protéine NPC1 au niveau neuronal provoque la mort des neurones à cause d'une altération de la réponse aux facteurs de croissance (Henderson *et al.*, 2000), de la fonction mitochondriale (Yu *et al.*, 2005) et de la structure axonale (Bu *et al.*, 2002). Sachant que ces protéines sont présentes de façon ubiquitaire, il n'est toujours pas compris pourquoi le cerveau est l'organe le plus touché.

Aucun traitement efficace n'est disponible pour cette maladie. Cependant, de récentes études ont démontré une nouvelle approche thérapeutique. Une seule injection de cyclodextrine dans des souris déficientes pour NPC1 de 7 jours ralentit considérablement la dégénérescence et augmente la durée de vie des souris de 50 % (Liu *et al.*, 2009a). Bien que la cyclodextrine ne traverse pas la BHE, une faible quantité peut atteindre le cerveau. Les fortes doses de cyclodextrine (5-10 mM), habituellement utilisées pour extraire le cholestérol des membranes cellulaires sont toxiques pour les neurones des souris. Au contraire, de faibles doses de cyclodextrine (0,1 mM) ne semblent pas être neurotoxiques, sont endocytosées par les cellules NPC1 KO et permettent de libérer le cholestérol séquestré dans les endosomes et/ou les lysosomes des neurones, astrocytes et microglie sans extraire des quantités importantes de cholestérol (Aquil *et al.*, 2011; Rosenbaum *et al.*, 2010). Un traitement par la cyclodextrine aura donc pour effet de mobiliser le cholestérol des endosomes/lysosomes et membranaire dans le cytosol et

pourra rejoindre le RE pour y être estérifié. Ceci a pour effet d'inhiber la transcription de SREBP2 et de ses gènes cibles telle que l'HMGCAR et d'activer la transcription des gènes cibles de LXR aboutissant à une diminution du taux de synthèse de cholestérol et à une augmentation de l'efflux de ce dernier. Via ces mécanismes, la cyclodextrine permet de restaurer une homéostasie du cholestérol normale (Peake and Vance, 2012).

2. Stockage du cholestérol : formation de cholestérol estérifié

Comme nous l'avons vu, le cholestérol est présent sous une forme libre et une forme estérifiée. Le maintien d'un équilibre dynamique entre le cholestérol libre et estérifié est important pour l'homéostasie du cholestérol cérébral car une surproduction de cholestérol libre peut être toxique pour les cellules (Tabas, 2002). Les neurones, les astrocytes et les cellules microgliales stockent le cholestérol dans des gouttelettes lipidiques (Falchi *et al.*, 2013; Khatchadourian *et al.*, 2012; Savage *et al.*, 1987). Dans ce but, le cholestérol est estérifié par l'acyl-coenzyme A : cholestérol acyltransférase 1 aussi appelée stérol-O-acyltransférase (ACAT/SOAT1) qui est localisée dans le RE (Chang *et al.*, 2009). L'ACAT1 est présente dans les neurones de différentes structures cérébrales telles que l'hippocampe, cortex, cervelet, striatum, bulbe olfactif et le thalamus (Kim *et al.*, 2011; Sakashita *et al.*, 2000). A noter que l'isoforme ACAT2 est présente en 1000 fois moins grande quantité dans ces structures que l'ACAT1. Les activités d'estérification ont été détectées dans le cerveau d'humain (Johnson and Shah, 1978), de rat (Choi and Suzuki, 1978), de poulet (Marco *et al.*, 1986) et de souris, avec une proportion de cholestérol estérifié représentant environ 1 % du cholestérol total (Bryleva *et al.*, 2010). La réduction génétique ou pharmacologique de l'ACAT chez la souris aboutit à une diminution d'environ 86 % des esters de cholestérol dans le cerveau et augmente le ratio de cholestérol libre sur le cholestérol estérifié (Hutter-Paier *et al.*, 2004). Suite à l'injection d'un analogue du glutamate appelé kainate, une réaction gliale et une perte neuronale sont présentes tout comme une augmentation de l'expression de l'ACAT1 dans l'hippocampe. Un stress oxydatif semble donc augmenter l'expression de l'ACAT1 dans l'hippocampe. Ceci est accompagné d'une augmentation de la quantité de cholestérol total dans l'hippocampe, qui n'est pas due à une augmentation de la quantité de cholestérol libre, mais à une augmentation de la quantité des esters de cholestérol. Il est possible que l'augmentation de l'expression de l'ACAT1 permette de stocker le

cholestérol afin de limiter l'apparition de produits d'oxydation toxiques et limiter l'efflux de cholestérol pour qu'il soit disponible pour réparer les dommages neuronaux (Kim *et al.*, 2011).

Une autre enzyme est responsable de l'estérification du cholestérol dans le cerveau. Cette enzyme est la lécithine acétyl cholestérol transférase (LCAT). Le cerveau représente le deuxième organe après le foie où la LCAT est le plus exprimée. Elle est présente dans l'hippocampe, le cortex et le cervelet. Son activité a été retrouvée dans de nombreuses lignées neurogliales. La LCAT a également été retrouvée dans le LCR chez l'homme (Albers *et al.*, 1992; McLean *et al.*, 1986; Smith *et al.*, 1990; Warden *et al.*, 1989). La LCAT est exclusivement sécrétée par les astrocytes. De plus, lorsque l'ApoE est absente, l'activité de la LCAT est diminuée mais peut être restaurée par l'ajout d'ApoA1, ce qui suggère que l'ApoE et l'ApoA1 sont des activateurs de la LCAT sécrétée par les astrocytes. De même, lorsque le transporteur ABCA1 est absent, l'activité de la LCAT est presque totalement inhibée. De plus, l'ApoE a une structure altérée lorsque la LCAT est absente, et l'ApoE liée aux HDL se trouve augmentée dans le LCR (Liquide Céphalo rachidien) des souris alors que l'ApoA1 liée aux HDL (*High Density Lipoprotein*) se trouve diminuée. Ces résultats démontrent que la LCAT estérifie le cholestérol cérébral et qu'elle peut influencer sur la composition et la teneur en ApoE et ApoA1 du LCR (Hirsch-Reinshagen *et al.*, 2009).

3. Métabolisation du cholestérol : formation des oxystérols

Le cerveau est capable de synthétiser son propre cholestérol. Dans le but de prévenir des accumulations de cholestérol au niveau cérébral, il est donc nécessaire d'excréter ce dernier. Or, le cholestérol est incapable de traverser la BHE. Son élimination ne peut se faire que via l'excrétion de métabolites. Le principal mécanisme d'élimination du cholestérol cérébral est sa conversion en oxystérol, et plus précisément en 24S-hydroxycholestérol (24S-OHC), aussi connu sous le nom de cérébrostérol, qui au contraire du cholestérol peut traverser la BHE (Figure 16) (Björkhem *et al.*, 1997; Lutjohann *et al.*, 1996).

L'enzyme responsable de la production du 24S-OHC est la 24S-hydroxylase et est un membre de la famille des cytochromes P450, CYP46A1 (Lund *et al.*, 1999). CYP46A1

est presque uniquement localisé dans les neurones du cortex, de l'hippocampe, du putamen, des amygdales et du thalamus (Lund *et al.*, 1999). Chez l'homme, le flux de 24S-OHC à travers la BHE du cerveau à la périphérie est d'environ 6 à 7 mg/jour (Lutjohann *et al.*, 1996). Chez le rat (Björkhem *et al.*, 1997) et chez la souris (Xie *et al.*, 2003), la production de 24S-OHC est équivalente à environ 2/3 de la synthèse de cholestérol. Sa demi-vie est de 12 h contre 4 à 6 mois pour le cholestérol (Björkhem *et al.*, 1997). Une fois sécrété du cerveau, le 24-OHC se retrouve dans la circulation, puis est capté par le foie et métabolisé. Près de la moitié du 24S-OHC atteint le foie et est métabolisé dans les acides biliaires (Bjorkhem *et al.*, 2001). Au niveau périphérique, un processus similaire existe, sauf que le groupe hydroxyle n'est pas ajouté en position 24 mais en position 27 (Figure 16). Presque toutes les cellules expriment l'enzyme responsable de la production de 27-hydroxycholesterol (27-OHC) qui est la stérol 27-hydroxylase CYP27A1 (Babiker *et al.*, 1997).

Figure 16 : Structures du 24S-hydroxycholestérol (A) et du 27-hydroxycholestérol (B) (d'après Björkhem *et al.* 2009)

Le 27-OHC est capable de traverser la BHE, et le flux de 27-OHC vers le cerveau est estimé à 5 mg/jour. De plus, les quantités de 27-OHC dans le LCR sont corrélées avec celles présentes dans le plasma, montrant un équilibre entre ces deux compartiments (Heverin *et al.*, 2005). La quantité de 27-OHC présente dans le LCR ne dépend pas uniquement de la capacité de synthèse de l'organisme mais aussi de l'intégrité de la BHE, qui altérée, entraîne une augmentation du flux de 27-OHC du plasma au cerveau et donc une augmentation de la quantité de 27-OHC dans le cerveau (Leoni *et al.*, 2003). Une fois dans le cerveau, le 27-OHC peut être métabolisé via l'enzyme neuronale CYP7B1 en acide

7 α -hydroxy-3-oxo-4-cholestenoïque. Ce métabolite est également capable de traverser la BHE et de rejoindre la circulation (Figure 17) (Meaney *et al.*, 2007).

Figure 17 : Métabolisme des oxystérols

Les transports de 24S-OHC et de 27-OHC à travers la BHE se font essentiellement par diffusion passive. Les groupements hydroxyles des oxystérols provoquent un changement conformationnel énergétiquement favorable, permettant l'interaction avec les têtes polaires des phospholipides et le passage entre les compartiments lipophiles. Des mécanismes faisant appel à des transporteurs organiques anioniques existent également (Meaney *et al.*, 2007; Ohtsuki *et al.*, 2007).

Les mécanismes de régulation de CYP46A1 (24S-hydroxylase) sont encore mal caractérisés. Le stress oxydatif engendre une forte augmentation de la transcription de ce gène (Ohyama *et al.*, 2006). Les facteurs de transcription de la famille Sp seraient impliqués dans la régulation de l'expression de CYP46A1 (Milagre *et al.*, 2008). Malgré l'absence de facteurs régulateurs, il existe cependant quelques régulations physiologiques de cette enzyme. Durant les deux premières semaines de vie, il y a une augmentation significative des acides ribonucléiques messagers (ARNm) du CYP46A1 en parallèle à une augmentation de la quantité de 24S-OHC et une réduction de la synthèse de cholestérol (Lund *et al.*, 1999; Ohyama *et al.*, 2006). Il est également décrit que des mécanismes épigénétiques importants sont présents pour la régulation de l'expression du CYP46A1 (Shafaati *et al.*, 2009). Sachant que CYP46A1 est présent dans les neurones et que ceux-ci s'approvisionnent en cholestérol, il est possible que le cholestérol soit un élément régulateur. Chez des souris mimant la maladie d'Huntington, le cholestérol cérébral se trouve diminué tout comme la quantité de 24S-OHC plasmatique suggérant un lien entre la disponibilité du substrat et l'activité de l'enzyme (Valenza *et al.*, 2007). Par ailleurs, des souris incapables de transformer le desmostérol en cholestérol présentent une diminution de 98% de la quantité de 24S-OHC, confortant cette hypothèse (Ohyama *et al.*, 2006).

Les oxystérols peuvent moduler le métabolisme du cholestérol en interagissant avec la protéine Insig, qui séquestre SREBP dans les membranes du RE, empêchant son clivage dans l'appareil de Golgi et ainsi sa migration dans le noyau. L'absence d'activation de SREBP a pour conséquence l'inhibition de la transcription des gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol (Radhakrishnan *et al.*, 2007). Chez des souris dont l'expression de CYP46A1 est supprimée, peu de changements biochimiques sont présents. Même si les quantités de 24S-OHC sont logiquement diminuées, celles en cholestérol total demeurent inchangées. Des mécanismes compensatoires aboutissent à une diminution de près de 40 % de la synthèse de cholestérol (Figure 18). Ces mécanismes sont une légère diminution de l'activité de l'HMGCoAR et de la quantité de desmostérol qui est un précurseur du cholestérol (Lund *et al.*, 2003b; Meljon *et al.*). De plus, ces souris présentent des troubles d'apprentissage spatial et moteur importants, qui sont associés à des troubles électrophysiologiques (Kotti *et al.*, 2006). Par ailleurs, une étude a démontré

que les effets d'un régime hyperlipidique sur les cibles de LXR ne sont pas totalement retrouvés chez ces souris n'exprimant pas la 24S-hydroxylase, suggérant un lien entre les oxystérols et LXR (Chen *et al.*, 2007).

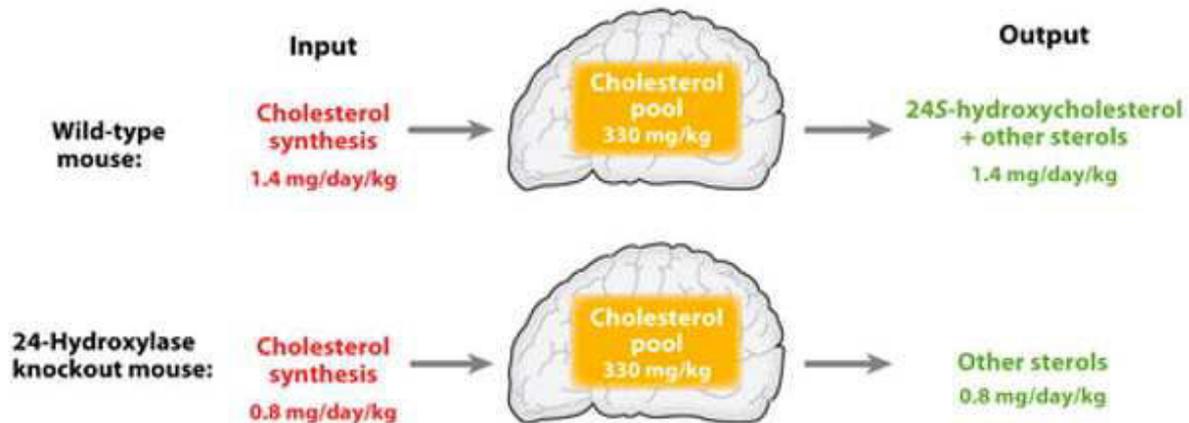


Figure 18 : Métabolisme du cholestérol cérébral chez des souris déficientes pour la 24S-hydroxylase (d'après Russel *et al.* 2009)

Comme décrit plus tôt dans ce manuscrit, les neurones à l'âge adulte sont incapables de synthétiser le cholestérol et doivent s'approvisionner en cholestérol via les astrocytes. Par ailleurs, nous avons vu que les neurones doivent exporter leur cholestérol pour éviter son accumulation. Le cholestérol est ensuite exporté à travers la BHE. Comme dans la circulation sanguine, cela suppose des transports multidirectionnels complexes du cholestérol. Ces transports sont effectués par l'intermédiaire des lipoprotéines cérébrales et de leurs récepteurs membranaires. D'autres transporteurs de la famille ABC interviennent également dans ces transports en liaison avec les lipoprotéines. Nous verrons tout d'abord ces lipoprotéines et le rôle fondamental de l'apolipoprotéine E pour ensuite examiner les transporteurs ABC et enfin les différents types de récepteurs à l'ApoE présents dans le cerveau.

D. Les transports intercellulaires et transcellulaires du cholestérol

1. Les lipoprotéines cérébrales et l'ApoE

Les apolipoprotéines du SNC ressemblent aux HDL plasmatiques en terme de taille, de densité et de composition. La principale différence est que l'ApoE est l'apolipoprotéine majoritaire dans le cerveau alors que c'est l'apolipoprotéine A (ApoA) qui est majoritaire dans les HDL plasmatiques (DeMattos *et al.*, 2001; Ladu *et al.*, 2000; LaDu *et al.*, 1998; Pitas *et al.*, 1987). Nous nous intéresserons donc ici exclusivement à l'ApoE.

L'ApoE est synthétisée et sécrétée de façon abondante par les astrocytes, et de façon moins importante par la microglie (DeMattos *et al.*, 2001; Gong *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2006). Elle peut également être synthétisée par les neurones dans l'hippocampe, et dans le cortex mais en très faibles quantités (Xu *et al.*, 1999a). La sécrétion d'ApoE par les neurones se fait essentiellement en réponse à des dommages neuronaux (Xu *et al.*, 1999b, 2006). L'ApoE est incapable de traverser la BHE; le stock d'ApoE présent dans le cerveau est celui sécrété par les astrocytes et les cellules gliales et ne vient pas de la périphérie (Linton *et al.*, 1991). Une fois produite et sécrétée par les astrocytes, l'ApoE est assemblée avec des phospholipides et du cholestérol pour former des lipoprotéines similaires en taille aux HDL plasmatiques. Ces particules lipoprotéiques se fixent ensuite sur des récepteurs aux ApoE (que nous traiterons dans une prochaine partie) exprimés au niveau neuronal (Figure 19). Ce mécanisme est utilisé pour la synaptogénèse, la réparation et la croissance axonale (Hayashi *et al.*, 2004; Mahley, 1988; Pitas *et al.*, 1998).

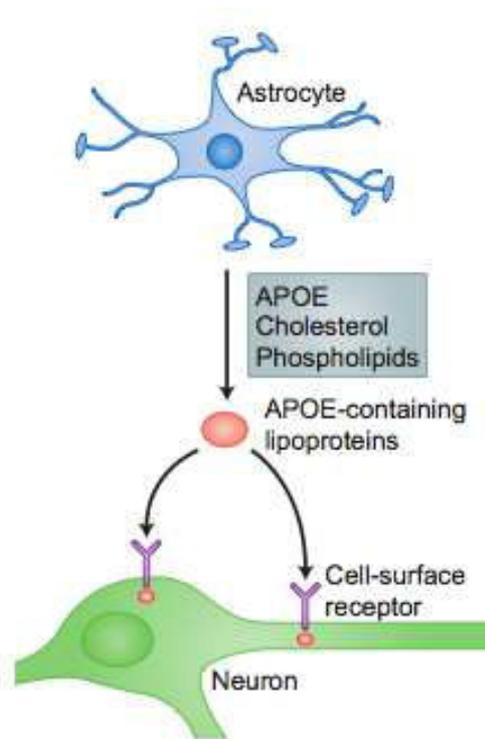


Figure 19 : Transport du cholestérol entre les astrocytes et les neurones (d'après Vance *et al.* 2012)

Le métabolisme de l'ApoE dans le SNC est encore mal compris et caractérisé, même si on sait qu'elle joue un rôle clé au niveau cérébral. L'expression de l'ApoE dans les cellules gliales est augmentée d'un facteur 150 après une blessure cérébrale, appuyant l'hypothèse que l'ApoE est impliquée dans les mécanismes de réparation neuronale. De plus, l'élimination des neurones en dégénérescence est perturbée chez des souris déficientes pour l'ApoE. Ces souris présentent des déficits d'apprentissage et de mémorisation importants caractérisés par des pertes synaptiques, des altérations du système cholinergique, de la LTP et de la plasticité synaptique suggérant un rôle critique de l'ApoE dans les fonctions neuronales normales (Figure 20) (Anderson *et al.*, 1998; Champagne *et al.*, 2002; Fagan *et al.*, 1998; Fullerton *et al.*, 1998; Gordon *et al.*, 1995, 1996; Ignatius *et al.*, 1986; Krugers *et al.*, 1997; Masliah *et al.*, 1995; Oitzl *et al.*, 1997; Snipes *et al.*, 1986; Veinbergs *et al.*, 1998).

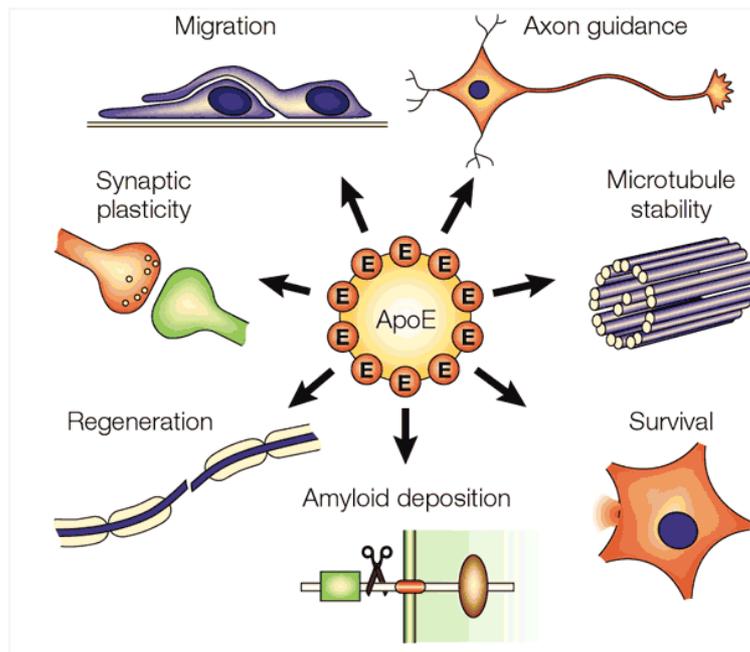


Figure 20 : Rôles de l'apoE dans le cerveau (d'après Herz *et al.* 2000)

L'ApoE est une glycoprotéine de 299 acides aminés qui existe sous 3 isoformes : ApoE2, ApoE3 et ApoE4. La présence d'un allèle ApoE4 est associée à une augmentation des risques d'apparition de la MA (Chartier-Harlin *et al.*, 1994; Houlden *et al.*, 1998). Ces isoformes diffèrent de 1 ou 2 acides aminés. En effet, l'ApoE3 a un résidu cystéine en position 112 et un résidu arginine en position 158, alors que l'ApoE2 a deux résidus cystéine à ces positions, et l'ApoE4 possède 2 résidus arginine à ces 2 positions (Weisgraber *et al.*, 1994). L'ApoE4 possède un domaine d'interaction entre l'acide glutamique à la position 255 (Glu-255) dans le domaine C-terminal et l'arginine à la position 61 (Arg-61) du domaine N-terminal. Ce domaine d'interaction est amplifié avec la présence de l'arginine en position 112 mais pas par la cystéine en position 112 de l'ApoE2 et de l'ApoE3. Bien que l'ApoE4 des rongeurs ait, comme l'ApoE4 humaine, deux arginines en position 112 et 158, elle n'a pas d'arginine en position 61 (Arg-61) qui est remplacée par une thréonine (Thr-61), ce qui permet d'éviter ce domaine d'interaction (Figure 21) (Dong and Weisgraber, 1996; Mahley *et al.*, 2006; McLean *et al.*, 1983).

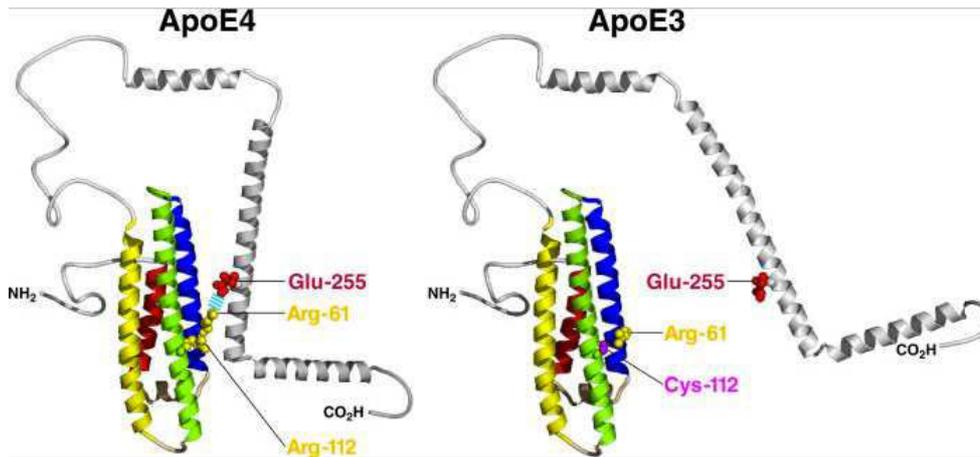


Figure 21 : Structures de l'ApoE3 et de l'ApoE4 (d'après Zhong *et al.* 2009)

Quand la thréonine en position 61 est remplacée par l'arginine, le domaine d'interaction obtenu est similaire à celui présent dans l'ApoE4 humaine (Raffai *et al.*, 2001). Les souris chez lesquelles ce remplacement est effectué présentent des diminutions de marqueurs synaptiques tels que la synaptophysine et la neurologine, ainsi que des troubles de l'apprentissage et de la mémoire. Il est intéressant de noter que les astrocytes de ces souris présentent une diminution de 34 % de la sécrétion de cholestérol, ce qui suggère un dysfonctionnement de l'approvisionnement en cholestérol des astrocytes vers les neurones (Zhong *et al.*, 2008). L'ApoE4 aurait une capacité de liaison aux lipides moins importante que l'ApoE3, ce qui peut expliquer cette diminution de l'efflux de cholestérol. En effet, l'addition dans des cultures primaires d'astrocytes et de neurones d'ApoE de différentes isoformes stimule l'efflux de cholestérol avec l'efficacité suivante : ApoE2>ApoE3>ApoE4 (Michikawa *et al.*, 2000). De même, 2,5 à 3,9 fois plus de cholestérol et de phospholipides sont exportés à partir d'astrocytes et de neurones corticaux primaires de rat exprimant l'ApoE3 humaine par rapport à ceux produisant l'isoforme ApoE4 (Minagawa *et al.*, 2009). De plus, des souris ApoE4 ont moins d'ApoE cérébrales que les souris ApoE3. Dans les astrocytes, le taux de dégradation de l'ApoE4 est supérieur à celui de l'ApoE3, ce qui suggère que l'ApoE4 faiblement liée aux lipides a un recyclage plus important (Riddell *et al.*, 2008).

Il est à noter que les souris déficientes pour l'ApoE (ApoE KO) mais qui expriment l'ApoE3 humaine sont protégées des processus de neurodégénérescence liés à l'âge

observés chez les souris ApoE KO alors que ce phénomène est absent chez les souris ApoE4 (Buttini *et al.*, 1999). De plus, l'expression de l'ApoE4 chez des souris ayant subi des lésions cérébrales perturbe la synaptogénèse et les processus de réparation (White *et al.*, 2001). Les capacités d'apprentissage et de mémorisation sont altérées chez les souris ApoE4 par rapport aux souris ApoE3 et tout particulièrement chez les femelles (Grootendorst *et al.*, 2005; Raber *et al.*, 1998). L'ApoE4 peut être responsable de ces troubles cognitifs en modifiant la LTP. C'est le cas des souris déficientes pour l'ApoE, qui présentent des altérations de l'apprentissage et de la mémorisation avec une altération de la LTP (Gordon *et al.*, 1995; Valastro *et al.*, 2001). La LTP des souris ApoE4 est significativement altérée par rapport à celle des souris ApoE3 et sauvages (Trommer *et al.*, 2004). Le mécanisme par lequel l'ApoE4 peut influencer la LTP n'est pas encore déterminé même s'il a été décrit qu'elle diminue l'expression neuronale du récepteur à l'ApoE2 (ApoER2) et du récepteur NMDAR à la surface de la cellule en les séquestrant dans des compartiments intracellulaires. Ceci réduit les capacités de la Reeline (ligand du ApoER2 qui régule la migration neuronale durant l'embryogénèse et la neurotransmission à l'âge adulte) à stimuler l'activité synaptique du NMDAR essentielle pour l'induction de la LTP (Chen *et al.*, 2010)

2. Les transporteurs de la famille ABC

Il existe de nombreux transporteurs faisant partie de la famille des transporteurs membranaires ABC. Leur fonction est intimement liée à celle de l'ApoE que nous venons de rencontrer. Nous parlerons ici des 3 principaux transporteurs qui sont ABCA1, ABCG1 et ABCG4 (Figure 22).

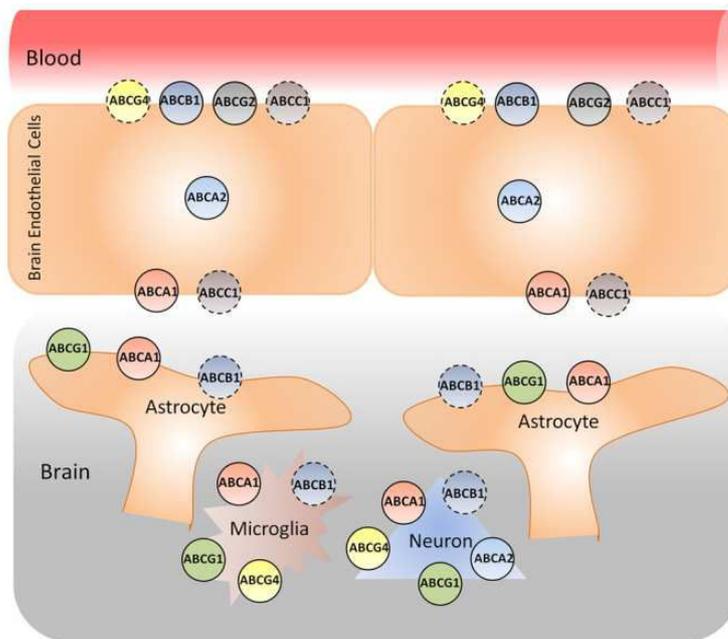


Figure 22 : Expressions des transporteurs du cholestérol dans le système nerveux central (d'après Abuznait *et al.* 2012)

a. ABCA1

ABCA1 est un membre de la famille des transporteurs transmembranaires ABC. Ces derniers régulent, via l'ATP, le transport de différents substrats à travers les membranes cellulaires (Dean *et al.*, 2001). Il est majoritairement exprimé au niveau neuronal et dans une moindre mesure dans les cellules gliales (Fukumoto *et al.*, 2002; Koldamova *et al.*, 2003) et également au niveau de la BHE (Gosselet *et al.*, 2009; Ohtsuki *et al.*, 2004). Il permet avant tout l'efflux de cholestérol du cerveau vers la circulation sanguine à travers la BHE (Do *et al.*, 2011; Panzenboeck *et al.*, 2002). Le rôle d'ABCA1 au niveau du SNC est encore mal caractérisé. ABCA1 est fortement exprimé au niveau cérébral et joue un rôle dans le transport du cholestérol cérébral en régulant la sécrétion d'ApoE par les astrocytes, déterminant la quantité d'ApoE dans le cerveau. Des souris déficientes pour ABCA1 ont une diminution très importante de la quantité d'ApoE dans le cerveau, le LCR et le plasma. Des astrocytes et de la microglie déficientes pour ABCA1 n'ont plus la même capacité à réguler l'efflux de cholestérol et présentent une réduction de la quantité de cholestérol dans le milieu, à cause d'une diminution de la sécrétion de

l'ApoE et une plus grande proportion d'ApoE faiblement liées aux lipides (Hirsch-Reinshagen *et al.*, 2004; Wahrle *et al.*, 2004).

ABCA1 est impliqué dans la neuroinflammation et la mort neuronale. En effet, des souris déficientes pour ABCA1 présentent une augmentation de l'expression de la GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*), et de différents médiateurs inflammatoires tels que TNF α (Tumor Necrosis Factor α), iNOS (*Inductible Nitric Oxyde Synthase*) NF κ B (*Nuclear factor-kappa B*). De façon originale, une équipe a créé des souris déficientes pour ABCA1 spécifiquement dans les neurones ou dans les astrocytes. Grâce à ces modèles, ils ont pu démontrer que l'absence d'ABCA1 à la fois dans les neurones et les astrocytes est nécessaire pour induire ces effets (Karasinska *et al.*, 2013). Une absence d'ABCA1 peut également avoir une influence sur le métabolisme du cholestérol indépendamment de son effet sur l'ApoE. En effet, des souris déficientes pour ABCA1 présentent une augmentation de la captation du cholestérol estérifié des HDL plasmatiques, grâce à la surexpression de la protéine SR-B1 (*Scavenger Receptor Class B Member 1*) dans les vaisseaux cérébraux, qui a pour rôle de transférer le cholestérol estérifié des HDL plasmatiques dans le cerveau. Ces perturbations s'accompagnent de troubles de la coordination motrice et des fonctions sensorimotrices chez les souris âgées et d'une diminution du nombre de synapses excitatrices et de vésicules synaptiques dans le cortex (Karasinska *et al.*, 2009).

b. ABCG1 et ABCG4

D'autres transporteurs de la même famille ont des rôles importants sur le métabolisme du cholestérol cérébral. C'est le cas des transporteurs ABCG1 et ABCG4 qui sont exprimés à la fois dans les neurones et les astrocytes d'hippocampe, de cervelet et du bulbe olfactif (Bojanic *et al.*, 2010; Tarr and Edwards, 2008; Wang *et al.*, 2008a). ABCG1 se trouve cependant être présent en cinq fois plus grande quantité dans les neurones que dans les astrocytes, et est autant exprimé dans les neurones que dans la microglie. Ils participent à l'efflux de cholestérol à la fois dans les neurones et les astrocytes (Karten *et al.*, 2006b; Kim *et al.*, 2007). Au niveau neuronal, ABCG1 et ABCG4 sont présents exclusivement au niveau des vésicules intracellulaires des corps cellulaires et des axones, et se situent dans les mêmes endosomes. Différents modèles *in vitro* et *in vivo* ont permis

de démontrer un rôle important de ces deux transporteurs dans la régulation de la synthèse du cholestérol. En effet, ABCG1 et ABCG4 facilitent le transport du cholestérol du RE à la membrane plasmique, où il sera disponible pour être éliminé par efflux grâce à des accepteurs comme les HDL et ABCA1. Une augmentation de l'expression d'ABCG1 et d'ABCG4 va donc diminuer le contenu en cholestérol cellulaire, et entraîner la translocation de SREBP2 dans le Golgi et son activation ainsi que celle de ses gènes cibles aboutissant à une augmentation de la synthèse de cholestérol (Tarr and Edwards, 2008). Ces résultats ont été retrouvés dans un modèle de souris PDAPP mimant la MA, où une déficience en ABCG1 diminue l'expression de SREBP2 et de l'HMGCoAR, réduisant la synthèse du cholestérol (Burgess *et al.*, 2008). De façon intéressante, ABCG1 et ABCG4 semblent agir ensemble. En effet, une déficience de l'un ou l'autre de ces transporteurs n'aura pas d'impact significatif sur la teneur en cholestérol cérébral et de ses précurseurs tels que le desmostérol et le lathostérol, tandis qu'une déficience des deux provoquera des augmentations de ces différents composés dans le cerveau. Ceci s'explique par le fait que ces deux transporteurs participent à l'efflux du cholestérol mais également du desmostérol via les HDL. Chez ces souris doubles mutantes, on retrouve une diminution de la synthèse du cholestérol qui est due au rôle inhibiteur du desmostérol sur cette dernière. De plus, la déficience de ces deux transporteurs induit une augmentation de l'expression du transporteur ABCA1 et de la sécrétion de l'ApoE qui sont des cibles de LXR. Ceci s'explique par le fait que le desmostérol, qui s'accumule chez ces souris, est un agoniste LXR (Wang *et al.*, 2008a) (Figure 23).

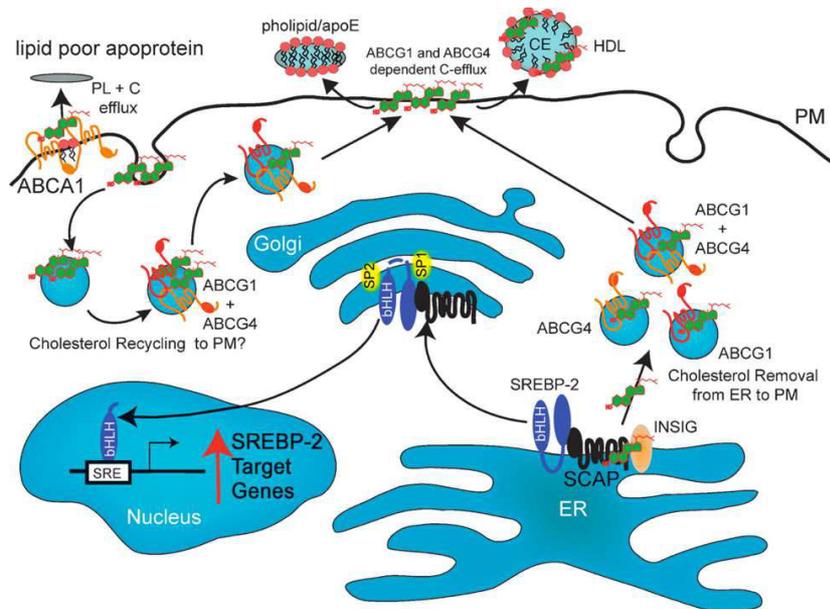


Figure 23 : Implications des transporteurs ABCG1 et ABCG4 dans le métabolisme du cholestérol cérébral (d'après Tarr *et al.* 2008) ABCG1 et ABCG4 régulent le transport vésiculaire du cholestérol intracellulaire vers la membrane où il sera excrété via ABCA1, ce qui entraîne une diminution du cholestérol intracellulaire et une translocation de SREBP dans le Golgi, aboutissant à la transcription de gènes cibles de la synthèse du cholestérol

3. Les récepteurs aux apolipoprotéines E

Plusieurs récepteurs de la famille des LDLR (*Low Density Lipoprotein Receptor*) sont présents dans le SNC tels que le récepteur LDLR, le récepteur LRP1, le récepteur VLDLR (*Very Low Density Lipoprotein Receptor*) ou encore le récepteur ApoER2, exprimés dans les neurones, les astrocytes, la microglie et dans les oligodendrocytes (Brown *et al.*, 1997; D'Arcangelo *et al.*, 1999; Hayashi *et al.*, 2007; Herz, 2001; Posse De Chaves *et al.*, 2000).

a. Le récepteur aux LDL (LDLR)

Le récepteur LDLR est surexprimé suite à une déficience cellulaire en cholestérol et sous exprimé suite à une augmentation de la quantité de cholestérol (Fan *et al.*, 2001). De plus, l'ApoE liée aux lipides a une plus grande affinité pour le récepteur LDLR que l'ApoE non liée aux lipides (Ruiz *et al.*, 2005). L'ApoE liée aux lipides est sécrétée par les astrocytes pour être ensuite captée et internalisée par le récepteur LDLR, délivrant ainsi du cholestérol aux neurones. Cette endocytose est perturbée chez des cellules cérébrales n'exprimant pas le récepteur LDLR. La quantité d'ApoE dans le LCR et le cerveau de

souris LDLR^{-/-} est 50 % plus importante que celle des souris sauvages (Fryer *et al.*, 2005a). Au contraire, chez des souris APP/PS1 mimant la MA surexprimant le LDLR au niveau cérébral, la quantité d'ApoE dans le cerveau est diminuée de 50 à 90 % selon le degré de surexpression du récepteur (Kim *et al.*, 2009). Ces résultats démontrent un rôle important du récepteur LDLR dans les processus d'endocytose de l'ApoE et la régulation de la teneur en ApoE cérébrales. Ces résultats sont confirmés grâce à une étude réalisée sur des souris où l'expression du récepteur LDLR est ou n'est pas supprimée et qui expriment l'ApoE2 ou l'ApoE3 ou l'ApoE4. Les souris LDLR^{-/-}-ApoE3 et LDLR^{-/-}-ApoE4 présentent des quantités d'ApoE fortement augmentées par rapport aux souris ApoE3 et apoE4 exprimant le récepteur LDLR (Fryer *et al.*, 2005a).

Au-delà de son rôle sur le métabolisme de l'ApoE, le récepteur LDLR joue un rôle sur les capacités cognitives puisque son absence entraîne des diminutions des capacités d'apprentissage et de mémorisation à court et long terme associées à une diminution de la densité synaptique dans l'hippocampe (Mulder *et al.*, 2004).

b. Récepteurs aux VLDL (VLDLR) et ApoER2

Les récepteurs VLDLR et ApoER2 sont deux autres membres de la famille des LDLR et sont essentiellement exprimés au niveau neuronal. En plus de leurs rôles de récepteurs aux lipoprotéines, ces récepteurs jouent des rôles clés dans la signalisation de la reeline qui est cruciale pour la migration neuronale durant le développement cérébral, la plasticité synaptique, le développement des épines dendritiques, la LTP et la survie neuronale. Les souris qui perdent l'expression de ces deux récepteurs présentent des fonctions neuronales et synaptiques perturbées (Beffert *et al.*, 2004, 2006; Brandes *et al.*, 2001; Niu *et al.*, 2008; Trommsdorff *et al.*, 1999). L'ApoER2 pourrait avoir un rôle dans la transmission synaptique grâce à son interaction avec PSD95 et le NMDAR1 (Hoe *et al.*, 2006a).

c. LRP1

Le récepteur de la famille des récepteurs aux LDL le plus étudié dans le domaine des neurosciences est le récepteur LRP1. Celui-ci est fortement exprimé dans les neurones et est également présent au niveau des astrocytes et de la microglie dans le cortex,

l'hippocampe et le cervelet. Il est également présent dans les unités neurovasculaires telles que les cellules vasculaires, les cellules endothéliales cérébrales, les péricytes, les cellules musculaires lisses vasculaires, et dans le plexus choroïde de la BHE (Andersen and Willnow, 2006; Herz and Bock, 2002; Marzolo *et al.*, 2000; Moestrup *et al.*, 1992; Rapp *et al.*, 2006; Rebeck *et al.*, 1993).

Le récepteur LRP1 est capable de lier plus de 30 ligands différents, tels que l'ApoE, la protéine APP, le peptide A β et l' α_2 macroglobuline, suggérant que le rôle de LRP1 n'est pas restreint à la fixation et l'endocytose des lipoprotéines mais que ce récepteur est impliqué dans la transduction des signaux. Le récepteur LRP1 est également essentiel pour le développement embryonnaire puisqu'une déficience en ce dernier est létale au stade embryonnaire (Herz *et al.*, 1992). Il possède de nombreux rôles physiologiques, tels que la régulation de la signalisation calcique, de la LTP, du développement neuronal, de la croissance des neurites, et de la survie neuronale (Bacsikai *et al.*, 2000; Fuentealba *et al.*, 2009; Hayashi *et al.*, 2007; Holtzman *et al.*, 1995; Zhuo *et al.*, 2000).

D'autres études effectuées sur des modèles de souris transgéniques ont démontré un rôle important du récepteur LRP1 dans le métabolisme de l'ApoE. En effet, des souris déficientes pour le récepteur LRP1 présentent une augmentation de la quantité d'ApoE dans le cerveau, à cause d'un catabolisme altéré et une demi-vie augmentée de ces dernières. Ces modifications s'accompagnent d'une diminution de la quantité de cholestérol cérébral dans le cerveau. A l'opposé, une surexpression de ce récepteur dans le cerveau provoque une légère diminution de la quantité d'ApoE cérébrale et une perturbation de la clairance des peptides A β (Zerbinatti *et al.*, 2006). Les souris déficientes pour le récepteur LRP1 au niveau neuronal ne présentent pas seulement des perturbations métaboliques mais également des troubles cognitifs et neurodégénératifs. En effet, ces souris acquièrent au cours du vieillissement des altérations importantes de la fonction neuronale. La densité des épines dendritiques ainsi que l'expression de marqueurs présynaptique (synaptophysine) et postsynaptique (PSD95) sont diminuées. Les expressions de la GFAP et d'Iba-1 (*Ionized calcium Binding protein Adaptator molecule 1*) sont augmentées dans l'hippocampe, tout comme différents marqueurs de l'activation de la microglie tels que Il β (Interleukine β), TNF α et IL-6 (Interleukine 6). En plus de ces

processus inflammatoires, des processus apoptotiques et de neurodégénérescence sont présents et mis en évidence respectivement par l'activation des caspases 3 et 6 et une diminution du marquage NeuN (*Neuronal Nuclei*). D'un point de vue comportemental, ces souris déficientes pour le récepteur LRP1 sont hyperactives et ont des déficits de la coordination motrice et des troubles de la mémoire. Ces troubles comportementaux sont mis en relation avec un déficit sévère de la LTP (Liu *et al.*, 2010). Les altérations de la teneur en cholestérol, des marqueurs synaptiques et de la morphologie des dendrites sont retrouvées dans des neurones déficients pour le récepteur LRP1. Les expressions du récepteur NMDAR1 et du récepteur au glutamate 1 (GluR1) sont diminuées chez ces neurones, tout comme chez les souris déficientes pour LRP1 au niveau neuronal. De plus, lorsque du cholestérol est ajouté dans le milieu de culture des neurones déficients pour le récepteur LRP1, l'expression du récepteur NMDAR1 est restaurée (Liu *et al.*, 2010). Par ailleurs, le récepteur LRP1 colocalise avec PSD95 et le récepteur NMDAR1. Un traitement au NMDA va entraîner une dégradation par le protéasome de PSD95 et diminuer l'interaction entre récepteur LRP1 et PSD95, provoquant une diminution de la LTP. Le récepteur LRP1 joue donc un rôle clé dans la transmission synaptique via la régulation de la fonction du NMDAR (May *et al.*, 2004).

III. Métabolisme cérébral du cholestérol et maladie d'Alzheimer

A. Impact des régimes hyperlipidique et enrichi en cholestérol chez l'animal

L'impact de régimes hyperlipidiques et enrichis en cholestérol sur la physiopathologie de la MA a été investigué en utilisant différentes espèces animales dont quelques modèles animaux reproduisant la MA que nous avons décrit dans une partie précédente.

Des rats Sprague Dawley placés pendant 6 mois sous une diète enrichie en cholestérol (5 %) présentent des troubles d'apprentissage dus à des transmissions synaptiques altérées et une activité de l'acétylcholinesterase amplifiée. De plus, les quantités de peptide A β ₄₂ et de protéines tau hyperphosphorylées se trouvent augmentées, tout comme différents marqueurs de l'inflammation (IL-1 α , IL-6, IL-10, TNF α) (Ullrich *et al.*, 2010a). Si on retrouve ces troubles d'apprentissage chez des rats Fisher âgés de 16 mois placés sous un régime enrichi en cholestérol (2 %) pendant 8 semaines, on n'observe pas d'augmentation de la quantité de peptide A β . Si ce régime induit des augmentations des triglycérides et du cholestérol total plasmatiques, ces modifications ne sont pas présentes dans le cerveau. En revanche, la morphologie des dendrites et des cellules gliales de l'hippocampe sont altérées (Granholm *et al.*, 2008). Chez le rat Long Evan, un régime enrichi en acide linoléique et linoléique entraîne une diminution du cholestérol membranaire et une amélioration des capacités d'apprentissage et de mémorisation (Yehuda *et al.*, 1998). Ces résultats suggèrent que la teneur globale en cholestérol cérébral n'est pas le seul facteur à prendre en compte, et que les quantités de cholestérol au niveau micro-environnemental, c'est à dire au niveau membranaire, sont tout aussi importantes, comme nous le verrons ci-dessous (études *in vitro*).

Des régimes similaires ont été appliqués sur des souris sauvages C57Bl6 et Swiss. Chez les souris C57Bl6, un régime enrichi en cholestérol (1 %) entraîne au bout de 3 mois une altération de la BHE due à une diminution de l'expression de l'occludine qui est une protéine impliquée dans la formation des jonctions serrées de la BHE (Takechi *et al.*, 2013a). Cependant, chez des souris Swiss placées sous un régime enrichi en cholestérol

(1,25 %) pendant 8 semaines, aucune altération de la BHE et du métabolisme d'APP n'est observée. En revanche, une augmentation de l'activité de l'acétylcholinestérase est présente dans l'hippocampe et le cortex (Moreira *et al.*, 2014). Par ailleurs, des souris sauvages ou déficientes pour le récepteur aux LDL placées sous un régime à la fois hyperlipidique (21 %) et enrichi en cholestérol (1,25 %) pendant 8 semaines présentent des troubles d'apprentissage et de mémorisation. Une neuroinflammation et une activation gliale sont mises en évidence par l'augmentation de l'expression et de la quantité de différents marqueurs tels que la GFAP, CD45 et les cytokines TNF α , IL1 β , IL6. L'expression de BACE1 se trouve également augmentée tout comme la quantité de peptides A β ₄₀ contrairement à celle des peptides A β ₄₂ (Thirumangalakudi *et al.*, 2008).

Les souris modèles de la MA ont également été utilisées dans ces approches expérimentales. Ainsi, des souris Tg2576 placées sous une diète athérogène provoque une augmentation du cholestérol total traduite par une augmentation des LDL et VLDL et une diminution des HDL. Des lésions d'athérosclérose apparaissent également. Ces souris présentent des troubles d'apprentissage et de la mémorisation plus importants lorsqu'elles sont placées sous ce régime, avec des augmentations des dépôts amyloïdes (Li *et al.*, 2003). Ces mêmes souris placées sous des régimes hyperlipidique et enrichi en cholestérol ont une augmentation de la quantité de cholestérol périphérique et cérébral et des taux de peptide A β dans le cerveau (Levin-Allerhand *et al.*, 2002; Shie *et al.*, 2002). Enfin, des souris Tg2576 placées sous régime standard et traitées avec un agent inhibiteur de la synthèse du cholestérol (BM15.766) par gavage ont une diminution du cholestérol plasmatique qui corrèle fortement avec la diminution de peptides A β ₄₀ et A β ₄₂ dans le cerveau (Refolo *et al.*, 2001). Des souris APP/PS1 placées sous un régime enrichi en cholestérol (5 %) pendant 7 semaines présentent des augmentations de la quantité en cholestérol plasmatique et cérébral, qui corrélient chacune avec l'augmentation des dépôts amyloïdes dans le cerveau, qui est due à une augmentation de la voie amyloïdogénique (diminution des fragments sAPP α et augmentation des fragments β -CTF (Refolo *et al.*, 2000). Ces mêmes souris placées sous un régime enrichi en cholestérol (1 %) pendant 3 mois ne présentent pas d'augmentation des peptides A β ₄₀ et A β ₄₂ dans le cerveau (Oksman *et al.*, 2006)

Plusieurs études ont utilisé le lapin New Zealand comme modèle d'étude. Ces lapins sont placés sous des régimes enrichis en cholestérol (1 % ou 2 %). Ils présentent une hypercholestérolémie mais sans altération de la teneur en cholestérol cérébral (Ghribi *et al.*, 2006a; Sharma *et al.*, 2008). Curieusement, des accumulations de cholestérol membranaire dans les neurones d'hippocampe ont été observées (Ghribi *et al.*, 2006a). Ces animaux présentent des altérations des facultés d'apprentissage et de la mémoire à long terme ainsi qu'une augmentation de la teneur en cholestérol dans l'hippocampe (Schreurs *et al.*, 2012). Ces troubles cognitifs sont mis en relation avec une augmentation de la phosphorylation de la protéine tau et des altérations du métabolisme d'APP. En effet, les quantités des peptides $A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$ et les dépôts amyloïdes sont plus importants (Ghribi *et al.*, 2006a; Prasanthi *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2008; Sparks *et al.*, 1994) Ces perturbations s'expliquent de différentes façons. Tout d'abord, l'expression et l'activité de l'enzyme BACE1 et l'expression de la protéine RAGE, qui sont respectivement responsables de la production et du transport des peptides amyloïdes du plasma vers le cerveau à travers la BHE, sont augmentées (Ghribi *et al.*, 2006a; Prasanthi *et al.*, 2008). De plus, les expressions du récepteur LRP1 et de l'enzyme qui interviennent respectivement dans la clairance et la dégradation des peptides $A\beta$ se trouvent diminuées (Prasanthi *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2008). Par ailleurs, des processus inflammatoires et apoptotiques, des dommages de l'ADN sont présents ainsi que des altérations de la BHE au niveau de la zone corticale uniquement. Cette altération de la BHE n'entraîne pas de changement de la teneur en cholestérol cérébral mais une augmentation de la quantité de cholestérol membranaire neuronal dans l'hippocampe (Ghribi *et al.*, 2006a, 2006b; Sparks *et al.*, 2000; Xue *et al.*, 2007). Les processus inflammatoires observés ne sont pas en relation avec les dépôts amyloïdes (Xue *et al.*, 2007). Une augmentation de l'hyperphosphorylation de tau est observée. Les perturbations de la voie de l'IGF-1 (*Insulin Growth Factor 1*) présentes chez ces animaux se traduisent par une diminution de la quantité d'IGF et de l'expression du récepteur à l'IGF et par une diminution de la phosphorylation d'Akt, indispensable pour activer cette voie. Par ailleurs, les phosphorylations des protéines GSK α (Glycogen synthase kinase α) et IGSK3 β (Isoform Glycogen synthase kinase 3 β) qui stimulent respectivement la production des peptides $A\beta$ et la phosphorylation de tau, se trouvent augmentées (Sharma *et al.*, 2008). Les auteurs ont traité des coupes de cerveau de lapin

avec du 27-OHC et ont observé une diminution de l'IGF1 et de la phosphorylation d'Akt, ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation de GSK α , suggérant que le 27-OHC reproduit en partie les effets induits par une diète riche en cholestérol, et pourrait établir un lien entre le cholestérol et la MA (Sharma *et al.*, 2008). Enfin, ces animaux présentent une augmentation de la taille des ventricules et une diminution du diamètre des vaisseaux sanguins cérébraux, phénomènes observés chez des patients atteints par la MA (Schreurs *et al.*, 2013).

D'autres études *in vivo* ont pour leur part abouti à des résultats allant dans le sens inverse, à savoir un effet bénéfique du cholestérol. C'est le cas d'une étude au cours de laquelle des souris Tg2576 sont placées sous un régime enrichi en cholestérol (2 %) pendant 6 semaines. Ces animaux démontrent des augmentations du cholestérol plasmatique et cérébral et une diminution significative de la quantité des peptides A β ₄₀ et plus modeste des dépôts amyloïdes (George *et al.*, 2004)

Chez des rats Wistar âgés de 1 mois placés sous un régime enrichi en cholestérol (2 %) pendant 2 mois, le cholestérol plasmatique et hippocampique se trouvent augmentés, tout comme leur capacité d'apprentissage et de mémoire à long terme, qui est mise en parallèle avec une amélioration de la transmission synaptique (Dufour *et al.*, 2006). Une autre étude réalisée sur des rats Wistar a démontré que la mise sous régime enrichi en cholestérol (2 %) pendant 2 mois améliore les capacités d'apprentissage et de la mémoire à long terme. Ces bénéfices cognitifs sont accompagnés d'une augmentation de la protéine post-synaptique PSD95 et de la protéine pré-synaptique synaptophysine dans l'hippocampe, et d'une diminution de la protéine CRB1 qui inhibe la libération des neurotransmetteurs (Ya *et al.*, 2013).

Dans une étude originale, des rats Sprague-Dawley ont été traités avec l'agent BM 15.766 (inhibiteur de la synthèse de cholestérol) mis dans l'eau de boisson pendant 4 mois. Cela a mis en évidence une diminution du cholestérol plasmatique et cérébral associée à une altération des capacités d'apprentissage. La mise sous régime enrichi en cholestérol (2 %) au bout de 2 mois et pendant les 2 derniers mois de traitement a empêché la diminution du cholestérol cérébral et a restauré les capacités d'apprentissage (Xu *et al.*, 1998).

Chez des souris porteuses de la mutation humaine *swedish* d'APP placées sous un régime enrichi en cholestérol (5 %) pendant 6 mois, des corrélations négatives ont été mises en évidence entre la teneur en cholestérol et la quantité d'ApoE plasmatiques et cérébrales et la quantité d'A β ₄₀ dans le cerveau. Autrement dit, plus les quantités de cholestérol plasmatique et d'ApoE dans le plasma et le cerveau sont importantes, plus les quantités d'A β ₄₀ sont réduites (Howland *et al.*, 1998).

Face à ces constats, nous pouvons conclure que les résultats obtenus ne sont pas unanimes, et qu'ils diffèrent d'une espèce animale à l'autre, ou d'une souche à une autre. Ceci peut s'expliquer de différentes manières. La première est que la grande variété de modèles et de souches utilisées rend difficile la comparaison des résultats obtenus. En effet, on peut remarquer que les modèles murins de la MA présentent parfois des augmentations de cholestérol cérébral dues à une hypercholestérolémie, alors que la BHE sépare les compartiments central et périphérique. Ces animaux présentent sûrement une altération de l'intégrité de la BHE responsable de ces perturbations. Ensuite, les animaux utilisés entre différentes études ont des âges parfois très différents. Il en est de même des compositions des régimes, qui sont de plus très rarement communiquées, ce qui rend les comparaisons des résultats relativement difficiles, pour ne pas dire biaisées. Les durées des régimes sont également différentes allant de 2 mois à plus de 6 mois. Les études *in vivo* réalisées ces 20 dernières années, bien qu'indispensables, n'ont fait que conforter la confusion née des études sur l'homme et permettent difficilement d'apporter des conclusions (Tableau 1, 2 et 3).

Tableau 1 : Impacts de régimes alimentaires sur la cognition chez le rat

Conditions						Effets					
Espèce	Souche	Sexe	Âge	Régime	Durée	Production du peptide A β	Inflammation	Apprentissage	Transmission synaptique	Intégrité de la BHE	Références
Rats	Sprague Dawley	♂	6 mois	Cholestérol 5%	5 mois	X	X	X	X		Ullrich <i>et al.</i> 2010a
Rats	Fischer	♂	16 mois	Cholestérol 2%	2 mois	∅	X	X			Granholm <i>et al.</i> 2008
Rats	Wistar	♂	1 mois	Cholestérol 2%	2 à 4 mois			✓	✓		Dufour <i>et al.</i> 2006
Rats	Wistar	♂	1 mois	Cholestérol 2%	2 mois			✓	✓		Ya <i>et al.</i> 2013
Rats	Sprague-Dawley	♂		Cholestérol 2%	2 mois			✓			Xu <i>et al.</i> 1998

✓ Effet bénéfique

X : Effet délétère

∅ : Absence d'effet

Tableau 2 : Impacts de régimes alimentaires sur la cognition chez le lapin

Conditions						Effets					
Espèce	Souche	Sexe	Âge	Régime	Durée	Production du peptide A β	Inflammation	Apprentissage	Transmission synaptique	Intégrité de la BHE	Références
Lapin	New Zealand	♂	18 à 24 mois	Cholestérol 2%	3 mois	X				X	Prasanthi <i>et al.</i> 2008
Lapin	New Zealand	♂	3 mois	Cholestérol 2%	2 mois			X			Schreurs <i>et al.</i> 2012
Lapin	New Zealand	♀	3 ans	Cholestérol 2%	3 mois	X					Sharma <i>et al.</i> 2008
Lapin	New Zealand	♀	Adulte	Cholestérol 2%	2 mois	X					Sparks <i>et al.</i> 1994
Lapin	New Zealand		Adulte	Cholestérol 1%	7 mois	X				X	Ghribi <i>et al.</i> 2006b
Lapin	New Zealand			Cholestérol 2%	3 mois	X				X	Sparks <i>et al.</i> 2000
Lapin	New Zealand	♂	Adolescents	Cholestérol 2%	10 semaines	Ø	X				Xue <i>et al.</i> 2007

✓ Effet bénéfique

X : Effet délétère

Ø : Absence d'effet

Tableau 3 : Impacts de régimes alimentaires sur la cognition chez la souris

Conditions						Effets					
Espèce	Souche	Sexe	Âge	Régime	Durée	Production du peptide Aβ	Inflammation	Apprentissage	Transmission synaptique	Intégrité de la BHE	Références
Souris	C57Bl6	♀	6 semaines	Cholestérol 1%	12 mois					X	Takechi <i>et al.</i> 2013a
Souris	Swiss	♂	3 mois	Cholestérol 1,25%	2 mois			X	X	X	Moreira <i>et al.</i> 2014
Souris	C57Bl6		4 mois	Cholestérol 1,25%	2 mois	X	X	X			Thirumangal akudi <i>et al.</i> 2008
Souris	PSAPP	♂	5 semaines	Cholestérol 5%	7 semaines	X					Refolo <i>et al.</i> 2000
Souris	APP/PS1	♂	6 mois	Cholestérol 1%	4 mois	∅		∅			Oksman <i>et al.</i> 2006
Souris	APP ^{Swe}		7 à 12 mois	Cholestérol 5%	8 semaines	✓					Howland <i>et al.</i> 1998
Souris	Tg2576	♀	12 mois	Cholestérol 5%	6 semaines	✓					George <i>et al.</i> 2004

✓ Effet bénéfique

X : Effet délétère

∅ : Absence d'effet

B. Cholestérol et production du peptide A β

1. Cholestérol, radeaux lipidiques et production du peptide A β

Les radeaux lipidiques sont des microdomaines membranaires hétérogènes riches en cholestérol et sphingolipides qui régulent les processus cellulaires (Lingwood and Simons, 2010). Les β et γ -sécrétases sont présentes dans les radeaux lipidiques tandis que l' α -sécrétase se trouve à l'extérieur (Allinson *et al.*, 2003; Hur *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 1998; Vetrivel *et al.*, 2004, 2005). De plus, APP est présent dans deux régions distinctes, à savoir dans les radeaux lipidiques et en dehors de ces derniers (Ehehalt *et al.*, 2003). C'est pour cette raison que la production des peptides A β a lieu majoritairement dans les radeaux lipidiques (Figure 24) (Lee *et al.*, 1998). Face à ce constat, il n'est donc pas surprenant que des modifications de la composition lipidique, notamment un enrichissement en cholestérol, puissent avoir un impact sur la localisation et le métabolisme d'APP et favoriser la voie amyloïdogénique (von Arnim *et al.*, 2008). En effet, différentes études *in vitro* ont démontré que la teneur en cholestérol module la production du peptide A β . Ainsi, une augmentation de cholestérol provoque une augmentation de l'activité des β et γ -sécrétases et une diminution de l'activité de l' α -sécrétase, favorisant la voie amyloïdogénique et donc la production du peptide A β , alors qu'une déplétion en cholestérol aura l'effet inverse (Bodovitz and Klein, 1996; Ehehalt *et al.*, 2003; Frears *et al.*, 1999; Galbete *et al.*, 2000; Grimm *et al.*, 2008; Kojro *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2009b; Malnar *et al.*, 2010, 2012; Osenkowski *et al.*, 2008; Racchi *et al.*, 1997; Simons *et al.*, 1998; Wahrle *et al.*, 2002; Xiong *et al.*, 2008).

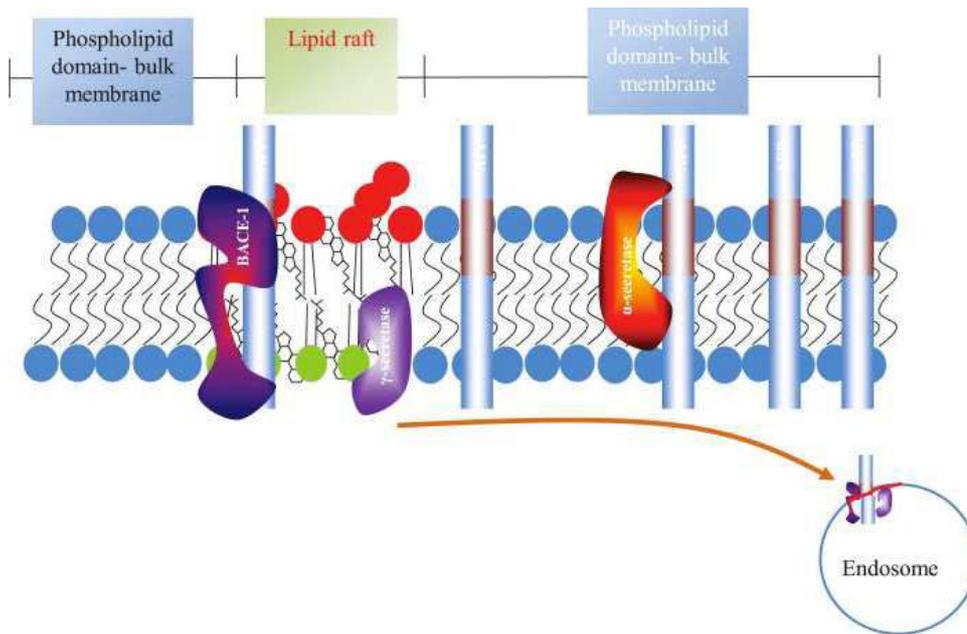


Figure 24 : Structure des radeaux lipidiques (d'après Hicks *et al.* 2012)

D'un point de vue mécanistique, les radeaux lipidiques peuvent moduler le clivage d'APP en modifiant notamment la localisation d'APP et celle des sécrétases. Le domaine C-terminal d'APP est capable de se fixer à la flotilin-1 et la flotilin-2 qui sont deux protéines marqueurs des radeaux lipidiques (Chen *et al.*, 2006; Parkin *et al.*, 1999; Schneider *et al.*, 2008). Le cholestérol permet aussi l'insertion d'APP dans les membranes des radeaux lipidiques via son fragment C99 qui contient un domaine de fixation au cholestérol. Une augmentation de ce dernier va augmenter la colocalisation d'APP, de BACE1 et des complexes de la γ -sécrétase dans les radeaux lipidiques et va favoriser la voie amyloïdogénique (Barrett *et al.*, 2012; Beel *et al.*, 2010; Kosicek *et al.*, 2010; Marquer *et al.*, 2011). Une déplétion en cholestérol aura un effet inverse, à savoir une diminution de l'interaction entre APP, BACE1, et les radeaux lipidiques, aboutissant à une diminution de la production du peptide A β (Ehehalt *et al.*, 2003; Guardia-Laguarta *et al.*, 2009; Hattori *et al.*, 2006; Riddell *et al.*, 2001). Ces résultats démontrent que les teneurs en cholestérol au niveau des microdomaines membranaires méritent une attention particulière, en plus des teneurs globales en cholestérol cérébral.

2. Transports du cholestérol et production du peptide A β

Des perturbations des mouvements du cholestérol à travers la cellule peuvent avoir des conséquences sur le métabolisme d'APP. En effet, une mutation de la protéine NPC1 provoque une accumulation de fragments CTF β , ainsi que des peptides A β_{40} et A β_{42} . Ces perturbations sont accompagnées d'accumulations de préséniline (membre de la γ -sécrétase) dans les endosomes (Burns *et al.*, 2003). Des accumulations similaires sont trouvées dans les endosomes de cerveaux de patients atteints par la maladie de Niemann-Pick (Jin *et al.*, 2004). Dans des cellules CHO (*Chinese Hamster Ovary*) déficientes pour la protéine NPC1 ou dans des cellules neuronales traitées avec l'agent U18666A qui bloque le transport du cholestérol des lysosomes au RE, une accumulation de peptides A β et de préséniline est présente, confirmant l'importance du transport du cholestérol intracellulaire sur le métabolisme amyloïde (Runz *et al.*, 2002).

Le transporteur ABCG1 a également un rôle sur la production du peptide A β , puisqu'une surexpression d'ABCG1 va diminuer la production et la sécrétion du peptide A β . Les mécanismes responsables ne sont pas encore compris, mais plusieurs expériences démontrent qu'ABCG1 ne participe pas à sa clairance, mais aurait des effets sur l'efflux du cholestérol, aboutissant à des changements de distribution du cholestérol impactant l'activité des sécrétases (Kim *et al.*, 2007). Ces résultats sont encore controversés depuis qu'il a été démontré qu'ABCG1 augmente la présentation d'APP à la membrane, ce qui favorise l'action des deux voies amyloïdogéniques et non amyloïdogéniques, et augmente ainsi à la fois la production de fragments sAPP α et du peptide A β (Tansley *et al.*, 2007).

a. Récepteurs à l'ApoE et production du peptide A β

Le rôle du récepteur LDLR sur le métabolisme du peptide A β n'est pas bien connu et controversé. L'extinction de l'expression du récepteur LDLR dans un modèle de souris PDAPP mimant la MA ne perturbe ni les quantités des peptides A β_{40} et A β_{42} solubles et insolubles ni les dépôts amyloïdes malgré l'augmentation de la quantité de l'ApoE dans le cortex et le LCR. En revanche, son extinction dans le modèle de souris Tg2576 provoque des troubles importants. En effet, ces souris Tg2576 déficientes pour le récepteur LDLR présentent une augmentation âge dépendante des dépôts amyloïdes accompagnée

d'hyperactivité ainsi que des déficits des capacités d'apprentissage et de mémorisation (Cao *et al.*, 2006). Une autre étude réalisée sur un modèle de souris APP/PS1 surexprimant le récepteur LDLR confirme ces résultats avec une augmentation de la clairance du peptide A β et une diminution des dépôts amyloïdes (Kim *et al.*, 2009).

Des souris déficientes pour le récepteur ApoER2 présentent des augmentations de l'expression d'APP et des peptides amyloïdes A β ₄₀ et A β ₄₂ dans le cortex frontal et l'hippocampe (Petit-Turcotte *et al.*, 2005). Il a également été démontré que la protéine chaperonne Fe65 qui interagit avec APP se fixe sur les récepteurs VLDLR et ApoER2, ce qui a pour conséquence d'augmenter la quantité d'APP à la membrane, de favoriser la production de sAPP α et de diminuer la production des peptides A β ₄₀ et A β ₄₂ (Dumanis *et al.*, 2012; Hoe *et al.*, 2005, 2006b). En outre, le récepteur ApoER2 favorise l'insertion d'APP dans les radeaux lipidiques, augmentant la production du peptide A β (Fuentesalba *et al.*, 2007)

Différentes découvertes ont poussé à s'interroger sur le lien existant entre APP et LRP1. En effet, la délétion d'APP ou de certains membres du complexe de la γ -sécrétase sur des modèles *in vitro* et *in vivo* induit une surexpression de LRP1. Chez des cellules déficientes pour APP (chez lesquelles le récepteur LRP1 est surexprimé), qui surexpriment des produits de clivage des fragments AICD issus du clivage d'APP par la γ -sécrétase, LRP1 retrouve son taux basal d'expression. De plus, la surexpression de fragments AICD dans des cellules a pour effet de supprimer l'expression de LRP1 grâce à la fixation de ces fragments AICD sur le promoteur de LRP1, ce qui a pour conséquence d'inhiber sa transcription et de diminuer son expression (Liu *et al.*, 2007). Dans les cellules déficientes pour APP (chez lesquelles le LRP1 est surexprimé), la quantité d'ApoE se trouve réduite. La restauration de l'expression basale de LRP1 dans des cellules qui surexpriment les fragments AICD permet également de restaurer la quantité d'ApoE. Ces résultats démontrent donc que le LRP1 établit un lien entre APP et l'ApoE et que l'ApoE et LRP1 sont des gènes cibles des fragments intracellulaires d'APP (Liu *et al.*, 2007). En plus de son rôle sur la clairance du peptide A β , le récepteur LRP1 joue un rôle important dans le métabolisme du peptide A β . Il interagit avec APP et peut réguler son métabolisme protéolytique ainsi que la production du peptide A β en favorisant la voie amyloïdogène

(Kinoshita *et al.*, 2001; Knauer *et al.*, 1996; Pietrzik, 2002; Pietrzik *et al.*, 2004; Rebeck *et al.*, 2001; Ulery *et al.*, 2000; Waldron *et al.*, 2008). De plus, des souris PDAPP mimant la MA et surexprimant le récepteur LRP1 présentent des troubles d'apprentissage et de la mémoire corrélés avec des augmentations de la quantité du peptide A β soluble (Zerbinatti *et al.*, 2004). Enfin, le récepteur LRP1 favorise la présence d'APP dans les radeaux lipidiques et l'interaction entre APP et BACE1 par des mécanismes encore inconnus (Yoon *et al.*, 2007).

b. Agents réduisant la synthèse de cholestérol total ou estérifié et la production du peptide A β : les statines et les inhibiteurs de l'ACAT

Les statines sont des composés initialement utilisés dans les maladies cardiovasculaires. Elles permettent de diminuer la synthèse de cholestérol, les teneurs en cholestérol plasmatique et plus précisément en LDL en inhibant l'HmgCoAR qui est l'enzyme limitante de cette étape (Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration *et al.*, 2010). Les statines possèdent également des propriétés anti-inflammatoires, en plus de capacités modulatrices de la production de cytokines et d'oxyde nitrique (NO) (Bellosta *et al.*, 2000). Leurs effets pléiotropiques ont suscité un certain intérêt qui a abouti à leur utilisation dans les pathologies neurologiques telles que la MA. Une des principales difficultés rencontrées dans le traitement des maladies neurodégénératives est la présence de la BHE qui empêche le passage de composés. Il existe plusieurs classes de statines qui diffèrent par leur lipophilicité qui va déterminer leur faculté à traverser la BHE et les mécanismes pour y parvenir (diffusion passive ou transport actif) (Tsuji *et al.*, 1993).

L'effet des statines a été évalué chez des modèles transgéniques mimant la MA tels que les souris Tg2576. Chez ces souris, la simvastatine améliore les performances d'apprentissage et de mémorisation sans affecter la production du peptide A β et les dépôts amyloïdes. Elles améliorent la plasticité synaptique et la fonction vasculaire cérébrale et diminuent les processus inflammatoires. Cependant, dans un modèle de souris APP/TGF-1, souris surexprimant la forme suédoise d'APP mutée ainsi que le *transforming growth factor* (TGF- β 1), la simvastatine n'a aucun effet sur les troubles cognitifs et les processus inflammatoires, même si elle diminue la production des

peptides A β ₄₀ et A β ₄₂ ainsi que les dépôts amyloïdes (Kurata *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2006; Papadopoulos *et al.*, 2014) La simvastatine a également démontré une faculté à réduire les altérations de la BHE induites par des hypercholestérolémies et à améliorer la résistance transendothéliale des cellules endothéliales des microvaisseaux (Jiang *et al.*, 2012). Les statines ont d'autres effets contre la dégénérescence neuronale indépendamment d'une réduction de production du peptide A β . En effet, dans différents modèles de démence vasculaire, de trauma cérébral ou de neurodégénération induits chez le rat et la souris, les statines telles que la simvastatine et l'atorvastatine démontrent des capacités d'amélioration des troubles d'apprentissage et de mémoire par différents mécanismes. Elles diminuent le stress oxydatif, les réponses inflammatoires, mais préviennent également la diminution de l'activité de l'acétylcholinestérase et de la synthèse de glutamine. Elles améliorent les fonctions endothéliales, la captation de glutamate, et favorisent la neurogénèse, la différenciation neuronale, et l'angiogénèse (Cibickova *et al.*, 2009; Koladiya *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2007; Tramontina *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013). De façon intéressante, la simvastatine n'a aucun impact sur les troubles d'apprentissage et de mémoire observés chez des rats ayant reçu une ablation du bulbe olfactif, même si elle améliore ces capacités chez les rats non lésés (Douma *et al.*, 2011).

Chez l'homme, il existe différents types d'études, à savoir les études épidémiologiques ou observationnelles et les études cliniques. Selon la démarche et les protocoles utilisés, les résultats obtenus diffèrent de façon relativement importante. Ainsi, les études épidémiologiques démontrent majoritairement un effet bénéfique des statines sur le déclin cognitif lié au vieillissement et une diminution des risques d'apparition de la MA (Bernick *et al.*, 2005; Haag *et al.*, 2009; Parale *et al.*, 2006; Sparks *et al.*, 2008; Yaffe *et al.*, 2002), même si certaines ne montrent aucun effet bénéfique des statines sur la cognition et le risque d'apparition de la MA (Arvanitakis *et al.*, 2008; Serrano-Pozo *et al.*, 2010; Zandi *et al.*, 2005). Certaines études ont même conclu à un effet délétère des statines sur les capacités cognitives (Evans and Golomb, 2009; Muldoon *et al.*, 2000). La grande majorité des essais cliniques randomisés en double aveugle concluent à une absence de bénéfice des statines (Feldman *et al.*, 2010; Sano *et al.*, 2011; Trompet *et al.*, 2010), bien qu'une seule étude a démontré à ce jour un effet bénéfique des statines dans un essai clinique de ce type (Sparks *et al.*, 2006). Ces résultats contradictoires

peuvent s'expliquer par le fait que les études cliniques sont réalisées sur des patients ayant déjà des troubles cognitifs et une pathologie déclarée et que les traitements sont utilisés sur des périodes relativement courtes de l'ordre de quelques semaines. Les études épidémiologiques, quant à elles, étudient des cohortes plus hétérogènes avec des personnes saines ou malades, présentant ou non des hypercholestérolémies, avec des suivis relativement longs allant parfois de l'âge moyen à l'âge âgé. Les résultats obtenus suggèrent que les statines sont incapables de réparer les troubles cognitifs présents dans ces pathologies et de les ralentir une fois que la maladie est déclarée. L'effet des statines chez l'homme est donc encore très controversé, et les potentiels bénéfiques n'ont jamais pu être mis en lien direct avec leurs effets sur le métabolisme du cholestérol cérébral. Ceci peut s'expliquer par le fait que les statines agissent particulièrement sur les LDL, en augmentant l'expression du LDLR et donc l'épuration des LDL, et ont un faible effet sur les HDL qui sont les lipoprotéines se rapprochant le plus de celles trouvées dans le cerveau.

L'utilisation d'inhibiteurs de l'ACAT a mis en évidence, encore plus que celle de statines, la relation entre la régulation des taux de cholestérol intracérébral et la production du peptide A β . Une étude pionnière a démontré en 2001 l'importance de l'ACAT dans le métabolisme du cholestérol cérébral, le développement et la progression de la MA. Grâce aux différents modèles cellulaires présentant des altérations du métabolisme du cholestérol (surproduction ou absence de cholestérol et d'esters de cholestérol), Puglielli a démontré qu'une déficience de l'ACAT entraîne une diminution de l'ordre de 90 % de la production du peptide A β ₄₂ et que cette production retourne à la normale lorsque ces mêmes cellules expriment à nouveau l'ACAT. Il a également mis en évidence que la quantité d'esters de cholestérol et non celle de cholestérol libre est impliquée dans la production du peptide A β ₄₂ (Puglielli *et al.*, 2001). Suite à cette étude, de rares travaux ont été amorcés afin d'évaluer l'effet d'une inhibition ou d'une déficience de l'ACAT chez des modèles animaux transgéniques mimant la MA. Deux études ont été publiées par une même équipe, dans lesquelles des souris porteuses de deux mutations d'APP ont été utilisées. Grâce à un système de billes de polymères encapsulant les inhibiteurs de l'activité ACAT, CP113-818 ou CI-1011 placées sous la peau au niveau antérolatéral de l'épaule des animaux, les auteurs ont démontré de très

nombreux effets bénéfiques de ces inhibiteurs tels que des diminutions de la cholestérolémie et des quantités de peptides $A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$ plasmatiques. Une diminution de 70 % des esters de cholestérol dans le cerveau entier est apparue, prouvant l'efficacité de ces inhibiteurs au niveau cérébral. D'un point de vue comportemental, le traitement a permis une amélioration des déficits d'apprentissage et de mémoire. Ces bénéfices sont en relation avec une diminution de l'ordre de 88% des dépôts de plaques amyloïdes dans le cerveau, accompagnée par une diminution de la production des peptides $A\beta_{40}$ et d' $A\beta_{42}$ issue d'une inhibition du métabolisme d'APP et de la voie amyloïdogène. Par ailleurs, une corrélation positive a été mise en évidence entre les dépôts des plaques amyloïdes et la réponse gliale, suggérant un effet bénéfique de cette réponse sur la clairance des plaques amyloïdes (Hutter-Paier *et al.*, 2004; Huttunen *et al.*, 2010). L'inhibiteur CI-1011 a également été étudié sur un modèle de cellules CHO exprimant la protéine APP751. Ces cellules traitées par cet inhibiteur présentent une diminution des esters de cholestérol, accompagnée d'une diminution de la production des fragments C terminaux d'APP, et de la sécrétion du peptide $A\beta$ soluble. Ces résultats suggèrent une action anti-amyloïdogénique de l'inhibiteur de l'ACAT CI-1011 (Huttunen *et al.*, 2010).

Une autre équipe a évalué l'impact d'une délétion de l'ACAT chez un modèle de souris 3XTg mimant la MA. Les résultats obtenus sont similaires à ceux des deux études précédentes, avec une amélioration des déficits cognitifs mise en relation avec une diminution importante de la quantité du peptide $A\beta_{42}$ et des dépôts de plaques amyloïdes dans le cerveau. Ces diminutions sont également dues à une inhibition du métabolisme et du clivage d'APP. Les auteurs ont démontré que la déficience de l'ACAT entraîne des perturbations importantes du métabolisme du cholestérol cérébral. Ces dernières se traduisent par une diminution du cholestérol cérébral et de ses esters, accompagnée d'une augmentation de 32 % du 24S-hydroxycholestérol. Une diminution de 28% de la synthèse de stérol due à une baisse de 65 % de l'expression de l'HmgCoAR, qui est l'enzyme limitante de la synthèse de cholestérol, est également présente. Ces résultats ont été corrélés *in vitro* grâce à des neurones d'hippocampes de souris ACAT^{-/-} ou 3XTg (Bryleva *et al.*, 2010). D'après ces résultats, il est envisageable que la déficience de l'ACAT augmente la teneur en cholestérol au niveau du réticulum endoplasmique et la quantité de substrat pour le cyp46A1 aboutissant à une surproduction du 24S-OHC. Cette

augmentation de la production de 24S-OHC entraîne une diminution de l'expression de l'HmgCoAR et d'APP, réduisant respectivement la synthèse de cholestérol et du peptide A β (Bryleva *et al.*, 2010)

Ces différents résultats mettent en évidence les potentialités des inhibiteurs de l'ACAT comme d'éventuels agents thérapeutiques de la MA. Des études sur leurs effets secondaires, périphériques et centraux sont cependant nécessaires avant d'éventuels essais thérapeutiques.

c. Oxystérols et production du peptide A β

Le 24S-OHC est un inhibiteur de la voie amyloïdogénique et diminue la formation et la sécrétion des peptides A β_{40} et A β_{42} ainsi que la formation de plaques amyloïdes. Le 24S-OHC stimule l'activité de l' α -sécrétase, diminue celles des β et γ -sécrétases et bloque le transport d'APP du RE à l'appareil de Golgi, empêchant l'accès des sécrétases à APP (Brown *et al.*, 2004; Hudry *et al.*, 2010; Urano *et al.*, 2013). Cependant, la déficience en 24S-hydroxylase chez un modèle de souris mimant la MA n'a aucun impact sur la production du peptide A β (Halford and Russell, 2009). Le 24S-OHC permet également de diminuer l'influx du peptide A β de la circulation vers le cerveau via une surexpression du transporteur ABCB1 au niveau de la barrière hémato encéphalique (Saint-Pol *et al.*, 2013). Le 27-OHC supprime les effets bénéfiques induits par le 24S-OHC et favorise la voie amyloïdogénique (Hudry *et al.*, 2010). Ces deux oxystérols ne semblent donc pas réguler de façon identique le métabolisme d'APP (Famer *et al.*, 2007). De ce fait, une hypercholestérolémie qui aboutit à une augmentation de la production de 27-OHC peut avoir un effet antagoniste de ceux induits par le 24S-OHC, ce qui fait du 27OHC un éventuel lien entre l'hypercholestérolémie et la MA. D'autres études semblent conforter cette hypothèse. En effet, une hypercholestérolémie induite par un régime hyperlipidique chez un modèle murin provoque une diminution de la protéine ARC (*Activity-regulated-cytoskeleton-associated protein*) qui est importante pour la formation et la consolidation de la mémoire et qui se trouve diminuée chez les patients décédés de la MA. De même, le NMDAR se trouve diminué chez ces animaux. De façon intéressante, l'ajout de faibles concentrations de 27-OHC sur des cultures de neurones d'hippocampe reproduit les effets induits par un régime hyperlipidique sur la protéine Arc et le NMDAR (Mateos *et*

al., 2009). De plus, le 27-OHC reproduit également les effets hypertenseurs induits par une hypercholestérolémie (Mateos *et al.*, 2011).

C. Cholestérol et toxicité du peptide

La toxicité du peptide A β retrouvée dans la MA est due à un excès de leur production et un déficit de leur clairance, mais aussi à une augmentation de la sensibilité vis à vis de leur toxicité qui est dépendante de la capacité de fixation de ces peptides à la membrane (Figure 25) (Simakova and Arispe, 2007). Les peptides A β monomériques ne sont pas toxiques. Le cholestérol va moduler et augmenter cette sensibilité en favorisant l'insertion et l'agrégation des peptides amyloïdes dans les membranes neuronales (Qiu *et al.*, 2009; Sathishkumar *et al.*, 2007; Schneider *et al.*, 2006; Wakabayashi and Matsuzaki, 2007; Yanagisawa and Matsuzaki, 2002) (Figure 25), notamment en donnant aux glycosphingolipides une structure conformationnelle propice à la liaison du peptide A β sur ces derniers (Yahi *et al.*, 2010). De plus, des corrélations positives ont été trouvées entre les taux de cholestérol membranaire et la fixation du peptide A β et sa toxicité (Subasinghe *et al.*, 2003).

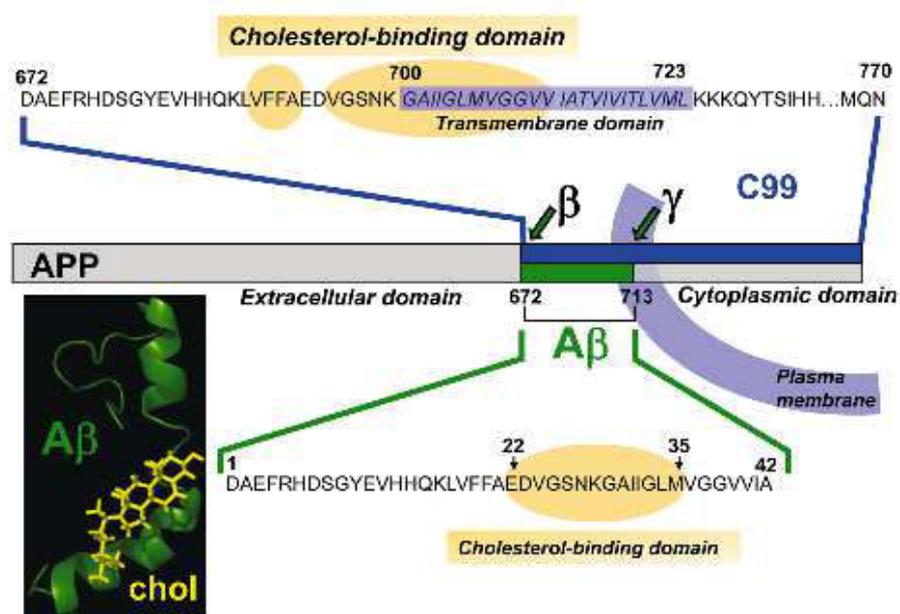


Figure 25 : Localisation des domaines d'interaction au cholestérol de l'APP et du peptide A β (d'après Di Scala *et al.* 2014)

Un agent nommé « Probucol » a récemment fait sa réapparition et démontre des effets prometteurs *in vivo* chez des souris C57/Bl6 et Swiss. En effet, ce composé diminue, tout comme les statines, les quantités de cholestérol plasmatique. De plus, le Probucol réduit les pertes synaptiques induites par des injections du peptide A β ₄₂ permettant d'améliorer les troubles cognitifs associés. Il prévient l'augmentation de l'activité de l'acétylcholinestérase ainsi que la peroxydation des lipides et maintient la fonction endothéliale. Le Probucol semble prévenir les altérations de la BHE et les processus inflammatoires (Santos *et al.*, 2012; Takechi *et al.*, 2013b).

La majorité des études se focalise sur les liens potentiellement existants entre le cholestérol, la production et la clairance du peptide A β mais peu de travaux s'intéressent aux liens existants entre le cholestérol, la toxicité du peptide A β et la sensibilité vis à vis de ce dernier. **Au cours de nos travaux, nous avons choisi d'étudier ce lien afin d'obtenir des informations complémentaires sur les altérations du métabolisme lipidique et la sensibilité au peptide A β .**

D. Cholestérol et clairance du peptide A β

1. ApoE et clairance du peptide A β

L'ApoE est considérée comme un facteur de risque de la MA via son rôle sur le métabolisme du peptide A β . La quantité d'ApoE ainsi que le polymorphisme vont impacter le métabolisme amyloïde (Figure 26). L'ApoE est une protéine chaperonne qui peut moduler la clairance et les dépôts des peptides A β . Les résidus 12-28 du peptide A β ont été identifiés comme des sites d'interaction avec l'ApoE. Sur l'ApoE, le site d'interaction avec le peptide A β se trouve sur le domaine C-terminal qui coïncide avec le site de liaison aux lipides. Initialement, il a été démontré que l'ApoE non liée aux lipides forme des complexes stables avec le peptide A β , et que l'ApoE4 fixe plus rapidement le peptide A β que l'ApoE3. En effet, les préparations d'ApoE4 non liées aux lipides nécessitent que quelques minutes pour se lier au peptide A β , tandis que plusieurs heures sont nécessaires pour l'ApoE3 non liée aux lipides (Sanan *et al.*, 1994; Strittmatter *et al.*, 1993a, 1993b). Cependant, d'autres études ont rapporté que l'ApoE2 et l'ApoE3 liées aux lipides forment plus de complexes avec le peptide A β que l'ApoE4 liée aux lipides (Aleshkov *et al.*, 1997; LaDu *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1997). Le degré d'efficacité de fixation

de l'ApoE liée aux lipides au peptide A β suit l'ordre suivant : ApoE2>ApoE3>ApoE4. De plus, lorsque l'ApoE est faiblement liée aux lipides, il y a une forte diminution des capacités d'interaction, et une disparition des différences dues à l'isoforme d'ApoE (Tokuda *et al.*, 2000). Il semble donc que le degré de liaison aux lipides de l'ApoE soit un paramètre crucial dans la régulation du métabolisme amyloïde. Ces résultats démontrent que les différences de structure entre l'ApoE murine et humaine, ainsi que les différentes isoformes de l'ApoE humaine ont un impact important sur les accumulations du peptide A β .

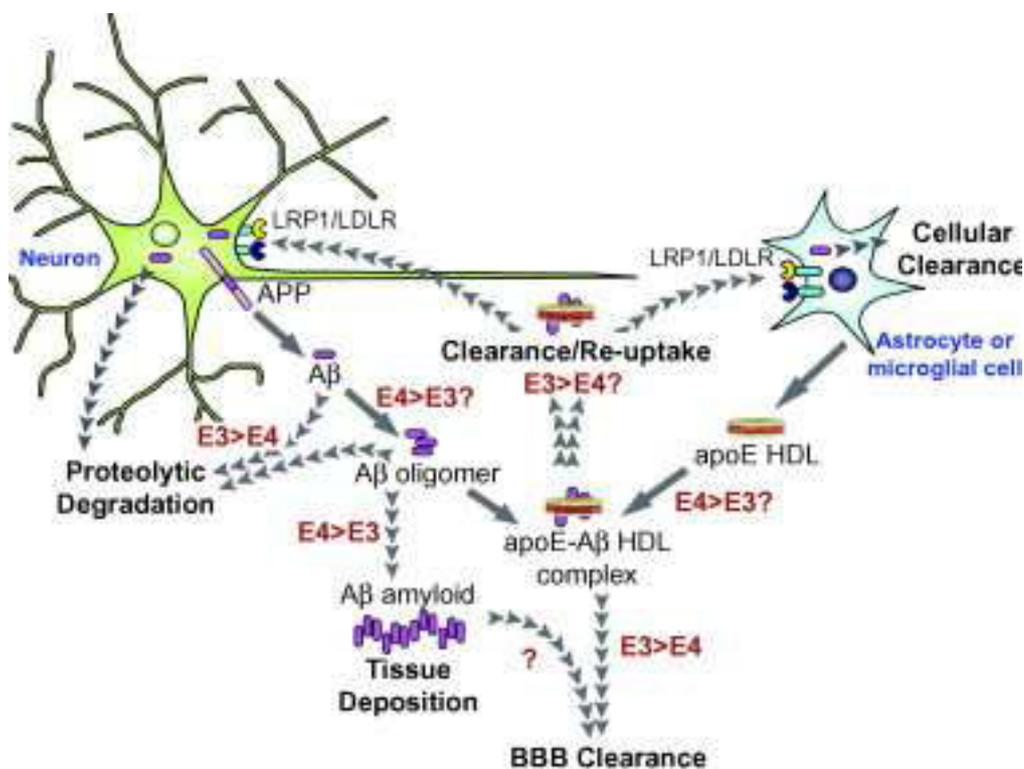


Figure 26 : Implications des apoE3 et apoE4 dans le métabolisme du peptide amyloïde (d'après Hauser *et al.* 2011)

Différents travaux ont étudié l'impact des différentes isoformes de l'ApoE sur l'agrégation du peptide A β . La perte totale de l'ApoE dans différents modèles de souris mimant la MA diminue significativement les dépôts amyloïdes mais sans affecter la production du peptide A β , ce qui suggère que l'ApoE peut avoir un rôle sur la conversion de la forme soluble du peptide A β en forme fibrillaire (Bales *et al.*, 1997, 1999; Costa *et al.*, 2004; Holtzman *et al.*, 1999, 2000a; Irizarry *et al.*, 2000). D'autre part l'expression des gènes

humains d'ApoE2 ou E3 ou E4 chez les souris modèles de MA n'exprimant plus l'ApoE murine aboutit à une modulation de l'importance des dépôts amyloïdes selon l'isoforme de l'ApoE exprimée, avec une graduation ApoE4>ApoE3>ApoE2. L'expression de l'ApoE humaine retarde les dépôts amyloïdes par rapport aux souris exprimant la forme murine d'ApoE (Bales *et al.*, 2009; Buttini *et al.*, 1999, 2002; Carter *et al.*, 2001; Dodart *et al.*, 2005; Fagan *et al.*, 2002; Fryer *et al.*, 2005b; Holtzman *et al.*, 1999, 2000b; Reiman *et al.*, 2009). Il a ainsi été démontré que les trois isoformes favorisent l'agrégation des peptides A β ₄₂ et A β ₄₀, avec une plus grande capacité d'agrégation pour l'ApoE4 (Castano *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1994; Wisniewski *et al.*, 1994). Ceci est cohérent avec le fait qu'il y a plus d'agrégats et de plaques amyloïdes chez les patients Alzheimer porteur du gène apoE4. Cependant d'autres études ont paradoxalement démontré que les 3 isoformes d'ApoE inhibent l'agrégation du peptide A β , avec une capacité d'inhibition inférieure pour l'ApoE4 (Beffert and Poirier, 1998; Evans *et al.*, 1995; Webster and Rogers, 1996; Wood *et al.*, 1996). Ces divergences sont probablement dues aux protocoles de préparation de l'ApoE et du peptide A β . En effet, le fait que l'ApoE soit liée ou non aux lipides change de façon importante sa structure conformationnelle, ce qui peut donc affecter sa capacité de liaison au peptide A β . Sachant que beaucoup d'études ont utilisé l'ApoE libre, les résultats obtenus sont donc à prendre avec beaucoup de précaution. Il est préférable d'utiliser des apolipoprotéines E qui conservent la structure de l'ApoE trouvée dans le cerveau, c'est à dire liée aux lipides, pour comprendre son rôle dans le métabolisme du peptide A β . Cette remarque est aussi valable pour les protocoles de préparation du peptide A β et des différentes formes existantes (monomère, oligomère...) qui diffèrent beaucoup d'une étude à l'autre.

Différentes études *in vitro* démontrent que l'ApoE facilite la fixation et l'internalisation des oligomères solubles du peptide A β (Beffert and Poirier, 1998; Cole and Ard, 2000; Nielsen *et al.*, 2009; Yamauchi *et al.*, 2000, 2002; Yang *et al.*, 1999) ainsi que la dégradation protéolytique de ce peptide. Le degré de liaison de l'ApoE aux lipides est un facteur qui va impacter ses facultés à stimuler la dégradation intracellulaire et extracellulaire du peptide A β par la néprilysine et l'IDE respectivement (Jiang *et al.*, 2008b). La microglie est capable de capter les oligomères solubles du peptide A β , et ce mécanisme est facilité si le peptide A β est ajouté à l'ApoE. L'ApoE2 permet une

dégradation maximale du peptide A β tandis que l'ApoE4 est beaucoup moins efficace (Jiang *et al.*, 2008c; Koistinaho *et al.*, 2004). L'autre moyen par lequel le peptide A β peut être éliminé est son transport à travers la BHE. Lorsque l'ApoE est liée au peptide A β , la clairance du peptide A β à travers la BHE est fortement diminuée par rapport à celle du peptide A β libre. De plus le peptide A β est éliminé de façon beaucoup plus rapide quand il est lié à l'ApoE2 ou l'ApoE3 plutôt qu'à l'ApoE4 (Bell *et al.*, 2007; Castellano *et al.*, 2011; Deane *et al.*, 2008; Ito *et al.*, 2007). L'implication de l'ApoE4 dans la pathologie d'Alzheimer est encore imparfaitement déterminée même si différentes hypothèses existent.

2. Le rôle fondamental de LRP1 dans la clairance du peptide A β

Le récepteur LRP1, dont l'ApoE est un des nombreux ligands avec la clustérine, intervient à trois niveaux différents dans la clairance du peptide A β

i) Au niveau de la BHE

Le récepteur LRP1 est présent au niveau d'unités neurovasculaires telles que le plexus choroïde et régule le transport du peptide A β à travers la BHE (Herz and Bock, 2002; Zlokovic *et al.*, 2010). A ce niveau, le récepteur LRP1 peut lier directement le peptide A β et l'exporter à travers la BHE vers le compartiment périphérique. En effet, la clairance des peptides A β_{40} et A β_{42} radiomarqués se trouve diminuée en présence d'un antagoniste du récepteur LRP1 (Bell *et al.*, 2007; Deane *et al.*, 2004; Shibata *et al.*, 2000). De plus, la déficience du récepteur LRP1 au niveau de la BHE entraîne une augmentation de la quantité du peptide A β dans le cerveau, ainsi que des troubles d'apprentissage et de mémorisation à court et long terme (Jaeger *et al.*, 2009). Le récepteur LRP1 permet également l'efflux du peptide A β via l'ApoE et l' α_2 -macroglobuline par la captation de complexes ApoE2/A β et ApoE3/A β et α_2 -macroglobuline/A β (Deane *et al.*, 2008; Shibata *et al.*, 2000). Enfin, il a récemment été rapporté que la fluvastatine (membre de la famille des statines) augmente l'expression du récepteur LRP1 dans les microvaisseaux cérébraux, ce qui aboutit à une augmentation de la clairance des peptides A β (Shinohara *et al.*, 2010). En plus de la clairance du peptide A β à travers la BHE, il existe également un processus de clairance du peptide A β du LCR vers la circulation sanguine qui se déroule au niveau du plexus choroïde. Sachant que le récepteur LRP1 est exprimé dans cette

structure, il a été supposé que le récepteur LRP1 pourrait également avoir un rôle dans la clairance du peptide A β du LCR vers la circulation sanguine. Le plexus choroïde est connu pour accumuler le plomb circulant dans l'organisme. Des injections intra-péritonéales de plomb concomitantes à des icv du peptide A β chez le rat ont provoqué une accumulation du peptide A β dans le plexus choroïde associée à une diminution de l'expression du récepteur LRP1 dans cette structure. Ces résultats suggèrent une implication du récepteur LRP1 dans la clairance du peptide A β du LCR (Behl *et al.*, 2009). Dans un modèle d'hydrocéphalie chronique chez le rat, l'expression de LRP1 se trouve diminuée dans les microvaisseaux cérébraux, et des dépôts de peptides A β sont présents (Klinge *et al.*, 2006). De plus, une diminution de l'expression du récepteur LRP1 dans les micros vaisseaux cérébraux est observée chez les patients atteints par la MA et associée à des accumulations de peptides A β aux niveaux cérébral et cérébrovasculaire (Donahue *et al.*, 2006; Shibata *et al.*, 2000). Un membre de la même famille, le récepteur LRP2, également appelé mégaline, joue un rôle dans la clairance du peptide A β via l'ApoJ grâce à la captation de complexes ApoJ/A β (Hammad *et al.*, 1997; Zlokovic *et al.*, 1996).

ii) Au niveau périphérique

Le récepteur LRP1 joue un rôle important dans l'élimination du peptide A β au niveau périphérique grâce à sa forme soluble appelée sLRP1. En effet, chez des souris et patients sains, sLRP1 fixe plus de 70 % des molécules de peptide A β plasmatique, empêchant son accès au cerveau. Cependant, chez les patients atteints par la MA et chez des souris mimant cette pathologie, la fixation du peptide A β à sLRP1 est compromise, à cause de l'oxydation de sLRP1 qui diminue drastiquement sa capacité à fixer le peptide A β . Il en résulte une augmentation de la teneur en peptides A β libres capables de traverser la BHE vers le cerveau via le transporteur RAGE (Deane *et al.*, 2003; Donahue *et al.*, 2006; Sagare *et al.*, 2007). Ceci représente un mécanisme important depuis qu'il a été démontré que le transporteur RAGE se trouve surexprimé chez les patients Alzheimer, et qu'il contribue à augmenter l'influx du peptide A β et leur accumulation dans le cerveau (Miller *et al.*, 2008).

iii) Au niveau hépatique

Le dernier niveau d'intervention de LRP1 sur la clairance du peptide A β se situe au niveau hépatique. En effet, le récepteur LRP1 est exprimé dans le foie et y participe à l'élimination du peptide A β . Ceci a été confirmé par l'utilisation de l'antagoniste RAP (*Receptor associated protein*) du récepteur LRP1 qui aboutit à une diminution de la clairance du peptide A β périphérique (Tamaki *et al.*, 2006). De plus, le récepteur LRP1 hépatique permet d'éliminer les complexes sLRP1-A β . Les peptides A β libres ou liés à sLRP1 peuvent également être éliminés par les reins, mais l'intervention du récepteur LRP1 dans l'élimination rénale n'est pas démontrée (Sagare *et al.*, 2007; Tamaki *et al.*, 2006, 2007).

3. Transporteur ABCA1 et clairance du peptide A β

De façon intéressante, des souris modèles de la MA et déficientes en transporteur ABCA1 présentent des augmentations de la quantité de peptides A β_{40} et A β_{42} solubles et insolubles, ainsi que des dépôts amyloïdes aux niveaux cérébral et vasculaire (Koldamova *et al.*, 2005a). Au contraire, des souris APP23 mimant la MA et surexprimant ABCA1 présentent une quantité plus importante d'ApoE liées aux lipides dans le LCR, tout comme le milieu conditionné préparé à partir de cultures primaires d'astrocytes de ces mêmes souris. Ces souris surexprimant ABCA1 présentent une diminution des dépôts et des plaques amyloïdes (Wahrle *et al.*, 2008). Lorsque l'expression d'ABCA1 est supprimée chez ces souris APP23, les dépôts amyloïdes sont augmentés. Des résultats identiques ont été retrouvés dans un autre modèle de souris mimant la MA (APP/PS1) chez lesquelles l'expression d'ABCA1 est supprimée (Hirsch-Reinshagen *et al.*, 2005).

La question de savoir si le génotype de l'ApoE module l'effet de la suppression du gène ABCA1 a été étudiée grâce à des souris porteuses du gène humain apoE3 ou apoE4 accompagné d'une délétion d'un allèle du gène ABCA1. Il s'avère que l'hétérozygotie pour ABCA1 entraîne des troubles cognitifs et une augmentation des dépôts amyloïdes uniquement chez les souris ApoE4. De plus, des perturbations importantes de la clairance des peptides A β dans le LCR sont présentes chez les souris ApoE4/ABCA1^{+/-}, alors qu'elles sont insignifiantes chez les souris ApoE3/ABCA1^{+/-} (Fitz *et al.*, 2012).

4. Régulation de LXR par ses agonistes ou les oxystérols et clairance du peptide A β

Comme nous l'avons vu précédemment, le récepteur LXR joue un rôle clé dans le métabolisme du cholestérol cérébral. Deux agonistes du récepteur LXR ont été créés et étudiés principalement sur des modèles animaux. Ces agonistes sont le T0901317 et le GW3965. Différents modèles animaux transgéniques mimant la MA ont été utilisés afin de tester les effets de l'agoniste LXR T0901317, tels que les souris Tg2576 et APP23. Différents traitements d'agoniste LXR T0901317 par gavage ou régimes alimentaires accompagnés ou non par des régimes hyperlipidiques ont été réalisés sur ces modèles de souris. Ces études ont toutes démontré une diminution des déficits cognitifs traduite par de meilleures performances d'apprentissage et de mémorisation. Ces bénéfices ont été corrélés avec des diminutions de la quantité du peptide A β_{42} et des dépôts de plaques amyloïdes dans des structures cérébrales importantes telles que l'hippocampe et le cortex. Ces diminutions sont dues à une augmentation de la clairance du peptide A β ou à une diminution de l'expression et de l'activité de BACE1. Ces bénéfices ont aussi été mis en relation avec une augmentation du flux de cholestérol cérébral, caractérisée par une augmentation du recyclage du cholestérol cérébral. En effet, une augmentation des précurseurs du cholestérol, qui sont le lathostérol, le desmostérol et le lanostérol, dans l'hippocampe et le cortex, ainsi qu'une diminution du cholestérol membranaire apparaissent. De plus, une augmentation de l'expression de l'ApoE, d'ABCA1 et d'ABCG1 est fort logiquement présente chez ces souris, puisqu'ils sont tous des gènes cibles du récepteur LXR (Cui *et al.*, 2011; Fitz *et al.*, 2010; Koldamova *et al.*, 2005b; Riddell *et al.*, 2007; Vanmierlo *et al.*, 2011). Certaines de ces observations ont été retrouvées dans un modèle de trauma cérébral induit chez des souris C57BL/6 et accompagnées d'une action anti-inflammatoire de l'agoniste LXR T0901317. De plus, l'amélioration de la clairance du peptide A β est directement liée à la surexpression d'ABCA1 (Loane *et al.*, 2011). Des études *in vitro* avaient également démontré auparavant que l'agoniste LXR T0901317 augmentait la production et la sécrétion de l'ApoE via ABCA1, aboutissant à une augmentation de la dégradation du peptide A β_{42} et une diminution de la sécrétion du peptide A β , ainsi qu'une diminution du clivage amyloïdogénique d'APP (Fitz *et al.*, 2010; Koldamova *et al.*, 2005b; Sun *et al.*, 2003). Le traitement par l'agoniste LXR T0901317 permet aussi une amélioration des troubles cognitifs via une diminution de l'activité de

l'acétylcholinestérase et du stress oxydant chez un modèle de démence induite chez des souris suisses albinos par une icv de streptozotocine et placées sous un régime hyperlipidique (Sodhi and Singh, 2014).

Les effets de l'agoniste LXR GW3965 chez des modèles animaux transgéniques tels que les souris Tg2576, APP/PS1 et APP/PS1/ABCA1^{-/-} ont été réalisés. Ces études démontrent une amélioration des déficits cognitifs présents chez ces animaux, via une diminution des dépôts amyloïdes et une augmentation de la clairance des peptides A β ₄₀ et A β ₄₂. Au niveau mécanistique, cet agoniste LXR augmente l'expression d'ABCA1 et de l'ApoE ainsi que son degré de liaison aux lipides via ABCA1. Ceci va directement impacter la dégradation du peptide A β via les endosomes et les lysosomes ainsi que l'activité de l'IDE, qui permet la dégradation du peptide A β (Donkin *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2008c). Une amélioration de la mémoire de travail via des réparations des dommages axonaux et une diminution des quantités des peptides A β ₄₀ et A β ₄₂ a été observée chez des souris sauvages C57BL/6 présentant un trauma cérébral et traitées par l'agoniste LXR GW3965. Cette étude a démontré que les effets bénéfiques se font de façon dépendante de l'ApoE (Namjoshi *et al.*, 2013). Enfin, une étude réalisée chez des souris traitées au MPTP (*1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine*) afin d'induire la maladie de Parkinson démontre un effet anti-neurodégénératif et anti-inflammatoire du GW3965 (Dai *et al.*, 2012).

L'activateur endogène du récepteur nucléaire LXR est le 24S-OHC (Lehmann *et al.*, 1997). Il a un effet stimulateur sur l'expression et la sécrétion d'ApoE (Abildayeva *et al.*, 2006). Par ailleurs, il existe une corrélation entre la teneur en 24S-OHC et la quantité d'ApoE dans le liquide céphalo rachidien de patients MA, appuyant l'hypothèse que le 24S-OHC est un médiateur de la production et de la sécrétion de l'ApoE (Shafaati *et al.*, 2007). Les oxystérols 24S-OHC et 27-OHC stimulent également l'expression d'ABCA1, qui est un transporteur important du cholestérol. De ce fait, les oxystérols favorisent l'efflux de cholestérol en activant la transcription des gènes cibles de LXR (Koldamova *et al.*, 2003; Panzenboeck *et al.*, 2006; Saint-Pol *et al.*, 2013; Theofilopoulos *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2003). Une étude a cependant contredit ces résultats, en n'observant aucune induction

de l'expression des gènes cibles de LXR chez un modèle de souris où la 24S-hydroxylase est surexprimée (Shafaati *et al.*, 2011a).

Une controverse sur les effets bénéfiques du 24S-OHC dans les maladies neurodégénératives est apparue suite aux publications de résultats démontrant *in vitro* un rôle neurotoxique du 24S-OHC via une perturbation de l'homéostasie calcique des cellules et le déclenchement d'une nécrose programmée (Kölsch *et al.*, 1999; Yamanaka *et al.*, 2011). Cependant, les concentrations en 24S-OHC utilisées dans ces études sont nettement plus importantes que celles utilisées dans la plupart des autres études.

Le 24S-OHC étant un produit dérivé des neurones, la quantité de cet oxystérol dans le plasma peut donc refléter le nombre de cellules neuronales métaboliquement actives dans le cerveau. Cependant, les quantités plasmatiques dépendent aussi de la capacité de métabolisation hépatique de cet oxystérol (Bretillon *et al.*, 2000a). Chez les nouveaux nés, la taille du cerveau équivaut à trois fois celle du foie, tandis que la taille de ces organes est plus ou moins similaire à l'âge adulte. En conséquence, la quantité de 24S-OHC plasmatique est augmentée chez l'enfant, et devient constante à l'âge adulte. A un âge avancé, la taille du foie est réduite par rapport à celle du cerveau et on trouve une augmentation de 24S-OHC plasmatique à partir de 65 ans. L'origine centrale du 24S-OHC et son métabolisme hépatique relativement homogène ont permis différentes investigations sur les possibilités d'utiliser le 24S-OHC comme marqueur de l'homéostasie du cholestérol cérébral. Les concentrations de 24S-OHC plasmatique peuvent changer en fonction du nombre de neurones métaboliquement actifs. En effet, la quantité de 24S-OHC plasmatique se trouve diminuée chez des patients décédés de la MA où une perte neuronale est présente (Bretillon *et al.*, 2000b; Leoni *et al.*, 2004; Lutjohann *et al.*, 1996). De façon intéressante, une induction de l'expression de la 24S-hydroxylase est présente dans les astrocytes de patients atteints par la MA (Bogdanovic *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2004). Il s'agit sûrement d'un phénomène compensatoire apparaissant en réponse à la perte neuronale, mais qui ne permet pas de compenser la perte de l'activité de la 24S-hydroxylase due à la dégénérescence neuronale. En accord avec l'hypothèse que la perte neuronale induit une diminution de la quantité de 24S-OHC dans le plasma, ce dernier se trouve diminué chez les patients atteints par la

maladie de Parkinson, caractérisée par une perte des neurones dopaminergiques (Breitillon *et al.*, 2000b). Cependant, des augmentations du 24S-OHC plasmatique ont également été observées chez les patients atteints par la MA (Lütjohann *et al.*, 2000; Zuliani *et al.*, 2011). La perte neuronale entraîne une dégradation des gaines de myéline riches en cholestérol et donc un recyclage beaucoup plus important du cholestérol, aboutissant à une augmentation de la quantité de cholestérol à métaboliser en 24S-OHC. Les variations en 24S-OHC plasmatique chez les patients atteints par la MA se font donc en deux temps. Dans un premier temps, une phase où le recyclage du cholestérol est amplifié suite à la dégénérescence des neurones, aboutissant à une augmentation de la sécrétion de 24S-OHC, puis la sécrétion en 24S-OHC plasmatique diminue résultant d'une perte trop importante de neurones métaboliquement actifs.

Près de 99 % du flux de 24-OHC du cerveau traverse la BHE et moins de 1 % atteint le LCR. De façon surprenante, cette petite quantité de 24S-OHC dans le LCR semble refléter le degré de dégénérescence neuronale. Si le 24S-OHC se trouve diminué dans le plasma de patients atteints par des troubles neurodégénératifs, il se trouve augmenté dans le LCR (Leoni *et al.*, 2004; Papassotiropoulos *et al.*, 2002; Schönknecht *et al.*, 2002; Shafaati *et al.*, 2011a; Teunissen *et al.*, 2003). De plus, la quantité de 24S-OHC dans le LCR corrèle avec les quantités des protéines tau et tau phosphorylées dans ce même compartiment (Leoni *et al.*, 2006). Enfin, un polymorphisme génétique pour le gène *cyp46A1* a été mis en évidence chez des patients atteints par la MA dont le ratio 24S-OHC/cholestérol est augmenté dans le LCR (Kölsch *et al.*, 2002). Le 27-OHC est augmenté dans le LCR de patients présentant des troubles neurodégénératifs (Leoni *et al.*, 2004; Shafaati *et al.*, 2011b). Cela peut sembler étonnant puisque le 27-OHC a pour origine la circulation. Cependant, la perte neuronale présente chez ces patients peut entraîner une diminution de la quantité de l'enzyme CYP7B1 qui métabolise le 27-OHC. Le fait que des patients atteints par la MA présentent une diminution de cette enzyme conforte cette hypothèse (Yau *et al.*, 2003). Malgré cela, cette hypothèse est difficile à valider car les maladies neurodégénératives provoquent des altérations de la barrière hémato-encéphalique, provoquant une augmentation du flux de 27-OHC de la périphérie vers le cerveau (Blennow *et al.*, 1990; Leoni *et al.*, 2003).

En conclusion, la conversion du cholestérol en oxystérol et plus précisément en 24S-OHC et 27-OHC, ainsi que leur rôle activateur sur LXR sont d'une grande importance pour le maintien de l'homéostasie du cholestérol cérébral et semblent jouer un rôle prépondérant dans la physiopathologie de la MA. De même, comme nous avons pu le voir tout au long de cette synthèse et dans ce chapitre, les récepteurs aux ApoE semblent être des acteurs majeurs du métabolisme du cholestérol cérébral, des fonctions cognitives et de la MA. Face au débat toujours en cours sur le lien existant entre le cholestérol et la MA, nous nous sommes intéressés à un récepteur aux lipoprotéines encore inconnu dans le SNC, à savoir le récepteur LSR que nous allons décrire dans la partie suivante.

IV. Lipolysis stimulated lipoprotein receptor (LSR)

En 1992, Bihain et Yen ont découvert que les fibroblastes issus de patients atteints par une hypercholestérolémie familiale chez lesquels le récepteur LDLR est absent, sont capables d'internaliser une quantité significative de LDL uniquement en présence d'oléate. L'ajout d'acides gras libres tels que l'oléate sur ces fibroblastes a pour conséquence d'amplifier cette voie d'endocytose indépendante du récepteur aux LDL (Bihain and Yen, 1992). Ces résultats ont suggéré l'existence d'un récepteur aux lipoprotéines activé par les acides gras libres, distinct du récepteur LDLR qui a été nommé *Lipolysis Stimulated Lipoprotein receptor* ou LSR. En effet, une fois activé par l'oléate dans des hépatocytes de rat, le récepteur subit un changement conformationnel révélant les sites de fixation aux ApoB et/ou ApoE (Mann *et al.*, 1995; Yen *et al.*, 1994). La présence d'acide gras libres (tel que l'oléate) est nécessaire pour la liaison entre l'ApoB ou l'ApoE et LSR et par conséquent l'endocytose médiée par LSR (Yen *et al.*, 2008). La liaison à l'oléate et aux autres acides gras est une originalité de ce récepteur.

Le récepteur LSR est un hétérotrimère constitué de 3 sous-unités α , α' et β dont les deux principales sont α et β et ont des poids moléculaires chez la souris de 68 kDa et 56 kDa respectivement. Les sous unités α et α' apparaissent en doublet, ce qui empêche de déterminer précisément le poids moléculaire de la sous unité α' qui ne possède pas les signaux d'adressage aux lysosomes. La sous unité β présente un domaine manquant qui comprend les signaux d'adressage aux lysosomes et le domaine transmembranaire potentiel. Il n'est pas encore démontré avec certitude quelle sous unité correspond aux domaines transmembranaire et extracellulaire (Yen *et al.*, 1999).

L'ARNm du récepteur LSR est abondamment exprimé dans le foie, et en moins grande quantité dans les poumons, l'intestin, les reins, les ovaires et les testicules. Il n'est pas détecté dans les muscles et le cœur. Afin de pouvoir étudier le rôle du récepteur LSR de façon plus précise et complète, un modèle animal déficient pour le récepteur LSR a été développé. Dans ce but, le gène LSR a été inactivé dans des cellules souches embryonnaires de souris 129/Ola par la délétion d'un segment de gène contenant l'exon 2-5, qui ont ensuite été implantées dans des embryons de souris. Cependant, les souris

LSR KO homozygotes meurent au bout de 12,5 à 15,3 jours de gestation contrairement aux souris hétérozygotes LSR^{+/-} qui sont parfaitement viables (Mesli *et al.*, 2004).

Lors de sa découverte, le récepteur LSR a été considéré comme un récepteur aux lipoprotéines riches en triglycérides et assurant leur clairance rapide en période postprandiale après un repas gras. Lorsque les souris LSR^{+/-} sont placées sous un régime hyperlipidique, une accumulation de triglycérides et de cholestérol plasmatiques ainsi qu'une diminution de 50% de la clairance des lipoprotéines riches en triglycérides (TG) durant la phase postprandiale apparaissent (Narvekar *et al.*, 2009; Yen *et al.*, 2008). Des dépôts lipidiques sont également présents au niveau aortique. Contrairement aux souris sauvages, chez les souris LSR^{+/-}, la prise de poids est corrélée avec l'augmentation des lipides plasmatiques (Yen *et al.*, 2008). Ces résultats démontrent donc que le récepteur LSR représente un lien entre l'hyperlipidémie, l'obésité et l'athérosclérose. L'extinction du récepteur LSR spécifiquement au niveau hépatique par siRNA (*small interfering RNA*) délivrés par des adénovirus augmente la quantité d'ApoB et d'ApoE et provoque l'augmentation de la triglycéridémie postprandiale (Narvekar *et al.*, 2009; Yen *et al.*, 2008). L'ApoCIII, connue pour provoquer des hypertriglycéridémie lors de sa surexpression, inhibe l'activité de LSR (Mann *et al.*, 1997). La quantité de récepteur à la surface des hépatocytes est fortement corrélée négativement au taux de triglycérides plasmatiques en phase postprandiale, démontrant la participation du récepteur LSR à la clairance des lipoprotéines riches en triglycérides lors de la phase postprandiale (Mann *et al.*, 1995). La protéine RAP inhibe l'activité du récepteur LSR en se fixant sur sa forme inactive (Troussard *et al.*, 1995). L'activité de ce récepteur est également inhibée par la lactoferrine qui est une protéine de lait qui inhibe la capture des chylomicrons au niveau hépatique. La fixation de la lactoferrine sur la forme active du récepteur LSR a pour conséquence d'empêcher la fixation des lipoprotéines riches en triglycérides, expliquant donc l'action hypertriglycéridémique de la lactoferrine plasmatique (Ahmad *et al.*, 2012; Mann *et al.*, 1995). Cette observation n'est pas sans intérêt dans notre contexte d'étude sur les relations entre ce récepteur, le métabolisme lipidique cérébral et le processus de la MA. En effet, la lactoferrine endogène est considérée comme une des protéines de régulation de l'inflammation (Legrand, 2012). Elle a également été utilisée comme un vecteur de transfert de molécules à travers la BHE vers le parenchyme cérébral (Huang *et al.*, 2013;

Su *et al.*, 2014; Ye *et al.*, 2013). De plus, la lactoferrine semble intervenir *in vitro* dans la clairance du peptide A β via le récepteur LRP1 en formant des complexes avec le peptide A β (Jaeger and Pietrzik, 2008; Qiu *et al.*, 1999). La figure 27 résume le fonctionnement du récepteur LSR dans la clairance des lipoprotéines périphériques riches en triglycérides.

Figure 27 : Régulation du récepteur LSR

Au cours du vieillissement, les souris LSR^{+/-} présentent une augmentation de la prise de poids et de la teneur en leptine plasmatique, suggérant un lien entre le récepteur LSR et la leptine. La leptine est une hormone sécrétée par les tissus adipeux (adipoquine) qui régule la prise alimentaire et la dépense énergétique. Elle induit un effet anorexigène et une augmentation des dépenses énergétiques en se fixant sur ces récepteurs situés dans l'hypothalamus. L'administration de doses physiologiques de leptine chez des souris par des injections intrapéritonéales induit une surexpression du récepteur LSR au niveau hépatique et améliore la clairance des chylomycrons en phase post prandiale (Narvekar

et al., 2009; Stenger *et al.*, 2010) (Figure 28). La leptine présente également des effets bénéfiques pour les processus d'apprentissage, de mémorisation, de transmission synaptique, de neuroprotection et de neurogénèse (Garza *et al.*, 2008; Oomura *et al.*, 2006). La leptine inhibe aussi l'expression de BACE1 et la production du peptide A β (Marwarha *et al.*, 2010, 2014; Niedowicz *et al.*, 2013). Plusieurs études indiquent une corrélation entre les taux circulants périphériques de leptine et l'expression de cette hormone ainsi que de son récepteur dans le cerveau et la MA (Harvey, 2010; Paz-Filho *et al.*, 2010).

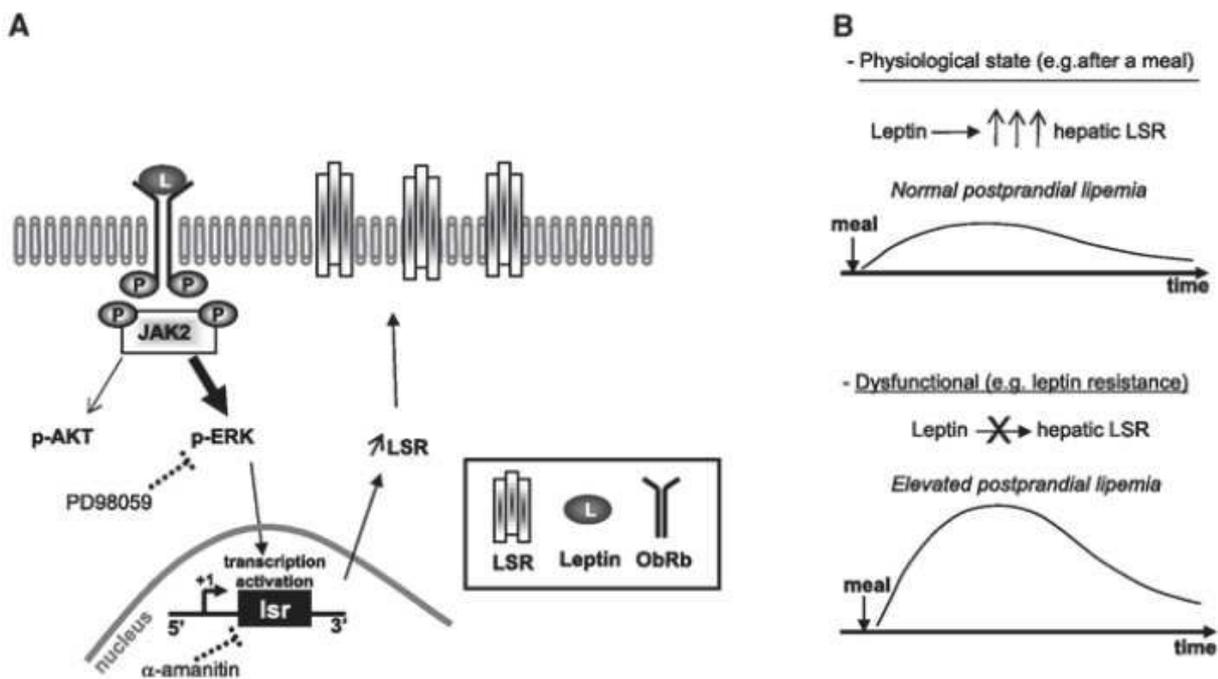


Figure 28 : Régulation de l'expression de LSR et de la lipémie postprandiale via la leptine (d'après Stenger *et al.* 2010)

Par ailleurs, le récepteur LSR est impliqué dans le maintien et la formation des jonctions serrées via le recrutement de la tricelluline, composant moléculaire important pour la formation des jonctions serrées. Les cellules endothéliales dans le SNC et la rétine sont beaucoup moins perméables aux solutés grâce à la présence de jonctions serrées tricellulaires. Le récepteur LSR a également été retrouvé dans ces contacts tri cellulaires (Furuse *et al.*, 2012; Higashi *et al.*, 2013; Iwamoto *et al.*, 2014; Masuda *et al.*, 2011). Le

récepteur LSR fait partie de la famille des angulines dont ILDR1 et ILDR2 (*immunoglobulin-like domain containing receptor 1 et 2*) sont membres. Ces protéines semblent être impliquées à la fois dans la sensibilité vis à vis du diabète, la clairance du cholestérol périphérique et la libération de cholécystokinine qui est une hormone peptidique anorexigène (Chandra *et al.*, 2013; Dokmanovic-Chouinard *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2013). La présence de l'ARNm du récepteur LSR a été observée dans la BHE (Daneman *et al.*, 2010). Puisque le récepteur LSR joue un rôle potentiel dans le maintien des jonctions serrées, l'absence de LSR au niveau de la BHE au stade embryonnaire pourrait expliquer la létalité observée chez les embryons déficients pour le récepteur LSR. Cette implication dans les cohésions des tissu épithéliaux est en adéquation avec les observations sur son implication dans un certain nombre de processus cancéreux comme dans les cancers du côlon, de la vessie et du sein (Herbsleb *et al.*, 2008; Reaves *et al.*, 2014). LSR est induit par p53, un régulateur bien connu du cycle cellulaire (Jazag *et al.*, 2005; Kannan *et al.*, 2001).

Enfin, le récepteur LSR a également été décrit comme un récepteur hôte d'une toxine produite par la bactérie *Clostridium difficile* appelée *Clostridium Difficile Transferase* (CDT), responsable de diarrhées et de colites. Le récepteur LSR permet l'endocytose d'une autre toxine produite par la bactérie *Clostridium spiriforme*, elle aussi à l'origine de diarrhées dans les intoxications alimentaires (Papatheodorou *et al.*, 2011, 2012, 2013). Ceci montre que le récepteur LSR, comme d'autres récepteurs initialement décrits comme des récepteurs aux lipoprotéines, peut assurer des fonctions de liaisons de multiples ligands.

Comme nous l'avons vu, divers récepteurs aux lipoprotéines, dont des récepteurs à l'ApoE jouent un rôle important dans la régulation du métabolisme du cholestérol cérébral, et semblent fortement impliqués dans la MA. De plus, les dyslipidémies et l'obésité à l'âge moyen sont des facteurs de risque de la MA. Face à ce constat, nous pouvons donc nous demander si le récepteur LSR ne pourrait pas être impliqué dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol cérébral et dans la physiopathologie de la MA. Lors de mon stage de deuxième année de master et la première année de doctorat, les premières expérimentations effectuées ont permis de caractériser la présence du récepteur LSR dans des structures cérébrales importantes pour les capacités cognitives et

la régulation du métabolisme énergétique. Suite à cela, différentes équipes ont caractérisé sa présence au niveau de la BHE (Higashi *et al.*, 2013; Iwamoto *et al.*, 2014). Cependant, on ignore encore s'il pourrait être un nouvel acteur du métabolisme du cholestérol cérébral et de la MA. Les travaux de cette thèse ont eu pour objectif de répondre à ces questions.

V. Résumé de la synthèse bibliographique

La MA est une maladie neurodégénérative entraînant des troubles comportementaux et de la mémoire dramatiques. Aucun traitement efficace n'existe à ce jour, tandis que de plus en plus de personnes sont et seront touchées par cette pathologie suite à l'augmentation de l'espérance de vie. Même si les mécanismes responsables de l'apparition et du développement de cette maladie ne sont pas maîtrisés, deux lésions ont bien été caractérisées. Il s'agit des dégénérescences neurofibrillaires constituées d'agrégats de protéines tau hyperphosphorylées, et des plaques amyloïdes constituées de peptides A β . Même si les troubles cognitifs ont en premier lieu été corrélés aux plaques amyloïdes, les recherches de ces dernières années semblent démontrer que les oligomères solubles du peptide A β seraient les principaux responsables des troubles cognitifs. Suite à une production excessive et/ou une altération de la clairance et de la dégradation des peptides A β et/ou une plus grande sensibilité vis à vis de ces derniers, les peptides A β entraînent des perturbations de la fonction neuronale. En raison du rôle crucial du cholestérol sur les fonctions neuronales et les capacités cognitives, de nombreuses investigations cliniques, in vivo et in vitro ont étudié le lien potentiel existant entre l'homéostasie du cholestérol et la MA. Les métabolismes du cholestérol central et périphérique sont indépendants à cause de la présence de la BHE. La synthèse de cholestérol dans le cerveau est donc de novo. A l'âge adulte, les neurones ont une capacité de synthèse du cholestérol quasi nulle. Ce sont les astrocytes qui vont produire le cholestérol et approvisionner les neurones en cholestérol. Plus de 20 étapes sont nécessaires pour cette synthèse, l'étape limitante étant celle catalysée par l'HMGCoAR. ABCA1, qui est le transporteur clé du cholestérol, permet à la fois l'efflux de cholestérol cérébral du cerveau vers la circulation sanguine à travers la BHE, et le transport du cholestérol des astrocytes vers les neurones. Il permet notamment la fixation du cholestérol sur les ApoE qui sont les apolipoprotéines majoritaires du SNC et qui représentent un facteur de risque génétique pour cette pathologie. Les apoE liées au cholestérol sont ensuite captées par les neurones via différents récepteurs aux lipoprotéines tels que LRP1 et LDLR et VLDL et ApoER2 qui ont un rôle clé dans la régulation du métabolisme du cholestérol cérébral, les fonctions cognitives et la MA. Une fois internalisé, le cholestérol peut être estérifié grâce aux enzymes ACAT et LCAT. L'excès de cholestérol sera quant à lui éliminé à travers la BHE ou métabolisé en 24S-OHC et 27-OH qui sont à l'inverse du cholestérol, capables de traverser la BHE. Ces oxystérols sont des ligands pour le récepteur nucléaire LXR, qui est un acteur de la régulation du métabolisme du cholestérol et qui

induit l'expression de différents gènes impliqués dans la synthèse et le transport du cholestérol tels que SREBP, l'HMGCoAR et ABCA1 (Figure 29).

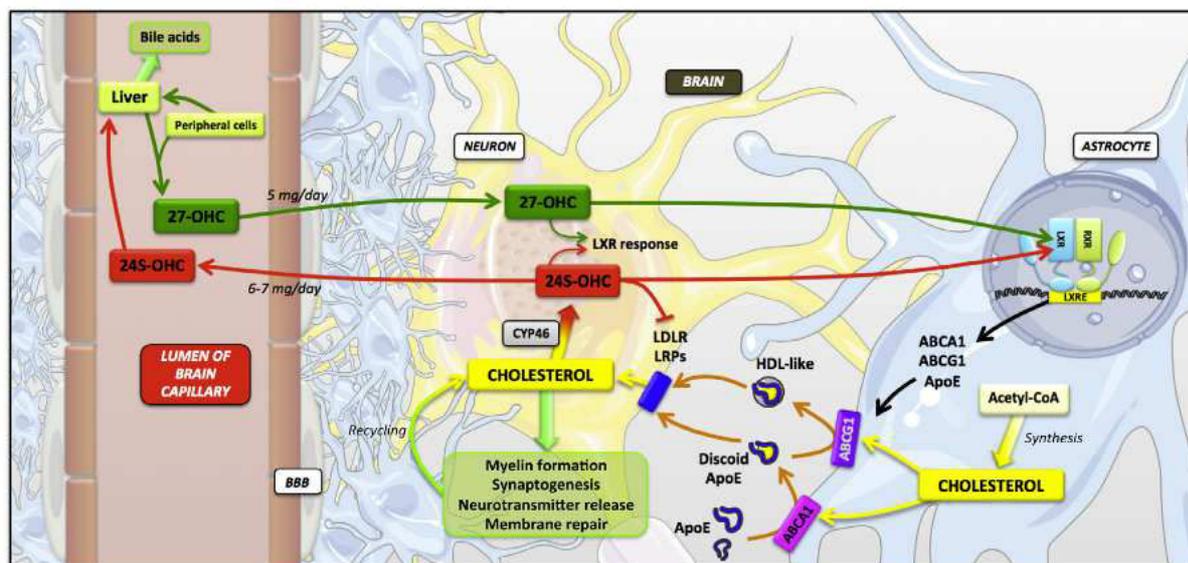


Figure 29 : Schéma récapitulatif du métabolisme du cholestérol cérébral (d'après Gosselet et al. 2013)

Le métabolisme du cholestérol cérébral n'est pas encore parfaitement caractérisé et son implication dans la MA est encore très controversée, ce qui met en avant un manque d'informations et de données. N'y aurait-il donc pas d'autres acteurs et d'autres récepteurs aux lipoprotéines impliqués dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol cérébral et la physiopathologie de la MA ?

Le rôle du récepteur LSR dans la régulation de l'homéostasie lipidique périphérique et son expression dans le BHE nous laissent penser qu'il pourrait être présent également au niveau cérébral et jouer un rôle dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol et la physiopathologie de la MA.

VI. Hypothèses et objectifs de travail

Nous avons démontré précédemment la complexité du métabolisme du cholestérol cérébral et de son interaction avec la MA. En effet, la littérature est à ce jour encore imprécise sur les mécanismes exacts régulant l'homéostasie du cholestérol cérébral et très controversée par rapport aux interactions existantes entre le cholestérol et la MA. Même s'il est clairement démontré que l'ApoE4 est un facteur génétique de la MA, les mécanismes par lesquels cette isoforme impacte la MA sont encore inconnus et sous d'intenses investigations. De même, les essais cliniques sur les statines, qui sont des agents ciblant le métabolisme du cholestérol, ne sont pas concluants et contradictoires. L'ensemble des travaux menés par la communauté scientifique ne converge pas.

Face à la complexité des résultats antérieurs, la caractérisation de nouveaux acteurs du métabolisme du cholestérol et de la MA représente un enjeu crucial afin d'obtenir des connaissances fondamentales supplémentaires qui permettront de mieux caractériser et comprendre le métabolisme du cholestérol et son lien avec la MA. Nous pensons que le cholestérol est un véritable facteur de risque pour la MA et que celle-ci peut être influencée par les apports alimentaires. Plus précisément, nous supposons que les récepteurs aux lipoprotéines représentent des acteurs majeurs du métabolisme du cholestérol cérébral et de la physiopathologie de la MA.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le récepteur LSR est connu pour être un récepteur périphérique aux lipoprotéines, et tout particulièrement de l'ApoE, jouant un rôle important dans la régulation de la lipémie postprandiale. De plus, il est présent au niveau de la BHE, structure critique dans la régulation du métabolisme du cholestérol cérébral et la physiopathologie de la MA. Le récepteur LSR représente donc pour nous un sujet de choix pour répondre aux besoins scientifiques précédemment évoqués. Ainsi, les objectifs de ces travaux de thèse sont les suivants :

1. Caractériser la présence du récepteur LSR dans le SNC de souris
2. Mettre en évidence une implication du récepteur LSR dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol cérébral au cours du vieillissement

3. Déterminer le degré de sensibilité au stress amyloïde induit par le peptide A β de souris hétérozygotes pour le récepteur LSR

4. Étudier l'impact de régimes hyperlipidique et enrichi en cholestérol sur les teneurs en cholestérol cérébral et les fonctions cognitives des souris hétérozygotes pour le récepteur LSR.

Chapitre II : Matériels et méthodes

I. Etudes *in vivo*

A. Animaux et conditions d'hébergement

Les études ont porté sur des souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} mâles et femelles âgées de 6 à 19 mois. Ces souris sont issues de reproductions au sein du laboratoire. Le génotype LSR^{-/-} étant létal (Yen *et al.*, 2008), les mâles LSR^{+/-} ont été mis en reproduction avec des femelles sauvages C57Bl6/J âgées de 3 à 6 mois maximum. Ces dernières sont fournies par Janvier Breeding (Le Genest Saint Isle, France). Les petits ont été séparés des parents à l'âge de 4 semaines et génotypés à l'âge de 6 semaines.

Les souris utilisées sont hébergées dans une animalerie de stabulation dans des conditions standardisées de température 21 ± 2 °C, d'hydrométrie (50 ± 5 %) et d'éclairage selon un cycle lumière/obscurité de 12 heures. Les souris disposent d'eau de boisson et de nourriture *ad libitum*. Elles sont acclimatées pendant un minimum de deux semaines avant tout début d'expériences. Toutes les procédures sont effectuées selon le respect des normes et réglementations imposées par le comité d'éthique lorrain en matière d'expérimentation animale.

B. Le génotypage

Les échantillons de queues des souris ont été prélevés (0,2 cm) sous anesthésie gazeuse (isoflurane). Les échantillons de queues ont ensuite été digérés dans un tampon de digestion à la protéinase K composé de *DirectPCR Lysis Reagent* (Euromedex) et de Protéinase K (20 mg /mL)(Biosystems) dans un four à hybridation rotatif durant une nuit à 55 °C, afin de libérer l'ADN. Les échantillons de queues digérés sont ensuite placés 45 minutes dans un bain marie à 85 °C afin d'inactiver l'enzyme digestive protéinase K. Une réaction de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est réalisée afin d'amplifier les allèles sauvage et muté de LSR en utilisant des amorces spécifiques. L'allèle LSR sauvage est détecté en utilisant l'amorce sens localisée sur l'exon 4 (5'-CAGGACCTCAGAAGCCCCTGA-3') et une amorce inverse localisée sur l'exon 5 (5'-AACAGCACTTGTCTGGGCAGC-3') aboutissant à un produit de PCR de 773 paires de bases. Cette région du gène est supprimée dans l'allèle muté. L'allèle muté a été détecté par la présence du gène néo. Le couple d'amorce utilisé est l'amorce « sens » (5'-GGCGCCCGGTTCTTTTGTCA-3') et

l'amorce « anti-sens » (5'-TTGGTGGTCGAATGGGCAGGT-3') donnant un produit de 179 pb (Mesli *et al.*, 2004). La solution de PCR contient 250 μ M de dNTPs, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,5 μ M de chaque amorce et 2,5 unités de Taq polymérase. Les conditions de PCR pour le gène LSR sauvage incluent une étape initiale de dénaturation de 5 minutes à 94°C suivie de 35 cycles de dénaturation de 30 secondes à 94 °C, d'hybridation d'une minute à 63 °C, et d'élongation de 30 secondes à 72 °C. Pour le gène muté, une étape initiale de 5 minutes à 94 °C de dénaturation est effectuée et suivie de 35 cycles de dénaturation de 30 secondes à 94 °C, d'hybridation d'une minute à 63 °C et d'élongation de 30 secondes à 72 °C. Après la réaction de PCR, 20 μ L des produits d'amplification sont déposés sur un gel d'agarose 1,5 % (poids / volume) après avoir mélangé les produits avec du tampon de charge (A/6), puis sont soumis à une migration à 100 V pendant 30 minutes, pour être enfin photographiés.

C. Chirurgie stéréotaxique

1. Anesthésie

Les animaux sont opérés sous anesthésie générale induite par un mélange de Kétamine (0,8 % p/v) et de Xylazine (0,1 % p/v) dans du sérum physiologique (NaCl 0,9 %), administré par voie intra péritonéale à la dose de 1 mg de kétamine / 10 g de souris. Après avoir vérifié la profondeur de l'anesthésie par l'exécution des tests d'abolition des réflexes cornéens, de retrait de la patte suite au pincement interdigital et de sursaut suite au pincement de la queue, l'animal est placé dans l'appareil à stéréotaxie.

2. Injections intracérébrales

La souris sous anesthésie générale est placée dans un appareil à stéréotaxie muni d'un microinjecteur. L'intervention chirurgicale est réalisée dans des conditions aseptiques. La tête de la souris est immobilisée à la fois sur le plan frontal et sagittal. La fixation sur le plan sagittal est réalisée grâce à deux barres d'oreilles introduites dans les pavillons des oreilles. La fixation sur le plan frontal se fait grâce à l'introduction d'un mord derrière les incisives de l'animal. Une fois la souris placée dans l'appareil à stéréotaxie, le crâne de la souris est rasé et la peau de la région dorsale du crâne est désinfectée avec une solution d'éthanol à 70 % (v/v). Une incision médiale est réalisée depuis l'arrière de la ligne interoculaire jusqu'au début de la voûte occipitale. Le crâne est

dégagé, puis gratté à l'aide du bistouri et nettoyé avec un coton légèrement imbibé d'eau oxygénée (3 %). Ceci fait apparaître les sutures de croissance formant le repère anatomique correspondant au bregma et utilisé pour situer les différentes structures cérébrales dans l'espace selon un trièdre de référence. Les coordonnées d'injection pour le ventricule latéral droit et gauche sont :

- Antéropostériorité = 0,22 mm antérieurement au plan vertical frontal
- Latéralité = 1 mm latéralement au plan sagittal médian
- Profondeur = 2,5 mm par rapport au plan horizontal

La calotte crânienne est percée à l'aide d'une fraise (\varnothing 0,5 mm) au niveau du point d'entrée de l'aiguille. Le crâne est nettoyé avec de la biseptine avant de faire descendre l'aiguille dans le ventricule latéral. L'injection est réalisée avec une seringue Hamilton de 5 μ L (Supelco, 800 series, H85RN équipée d'une aiguille G26s, point style 3 blunt). Un volume de 1 μ L de la solution à 0,5 mM d'oligomères A β solubles (A β Os) ou de solution saline véhicule (NaCl 0,9 % m/v) est injecté dans le ventricule latéral droit à un débit de 1 μ L/minute. La quantité d'oligomères d'A β injectée est de 500 pmol. Une fois l'injection terminée, l'aiguille est laissée en place pendant 2 minutes afin d'éviter le reflux de la solution injectée, puis retirée doucement. L'orifice est recouvert d'un film de cire hémostatique (Lukens Bone Wax) et le scalp de l'animal est recousu et désinfecté à la biseptine. La souris est replacée dans sa cage individuelle à proximité d'une bouillote afin de prévenir l'hypothermie induite par l'anesthésie et faciliter le réveil de l'animal.

D. Analyses comportementales

1. Système de capture vidéo

Toutes les analyses comportementales sont enregistrées à l'aide d'une caméra couplée à un système de capture vidéo (SMART, Bioseb, Vitrolles, France). Ce système est doté d'un mode « 3 points » qui détecte la morphologie globale de la souris et discrimine la tête, le centre de gravité et la base de la queue (Figure 30). À la fin de l'expérience, un fichier Excel regroupant les mesures désirées est généré afin d'obtenir les données nécessaires à l'évaluation des capacités cognitives des animaux.

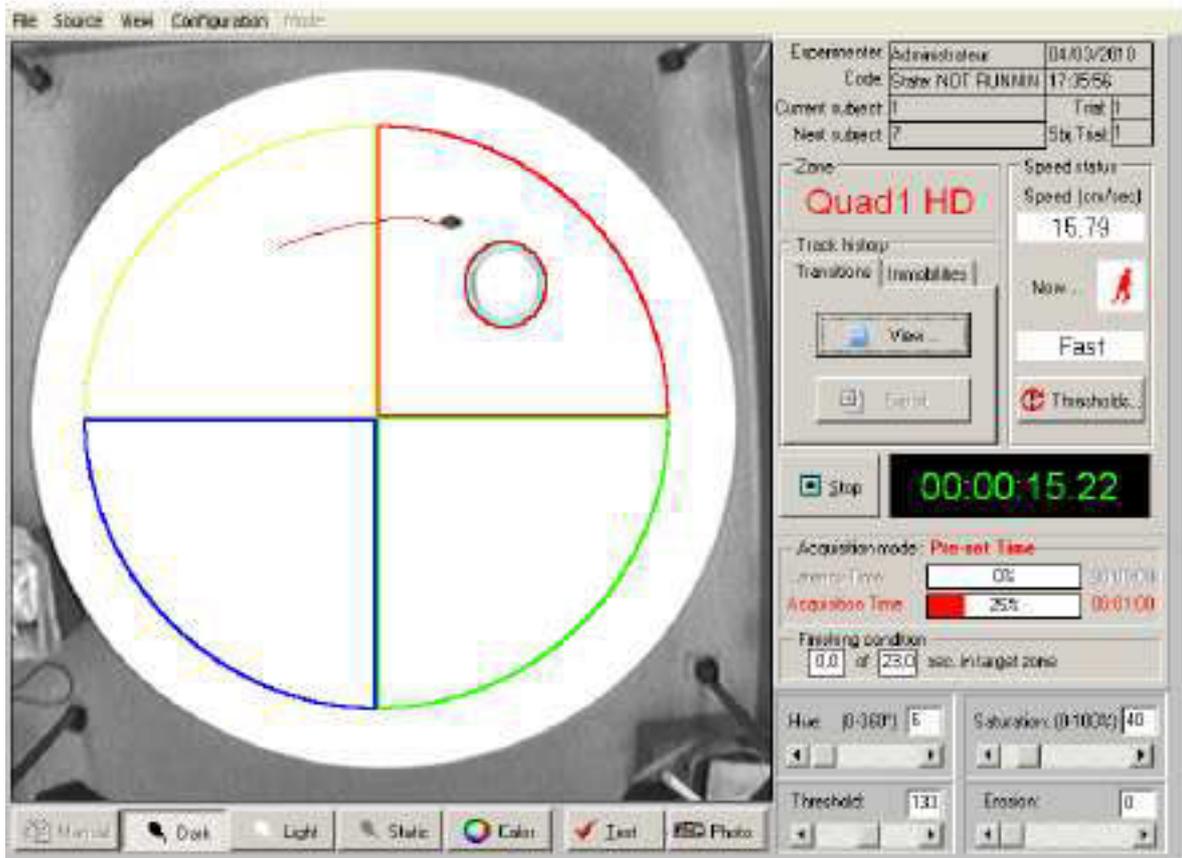


Figure 30 : Capture d'écran du logiciel de capture vidéo

La figure 31 décrit la cinétique expérimentale. Avant tout test comportemental, les souris sont placées 45 minutes dans la salle de comportement.

Figure 31 : Planification de la démarche expérimentale permettant d'évaluer l'impact d'oligomères solubles A β (A β Os) sur les capacités cognitives

2. Etude de la mémoire de travail à court terme : le labyrinthe en Y

Ce test permet d'évaluer la mémoire de travail qui permet de retenir à court terme une information et de l'utiliser immédiatement. Il est basé sur la tendance naturelle des rongeurs à explorer un nouvel environnement. Quand l'animal est placé dans le labyrinthe, il explore spontanément le bras le moins récemment visité. Ce paradigme d'étude de la mémoire de travail à court terme est composé de 3 bras A, B et C en plexiglas noir opaque de 40 cm de long, 10 cm de large, 14 cm de hauteur et orientés à 120° les uns par rapport aux autres. Le sol en plexiglas est décoré de symboles géométriques différents qui vont servir d'indices spatiaux afin de permettre à l'animal de discriminer les différents bras (Figure 32). Lors de ce test, les murs sont cachés à l'aide de rideaux noirs afin d'éviter toute interférence avec l'extérieur. Le labyrinthe est éclairé de manière indirecte à faible intensité de manière à obtenir 6 à 10 lux dans les bras.

Figure 32 : Schéma du dispositif du labyrinthe en Y

Pendant les 5 minutes de test, l'animal explore librement le dispositif. L'animal est considéré comme entré dans le bras lorsque son train arrière passe une ligne fictive située à 5 cm de l'entrée du bras. La souris est placée à l'extrémité d'un bras avec la tête dirigée vers la paroi, et est laissée libre d'explorer le labyrinthe pendant 5 minutes, en l'absence de l'expérimentateur à proximité pour ne pas perturber l'animal. Le nombre de bras visités et la séquence des visites sont enregistrés à l'aide d'une caméra placée au-dessus du labyrinthe. Une alternance spontanée est définie comme trois entrées successives dans les trois différents bras du labyrinthe (ABC, CBA...). Le pourcentage d'alternance spontanée est utilisé comme indice de performance de la mémoire de travail des animaux, et est calculé de la façon suivante :

3. Etude des capacités d'apprentissage et de la mémoire à long terme : la piscine de Morris où le labyrinthe aquatique

Le test de la piscine de Morris, repose sur la volonté de l'animal à s'échapper de l'eau pour laquelle il éprouve une aversion (21 °C). La piscine est constituée d'un réservoir circulaire de 80 cm de diamètre et 60 cm de hauteur, rempli au 2/3 d'eau opacifiée avec un colorant blanc. Une plate-forme immergée juste sous la surface de l'eau est placée dans

un endroit de la piscine (Figure 33). L'intensité lumineuse est approximativement de 100 lux. L'objectif de la souris est de localiser la plateforme et de nager vers elle le plus rapidement possible pour s'échapper de l'eau.

Figure 33 : Schéma du dispositif du labyrinthe aquatique

Ce test se déroule en 3 phases :

Phase d'habituation : Cette étape permet de familiariser l'animal au dispositif. Ici, les repères spatiaux sont dissimulés derrière des rideaux noirs. La souris doit rejoindre une plateforme visible dont la position varie à chaque essai. Deux essais le matin et l'après-midi de 60 secondes sont réalisés pendant 2 jours. L'objectif de l'habituation est que la souris comprenne qu'elle possède un moyen de s'échapper de l'eau.

Phase d'apprentissage : Les repères spatiaux sont rendus visibles. La plate-forme immergée (invisible) reste à la même place pendant toute la durée de l'apprentissage, donc d'un essai à l'autre et d'un jour à l'autre. En revanche, pour favoriser la stratégie allocentrique, les souris sont lâchées d'endroits différents d'un essai à l'autre. Cela favorise l'intégration des relations entre les éléments distaux situés à l'extérieur de la piscine (géométrie de la salle, repères spatiaux tels que des formes géométriques) et la position de la plate-forme. La souris réalise 4 tests de 60 secondes chacun (2 fois le matin et 2 fois

l'après-midi) pour apprendre, au fur et à mesure des essais et des jours, l'emplacement de la plate-forme. Entre chaque passage, un intervalle minimum de 45 minutes est appliqué. L'apprentissage de la localisation de la plate-forme est déterminé par une diminution progressive de la latence d'arrivée à la plate-forme au cours de la semaine d'apprentissage. Afin d'éviter des biais liés à la préférence spontanée pour un des quadrants de la piscine, l'ensemble des groupes expérimentaux sont divisés en sous-groupes et sont chacun entraînés sur différentes positions de plate-forme fixe

Phase de rétention : Pour évaluer le souvenir de la localisation de la plate-forme, et donc la mémoire à long terme, un test de rétention d'une durée de 60 secondes est réalisé. Lors de ce test, la plate-forme est retirée du dispositif. La surface de la piscine est alors divisée en 4 quadrants virtuels et le temps passé dans chaque quadrant est mesuré. Ainsi l'animal qui n'a pas mémorisé l'emplacement de la plate-forme aura une navigation totalement aléatoire, en passant 25 % du temps total dans chaque quadrant. En revanche, un animal qui se souvient de l'emplacement de celle-ci passera la majorité du temps du test dans le quadrant cible où se trouvait la plate-forme lors de la phase d'apprentissage.

4. Test du champ ouvert

Le dispositif est une chambre carrée de dimensions 56x56 cm avec des parois opaques. La chambre est placée sous diverses intensités lumineuses, avec une intensité lumineuse importante au centre (180 lux) et moins importante dans les angles et le long des parois (80 lux). Ce test repose sur la préférence des rongeurs aux espaces sombres et clos. Ainsi, le centre du dispositif sera particulièrement anxiogène pour l'animal au contraire des parois. La souris est placée le long d'une paroi et est laissée libre d'explorer le dispositif pendant 10 minutes. La distance parcourue, la vitesse de l'animal, le pourcentage de temps d'immobilisation ainsi que le pourcentage de temps passé dans les différentes zones de la chambre sont calculés.

E. Dissections et prélèvements tissulaires

Les animaux sont anesthésiés et mis à mort par une dose létale d'halotane (Mundipharma, France) dans une boîte d'aspiration. Les souris sont ensuite décapitées et la récupération des structures et tissus désirés pour les études ultérieures a lieu. Ces dernières sont placées dans des microtubes puis plongées dans l'azote liquide pour une

congélation immédiate, avant d'être stockées à -80 °C. Les structures récupérées sont le cortex, le cervelet, l'hippocampe, et l'hypothalamus, ainsi que le foie.

F. Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins sont réalisés dans la cavité rétro orbitaire des souris sous anesthésie gazeuse (isoflurane). Un volume d'environ 100 µL de sang est récupéré à chaque prélèvement par capillarité en utilisant une pipette pasteur dans un tube en polypropylène contenant 5 % d'EDTA. Les prélèvements sanguins réalisés juste avant la mise à mort de l'animal se font par une ponction cardiaque afin de récupérer un volume sanguin plus important d'environ 600 µL. Le plasma est immédiatement récupéré après une centrifugation de 5 minutes à 10 000 rpm à 4 °C puis dosé immédiatement ou stocké à -80 °C pour des analyses ultérieures.

II. Analyses biochimiques

A. Extraction lipidique

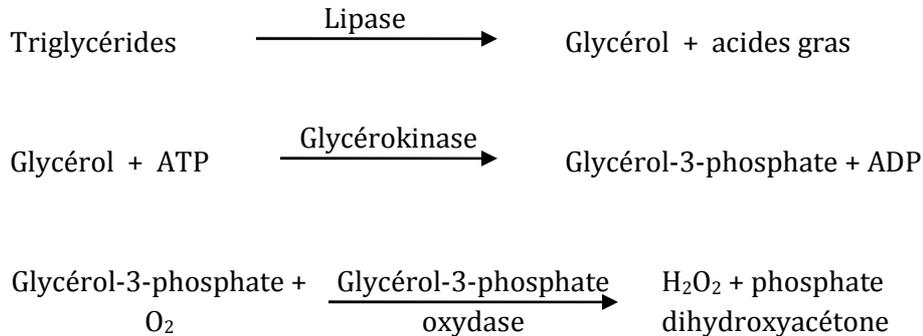
Environ 50 mg de tissu hépatique ainsi que des hippocampes, des cervelets, des cortex et des hypothalamus d'un hémisphère cérébral ont été déposés dans un tube et lyophilisés durant 5 heures. Suite à la lyophilisation, une solution de chloroforme/méthanol (2 : 1) a été ajoutée au tube (100-200 µL) et le tube a été vortexé pendant 1 minute toutes les 20 minutes durant 1 heure. La solution de chloroforme/méthanol a ensuite été récupérée dans un autre tube et l'extraction a été renouvelée deux autres fois. Les dosages lipidiques ont été réalisés en duplicats après évaporation d'une faible quantité de la solution récupérée (10-50 µL) avant l'ajout du réactif du kit de dosage. Les valeurs obtenues prennent en compte les dilutions réalisées (quantité de solution ajoutée à chaque extraction et quantité déposée pour évaporation et dosage).

B. Dosages lipidiques

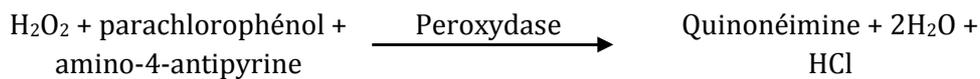
Les kits enzymatiques de dosage lipidique (triglycérides et cholestérol total) ont été fournis par Biomérieux (Craponne, France) et le kit de dosage des phospholipides a été fourni par Sobioda (Montbonnot St Martin, France).

1. Dosage des triglycérides

Les triglycérides d'un échantillon plasmatique ou tissulaire ont été dosés selon le principe suivant :



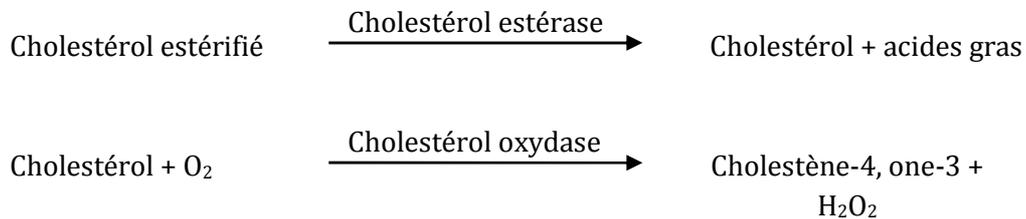
L'eau oxygénée formée est dosée selon une réaction de type TRINDER :



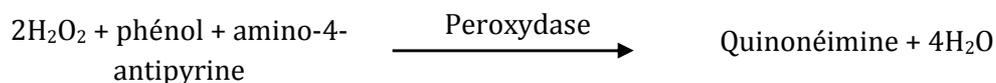
L'intensité de la coloration de la quinonéimine, mesurée à une longueur d'onde de 505 nm, est proportionnelle à la quantité de triglycérides présente dans l'échantillon.

2. Dosage du cholestérol total

Le cholestérol total d'un échantillon plasmatique ou tissulaire a été dosé selon le principe suivant :



L'eau oxygénée formée est dosée de la même manière que les triglycérides :



L'intensité de la coloration de la quinonéimine, mesurée à une longueur d'onde de 500 nm, est proportionnelle à la quantité de cholestérol total présente dans l'échantillon.

3. Dosage des phospholipides

Les phospholipides sont hydrolysés en choline par l'intermédiaire de la phospholipase D. La choline est ensuite oxydée par une choline oxydase pour former du peroxyde d'hydrogène, qui sera ensuite condensé par une peroxydase afin de former une coloration bleue. L'absorbance de la coloration bleue mesurée à 595 nm est proportionnelle à la quantité de phospholipides présente dans l'échantillon.

4. Dosage de la leptine plasmatique

Un kit *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) a été utilisé afin de détecter la leptine. Ce kit a été fourni par Millipore (Saint Quentin en Yvelines, France). La technique de l'ELISA repose sur une technique de "sandwich" entre une quantité d'anticorps précise, l'échantillon contenant la molécule détectée par l'anticorps et un autre anticorps couplé à une enzyme peroxydase fluorescente. Les dosages ont été réalisés selon les recommandations fournies par le fournisseur.

C. Extractions protéiques sur neurones primaires

Les neurones primaires cultivés dans les conditions décrites dans la suite de ce chapitre sont lavés deux fois dans du PBS froid. Différents volumes de tampon de lyse RIPA [25 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % nonidet NP-40, 1 % sodium d'oxycholate, 0,1 % SDS et des inhibiteurs de protéases (Complete Roche) sont ajoutés dans les supports de culture. Les cellules sont ensuite grattées et le tampon de lyse contenant les cellules récupéré. Ce dernier est soumis à deux cycles congélation/décongélation dans l'azote liquide et à 37 °C dans le bain-marie avant d'être centrifugé pendant 15 minutes à 10000 g à 4 °C. Le surnageant est récupéré et stocké à -80 °C en attendant d'être dosé.

D. Extraction protéique sur structures cérébrales

Les structures cérébrales récupérées comme décrit précédemment sont homogénéisées dans du tampon de lyse RIPA ([25 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % nonidet NP-40, 1 % sodium d'oxycholate, 0,1 % SDS et des inhibiteurs de protéases (Complete Roche)]. Les volumes de tampon de lyse sont ajustés selon les

structures utilisées. Ces dernières sont dissociées mécaniquement à l'aide d'une micropipette munie d'un cône bleu, puis d'un cône jaune, et enfin à l'aide d'une seringue et d'une aiguille (Diamètre 0,45 mm). Les homogénats obtenus sont ensuite soumis deux cycles congélation/décongélation dans l'azote liquide et à 37 °C dans le bain-marie avant d'être centrifugés pendant 15 minutes à 10000 g. Le surnageant est récupéré et stocké à -80°C en attendant d'être dosé.

E. Préparation des synaptosomes

Les structures cérébrales récupérées sont homogénéisées à l'aide d'un broyeur de type Potter dans un tampon d'homogénéisation (10 mM Tris pH=7,4 ; 0,32 M sucrose ; 2 mM EDTA). Une fois homogénéisée, la structure est centrifugée pendant 10 minutes à 750 g et 4 °C. Les surnageants sont ensuite récupérés puis centrifugés une nouvelle fois pendant 20 minutes à 12000 g à 4 °C. Le surnageant est éliminé et le culot obtenu est remis en suspension dans le tampon PBS (pH=7,4) et conservé à -80 °C.

F. Dosage des protéines :

Les concentrations protéiques dans les homogénats cérébraux, synaptosomes et lysats cellulaires sont évaluées à l'aide du kit BCA (Pierce, France) basé sur la réaction de Buriot. Le dosage est réalisé en microplaque dans laquelle 25 µL d'échantillon pur ou dilué sont ajoutés en duplicat. 200 µL de réactif BCA sont ensuite ajoutés dans chaque puits. L'absorbance ou l'intensité de la coloration est mesurée à 570 nm par un lecteur Fluostar (BMG-Labtechnologies). La concentration protéique des échantillons est calculée à partir d'une gamme d'étalonnage entre 25 et 2000 µg/mL d'albumine sérique bovine.

G. Immunoblot

1. Electrophorèse

La technique d'électrophorèse est une méthode de séparation des protéines en fonction de leur taille et/ou de leur charge électrique sous l'effet d'un champ électrique, au sein d'un support (dans le cas présent : un gel de polyacrylamide ou gel PAGE). Les électrophorèses sont réalisées en conditions dénaturantes, c'est à dire en présence de SDS qui confère une charge négative à toutes les protéines. De ce fait, leur séparation au sein du gel n'est plus soumise qu'à la seule différence de masse moléculaire.

Les protéines sont séparées en conditions dénaturantes par SDS-PAGE dans un système de migration verticale (Bio-Rad, France), avec des gels de 1,5 mm d'épaisseur. Les échantillons sont préalablement dénaturés pendant 5 minutes à 95°C dans du tampon de Laemmli (125 mM TrisHCl pH 8,0 ; 4 % (m/v) SDS ; 10 % (v/v) β mercaptoéthanol ; 0,004 % (m/v) bleu de bromophénol). Le gel est formé d'un gel de concentration à 5 % de polyacrylamide en tampon (0,5 M Tris HCl pH 6,8 ; 0,1 M (m/v) SDS) et d'un gel de séparation de polyacrylamide à 8-12 % selon la masse moléculaire des protéines d'intérêts en tampon (1,5 M Tris-HCl pH 8,3 ; 19,2 mM glycine ; 0,01 % (m/v) SDS). Les protéines migrent ensuite à 50 V constants dans le gel de concentration et 100 V constants dans le gel de séparation.

2. Électrotransfert et révélation

Une fois séparées, les protéines d'intérêt sont transférées sous l'effet d'un courant électrique (350 mA pendant 50 minutes) sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est ensuite saturée pendant 1 heure dans une solution de blocage (2 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween-20, 5 % (m/v) composée soit de lait soit d'albumine sérique bovine) afin d'éliminer tous les sites de liaisons non spécifiques. Après saturation, la membrane est incubée pendant la nuit à 4 °C sous agitation douce en présence d'anticorps spécifiques de la protéine d'intérêt qui sont dilués dans la solution de blocage. Ceci va permettre la fixation de l'anticorps sur la protéine d'intérêt. Après lavages dans [2 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween-20], la membrane est incubée 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à une peroxydase lui aussi dilué dans la solution de blocage. Ce deuxième anticorps vient se fixer sur le premier anticorps. La membrane est ensuite lavée et la protéine d'intérêt est détectée et révélée par chimiluminescence (GE Healthcare, France). La peroxydase va émettre une bande dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de protéine d'intérêt. Les bandes obtenues sont quantifiées par densitométrie avec le logiciel ImageJ.

III. Biologie cellulaire

A. Culture des neurones primaires

Des rattes de la souche Wistar sont achetées auprès du fournisseur agréé Janvier (Le Genest Saint Isle, France) et introduites dans l'animalerie au 14^{ème} jour de gestation. Ces

animaux sont maintenus avec accès *ad libitum* à la nourriture standard et à l'eau de boisson dans des conditions régulées de température et d'humidité selon un cycle lumière/obscurité de 12 heures pendant 72 heures, donc jusqu'au 17^{ème} jour de gestation.

Toutes les étapes suivantes sont effectuées dans des conditions stériles sous hotte à flux laminaire avec du matériel stérile ou à usage unique. La veille de la culture, les plaques de culture sont traitées par une solution aqueuse et stérile de poly-ornithine (Sigma) à une concentration de 15 g/mL pour les plaques de culture destinées aux analyses par western blot et par MTT, et de 150 µg/mL pour les plaques destinées aux analyses immunohistochimiques par microscopie. Les plaques sont ensuite placées dans un incubateur sous atmosphère humide à 35 °C et 6 % CO₂. La poly-ornithine permet de former un réseau polymérique homogène ayant un rôle de support et d'adhérence pour la croissance des neurones.

Au 17^{ème} jour de gestation, la rate est mise à mort par inhalation d'une dose létale d'halotane (Mundipharma, Boulogne-Billancourt) sous une sorbonne. L'abdomen est désinfecté à l'éthanol et est incisé et l'utérus gravide est récupéré et rincé dans une solution de PBS-Glucose. La paroi utérine et du sac vitellin est sectionnée, et les embryons sont rapidement placés dans une solution de PBS-Glucose avant d'être décapités. Une incision transversale permet ensuite d'ouvrir la boîte crânienne et d'en extraire le cerveau qui est placé dans un milieu de base afin d'y être disséqué sous loupe binoculaire (Tableau 4).

Tableau 4 : Composition des milieux de culture primaire de neurones corticaux embryonnaires de rats

Milieux	Compositions	Concentrations	Fournisseurs
Milieu de base (pH=7,4)	DMEM (Dulbecco-Modified Eagle's medium) Réf. 31600-083		Invitrogen (Cergy-Pontoise, France)
	Ham's F-12 (Réf. 32500-035)		Invitrogen
	L-Glutamine	200 mM	Invitrogen
	D-Glucose	35 mM	Sigma (St Quentin Fallavier, France)
	NaHCO ₃	800 mM	Sigma
	HEPES	100 mM	Invitrogen
	Pénicilline/streptomycine	10 UI/mL	Invitrogen
Milieu complet M2 (pH=7,4)	Milieu de base + apotransferrine	1,25 µM	Sigma
	Insuline	4,5 µM	Sigma
	Progestérone	20 µM	Sigma
	Putrescine	60 µM	Sigma
	Sélénium	30 µM	Sigma
Milieu de culture (pH=7,4)	Milieu complet + Ovalbumine	20 µM	Sigma

Les hémisphères cérébraux sont séparés puis les méninges et les bulbes olfactifs sont éliminés, ce qui permet d'isoler le cortex cérébral. Les cortex des différents embryons récupérés sont rassemblés et incubés pendant 5 minutes à température ambiante sous agitation lente et douce dans 20 mL d'une solution Trypsine/EDTA 1X (Invitrogen) contenant 18,8 µM de trypsine et 6,8 µM d'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) dans le PBS. Une fois décantés, les tissus sont incubés pendant 10 minutes à 37 °C dans 8 mL de milieu de base contenant 2,5 % de sérum de veau fœtal (SVF, Invitrogen) et 0,06 mg de DNase. Les amas cellulaires sont ensuite dissociés mécaniquement par

aspiration/refoulement à l'aide d'une micropipette et d'un cône stérile puis centrifugés pendant 5 minutes à 700 g. Deux lavages de la suspension cellulaire sont effectués avec du PBS/glucose et une centrifugation de 5 minutes à 700 g. Les culots sont ensuite remis en suspension dans 4 à 6 mL de milieu de base et homogénéisés. Ensuite, la densité cellulaire est calculée grâce à une cellule de Thoma. Les plaques 6 puits sontensemencées à une densité de 1,5 millions de cellules/puits, les plaques 12 puits à une densité de 500 000 cellules/puits, les plaques 24 puits à une densité de 300 000 cellules/puits et les plaques 4 puits à une densité de 300 000 cellules/puits dans un milieu de culture de croissance contenant de l'ovalbumine 20 μ M (M2-OV). Les plaques sont ensuite placées dans l'incubateur à 35 °C et 6 % CO₂ sous atmosphère humide. Après 7 jours, la population cellulaire est caractérisée pour être composée à plus de 95% de neurones.

B. Traitements par les oligonucléotides antisens

Deux couples d'oligonucléotides antisens AS1 et AS2 (inhibiteurs) et deux oligonucléotides sens S1 et S2 (témoins) (Thermofisher) ont été utilisés afin de réduire l'expression de LSR dans les neurones corticaux primaires de rats. Les neurones ont été incubés pendant 48 heures en présence de ces différents oligonucléotides, préalablement dilués à 4 μ M dans du milieu complet M2. 48 heures après, le milieu est remplacé par du milieu frais contenant le peptide A β soluble ainsi que de nouveaux oligonucléotides antisens. Les séquences des oligonucléotides sens S1 et S2 se trouvent respectivement à proximité du codon d'initiation et de la région 3' UTR et sont mentionnées dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Séquences des oligonucléotides antisens

Désignation	Type	Séquence
AS1	Antisens	5'-GCC ATC GCG GCC GTC TAG CA-3'
AS2	Antisens	5'-AAG CTA CAT ACA AAA CGT GG-3'
S1	Sens	5'-TGC TAG ACG GCC GCG ATG GC-3'
S2	Sens	5'-CCA CGT TTT GTA TGT AGC TT-3'

C. Traitement par les siRNA

1. INTERFERin®

Les siRNA (LifeTechnologies) sont préalablement mélangés dans du milieu Opti-MEM® puis homogénéisés délicatement par reflux. L'agent de transfection INTERFERin® (Polyplus Transfection) est ajouté dans le mélange précédent dans les quantités recommandées par le fournisseur, et le mélange est immédiatement vortexé pendant 10 secondes avant d'être incubé pendant 10 minutes à température ambiante afin que des liposomes se forment et encapsulent les siRNA. Pendant ces 10 min d'incubation, le milieu de culture est éliminé des supports de culture et remplacé par du milieu frais. Les siRNA sont ensuite ajoutés dans les puits à une concentration finale de 1 μ M.

2. Lipofectamine

Les siRNA sont mélangés dans du milieu Opti-MEM®. En parallèle, l'agent de transfection Lipofectamine (Fischer Scientific) est préalablement mélangé à du milieu Opti-Mem dans des quantités recommandées par le fournisseur pendant 5 minutes à température ambiante avant d'être ajouté avec les siRNA avec un ratio 1 : 1 (v : v). Le mélange est incubé pendant 10 minutes à température ambiante afin que des liposomes se forment et encapsulent les siRNA. Pendant ce temps d'incubation, le milieu de culture est éliminé des supports de culture et remplacé par du milieu frais. Les siRNA sont ensuite ajoutés dans les puits à une concentration finale de 1 μ M.

3. TransIT-TKO

L'agent de transfection TransIT-TKO (Mirus Bio) est dilué dans du milieu Opti-MEM® dans les quantités recommandées par le fournisseur. Le mélange est homogénéisé par reflux. Les siRNA sont ensuite ajoutés dans le mélange précédent et mélangés par reflux. Le tout est incubé pendant 20 minutes à température ambiante afin que des complexes de liposomes se forment. Pendant ce temps d'incubation, le milieu de culture des supports de culture est éliminé et remplacé par du milieu frais. Les siRNA sont ensuite ajoutés dans les puits à une concentration finale de 1 μ M.

D. Préparation des peptides

Le peptide A β (1-42) en provenance de Bachem (France) est préparé selon la méthode décrite par Pillot (Pillot *et al.*, 1996, 1999). Les peptides sont solubilisés dans

l'hexafluoro-2-propanol (Sigma, France) à une concentration de 5 mg/mL. Au moment de l'utilisation, des aliquots de la solution stock sont rapidement évaporés sous azote et solubilisés à la concentration voulue dans une solution de NaCl à 0,9 % (m/v) et conservés en fractions aliquotées congelées à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ afin d'éviter l'agrégation des peptides. Ainsi préparée, la solution d'oligomères $\text{A}\beta$ solubles contient un mélange de monomères, dimères, trimères et tétramères (Figure 34).

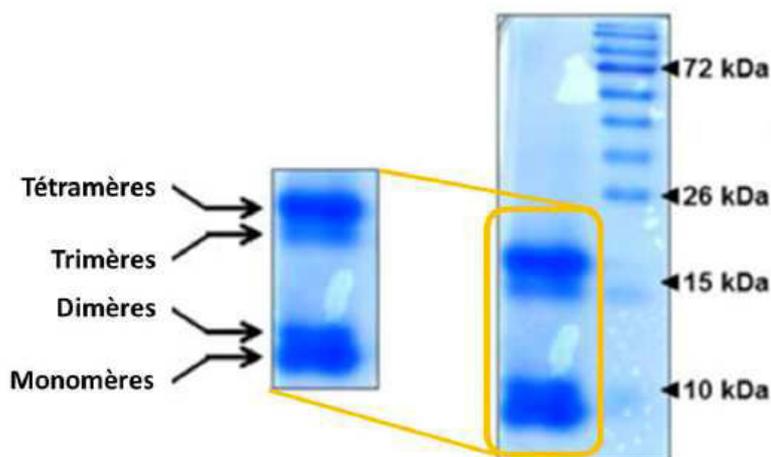


Figure 34 : Contrôle d'une préparation d'oligomères de peptide $\text{A}\beta$ (d'après Desbène *et al.* 2012)

E. Traitement par le peptide $\text{A}\beta$ soluble

Les traitements par le peptide $\text{A}\beta$ sont effectués 5 ou 6 jours après la mise en culture des neurones.

Pour les traitements avec les siRNA, les solutions stock de peptides (1mM dans l'hexafluoro-2-propanol) sont rapidement solubilisées dans du milieu complet M2 sans ovalbumine, pour une concentration finale de $0,5\text{ }\mu\text{M}$ et ajoutées au milieu contenant les siRNA. Pour les traitements avec les oligonucléotides antisens, le milieu est aspiré des supports de culture et immédiatement remplacé par du milieu frais contenant le peptide $\text{A}\beta$ soluble pour une concentration finale de $0,5\text{ }\mu\text{M}$ ainsi que les oligonucléotides antisens à une concentration de $4\text{ }\mu\text{M}$. Les neurones sont exposés aux oligomères solubles de peptide $\text{A}\beta_{42}$, pendant des durées variables allant de 6 heures à 48 heures. La toxicité cellulaire du peptide $\text{A}\beta$ est évaluée après 48 heures de traitement.

F. Test d'activité mitochondriale au MTT

1. Principe

Le MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium, Sigma) est un sel dont le cycle tétrazolium peut être clivé par la succinate déshydrogénase des mitochondries actives, formant après réduction des cristaux de formazan violets qui précipitent dans les cellules. Comme la réduction de ces composés ne peut avoir lieu que dans des cellules métaboliquement actives, ces composés sont utilisés pour apprécier la viabilité des cellules et l'état de leurs systèmes redox. La solubilisation de ces cristaux en milieu organique DMSO (diméthylsulfoxyde) donne une solution colorée dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de cellules métaboliquement actives. Les données de spectrophotométrie obtenues sont utilisées classiquement comme indicateurs de viabilité et de prolifération cellulaire, ou *a contrario* de cytotoxicité. Les résultats obtenus par ce test sur les neurones primaires sont bien corrélés avec ceux d'autres tests de viabilité des neurones, comme celui à la calcéine qui explore l'activité des estérases intracellulaires. Les valeurs sont exprimées en pourcentage par rapport aux valeurs obtenues à partir de neurones témoins.

2. Protocole

À la fin du traitement, un volume d'une solution de MTT à 12 mM dans le PBS/glucose est ajouté dans le puits à raison de 10 % du volume de milieu de culture. Les cellules sont alors incubées 1 heure à 37 °C, période durant laquelle des cristaux de formazan apparaissent dans les cellules. Le surnageant est alors remplacé par 150 µL de DMSO de façon à lyser les cellules et solubiliser ces cristaux. Après 10 minutes sous agitation, 100 µL de la solution de DMSO de chaque puits sont transférés en plaque de microtitration de 96 puits, avant de mesurer l'intensité de la coloration à 570 nm au moyen d'un lecteur de microplaque (Fluostar, BMG LabTechnologies, Champigny-sur-Marne).

IV. Biologie moléculaire

A. Extraction des ARN sur tissus

Pour l'extraction d'ARN, des demi-hippocampes sont homogénéisés dans 1 mL de tampon de lyse QIAzol Lysis reagent (Quiagen) mécaniquement par

aspiration/refoulement. Les ARN totaux sont extraits des hippocampes en utilisant le kit *RNeasy Microarray Tissue* (Qiagen). Les échantillons homogénéisés sont placés à température ambiante pendant 5 minutes afin de dissocier les complexes nucléoprotéiques. 200 μ L de chloroforme sont ajoutés dans chaque échantillon puis vortexés. Les tubes sont ensuite placés à température ambiante pendant 2 à 3 minutes puis centrifugés à 12000 g pendant 15 minutes à 4 °C. 3 phases sont obtenues : phase supérieure aqueuse incolore contenant les ARN, une interphase blanche, une phase inférieure organique rouge. La phase supérieure est récupérée et transférée dans un nouveau microtube. Ensuite, 600 μ L d'éthanol 70 % sont ajoutés et mélangés délicatement par reflux. 700 μ L d'échantillons sont ensuite placés dans une colonne puis centrifugés pendant 15 secondes à 8000 g. La colonne est lavée avec l'ajout de 350 μ L de tampon RW1 et une centrifugation de 15 secondes à 8000 g. 80 μ L de DNase sont ajoutés dans les différents échantillons qui sont laissés à température ambiante pendant 15 minutes. La colonne est de nouveau lavée par l'ajout de 350 μ L de tampon RW1 et une centrifugation de 15 secondes à 8000 g. Deux autres lavages sont réalisés, le premier par l'ajout de 500 μ L de tampon RPE et une centrifugation de 15 secondes à 8000 g et le deuxième par l'ajout de 500 μ L de tampon RPE et une centrifugation de 2 minutes à 8000 g. Une centrifugation supplémentaire d'une minute à 800 g est réalisée pour sécher la colonne, puis les ARN sont élués dans 40 μ L d'eau sans RNase. Les ARNs sont immédiatement quantifiés.

B. Quantification des ARN et gel d'électrophorèse

La concentration en ARN total est déterminée par un spectrophotomètre (Eppendorf) à une longueur d'onde de 260 nm tandis que la pureté des ARN est calculée par le ratio de la valeur d'absorbance 260 nm/280 nm. Les échantillons avec un ratio inférieur à 1,7 sont éliminés.

La qualité des ARN est vérifiée en déposant 1 μ g d'ARN sur un gel d'agarose 1 % dans du tampon TBE 0,5X (45 mM Tris base, pH 8,0, contenant 45 mM d'acide borique, et 1 mM EDTA). 1/6^{ème} du volume final de tampon de charge (60 mM Tris-HCl, pH=7.5 contenant 60 mM EDTA, 60 % (m/v) glycérol, bleu bromophénol, xylène cyanol, et EvaGreen® ; Jena Bioscience) est ajouté à chaque échantillon. La migration du gel se fait à 100 V pendant environ 1 heure. Ensuite, le gel est analysé sous UV en utilisant le système d'image VersaDocTM. La présence de deux bandes pour les sous unités 28S et 18S avec

une bande 28S deux fois plus importante que la 18S est preuve de la bonne intégrité de l'ARN et de son utilisation possible pour les études d'expression génique.

C. Transcription inverse

500 ng d'ARN obtenus après extraction sont utilisés pour synthétiser de l'ADNc et ajoutés à un mix d'élimination de l'ADN génomique. Le tout est mélangé doucement par reflux puis incubé pendant 5 minutes à 42 °C et placé immédiatement dans la glace pendant 1 minute au minimum. 10 µL de mix de transcription inverse sont ajoutés par échantillon et mélangés doucement par reflux et incubés pendant 15 minutes à 42 °C. La réaction est stoppée en incubant les échantillons pendant 5 minutes à 95 °C. De l'eau sans RNase est ajoutée à chaque échantillon, puis le tout est homogénéisé par reflux et stocké à -20 °C.

D. PCR quantitative à temps réel

La PCR quantitative en temps réel permet de suivre au cours du temps (« en temps réel ») le processus de PCR à l'aide de la fluorescence. La fluorescence obtenue est proportionnelle à la quantité de produits amplifiés. Plus l'échantillon est concentré en molécules d'intérêt à l'origine, moins il faudra de cycles pour obtenir un signal fluorescent significativement supérieur au bruit de fond. Des plaques à PCR (PAMM-057ZC-12RT² Profiler PCR Array Mouse Alzheimer's Disease, Qiagen) ont été utilisées. Ces plaques à PCR sont commercialisées sous la forme de plaques 96 puits, chaque puits contenant les amorces d'un gène cible. Les gènes cibles présents dans ces plaques sont définis par le fournisseur et interviennent dans différents processus de la MA, tels que le métabolisme du peptide A β , la formation synaptique, l'apoptose et le métabolisme du cholestérol cérébral. La PCR quantitative est réalisée avec le système *StepOnePlusTM* Real-time PCR system (Applied Biosystems) avec 500 ng d'ADNc mélangés à un mix *PowerSYBR Green PCR Master* (selon les recommandations des systèmes Applied). 25 µL du mélange précédemment préparé sont ajoutés dans chaque puits de la plaque de qPCR. Les paramètres d'amplification sont 10 minutes à 95 °C puis 40 cycles de 15 secondes à 95 °C et une minute à 60 °C. Pour normaliser les résultats obtenus, la moyenne de 5 gènes contrôles a été calculée.

V. Analyses statistiques

Le logiciel STAT VIEW a été utilisé pour l'analyse statistique des résultats. Les différences entre les différents groupes d'animaux ont été déterminées en employant le test t de Student. Des comparaisons multiples ont été réalisées au sein de groupes expérimentaux en utilisant des analyses de variances (analysis of variance ou ANOVA), afin de mettre en évidence d'éventuelles différences. Toutes les différences mises en évidence par ANOVA ont ensuite été confirmées par un test post hoc de Scheffe. Les valeurs de p inférieures à 0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives. Toutes les valeurs rapportées dans la partie Résultats de ce document ont été exprimées en associant la moyenne (m) des valeurs et l'erreur standard de la moyenne (SEM) (moyenne +/- SEM).

Chapitre III : Résultats et discussions

I. Brain region-specific immunolocalization of the lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) and altered cholesterol distribution in aged LSR^{+/-} mice

(Article publié dans Journal of Neurochemistry)

Cholesterol is a major component of the brain and is essential for cognitive function because of its role in the formation of functional synapses allowing communication between neurons [for review, (Schreurs 2010)]. Indeed, neuronal requirement for cholesterol is elevated because of the high density of axonal membranes and myelin sheath, of which this sterol is a major component [for review, (Pfrieger and Ungerer 2011)]. Cholesterol is delivered to tissues via lipoprotein particles. However, the brain's access to cholesterol and other lipids in the peripheral circulation is complicated by the presence of the blood–brain barrier (BBB), which serves as a selective low-permeable multicellular barrier. The brain must therefore rely on its own network capable of synthesizing, internalizing and metabolizing these lipids to provide the necessary components for neuronal cell membrane function. The glial cells play a central role towards providing neurons with lipids, and in particular cholesterol, in the form of lipoproteins. Lipoproteins in the CSF are very different from those of the periphery, and have been characterized as high-density lipoprotein-like particles containing primarily apolipoprotein (apo)E and apoJ (Boyles *et al.* 1985; Pitas *et al.* 1987; Kim *et al.* 2009a).

Studies have revealed the presence of the low-density lipoprotein receptor (LDL-R) in the CNS that is mainly expressed in astrocytes and endothelial cells throughout brain parenchyma (Rapp *et al.* 2006). ApoE levels in the CSF accumulate in LDL-R^{-/-} mice (Fryer *et al.* 2005), and are decreased when LDL-R is over-expressed (Kim *et al.* 2009b), suggesting a role of LDL-R in CNS apoE metabolism. The absence of LDL-R also is related with decreased pre-synaptic bouton density in the hippocampus (Mulder *et al.* 1993), as well as increased locomotor activity (Elder *et al.* 2008). This receptor is found throughout the brain, and although highly enriched in the brainstem, no significant changes in cholesterol content was observed in this region of LDL-R^{-/-} mice (Taha *et al.* 2009).

Other lipoprotein receptors in the LDL-R family also appear to play an important role in lipid homeostasis and cholesterol metabolism of neurons (Ladu *et al.* 2000; Qiu *et al.* 2006; Vance and Hayashi 2010). Among them, the LDL-R-related protein (LRP1) expression in the CNS has been the subject of many studies. Its expression is more selective and has been detected specifically in neuronal cell bodies and proximal processes including the hippocampus and the cerebellum (Pitas *et al.* 1987; Herz and Chen 2006), as well as in the pericytes (Tooyama *et al.* 1995). LRP1 is also found in astrocytic foot processes and along capillary membranes in a discontinuous manner, reflecting a role in the selective permeability at the level of the BBB (Herz 2003). Indeed, LRP1 has been implicated in the transport and metabolism of the β -amyloid peptide (Fujiyoshi *et al.* 2011). Deletion of the LRP gene results in embryonic lethality associated with severe malformations of the CNS (Herz *et al.* 1992) which clearly shows a critical role of this receptor in

CNS development. Nevertheless, glial cell-derived apoE-containing lipoprotein-mediated activation of axonal growth to promote neuron communication is not solely LRP dependent (Matsuo *et al.* 2011). Thus, other alternative or complementary pathways/transporters may exist that contribute towards the maintenance of adequate lipid status and intercellular lipid exchange in the brain.

We have recently demonstrated that the lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR), is involved in the hepatic clearance of triglyceride-rich apoB,E-containing lipoproteins during the post-prandial phase (Yen *et al.* 2008). *In vivo* studies have shown that this receptor plays an important role in maintaining normal peripheral circulation levels of cholesterol and triglycerides, and in contributing to the regulation of lipid distribution amongst the peripheral tissues (Yen *et al.* 2008; Narvekar *et al.* 2009). Absence of both *Lsr* alleles (LSR^{-/-}) is associated with *in utero* lethality at the embryonic stage, in which both brain-localized hemorrhages and premature dorsal skin detachment are observed (Mesli *et al.* 2004). During pre-natal development, dorsal skin is initially, along with the brain, part of the same primitive structure that subsequently separates during neural tube formation, therefore suggesting that LSR could be critical for mouse brain development. Our objective therefore was to characterize LSR expression in the brain. Here, we describe for the first time the localization of the lipoprotein receptor LSR in the mouse brain, specifically in neuronal cells and in regions located at the CSF and brain parenchyma interface. In aged LSR^{+/-} mice, we detected an altered cellular brain cholesterol distribution compared with control littermates associated with decreased number of entries in the Y-maze paradigm, suggesting a role of this receptor in the regulation of cholesterol homeostasis in the CNS directly implicated in cognitive function.

Materials and methods

Materials and antibodies

All chemicals and solvents were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) unless otherwise indicated. Rabbit anti-LSR antibody was purchased from Sigma-Aldrich and goat anti-actin, mouse anti-lipoprotein lipase (LpL), mouse anti- β -tubulin, and goat anti-calbindin from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Mouse anti-neuronal nuclei (NeuN) and anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibodies were purchased from Millipore (Molsheim, France). Alexa488- and Alexa594-conjugated secondary specific anti-mouse and anti-rabbit antibodies were acquired from Molecular Probes (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Secondary anti-mouse and anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France).

Animals

Adult male C57Bl/6J mice (Janvier Breeding, Le Genest Saint Isle, France) were housed in certified animal facilities on a 12-h light/

dark cycle with a mean temperature of 21–22°C and relative humidity of $50 \pm 20\%$, and provided rodent chow diet and water *ad libitum*. LSR^{+/-} mice were produced from a colony in our animal facilities as previously described (Yen *et al.* 2008). LSR^{+/+} littermates were used as controls. Animals were handled in accordance with French State Council guidelines for the use and care of laboratory animals.

Immunofluorescence studies

Anesthetized mice were killed by decapitation. Mouse brains were immediately dissected, placed in pre-cooled (-20°C) methylbutane for 30 min at -20°C, removed and then stored at -80°C. Brain sections (14 µm) were prepared using a cryostat HM550 (Microm-Microtech, Francheville, France) and then mounted on gelatin-coated slides.

Brain sections were fixed by treating with 4% (w/v) paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered saline (PBS) for 15 min at 21°C, and then permeabilized using 0.1% (v/v) Tween-20 in PBS (30 min, 21°C). After fixing, all steps were performed at 21°C. After washing in PBS, the sections were incubated 1 h with 10% (w/v) bovine serum albumin solution, followed by a 2-h incubation with the primary antibody, and washed three times with PBS. For detection, preparations were incubated with the appropriate Alexa-fluor 488- or Alexafluor 594-conjugated secondary antibody for 2 h at 21°C in the dark. Slices were washed and mounted on slides using Fluoromount.

Cholesterol staining

Membrane-bound non-esterified cholesterol was stained using the filipin dye. Briefly, after fixing brain preparations with 4% PFA, the coverslips were incubated in 125 µg/mL filipin in 10% bovine serum albumin for 2 h in the dark, washed in PBS, and then mounted onto slides. For staining of intracellular lipids droplets, PFA-fixed brain sections were incubated with Nile Red dye (10 µg/mL) for 30 min, and then washed in PBS, and mounted onto slides using Prolong Gold antifade reagentTM, which contains DAPI (Invitrogen). Preparations were visualized and digitized images were taken using identical exposure times of preparations from at least three different mice using either a fluorescence microscope (Nikon, Champigny-sur-Marne, France) or an FV10i-W confocal microscope (Olympus, Rungis, France). Quantitation of the lipid droplets observed in 18-month-old mice was performed using ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>), using the option 'analyze particle'.

Lipid analysis of brain structures

The cerebellum, cortex, hippocampus, and hypothalamus were isolated, rinsed in physiological saline, snap frozen in liquid N₂, and stored at -80°C. Lipid extractions were performed on pre-weighed lyophilized tissue samples followed by analysis of triglycerides, total cholesterol, and phospholipids using enzymatic kits (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France), as previously described (Yen *et al.* 2008).

Immunoblotting

Brain structures homogenates were prepared in radioimmunoprecipitation lysis buffer as previously described (Yen *et al.* 2008). Identical amounts of protein (20–30 µg) were separated by electro-

phoresis on 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis, and then transferred to nitrocellulose membranes. Immunoblots were performed as previously described (Yen *et al.* 2008).

Behavioral analysis in Y-maze test

The Y-maze test was performed as previously described (Garcia *et al.* 2010). The maze was made of opaque Plexiglas, and each arm was 40-cm long, 16-cm high, and 9-cm wide and positioned at equal angles. Mice were placed at the end of one arm before starting the experiment countdown. The series of arm entries were recorded visually, and arm entry was validated when the hind paws of the mouse were completely placed in the arm. Spontaneous alternation behavior was monitored during a 5-min interval. Alternation scores were calculated by analyzing overlapping triplet's sets. The percentage alternation was calculated as the ratio of actual (total alternations) to possible alternations.

Statistical analysis

All results are presented as mean and SEM. Statistical significance was assessed by the Student's *t*-test, with significance considered at *p* values < 0.05.

Results and discussion

LSR is expressed in region-specific neuronal cells, but not in astrocytes

We initially examined the general staining pattern of LSR by immunofluorescence in brain coronal sections of wild-type C57BL6/Rj mice, which appeared to be most marked in the hippocampus, hypothalamus, cerebellum, and areas surrounding the ventricles (data not shown).

A more detailed immunohistochemical study on these different structures was next performed to determine the cell-type localization of LSR using different cell-specific markers (Fig. 1). In the hippocampus (Fig. 1a), LSR was detected in NeuN-positively labeled neurons in the dentate gyrus as well as in the CA1 region, with a staining pattern suggestive of receptor distribution on the cell body membrane and neurites of hippocampal pyramidal neurons. LSR expression was also observed in other pyramidal-shaped neurons in the cerebellum, most particularly in cell bodies and neurites of Purkinje cells (Fig. 1b). Interestingly, fluorescence was not detected in the granular, or in the molecular layer of the cerebellum, but rather only in Purkinje cell bodies and neurites labeled by calbindin, whose extensions penetrated the molecular layer. The yellow regions in the merged picture (Fig. 1b, bottom panel), showed that LSR expression in the cerebellum was limited to these calbindin-expressing cells.

In the third ventricle region, LSR was found to be localized in NeuN-positives neurons, often described as forming the ventro-medial nucleus of the hypothalamus, appearing to be localized at the membrane (Fig. 1c, left panels, close-up). Double staining with an antibody for astrocyte-specific GFAP revealed that all GFAP-positive cells remained negative for

allowing lipid transport in the whole CNS. The presence of LSR at the apical side of ependymocytes, could therefore be consistent with its function of lipoprotein receptor as described for the liver (Yen *et al.* 2008; Narvekar *et al.* 2009). The absence of LDL-R did not significantly alter brain polyunsaturated fatty acid composition (Chen *et al.* 2008), suggesting that the brain may acquire these lipids through other pathways independent of the LDL-R. LDL-R^{-/-} mice crossed with LSR^{+/-} mice led to a significant decrease in docosahexaenoic acid/arachidonic acid ratio in the hippocampus (unpublished observations). As docosahexaenoic acid in the brain is acquired primarily from the periphery, this suggests that LSR may be involved in lipid transport in the brain. Further investigations are underway to identify the specific role of LSR in lipoprotein transport at the apical membrane of ependymocytes.

LSR is localized in the choroid plexus of the mouse brain

The choroid plexus is an epithelium-like structure located on the inner side of the lateral ventricles and is responsible for continuous CSF secretion. It is also present in the third ventricle and the roof of the fourth ventricle, and appears as a detached structure located in the dorsal part of the third ventricle lumen. The leptin receptor, originally cloned from this region (Tartaglia *et al.* 1995) was used as marker for this structure and found to colocalize with LSR expression (Fig. 1d), thus indicating that LSR was also expressed in choroidal cells. Interestingly, we had previously reported that leptin regulates LSR protein levels through the pErk canonical signaling pathway induced upon interaction of leptin with its receptor (Stenger *et al.* 2010). It could therefore be speculated that a similar regulatory mechanism is present in the CNS.

A second, more permeable barrier is present inside the brain at the level of the ventricle and choroid plexus, called the blood-CSF barrier. CSF is secreted from the choroid plexus surrounding the inner side of cerebral ventricle, and its components are essential for neurons to function where its chemical composition reflects brain function and status. The choroid plexus has also been shown to be an important site for the clearance of β -amyloid peptide, and expresses both megalin and LRP1, two receptors thought to be involved in the clearance of leptin and beta amyloid, respectively (Dietrich *et al.* 2008; Fujiyoshi *et al.* 2011). Ependymocytes represent the main cellular component of the choroid plexus and are responsible for CSF secretion. As the choroid plexus is a region rich in capillaries and membrane-associated shuttle systems for communication between brain parenchyma and CSF, this would represent another potential region in which LSR may play a role in the transport of lipids. Interestingly, a recent report by Daneman's laboratory identified the presence of *lsr* gene transcript in the endothelial cells of the brain which form the BBB (Daneman *et al.* 2010). Furthermore, a recent report demonstrated that LSR is

critical for the tricellular junctions of epithelial cells (Masuda *et al.* 2011), and may therefore play a similar role in the integrity of the cell barriers in the brain. Taken together, these data suggest a potential role of LSR in the transport of lipids or lipoproteins at the interface between the periphery and the brain (BBB), as well as between the brain parenchyma and CSF.

LSR expression in total protein extracts from different brain structures

The antibody used for the immunofluorescence studies was previously shown to be LSR specific (Yen *et al.* 2008; Stenger *et al.* 2010). Nevertheless, immunoblots were performed on homogenates prepared from the hippocampus, cerebellum, and hypothalamus, and revealed a band with an apparent molecular mass between 58 and 61 kDa, corresponding to that observed for hepatic LSR (Fig. 1e) (Yen *et al.* 1999). Although immunohistochemical studies did not detect a strong signal of LSR in the frontal cortex, immunoblotting revealed the presence of LSR in this brain region as well (data not shown).

Hepatic LSR activity as a lipoprotein receptor requires the presence of free fatty acids (FFAs), which causes a conformational change of the receptor exposing a binding site for apoB or apoE (Bihain and Yen 1992; Yen *et al.* 1994). As FFAs are lipolytic products, immunoblots were also performed to determine if lipoprotein lipase (LpL) protein could be detected on the same structures in which LSR was expressed. LpL protein was present to different degrees in all structures tested (Fig. 1e). This lipase appeared quite strongly expressed in the hippocampus (Fig. 1e), as had been previously reported (Goldberg *et al.* 1989). LpL was also detected in the frontal cortex (data not shown). The presence of LpL in these regions could therefore potentially provide the source of FFA that would be needed for LSR to function as a lipoprotein receptor. Interestingly, a study did report significant learning and memory deficits in mice lacking LpL, suggesting that LpL function is somehow connected to lipid status in the brain through as yet undefined mechanisms (Xian *et al.* 2009). We would propose that the presence of LpL in the different brain structures and most particularly the pyramidal neurons of the hippocampus (Goldberg *et al.* 1989), provides the means to produce FFA necessary for LSR to function as a lipoprotein receptor. If LpL is deficient, the resulting lack of FFA would lead to suboptimal activity of LSR, thus preventing the maintenance of appropriate lipid status in the neurons in this region. We next sought for evidence of cognition dysfunction in mice with reduced LSR expression.

Aged LSR^{+/-} mice demonstrate decreased exploratory activity in Y-maze behavior test

The absence of both alleles of LSR is embryonic lethal (Mesli *et al.* 2004). However, heterozygote LSR^{+/-} mice are

viable, and exhibit decreased lipoprotein clearance during the post-prandial phase (Yen *et al.* 2008). Initial observations of young LSR^{+/-} mice did not reveal any grossly evident phenotype relating to potential neurological problems. We did, however, observe a significant impact of reduced LSR expression in aging LSR^{+/-} mice on peripheral lipid homeostasis in the form of higher body mass and potential peripheral leptin resistance that was most marked in female mice (Stenger *et al.* 2010). In view of LSR's region-specific distribution in neurons of brain structures related to learning and memory, we questioned if potential changes in the CNS could also be observed as a result of reduced LSR expression with age. To avoid potential effects of hormonal variations for the behavioral assessment, we used young (10 weeks) and aged (18 months) male LSR^{+/-} mice as compared to control LSR^{+/-} littermates on standard diets. Neither group displayed a significant difference in body weight (data not shown). Our previous studies have shown no difference in food intake in LSR^{+/-} mice on a standard diet (Yen *et al.* 2008; Stenger *et al.* 2010). The Y-maze behavioral test is widely used to detect potential cognitive impairments, including spatial memory and short-term memory in rodents, and primarily reflects hippocampus function. Furthermore, while the cerebellum is associated with locomotor activity, it can also be involved in cognition, specifically via the Purkinje cells (Burguiere *et al.* 2010; Rochefort *et al.* 2011). We found that while spontaneous alternance did not differ between the LSR^{+/+} and LSR^{+/-} of both young and old mice (Fig. 2a), the number of entries into Y-maze arms was

significantly lower in 10-week- and 18-month-old LSR^{+/-} mice as compared to age-matched controls (Fig. 2b). This may have been primarily because of a significantly longer latency in the initial arm entry (Fig. 2c). Closer examination revealed that while the total time in the arm 2–8 entries was not different in the two groups of young mice, it was significantly different in the older LSR^{+/-} mice as compared to age-matched controls (Fig. 2d). As this was the first time that the mice had been exposed to the Y-maze, these results suggest that reduced LSR may be associated with cognitive disturbances related to reactivity to novel surroundings. Interestingly, a previous study suggests that Purkinje cells of the cerebellum may play an important role in determining spatial factors for the hippocampus (Rochefort *et al.* 2011), both regions of which express LSR.

Cholesterol distribution profile in young and old LSR^{+/-} mice

We then examined brain cholesterol distribution in LSR^{+/-} mice as compared to LSR^{+/+}. As cell-specific distribution of LSR was observed in the hippocampus as well as in Purkinje cells of the cerebellum, brain sections with these regions from the same young and old LSR^{+/-} and LSR^{+/+} mice were labeled with Nile Red, which stains intracellular lipid droplets. There were no significant differences in Nile Red staining of the hippocampus or cerebellum in the two groups of young mice (Fig. 3a, b, upper panels). Indeed, the staining appeared rather homogeneous and diffuse in the different brain areas. No lipid droplets were evidenced even at

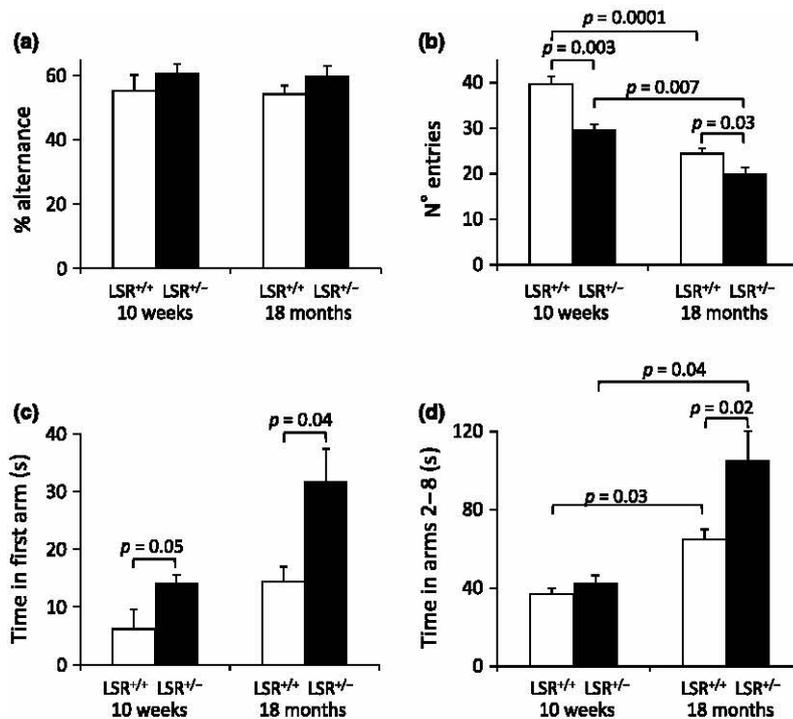


Fig. 2 Y-maze test in young and old LSR^{+/-} mice as compared with LSR^{+/+} control littermates. Young and old LSR^{+/-} mice (10 weeks, *n* = 5; 18 months, *n* = 18) and control littermates (LSR^{+/+}, 10 weeks, *n* = 4, 18 months, *n* = 14) were subjected to a Y-maze test as described in the Materials and methods. Results are shown as mean and SEM of the (a) % alternance, (b) number of entries, (c) time in the first arm, and (d) accumulated time in the subsequent 2–8 arms with the *p*-value indicated when statistically significant.

mechanisms involving LSR in the regulation of cholesterol and lipid homeostasis in the brain, as well as the consequences in terms of cognition. This in turn may lead toward the development of novel therapeutic and preventive strategies targeting LSR with the aim toward maintaining appropriate CNS lipid status and thus normal brain cognitive functions during aging.

Acknowledgements

This work was funded in part by the European League against Alzheimer's disease (LECMA), and by local grants provided by la Région Lorraine, and the University of Lorraine (BQR). CS was recipient of a post-doctoral fellowship from LECMA. AP is on a thesis scholarship provided by the French Ministry of Higher Education and Research. The authors state that there is no conflict of interest to disclose.

References

Bihain B. E. and Yen F. T. (1992) Free fatty acids activate a high-affinity saturable pathway for degradation of low-density lipoproteins in fibroblasts from a subject homozygous for familial hypercholesterolemia. *Biochemistry* **31**, 4628–4636.

Boyles J. K., Pitas R. E., Wilson E., Mahley R. W. and Taylor J. M. (1985) Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *J. Clin. Invest.* **76**, 1501–1513.

Burguiere E., Arabo A., Jarlier F., De Zeeuw C. I. and Rondi-Reig L. (2010) Role of the cerebellar cortex in conditioned goal-directed behavior. *J. Neurosci.* **30**, 13265–13271.

Burns M. P., Igbavboa U., Wang L., Wood W. G. and Duff K. (2006) Cholesterol distribution, not total levels, correlate with altered amyloid precursor protein processing in statin-treated mice. *Neuromolecular Med.* **8**, 319–328.

Calon F. (2011) Omega-3 polyunsaturated fatty acids in Alzheimer's disease: key questions and partial answers. *Curr. Alzheimer Res.* **8**, 470–478.

Camargo N., Brouwers J. F., Loos M., Gutmann D. H., Smit A. B. and Verheijen M. H. (2012) High-fat diet ameliorates neurological deficits caused by defective astrocyte lipid metabolism. *FASEB J.* Epub ahead of print, doi: 10.1096/fj.12-205807.

Cederholm T. and Palmblad J. (2010) Are omega-3 fatty acids options for prevention and treatment of cognitive decline and dementia? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **13**, 150–155.

Chen C. T., Ma D. W., Kim J. H., Mount H. T. and Bazinet R. P. (2008) The low density lipoprotein receptor is not necessary for maintaining mouse brain polyunsaturated fatty acid concentrations. *J. Lipid Res.* **49**, 147–152.

Daneman R., Zhou L., Agalliu D., Cahoy J. D., Kaushal A. and Barres B. A. (2010) The mouse blood-brain barrier transcriptome: a new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells. *PLoS ONE* **5**, e13741.

Demeester N., Castro G., Desrumaux C. *et al.* (2000) Characterization and functional studies of lipoproteins, lipid transfer proteins, and lecithin:cholesterol acyltransferase in CSF of normal individuals and patients with Alzheimer's disease. *J. Lipid Res.* **41**, 963–974.

Dietrich M. O., Spuch C., Antequera D., Rodal I., de Yébenes J. G., Molina J. A., Bermejo F. and Carro E. (2008) Megalin mediates the transport of leptin across the blood-CSF barrier. *Neurobiol. Aging* **29**, 902–912.

Di Paolo G. and Kim T. W. (2011) Linking lipids to Alzheimer's disease: cholesterol and beyond. *Nat. Rev. Neurosci.* **12**, 284–296.

Elder G. A., Ragnauth A., Dorr N., Franciosi S., Schmeidler J., Haroutunian V. and Buxbaum J. D. (2008) Increased locomotor activity in mice lacking the low-density lipoprotein receptor. *Behav. Brain Res.* **191**, 256–265.

Fryer J. D., Demattos R. B., McCormick L. M. *et al.* (2005) The low density lipoprotein receptor regulates the level of central nervous system human and murine apolipoprotein E but does not modify amyloid plaque pathology in PDAPP mice. *J. Biol. Chem.* **280**, 25754–25759.

Fujiyoshi M., Tachikawa M., Ohtsuki S. *et al.* (2011) Amyloid-beta peptide(1–40) elimination from cerebrospinal fluid involves low-density lipoprotein receptor-related protein 1 at the blood-cerebrospinal fluid barrier. *J. Neurochem.* **118**, 407–415.

Gamba P., Testa G., Sottero B., Gargiulo S., Poli G. and Leonarduzzi G. (2012) The link between altered cholesterol metabolism and Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1259**, 54–64.

Garcia P., Youssef I., Utvik J. K. *et al.* (2010) Ciliary neurotrophic factor cell-based delivery prevents synaptic impairment and improves memory in mouse models of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **30**, 7516–7527.

Goldberg I. J., Soprano D. R., Wyatt M. L., Vanni T. M., Kirchgessner T. G. and Schotz M. C. (1989) Localization of lipoprotein lipase mRNA in selected rat tissues. *J. Lipid Res.* **30**, 1569–1577.

Greenspan P., Mayer E. P. and Fowler S. D. (1985) Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J. Cell Biol.* **100**, 965–973.

Herz J. (2003) LRP: a bright beacon at the blood-brain barrier. *J. Clin. Invest.* **112**, 1483–1485.

Herz J. and Chen Y. (2006) Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 850–859.

Herz J., Clouthier D. E. and Hammer R. E. (1992) LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell* **71**, 411–421.

Huang T. L. (2010) Omega-3 fatty acids, cognitive decline, and Alzheimer's disease: a critical review and evaluation of the literature. *J. Alzheimers Dis.* **21**, 673–690.

Kim J., Basak J. M. and Holtzman D. M. (2009a) The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron* **63**, 287–303.

Kim J., Castellano J. M., Jiang H., Basak J. M., Parsadanian M., Pham V., Mason S. M., Paul S. M. and Holtzman D. M. (2009b) Overexpression of low-density lipoprotein receptor in the brain markedly inhibits amyloid deposition and increases extracellular A beta clearance. *Neuron* **64**, 632–644.

Krisanova N., Sivko R., Kasatkina L. and Borisova T. (2012) Neuroprotection by lowering cholesterol: a decrease in membrane cholesterol content reduces transporter-mediated glutamate release from brain nerve terminals. *Biochim. Biophys. Acta* **1822**, 1553–1561.

Ladu M. J., Reardon C., Van Eldik L., Fagan A. M., Bu G., Holtzman D. and Getz G. S. (2000) Lipoproteins in the central nervous system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **903**, 167–175.

Liu Q., Trotter J., Zhang J., Peters M. M., Cheng H., Bao J., Han X., Weeber E. J. and Bu G. (2010) Neuronal LRP1 knockout in adult mice leads to impaired brain lipid metabolism and progressive, age-dependent synapse loss and neurodegeneration. *J. Neurosci.* **30**, 17068–17078.

Masuda S., Oda Y., Sasaki H., Ikenouchi J., Higashi T., Akashi M., Nishi E. and Furuse M. (2011) LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells. *J. Cell Sci.* **124**, 548–555.

Matsuo M., Campenot R. B., Vance D. E., Ueda K. and Vance J. E. (2011) Involvement of low-density lipoprotein receptor-related protein and ABCG1 in stimulation of axonal extension by apoE-containing lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1811**, 31–38.

- Mesli S., Javorschi S., Berard A. M., Landry M., Priddle H., Kivlichan D., Smith A. J., Yen F. T., Bihain B. E. and Darmon M. (2004) Distribution of the lipolysis stimulated receptor in adult and embryonic murine tissues and lethality of LSR^{-/-} embryos at 12.5 to 14.5 days of gestation. *Eur. J. Biochem.* **271**, 3103–3114.
- Mulder M., Lombardi P., Jansen H., van Berkel T. J., Frants R. R. and Havekes L. M. (1993) Low density lipoprotein receptor internalizes low density and very low density lipoproteins that are bound to heparan sulfate proteoglycans via lipoprotein lipase. *J. Biol. Chem.* **268**, 9369–9375.
- Narvekar P., Berriel Diaz M., Kronen-Herzig A., Hardeland U., Strzoda D., Stohr S., Frohme M. and Herzig S. (2009) Liver-specific loss of lipolysis-stimulated lipoprotein receptor triggers systemic hyperlipidemia in mice. *Diabetes* **58**, 1040–1049.
- Pfrieger F. W. and Ungerer N. (2011) Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. *Prog. Lipid Res.* **50**, 357–371.
- Pitas R. E., Boyles J. K., Lee S. H., Hui D. and Weisgraber K. H. (1987) Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B, B(LDL) receptors in the brain. *J. Biol. Chem.* **262**, 14352–14360.
- Qiu S., Korwek K. M. and Weeber E. J. (2006) A fresh look at an ancient receptor family: emerging roles for low density lipoprotein receptors in synaptic plasticity and memory formation. *Neurobiol. Learn. Mem.* **85**, 16–29.
- Rapp A., Gmeiner B. and Huttlinger M. (2006) Implication of apoE isoforms in cholesterol metabolism by primary rat hippocampal neurons and astrocytes. *Biochimie* **88**, 473–483.
- Rochefort C., Arabo A., Andre M., Poucet B., Save E. and Rondi-Reig L. (2011) Cerebellum shapes hippocampal spatial code. *Science* **334**, 385–389.
- Schreurs B. G. (2010) The effects of cholesterol on learning and memory. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **34**, 1366–1379.
- Shepardson N. E., Shankar G. M. and Selkoe D. J. (2011a) Cholesterol level and statin use in Alzheimer disease: II. Review of human trials and recommendations. *Arch. Neurol.* **68**, 1385–1392.
- Shepardson N. E., Shankar G. M. and Selkoe D. J. (2011b) Cholesterol level and statin use in Alzheimer disease: I. Review of epidemiological and preclinical studies. *Arch. Neurol.* **68**, 1239–1244.
- Stenger C., Hanse M., Pratte D. *et al.* (2010) Up-regulation of hepatic lipolysis stimulated lipoprotein receptor by leptin: a potential lever for controlling lipid clearance during the postprandial phase. *FASEB J.* **24**, 4218–4228.
- Taha A. Y., Chen C. T., Liu Z., Kim J. H., Mount H. T. and Bazinet R. P. (2009) Brainstem concentrations of cholesterol are not influenced by genetic ablation of the low-density lipoprotein receptor. *Neurochem. Res.* **34**, 311–315.
- Tartaglia L. A., Dembski M., Weng X. *et al.* (1995) Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* **83**, 1263–1271.
- Tooyama I., Kawamata T., Akiyama H., Kimura H., Moestrup S. K., Gliemann J., Matsuo A. and McGeer P. L. (1995) Subcellular localization of the low density lipoprotein receptor-related protein (alpha 2-macroglobulin receptor) in human brain. *Brain Res.* **691**, 235–238.
- Uranga R. M. and Keller J. N. (2010) Diet and age interactions with regards to cholesterol regulation and brain pathogenesis. *Curr. Gerontol. Geriatr. Res.* **2010**, 219683.
- Vance J. E. and Hayashi H. (2010) Formation and function of apolipoprotein E-containing lipoproteins in the nervous system. *Biochim. Biophys. Acta* **1801**, 806–818.
- Xian X., Liu T., Yu J. *et al.* (2009) Presynaptic defects underlying impaired learning and memory function in lipoprotein lipase-deficient mice. *J. Neurosci.* **29**, 4681–4685.
- Yen F. T., Mann C. J., Guermani L. M., Hannouche N. F., Hubert N., Hornick C. A., Bordeau V. N., Agnani G. and Bihain B. E. (1994) Identification of a lipolysis-stimulated receptor that is distinct from the LDL receptor and the LDL receptor-related protein. *Biochemistry* **33**, 1172–1180.
- Yen F. T., Masson M., Clossais-Besnard N., Andre P., Grosset J. M., Bougueleret L., Dumas J. B., Guerassimenko O. and Bihain B. E. (1999) Molecular cloning of a lipolysis-stimulated remnant receptor expressed in the liver. *J. Biol. Chem.* **274**, 13390–13398.
- Yen F. T., Roitel O., Bonnard L., Notet V., Pratte D., Stenger C., Magueur E. and Bihain B. E. (2008) Lipolysis stimulated lipoprotein receptor: A novel molecular link between hyperlipidemia, weight gain, and atherosclerosis in mice. *J. Biol. Chem.* **283**, 25650–25659.

II. Résultats complémentaires

Afin de caractériser les mécanismes responsables des altérations de la distribution du cholestérol cérébral chez les souris LSR^{+/-} âgées et d'ouvrir de nouvelles perspectives par rapport à un rôle potentiel du récepteur LSR dans la physiopathologie de la MA, nous avons réalisé une étude de vieillissement sur des souris mâles et femelles LSR^{+/+} et LSR^{+/-}. Au cours de cette étude, le poids des souris a été suivi de l'âge de 6 mois jusqu'à l'âge de 19 mois de manière bimensuelle. Les masses corporelles des souris femelles LSR^{+/+} et LSR^{+/-} sont similaires et évoluent de façon progressive et identiques tout au long de leur vie (Figure 35). Par contre, nous avons remarqué chez les souris mâles LSR^{+/-} une prise de poids plus importante à partir de l'âge d'un an, pour atteindre une différence significative vers l'âge de 17 mois (Figure 35). Ces résultats mettent donc en évidence une perturbation métabolique acquise au cours du vieillissement. Les souris ont été placées dès l'âge de 6 mois en cage individuelle, il est possible que cette surcharge pondérale apparaisse suite à un manque d'activité physique de la part des souris mâles LSR^{+/-}.

Figure 35 : Evolution de la masse corporelle de souris mâles LSR^{+/+} et LSR^{+/-} au cours du vieillissement * p<0,05 entre souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-}

A la suite de l'observation d'une altération de la distribution du cholestérol cérébral au cours du vieillissement chez les souris hétérozygotes pour le récepteur LSR, nous avons voulu analyser, dans l'hippocampe de ce modèle de souris, l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol cérébral. Afin de répondre à ces objectifs et d'obtenir des informations préliminaires quant à un rôle potentiel du récepteur LSR dans la MA, nous avons utilisé des plaques de PCR quantitative à temps réel spécialement conçues pour l'étude de l'expression de gènes impliqués dans les métabolismes du cholestérol, des lipoprotéines cérébrales, du peptide A β , ainsi que dans les transmissions synaptiques ou encore dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose. La liste des gènes est prédéfinie par le fournisseur de ces plaques. Comme le démontre le nuage de points ci-dessous, peu de changements sont présents parmi les gènes étudiés entre les souris mâles LSR^{+/+} et LSR^{+/-} (Figure 36).

Figure 36 : Nuage de points représentant les deux delta Ct (Ct gènes d'intérêts-moyenne Ct des gènes de référence) d'hippocampes de souris mâles LSR^{+/+} et LSR^{+/-} âgées de 19 mois

Cependant, nous avons observé une augmentation de 103% de l'expression du gène BACE 2 chez les souris LSR^{+/-} (Tableau 6). La protéine BACE2 est un homologue de BACE1 faiblement exprimé dans le cerveau capable de cliver *in vitro* les formes sauvages et mutées de la protéine APP (Bennett *et al.*, 2000; Farzan *et al.*, 2000; Hussain *et al.*, 2000).

Nous avons aussi observé une augmentation significative de 45 % du gène butyrylcholinestérase chez les souris LSR^{+/-} (Tableau 6). Cette enzyme est capable de dégrader l'acétylcholine, qui est un neurotransmetteur important pour la transmission synaptique. L'inhibition de la butyrylcholinestérase augmente les taux d'acétylcholine dans le cerveau et améliore les capacités d'apprentissage. De plus, l'activité de ce gène est augmentée chez les patients atteints par la MA (Greig *et al.*, 2002, 2005).

Tableau 6 : Profil des changements d'expressions géniques chez les souris LSR^{+/-} par rapport aux souris LSR^{+/+}

Gène	Description du gène	Facteur de variation chez les souris LSR ^{+/-}	Valeurs de p
Métabolisme du peptide amyloïde (production, clairance, dégradation)			
<i>Adam9</i>	A disintegrin and metallopeptidase domain 9 (meltrin gamma)	1,14	0,206
<i>A2m</i>	Alpha-2-macroglobulin	1,12	0,852
<i>Ache</i>	Acetylcholinestérase	0,99	0,951
<i>Apba1</i>	Amyloid beta (A4) precursor protein binding, family A, member 1	1,1	0,445
<i>Apba3</i>	Amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 3	0,58	0,393

<i>Apbb1</i>	Amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1	1,02	0,757
<i>Apbb2</i>	Amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 2	1,04	0,753
<i>Aph1a</i>	Anterior pharynx defective 1a homolog (C. elegans)	0,97	0,971
<i>Aplp1</i>	Amyloid beta (A4) precursor-like protein 1	0,87	0,333
<i>Aplp2</i>	Amyloid beta (A4) precursor-like protein 2	1,1	0,522
<i>ApoE</i>	Apolipoprotein E	1,09	0,332
<i>App</i>	Amyloid beta (A4) precursor protein	1,05	0,159
<i>Bace1</i>	Beta-site APP cleaving enzyme 1	1,13	0,224
<i>Bace1</i>	Beta-site APP cleaving enzyme 1	1,13	0,224
<i>Bace2</i>	Beta-site APP-cleaving enzyme 2	2,03	0,043
<i>Ctsb</i>	Cathepsin B	1,01	0,948
<i>Ide</i>	Insulin degrading enzyme	0,91	0,299
<i>Lrp1</i>	Low density lipoprotein receptor-related protein 1	0,94	0,708
<i>Lrp6</i>	Low density lipoprotein receptor-related protein 6	1,14	0,41
<i>Lrp8</i>	Low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein E receptor	1,14	0,6
<i>Ncstn</i>	Nicastrin	0,94	0,457
<i>Plat</i>	Plasminogen activator, tissue	1,09	0,317
<i>Plau</i>	Plasminogen activator, urokinase	1,27	0,45

<i>Plg</i>	Plasminogen	0,54	0,357
<i>Psen1</i>	Presenilin 1	1,09	0,084
<i>Psen2</i>	Presenilin 2	0,93	0,574
<i>Ubqln1</i>	Ubiquilin 1	1,04	0,814
Microtubule et cytosquelette			
<i>Mapt</i>	Microtubule-associated protein tau	1,14	0,420
<i>Mtap2</i>	Microtubule-associated protein 2	0,03	0,504
<i>Pkp4</i>	Plakophilin 4	1,16	0,001
<i>Prkci</i>	Protein kinase C, iota	1,33	0,158
Formation et transmission synaptique			
<i>Bche</i>	Butyrylcholinesterase	1,45	0,048
<i>Bdnf</i>	Brain derived neurotrophic factor	0,99	0,966
<i>Chat</i>	Choline acetyltransferase	3,59	0,336
Métabolisme du cholestérol et des lipoprotéines			
<i>Abca1</i>	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	1,13	0,183
<i>Apoa1</i>	Apolipoprotein A-I	0,92	0,659
<i>Apoe</i>	Apolipoprotein E	1,09	0,332
<i>Clu</i>	Clusterin	0,81	0,197
<i>Hsd17b10</i>	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 10	0,90	0,290
<i>Igf2</i>	Insulin-like growth factor 2	0,83	0,878
<i>Lpl</i>	Lipoprotein lipase	0,96	0,865
<i>Sncb</i>	Synuclein, beta	1,15	0,451
Cycle cellulaire et Apoptose			

<i>Casp4</i>	Caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	0,91	0,732
<i>Cdk1</i>	Cyclin-dependent kinase 1	0,86	0,869
<i>Cdk5</i>	Cyclin-dependent kinase 5	0,94	0,594
<i>Cdk11</i>	Cyclin-dependent kinase-like 1 (CDC2-related kinase)	1,1	0,643
<i>Ep300</i>	E1A binding protein p300	1	0,877
<i>Ern1</i>	Endoplasmic reticulum (ER) to nucleus signalling 1	1,1	0,662
<i>Gap43</i>	Growth associated protein 43	1,08	0,601
<i>Gnao1</i>	Guanine nucleotide binding protein, alpha o	1,12	0,514
<i>Gnaz</i>	Guanine nucleotide binding protein, alpha z subunit	1,18	0,474
<i>Gnb1</i>	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 1	1,11	0,587
<i>Gnb2</i>	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 2	0,88	0,045
<i>Gnb4</i>	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 4	1,28	0,001
<i>Gnb5</i>	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 5	1,03	0,287
<i>Gng10</i>	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 10	0,88	0,255
<i>Gng11</i>	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 11	0,91	0,537
<i>Gng3</i>	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 3	0,94	0,287
<i>Gng4</i>	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 4	1,47	0,232
<i>Gng5</i>	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 5	0,98	0,901

<i>Gng7</i>	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 7	0,78	0,203
<i>Gng8</i>	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 8	0,84	0,717
<i>Gngt1</i>	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma transducing activity polypeptide 1	0,94	0,917
<i>Gngt2</i>	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma transducing activity polypeptide 2	1,01	0,866
<i>Gsk3a</i>	Glycogen synthase kinase 3 alpha	1,05	0,627
<i>Gsk3b</i>	Glycogen synthase kinase 3 beta	1,09	0,231
<i>Il1a</i>	Interleukin 1 alpha	1,33	0,226
<i>Insr</i>	Insulin receptor	1,05	0,739
<i>Mpo</i>	Myeloperoxidase	1,39	0,497
<i>Nae1</i>	NEDD8 activating enzyme E1 subunit 1	0,96	0,604
<i>Prkca</i>	Protein kinase C, alpha	1,08	0,666
<i>Prkcb</i>	Protein kinase C, beta	1,1	0,686
<i>Prkcc</i>	Protein kinase C, gamma	0,95	0,737
<i>Prkcd</i>	Protein kinase C, delta	2,11	0,31
<i>Prkce</i>	Protein kinase C, epsilon	1,09	0,35
<i>Prkcz</i>	Protein kinase C, zeta	0,98	0,753
<i>Snca</i>	Synuclein, alpha	0,98	0,987
<i>Uqcrc1</i>	Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1	0,97	0,901
<i>Uqcrc2</i>	Ubiquinol cytochrome c reductase core protein 2	1,08	0,593

Protéases

<i>Ctsc</i>	Cathepsin C	0,91	0,726
<i>Ctsd</i>	Cathepsin D	0,89	0,557
<i>Ctsg</i>	Cathepsin G	1,25	0,533
<i>Ctsl</i>	Cathepsin L	0,90	0,373
<i>Serpin a3c</i>	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3C	0,63	0,257
Gènes de référence			
<i>Actb</i>	Actin, beta	1,01	0,750
<i>B2m</i>	Beta-2 microglobulin	0,88	0,262
<i>Gapdh</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1,19	0,045
<i>Gusb</i>	Glucuronidase, beta	0,99	0,932
<i>Hsp90 ab1</i>	Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1	0,94	0,484

Nous avons ensuite voulu vérifier l'expression protéique de certains acteurs du métabolisme du cholestérol. Nous n'avons observé aucune différence d'expression des récepteurs LDLR et LRP1 (Figure 37 A), de l'HMGCoAR et de l'ACAT1 dans l'hippocampe de ces souris (Figure 37 B). Nous avons par contre mis en évidence une diminution significative de 24 % \pm 4,2 % de l'expression d'ABCA1 dans l'hippocampe de ces souris, ce qui suggère un déficit d'efflux du cholestérol qui pourrait expliquer les accumulations de cholestérol observées.

Figure 37 : Expressions protéiques de divers acteurs du métabolisme du cholestérol cérébral dans l'hippocampe de souris LSR^{+/+} (barres bleues) et LSR^{+/-} (barres rouges) âgées de 19 mois

Comme nous l'avons vu, le cholestérol est susceptible de jouer un rôle majeur dans la physiopathologie de la MA. Les altérations de la distribution du cholestérol cérébral ainsi que les altérations géniques de deux acteurs de la MA observées chez les souris LSR^{+/-} âgées nous ont conduit à étudier la sensibilité de ces souris au stress amyloïde.

III. Increased susceptibility of dyslipidemic heterozygous lipolysis-stimulated lipoprotein receptor LSR^{+/-} mice to amyloid stress is associated with changes in cortical cholesterol levels

(Article accepté dans Journal of Alzheimer's disease)

Increased susceptibility of dyslipidemic heterozygous lipolysis-stimulated lipoprotein receptor LSR^{+/-} mice to amyloid stress is associated with changes in cortical cholesterol levels

Anthony Pinçon^{a,b}, Mélanie H. Thomas^{a,b}, Marion Huguet^{a,b}, Ahmad Allouche^{a,b,e}, Julie C. Colin^{a,b}, Alain Georges^c, Annabelle Derrien^{a,b}, Marie-Claire Lanhers^{a,b}, Catherine Malaplate-Armand^{a,b,d}, Thierry Oster^{a,b}, Catherine Corbier^{a,b}, Thierry Pillot^{e,f}, Jean Luc Olivier^{a,b,d},
Frances T. Yen^{a,b,e,*}

^a Université de Lorraine, UR AFPA, EA3998, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54518 FRANCE,

^b INRA, UR AFPA, USC 0340 INRA, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54518 FRANCE,

^c Université de Lorraine, LARSA, IUT-NB, Vandœuvre-lès-Nancy, F54518 France,

^d Biochemistry Department, CHU de Nancy, Nancy, F-54000 FRANCE,

^eINSERM, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54518 FRANCE

Running title: Increased amyloid stress in LSR^{+/-} mice

^e Current address: SynAging SAS, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54518 FRANCE

* To whom correspondence should be addressed, Université de Lorraine, ENSAIA, URAFPA, 2 avenue de la Forêt de Haye, TSA 40602 F-54518 Vandœuvre-lès-Nancy France; Tel +33.(0)3.83.59.61.84; Fax +33.(0)3.83.59.61.81; email: frances.yen-potin@univ-lorraine.fr

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease that has been linked to changes in cholesterol metabolism. Neuronal cholesterol content significantly influences the pro-apoptotic effect of β -amyloid peptide₄₂ (A β ₄₂), which plays a key role in AD development. Aged mice with reduced expression of the lipolysis stimulated lipoprotein receptor (LSR^{+/-}), demonstrate modified brain lipid homeostasis, including membrane cholesterol accumulation and decreased intracellular lipid droplets, suggesting a potential role of LSR in brain cholesterol distribution. We questioned if these changes rendered the LSR^{+/-} mouse more susceptible to A β ₄₂-induced cognitive and biochemical changes. Results revealed that intracerebroventricular injection of oligomeric A β ₄₂ in male 15-month old LSR^{+/+} and LSR^{+/-} mice led to impairment in learning and long-term memory and decreased cortical cholesterol content of both groups; these effects were significantly amplified in the A β ₄₂-injected LSR^{+/-} group. Total latency of the Morris test was significantly and negatively correlated with cholesterol content in the cortex of the LSR^{+/-} mice, but not of controls. Significantly lower cortical PSD95 and SNAP-25 levels were detected in cortex of A β ₄₂-injected LSR^{+/-} mice, as well as cholesterol levels as compared to A β ₄₂-injected LSR^{+/+} mice. In addition, 24S-OH cholesterol metabolite levels were significantly higher in the cortex of LSR^{+/-} mice, suggesting that changes in brain cholesterol homeostasis as a result of the LSR^{+/-} genotype were directly linked to increased susceptibility to amyloid stress, and we would therefore propose the aged LSR^{+/-} mouse as a new model for understanding the link between modified lipid homeostasis as risk factor for AD.

Keywords: Alzheimer's disease, amyloid beta oligomers, animal model, cholesterol, cognitive impairment, learning, lipolysis stimulated lipoprotein receptor, memory

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD), a neurodegenerative disorder, is the most common form of dementia in developed countries, and is characterized clinically by progressive memory deficit and cognitive impairment, associated with accumulation of amyloid plaques in the brain, and neuronal and synaptic loss in the hippocampus and neocortex [1, 2]. Cholesterol is important for normal brain function including synaptic plasticity, learning and memory and in preserving neuronal integrity and thereby cognitive functions during aging. Indeed, increasing molecular evidence points towards a mechanistic link between altered cholesterol metabolism and AD progression [3, 4]. Moreover, hypercholesterolemia is recognized to be a risk factor for sporadic AD [5-7].

The soluble oligomeric form of amyloid peptide ($A\beta$) induces pro-apoptotic effects and stress responses in neurons that are thought to be key elements in the development of early AD. Furthermore, these $A\beta$ -induced deleterious effects are influenced by membrane cholesterol content in cultured neurons [8, 9]. We have developed an *in vivo* mouse model, in which intracerebroventricular (icv) injection of the same type of $A\beta$ oligomers into mice leads to deleterious effects in learning and memory associated with biochemical changes of synaptic markers resembling early AD [10]. Contrary to the numerous studies on the mouse AD models expressing mutant human APP or presenilin genes, direct icv administration of $A\beta$ peptide allow the evaluation of neurotoxicity of low amounts of $A\beta$ oligomers independently of the overproduction and brain accumulation of this peptide observed in transgenic AD models. In view of recent literature showing dyslipidemia as a risk factor for AD, the *in vivo* model that we developed provided a means to test the hypothesis that effect of $A\beta$ could potentially be amplified in mice with modified lipid homeostasis.

We have recently identified and characterized the lipolysis stimulated lipoprotein receptor (LSR) which, in the presence of fatty acids, can mediate endocytosis of both apoB and apoB,E containing lipoproteins [11]. While the absence of both alleles of LSR is embryonic lethal [12], the heterozygous $LSR^{+/-}$ mouse, which expresses 50% decreased mRNA and protein levels of this receptor is viable, and displays a moderate dyslipidemia due to decreased ability to clear lipoproteins during the postprandial phase [13]. Dyslipidemia in absence of LSR was confirmed by the observation of increased plasma levels of cholesterol and triglycerides following shRNA-mediated knockdown of hepatic LSR expression [14]. The $LSR^{+/-}$ genotype is also associated with higher fat mass when animals are placed under a high-fat diet [15], demonstrating a role of LSR in the regulation of lipid homeostasis.

LSR and other lipoprotein receptors such as the LDL-receptor (LDL-R) and LDL-R related protein 1 (LRP1) are found not only in peripheral tissues, but also in the brain. Indeed, LRP1 has been implicated in the processing and clearance of A β peptides [16-18], and LDL-R deficit does influence the toxic effect of A β peptide [19]. LSR is expressed specifically in neurons of regions including the hippocampus, cerebellum, hypothalamus and cortex [20]. Furthermore, a potential role of LSR in brain cholesterol homeostasis was revealed by significant morphological disorganization of brain membranes and modified cholesterol distribution in older $LSR^{+/-}$ mice, as compared to younger $LSR^{+/-}$ animals [20]. Therefore the $LSR^{+/-}$ genotype led not only to dyslipidemia, but also to age-related changes in brain cholesterol homeostasis, which led us to question whether these characteristics, also risk factors for AD, could render this mouse more susceptible to A β -induced effects on learning and memory. The study presented here reports the effect of icv injection of oligomeric A β_{42} on short-term and long-term memory and learning in aged $LSR^{+/-}$ and $LSR^{+/+}$ littermates, and the subsequent changes in brain cholesterol content and synaptic marker protein levels.

MATERIALS AND METHODS

Animal studies

LSR^{+/-} heterozygote mice were reproduced in-house; the C57BL/6J background was maintained by crossing LSR^{+/-} males with female wild-type C57BL/6J (Janvier Breeding), and used at 15 months of age. LSR^{+/-} animals were identified by genotyping as previously described, and have already been shown to display reduced mRNA and protein levels [13]; 50% reduced expression of brain LSR mRNA was verified by qPCR (data not shown). Animal handling and experimental protocols were authorized in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) for the use and care of laboratory animals and in conformity with PHS policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals, incorporated in the Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for Care and Use of Laboratory Animals. Animals were housed on a 12-h light/dark cycle with a mean temperature of 21–22°C and relative humidity of 50 ± 20%, and provided a standard chow diet (2018, Harlan, Gannat, France) and water *ad libitum*. LSR^{+/+} littermates were used as controls.

Preparation and injection of A β ₄₂ oligomers

Soluble A β ₄₂ oligomers were prepared from A β ₄₂ peptides (Bachem, Weil am Rhein, Germany) [21]. We have shown that these preparations resolve as trimers and tetramers (10-15 kDa) on SDS-PAGE [22]. All surgical procedures were performed on anesthetized 15-month old male mice (ketamine–xylazine mix, 1 mg/10 g body weight, i.p.). On day 1, A β ₄₂ (0.5 nmol in 1 μ L) or vehicle (0.15 M NaCl) were injected into the brain's right ventricle of anesthetized mice (NaCl-injected LSR^{+/+}, n=9; NaCl-injected LSR^{+/-}, n=6; A β ₄₂-injected LSR^{+/+}, n=9; A β ₄₂-injected LSR^{+/-}, n=9) according to stereotaxic coordinates from the bregma [anteroposterior (AP), -0.22 mm; lateral (L), -1 mm; dorsal (D), +2.5 mm] (n = 6-9/group). Injections were made using a 10 μ l Hamilton microsyringe fitted with a 26 gauge needle [10].

Behavioral analyses

Y-maze

Immediate working memory performance was assessed by recording spontaneous alternation behavior in a Y maze as described previously [20], but with a slight modification. Mice were placed at the end of one arm and allowed to move freely through the maze during a 5 min session. Since time spent in the first arm is prolonged in LSR^{+/-} mice as compared to littermates [20], t=0 was defined as the moment when the animal reached the center after leaving the first arm. The series of arm entries were recorded visually, and arm entry was considered to be completed when the hindpaws of the mouse were completely placed in the arm. Alternation was defined as successive entries into the three arms on overlapping triplet sets. The percentage alternation was calculated as the ratio of actual (total alternations) to possible (defined as the number of arm entries minus two) alternations. Spontaneous alternation behavior in the Y-maze was assessed on day 4 [23].

Morris water maze

The Morris water maze was performed as described previously [23]. The experimental apparatus consisted of a circular water tank containing water at 22°C and rendered opaque by adding an aqueous acrylic emulsion. A platform (diameter of 10 cm) was submerged 1 cm below the water surface and placed at the midpoint of one quadrant. The pool was placed in a test room homogeneously brightened at 100 lux and containing various prominent visual cues on the walls. The swimming paths of the animals were recorded using a video tracking system. On days 3 and 4, navigation to a visible platform was performed before place navigation to evaluate visual and motor abilities of the animals. Mice were submitted to four trials per day with two trials in the morning and two trials in the afternoon and with an intertrial interval of

at least 45 min. There was no additional maze cue in the room. The platform position and starting points were randomly distributed over all four quadrants of the pool. Mice that failed to find the platform after 60 s were guided to its location. Next, memory-acquisition trials (training) were performed four times daily during 5 consecutive days to reach a steady state of escape latency. The mice were allowed to swim freely for 60 s, left alone for an additional 30 s on the hidden platform, and then returned to the home cage during the intertrial interval. The intratrial intervals during four trials were 45 min. Start positions (set at each limit between quadrants) were randomly selected for each animal. In each trial, the time required to escape onto the hidden platform was recorded. Mice failing to find the platform within 60 s were placed on the platform for 10 s at the end of the trial. Memory-retention tests (probe trials) were performed 3 days after the last training session (day 14). The platform was removed, and each mouse was allowed a free 60 s swim.

Immunoblot analyses

On day 14, animals were sacrificed after the probe test and synaptosomal membrane-enriched fractions were prepared from dissected brain structures [23, 24]. Immunoblots were performed to detect postsynaptic density protein 95 (PSD95; 1:500 dilution; Cell Signaling, Saint Quentin Yvelines, France), SNAP-25 (1:1000; Santa Cruz, Heidelberg, Germany), and β -tubulin (1:1000 dilution; Sigma, Lyon, France); protein bands were revealed by chemiluminescence and analyzed as previously described [22, 23].

Analyses of free cholesterol and 24S-OH-cholesterol

Cortex or hippocampus samples (approximately 20 mg) obtained from NaCl-injected LSR^{+/+} and LSR^{+/-} mice and from A β ₄₂-injected LSR^{+/+} and LSR^{+/-} mice were homogenized in 2 mL of H₂O. Internal standards [300 μ g 5 α cholestane for cholesterol and 3 μ g Lup-20(29)-ene-3 β ,28-diol (betulin) for 24 (S) OH-cholesterol (24S-OHC)] were added, and lipids were extracted by

Folch [15 mL chloroform/methanol (2:1, v:v) containing 0.015% butylated hydrotoluene (BHT)]. After 1 min shaking, aqueous and organic phases were separated by centrifugation at $2000 \times g$ for 10 min at 4°C . The lower organic phase was transferred to a clean vial and evaporated under a stream of $\text{N}_2(\text{g})$. The dried residue was dissolved in 1 mL hexane, where 100 μL and 900 μL were used for cholesterol and 24S-OHC assays, respectively.

Samples were evaporated under a stream of $\text{N}_2(\text{g})$ and derivatized with 5 μL pyridine and 10 μL N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) with 1% trimethylchlorosilane (TMCS)(Sigma) for 15 min at 70°C . Derivatives were evaporated under a stream of $\text{N}_2(\text{g})$ and the residues were dissolved in 1 mL hexane prior to injection into the GC-MS. Analyses were carried out on a Perkin Elmer Clarus 500 gas chromatograph - Perkin Elmer Clarus 560 quadrupole mass spectrometer using electron impact ionization mode. The samples (5 μL) were injected splitless into the GC inlet via an autosampler. The injection temperature was maintained at 300°C , and separation was performed on an Uptibond-5 Premium (Interchim) 30 m capillary column (0.32 mm i.d., 0.25 μm phase thickness) using helium as a carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. The column temperature was kept at 180°C for 1 min, increased to 250°C at a rate of $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$, then raised to 300°C at a rate of $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, and further maintained at this temperature for 8 min, giving a total run time of 22.5 min. Selective ion monitoring was performed using electron ionization mode at 70 eV. The concentrations of each sterol were determined on the basis of standard curves and response coefficient using its respective internal standard, and are expressed as μg (cholesterol) or ng (24S-OHC) per mg tissue.

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SEM and were analyzed by one way or two-way ANOVA with genotype and treatment as factors or repeated measures ANOVA, followed by Fisher's PLSD test. Statistical significance was considered as $p < 0.05$.

RESULTS

To determine the effect of amyloid stress on LSR^{+/-} mice with altered brain cholesterol distribution, male 15-month old LSR^{+/+} and LSR^{+/-} mice were subjected to icv injection of soluble A β ₄₂ oligomers.

As previously reported, mice that were injected with A β ₄₂ displayed significantly decreased alternation rate ($p < 0.001$), which indicates impaired working memory (Fig 1A) [22]; this was the case for both LSR^{+/+} and LSR^{+/-} groups. Since the number of arm entries in the Y-maze test did not change significantly among all experimental groups (Fig 1B), the effects of A β ₄₂ were not due to exploratory, locomotor, visual or motivational effects. There was no difference in alternation between A β ₄₂-injected mice of LSR^{+/+} and LSR^{+/-} groups. This was similar to what was observed in LSR^{+/+} and LSR^{+/-} mice [20].

In the Morris water maze test, both escape and total latencies were significantly higher in A β ₄₂-injected mice as compared to the NaCl-injected groups (Fig 1, C and D). Furthermore, the decrease of learning abilities as evidenced by higher latencies was markedly greater in A β ₄₂-injected LSR^{+/-} mice as compared to A β ₄₂-injected LSR^{+/+} mice ($p < 0.01$) (Fig 1, C and D).

The probe test, which measures long-term memory, revealed that A β ₄₂-injected LSR^{+/-} mice spent less time ($p < 0.05$) in the platform quadrant, but significantly more ($p < 0.05$) time in the quadrant opposite of the platform as compared to A β ₄₂-injected LSR^{+/+} mice (Fig 1, E and F).

Indeed, the time spent in the opposite quadrant was close to 25%, which is the value that corresponds to a total random swimming pattern. Interestingly, the time in the platform quadrant of NaCl injected LSR^{+/-} mice was also lower ($p < 0.05$), as compared to NaCl injected LSR^{+/+} mice (Fig 1E). Similar average swimming speeds were observed in all groups (data not shown), indicating the absence of effect on locomotion, visual abilities, and motivation. These results therefore indicate that the loss of one LSR allele rendered mice more susceptible to A β ₄₂-induced alterations of learning and long-term memory.

Figure 1. *Increased susceptibility of LSR^{+/-} mice to A β -induced learning and long-term memory impairment.* On day 1, male LSR^{+/+} and LSR^{+/-} 15-month-old mice were injected icv with 0.9% NaCl or soluble A β ₄₂ oligomers as described in Materials and Methods. On day 4, Y-maze tests were performed, where (A) spontaneous alternation behavior and (B) number of arm entries were measured during a 5-min session. The training trials of Morris water-maze were performed between days 7–11. (C) Escape latency (mean of a group of four trials per day), and (D) cumulated total latency in the training week. Results of the probe trial (day 14) are

shown as (E) percentage of time spent in the platform quadrant and (F) percentage of time spent in the opposite platform quadrant (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparing NaCl and A β_{42} groups; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ between LSR^{+/+} and LSR^{+/-} groups)(NaCl-injected: LSR^{+/+} n=9; LSR^{+/-} n=6; A β_{42} -injected: LSR^{+/+} n=9 LSR^{+/-} n=9). All data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM).

We next sought to determine if this increased susceptibility of the LSR^{+/-} mouse could be linked to changes in cholesterol metabolism. The levels of the cholesterol metabolite, 24S-OH-cholesterol (24S-OHC), in lipid extracts of the hippocampus and cortex of all groups were measured by GC-MS. Figure 2A shows that 24S-OHC levels were higher ($p < 0.05$) in LSR^{+/-} as compared to LSR^{+/+} mice in both NaCl- and A β_{42} -treated groups, but only in the cortex, and not in the hippocampus. Free cholesterol content of the same lipid extracts of all groups were next measured by GC-MS. Results revealed that the injection of A β_{42} led to a significant decrease ($p < 0.01$) of cholesterol in the cortex of both LSR^{+/+} and LSR^{+/-} mice (Figure 2B). Furthermore, this A β_{42} -induced cholesterol lowering effect was significantly greater ($p < 0.05$) in the LSR^{+/-} mice, as compared to their wild-type littermates. Taken together, these results show that cholesterol homeostasis is modified in LSR^{+/-} mice, and suggest a potential modification in cholesterol synthesis. Immunoblots, however, did not reveal any significant differences in HMG CoA reductase cortex protein levels between LSR^{+/+} or LSR^{+/-} animals (data not shown).

Figure 2. *Differences in 24S-OH cholesterol (24S-OHC) in LSR^{+/-} mice and increased susceptibility of LSR^{+/-} mice to A β ₄₂-induced modifications of free cholesterol content in the cortex. (A) 24S-OHC and (B) free cholesterol content was determined by GC-MS in LSR^{+/+} (□) and LSR^{+/-} (■) mice that received NaCl (left bars on each panel) or A β ₄₂ (right bars on each panel) injections, as described in Materials and Methods. Results are expressed as mean \pm SEM of ng (24S-OHC) or μ g (free cholesterol) per mg tissue (** p <0.01 comparing NaCl and A β ₄₂ groups; # p <0.05 between LSR^{+/+} and LSR^{+/-} groups; n is indicated in parentheses for each group in the figure)*

Since we observed an effect of A β ₄₂ both on cholesterol content in the cortex and the behavioral variables measured in Figure 1, we next sought to determine any potential correlation between

these two parameters. Spearman's ρ test on data combined from all 4 groups revealed significant negative correlations ($p < 0.01$) between cholesterol content of the cortex (Figure 2B) and the cumulative total latency measured in the Morris test in Fig. 1D (Figure 3). Similar analyses for each group revealed that this correlation remained significant ($p < 0.01$) in the $A\beta_{42}$ groups, but not for the control NaCl groups. Interestingly, this negative correlation was also significant ($p < 0.01$) for the $LSR^{+/-}$ groups (NaCl- and $A\beta_{42}$ injected) combined, but not for the $LSR^{+/+}$ groups (NaCl- and $A\beta_{42}$ injected), indicating a close link in $LSR^{+/-}$ mice between modifications observed in cortex cholesterol levels and the changes in the total latency.

Figure 3. Scatter plot of free cholesterol content in cortex versus total latency measured in the Morris test (Fig. 1D) for all animals ($LSR^{+/+}$, \circ \square ; $LSR^{+/-}$ \bullet \blacksquare ; NaCl-injected groups, \circ \bullet ; $A\beta_{42}$ -injected groups \square \blacksquare), with Spearman ρ indicated for the groups that were statistically significant (** $p < 0.01$).

A β_{42} have been shown to affect levels of the pre- and post-synaptic proteins PSD95 and SNAP-25, respectively [22, 23, 25], which led us to question whether these proteins were modified in the hippocampus and cortex of A β_{42} -injected LSR^{+/-} mice. Interestingly, there was already a significantly lower level of PSD95 protein in the cortex NaCl-injected LSR^{+/-} as compared to that of NaCl-injected LSR^{+/+} mice ($p < 0.05$, Fig. 4A and 4B). Protein levels of SNAP-25 and PSD95, in the cortex of A β_{42} -injected LSR^{+/-} mice were found to be significantly decreased compared to that of A β_{42} -injected-LSR^{+/+} mice ($p < 0.01$, $p < 0.001$, respectively) (Fig. 4C and 4D). No differences in hippocampal SNAP-25 and PSD95 levels were detected between LSR^{+/+} or LSR^{+/-} in either NaCl- or A β_{42} -injected LSR^{+/+} and LSR^{+/-} mice.

Figure 4. *Increased susceptibility of LSR^{+/-} mice to A β_{42} -induced modifications of synaptic proteins in the cortex.* Immediately after the probe test, mice were sacrificed and synaptosome-enriched fractions were prepared from the hippocampus and cortex. Representative immunoblots of hippocampal and cortical SNAP-25 and PSD95 from LSR^{+/-} and LSR^{+/+} mice after (A) NaCl or (C) A β_{42} injections are shown. Densitometric analyses were performed to

determine signal intensities normalized to β -tubulin, and data are expressed as % of control LSR^{+/+} animals injected with (B) NaCl or (D) A β ₄₂ (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, comparing LSR^{+/+} and LSR^{+/-} mice). Results are shown as mean \pm SEM of immunoblots performed for all animals (NaCl-injected: LSR^{+/+} n=8; LSR^{+/-} n=5; A β ₄₂-injected: LSR^{+/+} n=8 LSR^{+/-} n=8).

DISCUSSION

This study shows that reduced LSR expression renders aged mice more susceptible to the effects of A β ₄₂ peptide injection on cognitive abilities, as shown by increased impairment in learning and long-term memory of A β ₄₂-injected LSR^{+/-} animals, associated with reduction of PSD95 and SNPA25 protein levels. The changes of these synaptic markers were observed primarily in the cortex, which is the brain structure related to numerous cognitive functions including memory. Indeed, the cortex is essential for recalling remote memories that initially were considered hippocampus-dependent [26-28]. Moreover, it has been shown that the prefrontal cortex is necessary for cellular consolidation and retrieval of both recent and remote memories, acquisition and consolidation of overlapping associations [29, 30]. Therefore, the combined alterations of SNAP-25 and PSD95 expression in the cortex of LSR^{+/-} mice is consistent with the higher sensitivity of LSR^{+/-} to the A β ₄₂-induced long-term memory deficit.

Cortex levels of 24S-OHC were found to be higher in both NaCl- and A β ₄₂-treated LSR^{+/-} groups, as compared to those of the control mice. Interestingly, there have been reports of high levels of this marker for cholesterol turnover either in the plasma or cerebrospinal fluid of patients with early Alzheimer or early dementia [31-34]. The increased 24S-OHC levels, as well as our previous results showing significant changes in membrane morphology in aged LSR^{+/-} mice, lead us to propose that cholesterol turnover is modified in this mouse model, which

may be the underlying cause for the increased susceptibility of LSR^{+/-} mice to amyloid stress induced by A β ₄₂ injection. Immunoblot analysis did not reveal any significant changes in HMG CoA-reductase protein levels between LSR^{+/+} and LSR^{+/-} mice, nor did preliminary studies show any difference between LSR^{+/-} and LSR^{+/+} in cortex protein levels of proteins involved in cholesterol esterification and transport: acetyl-coA acyl transferase 1 or 2, or ATP cassette binding transporter A1, (Pinçon *et al.*, unpublished data). Further studies are needed to determine the mechanisms underlying the effect of the LSR^{+/-} genotype on 24S-OHC.

Since 24S-OHC represents the means by which cholesterol is excreted from the brain, higher levels would indicate increased conversion of cholesterol to this metabolite, thus depleting cholesterol content in the membranes [35]. The 24S-OHC was initially considered as a putative activator of fatty acid metabolism via the liver X receptor (LXR)-induced activation of SREBP1c transcription and thus a potential activator of cholesterol synthesis [36, 37]. However, several studies demonstrated that enzymes involved in cholesterol synthesis are in fact inhibited by this oxysterol [38-41]. LXR activation by 24S-OHC does increase brain SREBP1c mRNA levels, but does not change the level of SREBP-cleaved protein [38]. In addition, this metabolite decreases levels of LXR-independent SREBP-2 mRNA [38]. Taken together, these studies suggest that the increased 24S-OHC in cortex of LSR^{+/-} mice would lead to reduced cholesterol synthesis. It was observed that cortical cholesterol levels of NaCl-injected LSR^{+/-} mice were slightly lower as compared to those of NaCl-injected controls, although this did not reach statistical significance.

The A β ₄₂ injection itself induced a significant decrease in free cholesterol in the cortex, which was more prominent for the LSR^{+/-} mice, resulting in a significantly lower cholesterol content in the cortex of A β ₄₂-injected LSR^{+/-} mice as compared to that of A β ₄₂-injected LSR^{+/+} mice. Previous data have shown that the cytotoxic effects of the A β ₄₂-soluble oligomers, including apoptosis [9] and oxidative stress [8] are aggravated with cholesterol depletion in neuronal

membranes. Our results here provide the first evidence for A β ₄₂-mediated lowering of cholesterol following its injection icv. Oligomeric A β ₄₂ treatment of neurons has also been shown to lead to modification of expression of different proteins involved in steroid and lipid metabolism [42], and Mohamed *et al.* showed that A β ₄₂ oligomers induce cholesterol sequestration in membranes through inhibition of SREBP2 cleavage and protein prenylation [43]. If such is the case, and taking into account the changes in cortical cholesterol turnover implied by the increased 24S-OHC in LSR^{+/-} mice, it is possible that A β peptide would amplify this dysfunction in LSR^{+/-} mice with modified cholesterol turnover.

24S-OHC is a strong agonist for LXRs [44, 45], nuclear receptors that are involved in the regulation of cholesterol metabolism. Previous studies showed that treatment of transgenic mouse models of Alzheimer's disease with LXR agonists improves cognitive deficits although the respective contribution of their actions on amyloid pathway or on cholesterol turnover remains to be clarified [46, 47]. Our results show that the increased levels of 24S-OHC in the cortex of LSR^{+/-} mice does not seem to protect or improve the learning deficits induced by icv injection of the A β peptide. Moreover, our model differs from the various transgenic AD models since cognitive impairment is achieved through A β ₄₂ oligomers and not through expression of mutant human APP or presenilin genes and formation of amyloid plaques. Furthermore, the data of a recent study shows that overexpression of the 24S-OHC synthesizing enzyme CYP46A1 enzyme in neuronal cell cultures actually inhibits the transcription activity of LXR by an increase of membrane levels of isoprenylated small guanosine triphosphate-binding proteins [48]. This would indicate that the relationship between 24S-OHC and LXR transcription activity in AD modifications of lipid metabolism and cognitive impairment mechanisms is dependent on the models used and results must be interpreted with caution. Additional studies are needed to determine if increased 24S-OHC content in cortex of LSR^{+/-}

mice is due, for example, to stimulation of its synthesis, alteration of its efflux from neuronal cells by the ABC family transporters, or if the various LXR-dependent pathways have been activated by 24S-OHC in these mice.

The precise role of LSR in brain cholesterol homeostasis regulation remains to be clearly defined. In the periphery, LSR participates in the clearance of apoB/apoE containing lipoproteins [11, 13, 14] and therefore may participate in the uptake of cholesterol-containing lipid particles in the brain, where neurons rely on glia-derived cholesterol secreted in ApoE rich lipoprotein [49]. LSR is an apoE receptor, and may potentially contribute to the uptake of A β associated with apoE [50]. It is of course possible that other apoE-binding receptors present in the brain may compensate for loss of LSR. However, we did not find any effect of genotype on the expression of the LDL-R or LRP1 in the cortex or hippocampus (Pinçon *et al.*, unpublished data).

Further analysis revealed a significant negative correlation between learning ability in the form of total latency and cortex cholesterol content, which supports the notion that modification of cholesterol levels were associated with the observed changes in cognitive function. This correlation was evident when all data was combined, and remained significant when combining data from the A β ₄₂-injected groups or from the LSR^{+/-} groups. Although correlations do not necessarily indicate a causal relationship, this nevertheless presents a strong argument for the changes in cortex cholesterol as contributing to the increased susceptibility of LSR^{+/-} to amyloid stress. Interestingly, de Oliveira *et al.* recently reported that a deficit of the lipoprotein receptor LDL-R renders mice more susceptible to neurotoxic effects of the A β peptide [19]. However, the nature and preparation of A β peptide are different compared to that used in our study, and these authors did not investigate A β effects on brain cholesterol content and catabolism.

In conclusion, reduced LSR expression in aged mice display modified brain cholesterol homeostasis associated with cognitive deficits as well as synaptic alterations that are amplified when exposed to amyloid stress. We propose that the dyslipidemic LSR^{+/-} mouse provides a new model for understanding the link between modified lipid homeostasis as risk factor for Alzheimer's disease.

Acknowledgements

This work was funded in part by grants from the French Ministry of Higher Education and Research (MESR), as well as by local grants (Région de Lorraine). AP is recipient of a MESR thesis fellowship; MT and JC both receive funding of thesis scholarships from the Région de Lorraine (MT and JC), France Alzheimer (MT), and the French Society of Nutrition SFN (JC).

REFERENCES

- [1] Chopra K, Misra S, Kuhad A (2011) Neurobiological aspects of Alzheimer's disease. *Expert Opin Ther Targets* **15**, 535-555.
- [2] Querfurth HW, LaFerla FM (2010) Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **362**, 329-344.
- [3] Di Paolo G, Kim TW (2011) Linking lipids to Alzheimer's disease: cholesterol and beyond. *Nat Rev Neurosci* **12**, 284-296.
- [4] Walsh DM, Selkoe DJ (2007) A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem* **101**, 1172-1184.
- [5] Kivipelto M, Ngandu T, Fratiglioni L, Viitanen M, Kareholt I, Winblad B, Helkala EL, Tuomilehto J, Soininen H, Nissinen A (2005) Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease. *Arch Neurol* **62**, 1556-1560.
- [6] Stewart R, White LR, Xue QL, Launer LJ (2007) Twenty-six-year change in total cholesterol levels and incident dementia: the Honolulu-Asia Aging Study. *Arch Neurol* **64**, 103-107.
- [7] Whitmer RA, Sidney S, Selby J, Johnston SC, Yaffe K (2005) Midlife cardiovascular risk factors and risk of dementia in late life. *Neurology* **64**, 277-281.
- [8] Pensalfini A, Zampagni M, Liguri G, Becatti M, Evangelisti E, Fiorillo C, Bagnoli S, Cellini E, Nacmias B, Sorbi S, Cecchi C (2011) Membrane cholesterol enrichment prevents A β -induced oxidative stress in Alzheimer's fibroblasts. *Neurobiol Aging* **32**, 210-222.
- [9] Sponne I, Fifre A, Koziel V, Oster T, Olivier JL, Pillot T (2004) Membrane cholesterol interferes with neuronal apoptosis induced by soluble oligomers but not fibrils of amyloid-beta peptide. *Faseb J* **18**, 836-838.
- [10] Youssef I, Florent-Bechard S, Malaplate-Armand C, Koziel V, Bihain B, Olivier JL, Leininger-Muller B, Kriem B, Oster T, Pillot T (2008) N-truncated amyloid-beta

- oligomers induce learning impairment and neuronal apoptosis. *Neurobiol Aging* **29**, 1319-1333.
- [11] Stenger C, Corbier C, Yen FT (2012) Structure and function of the lipolysis stimulated lipoprotein receptor In *Chemical Biology*, Ekinci D, ed. InTech, Rijeka, pp. 267-292.
- [12] Mesli S, Javorschi S, Berard AM, Landry M, Priddle H, Kivlichan D, Smith AJH, Yen FT, Bihain BE, Darmon M (2004) Distribution of the lipolysis stimulated receptor in adult and embryonic murine tissues and lethality of LSR^{-/-} embryos at 12.5 to 14.5 days of gestation. *European Journal of Biochemistry* **271**, 3103-3114.
- [13] Yen FT, Roitel O, Bonnard L, Notet V, Pratte D, Stenger C, Magueur E, Bihain BE (2008) Lipolysis stimulated lipoprotein receptor: a novel molecular link between hyperlipidemia, weight gain, and atherosclerosis in mice. *J Biol Chem* **283**, 25650-25659.
- [14] Narvekar P, Berriel Diaz M, Kronen-Herzig A, Hardeland U, Strzoda D, Stohr S, Frohme M, Herzig S (2009) Liver-specific loss of lipolysis-stimulated lipoprotein receptor triggers systemic hyperlipidemia in mice. *Diabetes* **58**, 1040-1049.
- [15] Stenger C, Hanse M, Pratte D, Mbala ML, Akbar S, Koziel V, Escanye MC, Kriem B, Malaplate-Armand C, Olivier JL, Oster T, Pillot T, Yen FT (2010) Up-regulation of hepatic lipolysis stimulated lipoprotein receptor by leptin: a potential lever for controlling lipid clearance during the postprandial phase. *Faseb J* **24**, 4218-4228.
- [16] Bell RD, Sagare AP, Friedman AE, Bedi GS, Holtzman DM, Deane R, Zlokovic BV (2007) Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *J Cereb Blood Flow Metab* **27**, 909-918.
- [17] Deane R, Wu Z, Sagare A, Davis J, Du Yan S, Hamm K, Xu F, Parisi M, LaRue B, Hu HW, Spijkers P, Guo H, Song X, Lenting PJ, Van Nostrand WE, Zlokovic BV (2004)

- LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms. *Neuron* **43**, 333-344.
- [18] Shibata M, Yamada S, Kumar SR, Calero M, Bading J, Frangione B, Holtzman DM, Miller CA, Strickland DK, Ghiso J, Zlokovic BV (2000) Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest* **106**, 1489-1499.
- [19] de Oliveira J, Moreira EL, dos Santos DB, Piermartiri TC, Dutra RC, Pinton S, Tasca CI, Farina M, Prediger RD, de Bem AF (2014) Increased susceptibility to amyloid-beta-induced neurotoxicity in mice lacking the low-density lipoprotein receptor. *J Alzheimers Dis* **41**, 43-60.
- [20] Stenger C, Pincon A, Hanse M, Royer L, Comte A, Koziel V, Olivier JL, Pillot T, Yen FT (2012) Brain region-specific immunolocalization of the lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) and altered cholesterol distribution in aged LSR+/- mice. *J Neurochem* **123**, 467-476.
- [21] Pillot T, Drouet B, Queille S, Labeur C, Vandekerckhove J, Rosseneu M, Pincon-Raymond M, Chambaz J (1999) The nonfibrillar amyloid beta-peptide induces apoptotic neuronal cell death: involvement of its C-terminal fusogenic domain. *J Neurochem* **73**, 1626-1634.
- [22] Desbene C, Malaplate-Armand C, Youssef I, Garcia P, Stenger C, Sauvee M, Fischer N, Rimet D, Koziel V, Escanye MC, Oster T, Kriem B, Yen FT, Pillot T, Olivier JL (2012) Critical role of cPLA2 in Abeta oligomer-induced neurodegeneration and memory deficit. *Neurobiol Aging* **33**, 1123 e1117-1129.
- [23] Garcia P, Youssef I, Utvik JK, Florent-Bechard S, Barthelemy V, Malaplate-Armand C, Kriem B, Stenger C, Koziel V, Olivier JL, Escanye MC, Hanse M, Allouche A, Desbene C, Yen FT, Bjerkvig R, Oster T, Niclou SP, Pillot T (2010) Ciliary

- neurotrophic factor cell-based delivery prevents synaptic impairment and improves memory in mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* **30**, 7516-7527.
- [24] Keller JN, Mark RJ, Bruce AJ, Blanc E, Rothstein JD, Uchida K, Waeg G, Mattson MP (1997) 4-Hydroxynonenal, an aldehydic product of membrane lipid peroxidation, impairs glutamate transport and mitochondrial function in synaptosomes. *Neuroscience* **80**, 685-696.
- [25] Chauhan NB, Lichtor T, Siegel GJ (2003) Aging potentiates Abeta-induced depletion of SNAP-25 in mouse hippocampus. *Brain Res* **982**, 219-227.
- [26] Frankland PW, Bontempi B, Talton LE, Kaczmarek L, Silva AJ (2004) The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science* **304**, 881-883.
- [27] Maviel T, Durkin TP, Menzaghi F, Bontempi B (2004) Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science* **305**, 96-99.
- [28] Teixeira CM, Pomedli SR, Maei HR, Kee N, Frankland PW (2006) Involvement of the anterior cingulate cortex in the expression of remote spatial memory. *J Neurosci* **26**, 7555-7564.
- [29] DeVito LM, Lykken C, Kanter BR, Eichenbaum H (2010) Prefrontal cortex: role in acquisition of overlapping associations and transitive inference. *Learn Mem* **17**, 161-167.
- [30] Leon WC, Bruno MA, Allard S, Nader K, Cuello AC (2010) Engagement of the PFC in consolidation and recall of recent spatial memory. *Learn Mem* **17**, 297-305.
- [31] Leoni V, Solomon A, Lovgren-Sandblom A, Minthon L, Blennow K, Hansson O, Wahlund LO, Kivipelto M, Bjorkhem I (2013) Diagnostic power of 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid: candidate marker of brain health. *J Alzheimers Dis* **36**, 739-747.

- [32] Papassotiropoulos A, Lutjohann D, Bagli M, Locatelli S, Jessen F, Buschfort R, Ptok U, Bjorkhem I, von Bergmann K, Heun R (2002) 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid is elevated in early stages of dementia. *J Psychiatr Res* **36**, 27-32.
- [33] Popp J, Lewczuk P, Kolsch H, Meichsner S, Maier W, Kornhuber J, Jessen F, Lutjohann D (2012) Cholesterol metabolism is associated with soluble amyloid precursor protein production in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **123**, 310-316.
- [34] Popp J, Meichsner S, Kolsch H, Lewczuk P, Maier W, Kornhuber J, Jessen F, Lutjohann D (2013) Cerebral and extracerebral cholesterol metabolism and CSF markers of Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol* **86**, 37-42.
- [35] Tian G, Kong Q, Lai L, Ray-Chaudhury A, Lin CL (2010) Increased expression of cholesterol 24S-hydroxylase results in disruption of glial glutamate transporter EAAT2 association with lipid rafts: a potential role in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **113**, 978-989.
- [36] Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, Shan B, Brown MS, Goldstein JL, Mangelsdorf DJ (2000) Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev* **14**, 2819-2830.
- [37] Yoshikawa T, Shimano H, Amemiya-Kudo M, Yahagi N, Hasty AH, Matsuzaka T, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Kimura S, Ishibashi S, Yamada N (2001) Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. *Mol Cell Biol* **21**, 2991-3000.
- [38] Cartagena CM, Burns MP, Rebeck GW (2010) 24S-hydroxycholesterol effects on lipid metabolism genes are modeled in traumatic brain injury. *Brain Res* **1319**, 1-12.

- [39] Shafaati M, Olin M, Bavner A, Pettersson H, Rozell B, Meaney S, Parini P, Bjorkhem I (2011) Enhanced production of 24S-hydroxycholesterol is not sufficient to drive liver X receptor target genes in vivo. *J Intern Med* **270**, 377-387.
- [40] Wang Y, Muneton S, Sjoval J, Jovanovic JN, Griffiths WJ (2008) The effect of 24S-hydroxycholesterol on cholesterol homeostasis in neurons: quantitative changes to the cortical neuron proteome. *J Proteome Res* **7**, 1606-1614.
- [41] Wang Y, Rogers PM, Su C, Varga G, Stayrook KR, Burris TP (2008) Regulation of cholesterologenesis by the oxysterol receptor, LXRA. *J Biol Chem* **283**, 26332-26339.
- [42] Malik B, Fernandes C, Killick R, Wroe R, Usardi A, Williamson R, Kellie S, Anderton BH, Reynolds CH (2012) Oligomeric amyloid-beta peptide affects the expression of genes involved in steroid and lipid metabolism in primary neurons. *Neurochem Int* **61**, 321-333.
- [43] Mohamed A, Saavedra L, Di Pardo A, Sipione S, Posse de Chaves E beta-amyloid inhibits protein prenylation and induces cholesterol sequestration by impairing SREBP-2 cleavage. *J Neurosci* **32**, 6490-6500.
- [44] Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA, Wisely GB, Kliewer SA, Corey EJ, Mangelsdorf DJ (1999) Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRA and LXRbeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 266-271.
- [45] Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL, Sundseth SS, Winegar DA, Blanchard DE, Spencer TA, Willson TM (1997) Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem* **272**, 3137-3140.

- [46] Fitz NF, Cronican A, Pham T, Fogg A, Fauq AH, Chapman R, Lefterov I, Koldamova R (2010) Liver X receptor agonist treatment ameliorates amyloid pathology and memory deficits caused by high-fat diet in APP23 mice. *J Neurosci* **30**, 6862-6872.
- [47] Vanmierlo T, Rutten K, Dederen J, Bloks VW, van Vark-van der Zee LC, Kuipers F, Kiliaan A, Blokland A, Sijbrands EJ, Steinbusch H, Prickaerts J, Lutjohann D, Mulder M (2011) Liver X receptor activation restores memory in aged AD mice without reducing amyloid. *Neurobiol Aging* **32**, 1262-1272.
- [48] Moutinho M, Nunes MJ, Gomes AQ, Gama MJ, Cedazo-Minguez A, Rodrigues CM, Bjorkhem I, Rodrigues E (2014) Cholesterol 24S-Hydroxylase Overexpression Inhibits the Liver X Receptor (LXR) Pathway by Activating Small Guanosine Triphosphate-Binding Proteins (sGTPases) in Neuronal Cells. *Mol Neurobiol*, in press.
- [49] Goritz C, Mauch DH, Nagler K, Pfrieder FW (2002) Role of glia-derived cholesterol in synaptogenesis: new revelations in the synapse-glia affair. *J Physiol Paris* **96**, 257-263.
- [50] Tai LM, Bilousova T, Jungbauer L, Roeske SK, Youmans KL, Yu C, Poon WW, Cornwell LB, Miller CA, Vinters HV, Van Eldik LJ, Fardo DW, Estus S, Bu G, Glyys KH, Ladu MJ (2013) Levels of soluble apolipoprotein E/amyloid-beta (Abeta) complex are reduced and oligomeric Abeta increased with APOE4 and Alzheimer disease in a transgenic mouse model and human samples. *J Biol Chem* **288**, 5914-5926.

IV. Impacts de régimes hyperlipidique et enrichi en cholestérol sur le métabolisme du cholestérol cérébral et périphérique et les capacités cognitives chez le modèle de souris LSR^{+/-}

A. Introduction

Nous avons montré dans le premier chapitre des résultats consacré à l'article publié dans *J Neurochem* que la répartition du cholestérol cérébral est modifiée chez les souris LSR^{+/-} âgées. Ces résultats établissent clairement un rôle de ce récepteur au niveau central en accord avec ses propriétés de liaison de l'apoE. Dans le chapitre suivant des résultats (article soumis à *J Alzh Dis*), nous avons ensuite montré que les souris LSR^{+/-} âgées présentent également une sensibilité accrue au peptide A β , agent principal de la MA et que cette sensibilité est liée à des altérations du métabolisme cérébral du cholestérol.

Notre hypothèse de travail qui découle des résultats précédents est que le récepteur LSR constituerait un élément charnière entre la dysrégulation du métabolisme cérébral du cholestérol et la sensibilité aux processus neurodégénératifs de la MA. En outre, nous avons vu dans la quatrième partie de l'introduction bibliographique que ce récepteur participe à la clairance des lipoprotéines riches en triglycérides et que la diminution de son expression aboutit à une obésité des souris femelles nourries avec des régimes hyperlipidiques, ce qui constitue un modèle d'obésité avec ses retentissements centraux éventuels. Plus particulièrement, une étude précédemment réalisée dans le laboratoire a montré qu'un régime hyperlipidique (40 % en apport calorique) et enrichi en cholestérol (régime de type *Western*) d'une durée de 30 semaines induit, chez des souris mâles LSR^{+/-}, une augmentation des lipoprotéines riches en triglycérides (Yen *et al.*, 2008). Un régime encore plus riche en lipides (60 % en apport calorique) appliqué pendant 10 semaines est suffisant pour induire une résistance à la leptine (Stenger *et al.*, 2010). La diminution de 50 % de l'expression du récepteur LSR présente chez les souris LSR^{+/-} induirait une réponse accrue aux dysfonctionnements périphériques et cérébraux provoqués par des régimes alimentaires hyperlipidiques ou enrichi en cholestérol, deux types de régime qui ont été utilisés dans les études antérieures de la littérature sur le métabolisme du cholestérol et la neurodégénérescence liée à la MA.

Nous avons vu dans le chapitre sur le métabolisme cérébral du cholestérol (deuxième partie de la synthèse bibliographique) que le cerveau possède l'équipement

enzymatique nécessaire pour assurer ses besoins en cholestérol. Nous avons également évoqué que les transports intercellulaires en cholestérol notamment entre les cellules gliales et les neurones, ainsi que les transports transcellulaires peuvent être à la source d'un certain nombre de dysfonctionnements et demeurent imparfaitement connus. Enfin, les mécanismes de conversion en oxystérols et d'exportation de ces métabolites apparaissent comme des processus clés pour l'homéostasie du cholestérol cérébral. Cependant, les relations entre les métabolismes central et périphérique du cholestérol et notamment l'influence des apports lipidiques alimentaires restent encore à explorer plus précisément, en raison de la possibilité éventuelle de maîtriser certains processus neurodégénératifs par une alimentation appropriée.

Dans le cas du développement de la MA, nous avons également vu précédemment (troisième partie de l'introduction bibliographique) qu'une littérature importante mais contradictoire soutient l'idée d'un lien fort entre les apports lipidiques alimentaires et le développement de cette maladie. Différents régimes de durées variées, jouant sur les apports en cholestérol ou en triglycérides, ont été utilisés sur différents modèles de rongeurs (souris de phénotype sauvage ou porteur de gènes humains mutés de préséniline et d'APP, rats et lapins). Un certain nombre d'études (Granholm *et al.*, 2008) démontrent que l'alimentation et l'apport exogène en triglycérides et cholestérol peuvent modifier les capacités cognitives basales de ces rongeurs. Chez les modèles murins de MA, ces régimes favoriseraient la production du peptide A β et l'hyperphosphorylation de la protéine tau (Li *et al.*, 2003; Refolo *et al.*, 2000) ce qui serait responsable d'une neurodégénérescence accrue et d'une dégradation des capacités cognitives. Pour les animaux de phénotype sauvage, non porteurs de gène humain muté de préséniline ou de la protéine APP, une neuroinflammation induite suite à un régime enrichi en cholestérol pourrait jouer un rôle dans la progression d'une neurodégénérescence et la dégradation des capacités cognitives (Ullrich *et al.*, 2010b). En outre, d'autres études ont montré que l'intégrité de la BHE peut être modifiée par le biais de la diminution de l'expression de protéines impliquées dans les jonctions serrées comme l'occludine, à la suite d'un régime hyperlipidique (Takechi *et al.*, 2013a). L'atteinte de la BHE peut modifier l'exportation du peptide A β par les récepteurs aux lipoprotéines comme LRP1 et accélérer le

processus de la MA dans les modèles murins de MA. Cette atteinte pourrait également modifier l'homéostasie cérébrale du cholestérol en diminuant les capacités d'exportation des oxystérols. Selon les types de régime et modèles animaux utilisés, des modifications des teneurs en cholestérol cérébral ou de sa distribution ont pu être observées ou non. Ainsi, les études menées chez le lapin New Zealand avec des régimes enrichis en cholestérol de 1 ou 2% ont mis en évidence une hypercholestérolémie chez ces animaux avec des accumulations de cholestérol membranaire dans les neurones d'hippocampe sans modification de la teneur globale en cholestérol du cerveau (Ghribi *et al.*, 2006a).

Ces données de la littérature soutiennent notre hypothèse qui postule qu'un régime déséquilibré en apport lipidique amorcerait un déséquilibre du métabolisme cérébral du cholestérol et aboutirait avec le vieillissement à une sensibilité accrue à la MA. Notre hypothèse suggère également que le récepteur LSR constituerait une des clés de ce mécanisme pathologique. Nos résultats antérieurs ont été acquis sur des animaux âgés. Nous avons tenté dans cette partie du travail d'induire des dysfonctionnements périphériques et cérébraux chez des souris LSR^{+/-} d'âge moyen afin de tester notre hypothèse. Nous avons mesuré les effets d'un régime enrichi en cholestérol d'une part et d'un régime hyperlipidique d'autre part en comparaison avec un régime standard sur :

- 1- le métabolisme lipidique périphérique
- 2- les capacités cognitives
- 3- les répercussions sur le métabolisme cérébral du cholestérol

L'objectif de cette étude a été de déterminer si des régimes alimentaires hyperlipidiques ou enrichi en cholestérol appliqués chez des souris LSR^{+/-} d'âge moyen pouvaient amorcer les altérations constatées chez des souris âgées dans les parties précédentes.

B. Composition et modalités d'application des régimes

Des souris femelles LSR^{+/+} et LSR^{+/-} (n=6 à 7 par groupe) âgées de 5 mois ont été soumises à trois régimes alimentaires différents durant 6 semaines : un régime alimentaire standard (STD) (Figure 38), un régime hyperlipidique (60 %) (HF) identique à celui utilisé dans les études précédentes du laboratoire (Stenger *et al.*, 2010) (Figure 39) et un régime enrichi en cholestérol (2 %) (CHOL) (Figure 40). Le régime CHOL n'est pas un régime commercialisé. Ce dernier a donc été confectionné spécialement pour cette étude. Afin que ce régime fournisse des apports caloriques identiques aux deux autres régimes STD et HF, 2 % d'huile de soja ont dû être remplacés par 2 % de cholestérol. Nous avons choisi d'utiliser des femelles sur la base des travaux antérieurs du laboratoire qui ont démontré que les souris femelles sont plus sensibles à ce type de régime.

Figure 38 : Composition du régime alimentaire standard

Figure 39 : Composition du régime alimentaire hyperlipidique (HF)

Figure 40 : Composition du régime alimentaire enrichi en cholestérol (2 %)

C. Résultats

1. Prise alimentaire et masse corporelle

Les souris femelles LSR^{+/+} et LSR^{+/-} (n=6 à 7 par groupe) âgées de 5 mois ont été élevées à raison de 3 à 4 souris par cage pendant 4 mois avant d'être isolées en cage individuelle durant 4 semaines avant et pendant la période des régimes. Le suivi alimentaire a consisté à placer une quantité définie d'aliments sous forme de croquettes dans la mangeoire de chaque cage et de déduire la quantité consommée en pesant l'aliment restant de façon hebdomadaire.

Les souris sauvages placées sous le régime HF présentent une augmentation de leur masse corporelle de 32,5 % ± 4,5 % à la fin du régime. Les souris LSR^{+/-} ont quant à elle une prise de masse corporelle de 41 % ± 3,5 % (Figure 41). Bien que la significativité statistique n'ait pu être confirmée entre les souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} sous régime HF, ces résultats concordent avec ceux obtenus dans une autre étude du laboratoire qui démontraient une prise de masse corporelle significativement accrue des souris LSR^{+/-} sous ce même régime (Stenger *et al.*, 2010). L'effectif assez faible de souris disponibles pour cette étude peut expliquer l'absence de significativité, bien qu'elle soit presque atteinte ($p < 0,06$).

Figure 41 : Evolution de la masse corporelle de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} placées sous des régimes STD et HF (* p<0,05 ou ** p<0,01 ou *p<0,001 entre groupes STD et HF) (n=6 LSR^{+/+} STD ; n=6 LSR^{+/-} STD ; n=7 LSR^{+/+} HF : n=7 LSR^{+/-} HF)**

Les souris placées sous régimes STD et CHOL n'ont pas présenté de prise de poids quel que soit le génotype. L'enrichissement en cholestérol et la déficience d'un allèle LSR n'ont donc eu aucun effet sur la prise de masse corporelle pendant ces 6 semaines (Figure 42).

Figure 42 : Evolution de la masse corporelle de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} placées sous des régimes STD et CHOL (n=6 LSR^{+/+} STD ; n=6 LSR^{+/-} STD ; n=6 LSR^{+/+} CHOL ; n=6 LSR^{+/-} CHOL)

Nous avons contrôlé de façon longitudinale la prise alimentaire des souris pour s'assurer que les prises de masse observées chez les souris placées sous régime HF ne soient pas dues à une prise alimentaire plus importante. Ces mesures nous ont permis de démontrer qu'aucune différence significative de prise alimentaire n'est apparue entre les souris placées sous régime STD et HF quel que soit le génotype (Figure 43).

Figure 43 : Evolution de la prise alimentaire de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} placées sous des régimes STD et HF (n=6 LSR^{+/+} STD ; n=6 LSR^{+/-} STD ; n=7 LSR^{+/+} HF ; n=7 LSR^{+/-} HF)

De façon inattendue, nous avons pu remarquer que la prise alimentaire des souris LSR^{+/-} sous régime CHOL est significativement plus importante que celle des souris LSR^{+/-} sous régime STD dès la première semaine de régime avec une différence de $26,7 \% \pm 2,3 \%$ à la fin du régime. De plus, la prise alimentaire des souris LSR^{+/-} sous régime CHOL augmente de façon constante à partir de la 3^{ème} semaine de régime pour atteindre une différence significative avec les souris sauvages placées sous ce même régime de $25,6 \% \pm 0,4 \%$ au bout des 6 semaines de régime. Bien qu'une tendance à l'augmentation de la prise alimentaire des souris LSR^{+/+} sous régime CHOL soit observée au cours des 4 premières semaines, les différences par rapport aux souris LSR^{+/+} placées sous régime STD ne sont pas significatives (Figure 44).

Figure 44 : Evolution de la prise alimentaire de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} placées sous des régimes STD et CHOL (*p<0,05 ou ** p<0,01 ou *p<0,001 entre groupes STD et CHOL ; #p<0,05 ou ##p<0,01 ou ###p<0,001 entre souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-}) (n=6 LSR^{+/+} STD ; n=6 LSR^{+/-} STD ; n=6 LSR^{+/+} CHOL ; n=6 LSR^{+/-} CHOL)**

Le fait que les souris sauvages placées sous régime CHOL ne présentent pas de modifications significatives de leurs prises alimentaires permet de conclure que la délétion d'un allèle LSR est responsable de l'augmentation de la prise alimentaire sans prise de poids observée sous ce régime. Ces résultats suggèrent donc que le récepteur LSR est impliqué dans la régulation de la prise alimentaire sous régime enrichi en cholestérol.

2. Dosages de cholestérol, de triglycérides et de leptine plasmatiques

Nous avons mesuré les niveaux de différents marqueurs plasmatiques afin de mettre en évidence d'éventuelles perturbations métaboliques liées aux régimes administrés.

Nous n'avons constaté aucune modification significative de la cholestérolémie postprandiale et à jeun chez les souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} sous régime STD avant et après régime (Figure 45). Des augmentations significatives de la cholestérolémie postprandiale d'environ 50 % ont été observées chez les souris des deux génotypes placées sous régime HF, mais sans différence significative entre les deux génotypes (Figure 45). Nous avons également observé une diminution de la cholestérolémie après une période de jeûne de 3h chez les souris de phénotype sauvages sans qu'elle retrouve les niveaux observés avec le régime STD. Cependant, nous ne retrouvons pas le même phénomène chez les souris LSR^{+/-}. En effet ces souris présentent une cholestérolémie à-jeun proche de celle observée lors de la phase postprandiale (Figure 45). Ces résultats supportent l'idée que le récepteur LSR est susceptible de jouer un rôle dans le métabolisme du cholestérol périphérique. Le régime CHOL n'a quant à lui induit aucune augmentation de la cholestérolémie quel que soit le génotype des souris par rapport au régime STD.

Figure 45 : Cholestérolémies postprandiales et à-jeun de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} placées sous des régimes STD, HF et CHOL

En ce qui concerne le régime STD, nous avons observé une diminution significative de l'ordre de 40 % de la triglycéridémie après trois heures de jeûne par rapport à la période post-prandiale sans différence entre les souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} (Figure 46). Nous avons obtenu des résultats identiques avec le régime HF (Figure 46). Nous avons cependant pu remarquer une diminution significative de la triglycéridémie postprandiale chez les souris mises sous régime CHOL sans différence entre les deux génotypes (Figure 46). En effet, les souris sauvages et hétérozygotes placées sous ces régimes présentent respectivement une diminution de l'ordre de 46 % \pm 11,2 % et de 38 % \pm 7,1 % de leur triglycéridémie postprandiale (Figure 46). Lors de la fabrication de ce régime, 2 % d'huile de soja ont été remplacés par 2 % de cholestérol, ce qui a diminué l'apport en acide gras, pouvant éventuellement expliquer cette diminution de la triglycéridémie observée.

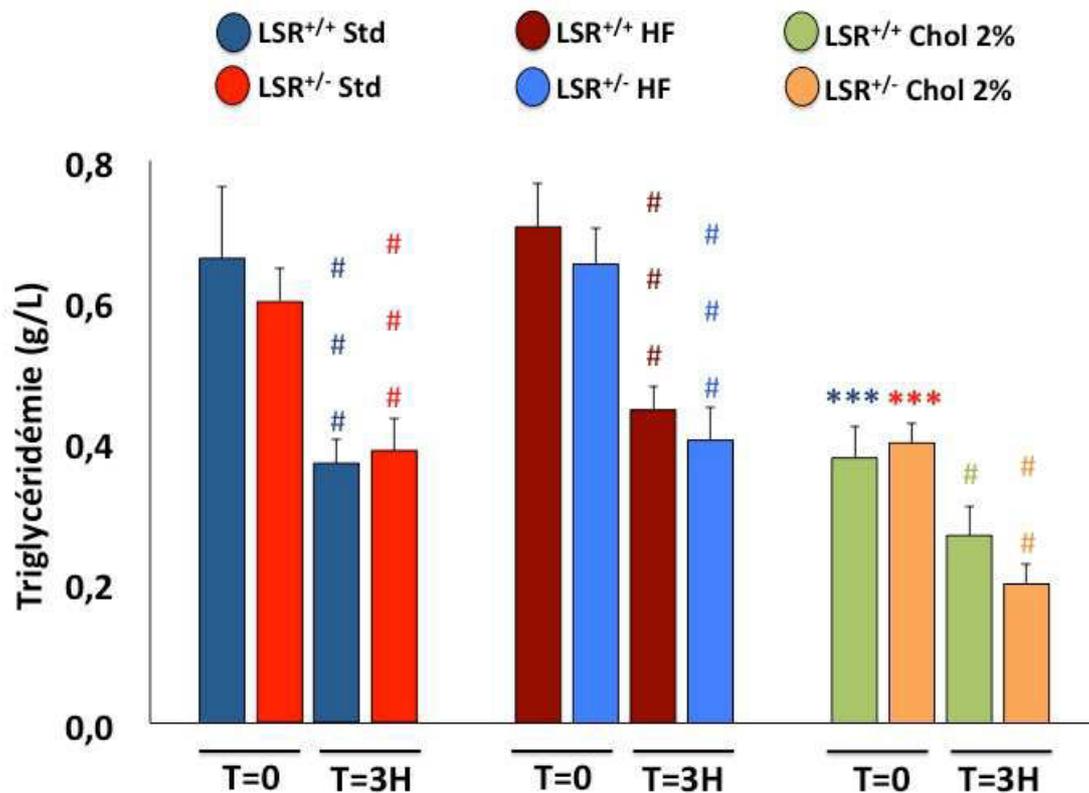


Figure 46 : Triglycéridémies postprandiale et à-jeun de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} placées sous des régimes STD, HF et CHOL (***) p<0,001 entre groupes CHOL et STD ; #p<0,05 ou ##p<0,01 ou ### p<0,001 entre souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-})

Les actions biologiques de la leptine sont associées aux modulations hypothalamiques du comportement alimentaire et de la dépense énergétique. La leptine est une hormone peptidique anorexigène synthétisée et sécrétée par les adipocytes. Connaissant le rôle pléiotropique de la leptine à la fois au niveau du métabolisme énergétique et de la cognition, nous avons dosé la leptine plasmatique des souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} placées sous ces régimes spéciaux. Nous avons observé une augmentation d'environ 700 % de la teneur en leptine plasmatique chez les souris mises sous régime HF (Figure 47). Cependant, aucune différence n'est présente entre les souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} quel que soit le régime sous lequel elles sont placées.

Figure 47 : Quantités de leptine plasmatiques de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} placées sous des régimes STD, HF et CHOL (*) p<0,001 entre groupes HF et STD)**

Une forte corrélation positive et significative est présente entre la masse des souris et la teneur en leptine plasmatique ($r=0,71$ $p<0,001$) (Figure 48). Cette corrélation n'est pas observée chez les souris placées sous régime STD. Par contre, une corrélation positive et significative est observée chez les souris placées sous régime HF ($r=0,55$ $p<0,05$). Ceci confirme que les augmentations de leptine plasmatique observées chez les souris mises sous régimes HF sont liées à l'augmentation de leur masse corporelle et surtout de leur masse grasse.

Figure 48 : Corrélation de Spearman entre la masse et les quantités de leptine plasmatique chez des souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} sous des régimes STD, HF et CHOL

3. Dosages lipidiques hépatiques

Nous avons ensuite mesuré les quantités de cholestérol par mg de tissu sec hépatique chez les souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} soumises aux trois régimes STD, HF et CHOL afin de déterminer si ces régimes ont pu amorcer des modifications au moins chez les souris LSR^{+/-}. Sous régime STD, les taux de cholestérol hépatique sont identiques chez les souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} (Figure 49). Le régime HF n'a pas induit de variation de ces taux de cholestérol hépatique quel que soit le génotype de la souris (Figure 49). Par contre, le régime CHOL a augmenté chez les souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} les quantités de cholestérol hépatique d'environ 19,6 % ± 2,7 % et de 27 % ± 4,6 % respectivement par rapport aux souris placées sous régime STD sans différence significative entre les deux génotypes (Figure 49).

Figure 49 : Quantités de cholestérol par mg de tissu sec hépatique de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} placées sous des régimes STD, HF et CHOL (p<0,01 entre groupe CHOL et STD)**

4. Dosages lipidiques dans les structures cérébrales (hypothalamus, cortex, hippocampe, cervelet)

Nous avons vu dans la partie bibliographique et dans l'introduction de ce chapitre que des régimes enrichis en cholestérol et/ou en triglycérides peuvent avoir un impact sur la composition lipidique des structures cérébrales. Néanmoins, la littérature contient aussi des résultats discordants montrant une absence d'effets entre les perturbations lipidiques périphériques et la composition lipidique des tissus cérébraux. Les teneurs en phospholipides ne varient pas dans les échantillons étudiés, nous avons donc mesuré dans différentes structures cérébrales le ratio cholestérol/phospholipides par mg de tissus sec afin de normaliser les résultats et de déterminer si ces régimes ont pu amorcer des modifications au moins chez les souris

LSR^{+/-}. Comme nous avons observé un effet du régime CHOL sur la prise alimentaire, nous avons débuté ces mesures par l'hypothalamus, structure qui contrôle la prise alimentaire via la sécrétion des peptides orexigènes ou anorexigènes.

Nous avons observé dans l'hypothalamus des souris placées sous régime HF des augmentations significatives du ratio cholestérol/phospholipides de 47,1 % ± 5,8 % chez les souris LSR^{+/+} et de 35,7 % ± 4,1 % chez les souris LSR^{+/-} par rapport aux souris placées sous régime STD. Cependant, aucune différence significative n'est présente entre les deux génotypes de souris (Figure 50). Par contre, nous avons constaté une augmentation significative du ratio cholestérol/phospholipide dans l'hypothalamus mais seulement chez les souris LSR^{+/-} placées sous régime CHOL et pas chez les souris sauvages placées sous le même régime.

Figure 50 : Ratios de cholestérol/phospholipides par mg de tissu sec d'hypothalamus de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} placées sous des régimes STD, HF et CHOL (* p<0,05 entre groupes HF et STD ## p<0,01 entre souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-})

En ce qui concerne les autres structures cérébrales, nous n'avons mis en évidence aucune différence significative dans le cervelet (Figure 51), le cortex (Figure 52) et l'hippocampe (Figure 53) des souris quels que soient le génotype et le régime.

Figure 51 : Ratios de cholestérol/phospholipides par mg de tissu sec de cervelet de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} placées sous des régimes STD, HF et CHOL

Figure 52 : Ratios de cholestérol/phospholipides par mg de tissu sec de cortex de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} placées sous des régimes STD, HF et CHOL

Figure 53 : Ratios de cholestérol/phospholipides par mg de tissu sec d'hippocampe de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} placées sous des régimes STD, HF et CHOL

5. Evaluation des capacités cognitives

Face aux résultats de la littérature scientifique mettant en avant l'impact de ces différents régimes alimentaires sur les capacités cognitives, nous avons voulu déterminer leurs effets sur les fonctions cognitives des souris LSR^{+/-}.

Nous avons donc tout d'abord évalué la mémoire de travail à court terme de ces souris après les 6 semaines de régime. Pour cela, nous avons utilisé le labyrinthe en Y dont le principe est décrit dans le matériel et méthodes et qui a été utilisé dans nos travaux précédents. La mise des souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} sous les différents régimes alimentaires n'a eu aucun impact sur les pourcentages d'alternances effectuées par les animaux même si on peut remarquer une légère diminution non significative des pourcentages d'alternances des souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} sous régime CHOL (Figure 54 A). Si les capacités de mémoire de travail n'ont pas été altérées par les régimes, les souris LSR^{+/-} sous régime HF présentent par contre une augmentation significative de leur nombre d'entrées de $24,5 \% \pm 2,3 \%$ par rapport à leur contrôles placée sous le même régime et une augmentation de $56,6 \% \pm 5,7 \%$ par rapport aux souris LSR^{+/-} sous régime STD (Figure 54 B). De plus, le nombre d'entrées effectué par les souris LSR^{+/-} sous régime HF est significativement plus élevé que celui des souris LSR^{+/+} placées sous le même régime (Figure 54 B). Nous observons également que le régime CHOL diminue de manière significative le nombre d'entrée des souris LSR^{+/-} par rapport à celui des souris LSR^{+/+} placées sous le même régime. Cependant, nous n'observons pas de différence significative par rapport aux souris placées sous régime STD (Figure 54 B).

Figure 54 : Pourcentages d'alternances (A) et nombres d'entrées (B) réalisés par des souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} soumises à des régimes STD, HF et CHOL (p<0,001 entre groupe HF et STD ou #p<0,05 entre souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-})**

A ce stade, nous pouvons donc conclure qu'à défaut de modifier les capacités de mémoire de travail, le régime HF augmente l'activité des souris LSR^{+/-}.

Nous avons ensuite voulu étudier les troubles d'activité ou d'anxiété qui semblent être présents chez les souris LSR^{+/-} sous régime HF. Pour cela, nous avons soumis les animaux au test de champ ouvert dont le principe est expliqué dans le matériel et méthodes (partie 1 D 4). Le premier paramètre étudié dans ce test a été la distance parcourue. Nous avons observé une augmentation significative de 36,2 % ± 4,9 % de la distance parcourue des souris LSR^{+/-} sous régime HF par rapport aux souris LSR^{+/-} placées sous régime STD (Figure 55). De plus, une augmentation significative de la distance parcourue des souris LSR^{+/-} sous régime HF par rapport à leurs contrôles placés sous le même régime de 35,5 % ± 4,9 % est observée (Figure 55). Ce résultat démontre donc une plus grande activité des souris LSR^{+/-} après 6 semaines de régime HF et concorde avec l'augmentation de l'activité démontrée par l'augmentation du nombre d'entrées effectuées par ces mêmes souris dans le

labyrinthe en Y (Figure 54). Le régime CHOL ne diminue pas de manière significative la distance parcourue par les souris placées sous ce régime quel que soit le génotype.

Figure 55 : Distances parcourues par des souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} soumises à des régimes STD, HF et CHOL (*p<0,05 entre groupes HF et STD ; ## p<0,01 entre souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-})

Afin d'obtenir des informations supplémentaires pour comprendre si les troubles observés sont dus à des modifications de la motivation ou à des perturbations de l'anxiété, nous avons calculé le pourcentage de temps passé par les souris dans la zone centrale du champ ouvert, qui constitue une zone très anxiogène pour les animaux. En effet, plus une souris passe de temps dans cette zone, moins la souris est anxieuse. Les souris LSR^{+/-} placées sous régime HF présentent une augmentation significative de 112,7 % ± 5,2 % du pourcentage de temps passé dans la zone centrale par rapport à leurs contrôles placés sous le même régime et une augmentation significative de 67,1 % ± 10,5 % par rapport aux souris LSR^{+/-} sous régime STD (Figure 56 A). Le régime CHOL n'impacte pas le pourcentage de temps passé dans la zone centrale par les souris quel que soit le génotype. Pour confirmer le résultat précédent,

nous avons calculé le pourcentage de temps d'immobilisation des souris qui est un marqueur de l'anxiété des souris. En effet, plus une souris s'immobilise pendant un test de comportement, plus celle-ci est stressée. Les souris LSR^{+/-} placées sous régime HF ont une diminution significative de 35,3 % ± 4,8 % de leur temps d'immobilisation par rapport à leurs contrôles placés sous le même régime (Figure 56 B). L'ensemble de ces résultats conforte donc l'idée que les souris LSR^{+/-} sous régime HF sont moins anxieuses. Le régime enrichi en cholestérol semble avoir un effet anxiogène comme en témoigne les augmentations significatives des temps d'immobilisation de 22,3 % ± 8,7 % et de 31 % ± 8,9 % des souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} respectivement par rapport aux souris placées sous régime STD. Cependant, aucune différence significative n'apparaît entre les deux génotypes de souris (Figure 56 B).

Figure 56 : Temps passés dans la zone centrale et d'immobilisation de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} soumises à des régimes STD, HF et CHOL (*p<0,05 ou **p<0,01 entre régime HF ou CHOL et STD ; ## p<0,01 ou ### p<0,001 entre souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-})

Afin de s'assurer d'une absence de troubles de la locomotion, nous avons calculé les vitesses moyennes globales des souris au cours de ce test. Tous les animaux

présentent des vitesses similaires, démontrant que les différences précédemment obtenues ne sont pas dues à des troubles de la locomotion (Figure 57 A). Les mesures des vitesses des souris dans la zone centrale démontrent que les animaux se déplacent plus rapidement dans cette zone suite à un stress accru. Cela confirme et valide le caractère anxiogène du test. De plus, tous les groupes de souris ont des vitesses similaires, ce qui confirme une nouvelle fois l'absence de problème de locomotion (Figure 57 B).

Figure 57 : Vitesses moyennes globale et dans la zone centrale de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} soumises à des régimes STD, HF et CHOL

6. Caractérisation des acteurs du métabolisme du cholestérol central hypothalamique

Sur la base de nos résultats montrant à la fois des modifications du rapport cholestérol/phospholipides dans l'hypothalamus des souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} soumises aux régimes HF ainsi qu'une diminution de l'anxiété chez les seules souris LSR^{+/-} soumises au régime HF, nous avons initié une exploration des mécanismes moléculaires et des acteurs du métabolisme du cholestérol dans cette structure cérébrale, qui pourraient être à l'origine de ces observations. Nous avons tout d'abord

recherché si une augmentation locale de la synthèse du cholestérol et/ou une diminution de son exportation pouvaient être à la source de ces phénomènes. Nous avons donc mesuré les niveaux d'expression protéique de l'HMGCoAR, enzyme clé du métabolisme du cholestérol, et de son principal transporteur ABCA1. L'expression protéique de l'HMGCoAR s'est révélée présente à des niveaux identiques chez toutes les souris et avec tous les régimes utilisés (Figure 58). Ceci semble indiquer que les accumulations de cholestérol ne sont pas dues à une augmentation de la synthèse de cholestérol. Cependant, bien que son expression ne soit pas modifiée, nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse que son activité soit augmentée.

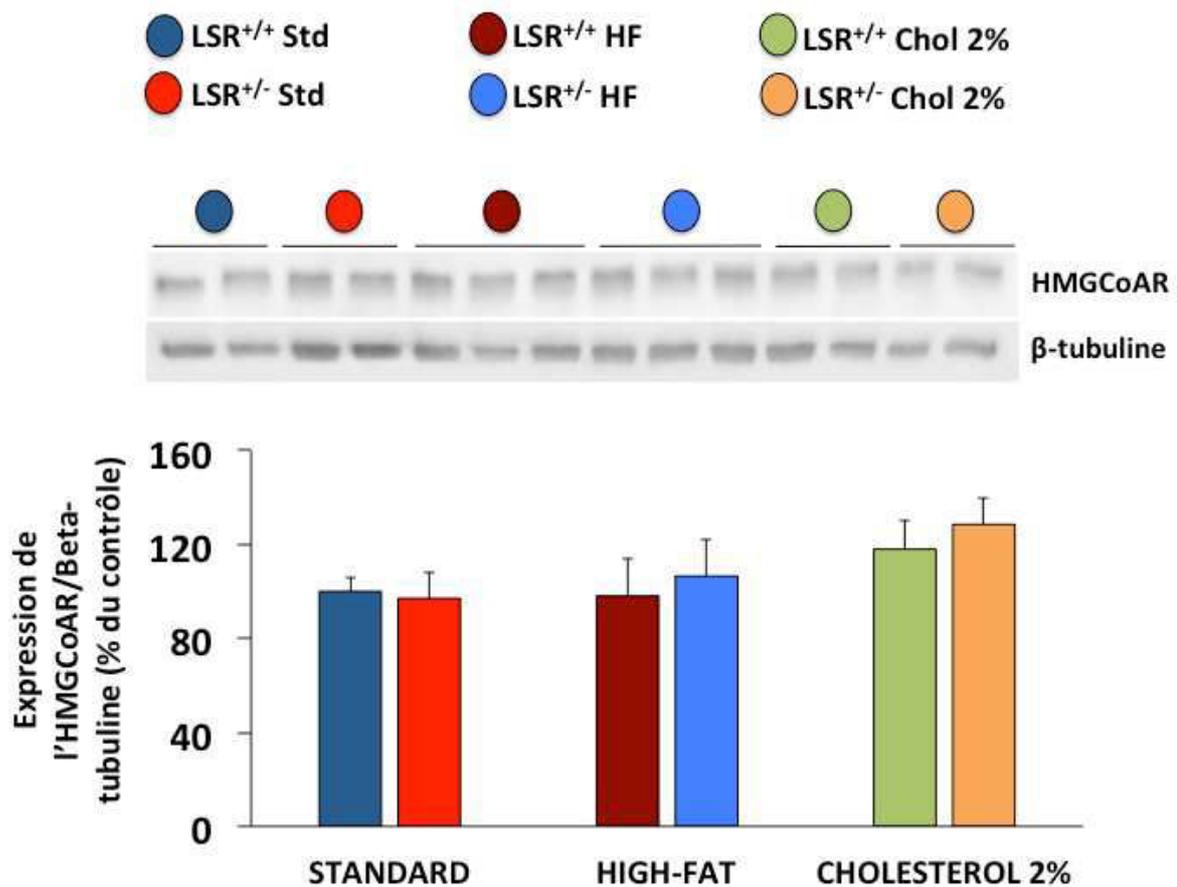


Figure 58 : Expressions de l'HMGCoAR dans l'hypothalamus de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} placées sous des régimes STD, HF et CHOL (n=5 LSR^{+/+} STD ; n=5 LSR^{+/-} STD ; n= 6 LSR^{+/+} HF ; n=6 LSR^{+/-} HF ; n=5 LSR^{+/+} CHOL ; n=5 LSR^{+/-} CHOL)

Nous avons observé une diminution significative de $22 \% \pm 6 \%$ de l'expression protéique d'ABCA1 chez les souris LSR^{+/-} placées sous régime STD par rapport aux souris sauvages. Une diminution de l'expression protéique d'ABCA1 est également présente chez les souris des deux génotypes placées sous régime HF et CHOL par rapport aux souris sous régime STD, mais qui n'atteint pas de significativité statistique (Figure 59). Puisque ABCA1 joue un rôle dans l'efflux du cholestérol cellulaire, il est envisageable que la diminution de l'expression d'ABCA1 dans l'hypothalamus des souris sous régime HF soit à l'origine des accumulations observées.

Figure 59 : Expression d'ABCA1 dans l'hypothalamus de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} placées sous des régimes STD, HF et CHOL (# p<0,05 entre souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-}) (n=5 LSR^{+/+} STD ; n=5 LSR^{+/-} STD ; n= 6 LSR^{+/+} HF ; n=6 LSR^{+/-} HF ; n=5 LSR^{+/+} CHOL ; n=5 LSR^{+/-} CHOL)

Nous avons ensuite porté notre attention aux mécanismes de signalisation entre le compartiment périphérique et le cerveau qui pourraient être impliqués. Dans la mesure où une augmentation de la prise alimentaire a été observée dans le régime CHOL, nous nous sommes tout d'abord intéressé au rôle de la ghréline, hormone pro-

orexigène qui est également impliquée dans des troubles du comportement et la MA (Gahete *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2014; Moon *et al.*, 2014). Nous avons mis en évidence une augmentation significative de l'expression du récepteur à la ghréline chez les souris LSR^{+/-} sous régime HF ainsi que chez les souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} placées sous régime CHOL (Figure 60).

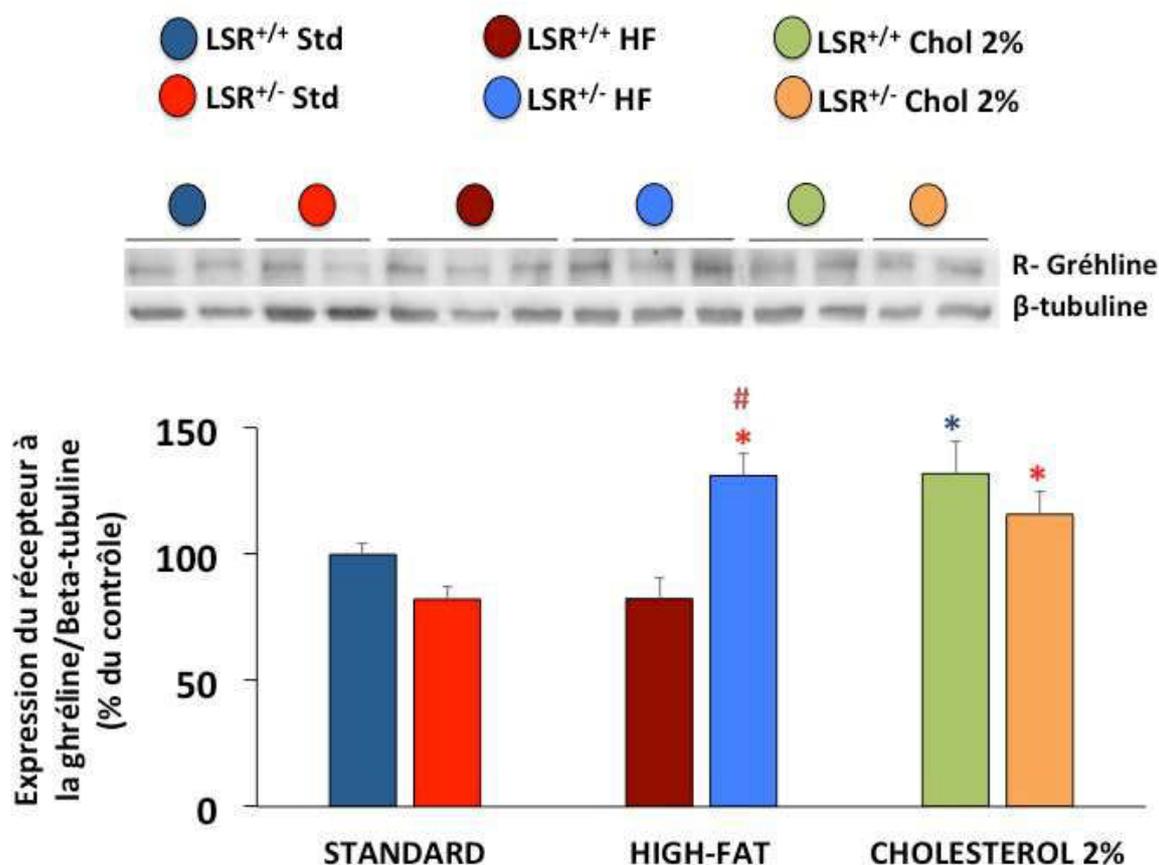


Figure 60 : Expressions du récepteur à la ghréline dans l'hypothalamus de souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} placées sous des régimes STD, HF et CHOL (* p<0,05 entre groupes HF ou CHOL et STD ; # p<0,05 entre souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-}) (n=5 LSR^{+/+} STD ; n=5 LSR^{+/-} STD ; n= 6 LSR^{+/+} HF ; n=6 LSR^{+/-} HF ; n=5 LSR^{+/+} CHOL ; n=5 LSR^{+/-} CHOL)

La ghréline, autrement appelée hormone de l'appétit, stimule la prise alimentaire et la prise de poids en favorisant notamment la production des peptides orexigènes NPY et AgRP (Verhulst and Depoortere, 2012). Nous avons donc essayé de mesurer les niveaux d'expression de ces deux neuropeptides par immunoblot.

Malheureusement, il nous a été impossible de détecter le moindre signal par cette technique.

D. Discussion

L'objectif de notre travail était de rechercher si des régimes enrichis en lipides, appliqués pendant une durée de 6 semaines, pouvaient mettre en évidence des altérations du métabolisme central du cholestérol chez des souris LSR^{+/-} d'âge moyen, sur la base de nos observations précédentes chez des souris LSR^{+/-} âgées. Le régime riche en triglycérides a abouti chez ces souris à une diminution de la différence des taux de cholestérol plasmatique après une période de jeûne de 3 heures (ce qui suggère une diminution de la clairance du cholestérol plasmatique), une diminution de l'anxiété ou anxiolyse, une augmentation du ratio cholestérol/phospholipides dans l'hypothalamus, ainsi qu'une augmentation de l'expression du récepteur de la ghréline dans cette même structure cérébrale. Seulement, l'augmentation du ratio hypothalamique cholestérol/phospholipides a été retrouvée également chez les souris de phénotype sauvage. Le régime enrichi en cholestérol a eu des effets différents. En effet, aucune altération de la cholestérolémie ou des taux de cholestérol plasmatique après une période de jeûne de 3 heures et aucune modification comportementale n'ont été observées. Cependant, une augmentation du ratio cholestérol/phospholipides dans l'hypothalamus propre à la souris LSR^{+/-} et une augmentation du récepteur de la ghréline présente également chez les souris de phénotype sauvage ont été observées.

En ce qui concerne la dyslipidémie et les effets périphériques du régime HF, notre étude a retrouvé les résultats des travaux réalisés antérieurement dans le laboratoire (Stenger *et al.*, 2010; Yen *et al.*, 2008), c'est-à-dire une augmentation plus importante du poids des souris LSR^{+/-}. Ces études antérieures ont surtout porté sur les phénomènes de clairance et de captation hépatique des lipoprotéines riches en triglycérides à l'aide de gavage de solutions riches en triglycérides (Stenger *et al.*, 2010; Yen *et al.*, 2008). D'autres études ont démontré qu'un régime hyperlipidique induit une augmentation de la cholestérolémie ainsi qu'une diminution de la triglycéridémie (Biddinger *et al.*, 2005; Yen *et al.*, 2008). Ces données sont en cohérence avec notre résultat sur la diminution des taux de cholestérol après une période de jeûne de 3

heures et après un régime d'une durée de 6 semaines et semblent donc conforter un rôle potentiel de LSR dans le métabolisme et la clairance du cholestérol plasmatique. Un profil des lipoprotéines plasmatiques permettrait de savoir quels types de lipoprotéines sont difficilement épurées lors de la phase postprandiale chez les souris LSR^{+/-} placées sous ce type de régime. Par contre, le régime enrichi en cholestérol n'a modifié ni la cholestérolémie, ni le taux de cholestérol plasmatique après une période de jeûne de 3 heures par rapport au régime STD. Il a par contre provoqué une augmentation de la quantité de cholestérol hépatique et une diminution d'environ 40 % des triglycéridémies post-prandiales chez les souris LSR^{+/+} et LSR^{+/-} par rapport au régime STD. Nous ne pouvons pas écarter l'idée que la majorité du cholestérol ait été éliminé dans les acides biliaires d'autant plus que les foies des souris des deux génotypes soumises à ce régime étaient de couleur beaucoup plus pâle que les souris placées sous les autres régimes, ce qui suggère une stéatose. Il est à noter que lors de la fabrication de ce régime, 2 % d'huile de soja ont été remplacés par 2 % de cholestérol, ce qui a diminué l'apport en acide gras. Cette diminution de l'apport en triglycérides alimentaires pourrait expliquer celle de la triglycéridémie dans les deux génotypes de souris et éventuellement l'augmentation de la prise alimentaire chez les souris LSR^{+/-}.

L'un des résultats marquants de notre étude est l'induction par le régime HF d'une diminution de l'anxiété (ou anxiolyse) spécifiquement chez la souris LSR^{+/-} et non chez la souris de phénotype sauvage. La compréhension des rapports entre stress, prise alimentaire et prise de poids chez l'homme est importante pour lutter contre la croissance de l'obésité et des pathologies associées dans les sociétés actuelles, où les situations de stress ressenti semblent affecter un nombre croissant d'individus. Une augmentation de prise alimentaire et la consommation d'aliments gras et sucrés permettraient de diminuer l'anxiété. Mais les connaissances à ce sujet sont encore extrêmement limitées. Chez l'animal, un certain nombre d'études ont démontré que des régimes hyperlipidiques diminuent l'anxiété des animaux (Alsiö *et al.*, 2009; Haagenen *et al.*, 2014; Maniam and Morris, 2010; Prasad and Prasad, 1996; Teegarden and Bale, 2007, 2007). En effet, des souris placées sous des régimes faiblement caloriques présentent des troubles de l'anxiété lors de tests comportementaux

stressants, contrairement aux souris placées sous des régimes HF (Finger *et al.*, 2011). D'autres études ont par contre indiqué une augmentation de l'anxiété des souris placées sous des régimes HF (Can *et al.*, 2012). En fait, l'influence d'un régime alimentaire hyperlipidique sur le comportement animal et son anxiété dépend des modalités d'application du régime et des conditions de stress utilisées (Finger *et al.*, 2011). En outre des différences liées à l'âge et au genre ont pu être observées. Ainsi, un régime hyperlipidique a eu plus d'impact comportemental chez des rats âgés. De même, suite à ce régime, les femelles ont présenté une anxiolyse alors que les males ont au contraire démontré un comportement plus anxieux en réponse à ce régime (Warneke *et al.*, 2014). Différents acteurs ont été mis en évidence pour apporter des informations mécanistiques. Tout d'abord, les animaux ayant vu leur anxiété augmentée suite à un régime HF présentent une diminution du glutathion sanguin ainsi qu'une augmentation de la corticostérone plasmatique. (Buchenauer *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2014; Del Rosario *et al.*, 2012; Sharma and Fulton, 2013). De plus, des corrélations entre la quantité de DHA cérébral et l'anxiété sont présentes. Ainsi, les régimes HF entraînent une diminution de la quantité de DHA dans le cerveau associée à une augmentation de l'anxiété (Sharma *et al.*, 2012).

Les mécanismes biologiques au niveau cérébral sous tendant ces effets d'anxiolyse parfois observés suite à l'administration de régimes hyperlipidiques ont fait l'objet de plusieurs hypothèses. Certains auteurs ont avancé une diminution de l'activité de l'acétylcholine estérase dans le cerveau, ce qui augmente la quantité d'acétylcholine dans le cerveau, améliorant les transmissions synaptiques (Kaizer *et al.*, 2004; Morganstern *et al.*, 2012). La ghréline semble avoir un rôle central à l'interface de la réponse alimentaire au stress (Schellekens *et al.*, 2012). L'administration intracérébroventriculaire de ghréline pendant 4 semaines induit un comportement de type anxieux et dépressif chez des rats (Carlini *et al.*, 2002). A l'inverse, la suppression de l'expression du récepteur de la ghréline entraîne la suppression de l'hyperactivité dans un modèle d'anorexie mentale (Verhagen *et al.*, 2011). Ces deux études montrent une relation entre la signalisation de la ghréline au niveau cérébral et le comportement de type anxieux, même si cette relation reste à préciser. L'augmentation de l'expression du récepteur de la ghréline sous régime HF chez les souris femelles LSR^{+/-} peut être

rapprochée de l'anxiolyse chez ces mêmes animaux et va dans le sens d'une implication de la signalisation de la ghréline dans les modifications comportementales de ces animaux en réponse au régime alimentaire. Cependant, l'induction identique de l'expression de ce récepteur par le régime CHOL dans l'hypothalamus des souris de génotype sauvage et LSR^{+/-} sans modification comportementale suggère que ce régime a des effets spécifiques et différents du régime HF sur le système neuroendocrinien.

Le neuropeptide Y est un autre acteur décrit pour influencer l'anxiété. En effet, ce dernier induit des effets anxiolytiques via son récepteur NPY1R (Nakajima *et al.*, 1998; Redrobe *et al.*, 2002). Les régimes HF diminuent l'expression du récepteur NPY1R dans le cortex préfrontal, l'hippocampe et l'hypothalamus, diminuant ses effets anxiolytiques (Sharma *et al.*, 2012). Le neuropeptide Y est également décrit pour réguler la réponse alimentaire en réponse à la ghréline (Verhulst and Depoortere, 2012). Il ne présente donc pas seulement un intérêt pour les phénomènes d'anxiolyse observés, mais aussi pour les altérations de la prise alimentaire que nous avons observées chez les souris LSR^{+/-} mises sous régime CHOL. L'autre acteur de la régulation de la prise alimentaire auquel nous nous sommes intéressés est l'« *Agouti-related-peptide* » AGRP. Ce peptide exprimé dans le noyau arqué de l'hypothalamus est également orexigénique et favorise la consommation alimentaire (Broberger *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2000; Rossi *et al.*, 1998). Nous nous sommes enfin intéressés à un troisième neuropeptide, le « *Cocaine and amphetamine-regulated transcript* » (CART), qui est anorexigénique et localisé dans des zones spécifiques de l'hypothalamus telles que le noyau arqué et le noyau paraventriculaire (Li *et al.*, 2002). Malheureusement, il nous a été impossible de quantifier les expressions de ces 3 neuropeptides par immunoblot. Nous avons utilisé l'hypothalamus d'un hémisphère cérébral, l'autre étant utilisé pour les dosages lipidiques. Les quantités d'homogénats et de protéines obtenues étaient très faibles, ce qui a représenté un facteur limitant lors des dépôts pour l'immunoblot. En conclusion, les souris LSR^{+/-} pourraient constituer un modèle pour étudier les relations régime hyperlipidique-anxiété-ghréline et leur impact sur la prise alimentaire et l'obésité. Cependant, une caractérisation plus approfondie des acteurs moléculaires, des concentrations de ghréline périphériques et

centrales, des voies de signalisation de la ghréline, ainsi que des productions et des activités des peptides orexigènes et anorexigène doit être menée.

L'augmentation des taux de cholestérol dans l'hypothalamus induite par le régime HF ne semble pas être reliée à l'anxiolyse ni à l'augmentation de l'expression du récepteur de la ghréline car elle a été constatée aussi bien chez les souris LSR^{+/-} que chez les souris sauvages. Par contre, elle pourrait être impliquée dans l'augmentation de la prise alimentaire induite par le régime CHOL chez les souris LSR^{+/-} par des mécanismes encore à caractériser. Nous n'avons observé aucune augmentation de la teneur en cholestérol dans les autres structures cérébrales ni d'indice d'une redistribution contrairement à ce que nous avons observé chez les souris LSR^{+/-} âgées. La durée du régime de six semaines appliquée à des souris qui présentent un déficit partiel de l'expression du récepteur LSR à l'état hétérozygote n'est sans doute pas suffisante pour initier une altération du métabolisme du cholestérol dans l'hippocampe, le cortex ou le cervelet. Par contre, nous n'avons pas mesuré les taux de 24S-OHC qui sont augmentés dans le cortex des souris LSR^{+/-} âgées (article J. Alzh Dis). Les acteurs du métabolisme du cholestérol cérébral qui pourraient être affectés chez les souris LSR^{+/-} et être à l'origine de la plus grande sensibilité de ces souris au peptide A β au cours du vieillissement restent donc à identifier. Il est à noter que le récepteur LSR est présent au sein de la BHE et semble jouer un rôle dans la formation des jonctions serrées, éléments clés de l'intégrité et de l'imperméabilité de la BHE (Iwamoto *et al.*, 2014; Masuda *et al.*, 2011). La déficience de 50% du récepteur LSR chez le modèle de souris LSR^{+/-} peut entraîner une altération de l'intégrité de la BHE conduisant à des modifications de la teneur en cholestérol cérébral dans des conditions d'hypercholestérolémie. Cette hypothèse sera également à évaluer dans un futur travail.

Chapitre IV : Conclusions et perspectives

Les améliorations des conditions de vie, des politiques de prévention et de prise en charge des 50 dernières années ont entraîné un allongement de la durée de vie et une augmentation du nombre d'individus âgés. De ce fait, un accroissement des cas de démences liées à l'âge telle que la MA touche les populations. La MA est devenue aujourd'hui un enjeu de santé publique. Les connaissances acquises au cours des dernières années tant au niveau épidémiologique que préclinique ont permis de révéler l'importance du cholestérol et de la nutrition pour la physiologie du système nerveux. Cependant, les mécanismes et le rôle du cholestérol dans la physiopathologie de la MA restent encore controversés. Il est donc nécessaire de caractériser de nouveaux acteurs du métabolisme du cholestérol cérébral et de la MA. Ainsi, ces travaux ont de thèse ont porté sur le récepteur LSR dans le cerveau de souris, qui est à l'origine connu pour jouer un rôle dans la clairance des lipoprotéines riches en TG lors de la phase postprandiale.

Le premier objectif de ces travaux de thèse a été de caractériser la présence du récepteur LSR dans le système nerveux central. Par la technique d'immunohistochimie, nous avons démontré la présence de ce récepteur dans des structures importantes pour les capacités cognitives et le métabolisme énergétique, telles que l'hippocampe, le cortex, le cervelet, l'hypothalamus, le système ventriculaire et le plexus choroïde. Nous avons ensuite démontré chez des souris hétérozygotes pour le récepteur LSR une altération de la distribution du cholestérol cérébral au cours du vieillissement, suggérant un rôle du récepteur LSR dans la régulation du métabolisme du cholestérol cérébral.

A la suite de l'observation d'une altération de la distribution du cholestérol cérébral présente chez les souris LSR^{+/-} et connaissant le rôle potentiel du cholestérol cérébral dans la physiopathologie de la MA, le troisième objectif a été de déterminer le degré de sensibilité de ces souris à la neurotoxicité des oligomères du peptide A β . Dans ce but, nous avons effectué des injections intracérébroventriculaires d'oligomères du peptide A β ₄₂ chez des souris LSR^{+/-}, suivies de divers tests comportementaux afin d'évaluer les capacités cognitives. Nous avons ainsi pu observer des altérations des capacités d'apprentissage, de la mémoire à long terme et

de l'expression de marqueur synaptiques amplifiées chez les souris LSR^{+/-}, traduisant une sensibilité accrue de ces dernières à la neurotoxicité des oligomères du peptide A β . Nous avons également observé une diminution de la teneur en cholestérol cortical suite aux icv d'oligomères du peptide A β , qui corrèle négativement avec les capacités d'apprentissage. Ces diminutions de la quantité de cholestérol cortical sont plus importantes chez les souris LSR^{+/-} confirmant leur plus grande sensibilité aux oligomères du peptide A β . Nous avons également mis en évidence une accumulation de 24S-OHC dans le cortex de ces souris sans que le lien entre cette accumulation et la plus grande sensibilité au peptide A β ait pu être établi précisément. Ces éléments indiquent que des altérations du métabolisme du cholestérol cérébral sous-tendent la plus grande sensibilité des souris LSR^{+/-} au peptide A β .

Le troisième objectif de cette thèse a été d'évaluer l'impact de divers régimes alimentaires chez le modèle de souris hétérozygote pour le récepteur LSR. Cette étude a permis de conforter l'idée que le récepteur LSR est potentiellement impliqué dans le métabolisme et la clairance du cholestérol périphérique. Au cours de cette étude, nous avons pu également observer une diminution de l'anxiété des souris LSR^{+/-} placées sous régime HF, ainsi qu'une augmentation de l'expression hypothalamique du récepteur à la ghréline, suggérant un lien entre cette hormone et les troubles d'anxiété. De façon inattendue, nous avons observé une augmentation de la prise alimentaire des souris LSR^{+/-} placées sous régime CHOL, ce qui suggère un rôle du récepteur LSR dans la régulation de la prise alimentaire sous une alimentation riche en cholestérol, bien que les mécanismes sous jacents restent à déterminer. La présence du récepteur LSR dans la BHE et son rôle dans la formation des jonctions serrées laisse suggérer une probable altération de l'intégrité de la BHE, qui pourrait provoquer des perturbations de la teneur en cholestérol cérébral dans des conditions d'hypercholestérolémie. Cependant, nous n'avons observé aucune perturbation des teneurs en cholestérol cérébral dans les structures cérébrales étudiées des souris LSR^{+/-} mises sous régimes hyperlipidique, exceptée dans l'hypothalamus.

Trois questions principales émergent de ces travaux :

- 1- Quels sont les mécanismes expliquant les altérations de la distribution du cholestérol dans les différentes structures cérébrales, l'augmentation des teneurs en 24S-OHC dans le cortex, la plus grande sensibilité au peptide A β des souris LSR^{+/-} âgées ?
- 2- Comment se constituent ces phénomènes au cours du vieillissement ?
- 3- Quels sont les mécanismes expliquant l'effet anxiolytique observé chez les souris LSR^{+/-} sous régime HF et les troubles de la prise alimentaire observés chez les souris LSR^{+/-} sous régime CHOL ?

Pour répondre à la première question, nous pouvons tout d'abord proposer une extension de l'étude transcriptomique réalisée sur l'hippocampe. Cette étude a porté sur un ensemble de gène mais il manquait des acteurs importants du métabolisme du cholestérol comme la CYP46A1 responsable de la synthèse du 24S-OHC. De plus, seul l'hippocampe a été étudié et il serait utile d'examiner d'autres régions cérébrales comme le cortex et l'hypothalamus. Il serait également utile d'examiner un effet genre dans la mesure où nous avons réalisé les études « régimes » sur des femelles et les études de sensibilité au peptide A β sur des souris mâles.

Un modèle cellulaire pourrait être proposé pour mieux caractériser les mécanismes moléculaires. En raison des limites de temps rencontrées pour le développement d'un modèle cellulaire basé sur l'utilisation de cultures primaires de neurones corticaux et des problèmes dus à la toxicité des divers agents de transfection testés, il serait intéressant de construire une lignée cellulaire exprimant les différentes sous-unités du récepteur LSR. En effet, ce modèle pourrait permettre de caractériser l'expression de nombreux acteurs du métabolisme du cholestérol en présence et l'absence du récepteur LSR.

Sachant qu'il existe des interactions entre l'ApoE et le peptide A β , que le récepteur LSR est un récepteur à l'ApoE et que l'expression du gène de l'ApoE est régulée par le 24S-OHC, il est possible que le récepteur LSR joue un rôle dans la clairance du peptide A β . Il pourrait donc être intéressant d'étudier les potentielles interactions directes et indirectes entre le récepteur LSR, le peptide A β , et l'ApoE grâce

à des modèles d'expression cellulaire. Nous pourrions également évaluer plus précisément les interactions potentielles entre le récepteur LSR et les différentes isoformes de l'ApoE telles que l'ApoE2, l'ApoE3 et l'ApoE4, cette dernière isoforme étant le facteur de risque génétique le plus anciennement connu. Afin de bénéficier de réponses *in vivo* et pas seulement *in vitro* quant au rôle potentiel du récepteur LSR dans la clairance du peptide A β , nous pourrions croiser des souris LSR^{+/-} avec des modèles transgéniques de la MA qui produisent de manière excessive le peptide A β .

Pour répondre à la deuxième question et déterminer comment se constitue un vieillissement pathologique chez la souris déficiente pour le récepteur LSR, un nouveau modèle animal pourrait être proposé, avec une suppression du récepteur LSR qui serait totale après induction et neuro-spécifique. En effet, nous avons vu que la suppression constitutive homozygote du gène LSR était létale. L'inductibilité par les systèmes CRE/LOX lèverait cet obstacle et permettrait une suppression de durée mesurée et tissus spécifique. Ce modèle est en construction en collaboration avec la Clinique de la Souris à Strasbourg. Cette lignée pourrait être croisée avec des modèles de vieillissement précoce comme les souris SAM (Senescence Accelerated Mice).

Pour répondre à la troisième question et expliquer comment ces différents régimes alimentaires peuvent influencer l'anxiété et la prise alimentaire chez la souris LSR^{+/-}, une caractérisation du statut hormonal de ces souris, des concentrations de ghréline périphériques et centrales, des voies de signalisation de la ghréline, ainsi que des productions et des activités des peptides orexigènes et anorexigène doit être menée.

Enfin, nous supposons que le récepteur LSR joue un rôle beaucoup plus complexe que celui de simple récepteur aux lipoprotéines. En effet, la létalité observée chez les souris LSR^{+/-} au stade embryonnaire laisse suggérer un rôle important de ce dernier dans le neurodéveloppement.

Appendice : Développement d'un modèle *in vitro*

Face aux résultats obtenus *in vivo* qui font l'objet de l'article en révision dans JAD, nous avons voulu développer un modèle *in vitro* afin de démontrer que la déficience du récepteur LSR induit une plus grande sensibilité au stress amyloïde. Le but est à terme de déterminer les mécanismes responsables de cette sensibilité accrue observée chez l'animal. Nous avons ainsi voulu utiliser un modèle développé au laboratoire qui consiste à traiter des neurones corticaux primaires embryonnaires de rat avec des oligomères soluble du peptide A β . En effet, ce traitement provoque une diminution des marqueurs synaptiques (Desbène *et al.*, 2012). La démarche expérimentale de cette étude consiste à diminuer l'expression du récepteur LSR dans ces neurones, de les traiter ensuite avec des oligomères du peptide A β et d'évaluer la toxicité de ces derniers par MTT et de caractériser l'expression de marqueurs synaptiques par immunoblot.

Nous avons tout d'abord vérifié la présence du récepteur LSR dans les neurones primaires corticaux. Par immunofluorescence, nous avons ainsi pu déterminer sa présence au niveau des corps cellulaires et des prolongements neuronaux, ce qui rend l'utilisation des neurones primaires corticaux possible (Figure 61).

Figure 61 : Immunolocalisation du récepteur LSR dans des neurones primaires corticaux embryonnaires de rats (LSR marqué en rouge et les noyaux en bleus)

Nous avons utilisé différents vecteurs de transfection afin de transférer des siRNA dirigés contre le récepteur LSR. Ces derniers forment des liposomes qui encapsulent les siRNA et favorisent leur entrée dans les cellules suite à une fusion membranaire. Les vecteurs utilisés ont été l'INTERFERin (Polyplus), le TransIT-TKo (*fournisseur*) et la lipofectamine (Invitrogen). Cependant, nous avons été confronté à des problèmes de toxicité induits par ces vecteurs. En effet, l'Interferin ainsi que le vecteur Transit KO ont entraîné une dégradation presque totale des prolongements neuronaux après 24 heures d'incubation seulement (Figure 62). Nous avons donc décidé de ne pas poursuivre les études avec ces deux agents de transfection.

Figure 62 : Neurones primaires corticaux embryonnaires de rats après transfection de siRNA avec les vecteurs de transfection INTERFERin et TransIT-TKO

Nous avons ensuite testé la lipofectamine. Nous avons utilisé 2 quantités différentes, à savoir 3 μL (qui est la quantité conseillée par le fournisseur) et 1,5 μL pour réduire au maximum les problèmes de toxicité. La lipofectamine a induit des altérations morphologiques, mais beaucoup moins importantes que celles observées avec les deux vecteurs précédents (Figure 63). Nous avons donc décidé de retenir ce vecteur de transfection et de poursuivre les mises au point de ce modèle.

Figure 63 : Neurones primaires corticaux embryonnaires de rats après transfection de siRNA avec la lipofectamine

Après l'observation des très légères altérations des prolongements neuronaux, nous avons voulu vérifier si l'expression du marqueur synaptique SNAP25 n'est pas affectée par le vecteur de transfection. L'immunoblot réalisé sur les neurones transfectés avec des siRNA blancs ou contrôles et dirigés contre le récepteur LSR avec la lipofectamine a démontré une dégradation importante de l'ordre de 50 % à 60 % du marqueur SNAP25, que ce soit avec 1,5 μ L ou 3 μ L de lipofectamine (Figure 64).

Figure 64 : Expressions du marqueur présynaptique SNAP25 après transfection de siRNA avec la lipofectamine

La protéine SNAP25 étant un marqueur synaptique permettant de valider les effets des traitements avec les oligomères du peptide A β , nous avons conclu que ce modèle *in vitro* n'était pas utilisable dans les conditions présentes. De plus, cette dégradation des marqueurs synaptiques suggère la présence d'une toxicité. Par la suite, nous avons donc réduit les temps d'incubation à 6 heures et 24 heures au lieu de 48 heures. Les neurones primaires sont des cellules qui ne se multiplient pas, nous avons donc posé l'hypothèse que l'incubation des neurones pendant 6 heures ou 24 heures serait suffisante pour diminuer l'expression du récepteur LSR. Nous avons ainsi testé ces deux temps d'incubation avec encore une fois deux volumes différents de lipofectamine (1,5 μ L et 3 μ L). Après 6 heures et 24 heures, les dégradations des

prolongements neuronaux sont similaires à celles observées après 48 heures d'incubation. On notera cependant que les prolongements neuronaux sont un peu moins dégradés après 6 heures d'incubation (Figure 65).

Figure 65 : Neurones primaires corticaux embryonnaires de rats après transfection de siRNA avec lipofectamine

Nous avons ensuite voulu vérifier la présence d'une éventuelle toxicité suite aux traitements avec la lipofectamine comme le suggèrent les modestes altérations des prolongements neuronaux. Pour se faire, nous avons réalisé le test du MTT dont le principe est décrit dans le matériel et méthodes. Au bout de 6 heures et 24 heures et avec 1,5 μ L de lipofectamine, nous avons observé une toxicité d'environ 35 % (Figure

66). La toxicité étant similaire avec les deux temps d'incubation, cela démontre que la lipofectamine induit une toxicité très rapidement. Cette toxicité est de 40 % lorsque l'on utilise 3 μ L de lipofectamine, que ce soit au bout de 6 heures ou de 24 heures d'incubation (Figure 66). Vu que les cellules transfectées avec les siRNA présentent une toxicité basale de 35 % - 40 %, il n'est pas envisageable de les traiter avec des oligomères du peptide A β et avons abandonné l'idée d'utiliser ce modèle.

Figure 66 : Viabilité de neurones primaires corticaux embryonnaires de rats après transfection de siRNA avec la lipofectamine

Suite à ces résultats non concluants, nous avons utilisé des oligonucléotides antisens qui présentent l'avantage de ne pas nécessiter l'utilisation de vecteur de transfection. Cette méthode devrait donc éliminer les problèmes de toxicité rencontrés jusqu'à présent. Nous avons donc réalisé les transfections de deux oligonucléotides

antisens et de leurs contrôles respectifs avec ou sans traitement d'oligomères du peptide A β , comme décrit dans la partie matériels et méthodes. La toxicité a été évaluée comme précédemment par MTT. Le traitement par les oligonucléotides sens et antisens n'a pas induit de toxicité, et nous a donc permis d'éliminer les problèmes précédemment rencontrés. Comme attendu, les traitements avec les oligomères du peptide A β ont entraîné une toxicité de l'ordre de 30 % à la dose de 0,5 μ M quelque soit les conditions les siRNA transfectés. Autrement dit, les transfections des oligonucléotides sens et antisens n'ont pas eu d'impact sur la sensibilité des neurones vis à vis des oligomères (Figure 67).

Figure 67 : Viabilité de neurones primaires corticaux embryonnaires de rats après transfection d'oligonucléotides et traitement aux oligomères du peptide abeta

Nous avons ensuite vérifié si les transfections des oligonucléotides antisens ont entraîné une diminution de l'expression de LSR. Ni l'antisens 1 (AS1), ni l'antisens 2 (AS2) n'ont entraîné de diminution de l'expression du récepteur LSR (Figure 68). L'absence d'augmentation de sensibilité aux oligomères peut donc s'expliquer par le fait que l'expression du récepteur LSR n'a pas été diminuée et modifiée. De ce fait, ce modèle *in vitro* n'est malheureusement pas exploitable.

Figure 68 : Expression du récepteur LSR dans des neurones primaires corticaux embryonnaires de rats après transfection d'oligonucléotides

Il pourrait être intéressant d'utiliser un autre type de siRNA, appelés Accell-siRNA (Dharmacon), qui tout comme les oligonucléotides, ne nécessitent pas l'utilisation d'un vecteur de transfection. Ceci permettrait de s'affranchir des problèmes de toxicité rencontrés, et de bénéficier de l'efficacité plus importante des siRNA par rapport à celles des oligonucléotides antisens.

A défaut d'utiliser un modèle de culture primaire qui est beaucoup plus représentatif de la physiologie animale que les lignées cellulaires, nous pourrions tout

de même essayer de traiter des cellules N2A qui sont des neuroblastomes murins avec des siRNA. En effet, plusieurs immunoblots ont démontré que ces cellules expriment de façon relativement importante le récepteur LSR. L'achat de siRNA dirigés contre le récepteur LSR murin et la mise au point de leur transfection sur ce modèle de cellules est à envisager afin d'obtenir des informations mécanistiques liant le récepteur LSR au métabolisme du cholestérol et du peptide amyloïde (Figure 69).

Figure 69 : Immunoblot du récepteur LSR sur des cellules N2A

Bibliographie

A

- Abildayeva, K., Jansen, P.J., Hirsch-Reinshagen, V., Bloks, V.W., Bakker, A.H.F., Ramaekers, F.C.S., Vente, J. de, Groen, A.K., Cheryl L. Wellington, Kuipers, F., et al. (2006). 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.
- Abuznait, A.H., and Kaddoumi, A. (2012). Role of ABC transporters in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *ACS Chem Neurosci* 3, 820–831.
- Adams, C.M., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2003). Cholesterol-induced conformational change in SCAP enhanced by Insig proteins and mimicked by cationic amphiphiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10647–10652.
- Adams, C.M., Reitz, J., De Brabander, J.K., Feramisco, J.D., Li, L., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2004). Cholesterol and 25-hydroxycholesterol inhibit activation of SREBPs by different mechanisms, both involving SCAP and Insigs. *J. Biol. Chem.* 279, 52772–52780.
- Agís-Balboa, R.C., Pinna, G., Zhubi, A., Maloku, E., Veldic, M., Costa, E., and Guidotti, A. (2006). Characterization of brain neurons that express enzymes mediating neurosteroid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 14602–14607.
- Ahmad, N., Girardet, J.-M., Akbar, S., Lanhers, M.-C., Paris, C., Yen, F.T., and Corbier, C. (2012). Lactoferrin and its hydrolysate bind directly to the oleate-activated form of the lipolysis stimulated lipoprotein receptor. *FEBS J.* 279, 4361–4373.
- Albers, J.J., Marcovina, S.M., and Christenson, R.H. (1992). Lecithin cholesterol acyltransferase in human cerebrospinal fluid: reduced level in patients with multiple sclerosis and evidence of direct synthesis in the brain. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 22, 169–172.
- Aleshkov, S., Abraham, C.R., and Zannis, V.I. (1997). Interaction of nascent ApoE2, ApoE3, and ApoE4 isoforms expressed in mammalian cells with amyloid peptide beta (1-40). Relevance to Alzheimer's disease. *Biochemistry* 36, 10571–10580.
- Alkam, T., Nitta, A., Mizoguchi, H., Saito, K., Seshima, M., Itoh, A., Yamada, K., and Nabeshima, T. (2008a). Restraining tumor necrosis factor-alpha by thalidomide prevents the amyloid beta-induced impairment of recognition memory in mice. *Behav. Brain Res.* 189, 100–106.
- Alkam, T., Nitta, A., Mizoguchi, H., Itoh, A., Murai, R., Nagai, T., Yamada, K., and Nabeshima, T. (2008b). The extensive nitration of neurofilament light chain in the hippocampus is associated with the cognitive impairment induced by amyloid beta in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 327, 137–147.
- Allen, B., Ingram, E., Takao, M., Smith, M.J., Jakes, R., Virdee, K., Yoshida, H., Holzer, M., Craxton, M., Emson, P.C., et al. (2002). Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 9340–9351.
- Allinson, T.M.J., Parkin, E.T., Turner, A.J., and Hooper, N.M. (2003). ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J. Neurosci. Res.* 74, 342–352.

- Alsiö, J., Roman, E., Olszewski, P.K., Jonsson, P., Fredriksson, R., Levine, A.S., Meyerson, B.J., Hulting, A.-L., Lindblom, J., and Schiöth, H.B. (2009). Inverse association of high-fat diet preference and anxiety-like behavior: a putative role for urocortin 2. *Genes Brain Behav.* 8, 193–202.
- Alzheimer, A., Stelzmann, R.A., Schnitzlein, H.N., and Murtagh, F.R. (1995). An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde." *Clin. Anat. N. Y. N* 8, 429–431.
- Amaral, F.A., Lemos, M.T.R., Dong, K.E., Bittencourt, M.F.Q.P., Caetano, A.L., Pesquero, J.B., Viel, T.A., and Buck, H.S. (2010). Participation of kinin receptors on memory impairment after chronic infusion of human amyloid-beta 1-40 peptide in mice. *Neuropeptides* 44, 93–97.
- Andersen, O.M., and Willnow, T.E. (2006). Lipoprotein receptors in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 29, 687–694.
- Andersen, K., Launer, L.J., Dewey, M.E., Letenneur, L., Ott, A., Copeland, J.R., Dartigues, J.F., Kragh-Sorensen, P., Baldereschi, M., Brayne, C., et al. (1999). Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The Eurodem Studies. Eurodem Incidence Research Group. *Neurology* 53, 1992–1997.
- Anderson, R., Barnes, J.C., Bliss, T.V., Cain, D.P., Cambon, K., Davies, H.A., Errington, M.L., Fellows, L.A., Gray, R.A., Hoh, T., et al. (1998). Behavioural, physiological and morphological analysis of a line of apolipoprotein E knockout mouse. *Neuroscience* 85, 93–110.
- Angevaren, M., Aufdemkampe, G., Verhaar, H.J.J., Aleman, A., and Vanhees, L. (2008). Physical activity and enhanced fitness to improve cognitive function in older people without known cognitive impairment. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD005381.
- Antonny, B., and Schekman, R. (2001). ER export: public transportation by the COPII coach. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 438–443.
- Apfel, R., Benbrook, D., Lernhardt, E., Ortiz, M.A., Salbert, G., and Pfahl, M. (1994). A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *Mol. Cell. Biol.* 14, 7025–7035.
- Aqul, A., Liu, B., Ramirez, C.M., Pieper, A.A., Estill, S.J., Burns, D.K., Liu, B., Repa, J.J., Turley, S.D., and Dietschy, J.M. (2011). Unesterified cholesterol accumulation in late endosomes/lysosomes causes neurodegeneration and is prevented by driving cholesterol export from this compartment. *J. Neurosci.* 31, 9404–9413.
- Aridor, M., Weissman, J., Bannykh, S., Nuoffer, C., and Balch, W.E. (1998). Cargo selection by the COPII budding machinery during export from the ER. *J. Cell Biol.* 141, 61–70.
- Arvanitakis, Z., Schneider, J.A., Wilson, R.S., Bienias, J.L., Kelly, J.F., Evans, D.A., and Bennett, D.A. (2008). Statins, incident Alzheimer disease, change in cognitive function, and neuropathology. *Neurology* 70, 1795–1802.
- Attems, J., Quass, M., Jellinger, K.A., and Lintner, F. (2007). Topographical distribution of cerebral amyloid angiopathy and its effect on cognitive decline are influenced by Alzheimer disease pathology.

J. Neurol. Sci. 257, 49–55.

B

Babiker, A., Andersson, O., Lund, E., Xiu, R.J., Deeb, S., Reshef, A., Leitersdorf, E., Diczfalusy, U., and Björkhem, I. (1997). Elimination of cholesterol in macrophages and endothelial cells by the sterol 27-hydroxylase mechanism. Comparison with high density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. *J. Biol. Chem.* 272, 26253–26261.

Bacsikai, B.J., Xia, M.Q., Strickland, D.K., Rebeck, G.W., and Hyman, B.T. (2000). The endocytic receptor protein LRP also mediates neuronal calcium signaling via N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 11551–11556.

Bagger, Y.Z., Tankó, L.B., Alexandersen, P., Qin, G., and Christiansen, C. (2004). The implications of body fat mass and fat distribution for cognitive function in elderly women. *Obes. Res.* 12, 1519–1526.

Bales, K.R., Verina, T., Dodel, R.C., Du, Y., Altstiel, L., Bender, M., Hyslop, P., Johnstone, E.M., Little, S.P., Cummins, D.J., et al. (1997). Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. *Nat. Genet.* 17, 263–264.

Bales, K.R., Verina, T., Cummins, D.J., Du, Y., Dodel, R.C., Saura, J., Fishman, C.E., DeLong, C.A., Piccardo, P., Petegnief, V., et al. (1999). Apolipoprotein E is essential for amyloid deposition in the APP(V717F) transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 15233–15238.

Bales, K.R., Liu, F., Wu, S., Lin, S., Koger, D., DeLong, C., Hansen, J.C., Sullivan, P.M., and Paul, S.M. (2009). Human APOE isoform-dependent effects on brain β -Amyloid levels in PDAPP transgenic mice. *J. Neurosci.* 29, 6771–6779.

Baranowski, M. (2008). Biological role of liver X receptors. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* 59 Suppl 7, 31–55.

Barelli, H., Lebeau, A., Vizzavona, J., Delaere, P., Chevallier, N., Drouot, C., Marambaud, P., Ancolio, K., Buxbaum, J.D., Khorkova, O., et al. (1997). Characterization of new polyclonal antibodies specific for 40 and 42 amino acid-long amyloid beta peptides: their use to examine the cell biology of presenilins and the immunohistochemistry of sporadic Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy cases. *Mol. Med. Camb. Mass* 3, 695–707.

Barlowe, C. (2002). COPII-dependent transport from the endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 417–422.

Barrett, P.J., Song, Y., Van Horn, W.D., Hustedt, E.J., Schafer, J.M., Hadziselimovic, A., Beel, A.J., and Sanders, C.R. (2012). The amyloid precursor protein has a flexible transmembrane domain and binds cholesterol. *Science* 336, 1168–1171.

Beckmann, N., Schuler, A., Mueggler, T., Meyer, E.P., Wiederhold, K.-H., Staufenbiel, M., and Krucker, T. (2003). Age-dependent cerebrovascular abnormalities and blood flow disturbances in APP23 mice modeling Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 8453–8459.

- Beel, A.J., Sakakura, M., Barrett, P.J., and Sanders, C.R. (2010). Direct binding of cholesterol to the amyloid precursor protein: An important interaction in lipid-Alzheimer's disease relationships? *Biochim. Biophys. Acta* 1801, 975–982.
- Beffert, U., and Poirier, J. (1998). ApoE associated with lipid has a reduced capacity to inhibit beta-amyloid fibril formation. *Neuroreport* 9, 3321–3323.
- Beffert, U., Stolt, P.C., and Herz, J. (2004). Functions of lipoprotein receptors in neurons. *J. Lipid Res.* 45, 403–409.
- Beffert, U., Nematollah Farsian, F., Masiulis, I., Hammer, R.E., Yoon, S.O., Giehl, K.M., and Herz, J. (2006). ApoE receptor 2 controls neuronal survival in the adult brain. *Curr. Biol. CB* 16, 2446–2452.
- Behl, M., Zhang, Y., Monnot, A.D., Jiang, W., and Zheng, W. (2009). Increased beta-amyloid levels in the choroid plexus following lead exposure and the involvement of low-density lipoprotein receptor protein-1. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 240, 245–254.
- Bell, R.D., Sagare, A.P., Friedman, A.E., Bedi, G.S., Holtzman, D.M., Deane, R., and Zlokovic, B.V. (2007). Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 909–918.
- Bellosta, S., Ferri, N., Arnaboldi, L., Bernini, F., Paoletti, R., and Corsini, A. (2000). Pleiotropic effects of statins in atherosclerosis and diabetes. *Diabetes Care* 23 Suppl 2, B72–78.
- Beltowski, J., and Semczuk, A. (2010). Liver X receptor (LXR) and the reproductive system: a potential novel target for therapeutic intervention. *Pharmacol. Rep. PR* 62, 15–27.
- Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Loeloff, R., Louis, J.C., Curran, E., Citron, M., and Vassar, R. (2000). Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. *J. Biol. Chem.* 275, 20647–20651.
- Bernick, C., Katz, R., Smith, N.L., Rapp, S., Bhadelia, R., Carlson, M., Kuller, L., and Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group (2005). Statins and cognitive function in the elderly: the Cardiovascular Health Study. *Neurology* 65, 1388–1394.
- Biddinger, S.B., Almind, K., Miyazaki, M., Kokkotou, E., Ntambi, J.M., and Kahn, C.R. (2005). Effects of diet and genetic background on sterol regulatory element-binding protein-1c, stearoyl-CoA desaturase 1, and the development of the metabolic syndrome. *Diabetes* 54, 1314–1323.
- Bihain, B.E., and Yen, F.T. (1992). Free fatty acids activate a high-affinity saturable pathway for degradation of low-density lipoproteins in fibroblasts from a subject homozygous for familial hypercholesterolemia. *Biochemistry* 31, 4628–4636.
- Binder, L.I., Frankfurter, A., and Rebhun, L.I. (1985). The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J. Cell Biol.* 101, 1371–1378.
- Bjorkhem, I., Andersson, U., Ellis, E., Alvelius, G., Ellegard, L., Diczfalusy, U., Sjovall, J., and Einarsson, C. (2001). From brain to bile. Evidence that conjugation and omega-hydroxylation are important for elimination of 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) in humans. *J. Biol. Chem.* 276, 37004–37010.

- Björkhem, I., Cedazo-Minguez, A., Leoni, V., and Meaney, S. (2009). Oxysterols and neurodegenerative diseases. *Mol. Aspects Med.* 30, 171–179.
- Björkhem, I., and Meaney, S. (2004). Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 806–815.
- Björkhem, I., Lütjohann, D., Breuer, O., Sakinis, A., and Wennmalm, A. (1997). Importance of a novel oxidative mechanism for elimination of brain cholesterol. Turnover of cholesterol and 24(S)-hydroxycholesterol in rat brain as measured with $^{18}O_2$ techniques in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* 272, 30178–30184.
- Black, J.E., Isaacs, K.R., Anderson, B.J., Alcantara, A.A., and Greenough, W.T. (1990). Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 5568–5572.
- Blennow, K., Wallin, A., Fredman, P., Karlsson, I., Gottfries, C.G., and Svennerholm, L. (1990). Blood-brain barrier disturbance in patients with Alzheimer's disease is related to vascular factors. *Acta Neurol. Scand.* 81, 323–326.
- Bodovitz, S., and Klein, W.L. (1996). Cholesterol modulates alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* 271, 4436–4440.
- Bogdanovic, N., Bretillon, L., Lund, E.G., Diczfalusy, U., Lannfelt, L., Winblad, B., Russell, D.W., and Björkhem, I. (2001). 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.
- Bojanic, D.D., Tarr, P.T., Gale, G.D., Smith, D.J., Bok, D., Chen, B., Nusinowitz, S., Lövgren-Sandblom, A., Björkhem, I., and Edwards, P.A. (2010). Differential expression and function of ABCG1 and ABCG4 during development and aging. *J. Lipid Res.* 51, 169–181.
- Bondolfi, L., Calhoun, M., Ermini, F., Kuhn, H.G., Wiederhold, K.-H., Walker, L., Staufenbiel, M., and Jucker, M. (2002). Amyloid-associated neuron loss and gliogenesis in the neocortex of amyloid precursor protein transgenic mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 515–522.
- Borchelt, D.R., Thinakaran, G., Eckman, C.B., Lee, M.K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C.M., Kim, G., Seekins, S., Yager, D., et al. (1996). Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate A β _{1-42/1-40} ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 17, 1005–1013.
- Borchelt, D.R., Ratovitski, T., van Lare, J., Lee, M.K., Gonzales, V., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Price, D.L., and Sisodia, S.S. (1997). Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* 19, 939–945.
- Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82, 239–259.
- Braak, H., and Braak, E. (1992). The human entorhinal cortex: normal morphology and lamina-specific pathology in various diseases. *Neurosci. Res.* 15, 6–31.
- Brandes, C., Kahr, L., Stockinger, W., Hiesberger, T., Schneider, W.J., and Nimpf, J. (2001). Alternative

splicing in the ligand binding domain of mouse ApoE receptor-2 produces receptor variants binding reelin but not alpha 2-macroglobulin. *J. Biol. Chem.* 276, 22160–22169.

Bretillon, L., Lütjohann, D., Stähle, L., Widhe, T., Bindl, L., Eggertsen, G., Diczfalusy, U., and Björkhem, I. (2000a). Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol reflect the balance between cerebral production and hepatic metabolism and are inversely related to body surface. *J. Lipid Res.* 41, 840–845.

Bretillon, L., Sidén, A., Wahlund, L.O., Lütjohann, D., Minthon, L., Crisby, M., Hillert, J., Groth, C.G., Diczfalusy, U., and Björkhem, I. (2000b). Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol in patients with neurological diseases. *Neurosci. Lett.* 293, 87–90.

Broberger, C., Johansen, J., Johansson, C., Schalling, M., and Hökfelt, T. (1998). The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 15043–15048.

Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89, 331–340.

Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1999). A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 11041–11048.

Brown, J., 3rd, Theisler, C., Silberman, S., Magnuson, D., Gottardi-Littell, N., Lee, J.M., Yager, D., Crowley, J., Sambamurti, K., Rahman, M.M., et al. (2004). Differential expression of cholesterol hydroxylases in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 279, 34674–34681.

Brown, M.D., Banker, G.A., Hussaini, I.M., Gonias, S.L., and VandenBerg, S.R. (1997). Low density lipoprotein receptor-related protein is expressed early and becomes restricted to a somatodendritic domain during neuronal differentiation in culture. *Brain Res.* 747, 313–317.

Brunden, K.R., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2009). Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Nat Rev Drug Discov* 8, 783–793.

Bryleva, E.Y., Rogers, M.A., Chang, C.C.Y., Buen, F., Harris, B.T., Rousselet, E., Seidah, N.G., Oddo, S., LaFerla, F.M., Spencer, T.A., et al. (2010). ACAT1 gene ablation increases 24(S)-hydroxycholesterol content in the brain and ameliorates amyloid pathology in mice with AD. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 3081–3086.

Bu, B., Li, J., Davies, P., and Vincent, I. (2002). Deregulation of cdk5, hyperphosphorylation, and cytoskeletal pathology in the Niemann-Pick type C murine model. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 6515–6525.

Buchenauer, T., Behrendt, P., Bode, F.J., Horn, R., Brabant, G., Stephan, M., and Nave, H. (2009). Diet-induced obesity alters behavior as well as serum levels of corticosterone in F344 rats. *Physiol. Behav.* 98, 563–569.

Buée, L., and Delacourte, A. (2006). Tauopathy and Alzheimer disease: a full degenerating process. *Psychol. Neuropsychiatr. Vieil.* 4, 261–273.

Burgess, B.L., Parkinson, P.F., Racke, M.M., Hirsch-Reinshagen, V., Fan, J., Wong, C., Stukas, S.,

Theroux, L., Chan, J.Y., Donkin, J., et al. (2008). ABCG1 influences the brain cholesterol biosynthetic pathway but does not affect amyloid precursor protein or apolipoprotein E metabolism in vivo. *J. Lipid Res.* 49, 1254–1267.

Burns, M., Gaynor, K., Olm, V., Mercken, M., LaFrancois, J., Wang, L., Mathews, P.M., Noble, W., Matsuoka, Y., and Duff, K. (2003). Presenilin redistribution associated with aberrant cholesterol transport enhances β -amyloid production in vivo. *J. Neurosci.* 23, 5645–5649.

Butterfield, D.A. (2002). Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic. Res.* 36, 1307–1313.

Buttini, M., Orth, M., Bellosta, S., Akeefe, H., Pitas, R.E., Wyss-Coray, T., Mucke, L., and Mahley, R.W. (1999). Expression of human apolipoprotein E3 or E4 in the brains of Apoe^{-/-} mice: isoform-specific effects on neurodegeneration. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 4867–4880.

Buttini, M., Yu, G.-Q., Shockley, K., Huang, Y., Jones, B., Masliah, E., Mallory, M., Yeo, T., Longo, F.M., and Mucke, L. (2002). Modulation of Alzheimer-like synaptic and cholinergic deficits in transgenic mice by human apolipoprotein E depends on isoform, aging, and overexpression of amyloid beta peptides but not on plaque formation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 10539–10548.

C

Calabrese, B., Shaked, G.M., Tabarean, I.V., Braga, J., Koo, E.H., and Halpain, S. (2007). Rapid, concurrent alterations in pre- and postsynaptic structure induced by naturally-secreted amyloid-beta protein. *Mol. Cell. Neurosci.* 35, 183–193.

Calero, M., Rostagno, A., Matsubara, E., Zlokovic, B., Frangione, B., and Ghiso, J. (2000). Apolipoprotein J (clusterin) and Alzheimer's disease. *Microsc. Res. Tech.* 50, 305–315.

Can, Ö.D., Ulupınar, E., Özkay, Ü.D., Yegin, B., and Öztürk, Y. (2012). The effect of simvastatin treatment on behavioral parameters, cognitive performance, and hippocampal morphology in rats fed a standard or a high-fat diet. *Behav. Pharmacol.* 23, 582–592.

Cao, D., Fukuchi, K., Wan, H., Kim, H., and Li, L. (2006). Lack of LDL receptor aggravates learning deficits and amyloid deposits in Alzheimer transgenic mice. *Neurobiol. Aging* 27, 1632–1643.

Carlini, V.P., Monzón, M.E., Varas, M.M., Cragolini, A.B., Schiöth, H.B., Scimonelli, T.N., and de Barioglio, S.R. (2002). Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299, 739–743.

Carstea, E.D., Morris, J.A., Coleman, K.G., Loftus, S.K., Zhang, D., Cummings, C., Gu, J., Rosenfeld, M.A., Pavan, W.J., Krizman, D.B., et al. (1997). Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* 277, 228–231.

Carter, D.B., Dunn, E., McKinley, D.D., Stratman, N.C., Boyle, T.P., Kuiper, S.L., Oostveen, J.A., Weaver, R.J., Boller, J.A., and Gurney, M.E. (2001). Human apolipoprotein E4 accelerates beta-amyloid deposition in APP^{sw} transgenic mouse brain. *Ann. Neurol.* 50, 468–475.

- Castano, E.M., Prelli, F., Wisniewski, T., Golabek, A., Kumar, R.A., Soto, C., and Frangione, B. (1995). Fibrillogenesis in Alzheimer's disease of amyloid beta peptides and apolipoprotein E. *Biochem. J.* 306 (Pt 2), 599–604.
- Castellano, J.M., Kim, J., Stewart, F.R., Jiang, H., DeMattos, R.B., Patterson, B.W., Fagan, A.M., Morris, J.C., Mawuenyega, K.G., Cruchaga, C., et al. (2011). Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- β peptide clearance. *Sci. Transl. Med.* 3, 89ra57.
- Champagne, D., Dupuy, J.-B., Rochford, J., and Poirier, J. (2002). Apolipoprotein E knockout mice display procedural deficits in the Morris water maze: analysis of learning strategies in three versions of the task. *Neuroscience* 114, 641–654.
- Chandra, R., Wang, Y., Shahid, R.A., Vigna, S.R., Freedman, N.J., and Liddle, R.A. (2013). Immunoglobulin-like domain containing receptor 1 mediates fat-stimulated cholecystokinin secretion. *J. Clin. Invest.* 123, 3343–3352.
- Chaney, M.O., Stine, W.B., Kokjohn, T.A., Kuo, Y.-M., Esh, C., Rahman, A., Luehrs, D.C., Schmidt, A.M., Stern, D., Yan, S.D., et al. (2005). RAGE and amyloid beta interactions: atomic force microscopy and molecular modeling. *Biochim. Biophys. Acta* 1741, 199–205.
- Chang, T.-Y., Li, B.-L., Chang, C.C.Y., and Urano, Y. (2009). Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferases. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297, E1–9.
- Chartier-Harlin, M.C., Crawford, F., Houlieden, H., Warren, A., Hughes, D., Fidani, L., Goate, A., Rossor, M., Roques, P., and Hardy, J. (1991). Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* 353, 844–846.
- Chartier-Harlin, M.C., Parfitt, M., Legrain, S., Pérez-Tur, J., Brousseau, T., Evans, A., Berr, C., Vidal, O., Roques, P., and Gourlet, V. (1994). Apolipoprotein E, epsilon 4 allele as a major risk factor for sporadic early and late-onset forms of Alzheimer's disease: analysis of the 19q13.2 chromosomal region. *Hum. Mol. Genet.* 3, 569–574.
- Chauhan, N.B., Lichtor, T., and Siegel, G.J. (2003). Aging potentiates A β -induced depletion of SNAP-25 in mouse hippocampus. *Brain Res.* 982, 219–227.
- De Chaves, E.I., Rusiñol, A.E., Vance, D.E., Campenot, R.B., and Vance, J.E. (1997). Role of lipoproteins in the delivery of lipids to axons during axonal regeneration. *J. Biol. Chem.* 272, 30766–30773.
- Chávez-Gutiérrez, L., Bammens, L., Benilova, I., Vandersteen, A., Benurwar, M., Borgers, M., Lismont, S., Zhou, L., Van Cleynenbreugel, S., Esselmann, H., et al. (2012). The mechanism of γ -Secretase dysfunction in familial Alzheimer disease. *EMBO J.* 31, 2261–2274.
- Chawla, A., Repa, J.J., Evans, R.M., and Mangelsdorf, D.J. (2001). Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 294, 1866–1870.
- Chen, G., Chen, K.S., Knox, J., Inglis, J., Bernard, A., Martin, S.J., Justice, A., McConlogue, L., Games, D., Freedman, S.B., et al. (2000). A learning deficit related to age and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 408, 975–979.

- Chen, K.S., Masliah, E., Grajeda, H., Guido, T., Huang, J., Khan, K., Motter, R., Soriano, F., and Games, D. (1998). Neurodegenerative Alzheimer-like pathology in PDAPP 717V-->F transgenic mice. *Prog. Brain Res.* 117, 327–334.
- Chen, T.-Y., Liu, P.-H., Ruan, C.-T., Chiu, L., and Kung, F.-L. (2006). The intracellular domain of amyloid precursor protein interacts with flotillin-1, a lipid raft protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342, 266–272.
- Chen, W., Chen, G., Head, D.L., Mangelsdorf, D.J., and Russell, D.W. (2007). Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice. *Cell Metab.* 5, 73–79.
- Chen, Y., Durakoglugil, M.S., Xian, X., and Herz, J. (2010). ApoE4 reduces glutamate receptor function and synaptic plasticity by selectively impairing ApoE receptor recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 12011–12016.
- Choi, M.U., and Suzuki, K. (1978). A cholesterol-esterifying enzyme in rat central nervous system myelin. *J. Neurochem.* 31, 879–885.
- Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration, Baigent, C., Blackwell, L., Emberson, J., Holland, L.E., Reith, C., Bhalra, N., Peto, R., Barnes, E.H., Keech, A., et al. (2010). Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet* 376, 1670–1681.
- Chow, V.W., Mattson, M.P., Wong, P.C., and Gleichmann, M. (2010). An Overview of APP Processing Enzymes and Products. *NeuroMolecular Med.* 12, 1–12.
- Cibickova, L., Radomir, H., Stanislav, M., Norbert, C., Helena, Z., Daniel, J., Alena, T., Eva, B., and Vladimir, P. (2009). The influence of simvastatin, atorvastatin and high-cholesterol diet on acetylcholinesterase activity, amyloid beta and cholesterol synthesis in rat brain. *Steroids* 74, 13–19.
- Claudel, T., Leibowitz, M.D., Fiévet, C., Tailleux, A., Wagner, B., Repa, J.J., Torpier, G., Lobaccaro, J.M., Paterniti, J.R., Mangelsdorf, D.J., et al. (2001). Reduction of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice by activation of the retinoid X receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 2610–2615.
- Clinton, L.K., Billings, L.M., Green, K.N., Caccamo, A., Ngo, J., Oddo, S., McGaugh, J.L., and LaFerla, F.M. (2007). Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. *Neurobiol. Dis.* 28, 76–82.
- Cochran, E., Bacci, B., Chen, Y., Patton, A., Gambetti, P., and Autilio-Gambetti, L. (1991). Amyloid precursor protein and ubiquitin immunoreactivity in dystrophic axons is not unique to Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 139, 485–489.
- Cole, G.M., and Ard, M.D. (2000). Influence of lipoproteins on microglial degradation of Alzheimer's amyloid beta-protein. *Microsc. Res. Tech.* 50, 316–324.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., and Pericak-Vance, M.A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921–923.

Corder, E.H., Ghebremedhin, E., Taylor, M.G., Thal, D.R., Ohm, T.G., and Braak, H. (2004). The biphasic relationship between regional brain senile plaque and neurofibrillary tangle distributions: modification by age, sex, and APOE polymorphism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1019, 24–28.

Costa, D.A., Nilsson, L.N.G., Bales, K.R., Paul, S.M., and Potter, H. (2004). Apolipoprotein is required for the formation of filamentous amyloid, but not for amorphous Abeta deposition, in an AbetaPP/PS double transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 6, 509–514.

Cotman, C.W., and Berchtold, N.C. (2002). Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.* 25, 295–301.

Couchie, D., Charrière-Bertrand, C., and Nunez, J. (1988). Expression of the mRNA for tau proteins during brain development and in cultured neurons and astroglial cells. *J. Neurochem.* 50, 1894–1899.

Coulson, E.J. (2006). Does the p75 neurotrophin receptor mediate Abeta-induced toxicity in Alzheimer's disease? *J. Neurochem.* 98, 654–660.

Cowan, C.M., Bossing, T., Page, A., Shepherd, D., and Mudher, A. (2010). Soluble hyper-phosphorylated tau causes microtubule breakdown and functionally compromises normal tau in vivo. *Acta Neuropathol.* 120, 593–604.

Craft, J.M., Van Eldik, L.J., Zasadzki, M., Hu, W., and Watterson, D.M. (2004). Aminopyridazines attenuate hippocampus-dependent behavioral deficits induced by human beta-amyloid in a murine model of neuroinflammation. *J. Mol. Neurosci.* MN 24, 115–122.

Cui, W., Sun, Y., Wang, Z., Xu, C., Xu, L., Wang, F., Chen, Z., Peng, Y., and Li, R. (2011). Activation of liver X receptor decreases BACE1 expression and activity by reducing membrane cholesterol levels. *Neurochem. Res.* 36, 1910–1921.

D

D'Arcangelo, G., Homayouni, R., Keshvara, L., Rice, D.S., Sheldon, M., and Curran, T. (1999). Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron* 24, 471–479.

Dai, Y., Tan, X., Wu, W., Warner, M., and Gustafsson, J.-Å. (2012). Liver X receptor β protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 13112–13117.

Daneman, R., Zhou, L., Agalliu, D., Cahoy, J.D., Kaushal, A., and Barres, B.A. (2010). The mouse blood-brain barrier transcriptome: a new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells. *PLoS One* 5, e13741.

Dean, M., Hamon, Y., and Chimini, G. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res.* 42, 1007–1017.

Deane, R., Du Yan, S., Subramanian, R.K., LaRue, B., Jovanovic, S., Hogg, E., Welch, D., Manness, L., Lin, C., Yu, J., et al. (2003). RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat. Med.* 9, 907–913.

Deane, R., Wu, Z., Sagare, A., Davis, J., Du Yan, S., Hamm, K., Xu, F., Parisi, M., LaRue, B., Hu, H.W., et

- al. (2004). LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms. *Neuron* 43, 333–344.
- Deane, R., Sagare, A., Hamm, K., Parisi, M., Lane, S., Finn, M.B., Holtzman, D.M., and Zlokovic, B.V. (2008). apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. *J. Clin. Invest.* 118, 4002–4013.
- De Felice, F.G., Velasco, P.T., Lambert, M.P., Viola, K., Fernandez, S.J., Ferreira, S.T., and Klein, W.L. (2007). Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J. Biol. Chem.* 282, 11590–11601.
- Delacourte, A., and Defossez, A. (1986). Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J. Neurol. Sci.* 76, 173–186.
- Delaère, P., He, Y., Fayet, G., Duyckaerts, C., and Hauw, J.J. (1993). Beta A4 deposits are constant in the brain of the oldest old: an immunocytochemical study of 20 French centenarians. *Neurobiol. Aging* 14, 191–194.
- DeMattos, R.B., Brendza, R.P., Heuser, J.E., Kierson, M., Cirrito, J.R., Fryer, J., Sullivan, P.M., Fagan, A.M., Han, X., and Holtzman, D.M. (2001). Purification and characterization of astrocyte-secreted apolipoprotein E and J-containing lipoproteins from wild-type and human apoE transgenic mice. *Neurochem. Int.* 39, 415–425.
- Desbène, C., Malaplate-Armand, C., Youssef, I., Garcia, P., Stenger, C., Sauvé, M., Fischer, N., Rimet, D., Koziel, V., Escanyé, M.-C., et al. (2012). Critical role of cPLA2 in A β oligomer-induced neurodegeneration and memory deficit. *Neurobiol. Aging* 33, 1123.e17–29.
- Dickson, D.W., Farlo, J., Davies, P., Crystal, H., Fuld, P., and Yen, S.H. (1988). Alzheimer's disease. A double-labeling immunohistochemical study of senile plaques. *Am. J. Pathol.* 132, 86–101.
- Dietschy, J.M., and Turley, S.D. (2001). Cholesterol metabolism in the brain. *Curr. Opin. Lipidol.* 12, 105–112.
- Dietschy, J.M., and Turley, S.D. (2004). Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J. Lipid Res.* 45, 1375–1397.
- Dineley, K.T., Xia, X., Bui, D., Sweatt, J.D., and Zheng, H. (2002). Accelerated plaque accumulation, associative learning deficits, and up-regulation of alpha 7 nicotinic receptor protein in transgenic mice co-expressing mutant human presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *J. Biol. Chem.* 277, 22768–22780.
- Di Scala, C., Chahinian, H., Yahi, N., Garmy, N., and Fantini, J. (2014). Interaction of Alzheimer's β -Amyloid peptides with cholesterol: mechanistic insights into amyloid pore formation. *Biochemistry.* 53(28):4489-502
- Do, T.M., Ouellet, M., Calon, F., Chimini, G., Chacun, H., Farinotti, R., and Bourasset, F. (2011). Direct evidence of abca1-mediated efflux of cholesterol at the mouse blood-brain barrier. *Mol. Cell. Biochem.*

357, 397–404.

Dodart, J.-C., Bales, K.R., Gannon, K.S., Greene, S.J., DeMattos, R.B., Mathis, C., DeLong, C.A., Wu, S., Wu, X., Holtzman, D.M., et al. (2002). Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model. *Nat. Neurosci.* 5, 452–457.

Dodart, J.-C., Marr, R.A., Koistinaho, M., Gregersen, B.M., Malkani, S., Verma, I.M., and Paul, S.M. (2005). Gene delivery of human apolipoprotein E alters brain Abeta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 1211–1216.

Dodart, J.C., Meziane, H., Mathis, C., Bales, K.R., Paul, S.M., and Ungerer, A. (1999). Behavioral disturbances in transgenic mice overexpressing the V717F beta-amyloid precursor protein. *Behav. Neurosci.* 113, 982–990.

Dodart, J.C., Mathis, C., Saura, J., Bales, K.R., Paul, S.M., and Ungerer, A. (2000). Neuroanatomical abnormalities in behaviorally characterized APP(V717F) transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* 7, 71–85.

Dokmanovic-Chouinard, M., Chung, W.K., Chevre, J.-C., Watson, E., Yonan, J., Wiegand, B., Bromberg, Y., Wakae, N., Wright, C.V., Overton, J., et al. (2008). Positional cloning of "Lisch-Like", a candidate modifier of susceptibility to type 2 diabetes in mice. *PLoS Genet.* 4, e1000137.

Dolev, I., and Michaelson, D.M. (2004). A nontransgenic mouse model shows inducible amyloid-beta (Abeta) peptide deposition and elucidates the role of apolipoprotein E in the amyloid cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 13909–13914.

Donahue, J.E., Flaherty, S.L., Johanson, C.E., Duncan, J.A., 3rd, Silverberg, G.D., Miller, M.C., Tavares, R., Yang, W., Wu, Q., Sabo, E., et al. (2006). RAGE, LRP-1, and amyloid-beta protein in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 112, 405–415.

Dong, L.M., and Weisgraber, K.H. (1996). Human apolipoprotein E4 domain interaction. Arginine 61 and glutamic acid 255 interact to direct the preference for very low density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 271, 19053–19057.

Donkin, J.J., Stukas, S., Hirsch-Reinshagen, V., Namjoshi, D., Wilkinson, A., May, S., Chan, J., Fan, J., Collins, J., and Wellington, C.L. (2010). ATP-binding cassette transporter A1 mediates the beneficial effects of the liver X receptor agonist GW3965 on object recognition memory and amyloid burden in amyloid precursor protein/presenilin 1 mice. *J. Biol. Chem.* 285, 34144–34154.

Douma, T.N., Borre, Y., Hendriksen, H., Olivier, B., and Oosting, R.S. (2011). Simvastatin improves learning and memory in control but not in olfactory bulbectomized rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 216, 537–544.

Drubin, D.G., and Kirschner, M.W. (1986). Tau protein function in living cells. *J. Cell Biol.* 103, 2739–2746.

Dufour, F., Liu, Q.-Y., Gusev, P., Alkon, D., and Atzori, M. (2006). Cholesterol-enriched diet affects spatial learning and synaptic function in hippocampal synapses. *Brain Res.* 1103, 88–98.

Dumanis, S.B., Chamberlain, K.A., Jin Sohn, Y., Jin Lee, Y., Guénette, S.Y., Suzuki, T., Mathews, P.M.,

Pak, D.T., Rebeck, G.W., Suh, Y.-H., et al. (2012). FE65 as a link between VLDLR and APP to regulate their trafficking and processing. *Mol. Neurodegener.* 7, 9.

E

Eehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C., and Simons, K. (2003). Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J. Cell Biol.* 160, 113–123.

Elias, P.K., Elias, M.F., Robbins, M.A., and Budge, M.M. (2004). Blood pressure-related cognitive decline: does age make a difference? *Hypertension* 44, 631–636.

Elias, P.K., Elias, M.F., D'Agostino, R.B., Sullivan, L.M., and Wolf, P.A. (2005). Serum cholesterol and cognitive performance in the Framingham Heart Study. *Psychosom. Med.* 67, 24–30.

Elrick, M.J., Pacheco, C.D., Yu, T., Dadgar, N., Shakkottai, V.G., Ware, C., Paulson, H.L., and Lieberman, A.P. (2010). Conditional Niemann-Pick C mice demonstrate cell autonomous Purkinje cell neurodegeneration. *Hum. Mol. Genet.* 19, 837–847.

Espenshade, P.J., Cheng, D., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1999). Autocatalytic processing of site-1 protease removes propeptide and permits cleavage of sterol regulatory element-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 274, 22795–22804.

Evans, M.A., and Golomb, B.A. (2009). Statin-associated adverse cognitive effects: survey results from 171 patients. *Pharmacotherapy* 29, 800–811.

Evans, D.A., Beckett, L.A., Albert, M.S., Hebert, L.E., Scherr, P.A., Funkenstein, H.H., and Taylor, J.O. (1993). Level of education and change in cognitive function in a community population of older persons. *Ann. Epidemiol.* 3, 71–77.

Evans, K.C., Berger, E.P., Cho, C.G., Weisgraber, K.H., and Lansbury, P.T., Jr (1995). Apolipoprotein E is a kinetic but not a thermodynamic inhibitor of amyloid formation: implications for the pathogenesis and treatment of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 763–767.

F

Fagan, A.M., Murphy, B.A., Patel, S.N., Kilbridge, J.F., Mobley, W.C., Bu, G., and Holtzman, D.M. (1998). Evidence for normal aging of the septo-hippocampal cholinergic system in apoE (-/-) mice but impaired clearance of axonal degeneration products following injury. *Exp. Neurol.* 151, 314–325.

Fagan, A.M., Watson, M., Parsadanian, M., Bales, K.R., Paul, S.M., and Holtzman, D.M. (2002). Human and murine ApoE markedly alters A beta metabolism before and after plaque formation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 9, 305–318.

Falchi, A.M., Sogos, V., Saba, F., Piras, M., Congiu, T., and Piludu, M. (2013). Astrocytes shed large membrane vesicles that contain mitochondria, lipid droplets and ATP. *Histochem. Cell Biol.* 139, 221–231.

Famer, D., Meaney, S., Mousavi, M., Nordberg, A., Björkhem, I., and Crisby, M. (2007). Regulation of α - and β -secretase activity by oxysterols: Cerebrosterol stimulates processing of APP via the α -secretase pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359, 46–50.

- Fan, Q.W., Iosbe, I., Asou, H., Yanagisawa, K., and Michikawa, M. (2001). Expression and regulation of apolipoprotein E receptors in the cells of the central nervous system in culture: A review. *J. Am. Aging Assoc.* 24, 1–10.
- Farzan, M., Schnitzler, C.E., Vasilieva, N., Leung, D., and Choe, H. (2000). BACE2, a beta -secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 9712–9717.
- Feldman, H.H., and Woodward, M. (2005). The staging and assessment of moderate to severe Alzheimer disease. *Neurology* 65, S10–S17.
- Feldman, H.H., Doody, R.S., Kivipelto, M., Sparks, D.L., Waters, D.D., Jones, R.W., Schwam, E., Schindler, R., Hey-Hadavi, J., DeMicco, D.A., et al. (2010). Randomized controlled trial of atorvastatin in mild to moderate Alzheimer disease: LEADe. *Neurology* 74, 956–964.
- Fester, L., Zhou, L., Bütow, A., Huber, C., von Lossow, R., Prange-Kiel, J., Jarry, H., and Rune, G.M. (2009). Cholesterol-promoted synaptogenesis requires the conversion of cholesterol to estradiol in the hippocampus. *Hippocampus* 19, 692–705.
- Finger, B.C., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2011). High-fat diet selectively protects against the effects of chronic social stress in the mouse. *Neuroscience* 192, 351–360.
- Fitz, N.F., Cronican, A., Pham, T., Fogg, A., Fauq, A.H., Chapman, R., Lefterov, I., and Koldamova, R. (2010). Liver X receptor agonist treatment ameliorates amyloid pathology and memory deficits caused by high-fat diet in APP23 mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 6862–6872.
- Fitz, N.F., Cronican, A.A., Saleem, M., Fauq, A.H., Chapman, R., Lefterov, I., and Koldamova, R. (2012). Abca1 Deficiency Affects Alzheimer's Disease-Like Phenotype in Human ApoE4 But Not in ApoE3-Targeted Replacement Mice. *J. Neurosci.* 32, 13125–13136.
- Francis, R., McGrath, G., Zhang, J., Ruddy, D.A., Sym, M., Apfeld, J., Nicoll, M., Maxwell, M., Hai, B., Ellis, M.C., et al. (2002). *aph-1* and *pen-2* are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev. Cell* 3, 85–97.
- Frears, E.R., Stephens, D.J., Walters, C.E., Davies, H., and Austen, B.M. (1999). The role of cholesterol in the biosynthesis of beta-amyloid. *Neuroreport* 10, 1699–1705.
- Fryer, J.D., Demattos, R.B., McCormick, L.M., O'Dell, M.A., Spinner, M.L., Bales, K.R., Paul, S.M., Sullivan, P.M., Parsadanian, M., Bu, G., et al. (2005a). The low density lipoprotein receptor regulates the level of central nervous system human and murine apolipoprotein E but does not modify amyloid plaque pathology in PDAPP mice. *J. Biol. Chem.* 280, 25754–25759.
- Fryer, J.D., Simmons, K., Parsadanian, M., Bales, K.R., Paul, S.M., Sullivan, P.M., and Holtzman, D.M. (2005b). Human apolipoprotein E4 alters the amyloid-beta 40:42 ratio and promotes the formation of cerebral amyloid angiopathy in an amyloid precursor protein transgenic model. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 2803–2810.
- Fuentealba, R.A., Barría, M.I., Lee, J., Cam, J., Araya, C., Escudero, C.A., Inestrosa, N.C., Bronfman, F.C., Bu, G., and Marzolo, M.-P. (2007). ApoER2 expression increases A β production while decreasing

Amyloid Precursor Protein (APP) endocytosis: Possible role in the partitioning of APP into lipid rafts and in the regulation of gamma-secretase activity. *Mol. Neurodegener.* 2, 14.

Fuentealba, R.A., Liu, Q., Kanekiyo, T., Zhang, J., and Bu, G. (2009). Low density lipoprotein receptor-related protein 1 promotes anti-apoptotic signaling in neurons by activating Akt survival pathway. *J. Biol. Chem.* 284, 34045–34053.

Fuentealba, R.A., Liu, Q., Zhang, J., Kanekiyo, T., Hu, X., Lee, J.-M., LaDu, M.J., and Bu, G. (2010). Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 (LRP1) mediates neuronal A β 42 uptake and lysosomal trafficking. *PLoS ONE* 5, e11884.

Fukumoto, H., Deng, A., Irizarry, M.C., Fitzgerald, M.L., and Rebeck, G.W. (2002). Induction of the cholesterol transporter ABCA1 in CNS cells by LXR agonists increases secreted A β levels. *J. Biol. Chem.*

Fullerton, S.M., Strittmatter, W.J., and Matthew, W.D. (1998). Peripheral sensory nerve defects in apolipoprotein E knockout mice. *Exp. Neurol.* 153, 156–163.

Furukawa, K., Barger, S.W., Blalock, E.M., and Mattson, M.P. (1996). Activation of K⁺ channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein. *Nature* 379, 74–78.

Furuse, M., Oda, Y., Higashi, T., Iwamoto, N., and Masuda, S. (2012). Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor: a novel membrane protein of tricellular tight junctions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1257, 54–58.

G

Gahete, M.D., Córdoba-Chacón, J., Kineman, R.D., Luque, R.M., and Castaño, J.P. (2011). Role of ghrelin system in neuroprotection and cognitive functions: implications in Alzheimer's disease. *Peptides* 32, 2225–2228.

Gakhar-Koppole, N., Hundeshagen, P., Mandl, C., Weyer, S.W., Allinquant, B., Müller, U., and Ciccolini, F. (2008). Activity requires soluble amyloid precursor protein alpha to promote neurite outgrowth in neural stem cell-derived neurons via activation of the MAPK pathway. *Eur. J. Neurosci.* 28, 871–882.

Galbete, J.L., Martin, T.R., Peressini, E., Modena, P., Bianchi, R., and Forloni, G. (2000). Cholesterol decreases secretion of the secreted form of amyloid precursor protein by interfering with glycosylation in the protein secretory pathway. *Biochem. J.* 348, 307.

Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T., and Gillespie, F. (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 373, 523–527.

Garver, W.S., Francis, G.A., Jelinek, D., Shepherd, G., Flynn, J., Castro, G., Walsh Vockley, C., Coppock, D.L., Pettit, K.M., Heidenreich, R.A., et al. (2007). The National Niemann-Pick C1 disease database: report of clinical features and health problems. *Am. J. Med. Genet. A.* 143A, 1204–1211.

Garza, J.C., Guo, M., Zhang, W., and Lu, X.-Y. (2008). Leptin increases adult hippocampal neurogenesis in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* 283, 18238–18247.

- George, A.J., Holsinger, R.M.D., McLean, C.A., Laughton, K.M., Beyreuther, K., Evin, G., Masters, C.L., and Li, Q.-X. (2004). 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.
- German, D.C., Liang, C.-L., Song, T., Yazdani, U., Xie, C., and Dietschy, J.M. (2002). Neurodegeneration in the Niemann–Pick C mouse: glial involvement. *Neuroscience* 109, 437–450.
- Ghribi, O., Larsen, B., Schrag, M., and Herman, M.M. (2006a). High cholesterol content in neurons increases BACE, β -amyloid, and phosphorylated tau levels in rabbit hippocampus. *Exp. Neurol.* 200, 460–467.
- Ghribi, O., Golovko, M.Y., Larsen, B., Schrag, M., and Murphy, E.J. (2006b). Deposition of iron and β -amyloid plaques is associated with cortical cellular damage in rabbits fed with long-term cholesterol-enriched diets. *J. Neurochem.* 99, 438–449.
- Gill, S., Chow, R., and Brown, A.J. (2008). Sterol regulators of cholesterol homeostasis and beyond: the oxysterol hypothesis revisited and revised. *Prog. Lipid Res.* 47, 391–404.
- Glabe, C.G. (2006). Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease. *Neurobiol. Aging* 27, 570–575.
- Glenner, G.G., and Wong, C.W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 885–890.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M.C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., and James, L. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704–706.
- Goble, A.J. (2005). Obesity in middle age and future risk of dementia: Problem is probably greater for women. *BMJ* 331, 454–454.
- Goedert, M., Wischik, C.M., Crowther, R.A., Walker, J.E., and Klug, A. (1988). Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 4051–4055.
- Goldstein, J.L., DeBose-Boyd, R.A., and Brown, M.S. (2006). Protein Sensors for membrane sterols. *Cell* 124, 35–46.
- Goldstein, J.L., Rawson, R.B., and Brown, M.S. (2002). Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 397, 139–148.
- Gomes, S., Martins, I., Fonseca, A.C.R.G., Oliveira, C.R., Resende, R., and Pereira, C.M.F. (2014). Protective effect of leptin and ghrelin against toxicity induced by amyloid- β oligomers in a hypothalamic cell line. *J. Neuroendocrinol.* 26, 176–185.
- Gong, J.-S., Kobayashi, M., Hayashi, H., Zou, K., Sawamura, N., Fujita, S.C., Yanagisawa, K., and

- Michikawa, M. (2002). Apolipoprotein E (ApoE) isoform-dependent lipid release from astrocytes prepared from human ApoE3 and ApoE4 knock-in mice. *J. Biol. Chem.* 277, 29919–29926.
- Gong, Y., Lee, J.N., Lee, P.C.W., Goldstein, J.L., Brown, M.S., and Ye, J. (2006). Sterol-regulated ubiquitination and degradation of Insig-1 creates a convergent mechanism for feedback control of cholesterol synthesis and uptake. *Cell Metab.* 3, 15–24.
- Gonzalez-Lima, F., Berndt, J.D., Valla, J.E., Games, D., and Reiman, E.M. (2001). Reduced corpus callosum, fornix and hippocampus in PDAPP transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroreport* 12, 2375–2379.
- Gordon, I., Grauer, E., Genis, I., Sehayek, E., and Michaelson, D.M. (1995). Memory deficits and cholinergic impairments in apolipoprotein E-deficient mice. *Neurosci. Lett.* 199, 1–4.
- Gordon, I., Genis, I., Grauer, E., Sehayek, E., and Michaelson, D.M. (1996). Biochemical and cognitive studies of apolipoprotein-E-deficient mice. *Mol. Chem. Neuropathol. Spons. Int. Soc. Neurochem. World Fed. Neurol. Res. Groups Neurochem. Cerebrospinal Fluid* 28, 97–103.
- Gosselet, F., Candela, P., Sevin, E., Berezowski, V., Cecchelli, R., and Fenart, L. (2009). Transcriptional profiles of receptors and transporters involved in brain cholesterol homeostasis at the blood-brain barrier: use of an in vitro model. *Brain Res.* 1249, 34–42.
- Götz, J., Chen, F., Barmettler, R., and Nitsch, R.M. (2001). Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau. *J. Biol. Chem.* 276, 529–534.
- Gosselet, F., Saint-Pol, J., and Fenart, L. Effects of oxysterols on the blood–brain barrier: Implications for Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Gowing, E., Roher, A.E., Woods, A.S., Cotter, R.J., Chaney, M., Little, S.P., and Ball, M.J. (1994). Chemical characterization of A beta 17-42 peptide, a component of diffuse amyloid deposits of Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 269, 10987–10990.
- Granholm, A.-C., Bimonte-Nelson, H.A., Moore, A.B., Nelson, M.E., Freeman, L.R., and Sambamurti, K. (2008). Effects of a saturated fat and high cholesterol diet on memory and hippocampal morphology in the middle-aged rat. *J. Alzheimers Dis. JAD* 14, 133–145.
- Greig, N.H., Lahiri, D.K., and Sambamurti, K. (2002). Butyrylcholinesterase: an important new target in Alzheimer's disease therapy. *Int. Psychogeriatr. IPA* 14 Suppl 1, 77–91.
- Greig, N.H., Utsuki, T., Ingram, D.K., Wang, Y., Pepeu, G., Scali, C., Yu, Q.-S., Mamczarz, J., Holloway, H.W., Giordano, T., et al. (2005). Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer beta-amyloid peptide in rodent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 17213–17218.
- Grimm, M.O.W., Grimm, H.S., Tomic, I., Beyreuther, K., Hartmann, T., and Bergmann, C. (2008). Independent inhibition of Alzheimer disease beta- and gamma-secretase cleavage by lowered cholesterol levels. *J. Biol. Chem.* 283, 11302–11311.
- Grootendorst, J., Bour, A., Vogel, E., Kelche, C., Sullivan, P.M., Dodart, J.-C., Bales, K., and Mathis, C.

(2005). Human apoE targeted replacement mouse lines: h-apoE4 and h-apoE3 mice differ on spatial memory performance and avoidance behavior. *Behav. Brain Res.* 159, 1–14.

Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M., and Binder, L.I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 4913–4917.

Guardia-Laguarta, C., Coma, M., Pera, M., Clarimón, J., Sereno, L., Agulló, J.M., Molina-Porcel, L., Gallardo, E., Deng, A., Berezovska, O., et al. (2009). Mild cholesterol depletion reduces amyloid-beta production by impairing APP trafficking to the cell surface. *J. Neurochem.* 110, 220–230.

Gustafson, D., Rothenberg, E., Blennow, K., Steen, B., and Skoog, I. (2003). An 18-year follow-up of overweight and risk of Alzheimer disease. *Arch. Intern. Med.* 163, 1524–1528.

H

Haag, M.D.M., Hofman, A., Koudstaal, P.J., Stricker, B.H.C., and Breteler, M.M.B. (2009). Statins are associated with a reduced risk of Alzheimer disease regardless of lipophilicity. The Rotterdam Study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 80, 13–17.

Haagensen, A.M.J., Sørensen, D.B., Sandøe, P., Matthews, L.R., Birck, M.M., Fels, J.J., and Astrup, A. (2014). High fat, low carbohydrate diet limit fear and aggression in Göttingen minipigs. *PLoS One* 9, e93821.

Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., and Sisodia, S. (2012). Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006270–a006270.

Haass, C., and Selkoe, D.J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 101–112.

Haines, T.H. (2001). Do sterols reduce proton and sodium leaks through lipid bilayers? *Prog. Lipid Res.* 40, 299–324.

Halford, R.W., and Russell, D.W. (2009). Reduction of cholesterol synthesis in the mouse brain does not affect amyloid formation in Alzheimer's disease, but does extend lifespan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 3502–3506.

Hammad, S.M., Ranganathan, S., Loukinova, E., Twal, W.O., and Argraves, W.S. (1997). Interaction of Apolipoprotein J-Amyloid β -Peptide Complex with Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein-2/Megalin a mechanism to prevent pathological accumulation of amyloid β -peptide. *J. Biol. Chem.* 272, 18644–18649.

Hardy, J., and Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–356.

Hardy, J.A., and Higgins, G.A. (1992). Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science* 256, 184–185.

Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M.L., Pahwa, J.S., Moskva, V., Dowzell, K., Williams, A., et al. (2009). Genome-wide association study identifies variants

at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* *41*, 1088–1093.

Hattori, C., Asai, M., Onishi, H., Sasagawa, N., Hashimoto, Y., Saido, T.C., Maruyama, K., Mizutani, S., and Ishiura, S. (2006). BACE1 interacts with lipid raft proteins. *J. Neurosci. Res.* *84*, 912–917.

Hauser, P.S., Narayanaswami, V., and Ryan, R.O. (2011). Apolipoprotein E: From lipid transport to neurobiology. *Progress in Lipid Research* *50*, 62–74.

Hayashi, H., Campenot, R.B., Vance, D.E., and Vance, J.E. (2004). Glial lipoproteins stimulate axon growth of central nervous system neurons in compartmented cultures. *J. Biol. Chem.* *279*, 14009–14015.

Hayashi, H., Campenot, R.B., Vance, D.E., and Vance, J.E. (2007). Apolipoprotein E-containing lipoproteins protect neurons from apoptosis via a signaling pathway involving low-density lipoprotein receptor-related protein-1. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 1933–1941.

Hemming, M.L., Patterson, M., Reske-Nielsen, C., Lin, L., Isacson, O., and Selkoe, D.J. (2007). Reducing amyloid plaque burden via ex vivo gene delivery of an Abeta-degrading protease: a novel therapeutic approach to Alzheimer disease. *PLoS Med.* *4*, e262.

Henderson, L.P., Lin, L., Prasad, A., Paul, C.A., Chang, T.Y., and Maue, R.A. (2000). Embryonic striatal neurons from niemann-pick type C mice exhibit defects in cholesterol metabolism and neurotrophin responsiveness. *J. Biol. Chem.* *275*, 20179–20187.

Herbsleb, M., Birkenkamp-Demtroder, K., Thykjaer, T., Wiuf, C., Hein, A.-M.K., Orntoft, T.F., and Dyrskjöt, L. (2008). Increased cell motility and invasion upon knockdown of lipolysis stimulated lipoprotein receptor (LSR) in SW780 bladder cancer cells. *BMC Med. Genomics* *1*, 31.

Herz, J. (2001). The LDL receptor gene family: (un)expected signal transducers in the brain. *Neuron* *29*, 571–581.

Herz, J., and Beffert, U. (2000). Apolipoprotein E receptors: linking brain development and alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* *1*, 51–58.

Herz, J., and Bock, H.H. (2002). Lipoprotein receptors in the nervous system. *Annu. Rev. Biochem.* *71*, 405–434.

Herz, J., Clouthier, D.E., and Hammer, R.E. (1992). LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell* *71*, 411–421.

Heverin, M., Meaney, S., Lütjohann, D., Diczfalusy, U., Wahren, J., and Björkhem, I. (2005). Crossing the barrier: net flux of 27-hydroxycholesterol into the human brain. *J. Lipid Res.* *46*, 1047–1052.

Hicks, D.A., Nalivaeva, N.N., and Turner, A.J. (2012). Lipid Rafts and Alzheimer's Disease: Protein-Lipid Interactions and Perturbation of Signaling. *Frontiers in Physiology* *3*.

Higashi, T., Tokuda, S., Kitajiri, S., Masuda, S., Nakamura, H., Oda, Y., and Furuse, M. (2013). Analysis of the "angulin" proteins LSR, ILDR1 and ILDR2--tricellulin recruitment, epithelial barrier function and implication in deafness pathogenesis. *J. Cell Sci.* *126*, 966–977.

Hirakura, Y., Lin, M.C., and Kagan, B.L. (1999). Alzheimer amyloid abeta1-42 channels: effects of

solvent, pH, and Congo Red. *J. Neurosci. Res.* 57, 458–466.

Hirsch-Reinshagen, V., Zhou, S., Burgess, B.L., Bernier, L., McIsaac, S.A., Chan, J.Y., Tansley, G.H., Cohn, J.S., Hayden, M.R., and Wellington, C.L. (2004). Deficiency of ABCA1 impairs apolipoprotein E metabolism in brain. *J. Biol. Chem.* 279, 41197–41207.

Hirsch-Reinshagen, V., Maia, L.F., Burgess, B.L., Blain, J.-F., Naus, K.E., McIsaac, S.A., Parkinson, P.F., Chan, J.Y., Tansley, G.H., Hayden, M.R., et al. (2005). The absence of ABCA1 decreases soluble ApoE levels but does not diminish amyloid deposition in two murine models of Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 280, 43243–43256.

Hirsch-Reinshagen, V., Donkin, J., Stukas, S., Chan, J., Wilkinson, A., Fan, J., Parks, J.S., Kuivenhoven, J.A., Lütjohann, D., Pritchard, H., et al. (2009). LCAT synthesized by primary astrocytes esterifies cholesterol on glia-derived lipoproteins. *J. Lipid Res.* 50, 885–893.

Hoe, H.-S., Wessner, D., Beffert, U., Becker, A.G., Matsuoka, Y., and Rebeck, G.W. (2005). F-Spondin interaction with the Apolipoprotein E Receptor ApoER2 affects processing of Amyloid Precursor Protein. *Mol. Cell. Biol.* 25, 9259–9268.

Hoe, H.-S., Pocivavsek, A., Chakraborty, G., Fu, Z., Vicini, S., Ehlers, M.D., and Rebeck, G.W. (2006a). Apolipoprotein E Receptor 2 Interactions with the N-Methyl-D-aspartate Receptor. *J. Biol. Chem.* 281, 3425–3431.

Hoe, H.-S., Magill, L.A., Guenette, S., Fu, Z., Vicini, S., and Rebeck, G.W. (2006b). FE65 Interaction with the ApoE Receptor ApoEr2. *J. Biol. Chem.* 281, 24521–24530.

Holcomb, L., Gordon, M.N., McGowan, E., Yu, X., Benkovic, S., Jantzen, P., Wright, K., Saad, I., Mueller, R., Morgan, D., et al. (1998). Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat. Med.* 4, 97–100.

Holtzman, D.M., Pitas, R.E., Kilbridge, J., Nathan, B., Mahley, R.W., Bu, G., and Schwartz, A.L. (1995). 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.

Holtzman, D.M., Bales, K.R., Wu, S., Bhat, P., Parsadanian, M., Fagan, A.M., Chang, L.K., Sun, Y., and Paul, S.M. (1999). Expression of human apolipoprotein E reduces amyloid-beta deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Clin. Invest.* 103, R15–R21.

Holtzman, D.M., Fagan, A.M., Mackey, B., Tenkova, T., Sartorius, L., Paul, S.M., Bales, K., Ashe, K.H., Irizarry, M.C., and Hyman, B.T. (2000a). Apolipoprotein E facilitates neuritic and cerebrovascular plaque formation in an Alzheimer's disease model. *Ann. Neurol.* 47, 739–747.

Holtzman, D.M., Bales, K.R., Tenkova, T., Fagan, A.M., Parsadanian, M., Sartorius, L.J., Mackey, B., Olney, J., McKeel, D., Wozniak, D., et al. (2000b). Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 2892–2897.

Houlden, H., Crook, R., Backhovens, H., Prihar, G., Baker, M., Hutton, M., Rossor, M., Martin, J.J., Van

- Broeckhoven, C., and Hardy, J. (1998). ApoE genotype is a risk factor in nonpresenilin early-onset Alzheimer's disease families. *Am. J. Med. Genet.* *81*, 117–121.
- Howland, D.S., Trusko, S.P., Savage, M.J., Reaume, A.G., Lang, D.M., Hirsch, J.D., Maeda, N., Siman, R., Greenberg, B.D., Scott, R.W., et al. (1998). Modulation of secreted β -Amyloid Precursor Protein and amyloid β -peptide in brain by cholesterol. *J. Biol. Chem.* *273*, 16576–16582.
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., and Cole, G. (1996). Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* *274*, 99–102.
- Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S., and Malinow, R. (2006). AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* *52*, 831–843.
- Hu, C.Y., Ong, W.Y., and Patel, S.C. (2000). Regional distribution of NPC1 protein in monkey brain. *J. Neurocytol.* *29*, 765–773.
- Huang, F.-Y.J., Chen, W.-J., Lee, W.-Y., Lo, S.-T., Lee, T.-W., and Lo, J.-M. (2013). In vitro and in vivo evaluation of lactoferrin-conjugated liposomes as a novel carrier to improve the brain delivery. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 2862–2874.
- Huang, H.-J., Liang, K.-C., Chen, C.-P., Chen, C.-M., and Hsieh-Li, H.M. (2007). Intrahippocampal administration of A beta(1-40) impairs spatial learning and memory in hyperglycemic mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* *87*, 483–494.
- Hudry, E., Van Dam, D., Kulik, W., De Deyn, P.P., Stet, F.S., Ahouansou, O., Benraiss, A., Delacourte, A., Bougnères, P., Aubourg, P., et al. (2010). 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. J. Am. Soc. Gene Ther.* *18*, 44–53.
- Hur, J.-Y., Welander, H., Behbahani, H., Aoki, M., Frånberg, J., Winblad, B., Frykman, S., and Tjernberg, L.O. (2008). Active gamma-secretase is localized to detergent-resistant membranes in human brain. *FEBS J.* *275*, 1174–1187.
- Hussain, I., Powell, D., Howlett, D.R., Tew, D.G., Meek, T.D., Chapman, C., Gloger, I.S., Murphy, K.E., Southan, C.D., Ryan, D.M., et al. (1999). Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol. Cell. Neurosci.* *14*, 419–427.
- Hussain, I., Powell, D.J., Howlett, D.R., Chapman, G.A., Gilmour, L., Murdock, P.R., Tew, D.G., Meek, T.D., Chapman, C., Schneider, K., et al. (2000). ASP1 (BACE2) cleaves the amyloid precursor protein at the beta-secretase site. *Mol. Cell. Neurosci.* *16*, 609–619.
- Hutter-Paier, B., Huttunen, H.J., Puglielli, L., Eckman, C.B., Kim, D.Y., Hofmeister, A., Moir, R.D., Domnitz, S.B., Frosch, M.P., Windisch, M., et al. (2004). The ACAT inhibitor CP-113,818 markedly reduces amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron* *44*, 227–238.
- Huttunen, H.J., Havas, D., Peach, C., Barren, C., Duller, S., Xia, W., Frosch, M.P., Hutter-Paier, B., Windisch, M., and Kovacs, D.M. (2010). The Acyl-Coenzyme A:Cholesterol Acyltransferase Inhibitor CI-1011 reverses diffuse brain amyloid pathology in aged Amyloid Precursor Protein transgenic mice.

J. Neuropathol. Exp. Neurol. 69, 777–788.

I

Ignatius, M.J., Gebicke-Härter, P.J., Skene, J.H., Schilling, J.W., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W., and Shooter, E.M. (1986). Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 83, 1125–1129.

Ihara, Y., Nukina, N., Miura, R., and Ogawara, M. (1986). Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. J. Biochem. (Tokyo) 99, 1807–1810.

Irizarry, M.C., Soriano, F., McNamara, M., Page, K.J., Schenk, D., Games, D., and Hyman, B.T. (1997). Abeta deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 17, 7053–7059.

Irizarry, M.C., Rebeck, G.W., Cheung, B., Bales, K., Paul, S.M., Holzman, D., and Hyman, B.T. (2000). Modulation of A beta deposition in APP transgenic mice by an apolipoprotein E null background. Ann. N. Y. Acad. Sci. 920, 171–178.

Ito, S., Ohtsuki, S., Kamiie, J., Nezu, Y., and Terasaki, T. (2007). Cerebral clearance of human amyloid-beta peptide (1-40) across the blood-brain barrier is reduced by self-aggregation and formation of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 ligand complexes. J. Neurochem. 103, 2482–2490.

Iwamoto, N., Higashi, T., and Furuse, M. (2014). Localization of angulin-1/LSR and tricellulin at tricellular contacts of brain and retinal endothelial cells in vivo. Cell Struct. Funct. 39, 1–8.

Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Watanabe, K., Sekiguchi, M., Hosoki, E., Kawashima-Morishima, M., Lee, H.J., Hama, E., Sekine-Aizawa, Y., et al. (2000). Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. Nat. Med. 6, 143–150.

Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., and Ihara, Y. (1994). Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). Neuron 13, 45–53.

J

Jaeger, S., and Pietrzik, C.U. (2008). Functional role of lipoprotein receptors in Alzheimer's disease. Curr. Alzheimer Res. 5, 15–25.

Jaeger, L.B., Dohgu, S., Hwang, M.C., Farr, S.A., Murphy, M.P., Fleegal-DeMotta, M.A., Lynch, J.L., Robinson, S.M., Niehoff, M.L., Johnson, S.N., et al. (2009). Testing the neurovascular hypothesis of Alzheimer's disease: LRP-1 antisense reduces blood-brain barrier clearance, increases brain levels of amyloid-beta protein, and impairs cognition. J. Alzheimers Dis. JAD 17, 553–570.

James, B.D., and Schneider, J.A. (2010). Increasing incidence of dementia in the oldest old: evidence and implications. Alzheimers Res. Ther. 2, 9.

Jamroz-Wiśniewska, A., Wójcicka, G., Horoszewicz, K., and Bętkowski, J. (2007). Liver X receptors

(LXRs). Part II: non-lipid effects, role in pathology, and therapeutic implications. *Postępy Hig. Med. Dośw. Online* 61, 760–785.

Janowski, B.A. (2002). The hypocholesterolemic agent LY295427 up-regulates INSIG-1, identifying the INSIG-1 protein as a mediator of cholesterol homeostasis through SREBP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12675–12680.

Janowski, B.A., Willy, P.J., Devi, T.R., Falck, J.R., and Mangelsdorf, D.J. (1996). An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 383, 728–731.

Jarrett, J.T., Berger, E.P., and Lansbury, P.T., Jr (1993). 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.

Jazag, A., Ijichi, H., Kanai, F., Imamura, T., Guleng, B., Ohta, M., Imamura, J., Tanaka, Y., Tateishi, K., Ikenoue, T., et al. (2005). Smad4 silencing in pancreatic cancer cell lines using stable RNA interference and gene expression profiles induced by transforming growth factor-beta. *Oncogene* 24, 662–671.

Jeong, S.-K., Nam, H.-S., Son, M.-H., Son, E.-J., and Cho, K.-H. (2005). Interactive effect of obesity indexes on cognition. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 19, 91–96.

Jeremic, A., Jin Cho, W., and Jena, B.P. (2006). Cholesterol is critical to the integrity of neuronal porosome/fusion pore. *Ultramicroscopy* 106, 674–677.

Jhoo, J.H., Kim, H.-C., Nabeshima, T., Yamada, K., Shin, E.-J., Jhoo, W.-K., Kim, W., Kang, K.-S., Jo, S.A., and Woo, J.I. (2004). Beta-amyloid (1-42)-induced learning and memory deficits in mice: involvement of oxidative burdens in the hippocampus and cerebral cortex. *Behav. Brain Res.* 155, 185–196.

Jiang, L., Zhang, Y., Wu, X., Song, F., and Guo, D. (2008a). Effect of insulin on the cognizing function and expression of hippocampal Abeta1-40 of rat with Alzheimer disease. *Chin. Med. J.* 121, 827–831.

Jiang, Q., Lee, C.Y.D., Mandrekar, S., Wilkinson, B., Cramer, P., Zelcer, N., Mann, K., Lamb, B., Willson, T.M., Collins, J.L., et al. (2008b). ApoE promotes the proteolytic degradation of Abeta. *Neuron* 58, 681–693.

Jiang, Q., Lee, C.Y.D., Mandrekar, S., Wilkinson, B., Cramer, P., Zelcer, N., Mann, K., Lamb, B., Willson, T.M., Collins, J.L., et al. (2008c). ApoE promotes the proteolytic degradation of Abeta. *Neuron* 58, 681–693.

Jiang, X., Guo, M., Su, J., Lu, B., Ma, D., Zhang, R., Yang, L., Wang, Q., Ma, Y., and Fan, Y. (2012). Simvastatin Blocks Blood-Brain Barrier Disruptions Induced by Elevated Cholesterol Both In Vivo and In Vitro. *Int. J. Alzheimers Dis.* 2012.

Jin, L.-W., Shie, F.-S., Maezawa, I., Vincent, I., and Bird, T. (2004). Intracellular accumulation of amyloidogenic fragments of amyloid-beta precursor protein in neurons with Niemann-Pick type C defects is associated with endosomal abnormalities. *Am. J. Pathol.* 164, 975–985.

Johnson, R.C., and Shah, S.N. (1978). Cholesterol ester metabolizing enzymes in human brain: properties, subcellular distribution and relative levels in various diseased conditions. *J. Neurochem.* 31,

895–902.

Jusakul, A., Yongvanit, P., Loilome, W., Namwat, N., and Kuver, R. (2011). Mechanisms of oxysterol-induced carcinogenesis. *Lipids Health Dis* 10, 44.

K

Kagan, B.L., Azimov, R., and Azimova, R. (2004). Amyloid peptide channels. *J. Membr. Biol.* 202, 1–10.

Kaizer, R.R., da Silva, A.C., Morsch, V.M., Corrêa, M.C., and Schetinger, M.R.C. (2004). Diet-induced changes in AChE activity after long-term exposure. *Neurochem. Res.* 29, 2251–2255.

Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., Sisodia, S., and Malinow, R. (2003). APP processing and synaptic function. *Neuron* 37, 925–937.

Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Müller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733–736.

Kannan, K., Amariglio, N., Rechavi, G., Jakob-Hirsch, J., Kela, I., Kaminski, N., Getz, G., Domany, E., and Givol, D. (2001). DNA microarrays identification of primary and secondary target genes regulated by p53. *Oncogene* 20, 2225–2234.

Karasinska, J.M., Rinninger, F., Lütjohann, D., Ruddle, P., Franciosi, S., Kruit, J.K., Singaraja, R.R., Hirsch-Reinshagen, V., Fan, J., Brunham, L.R., et al. (2009). Specific loss of brain ABCA1 increases brain cholesterol uptake and influences neuronal structure and function. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 3579–3589.

Karasinska, J.M., de Haan, W., Franciosi, S., Ruddle, P., Fan, J., Kruit, J.K., Stukas, S., Lütjohann, D., Gutmann, D.H., Wellington, C.L., et al. (2013). ABCA1 influences neuroinflammation and neuronal death. *Neurobiol. Dis.* 54, 445–455.

Karten, B., Vance, D.E., Campenot, R.B., and Vance, J.E. (2003). Trafficking of cholesterol from cell bodies to distal axons in Niemann Pick C1-deficient neurons. *J. Biol. Chem.* 278, 4168–4175.

Karten, B., Hayashi, H., Francis, G.A., Campenot, R.B., Vance, D.E., and Vance, J.E. (2005). Generation and function of astroglial lipoproteins from Niemann-Pick type C1-deficient mice. *Biochem. J.* 387, 779–788.

Karten, B., Campenot, R.B., Vance, D.E., and Vance, J.E. (2006a). The Niemann-Pick C1 protein in recycling endosomes of presynaptic nerve terminals. *J. Lipid Res.* 47, 504–514.

Karten, B., Campenot, R.B., Vance, D.E., and Vance, J.E. (2006b). Expression of ABCG1, but not ABCA1, correlates with cholesterol release by cerebellar astroglia. *J. Biol. Chem.* 281, 4049–4057.

Karten, B., Peake, K.B., and Vance, J.E. (2009). Mechanisms and consequences of impaired lipid trafficking in Niemann-Pick type C1-deficient mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1791, 659–670.

Kelly, P.H., Bondolfi, L., Hunziker, D., Schlecht, H.-P., Carver, K., Maguire, E., Abramowski, D.,

- Wiederhold, K.-H., Sturchler-Pierrat, C., Jucker, M., et al. (2003). Progressive age-related impairment of cognitive behavior in APP23 transgenic mice. *Neurobiol. Aging* 24, 365–378.
- Khatchadourian, A., Bourque, S.D., Richard, V.R., Titorenko, V.I., and Maysinger, D. (2012). Dynamics and regulation of lipid droplet formation in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated microglia. *Biochim. Biophys. Acta* 1821, 607–617.
- Kilander, L., Nyman, H., Boberg, M., and Lithell, H. (2000). The association between low diastolic blood pressure in middle age and cognitive function in old age. A population-based study. *Age Ageing* 29, 243–248.
- Kim, H.-S., Cho, J.-Y., Kim, D.-H., Yan, J.-J., Lee, H.-K., Suh, H.-W., and Song, D.-K. (2004). Inhibitory effects of long-term administration of ferulic acid on microglial activation induced by intracerebroventricular injection of beta-amyloid peptide (1-42) in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 120–121.
- Kim, J., Castellano, J.M., Jiang, H., Basak, J.M., Parsadanian, M., Pham, V., Mason, S.M., Paul, S.M., and Holtzman, D.M. (2009). Overexpression of low-density lipoprotein receptor in the brain markedly inhibits amyloid deposition and increases extracellular A beta clearance. *Neuron* 64, 632–644.
- Kim, J.-H., Ee, S.-M., Jittiwat, J., Ong, E.-S., Farooqui, A.A., Jenner, A.M., and Ong, W.-Y. (2011). Increased expression of acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase-1 and elevated cholesteryl esters in the hippocampus after excitotoxic injury. *Neuroscience* 185, 125–134.
- Kim, J.H., Anwyl, R., Suh, Y.H., Djamgoz, M.B., and Rowan, M.J. (2001). Use-dependent effects of amyloidogenic fragments of (beta)-amyloid precursor protein on synaptic plasticity in rat hippocampus in vivo. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 1327–1333.
- Kim, M.S., Rossi, M., Abusnana, S., Sunter, D., Morgan, D.G., Small, C.J., Edwards, C.M., Heath, M.M., Stanley, S.A., Seal, L.J., et al. (2000). Hypothalamic localization of the feeding effect of agouti-related peptide and alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Diabetes* 49, 177–182.
- Kim, W.S., Rahmanto, A.S., Kamili, A., Rye, K.-A., Guillemin, G.J., Gelissen, I.C., Jessup, W., Hill, A.F., and Garner, B. (2007). Role of ABCG1 and ABCA1 in regulation of neuronal cholesterol efflux to apolipoprotein E discs and suppression of amyloid- β peptide generation. *J. Biol. Chem.* 282, 2851–2861.
- King, D.L., and Arendash, G.W. (2002a). Behavioral characterization of the Tg2576 transgenic model of Alzheimer's disease through 19 months. *Physiol. Behav.* 75, 627–642.
- King, D.L., and Arendash, G.W. (2002b). Maintained synaptophysin immunoreactivity in Tg2576 transgenic mice during aging: correlations with cognitive impairment. *Brain Res.* 926, 58–68.
- Kinoshita, A., Whelan, C.M., Smith, C.J., Mikhailenko, I., Rebeck, G.W., Strickland, D.K., and Hyman, B.T. (2001). Demonstration by fluorescence resonance energy transfer of two sites of interaction between the low-density lipoprotein receptor-related protein and the amyloid precursor protein: role of the intracellular adapter protein Fe65. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 8354–8361.
- Kivipelto, M., Helkala, E.L., Hänninen, T., Laakso, M.P., Hallikainen, M., Alhainen, K., Soininen, H., Tuomilehto, J., and Nissinen, A. (2001). Midlife vascular risk factors and late-life mild cognitive impairment: A population-based study. *Neurology* 56, 1683–1689.

- Klinge, P.M., Samii, A., Niescken, S., Brinker, T., and Silverberg, G.D. (2006). Brain amyloid accumulates in aged rats with kaolin-induced hydrocephalus. *Neuroreport* 17, 657–660.
- Knauer, M.F., Orlando, R.A., and Glabe, C.G. (1996). Cell surface APP751 forms complexes with protease nexin 2 ligands and is internalized via the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *Brain Res.* 740, 6–14.
- Kobayashi, D.T., and Chen, K.S. (2005). Behavioral phenotypes of amyloid-based genetically modified mouse models of Alzheimer's disease. *Genes Brain Behav.* 4, 173–196.
- Koistinaho, M., Lin, S., Wu, X., Esterman, M., Koger, D., Hanson, J., Higgs, R., Liu, F., Malkani, S., Bales, K.R., et al. (2004). Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. *Nat. Med.* 10, 719–726.
- Kojro, E., Gimpl, G., Lammich, S., Marz, W., and Fahrenholz, F. (2001). Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 5815–5820.
- Kok, E., Haikonen, S., Luoto, T., Huhtala, H., Goebeler, S., Haapasalo, H., and Karhunen, P.J. (2009). Apolipoprotein E-dependent accumulation of Alzheimer disease-related lesions begins in middle age. *Ann. Neurol.* 65, 650–657.
- Koladiya, R.U., Jaggi, A.S., Singh, N., and Sharma, B.K. (2008). Ameliorative role of Atorvastatin and Pitavastatin in L-Methionine induced vascular dementia in rats. *BMC Pharmacol.* 8, 14.
- Koldamova, R., Staufenbiel, M., and Lefterov, I. (2005a). Lack of ABCA1 Considerably Decreases Brain ApoE Level and Increases Amyloid Deposition in APP23 Mice. *J. Biol. Chem.* 280, 43224–43235.
- Koldamova, R.P., Lefterov, I.M., Ikonovic, M.D., Skoko, J., Lefterov, P.I., Isanski, B.A., DeKosky, S.T., and Lazo, J.S. (2003). 22R-hydroxycholesterol and 9-cis-retinoic acid induce ATP-binding cassette transporter A1 expression and cholesterol efflux in brain cells and decrease amyloid beta secretion. *J. Biol. Chem.* 278, 13244–13256.
- Koldamova, R.P., Lefterov, I.M., Staufenbiel, M., Wolfe, D., Huang, S., Glorioso, J.C., Walter, M., Roth, M.G., and Lazo, J.S. (2005b). The Liver X Receptor Ligand T0901317 decreases amyloid β production in vitro and in a mouse model of Alzheimer's Disease. *J. Biol. Chem.* 280, 4079–4088.
- Kölsch, H., Lütjohann, D., Tulke, A., Björkhem, I., and Rao, M.L. (1999). The neurotoxic effect of 24-hydroxycholesterol on SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Brain Res.* 818, 171–175.
- Kölsch, H., Lütjohann, D., Ludwig, M., Schulte, A., Ptok, U., Jessen, F., von Bergmann, K., Rao, M.L., Maier, W., and Heun, R. (2002). Polymorphism in the cholesterol 24S-hydroxylase gene is associated with Alzheimer's disease. *Mol. Psychiatry* 7, 899–902.
- Korade, Z., and Kenworthy, A.K. (2008). Lipid rafts, cholesterol, and the brain. *Neuropharmacology* 55, 1265–1273.
- Kosicek, M., Malnar, M., Goate, A., and Hecimovic, S. (2010). 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.

Kosik, K.S., Joachim, C.L., and Selkoe, D.J. (1986). Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 4044–4048.

Kotilinek, L.A., Bacskai, B., Westerman, M., Kawarabayashi, T., Younkin, L., Hyman, B.T., Younkin, S., and Ashe, K.H. (2002). Reversible memory loss in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 6331–6335.

Kotti, T.J., Ramirez, D.M.O., Pfeiffer, B.E., Huber, K.M., and Russell, D.W. (2006). Brain cholesterol turnover required for geranylgeraniol production and learning in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 3869–3874.

Kowall, N.W., Beal, M.F., Busciglio, J., Duffy, L.K., and Yankner, B.A. (1991). An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 7247–7251.

Krugers, H.J., Mulder, M., Korf, J., Havekes, L., de Kloet, E.R., and Joëls, M. (1997). Altered synaptic plasticity in hippocampal CA1 area of apolipoprotein E deficient mice. *Neuroreport* 8, 2505–2510.

Kullmann, D.M., and Lamsa, K.P. (2007). Long-term synaptic plasticity in hippocampal interneurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 687–699.

Kurata, T., Miyazaki, K., Kozuki, M., Morimoto, N., Ohta, Y., Ikeda, Y., and Abe, K. (2011). Progressive neurovascular disturbances in the cerebral cortex of Alzheimer's disease-model mice: protection by atorvastatin and pitavastatin. *Neuroscience* 197, 358–368.

Kurochkin, I.V., and Goto, S. (1994). Alzheimer's beta-amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS Lett.* 345, 33–37.

L

Lacor, P.N., Buniel, M.C., Furlow, P.W., Clemente, A.S., Velasco, P.T., Wood, M., Viola, K.L., and Klein, W.L. (2007). Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 796–807.

Ladu, M.J., Reardon, C., Van Eldik, L., Fagan, A.M., Bu, G., Holtzman, D., and Getz, G.S. (2000). Lipoproteins in the central nervous system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 903, 167–175.

LaDu, M.J., Falduto, M.T., Manelli, A.M., Reardon, C.A., Getz, G.S., and Frail, D.E. (1994). Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid. *J. Biol. Chem.* 269, 23403–23406.

LaDu, M.J., Gilligan, S.M., Lukens, J.R., Cabana, V.G., Reardon, C.A., Van Eldik, L.J., and Holtzman, D.M. (1998). Nascent astrocyte particles differ from lipoproteins in CSF. *J. Neurochem.* 70, 2070–2081.

LaFerla, F.M., and Oddo, S. (2005). Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol Med* 11, 170–176.

- Lalowski, M., Golabek, A., Lemere, C.A., Selkoe, D.J., Wisniewski, H.M., Beavis, R.C., Frangione, B., and Wisniewski, T. (1996). The "nonamyloidogenic" p3 fragment (amyloid beta17-42) is a major constituent of Down's syndrome cerebellar preamyloid. *J. Biol. Chem.* *271*, 33623–33631.
- Lambert, J.-C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., Combarros, O., Zelenika, D., Bullido, M.J., Tavernier, B., et al. (2009). Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *CR1* associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* *41*, 1094–1099.
- Lambert, M.P., Barlow, A.K., Chromy, B.A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K.L., et al. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 6448–6453.
- Larson, J., Lynch, G., Games, D., and Seubert, P. (1999). Alterations in synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampal slices from young and aged PDAPP mice. *Brain Res.* *840*, 23–35.
- Laskowitz, D.T., Horsburgh, K., and Roses, A.D. (1998). Apolipoprotein E and the CNS response to injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *18*, 465–471.
- Launer, L.J., Ross, G.W., Petrovitch, H., Masaki, K., Foley, D., White, L.R., and Havlik, R.J. (2000). Midlife blood pressure and dementia: the Honolulu-Asia aging study. *Neurobiol. Aging* *21*, 49–55.
- Lee, J.N., and Ye, J. (2004). Proteolytic activation of sterol regulatory element-binding protein induced by cellular stress through depletion of Insig-1. *J. Biol. Chem.* *279*, 45257–45265.
- Lee, S.J., Liyanage, U., Bickel, P.E., Xia, W., Lansbury, P.T., and Kosik, K.S. (1998). A detergent-insoluble membrane compartment contains A β in vivo. *Nat. Med.* *4*, 730–734.
- Legrand, D. (2012). Lactoferrin, a key molecule in immune and inflammatory processes. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* *90*, 252–268.
- Lehmann, J.M., Kliewer, S.A., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Oliver, B.B., Su, J.L., Sundseth, S.S., Winegar, D.A., Blanchard, D.E., Spencer, T.A., et al. (1997). Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J. Biol. Chem.* *272*, 3137–3140.
- Leoni, V., Masterman, T., Patel, P., Meaney, S., Diczfalusy, U., and Björkhem, I. (2003). Side chain oxidized oxysterols in cerebrospinal fluid and the integrity of blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *J. Lipid Res.* *44*, 793–799.
- Leoni, V., Masterman, T., Mousavi, F.S., Wretling, B., Wahlund, L.-O., Diczfalusy, U., Hillert, J., and Björkhem, I. (2004). Diagnostic use of cerebral and extracerebral oxysterols. *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM FESCC* *42*, 186–191.
- Leoni, V., Shafaati, M., Salomon, A., Kivipelto, M., Björkhem, I., and Wahlund, L.-O. (2006). Are the CSF levels of 24S-hydroxycholesterol a sensitive biomarker for mild cognitive impairment? *Neurosci. Lett.* *397*, 83–87.
- Lesser, G.T., Haroutunian, V., Purohit, D.P., Schnaider Beerli, M., Schmeidler, J., Honkanen, L., Neufeld, R., and Libow, L.S. (2009). Serum lipids are related to Alzheimer's pathology in nursing home residents. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* *27*, 42–49.

- Letenneur, L., Launer, L.J., Andersen, K., Dewey, M.E., Ott, A., Copeland, J.R., Dartigues, J.F., Kragh-Sorensen, P., Baldereschi, M., Brayne, C., et al. (2000). Education and the risk for Alzheimer's disease: sex makes a difference. EURODEM pooled analyses. Eurodem Incidence Research Group. *Am. J. Epidemiol.* *151*, 1064–1071.
- Levin-Allerhand, J.A., Lominska, C.E., and Smith, J.D. (2002). Increased amyloid- levels in APPSWE transgenic mice treated chronically with a physiological high-fat high-cholesterol diet. *J. Nutr. Health Aging* *6*, 315–319.
- Levitan, D., Lee, J., Song, L., Manning, R., Wong, G., Parker, E., and Zhang, L. (2001). PS1 N- and C-terminal fragments form a complex that functions in APP processing and Notch signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 12186–12190.
- Lewis, J., McGowan, E., Rockwood, J., Melrose, H., Nacharaju, P., Van Slegtenhorst, M., Gwinn-Hardy, K., Paul Murphy, M., Baker, M., Yu, X., et al. (2000). Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat. Genet.* *25*, 402–405.
- Li, H.-Y., Hwang, H.-W., and Hu, Y.-H. (2002). Functional characterizations of cocaine- and amphetamine-regulated transcript mRNA expression in rat hypothalamus. *Neurosci. Lett.* *323*, 203–206.
- Li, L., Cao, D., Garber, D.W., Kim, H., and Fukuchi, K. (2003). Association of aortic atherosclerosis with cerebral beta-amyloidosis and learning deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* *163*, 2155–2164.
- Li, L., Cao, D., Kim, H., Lester, R., and Fukuchi, K. (2006). Simvastatin enhances learning and memory independent of amyloid load in mice. *Ann. Neurol.* *60*, 729–739.
- Li, S., Hong, S., Shepardson, N.E., Walsh, D.M., Shankar, G.M., and Selkoe, D. (2009). Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron* *62*, 788–801.
- Lindwall, G., and Cole, R.D. (1984). Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J. Biol. Chem.* *259*, 5301–5305.
- Lingwood, D., and Simons, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* *327*, 46–50.
- Linton, M.F., Gish, R., Hubl, S.T., Büttler, E., Esquivel, C., Bry, W.I., Boyles, J.K., Wardell, M.R., and Young, S.G. (1991). Phenotypes of apolipoprotein B and apolipoprotein E after liver transplantation. *J. Clin. Invest.* *88*, 270–281.
- Liu, B., Turley, S.D., Burns, D.K., Miller, A.M., Repa, J.J., and Dietschy, J.M. (2009a). Reversal of defective lysosomal transport in NPC disease ameliorates liver dysfunction and neurodegeneration in the *npc1*^{-/-} mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 2377–2382.
- Liu, C.-C., Liu, C.-C., Kanekiyo, T., Xu, H., and Bu, G. (2013). Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol* *9*, 106–118.
- Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Gong, C.-X. (2005). Contributions of protein phosphatases PP1,

- PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur. J. Neurosci.* 22, 1942–1950.
- Liu, Q., Zerbinatti, C.V., Zhang, J., Hoe, H.-S., Wang, B., Cole, S.L., Herz, J., Muglia, L., and Bu, G. (2007). Amyloid Precursor Protein regulates brain apolipoprotein E and cholesterol metabolism through Lipoprotein Receptor LRP1. *Neuron* 56, 66–78.
- Liu, Q., Trotter, J., Zhang, J., Peters, M.M., Cheng, H., Bao, J., Han, X., Weeber, E.J., and Bu, G. (2010). Neuronal LRP1 knockout in adult mice leads to impaired brain lipid metabolism and progressive, age-dependent synapse loss and neurodegeneration. *J. Neurosci.* 30, 17068–17078.
- Liu, W., Zhai, X., Li, H., and Ji, L. (2014). Depression-like behaviors in mice subjected to co-treatment of high-fat diet and corticosterone are ameliorated by AICAR and exercise. *J. Affect. Disord.* 156, 171–177.
- Liu, W.W., Todd, S., Coulson, D.T.R., Irvine, G.B., Passmore, A.P., McGuinness, B., McConville, M., Craig, D., and Johnston, J.A. (2009b). A novel reciprocal and biphasic relationship between membrane cholesterol and beta-secretase activity in SH-SY5Y cells and in human platelets. *J. Neurochem.* 108, 341–349.
- Loane, D.J., Washington, P.M., Vardanian, L., Pocivavsek, A., Hoe, H.-S., Duff, K.E., Cernak, I., Rebeck, G.W., Faden, A.I., and Burns, M.P. (2011). Modulation of ABCA1 by an LXR agonist reduces β -amyloid levels and improves outcome after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 28, 225–236.
- Lopez, M.E., Klein, A.D., Dimbil, U.J., and Scott, M.P. (2011). Anatomically defined neuron-based rescue of neurodegenerative Niemann-Pick type C disorder. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 4367–4378.
- Lorenzo, A., and Yankner, B.A. (1994). Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 12243–12247.
- Lu, D., Qu, C., Goussev, A., Jiang, H., Lu, C., Schallert, T., Mahmood, A., Chen, J., Li, Y., and Chopp, M. (2007). Statins increase neurogenesis in the dentate gyrus, reduce delayed neuronal death in the hippocampal CA3 region, and improve spatial learning in rat after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 24, 1132–1146.
- Luchsinger, J.A., Tang, M.X., Stern, Y., Shea, S., and Mayeux, R. (2001). Diabetes mellitus and risk of Alzheimer's disease and dementia with stroke in a multiethnic cohort. *Am. J. Epidemiol.* 154, 635–641.
- Luchsinger, J.A., Tang, M.-X., Shea, S., and Mayeux, R. (2004). Hyperinsulinemia and risk of Alzheimer disease. *Neurology* 63, 1187–1192.
- Lund, E.G., Guileyardo, J.M., and Russell, D.W. (1999). cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 7238–7243.
- Lund, E.G., Menke, J.G., and Sparrow, C.P. (2003a). Liver X receptor agonists as potential therapeutic agents for dyslipidemia and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 1169–1177.
- Lund, E.G., Xie, C., Kotti, T., Turley, S.D., Dietschy, J.M., and Russell, D.W. (2003b). Knockout of the cholesterol 24-hydroxylase gene in mice reveals a brain-specific mechanism of cholesterol turnover. *J. Biol. Chem.* 278, 22980–22988.
- Lutjohann, D., Breuer, O., Ahlborg, G., Nennesmo, I., Siden, A., Diczfalusy, U., and Bjorkhem, I. (1996).

Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9799–9804.

Lütjohann, D., Papassotiropoulos, A., Björkhem, I., Locatelli, S., Bagli, M., Oehring, R.D., Schlegel, U., Jessen, F., Rao, M.L., von Bergmann, K., et al. (2000). Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. *J. Lipid Res.* 41, 195–198.

M

Ma, T., and Klann, E. (2012). Amyloid β : linking synaptic plasticity failure to memory disruption in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 120 *Suppl 1*, 140–148.

Ma, J., Yee, A., Brewer, H.B., Jr, Das, S., and Potter, H. (1994). Amyloid-associated proteins alpha 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer beta-protein into filaments. *Nature* 372, 92–94.

Magdesian, M.H., Carvalho, M.M.V.F., Mendes, F.A., Saraiva, L.M., Juliano, M.A., Juliano, L., Garcia-Abreu, J., and Ferreira, S.T. (2008). Amyloid-beta binds to the extracellular cysteine-rich domain of Frizzled and inhibits Wnt/beta-catenin signaling. *J. Biol. Chem.* 283, 9359–9368.

Mahley, R.W. (1988). Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240, 622–630.

Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., and Huang, Y. (2006). Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 5644–5651.

Malm, T., Ort, M., Tähtivaara, L., Jukarainen, N., Goldsteins, G., Puoliväli, J., Nurmi, A., Pussinen, R., Ahtoniemi, T., Miettinen, T.-K., et al. (2006). beta-Amyloid infusion results in delayed and age-dependent learning deficits without role of inflammation or beta-amyloid deposits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 8852–8857.

Malnar, M., Kosicek, M., Mitterreiter, S., Omerbasic, D., Lichtenthaler, S.F., Goate, A., and Hecimovic, S. (2010). Niemann-Pick type C cells show cholesterol dependent decrease of APP expression at the cell surface and its increased processing through the beta-secretase pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1802, 682–691.

Malnar, M., Kosicek, M., Lisica, A., Posavec, M., Krolo, A., Njavro, J., Omerbasic, D., Tahirovic, S., and Hecimovic, S. (2012). Cholesterol-depletion corrects APP and BACE1 mistrafficking in NPC1-deficient cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 1270–1283.

Maniam, J., and Morris, M.J. (2010). Palatable cafeteria diet ameliorates anxiety and depression-like symptoms following an adverse early environment. *Psychoneuroendocrinology* 35, 717–728.

Mann, C.J., Khallou, J., Chevreuil, O., Troussard, A.A., Guermani, L.M., Launay, K., Delplanque, B., Yen, F.T., and Bihain, B.E. (1995). Mechanism of activation and functional significance of the lipolysis-stimulated receptor. Evidence for a role as chylomicron remnant receptor. *Biochemistry* 34, 10421–10431.

- Mann, C.J., Troussard, A.A., Yen, F.T., Hannouche, N., Najib, J., Fruchart, J.C., Lotteau, V., André, P., and Bihain, B.E. (1997). Inhibitory effects of specific apolipoprotein C-III isoforms on the binding of triglyceride-rich lipoproteins to the lipolysis-stimulated receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 31348–31354.
- Marco, C., Morillas, L.G., and Garcia-Peregrin, E. (1986). Acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase in neonatal chick brain. *Biochim. Biophys. Acta* 875, 599–604.
- Marquer, C., Devauges, V., Cossec, J.-C., Liot, G., Lécart, S., Saudou, F., Duyckaerts, C., Lévêque-Fort, S., and Potier, M.-C. (2011). Local cholesterol increase triggers amyloid precursor protein-Bace1 clustering in lipid rafts and rapid endocytosis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 25, 1295–1305.
- Martin, M.G., Perga, S., Trovò, L., Rasola, A., Holm, P., Rantamäki, T., Harkany, T., Castrén, E., Chiara, F., and Dotti, C.G. (2008). Cholesterol loss enhances TrkB signaling in hippocampal neurons aging in vitro. *Mol. Biol. Cell* 19, 2101–2112.
- Marwarha, G., Dasari, B., Prasanthi, J.R.P., Schommer, J., and Ghribi, O. (2010). Leptin reduces the accumulation of Abeta and phosphorylated tau induced by 27-hydroxycholesterol in rabbit organotypic slices. *J. Alzheimers Dis. JAD* 19, 1007–1019.
- Marwarha, G., Raza, S., Meiers, C., and Ghribi, O. (2014). Leptin attenuates BACE1 expression and amyloid- β genesis via the activation of SIRT1 signaling pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 1587–1595.
- Marzolo, M.P., von Bernhardi, R., Bu, G., and Inestrosa, N.C. (2000). Expression of alpha(2)-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) in rat microglial cells. *J. Neurosci. Res.* 60, 401–411.
- Masliah, E., Mallory, M., Ge, N., Alford, M., Veinbergs, I., and Roses, A.D. (1995). Neurodegeneration in the central nervous system of apoE-deficient mice. *Exp. Neurol.* 136, 107–122.
- Massart, F., Reginster, J.Y., and Brandi, M.L. (2001). Genetics of menopause-associated diseases. *Maturitas* 40, 103–116.
- Masters, C.L., Simms, G., Weinman, N.A., Multhaup, G., McDonald, B.L., and Beyreuther, K. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 4245–4249.
- Masuda, S., Oda, Y., Sasaki, H., Ikenouchi, J., Higashi, T., Akashi, M., Nishi, E., and Furuse, M. (2011). LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells. *J. Cell Sci.* 124, 548–555.
- Mateos, L., Akterin, S., Gil-Bea, F.-J., Spulber, S., Rahman, A., Björkhem, I., Schultzberg, M., Flores-Morales, A., and Cedazo-Mínguez, A. (2009). Activity-Regulated Cytoskeleton-Associated Protein in rodent brain is down-regulated by high fat diet in vivo and by 27-hydroxycholesterol in vitro. *Brain Pathol.* 19, 69–80.
- Mateos, L., Ismail, M.-A.-M., Gil-Bea, F.-J., Schüle, R., Schöls, L., Heverin, M., Folkesson, R., Björkhem, I., and Cedazo-Mínguez, A. (2011). Side chain-oxidized oxysterols regulate the brain renin-angiotensin

system through a liver X receptor-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 286, 25574–25585.

Mattson, M.P., Cheng, B., Culwell, A.R., Esch, F.S., Lieberburg, I., and Rydel, R.E. (1993). Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron* 10, 243–254.

May, P., Rohlmann, A., Bock, H.H., Zurhove, K., Marth, J.D., Schomburg, E.D., Noebels, J.L., Beffert, U., Sweatt, J.D., Weeber, E.J., et al. (2004). Neuronal LRP1 functionally associates with postsynaptic proteins and is required for normal motor function in mice. *Mol. Cell. Biol.* 24, 8872–8883.

McLean, J., Wion, K., Drayna, D., Fielding, C., and Lawn, R. (1986). Human lecithin-cholesterol acyltransferase gene: complete gene sequence and sites of expression. *Nucleic Acids Res.* 14, 9397–9406.

McLean, J.W., Fukazawa, C., and Taylor, J.M. (1983). Rat apolipoprotein E mRNA. Cloning and sequencing of double-stranded cDNA. *J. Biol. Chem.* 258, 8993–9000.

Meaney, S., Heverin, M., Panzenboeck, U., Ekström, L., Axelsson, M., Andersson, U., Diczfalusy, U., Pikuleva, I., Wahren, J., Sattler, W., et al. (2007). Novel route for elimination of brain oxysterols across the blood-brain barrier: conversion into 7 α -hydroxy-3-oxo-4-cholestenoic acid. *J. Lipid Res.* 48, 944–951.

Medeiros, R., Prediger, R.D.S., Passos, G.F., Pandolfo, P., Duarte, F.S., Franco, J.L., Dafre, A.L., Di Giunta, G., Figueiredo, C.P., Takahashi, R.N., et al. (2007). Connecting TNF- α signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer's disease: relevance for the behavioral and synaptic deficits induced by amyloid beta protein. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 5394–5404.

Meljon, A., Wang, Y., and Griffiths, W.J. Oxysterols in the brain of the cholesterol 24-hydroxylase knockout mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

Meng, Y., Lee, J.H., Cheng, R., St George-Hyslop, P., Mayeux, R., and Farrer, L.A. (2007). Association between SORL1 and Alzheimer's disease in a genome-wide study. *Neuroreport* 18, 1761–1764.

Mesli, S., Javorschi, S., Bérard, A.M., Landry, M., Priddle, H., Kivlichan, D., Smith, A.J.H., Yen, F.T., Bihain, B.E., and Darmon, M. (2004). Distribution of the lipolysis stimulated receptor in adult and embryonic murine tissues and lethality of LSR $^{-/-}$ embryos at 12.5 to 14.5 days of gestation. *Eur. J. Biochem. FEBS* 271, 3103–3114.

Meziane, H., Dodart, J.C., Mathis, C., Little, S., Clemens, J., Paul, S.M., and Ungerer, A. (1998). Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 12683–12688.

Michikawa, M., Fan, Q.W., Isobe, I., and Yanagisawa, K. (2000). Apolipoprotein E exhibits isoform-specific promotion of lipid efflux from astrocytes and neurons in culture. *J. Neurochem.* 74, 1008–1016.

Mielke, M.M., Zandi, P.P., Sjögren, M., Gustafson, D., Ostling, S., Steen, B., and Skoog, I. (2005). High total cholesterol levels in late life associated with a reduced risk of dementia. *Neurology* 64, 1689–1695.

Milagre, I., Nunes, M.J., Gama, M.J., Silva, R.F., Pascussi, J.M., Lechner, M.C., and Rodrigues, E. (2008). Transcriptional regulation of the human CYP46A1 brain-specific expression by Sp transcription factors. *J. Neurochem.* 106, 835–849.

- Miller, M.C., Tavares, R., Johanson, C.E., Hovanesian, V., Donahue, J.E., Gonzalez, L., Silverberg, G.D., and Stopa, E.G. (2008). Hippocampal RAGE immunoreactivity in early and advanced Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1230, 273–280.
- Minagawa, H., Gong, J.-S., Jung, C.-G., Watanabe, A., Lund-Katz, S., Phillips, M.C., Saito, H., and Michikawa, M. (2009). Mechanism underlying apolipoprotein E (ApoE) isoform-dependent lipid efflux from neural cells in culture. *J. Neurosci. Res.* 87, 2498–2508.
- Moestrup, S.K., Gliemann, J., and Pallesen, G. (1992). Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues. *Cell Tissue Res.* 269, 375–382.
- Mogi, M., Li, J.-M., Tsukuda, K., Iwanami, J., Min, L.-J., Sakata, A., Fujita, T., Iwai, M., and Horiuchi, M. (2008). Telmisartan prevented cognitive decline partly due to PPAR-gamma activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375, 446–449.
- Moon, M., Cha, M.-Y., and Mook-Jung, I. (2014). Impaired hippocampal neurogenesis and its enhancement with ghrelin in 5XFAD mice. *J. Alzheimers Dis. JAD* 41, 233–241.
- Moreira, E.L.G., Oliveira, J. de, Engel, D.F., Walz, R., Bem, A.F. de, Farina, M., and Prediger, R.D.S. (2014). Hypercholesterolemia induces short-term spatial memory impairments in mice: up-regulation of acetylcholinesterase activity as an early and causal event? *J. Neural Transm.* 121, 415–426.
- Morganstern, I., Ye, Z., Liang, S., Fagan, S., and Leibowitz, S.F. (2012). Involvement of cholinergic mechanisms in the behavioral effects of dietary fat consumption. *Brain Res.* 1470, 24–34.
- Mucke, L., Masliah, E., Yu, G.Q., Mallory, M., Rockenstein, E.M., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Johnson-Wood, K., and McConlogue, L. (2000). High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 4050–4058.
- Mueggler, T., Sturchler-Pierrat, C., Baumann, D., Rausch, M., Staufenbiel, M., and Rudin, M. (2002). Compromised hemodynamic response in amyloid precursor protein transgenic mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 7218–7224.
- Mulder, M., Jansen, P.J., Janssen, B.J.A., van de Berg, W.D.J., van der Boom, H., Havekes, L.M., de Kloet, R.E., Ramaekers, F.C.S., and Blokland, A. (2004). Low-density lipoprotein receptor-knockout mice display impaired spatial memory associated with a decreased synaptic density in the hippocampus. *Neurobiol. Dis.* 16, 212–219.
- Muldoon, M.F., Ryan, C.M., Matthews, K.A., and Manuck, S.B. (1997). Serum cholesterol and intellectual performance. *Psychosom. Med.* 59, 382–387.
- Muldoon, M.F., Barger, S.D., Ryan, C.M., Flory, J.D., Lehoczy, J.P., Matthews, K.A., and Manuck, S.B. (2000). Effects of lovastatin on cognitive function and psychological well-being. *Am. J. Med.* 108, 538–546.
- Müller, T., Meyer, H.E., Egensperger, R., and Marcus, K. (2008). The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics-

relevance for Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 85, 393–406.

Mutka, A.-L., Lusa, S., Linder, M.D., Jokitalo, E., Kopra, O., Jauhiainen, M., and Ikonen, E. (2004). Secretion of Sterols and the NPC2 Protein from primary astrocytes. *J. Biol. Chem.* 279, 48654–48662.

N

Nakajima, M., Inui, A., Asakawa, A., Momose, K., Ueno, N., Teranishi, A., Baba, S., and Kasuga, M. (1998). Neuropeptide Y produces anxiety via Y2-type receptors. *Peptides* 19, 359–363.

Nakano, Y., Kondoh, G., Kudo, T., Imaizumi, K., Kato, M., Miyazaki, J.I., Tohyama, M., Takeda, J., and Takeda, M. (1999). Accumulation of murine amyloid β 42 in a gene-dosage-dependent manner in PS1 "knock-in" mice. *Eur. J. Neurosci.* 11, 2577–2581.

Namba, Y., Tomonaga, M., Kawasaki, H., Otomo, E., and Ikeda, K. (1991). Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res.* 541, 163–166.

Namjoshi, D.R., Martin, G., Donkin, J., Wilkinson, A., Stukas, S., Fan, J., Carr, M., Tabarestani, S., Wuerth, K., Hancock, R.E.W., et al. (2013). The liver X receptor agonist GW3965 improves recovery from mild repetitive traumatic brain injury in mice partly through apolipoprotein E. *PLoS One* 8, e53529.

Narvekar, P., Berriel Diaz, M., Kronen-Herzig, A., Hardeland, U., Strzoda, D., Stöhr, S., Frohme, M., and Herzig, S. (2009). Liver-specific loss of lipolysis-stimulated lipoprotein receptor triggers systemic hyperlipidemia in mice. *Diabetes* 58, 1040–1049.

Naureckiene, S., Sleat, D.E., Lackland, H., Fensom, A., Vanier, M.T., Wattiaux, R., Jadot, M., and Lobel, P. (2000). Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. *Science* 290, 2298–2301.

Niedowicz, D.M., Studzinski, C.M., Weidner, A.M., Platt, T.L., Kingry, K.N., Beckett, T.L., Bruce-Keller, A.J., Keller, J.N., and Murphy, M.P. (2013). Leptin regulates amyloid β production via the γ -secretase complex. *Biochim. Biophys. Acta* 1832, 439–444.

Nielsen, H.M., Veerhuis, R., Holmqvist, B., and Janciauskiene, S. (2009). Binding and uptake of A β 1-42 by primary human astrocytes in vitro. *Glia* 57, 978–988.

Nieweg, K., Schaller, H., and Pfrieder, F.W. (2009). Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats. *J. Neurochem.* 109, 125–134.

Niu, S., Yabut, O., and D'Arcangelo, G. (2008). The Reelin signaling pathway promotes dendritic spine development in hippocampal neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 10339–10348.

Nohturfft, A., Yabe, D., Goldstein, J.L., Brown, M.S., and Espenshade, P.J. (2000). Regulated step in cholesterol feedback localized to budding of SCAP from ER membranes. *Cell* 102, 315–323.

Nourhashémi, F., Andrieu, S., Gillette-Guyonnet, S., Reynish, E., Albarède, J.-L., Grandjean, H., and Vellas, B. (2002). Is there a relationship between fat-free soft tissue mass and low cognitive function? Results from a study of 7,105 women. *J. Am. Geriatr. Soc.* 50, 1796–1801.

O

- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., and LaFerla, F.M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39, 409–421.
- Ohsawa, I., Takamura, C., Morimoto, T., Ishiguro, M., and Kohsaka, S. (1999). Amino-terminal region of secreted form of amyloid precursor protein stimulates proliferation of neural stem cells. *Eur. J. Neurosci.* 11, 1907–1913.
- Ohtsuki, S., Watanabe, Y., Hori, S., Suzuki, H., Bhongsatiern, J., Fujiyoshi, M., Kamoi, M., Kamiya, N., Takanaga, H., and Terasaki, T. (2004). mRNA expression of the ATP-binding cassette transporter subfamily A (ABCA) in rat and human brain capillary endothelial cells. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 1437–1440.
- Ohtsuki, S., Ito, S., Matsuda, A., Hori, S., Abe, T., and Terasaki, T. (2007). Brain-to-blood elimination of 24S-hydroxycholesterol from rat brain is mediated by organic anion transporting polypeptide 2 (oatp2) at the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 103, 1430–1438.
- Ohyama, Y., Meaney, S., Heverin, M., Ekström, L., Brafman, A., Shafir, M., Andersson, U., Olin, M., Eggertsen, G., Diczfalusy, U., et al. (2006). Studies on the transcriptional regulation of cholesterol 24-Hydroxylase (CYP46A1) marked insensitivity toward different regulatory axes. *J. Biol. Chem.* 281, 3810–3820.
- Oitzl, M.S., Mulder, M., Lucassen, P.J., Havekes, L.M., Grootendorst, J., and de Kloet, E.R. (1997). Severe learning deficits in apolipoprotein E-knockout mice in a water maze task. *Brain Res.* 752, 189–196.
- Oksman, M., Iivonen, H., Högges, E., Amtul, Z., Penke, B., Leenders, I., Broersen, L., Lütjohann, D., Hartmann, T., and Tanila, H. (2006). Impact of different saturated fatty acid, polyunsaturated fatty acid and cholesterol containing diets on beta-amyloid accumulation in APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* 23, 563–572.
- Ong, W.-Y., Kumar, U., Switzer, R.C., Sidhu, A., Suresh, G., Hu, C.-Y., and Patel, S.C. (2001). Neurodegeneration in Niemann-Pick type C disease mice. *Exp. Brain Res.* 141, 218–231.
- Oomura, Y., Hori, N., Shiraiishi, T., Fukunaga, K., Takeda, H., Tsuji, M., Matsumiya, T., Ishibashi, M., Aou, S., Li, X.L., et al. (2006). Leptin facilitates learning and memory performance and enhances hippocampal CA1 long-term potentiation and CaMK II phosphorylation in rats. *Peptides* 27, 2738–2749.
- Osenkowski, P., Ye, W., Wang, R., Wolfe, M.S., and Selkoe, D.J. (2008). Direct and potent regulation of gamma-secretase by its lipid microenvironment. *J. Biol. Chem.* 283, 22529–22540.

P

- Panzenboeck, U., Balazs, Z., Sovic, A., Hrzenjak, A., Levak-Frank, S., Wintersperger, A., Malle, E., and Sattler, W. (2002). ABCA1 and scavenger receptor class B, type I, are modulators of reverse sterol transport at an in vitro blood-brain barrier constituted of porcine brain capillary endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 277, 42781–42789.
- Panzenboeck, U., Kratzer, I., Sovic, A., Wintersperger, A., Bernhart, E., Hammer, A., Malle, E., and Sattler, W. (2006). Regulatory effects of synthetic liver X receptor- and peroxisome-proliferator activated receptor agonists on sterol transport pathways in polarized cerebrovascular endothelial cells. *Int. J.*

Biochem. Cell Biol. 38, 1314–1329.

Papadopoulos, P., Tong, X.-K., and Hamel, E. (2014). Selective benefits of simvastatin in bitransgenic APPSwe,Ind/TGF- β 1 mice. *Neurobiol. Aging* 35, 203–212.

Papassotiropoulos, A., Lütjohann, D., Bagli, M., Locatelli, S., Jessen, F., Buschfort, R., Ptok, U., Björkhem, I., von Bergmann, K., and Heun, R. (2002). 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid is elevated in early stages of dementia. *J. Psychiatr. Res.* 36, 27–32.

Papatheodorou, P., Carette, J.E., Bell, G.W., Schwan, C., Guttenberg, G., Brummelkamp, T.R., and Aktories, K. (2011). Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) is the host receptor for the binary toxin Clostridium difficile transferase (CDT). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 16422–16427.

Papatheodorou, P., Wilczek, C., Nölke, T., Guttenberg, G., Hornuss, D., Schwan, C., and Aktories, K. (2012). Identification of the cellular receptor of Clostridium spiroforme toxin. *Infect. Immun.* 80, 1418–1423.

Papatheodorou, P., Hornuss, D., Nölke, T., Hemmasi, S., Castonguay, J., Picchianti, M., and Aktories, K. (2013). Clostridium difficile binary toxin CDT induces clustering of the lipolysis-stimulated lipoprotein receptor into lipid rafts. *mBio* 4, e00244–00213.

Parale, G.P., Baheti, N.N., Kulkarni, P.M., and Panchal, N.V. (2006). Effects of atorvastatin on higher functions. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 62, 259–265.

Parkin, E.T., Turner, A.J., and Hooper, N.M. (1999). Amyloid precursor protein, although partially detergent-insoluble in mouse cerebral cortex, behaves as an atypical lipid raft protein. *Biochem. J.* 344 Pt 1, 23–30.

Parton, R.G., and Hancock, J.F. (2004). Lipid rafts and plasma membrane microorganization: insights from Ras. *Trends Cell Biol.* 14, 141–147.

Patel, S.C., Suresh, S., Kumar, U., Hu, C.Y., Cooney, A., Blanchette-Mackie, E.J., Neufeld, E.B., Patel, R.C., Brady, R.O., Patel, Y.C., et al. (1999). Localization of Niemann-Pick C1 protein in astrocytes: implications for neuronal degeneration in Niemann-Pick type C disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 1657–1662.

Paz-Filho, G., Wong, M.-L., and Licinio, J. (2010). Leptin levels and Alzheimer disease. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 303, 1478; author reply 1478–1479.

Peake, K.B., and Vance, J.E. (2010). Defective cholesterol trafficking in Niemann-Pick C-deficient cells. *FEBS Letters* 584, 2731–2739.

Peake, K.B., and Vance, J.E. (2012). Normalization of cholesterol homeostasis by 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in neurons and glia from Niemann-Pick C1 (NPC1)-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 287, 9290–9298.

Petersen, R.C. (2004). Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *J. Intern. Med.* 256, 183–194.

Petit-Turcotte, C., Aumont, N., Beffert, U., Dea, D., Herz, J., and Poirier, J. (2005). The apoE receptor

apoER2 is involved in the maintenance of efficient synaptic plasticity. *Neurobiol. Aging* 26, 195–206.

Pfriege, F.W. (2003a). Role of cholesterol in synapse formation and function. *Biochim. Biophys. Acta* 1610, 271–280.

Pfriege, F.W. (2003b). Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 60, 1158–1171.

Pietrzik, C.U. (2002). The cytoplasmic domain of the LDL receptor-related protein regulates multiple steps in APP processing. *EMBO J.* 21, 5691–5700.

Pietrzik, C.U., Yoon, I.-S., Jaeger, S., Busse, T., Weggen, S., and Koo, E.H. (2004). FE65 constitutes the functional link between the Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein and the Amyloid Precursor Protein. *J. Neurosci.* 24, 4259–4265.

Pike, C.J., Walencewicz, A.J., Glabe, C.G., and Cotman, C.W. (1991a). Aggregation-related toxicity of synthetic beta-amyloid protein in hippocampal cultures. *Eur. J. Pharmacol.* 207, 367–368.

Pike, C.J., Walencewicz, A.J., Glabe, C.G., and Cotman, C.W. (1991b). In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res.* 563, 311–314.

Pillot, T., Goethals, M., Vanloo, B., Talussot, C., Brasseur, R., Vandekerckhove, J., Rosseneu, M., and Lins, L. (1996). Fusogenic properties of the C-terminal domain of the Alzheimer beta-amyloid peptide. *J. Biol. Chem.* 271, 28757–28765.

Pillot, T., Drouet, B., Queillé, S., Labeur, C., Vandekerckhove, J., Rosseneu, M., Pinçon-Raymond, M., and Chambaz, J. (1999). The Nonfibrillar Amyloid β -Peptide induces apoptotic neuronal cell death. *J. Neurochem.* 73, 1626–1634.

Pitas, R.E., Boyles, J.K., Lee, S.H., Hui, D., and Weisgraber, K.H. (1987). Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E(LDL) receptors in the brain. *J. Biol. Chem.* 262, 14352–14360.

Pitas, R.E., Ji, Z.S., Weisgraber, K.H., and Mahley, R.W. (1998). Role of apolipoprotein E in modulating neurite outgrowth: potential effect of intracellular apolipoprotein E. *Biochem. Soc. Trans.* 26, 257–262.

Poirier, J., Baccichet, A., Dea, D., and Gauthier, S. (1993). Cholesterol synthesis and lipoprotein reuptake during synaptic remodelling in hippocampus in adult rats. *Neuroscience* 55, 81–90.

Polvikoski, T., Sulkava, R., Haltia, M., Kainulainen, K., Vuorio, A., Verkkoniemi, A., Niinistö, L., Halonen, P., and Kontula, K. (1995). Apolipoprotein E, dementia, and cortical deposition of beta-amyloid protein. *N. Engl. J. Med.* 333, 1242–1247.

Posse De Chaves, E.I., Vance, D.E., Campenot, R.B., Kiss, R.S., and Vance, J.E. (2000). Uptake of lipoproteins for axonal growth of sympathetic neurons. *J. Biol. Chem.* 275, 19883–19890.

Prasad, A., and Prasad, C. (1996). Short-term consumption of a diet rich in fat decreases anxiety response in adult male rats. *Physiol. Behav.* 60, 1039–1042.

Prasad, A., Fischer, W.A., Maue, R.A., and Henderson, L.P. (2000). Regional and Developmental

Expression of the Npc1 mRNA in the Mouse Brain. *J. Neurochem.* 75, 1250–1257.

Prasanthi, J., Schommer, E., Thomasson, S., Thompson, A., Feist, G., and Ghribi, O. (2008). Regulation of beta-amyloid levels in the brain of cholesterol-fed rabbit, a model system for sporadic Alzheimer's disease. *Mech. Ageing Dev.* 129, 649–655.

Price, J.L., McKeel, D.W., Jr, Buckles, V.D., Roe, C.M., Xiong, C., Grundman, M., Hansen, L.A., Petersen, R.C., Parisi, J.E., Dickson, D.W., et al. (2009). Neuropathology of nondemented aging: presumptive evidence for preclinical Alzheimer disease. *Neurobiol. Aging* 30, 1026–1036.

Puglielli, L., Konopka, G., Pack-Chung, E., Ingano, L.A., Berezovska, O., Hyman, B.T., Chang, T.Y., Tanzi, R.E., and Kovacs, D.M. (2001). Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase modulates the generation of the amyloid beta-peptide. *Nat. Cell Biol.* 3, 905–912.

Q

Qiu, C., Bäckman, L., Winblad, B., Agüero-Torres, H., and Fratiglioni, L. (2001). The influence of education on clinically diagnosed dementia incidence and mortality data from the Kungsholmen Project. *Arch. Neurol.* 58, 2034–2039.

Qiu, L., Lewis, A., Como, J., Vaughn, M.W., Huang, J., Somerharju, P., Virtanen, J., and Cheng, K.H. (2009). Cholesterol modulates the interaction of beta-amyloid peptide with lipid bilayers. *Biophys. J.* 96, 4299–4307.

Qiu, Z., Strickland, D.K., Hyman, B.T., and Rebeck, G.W. (1999). Alpha2-macroglobulin enhances the clearance of endogenous soluble beta-amyloid peptide via low-density lipoprotein receptor-related protein in cortical neurons. *J. Neurochem.* 73, 1393–1398.

Quan, G., Xie, C., Dietschy, J.M., and Turley, S.D. (2003). Ontogenesis and regulation of cholesterol metabolism in the central nervous system of the mouse. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 146, 87–98.

R

Raber, J., Wong, D., Buttini, M., Orth, M., Bellosta, S., Pitas, R.E., Mahley, R.W., and Mucke, L. (1998). Isoform-specific effects of human apolipoprotein E on brain function revealed in ApoE knockout mice: increased susceptibility of females. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 10914–10919.

Racchi, M., Baetta, R., Salvietti, N., Ianna, P., Franceschini, G., Paoletti, R., Fumagalli, R., Govoni, S., Trabucchi, M., and Soma, M. (1997). Secretory processing of amyloid precursor protein is inhibited by increase in cellular cholesterol content. *Biochem. J.* 322, 893.

Radhakrishnan, A., Ikeda, Y., Kwon, H.J., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2007). Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Oxysterols block transport by binding to Insig. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 6511–6518.

Raffai, R.L., Dong, L.M., Farese, R.V., Jr, and Weisgraber, K.H. (2001). Introduction of human apolipoprotein E4 "domain interaction" into mouse apolipoprotein E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 11587–11591.

Ramsden, M., Kotilinek, L., Forster, C., Paulson, J., McGowan, E., SantaCruz, K., Guimaraes, A., Yue,

- M., Lewis, J., Carlson, G., et al. (2005). Age-dependent neurofibrillary tangle formation, neuron loss, and memory impairment in a mouse model of human tauopathy (P301L). *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 10637–10647.
- Rapp, A., Gmeiner, B., and Hüttinger, M. (2006). Implication of apoE isoforms in cholesterol metabolism by primary rat hippocampal neurons and astrocytes. *Biochimie* 88, 473–483.
- Rauthan, M., and Pilon, M. (2011). The mevalonate pathway in *C. elegans*. *Lipids Health Dis.* 10, 243.
- Ravid, T., Doolman, R., Avner, R., Harats, D., and Roitelman, J. (2000). The ubiquitin-proteasome pathway mediates the regulated degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J. Biol. Chem.* 275, 35840–35847.
- Razay, G. (2005). Obesity in middle age and future risk of dementia: Midlife obesity increases risk of future dementia. *BMJ* 331, 455–455.
- Reaves, D.K., Fagan-Solis, K.D., Dunphy, K., Oliver, S.D., Scott, D.W., and Fleming, J.M. (2014). The role of lipolysis stimulated lipoprotein receptor in breast cancer and directing breast cancer cell behavior. *PLoS One* 9, e91747.
- Rebeck, G.W., Reiter, J.S., Strickland, D.K., and Hyman, B.T. (1993). Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron* 11, 575–580.
- Rebeck, G.W., Moir, R.D., Mui, S., Strickland, D.K., Tanzi, R.E., and Hyman, B.T. (2001). Association of membrane-bound amyloid precursor protein APP with the apolipoprotein E receptor LRP. *Mol. Brain Res.* 87, 238–245.
- Redrobe, J.P., Dumont, Y., and Quirion, R. (2002). Neuropeptide Y (NPY) and depression: from animal studies to the human condition. *Life Sci.* 71, 2921–2937.
- Refolo, L.M., Malester, B., LaFrancois, J., Bryant-Thomas, T., Wang, R., Tint, G.S., Sambamurti, K., Duff, K., and Pappolla, M.A. (2000). Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol. Dis.* 7, 321–331.
- Refolo, L.M., Pappolla, M.A., LaFrancois, J., Malester, B., Schmidt, S.D., Thomas-Bryant, T., Tint, G.S., Wang, R., Mercken, M., Petanceska, S.S., et al. (2001). A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 8, 890–899.
- Reid, P.C., Sakashita, N., Sugii, S., Ohno-Iwashita, Y., Shimada, Y., Hickey, W.F., and Chang, T.-Y. (2004). A novel cholesterol stain reveals early neuronal cholesterol accumulation in the Niemann-Pick type C1 mouse brain. *J. Lipid Res.* 45, 582–591.
- Reiman, E.M., Chen, K., Liu, X., Bandy, D., Yu, M., Lee, W., Ayutyanont, N., Keppler, J., Reeder, S.A., Langbaum, J.B.S., et al. (2009). Fibrillar amyloid-beta burden in cognitively normal people at 3 levels of genetic risk for Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 6820–6825.
- Riddell, D.R., Christie, G., Hussain, I., and Dingwall, C. (2001). Compartmentalization of beta-secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts. *Curr. Biol. CB* 11, 1288–1293.
- Riddell, D.R., Zhou, H., Comery, T.A., Kouranova, E., Lo, C.F., Warwick, H.K., Ring, R.H., Kirksey, Y.,

- Aschmies, S., Xu, J., et al. (2007). The LXR agonist TO901317 selectively lowers hippocampal Abeta42 and improves memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Mol. Cell. Neurosci.* *34*, 621–628.
- Riddell, D.R., Zhou, H., Atchison, K., Warwick, H.K., Atkinson, P.J., Jefferson, J., Xu, L., Aschmies, S., Kirksey, Y., Hu, Y., et al. (2008). Impact of apolipoprotein E (ApoE) polymorphism on brain ApoE levels. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 11445–11453.
- Rogaeva, E., Meng, Y., Lee, J.H., Gu, Y., Kawarai, T., Zou, F., Katayama, T., Baldwin, C.T., Cheng, R., Hasegawa, H., et al. (2007). The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat. Genet.* *39*, 168–177.
- Roher, A.E., Lowenson, J.D., Clarke, S., Woods, A.S., Cotter, R.J., Gowing, E., and Ball, M.J. (1993). beta-Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 10836–10840.
- Del Rosario, A., McDermott, M.M., and Panee, J. (2012). Effects of a high-fat diet and bamboo extract supplement on anxiety- and depression-like neurobehaviours in mice. *Br. J. Nutr.* *108*, 1143–1149.
- Rosenbaum, A.I., Zhang, G., Warren, J.D., and Maxfield, F.R. (2010). Endocytosis of beta-cyclodextrins is responsible for cholesterol reduction in Niemann-Pick type C mutant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 5477–5482.
- Rossi, M., Kim, M.S., Morgan, D.G., Small, C.J., Edwards, C.M., Sunter, D., Abusnana, S., Goldstone, A.P., Russell, S.H., Stanley, S.A., et al. (1998). A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* *139*, 4428–4431.
- Ruiz, J., Kouliavskaia, D., Migliorini, M., Robinson, S., Saenko, E.L., Gorlatova, N., Li, D., Lawrence, D., Hyman, B.T., Weisgraber, K.H., et al. (2005). The apoE isoform binding properties of the VLDL receptor reveal marked differences from LRP and the LDL receptor. *J. Lipid Res.* *46*, 1721–1731.
- Runz, H., Rietdorf, J., Tomic, I., de Bernard, M., Beyreuther, K., Pepperkok, R., and Hartmann, T. (2002). Inhibition of intracellular cholesterol transport alters presenilin localization and amyloid precursor protein processing in neuronal cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 1679–1689.
- Russell, D.W., Halford, R.W., Ramirez, D.M.O., Shah, R., and Kotti, T. (2009). Cholesterol 24-Hydroxylase: An enzyme of cholesterol turnover in the brain. *Annual Review of Biochemistry* *78*, 1017–1040.

S

- Sagare, A., Deane, R., Bell, R.D., Johnson, B., Hamm, K., Pendu, R., Marky, A., Lenting, P.J., Wu, Z., Zarcone, T., et al. (2007). Clearance of amyloid-beta by circulating lipoprotein receptors. *Nat. Med.* *13*, 1029–1031.
- Saint-Pol, J., Candela, P., Boucau, M.-C., Fenart, L., and Gosselet, F. (2013). Oxysterols decrease apical-to-basolateral transport of A β peptides via an ABCB1-mediated process in an in vitro Blood-brain barrier model constituted of bovine brain capillary endothelial cells. *Brain Res.* *1517*, 1–15.

- Sakashita, N., Miyazaki, A., Takeya, M., Horiuchi, S., Chang, C.C., Chang, T.Y., and Takahashi, K. (2000). Localization of human acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase-1 (ACAT-1) in macrophages and in various tissues. *Am. J. Pathol.* 156, 227–236.
- Sanan, D.A., Weisgraber, K.H., Russell, S.J., Mahley, R.W., Huang, D., Saunders, A., Schmechel, D., Wisniewski, T., Frangione, B., and Roses, A.D. (1994). Apolipoprotein E associates with beta amyloid peptide of Alzheimer's disease to form novel monofibrils. Isoform apoE4 associates more efficiently than apoE3. *J. Clin. Invest.* 94, 860–869.
- Sano, M., Bell, K.L., Galasko, D., Galvin, J.E., Thomas, R.G., van Dyck, C.H., and Aisen, P.S. (2011). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of simvastatin to treat Alzheimer disease. *Neurology* 77, 556–563.
- Santos, D.B., Peres, K.C., Ribeiro, R.P., Colle, D., Santos, A.A. dos, Moreira, E.L.G., Souza, D.O.G., Figueiredo, C.P., and Farina, M. (2012). Probucol, a lipid-lowering drug, prevents cognitive and hippocampal synaptic impairments induced by amyloid β peptide in mice. *Exp. Neurol.* 233, 767–775.
- Sarna, J.R., Larouche, M., Marzban, H., Sillitoe, R.V., Rancourt, D.E., and Hawkes, R. (2003). Patterned Purkinje cell degeneration in mouse models of Niemann-Pick type C disease. *J. Comp. Neurol.* 456, 279–291.
- Sathishkumar, K., Xi, X., Martin, R., and Uppu, R.M. (2007). Cholesterol secoaldehyde, an ozonation product of cholesterol, induces amyloid aggregation and apoptosis in murine GT1-7 hypothalamic neurons. *J. Alzheimers Dis. JAD* 11, 261–274.
- Savage, M.J., Goldberg, D.J., and Schacher, S. (1987). Absolute specificity for retrograde fast axonal transport displayed by lipid droplets originating in the axon of an identified Aplysia neuron in vitro. *Brain Res.* 406, 215–223.
- Schellekens, H., Finger, B.C., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2012). Ghrelin signalling and obesity: at the interface of stress, mood and food reward. *Pharmacol. Ther.* 135, 316–326.
- Schmechel, D.E., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Crain, B.J., Hulette, C.M., Joo, S.H., Pericak-Vance, M.A., Goldgaber, D., and Roses, A.D. (1993). Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 9649–9653.
- Schneider, A., Schulz-Schaeffer, W., Hartmann, T., Schulz, J.B., and Simons, M. (2006). Cholesterol depletion reduces aggregation of amyloid-beta peptide in hippocampal neurons. *Neurobiol. Dis.* 23, 573–577.
- Schneider, A., Rajendran, L., Honsho, M., Gralle, M., Donnert, G., Wouters, F., Hell, S.W., and Simons, M. (2008). Flotillin-dependent clustering of the amyloid precursor protein regulates its endocytosis and amyloidogenic processing in neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 2874–2882.
- Schönknecht, P., Lütjohann, D., Pantel, J., Bardenheuer, H., Hartmann, T., von Bergmann, K., Beyreuther, K., and Schröder, J. (2002). Cerebrospinal fluid 24S-hydroxycholesterol is increased in patients with Alzheimer's disease compared to healthy controls. *Neurosci. Lett.* 324, 83–85.

- Schreurs, B.G., Wang, D., Smith-Bell, C.A., Burhans, L.B., Bell, R., and Gonzalez-Joekes, J. (2012). Dietary cholesterol concentration and duration degrade long-term memory of classical conditioning of the rabbit's nictitating membrane response. *Int. J. Alzheimers Dis.* 2012, 732634.
- Schreurs, B.G., Smith-Bell, C.A., and Lemieux, S.K. (2013). Dietary cholesterol increases ventricular volume and narrows cerebrovascular diameter in a rabbit model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 254, 61–69.
- Schultz, J.R., Tu, H., Luk, A., Repa, J.J., Medina, J.C., Li, L., Schwendner, S., Wang, S., Thoolen, M., Mangelsdorf, D.J., et al. (2000). Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* 14, 2831–2838.
- Selkoe, D.J. (1989). Amyloid β protein precursor and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Cell* 58, 611–612.
- Selkoe, D.J. (1994). Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10, 373–403.
- Serrano-Pozo, A., Vega, G.L., Lütjohann, D., Locascio, J.J., Tennis, M.K., Deng, A., Atri, A., Hyman, B.T., Irizarry, M.C., and Growdon, J.H. (2010). Effects of simvastatin on cholesterol metabolism and Alzheimer disease biomarkers. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 24, 220–226.
- Sever, N., Song, B.-L., Yabe, D., Goldstein, J.L., Brown, M.S., and DeBose-Boyd, R.A. (2003a). Insig-dependent ubiquitination and degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase stimulated by sterols and geranylgeraniol. *J. Biol. Chem.* 278, 52479–52490.
- Sever, N., Yang, T., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and DeBose-Boyd, R.A. (2003b). Accelerated degradation of HMG CoA reductase mediated by binding of insig-1 to its sterol-sensing domain. *Mol. Cell* 11, 25–33.
- Sever, N., Lee, P.C.W., Song, B.-L., Rawson, R.B., and Debose-Boyd, R.A. (2004). Isolation of mutant cells lacking Insig-1 through selection with SR-12813, an agent that stimulates degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J. Biol. Chem.* 279, 43136–43147.
- Sévin, M., Lesca, G., Baumann, N., Millat, G., Lyon-Caen, O., Vanier, M.T., and Sedel, F. (2007). The adult form of Niemann-Pick disease type C. *Brain J. Neurol.* 130, 120–133.
- Shafaati, M., Solomon, A., Kivipelto, M., Björkhem, I., and Leoni, V. (2007). Levels of ApoE in cerebrospinal fluid are correlated with Tau and 24S-hydroxycholesterol in patients with cognitive disorders. *Neurosci. Lett.* 425, 78–82.
- Shafaati, M., O'Driscoll, R., Björkhem, I., and Meaney, S. (2009). Transcriptional regulation of cholesterol 24-hydroxylase by histone deacetylase inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378, 689–694.
- Shafaati, M., Olin, M., Båvner, A., Pettersson, H., Rozell, B., Meaney, S., Parini, P., and Björkhem, I. (2011a). Enhanced production of 24S-hydroxycholesterol is not sufficient to drive liver X receptor target genes in vivo. *J. Intern. Med.* 270, 377–387.
- Shafaati, M., Marutle, A., Pettersson, H., Lövgren-Sandblom, A., Olin, M., Pikuleva, I., Winblad, B., Nordberg, A., and Björkhem, I. (2011b). Marked accumulation of 27-hydroxycholesterol in the brains of

Alzheimer's patients with the Swedish APP 670/671 mutation. *J. Lipid Res.* 52, 1004–1010.

Shankar, G.M., Bloodgood, B.L., Townsend, M., Walsh, D.M., Selkoe, D.J., and Sabatini, B.L. (2007). Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 2866–2875.

Sharma, S., and Fulton, S. (2013). Diet-induced obesity promotes depressive-like behaviour that is associated with neural adaptations in brain reward circuitry. *Int. J. Obes.* 2005 37, 382–389.

Sharma, S., Jaya Prasanthi, R., Schommer, E., Feist, G., and Ghribi, O. (2008). Hypercholesterolemia-induced A β accumulation in rabbit brain is associated with alteration in IGF-1 signaling. *Neurobiol. Dis.* 32, 426–432.

Sharma, S., Zhuang, Y., and Gomez-Pinilla, F. (2012). High-fat diet transition reduces brain DHA levels associated with altered brain plasticity and behaviour. *Sci. Rep.* 2.

Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., et al. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754–760.

Shibata, M., Yamada, S., Kumar, S.R., Calero, M., Bading, J., Frangione, B., Holtzman, D.M., Miller, C.A., Strickland, D.K., Ghiso, J., et al. (2000). Clearance of Alzheimer's amyloid- β 1-40 peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J. Clin. Invest.* 106, 1489–1499.

Shie, F.-S., Jin, L.-W., Cook, D.G., Leverenz, J.B., and LeBoeuf, R.C. (2002). Diet-induced hypercholesterolemia enhances brain A beta accumulation in transgenic mice. *Neuroreport* 13, 455–459.

Shinohara, M., Sato, N., Kurinami, H., Takeuchi, D., Takeda, S., Shimamura, M., Yamashita, T., Uchiyama, Y., Rakugi, H., and Morishita, R. (2010). Reduction of brain beta-amyloid (A β) by fluvastatin, a hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor, through increase in degradation of amyloid precursor protein C-terminal fragments (APP-CTFs) and A β clearance. *J. Biol. Chem.* 285, 22091–22102.

Simakova, O., and Arispe, N.J. (2007). The cell-selective neurotoxicity of the Alzheimer's A β peptide is determined by surface phosphatidylserine and cytosolic ATP levels. Membrane binding is required for A β toxicity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 13719–13729.

Simons, M., Keller, P., De Strooper, B., Beyreuther, K., Dotti, C.G., and Simons, K. (1998). Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6460–6464.

Singh-Manoux, A., Gimeno, D., Kivimaki, M., Brunner, E., and Marmot, M.G. (2008). Low HDL cholesterol is a risk factor for deficit and decline in memory in midlife: the Whitehall II study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 1556–1562.

Sinha, S., Anderson, J.P., Barbour, R., Basi, G.S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H.F., Frigon, N., Hong, J. (1999). Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402, 537–540.

- Smith, K.M., Lawn, R.M., and Wilcox, J.N. (1990). Cellular localization of apolipoprotein D and lecithin:cholesterol acyltransferase mRNA in rhesus monkey tissues by in situ hybridization. *J. Lipid Res.* 31, 995–1004.
- Snipes, G.J., McGuire, C.B., Norden, J.J., and Freeman, J.A. (1986). Nerve injury stimulates the secretion of apolipoprotein E by nonneuronal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 1130–1134.
- Sodhi, R.K., and Singh, N. (2014). Liver X receptor agonist T0901317 reduces neuropathological changes and improves memory in mouse models of experimental dementia. *Eur. J. Pharmacol.* 732, 50–59.
- Solans, A., Estivill, X., and de La Luna, S. (2000). A new aspartyl protease on 21q22.3, BACE2, is highly similar to Alzheimer's amyloid precursor protein beta-secretase. *Cytogenet. Cell Genet.* 89, 177–184.
- Solomon, A., Kåreholt, I., Ngandu, T., Winblad, B., Nissinen, A., Tuomilehto, J., Soininen, H., and Kivipelto, M. (2007). Serum cholesterol changes after midlife and late-life cognition: twenty-one-year follow-up study. *Neurology* 68, 751–756.
- Solomon, A., Kivipelto, M., Wolozin, B., Zhou, J., and Whitmer, R.A. (2009). Midlife serum cholesterol and increased risk of Alzheimer's and vascular dementia three decades later. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 28, 75–80.
- Song, B.-L., Javitt, N.B., and DeBose-Boyd, R.A. (2005). Insig-mediated degradation of HMG CoA reductase stimulated by lanosterol, an intermediate in the synthesis of cholesterol. *Cell Metab.* 1, 179–189.
- Sotthibundhu, A., Sykes, A.M., Fox, B., Underwood, C.K., Thangnipon, W., and Coulson, E.J. (2008). Beta-amyloid(1-42) induces neuronal death through the p75 neurotrophin receptor. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 3941–3946.
- Sparks, D.L., Scheff, S.W., Hunsaker III, J.C., Liu, H., Landers, T., and Gross, D.R. (1994). Induction of Alzheimer-like β -amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. *Exp. Neurol.* 126, 88–94.
- Sparks, D.L., Kuo, Y.M., Roher, A., Martin, T., and Lukas, R.J. (2000). Alterations of Alzheimer's disease in the cholesterol-fed rabbit, including vascular inflammation. Preliminary observations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 903, 335–344.
- Sparks, D.L., Connor, D.J., Sabbagh, M.N., Petersen, R.B., Lopez, J., and Browne, P. (2006). Circulating cholesterol levels, apolipoprotein E genotype and dementia severity influence the benefit of atorvastatin treatment in Alzheimer's disease: results of the Alzheimer's Disease Cholesterol-Lowering Treatment (ADCLT) trial. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 185, 3–7.
- Sparks, D.L., Kryscio, R.J., Sabbagh, M.N., Connor, D.J., Sparks, L.M., and Liebsack, C. (2008). Reduced risk of incident AD with elective statin use in a clinical trial cohort. *Curr. Alzheimer Res.* 5, 416–421.
- Spillantini, M.G., Goedert, M., Crowther, R.A., Murrell, J.R., Farlow, M.R., and Ghetti, B. (1997). Familial multiple system tauopathy with presenile dementia: A disease with abundant neuronal and glial tau filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 4113.

Steiner, H., Winkler, E., Edbauer, D., Prokop, S., Basset, G., Yamasaki, A., Kostka, M., and Haass, C. (2002). PEN-2 is an integral component of the gamma-secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. *J. Biol. Chem.* 277, 39062–39065.

Stenger, C., Hanse, M., Pratte, D., Mbala, M.-L., Akbar, S., Koziel, V., Escanyé, M.-C., Kriem, B., Malaplate-Armand, C., Olivier, J.-L., et al. (2010). Up-regulation of hepatic lipolysis stimulated lipoprotein receptor by leptin: a potential lever for controlling lipid clearance during the postprandial phase. *FASEB J.* 24, 4218–4228.

Stern, Y., Gurland, B., Tatemichi, T.K., Tang, M.X., Wilder, D., and Mayeux, R. (1994). Influence of education and occupation on the incidence of Alzheimer's disease. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 271, 1004–1010.

Storch, J., and Xu, Z. (2009). Niemann–Pick C2 (NPC2) and intracellular cholesterol trafficking. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1791, 671–678.

Strittmatter, W.J., Weisgraber, K.H., Huang, D.Y., Dong, L.M., Salvesen, G.S., Pericak-Vance, M., Schmechel, D., Saunders, A.M., Goldgaber, D., and Roses, A.D. (1993a). Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8098–8102.

Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S., and Roses, A.D. (1993b). 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.

Sturchler-Pierrat, C., Abramowski, D., Duke, M., Wiederhold, K.H., Mistl, C., Rothacher, S., Ledermann, B., Bürki, K., Frey, P., Paganetti, P.A., et al. (1997). Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 13287–13292.

Su, Z., Xing, L., Chen, Y., Xu, Y., Yang, F., Zhang, C., Ping, Q., and Xiao, Y. (2014). Lactoferrin-modified poly(ethylene glycol)-grafted BSA nanoparticles as a dual-targeting carrier for treating brain gliomas. *Mol. Pharm.* 11, 1823–1834.

Subasinghe, S., Unabia, S., Barrow, C.J., Mok, S.S., Aguilar, M.-I., and Small, D.H. (2003). Cholesterol is necessary both for the toxic effect of Abeta peptides on vascular smooth muscle cells and for Abeta binding to vascular smooth muscle cell membranes. *J. Neurochem.* 84, 471–479.

Sun, L.-P., Li, L., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2005). Insig required for sterol-mediated inhibition of Scap/SREBP binding to COPII proteins in vitro. *J. Biol. Chem.* 280, 26483–26490.

Sun, Y., Yao, J., Kim, T.-W., and Tall, A.R. (2003). Expression of Liver X Receptor target genes decreases cellular amyloid β peptide secretion. *J. Biol. Chem.* 278, 27688–27694.

T

Tabas, I. (2002). Cholesterol in health and disease. *J. Clin. Invest.* 110, 583–590.

Takechi, R., Pallegage-Gamarallage, M.M., Lam, V., Giles, C., and Mamo, J.C. (2013a). Aging-related changes in blood-brain barrier integrity and the effect of dietary fat. *Neurodegener. Dis.* 12, 125–135.

- Takechi, R., Galloway, S., Pallegage-Gamarallage, M.M., Lam, V., Dhaliwal, S.S., and Mamo, J.C. (2013b). Probucol prevents blood-brain barrier dysfunction in wild-type mice induced by saturated fat or cholesterol feeding. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* *40*, 45–52.
- Takeuchi, A., Irizarry, M.C., Duff, K., Saido, T.C., Hsiao Ashe, K., Hasegawa, M., Mann, D.M., Hyman, B.T., and Iwatsubo, T. (2000). Age-related amyloid beta deposition in transgenic mice overexpressing both Alzheimer mutant presenilin 1 and amyloid beta precursor protein Swedish mutant is not associated with global neuronal loss. *Am. J. Pathol.* *157*, 331–339.
- Tamaki, C., Ohtsuki, S., Iwatsubo, T., Hashimoto, T., Yamada, K., Yabuki, C., and Terasaki, T. (2006). Major involvement of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in the clearance of plasma free amyloid beta-peptide by the liver. *Pharm. Res.* *23*, 1407–1416.
- Tamaki, C., Ohtsuki, S., and Terasaki, T. (2007). Insulin facilitates the hepatic clearance of plasma amyloid beta-peptide (1–40) by intracellular translocation of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) to the plasma membrane in hepatocytes. *Mol. Pharmacol.* *72*, 850–855.
- Tansley, G.H., Burgess, B.L., Bryan, M.T., Su, Y., Hirsch-Reinshagen, V., Pearce, J., Chan, J.Y., Wilkinson, A., Evans, J., Naus, K.E., et al. (2007). The cholesterol transporter ABCG1 modulates the subcellular distribution and proteolytic processing of β -amyloid precursor protein. *J. Lipid Res.* *48*, 1022–1034.
- Tarr, P.T., and Edwards, P.A. (2008). ABCG1 and ABCG4 are coexpressed in neurons and astrocytes of the CNS and regulate cholesterol homeostasis through SREBP-2. *J. Lipid Res.* *49*, 169–182.
- Taylor, C.J., Ireland, D.R., Ballagh, I., Bourne, K., Marechal, N.M., Turner, P.R., Bilkey, D.K., Tate, W.P., and Abraham, W.C. (2008). Endogenous secreted amyloid precursor protein- α regulates hippocampal NMDA receptor function, long-term potentiation and spatial memory. *Neurobiol. Dis.* *31*, 250–260.
- Teegarden, S.L., and Bale, T.L. (2007). Decreases in dietary preference produce increased emotionality and risk for dietary relapse. *Biol. Psychiatry* *61*, 1021–1029.
- Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L.A., and Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol.* *30*, 572–580.
- Teunissen, C.E., De Vente, J., von Bergmann, K., Bosma, H., van Boxtel, M.P.J., De Bruijn, C., Jolles, J., Steinbusch, H.W.M., and Lütjohann, D. (2003). Serum cholesterol, precursors and metabolites and cognitive performance in an aging population. *Neurobiol. Aging* *24*, 147–155.
- Thelen, K.M., Falkai, P., Bayer, T.A., and Lütjohann, D. (2006). Cholesterol synthesis rate in human hippocampus declines with aging. *Neurosci. Lett.* *403*, 15–19.
- Theofilopoulos, S., Wang, Y., Kitambi, S.S., Sacchetti, P., Sousa, K.M., Bodin, K., Kirk, J., Saltó, C., Gustafsson, M., Toledo, E.M., et al. (2013). Brain endogenous liver X receptor ligands selectively promote midbrain neurogenesis. *Nat. Chem. Biol.* *9*, 126–133.
- Thinakaran, G., and Koo, E.H. (2008). Amyloid Precursor Protein Trafficking, Processing, and Function. *J. Biol. Chem.* *283*, 29615–29619.

- Thirumangalakudi, L., Prakasam, A., Zhang, R., Bimonte-Nelson, H., Sambamurti, K., Kindy, M.S., and Bhat, N.R. (2008). High cholesterol-induced neuroinflammation and amyloid precursor protein processing correlate with loss of working memory in mice. *J. Neurochem.* 106, 475–485.
- Tokuda, T., Calero, M., Matsubara, E., Vidal, R., Kumar, A., Permanne, B., Zlokovic, B., Smith, J.D., Ladu, M.J., Rostagno, A., et al. (2000). Lipidation of apolipoprotein E influences its isoform-specific interaction with Alzheimer's amyloid beta peptides. *Biochem. J.* 348 Pt 2, 359–365.
- Tomidokoro, Y., Harigaya, Y., Matsubara, E., Ikeda, M., Kawarabayashi, T., Shirao, T., Ishiguro, K., Okamoto, K., Younkin, S.G., and Shoji, M. (2001). Brain Abeta amyloidosis in APPsw mice induces accumulation of presenilin-1 and tau. *J. Pathol.* 194, 500–506.
- Tramontina, A.C., Wartchow, K.M., Rodrigues, L., Biasibetti, R., Quincozes-Santos, A., Bobermin, L., Tramontina, F., and Gonçalves, C.-A. (2011). The neuroprotective effect of two statins: simvastatin and pravastatin on a streptozotocin-induced model of Alzheimer's disease in rats. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 118, 1641–1649.
- Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1995). Phosphorylation of paired helical filament tau in Alzheimer's disease neurofibrillary lesions: focusing on phosphatases. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 9, 1570–1576.
- Trojanowski, J.Q., Schuck, T., Schmidt, M.L., and Lee, V.M. (1989). Distribution of tau proteins in the normal human central and peripheral nervous system. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 37, 209–215.
- Trommer, B.L., Shah, C., Yun, S.H., Gamkrelidze, G., Pasternak, E.S., Ye, G.L., Sotak, M., Sullivan, P.M., Pasternak, J.F., and LaDu, M.J. (2004). ApoE isoform affects LTP in human targeted replacement mice. *Neuroreport* 15, 2655–2658.
- Trommsdorff, M., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Shelton, J., Stockinger, W., Nimpf, J., Hammer, R.E., Richardson, J.A., and Herz, J. (1999). Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell* 97, 689–701.
- Trompet, S., van Vliet, P., de Craen, A.J.M., Jolles, J., Buckley, B.M., Murphy, M.B., Ford, I., Macfarlane, P.W., Sattar, N., Packard, C.J., et al. (2010). Pravastatin and cognitive function in the elderly. Results of the PROSPER study. *J. Neurol.* 257, 85–90.
- Troussard, A.A., Khallou, J., Mann, C.J., André, P., Strickland, D.K., Bihain, B.E., and Yen, F.T. (1995). Inhibitory effect on the lipolysis-stimulated receptor of the 39-kDa receptor-associated protein. *J. Biol. Chem.* 270, 17068–17071.
- Tsuji, A., Saheki, A., Tamai, I., and Terasaki, T. (1993). Transport mechanism of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors at the blood-brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267, 1085–1090.

U

- Ulery, P.G., Beers, J., Mikhailenko, I., Tanzi, R.E., Rebeck, G.W., Hyman, B.T., and Strickland, D.K. (2000). Modulation of β -Amyloid Precursor Protein processing by the Low Density Lipoprotein

Receptor-related Protein (LRP) evidence that LRP contributes to the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 275, 7410–7415.

Ullrich, C., Pirchl, M., and Humpel, C. (2010a). Hypercholesterolemia in rats impairs the cholinergic system and leads to memory deficits. *Mol. Cell. Neurosci.* 45, 408–417.

Ullrich, C., Pirchl, M., and Humpel, C. (2010b). Hypercholesterolemia in rats impairs the cholinergic system and leads to memory deficits. *Mol. Cell. Neurosci.* 45, 408–417.

Urano, Y., Ochiai, S., and Noguchi, N. (2013). Suppression of amyloid- β production by 24S-hydroxycholesterol via inhibition of intracellular amyloid precursor protein trafficking. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 27, 4305–4315.

V

Valastro, B., Ghribi, O., Poirier, J., Krzywkowski, P., and Massicotte, G. (2001). AMPA receptor regulation and LTP in the hippocampus of young and aged apolipoprotein E-deficient mice. *Neurobiol. Aging* 22, 9–15.

Valenza, M., Carroll, J.B., Leoni, V., Bertram, L.N., Björkhem, I., Singaraja, R.R., Donato, S.D., Lutjohann, D., Hayden, M.R., and Cattaneo, E. (2007). Cholesterol biosynthesis pathway is disturbed in YAC128 mice and is modulated by huntingtin mutation. *Hum. Mol. Genet.* 16, 2187–2198.

Van Exel, E., de Craen, A.J.M., Gussekloo, J., Houx, P., Bootsma-van der Wiel, A., Macfarlane, P.W., Blauw, G.J., and Westendorp, R.G.J. (2002). Association between high-density lipoprotein and cognitive impairment in the oldest old. *Ann. Neurol.* 51, 716–721.

Vance, J.E. (2010). Transfer of Cholesterol by the NPC Team. *Cell Metab.* 12, 105–106.

Vance, J.E. (2012). Dysregulation of cholesterol balance in the brain: contribution to neurodegenerative diseases. *Dis. Model. Mech.* 5, 746–755.

Vance, J.E., and Hayashi, H. (2010). Formation and function of apolipoprotein E-containing lipoproteins in the nervous system. *Biochim. Biophys. Acta* 1801, 806–818.

Vance, J.E., Pan, D., Campenot, R.B., Bussière, M., and Vance, D.E. (1994). Evidence that the major membrane lipids, except cholesterol, are made in axons of cultured rat sympathetic neurons. *J. Neurochem.* 62, 329–337.

Van Dam, D., D'Hooge, R., Staufenbiel, M., Van Ginneken, C., Van Meir, F., and De Deyn, P.P. (2003). Age-dependent cognitive decline in the APP23 model precedes amyloid deposition. *Eur. J. Neurosci.* 17, 388–396.

Vanier, M.T., and Millat, G. (2003). Niemann-Pick disease type C. *Clin. Genet.* 64, 269–281.

Vanmierlo, T., Rutten, K., Dederen, J., Bloks, V.W., van Vark-van der Zee, L.C., Kuipers, F., Kiliaan, A., Blokland, A., Sijbrands, E.J.G., Steinbusch, H., et al. (2011). Liver X receptor activation restores memory in aged AD mice without reducing amyloid. *Neurobiol. Aging* 32, 1262–1272.

Van Praag, H., Kempermann, G., and Gage, F.H. (1999). Running increases cell proliferation and

neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* 2, 266–270.

Varadarajan, S., Yatin, S., Aksenova, M., and Butterfield, D.A. (2000). Review: Alzheimer's amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. *J. Struct. Biol.* 130, 184–208.

Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., et al. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735–741.

Veinbergs, I., Jung, M.W., Young, S.J., Van Uden, E., Groves, P.M., and Masliah, E. (1998). Altered long-term potentiation in the hippocampus of apolipoprotein E-deficient mice. *Neurosci. Lett.* 249, 71–74.

Verdier, Y., and Penke, B. (2004). Binding sites of amyloid beta-peptide in cell plasma membrane and implications for Alzheimer's disease. *Curr. Protein Pept. Sci.* 5, 19–31.

Verhagen, L.A.W., Egecioglu, E., Luijendijk, M.C.M., Hillebrand, J.J.G., Adan, R.A.H., and Dickson, S.L. (2011). Acute and chronic suppression of the central ghrelin signaling system reveals a role in food anticipatory activity. *Eur. Neuropsychopharmacol. J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol.* 21, 384–392.

Verhulst, P.-J., and Depoortere, I. (2012). Ghrelin's second life: from appetite stimulator to glucose regulator. *World J. Gastroenterol. WJG* 18, 3183–3195.

Vetrivel, K.S., Cheng, H., Lin, W., Sakurai, T., Li, T., Nukina, N., Wong, P.C., Xu, H., and Thinakaran, G. (2004). Association of gamma-secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes. *J. Biol. Chem.* 279, 44945–44954.

Vetrivel, K.S., Cheng, H., Kim, S.-H., Chen, Y., Barnes, N.Y., Parent, A.T., Sisodia, S.S., and Thinakaran, G. (2005). Spatial segregation of gamma-secretase and substrates in distinct membrane domains. *J. Biol. Chem.* 280, 25892–25900.

Viswanathan, A., and Greenberg, S.M. (2011). Cerebral amyloid angiopathy in the elderly. *Ann. Neurol.* 70, 871–880.

Von Arnim, C.A.F., von Einem, B., Weber, P., Wagner, M., Schwanzar, D., Spoelgen, R., Strauss, W.L.S., and Schneckenburger, H. (2008). Impact of cholesterol level upon APP and BACE proximity and APP cleavage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 370, 207–212.

W

Wahrle, S., Das, P., Nyborg, A.C., McLendon, C., Shoji, M., Kawarabayashi, T., Younkin, L.H., Younkin, S.G., and Golde, T.E. (2002). Cholesterol-dependent γ -secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiol. Dis.* 9, 11–23.

Wahrle, S.E., Jiang, H., Parsadanian, M., Legleiter, J., Han, X., Fryer, J.D., Kowalewski, T., and Holtzman, D.M. (2004). ABCA1 is required for normal central nervous system ApoE levels and for lipidation of astrocyte-secreted apoE. *J. Biol. Chem.* 279, 40987–40993.

Wahrle, S.E., Jiang, H., Parsadanian, M., Kim, J., Li, A., Knoten, A., Jain, S., Hirsch-Reinshagen, V., Wellington, C.L., Bales, K.R., et al. (2008). Overexpression of ABCA1 reduces amyloid deposition in the PDAPP mouse model of Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* 118, 671–682.

- Wakabayashi, M., and Matsuzaki, K. (2007). Formation of Amyloids by A β -(1–42) on NGF-differentiated PC12 cells: roles of gangliosides and cholesterol. *J. Mol. Biol.* 371, 924–933.
- Waldron, E., Heilig, C., Schweitzer, A., Nadella, N., Jaeger, S., Martin, A.M., Weggen, S., Brix, K., and Pietrzik, C.U. (2008). LRP1 modulates APP trafficking along early compartments of the secretory pathway. *Neurobiol. Dis.* 31, 188–197.
- Walkley, S.U., and Suzuki, K. (2004). Consequences of NPC1 and NPC2 loss of function in mammalian neurons. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1685, 48–62.
- Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., and Selkoe, D.J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416, 535–539.
- Wang, M.L., Motamed, M., Infante, R.E., Abi-Mosleh, L., Kwon, H.J., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2010). Identification of surface residues on Niemann-Pick C2 essential for hydrophobic handoff of cholesterol to NPC1 in lysosomes. *Cell Metab.* 12, 166–173.
- Wang, N., Yvan-Charvet, L., Lütjohann, D., Mulder, M., Vanmierlo, T., Kim, T.-W., and Tall, A.R. (2008a). ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cholesterol and desmosterol efflux to HDL and regulate sterol accumulation in the brain. *FASEB J.* 22, 1073–1082.
- Wang, Y., Rogers, P.M., Su, C., Varga, G., Stayrook, K.R., and Burris, T.P. (2008b). Regulation of cholesterologenesis by the oxysterol receptor, LXRalpha. *J. Biol. Chem.* 283, 26332–26339.
- Warden, C.H., Langner, C.A., Gordon, J.I., Taylor, B.A., McLean, J.W., and Lusis, A.J. (1989). Tissue-specific expression, developmental regulation, and chromosomal mapping of the lecithin: cholesterol acyltransferase gene. Evidence for expression in brain and testes as well as liver. *J. Biol. Chem.* 264, 21573–21581.
- Waring, S.C., and Rosenberg, R.N. (2008). Genome-wide association studies in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 65, 329–334.
- Warneke, W., Klaus, S., Fink, H., Langley-Evans, S.C., and Voigt, J.-P. (2014). The impact of cafeteria diet feeding on physiology and anxiety-related behaviour in male and female Sprague-Dawley rats of different ages. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 116, 45–54.
- Wasser, C.R., Ertunc, M., Liu, X., and Kavalali, E.T. (2007). Cholesterol-dependent balance between evoked and spontaneous synaptic vesicle recycling. *J. Physiol.* 579, 413–429.
- Watanabe, K., Watson, E., Cremona, M.L., Millings, E.J., Lefkowitz, J.H., Fischer, S.G., LeDuc, C.A., and Leibel, R.L. (2013). ILDR2: an endoplasmic reticulum resident molecule mediating hepatic lipid homeostasis. *PloS One* 8, e67234.
- Webster, S., and Rogers, J. (1996). Relative efficacies of amyloid beta peptide (A beta) binding proteins in A beta aggregation. *J. Neurosci. Res.* 46, 58–66.
- Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y., and Kirschner, M.W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 1858–1862.

- Weisgraber, K.H., Roses, A.D., and Strittmatter, W.J. (1994). The role of apolipoprotein E in the nervous system. *Curr. Opin. Lipidol.* 5, 110–116.
- West, R., Beeri, M.S., Schmeidler, J., Hannigan, C.M., Angelo, G., Grossman, H.T., Rosendorff, C., and Silverman, J.M. (2008). Better memory functioning associated with higher total and low-density lipoprotein cholesterol levels in very elderly subjects without the apolipoprotein e4 allele. *Am. J. Geriatr. Psychiatry Off. J. Am. Assoc. Geriatr. Psychiatry* 16, 781–785.
- White, F., Nicoll, J.A., Roses, A.D., and Horsburgh, K. (2001). Impaired neuronal plasticity in transgenic mice expressing human apolipoprotein E4 compared to E3 in a model of entorhinal cortex lesion. *Neurobiol. Dis.* 8, 611–625.
- Whitmer, R.A., Sidney, S., Selby, J., Johnston, S.C., and Yaffe, K. (2005). Midlife cardiovascular risk factors and risk of dementia in late life. *Neurology* 64, 277–281.
- Willy, P.J., Umesono, K., Ong, E.S., Evans, R.M., Heyman, R.A., and Mangelsdorf, D.J. (1995). LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev.* 9, 1033–1045.
- Wisniewski, T., Castaño, E.M., Golabek, A., Vogel, T., and Frangione, B. (1994). Acceleration of Alzheimer's fibril formation by apolipoprotein E in vitro. *Am. J. Pathol.* 145, 1030–1035.
- Wolfe, M.S., Xia, W., Ostaszewski, B.L., Diehl, T.S., Kimberly, W.T., and Selkoe, D.J. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398, 513–517.
- Wood, S.J., Chan, W., and Wetzel, R. (1996). Seeding of A beta fibril formation is inhibited by all three isoforms of apolipoprotein E. *Biochemistry* 35, 12623–12628.
- Wu, C., Zhou, D., Wen, C., Zhang, L., Como, P., and Qiao, Y. (2003). Relationship between blood pressure and Alzheimer's disease in Linxian County, China. *Life Sci.* 72, 1125–1133.

X

- Xiao, Q., Gil, S.-C., Yan, P., Wang, Y., Han, S., Gonzales, E., Perez, R., Cirrito, J.R., and Lee, J.-M. (2012). Role of phosphatidylinositol clathrin assembly lymphoid-myeloid leukemia (PICALM) in intracellular amyloid precursor protein (APP) processing and amyloid plaque pathogenesis. *J. Biol. Chem.* 287, 21279–21289.
- Xie, C., Lund, E.G., Turley, S.D., Russell, D.W., and Dietschy, J.M. (2003). Quantitation of two pathways for cholesterol excretion from the brain in normal mice and mice with neurodegeneration. *J. Lipid Res.* 44, 1780–1789.
- Xiong, H., Callaghan, D., Jones, A., Walker, D.G., Lue, L.-F., Beach, T.G., Sue, L.I., Woulfe, J., Xu, H., Stanimirovic, D.B., et al. (2008). Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high beta- and gamma-secretase activities and A β production. *Neurobiol. Dis.* 29, 422–437.
- Xu, G., Servatius, R.J., Shefer, S., Tint, G.S., O'Brien, W.T., Batta, A.K., and Salen, G. (1998). Relationship between abnormal cholesterol synthesis and retarded learning in rats. *Metabolism.* 47, 878–882.
- Xu, P.T., Gilbert, J.R., Qiu, H.L., Ervin, J., Rothrock-Christian, T.R., Hulette, C., and Schmechel, D.E.

(1999a). Specific regional transcription of apolipoprotein E in human brain neurons. *Am. J. Pathol.* 154, 601–611.

Xu, P.T., Schmechel, D., Qiu, H.L., Herbstreith, M., Rothrock-Christian, T., Eyster, M., Roses, A.D., and Gilbert, J.R. (1999b). Sialylated human apolipoprotein E (apoEs) is preferentially associated with neuron-enriched cultures from APOE transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* 6, 63–75.

Xu, Q., Bernardo, A., Walker, D., Kanegawa, T., Mahley, R.W., and Huang, Y. (2006). Profile and regulation of apolipoprotein E (ApoE) expression in the CNS in mice with targeting of green fluorescent protein gene to the ApoE locus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 4985–4994.

Xue, Q.-S., Sparks, D.L., and Streit, W.J. (2007). Microglial activation in the hippocampus of hypercholesterolemic rabbits occurs independent of increased amyloid production. *J. Neuroinflammation* 4, 20.

Y

Ya, B., Liu, W., Ge, F., Zhang, Y., Zhu, B., and Bai, B. (2013). Dietary cholesterol alters memory and synaptic structural plasticity in young rat brain. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* 34, 1355–1365.

Yabe, D., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2002). Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12753–12758.

Yaffe, K., Barrett-Connor, E., Lin, F., and Grady, D. (2002). Serum lipoprotein levels, statin use, and cognitive function in older women. *Arch. Neurol.* 59, 378–384.

Yahi, N., Aulas, A., and Fantini, J. (2010). How cholesterol constrains glycolipid conformation for optimal recognition of Alzheimer's beta amyloid peptide (A β 1-40). *PloS One* 5, e9079.

Yamanaka, K., Saito, Y., Yamamori, T., Urano, Y., and Noguchi, N. (2011). 24(S)-hydroxycholesterol induces neuronal cell death through necroptosis, a form of programmed necrosis. *J. Biol. Chem.* 286, 24666–24673.

Yamauchi, K., Tozuka, M., Hidaka, H., Nakabayashi, T., Sugano, M., Kondo, Y., Nakagawara, A., and Katsuyama, T. (2000). Effect of apolipoprotein AII on the interaction of apolipoprotein E with beta-amyloid: some apo(E-AII) complexes inhibit the internalization of beta-amyloid in cultures of neuroblastoma cells. *J. Neurosci. Res.* 62, 608–614.

Yamauchi, K., Tozuka, M., Hidaka, H., Nakabayashi, T., Sugano, M., and Katsuyama, T. (2002). Isoform-specific effect of apolipoprotein E on endocytosis of beta-amyloid in cultures of neuroblastoma cells. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 32, 65–74.

Yan, J.-J., Kim, D.-H., Moon, Y.-S., Jung, J.-S., Ahn, E.-M., Baek, N.-I., and Song, D.-K. (2004). Protection against beta-amyloid peptide-induced memory impairment with long-term administration of extract of *Angelica gigas* or decursinol in mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 28, 25–30.

Yan, J.J., Cho, J.Y., Kim, H.S., Kim, K.L., Jung, J.S., Huh, S.O., Suh, H.W., Kim, Y.H., and Song, D.K.

(2001). Protection against beta-amyloid peptide toxicity in vivo with long-term administration of ferulic acid. *Br. J. Pharmacol.* 133, 89–96.

Yan, S.D., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H., Roher, A., Slattery, T., Zhao, L., Nagashima, M., Morser, J., et al. (1996). RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 382, 685–691.

Yanagisawa, K., and Matsuzaki, K. (2002). Cholesterol-dependent aggregation of amyloid beta-protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 977, 384–386.

Yang, D.S., Smith, J.D., Zhou, Z., Gandy, S.E., and Martins, R.N. (1997). Characterization of the binding of amyloid-beta peptide to cell culture-derived native apolipoprotein E2, E3, and E4 isoforms and to isoforms from human plasma. *J. Neurochem.* 68, 721–725.

Yang, D.S., Small, D.H., Seydel, U., Smith, J.D., Hallmayer, J., Gandy, S.E., and Martins, R.N. (1999). Apolipoprotein E promotes the binding and uptake of beta-amyloid into Chinese hamster ovary cells in an isoform-specific manner. *Neuroscience* 90, 1217–1226.

Yau, J.L.W., Rasmuson, S., Andrew, R., Graham, M., Noble, J., Olsson, T., Fuchs, E., Lathe, R., and Seckl, J.R. (2003). Dehydroepiandrosterone 7-hydroxylase CYP7B: predominant expression in primate hippocampus and reduced expression in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 121, 307–314.

Ye, Y., Sun, Y., Zhao, H., Lan, M., Gao, F., Song, C., Lou, K., Li, H., and Wang, W. (2013). A novel lactoferrin-modified β -cyclodextrin nanocarrier for brain-targeting drug delivery. *Int. J. Pharm.* 458, 110–117.

Yehuda, S., Rabinovitz, S., and Mostofsky, D.I. (1998). Modulation of learning and neuronal membrane composition in the rat by essential fatty acid preparation: time-course analysis. *Neurochem. Res.* 23, 627–634.

Yen, F.T., Mann, C.J., Guermani, L.M., Hannouche, N.F., Hubert, N., Hornick, C.A., Bordeau, V.N., Agnani, G., and Bihain, B.E. (1994). Identification of a lipolysis-stimulated receptor that is distinct from the LDL receptor and the LDL receptor-related protein. *Biochemistry* 33, 1172–1180.

Yen, F.T., Masson, M., Clossais-Besnard, N., André, P., Grosset, J.M., Bougueleret, L., Dumas, J.B., Guerassimenko, O., and Bihain, B.E. (1999). Molecular cloning of a lipolysis-stimulated remnant receptor expressed in the liver. *J. Biol. Chem.* 274, 13390–13398.

Yen, F.T., Roitel, O., Bonnard, L., Notet, V., Pratte, D., Stenger, C., Magueur, E., and Bihain, B.E. (2008). Lipolysis Stimulated Lipoprotein Receptor a novel molecular link between hyperlipidemia, weight gain, and atherosclerosis in mice. *J. Biol. Chem.* 283, 25650–25659.

Yoon, I.-S., Chen, E., Busse, T., Repetto, E., Lakshmana, M.K., Koo, E.H., and Kang, D.E. (2007). Low-density lipoprotein receptor-related protein promotes amyloid precursor protein trafficking to lipid rafts in the endocytic pathway. *FASEB J.* 21, 2742–2752.

Younkin, S.G. (1998). The role of A beta 42 in Alzheimer's disease. *J. Physiol. Paris* 92, 289–292.

Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., Song, Y.Q., Rogaeva, E., Chen,

F., Kawarai, T., et al. (2000). Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature* 407, 48–54.

Yu, W., Gong, J.-S., Ko, M., Garver, W.S., Yanagisawa, K., and Michikawa, M. (2005). Altered cholesterol metabolism in Niemann-Pick type C1 mouse brains affects mitochondrial function. *J. Biol. Chem.* 280, 11731–11739.

Z

Zaheer, A., Zaheer, S., Thangavel, R., Wu, Y., Sahu, S.K., and Yang, B. (2008). Glia maturation factor modulates beta-amyloid-induced glial activation, inflammatory cytokine/chemokine production and neuronal damage. *Brain Res.* 1208, 192–203.

Zandi, P.P., Sparks, D.L., Khachaturian, A.S., Tschanz, J., Norton, M., Steinberg, M., Welsh-Bohmer, K.A., Breitner, J.C.S., and Cache County Study investigators (2005). Do statins reduce risk of incident dementia and Alzheimer disease? The Cache County Study. *Arch. Gen. Psychiatry* 62, 217–224.

Zelcer, N., and Tontonoz, P. (2006). Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *J. Clin. Invest.* 116, 607–614.

Zerbinatti, C.V., Wozniak, D.F., Cirrito, J., Cam, J.A., Osaka, H., Bales, K.R., Zhuo, M., Paul, S.M., Holtzman, D.M., and Bu, G. (2004). Increased soluble amyloid- β peptide and memory deficits in amyloid model mice overexpressing the low-density lipoprotein receptor-related protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 1075–1080.

Zerbinatti, C.V., Wahrle, S.E., Kim, H., Cam, J.A., Bales, K., Paul, S.M., Holtzman, D.M., and Bu, G. (2006). Apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor-related protein facilitate intraneuronal Abeta42 accumulation in amyloid model mice. *J. Biol. Chem.* 281, 36180–36186.

Zervas, M., Dobrenis, K., and Walkley, S.U. (2001). Neurons in Niemann-Pick disease type C accumulate gangliosides as well as unesterified cholesterol and undergo dendritic and axonal alterations. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60, 49–64.

Zhang, Y.-Y., Fan, Y.-C., Wang, M., Wang, D., and Li, X.-H. (2013). Atorvastatin attenuates the production of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in the hippocampus of an amyloid β 1-42-induced rat model of Alzheimer's disease. *Clin. Interv. Aging* 8, 103–110.

Zhang-Nunes, S.X., Maat-Schieman, M.L.C., van Duinen, S.G., Roos, R.A.C., Frosch, M.P., and Greenberg, S.M. (2006). The cerebral beta-amyloid angiopathies: hereditary and sporadic. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 16, 30–39.

Zheng, H., and Koo, E.H. (2006). The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol. Neurodegener.* 1, 5.

Zhong, N., Scarce-Levie, K., Ramaswamy, G., and Weisgraber, K.H. (2008). Apolipoprotein E4 domain interaction: synaptic and cognitive deficits in mice. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 4, 179–192.

Zhong, N., and Weisgraber, K.H. (2009). Understanding the association of apolipoprotein E4 with

Alzheimer disease: clues from its structure. *Journal of Biological Chemistry* 284, 6027–6031.

Zhuo, M., Holtzman, D.M., Li, Y., Osaka, H., DeMaro, J., Jacquin, M., and Bu, G. (2000). Role of tissue plasminogen activator receptor LRP in hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 542–549.

Zlokovic, B.V., Martel, C.L., Matsubara, E., McComb, J.G., Zheng, G., McCluskey, R.T., Frangione, B., and Ghiso, J. (1996). Glycoprotein 330/megalin: probable role in receptor-mediated transport of apolipoprotein J alone and in a complex with Alzheimer disease amyloid beta at the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 4229.

Zlokovic, B.V., Deane, R., Sagare, A.P., Bell, R.D., and Winkler, E.A. (2010). Low-density lipoprotein receptor-related protein-1: a serial clearance homeostatic mechanism controlling Alzheimer's amyloid β -peptide elimination from the brain. *J. Neurochem.* 115, 1077–1089.

Zuliani, G., Donnorso, M.P., Bosi, C., Passaro, A., Dalla Nora, E., Zurlo, A., Bonetti, F., Mozzi, A.F., and Cortese, C. (2011). Plasma 24S-hydroxycholesterol levels in elderly subjects with late onset Alzheimer's disease or vascular dementia: a case-control study. *BMC Neurol.* 11, 121.

Implication du récepteur aux lipoprotéines LSR (lipolysis stimulated lipoprotein receptor) dans le contrôle de l'homéostasie du cholestérol cérébral et les capacités cognitives au cours du vieillissement.

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative touchant plusieurs millions de personnes. La MA a une origine multifactorielle. Diverses études suggèrent qu'une perturbation du métabolisme du cholestérol contribue au développement de la MA. Cependant, la littérature présente beaucoup de confusion. Il est donc crucial de mieux caractériser le métabolisme et l'implication du cholestérol dans la MA. Ce travail s'est intéressé au récepteur Lipolysis Stimulated Lipoprotein Receptor (LSR) qui est un récepteur hépatique aux lipoprotéines participant à la clairance des lipides en phase post prandiale. Les objectifs de cette thèse ont été de caractériser la présence du récepteur LSR dans le cerveau de souris, de déterminer son rôle dans le contrôle de l'homéostasie du cholestérol cérébral et dans la physiopathologie de la MA. Ainsi, nous avons caractérisé la présence de LSR dans des structures cérébrales importantes pour les capacités cognitives et le métabolisme énergétique. Grâce à un modèle de souris hétérozygote pour le récepteur LSR, nous avons mis en évidence que la délétion d'un allèle LSR entraîne une altération du métabolisme du cholestérol cérébral au cours du vieillissement, qui est corrélée avec une augmentation de la sensibilité au stress amyloïde. Ces résultats suggèrent un rôle du récepteur LSR dans le contrôle de l'homéostasie du cholestérol cérébral et renforcent l'idée qu'une altération de cette dernière peut impacter la physiopathologie de la MA. Enfin, nous avons observé que la déficience d'un allèle LSR chez des souris placées sous un régime hyperlipidique pouvait impacter le métabolisme lipidique périphérique ainsi que l'anxiété de ces souris.

Mot clés : Cholestérol, Comportement, Alzheimer, Métabolisme, Nutrition, LSR

Role of the lipoprotein receptor LSR (lipolysis stimulated lipoprotein receptor) in brain cholesterol homeostasis and cognitive abilities in aging

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease affecting millions of people. The origin of AD is multifactorial. Studies suggest that disturbance of cholesterol metabolism contributes to AD development. However, data in the literature is conflicting. It is therefore crucial to better characterize the metabolism and involvement of cholesterol in AD. This work focused on the Lipolysis Stimulated Lipoprotein Receptor (LSR), a hepatic lipoprotein receptor involved in the clearance of lipoproteins during the postprandial phase. The objectives of this thesis were to characterize LSR receptor expression profile in the mouse brain, and to determine its role in both brain cholesterol homeostasis and in the pathophysiology of AD. We identified and characterized LSR expression in brain structures that are involved in cognitive abilities and the regulation of energy metabolism. Next, using a mouse model heterozygous for the LSR receptor, we were able to demonstrate that the deletion of one allele LSR causes impaired brain cholesterol metabolism in aging, which was correlated with increased susceptibility to amyloid stress. These results suggest a role of LSR receptor in brain cholesterol homeostasis and show that alterations of the brain cholesterol metabolism can impact AD pathophysiology. Finally, we observed that the deficiency of an LSR allele in mice on a high fat diets affected peripheral lipid metabolism and the anxiety in these mice.

Mot clés: Cholesterol, Behavior, Alzheimer, Metabolism, Nutrition, LSR