Étude des conséquences biologiques et fonctionnelles de différentes mutations identifiées par GWAS dans la maladie d'Alzheimer

Charlotte Bauer

▶ **To cite this version:**

Charlotte Bauer. Étude des conséquences biologiques et fonctionnelles de différentes mutations identifiées par GWAS dans la maladie d'Alzheimer. Neurobiologie. 2018. hal-02044558

HAL Id: hal-02044558
https://ephe.hal.science/hal-02044558

Submitted on 26 Feb 2019

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.

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

présenté

par

BAUER Charlotte

pour l'obtention du Diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes

Étude des conséquences biologiques et fonctionnelles de différentes mutations identifiées par GWAS dans la maladie d'Alzheimer

Soutenu le 30 novembre 2018 devant le jury suivant :

STEVANIN Giovanni - Président

CHECLER Frédéric - Tuteur scientifique

MESTRE-FRANCES Nadine - Tuteur pédagogique

AUBERGER Patrick - Rapporteur

RIVERA Santiago - Examinateur

Mémoire préparé sous la direction de :

CHECLER Frédéric - Laboratoire de : Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/UNS-UMR7275

Directeur : Nahon Jean-Louis

Et de

MESTRE-FRANCES Nadine - Laboratoire de : Université de Montpellier, UMRS 1198

Directeur : VERDIER Jean-Michel

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Étude des conséquences biologiques et fonctionnelles de différentes mutations identifiées par GWAS dans la maladie d'Alzheimer

BAUER Charlotte

30 novembre 2018

RESUME

La maladie d'Alzheimer (MA) se caractérise par des pertes de mémoire, des troubles cognitifs et une perte d'autonomie des patients. C'est une maladie rare avant 65 ans**.** Moins de 2 % des cas de MA surviennent avant cet âge, essentiellement chez des personnes atteintes de formes familiales héréditaires rares. Comme dans toute maladie chronique, il existe une susceptibilité individuelle, qui crée un terrain plus ou moins favorable à l'apparition de la maladie en fonction du vieillissement et des autres facteurs de risque environnementaux. Le risque de développer la maladie est en moyenne multiplié par 1,5 si un parent du premier degré est touché. Il est multiplié par 2 si au moins deux le sont. Cette susceptibilité individuelle est en partie portée par notre génome. La connaissance de gènes à l'origine de cette susceptibilité, identifiés au cours du Plan Alzheimer (2008-2012) par étude d'association pangénomique (*genome-wide association study ou GWAS*), permet de mieux comprendre comment survient la MA**.** Certains gènes sont impliqués dans le métabolisme du peptide amyloïde, d'autres interviennent dans le métabolisme des lipides, dans l'immunité innée, dans l'inflammation, dans le fonctionnement synaptique ou celui de l'hippocampe. Cette diversité témoigne de la grande complexité des mécanismes à l'origine de la maladie.

L'un des marqueurs histopathologiques de la MA est l'apparition dans le cerveau de dépôts extracellulaires constitués essentiellement du peptide amyloïde Aβ. Ce peptide Aβ est issu du clivage de la protéine βAPP (*β amyloid precursor protein*) par les activités β et γ-sécrétase qui libèrent respectivement les extrémités amino- et carboxy-terminales de ce peptide.

Dans ce mémoire je m'intéresserai plus particulièrement à la protéine SorLA (*Sorting protein-related Receptor containing LDLR class-A repeats*), appartenant à la famille de la sortiline, décrite pour la première fois en 1997. Des travaux, réalisés à partir d'autopsies de cerveaux humains, suggèrent l'importance de la protéine dans cet organe. De plus il existe une association entre des variants génétiques de SORL1 (mutations ou polymorphismes nucléotidiques simples « SNP ») et des formes familiales tardives de la MA. Depuis 20 ans, plusieurs chercheurs proposent que SorLA soit engagée dans le recyclage par endocytose de la protéine βAPP.

MOTS-CLES : Alzheimer – SorLA – βAPP - peptide amyloïde – GWAS

REMERCIEMENTS

Dans un premier temps, je souhaite remercier l'ensemble des membres du jury ainsi que les rapporteurs pour le temps consacré à l'évaluation de ce travail.

Mes remerciements vont ensuite au Dr Frédéric Checler, mon tuteur scientifique, pour m'avoir permis de préparer le diplôme de l'EPHE en Sciences de la Vie et de la Terre, m'avoir accordé sa confiance, m'avoir guidé et encadré tout en poursuivant mon activité de technicienne au sein de son laboratoire.

Je tiens également à remercier le Dr Nadine Mestre-Frances, ma tutrice pédagogique, pour son suivi, ses conseils et ses cours dans les différents modules auxquels j'ai assisté durant 3 ans à Montpellier.

Je remercie tous les membres de l'institut IPMC et particulièrement ceux de l'équipe FC avec qui je travaille chaque jour pour une meilleure compréhension de la biologie du vieillissement cérébral : Inger, Raphaëlle, Audrey, Alexandre, Julie, Wejdane, Eric, Lila, Ligia, Cristine, Mounia, Renaud, Arnaud, Anaïs et Corinne.

Enfin, je souhaite remercier ma famille, mes amis, pour leur soutien et leurs encouragements. Retourner en formation à l'âge adulte demande de nombreux sacrifices et il faut savoir se poser les bonnes questions pour se lancer.

TABLE DES MATIERES

1 - PRESENTATION DE LA MA **page 10**

1.1 Les aspects cliniques page 10

- Les symptômes de la MA page 10
- Le diagnostic de la MA page 11
- Le traitement actuel de la MA page 13

1.2 Les aspects histologiques page 13

- Les dégénérescences neurofibrillaires intracellulaires page 14
- Les dépôts amyloïdes extracellulaires page 14

1.3 L'étiologie de la MA page 15

2 - LA βAPP ET SES CLIVAGES **page 17**

2.1 La protéine βAPP page 17

2.2 Le métabolisme de la protéine βAPP page 18

- La maturation non-amyloïdogénique page 18
- La maturation amyloïdogénique page 19
- Le clivage γ-sécrétase page 20
- Les fragments protéolytiques de la protéine βAPP page 22

2.3 Le trafic de la protéine βAPP page 23

- Le complexe rétromère page 25
- Les récepteurs de lipoprotéines de faibles densités page 27

3 - LE PEPTIDE AMYLOIDE Aβ **page 29**

3.1 LES DIFFERENTES ESPECES DE PEPTIDE AMYLOIDE Aβ page 29

3.2 LES FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DU PEPTIDE AMYLOIDE Aβ page 30

3.3 LOCALISATION DU PEPTIDE Aβ page 30

4 - LA PROTEINE SorLA DANS LA MA **page 32**

5- OBJECTIF **page 34**

6 - MATERIELS ET METHODES **page 34**

6.1 Constructions et mutagénèse dirigée page 34

6.2 Culture cellulaire et transfections page 35

6.3 Immunoprécipitations d'Aβ sécrété page 35

6.4 Dosages de γ-sécrétase in vitro page 36

6.5 Immunoempreintes page 36

6.6 Mesure de l'activité enzymatique de la néprilysine page 36

6.7 Mesure de l'activité enzymatique de BACE1 page 36

6.8 Mesure enzymatique de l'α-sécrétase sur cellules intactes page 37

6.9 Mesure de l'activité enzymatique de la cathepsine B in vitro page 37

6.10 ELISA en sandwich sur l'Aβ sécrété et intracellulaire page 37

6.11 Analyses statistiques page 38

7 - RESULTATS page 38

7.1 Expression et devenir des mutants de la protéine SorLA dans les cellules exprimant APPwt et APPswe page 38

7.2 Influence de $SorLA^{WT}$ et de ses mutants sur l'expression de βAPP et sur ses protéolyses non amyloïdogéniques dans les cellules exprimant APPwt et APPswe page 41

7.3 Influence de $SorLA^{WT}$ et ses mutants sur le peptide Aβ et sur l'expression et l'activité γ-sécrétase page 43

7.4 Influence de $SorLA^{WT}$ et ses mutants sur les fragments C-terminaux de βAPP et sur l'activité β-sécrétase page 49

7.5 Influence de $SorLA^{WT}$ et ses mutants sur l'activité de la néprilysine et de la cathepsine B page 52

8 - DISCUSSION page 54

9 - BIBLIOGRAPHIE page 57

ABBREVIATIONS

Aβ : peptide amyloïde

ADAM : a disintegrin and metalloprotease

AICD : βAPP intracellular domain

AMPA : α-amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate

AP-2 : adaptor protein-2

Aph-1 : anterior pharynx defective-1

ApoE : apolipoprotéine E

ApoER2 : apolipoprotein E receptor 2

ATP : adénosine triphosphate

BACE1 : β-site APP cleaving enzyme 1

BAX : BCL2-associated X protein

βAPP : β-amyloid precursor protein

BIN1 : bridging integrator 1

CLU : clusterin

CR1 : complement component 3b/4b receptor 1

Dab : disabled

DNF : dégénérescences neurofibrillaires

DR6 : death receptor 6

EGF : epidermal growth factor

FN III : Fibronectin type III domain

GGA : Golgi-localized, gamma-adaptin ear homology, Arf-binding

GWAS : genome-wide association study

GSK-3β : glycogen synthase kinase 3 beta

IC : intervalle de confiance

IRM : imagerie par résonance magnétique

Jip : JNK-interacting protein

LDLR : low density lipoprotein receptor

Lrad3 : LDL receptor class A domain containing 3

LRP1 : low density lipoprotein receptor-related protein 1

MA : maladie d'Alzheimer

MCI : mild cognitive impairment

MVB : multivesicular body

NCT : nicastrine

NMDA : *N*-méthyl-D-aspartate

OR : odds ratio

Pen-2 : presenilin-enhancer-2

PICALM : phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein

PS : préséniline**s**

PTB : phosphotyrosin binding

RE : réticulum endoplasmique

sAPPα : soluble alpha-APP

SH2 : Src-homology 2

SNP : polymorphismes nucléotidiques simples

SNX : sorting nexin

SorCS : sortilin-related CNS expressed

SORL1 : sortilin-related receptor 1

SorLA : sorting-related receptor with type A repeats

TACE : TNF-alpha converting enzyme

TGN : trans-Golgi network

TPE : tomographie par émission de positon

VLDLR : very-low-density-lipoprotein receptor

Vps : vacuolar protein sorting

YENPTY : séquence cytoplasmique constituée des acides aminés Tyr-Glu-Asn-Pro-Thr-Tyr

FIGURES

Figure 1 : les lésions cérébrales microscopiques de la MA

Figure 2 : les différentes formes de la MA

Figure 3 : le processus protéolytique de la protéine βAPP

Figure 4 : le trafic intracellulaire de βAPP

Figure 5 : représentation schématique des membres de la famille des LDLR

Figure 6 : différentes voies du processus de clivage de βAPP modulées par les membres de la famille LDLR

Figure 7 : hypothèse proposée par Gouras et collaborateurs

Figure 8 : la protéine SorLA

Figure 9 : les mutations identifiées sur le gène SORL1

Figure 10 : expression de SorLA dans les HEK293 APP-WT et APP-SWE

Figure 11 : expression de la néomycine après transfection des constructions SORL1

Figure 12 : expression de SorLA après traitement à la lactacystine dans les cellules HEK293 APP-WT

Figure 13 : expression de SorLA après traitement à la lactacystine dans les cellules HEK293 APP-SWE

Figure 14 : expression de SorLA après traitement au NH4Cl dans les cellules HEK293 APP-WT

Figure 15 : expression de SorLA après traitement au NH4Cl dans les cellules HEK293 APP-SWE

Figure 16 : expression de SorLA après traitement à la pifithrine dans les cellules HEK293 APP-WT

Figure 17 : expression de SorLA après traitement à la pifithrine dans les cellules HEK293 APP-SWE

Figure 18 : expression de βAPP dans les cellules HEK293 APP-WT

Figure 19 : expression de βAPP dans les cellules HEK293 APP-SWE

Figure 20 : sécrétion de sAPPα dans les cellules HEK293 APP-WT

Figure 21 : sécrétion de sAPPα dans les cellules HEK293 APP-SWE

Figure 22 : activité α-sécrétase dans les cellules HEK293 APP-WT

Figure 23 : activité α-sécrétase dans les cellules HEK293 APP-SWE

Figure 24 : immunoprécipitation du peptide Aβ dans les cellules HEK293 APP-WT

Figure 25 : immunoprécipitation du peptide Aβ dans les cellules HEK293 APP-SWE

Figure 26 : sécrétion du peptide Aβ40 et Aβ42 par ELISA dans les cellules HEK293 APP-WT

Figure 27 : sécrétion du peptide Aβ40 et Aβ42 par ELISA dans les cellules HEK293 APP-SWE

Figure 28 : Aβ40 et Aβ42 intracellulaires par ELISA dans les cellules HEK293 APP-WT

Figure 29 : Aβ40 et Aβ42 intracellulaires par ELISA dans les cellules HEK293 APP-SWE

Figure 30 : expressions des membres du complexe γ-sécrétase dans les cellules HEK293 APP-WT

Figure 31 : expressions des membres du complexe γ-sécrétase dans les cellules HEK293 APP-SWE

Figure 32 : activité γ-sécrétase dans les cellules HEK293 APP-SWE

Figure 33 : expressions de C99 et C83 dans les cellules HEK293 APP-WT

Figure 34 : expressions de C99 et C83 dans les cellules HEK293 APP-SWE

Figure 35 : analyses statistiques de l'expression de C99 et C83 dans les cellules HEK293 APP-WT

Figure 36 : analyses statistiques de l'expression de C99 et C83 dans les cellules HEK293 APP-SWE

Figure 37 : activité de BACE1 dans les cellules HEK293 APP-WT

Figure 38 : activité de BACE1 dans les cellules HEK293 APP-SWE

Figure 39 : activité de NEP dans les cellules HEK293 APP-WT

Figure 40 : activité de NEP dans les cellules HEK293 APP-SWE

Figure 41 : activité de la cathepsine B dans les cellules HEK293 APP-WT

Figure 42 : activité de la cathepsine B dans les cellules HEK293 APP-SWE

1 - PRESENTATION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

La maladie d'Alzheimer (MA) a été décrite pour la première fois par Aloïs Alzheimer en 1906 lors de la 37ème conférence des psychiatres allemands à Tübingen. Il décrit le comportement anormal d'une de ses patientes, Augusta D. 51 ans, qui présente un délire de jalousie envers son mari, une dégradation de la mémoire et une désorientation spatiale et temporelle importante. L'examen post-mortem du cerveau de cette patiente révèle la présence dans le cortex cérébral de dépôts protéiques et d'enchevêtrements neurofibrillaires.

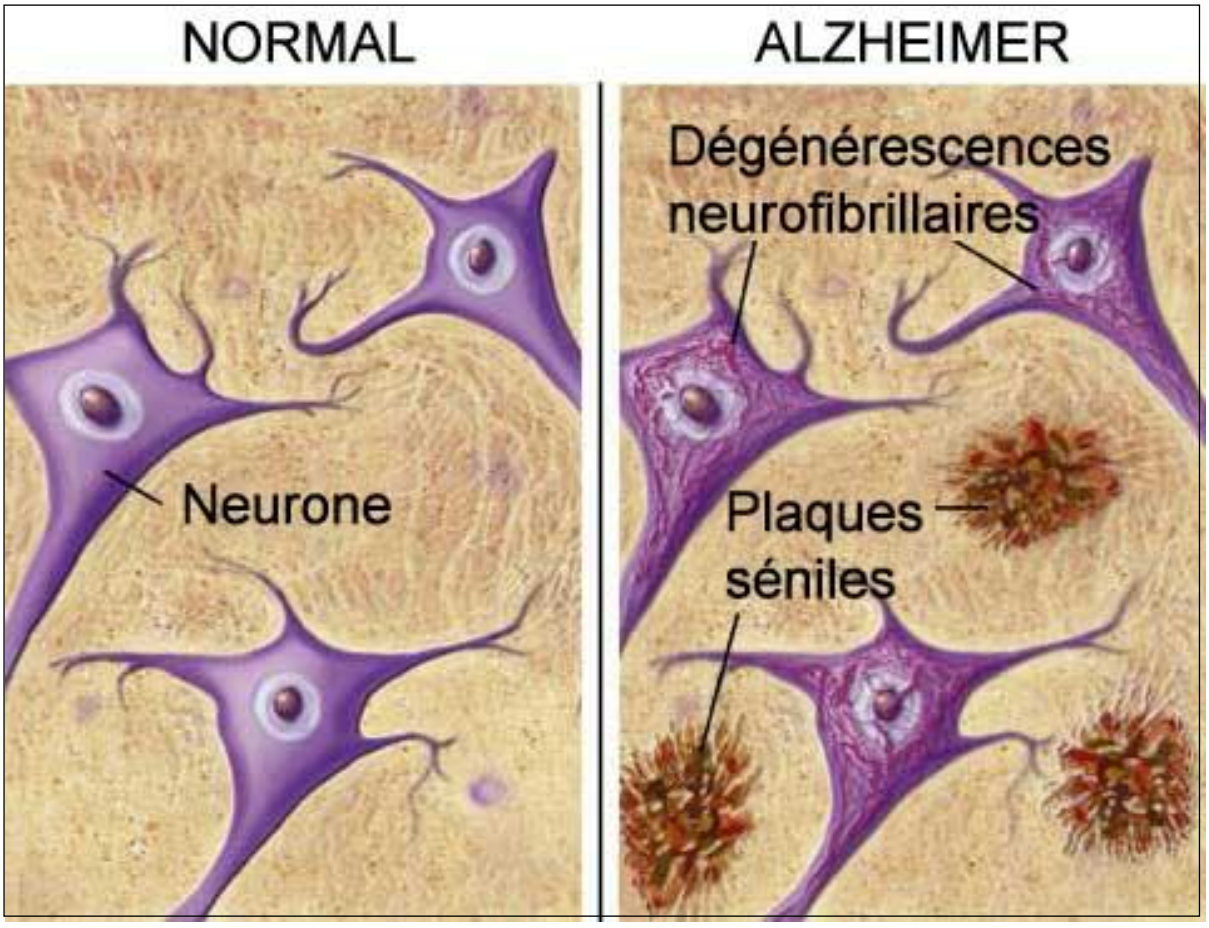

Figure 1 : les lésions cérébrales microscopiques de la MA

1.1 Les aspects cliniques

I- Les symptômes de la MA

La MA est caractérisée cliniquement par le développement progressif d'une démence cognitive où dominent les troubles de la mémoire. Les signes d'une amnésie légère portant sur des faits récents sont les manifestations les plus précoces et les plus fréquemment observées chez les malades. Cette amnésie légère progresse ensuite en une perte de mémoire plus sévère, portant sur des faits plus anciens. Les patients ont également

une désorientation temporelle et spatiale, ils ont tendance à se perdre dans des endroits qui leur sont pourtant familiers, et perdent souvent la notion de temps. Les malades ont des troubles du langage (ou aphasie) et peuvent avoir de plus en plus de mal à s'exprimer, à parler, à lire, à écrire, et participent de moins en moins aux conversations avec l'entourage. Ils ont des troubles gestuels (ou apraxie) c'est-à-dire des difficultés à accomplir des tâches quotidiennes, comme se laver, s'habiller, téléphoner … Ils ne savent plus se servir d'objets malgré des fonctions motrices intactes. Ils ont des troubles de la reconnaissance (ou agnosie) et sont incapables de reconnaitre ou d'identifier des objets ou des personnes de leur entourage malgré des fonctions sensorielles intactes. L'absence d'émotion (ou apathie) leur fait perdre toute initiative, les patients se referment sur eux-mêmes, se désintéressent de tout, deviennent indifférents aux émotions, aux désirs. Ils ont un comportement similaire à un état dépressif. Enfin, les malades ont des troubles de l'humeur et peuvent avoir des idées délirantes, des angoisses inexpliquées, ils se sentent persécutés et se montrent agressifs envers leur entourage.

L'apparition des différents symptômes est progressive et varie énormément d'une personne à l'autre, mais globalement les malades perdent peu à peu leur autonomie et deviennent dépendants de leur entourage. Les médecins distinguent 3 grandes phases dans l'évolution de la MA. Une phase asymptomatique (10 à 25 ans) au cours de laquelle les lésions s'installent sans traduction clinique, sans doute en raison de mécanismes de compensation neuronaux tels que l'hyperactivité des neurones restants ou l'hypersensibilité des récepteurs post-synaptiques. Une phase symptomatique pré-démentielle (3 à 5 ans) où les symptômes sont légers sans perte d'autonomie et insuffisants pour définir une démence. C'est au cours de cette phase que les neuropsychiatres identifient les patients MCI (mild cognitive impairment) présentant seulement des troubles cognitifs pré-démentiels. Et enfin, une phase symptomatique démentielle pendant laquelle les troubles mnésiques s'aggravent, les troubles du comportement apparaissent (aphasie, apraxie, agnosie et apathie) et le patient perd son autonomie. C'est à ce stade tardif que la démence est diagnostiquée.

II- Le diagnostic de la MA

Le diagnostic de démence :

Les tests neuropsychologiques, accompagnés de multiples tests comportementaux, permettent d'identifier un état de démence. Parmi ces tests, il existe par exemple l'évolution globale du fonctionnement cognitif, l'évaluation de la mémoire ou bien encore l'évaluation des fonctions exécutives. L'imagerie cérébrale par résonance magnétique (IRM) permet de suivre l'évolution de l'atrophie cérébrale et de confirmer le diagnostic de démence. Il

existe, en effet, une forte corrélation entre les symptômes de démence et la diminution du volume cérébral (Fox et al, 1996 ; Jack et al, 2000).

Le diagnostic différentiel :

Il consiste, par le biais d'examens cliniques (scanner, bilan sanguin) à éliminer certaines causes de démence comme un accident vasculaire, un trouble thyroïdien ou un déficit vitaminique car dans 60% des cas la démence est associée à la MA mais elle peut aussi être associée à d'autres pathologies.

Le diagnostic certain *post-mortem* :

Les seuls critères qui permettent aujourd'hui de porter avec certitude un diagnostic de la MA reposent sur l'observation microscopique post-mortem du cerveau qui révèlent la présence des marqueurs histopathologiques de cette maladie que sont d'une part les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) intracellulaires constituées principalement de la protéine Tau, d'autre part les plaques séniles constituées essentiellement du peptide amyloïde, Aβ (*Figure 1*).

L'un des plus grands enjeux de la recherche clinique est la mise au point d'un diagnostic précoce, efficace et spécifique de la MA. Il existe principalement 2 approches susceptibles de répondre à cet objectif. L'une est la détection précoce de marqueurs biologiques spécifiques de la MA, la protéine Tau ou le peptide Aβ, dans le liquide céphalorachidien (Andreasen and Blennow, 2005). L'autre espoir réside dans les progrès d'imagerie cérébrale et la visualisation précoce des plaques séniles. Une équipe japonaise a, en effet, visualisé les plaques séniles de souris transgéniques vivantes en leur injectant par voie intraveineuse un traceur amyloïdophile, non toxique et détectable par IRM classique (Higuchi et al, 2005). Une autre technique d'imagerie prometteuse est la tomographie par émission de positon (TEP) qui permet de visualiser et de quantifier un radio-traceur injecté préalablement à un individu. Des américains ont testé chez la souris et chez l'homme, un radio-traceur marqué au carbone 11, dérivé de la thioflavine (colorant spécifique des amas amyloïdes, *in vitro*), capable *in vivo* de traverser la barrière hémato-encéphalique et de venir marquer les plaques séniles (Klunk et al, 2004). Plus récemment, il a été proposé d'associer aux examens cliniques le dosage dans le liquide cérébro-spinal (LCS) de trois biomarqueurs : les protéines Tau totales, les protéines Tau hyperphosphorylées et le peptide Aβ 1-42 (Khachaturian, 2011 ; Albert et al, 2011). Ces derniers sont libérés dans le LCS ce qui permet de les doser facilement grâce à des techniques immuno-enzymatiques de type ELISA commerciales. Ce dosage permet de détecter très tôt la MA, avant même la survenue des signes cliniques. La variation de concentration de ces trois biomarqueurs est le reflet des conséquences des lésions caractéristiques de la maladie dans le cerveau : une diminution d'Aβ 1-42 associée à une augmentation de Tau et phospho-Tau caractérisent une MA (Tapiola et al, 2009 ; Strozyk

et al, 2003 ; Buerger et al, 2006). Ils ont été proposés par l'International Working Group (IWG) et le National Institute on Aging-Alzheimer's Association (NIA-AA). L'interprétation du dosage peut rendre plusieurs conclusions possibles : 1) les 3 marqueurs sont dans les normes physiologiques, le test est donc informatif. On conclura à un test négatif « Profil biochimique normal », 2) les 3 marqueurs sont dans les normes pathologiques, le test est donc informatif. On conclura à un test positif « Profil biochimique en faveur d'une MA probable », 3) dans tous les autres cas de figures, lorsque seulement un ou deux marqueurs sont dans les normes pathologiques, on conclura à un test non informatif.

III- Le traitement actuel de la MA

Aujourd'hui encore, il n'existe aucun traitement curatif de la MA. Les médicaments utilisés ne sont que symptomatiques, c'est-à-dire qu'ils combattent les symptômes et non les causes de la pathologie. Ils atténuent les pertes de mémoire, les dysfonctionnements du langage et du raisonnement et stabilisent les troubles de la maladie en ciblant principalement deux transmissions synaptiques que sont les transmissions cholinergique et glutamatergique. La transmission cholinergique a pour neurotransmetteur l'acétylcholine qui est libérée au niveau des synapses, se fixe aux récepteurs muscariniques ou nicotiniques présents à la surface des membranes post-synaptiques pour transmettre l'influx nerveux. L'acétylcholine libre, non fixée aux récepteurs cholinergiques, est dégradée dans la fente synaptique par l'acétylcholinestérase. Cette transmission cholinergique semble jouer un rôle important dans les fonctions cognitives, et elle est sérieusement affectée chez les patients atteints de la MA (Kasa et al, 1997), d'où l'intérêt porté aux médicaments capables d'améliorer cette transmission cholinergique dans le traitement de la MA (les inhibiteurs d'acétylcholinestérase qui inhibent la dégradation de l'acétylcholine et les agonistes des récepteurs cholinergiques qui améliorent la transmission cholinergique en se substituant à l'acétylcholine). La transmission glutamatergique a pour neurotransmetteur le glutamate. Il est libéré au niveau des synapses, se fixe aux récepteurs glutamatergiques (AMPA, NMDA) présents à la surface des membranes post-synaptiques. Une activation brève des récepteurs est bénéfique pour une transmission synaptique normale, mais à l'inverse une activation prolongée ou chronique des récepteurs est associée à une dégénérescence neuronale importante. La stratégie thérapeutique visant la transmission glutamatergique consiste à inhiber l'effet pathogène du glutamate et à limiter la dégénérescence neuronale observée chez les patients atteints de la MA. Un antagoniste non compétitif (exemple : la mémantine) du récepteur NMDA bloque son canal calcique et inhibe la neurotoxicité du glutamate sans altérer son rôle physiologique nécessaire aux mécanismes mnésiques (apprentissage et mémoire) (Sonkusare et al, 2005).

1.2 Les aspects histologiques

Les patients atteints de la MA présentent des lésions cérébrales macroscopiques et notamment une importante atrophie cérébrale qui se traduit par une dilatation du système

ventriculaire et un élargissement des sillons corticaux. Le cerveau d'un patient atteint de la MA peut perdre jusqu'à 20% de son volume alors que chez une personne normale le volume du cerveau reste constant jusqu'à 50-55 ans puis il diminue d'environ 2% tous les 10 ans (Dhenain et al, 2002). Des lésions cérébrales microscopiques sont également observées chez les patients atteints de la MA. Elles ont été découvertes pour la première fois par Aloïs Alzheimer après l'analyse *post-mortem* du cortex cérébral de sa première patiente. Grâce à une technique d'imprégnation à l'argent, il met en évidence d'une part des dépôts protéiques intracellulaires qui seront plus tard appelées dégénérescences neurofibrillaires (DNF), et d'autre part des dépôts protéiques extracellulaires qui seront baptisées plaques séniles.

I- Les dégénérescences neurofibrillaires intracellulaires (DNF)

Les DNF sont des dépôts de filaments pathologiques qui s'accumulent aussi bien dans les corps cellulaires des neurones que dans leurs prolongements. Les observations de ces lésions en microscopie électronique ont révélé une structure en paire de filaments protéiques appariée en hélice. Le composant majeur de ces dépôts intracellulaires est la protéine Tau, impliquée dans le dynamisme de la polymérisation et de la déstabilisation des microtubules. L'hyperphosphorylation de la protéine Tau empêche son ancrage aux microtubules, provoque son agrégation et contribue, sans doute, aux dysfonctionnements pathologiques de la MA (Johnson and Jenkins, 1999).

II- Les dépôts amyloïdes extracellulaires

Les dépôts amyloïdes se forment dans le parenchyme nerveux extracellulaire du cortex cérébral. On distingue 3 types de dépôts amyloïdes, présents dans les cerveaux de patients Alzheimer : les plaques séniles (ou plaques neuritiques) qui ont une structure sphérique de 50 à 200 μm, formée d'un dépôt central dense (le cœur) entouré de lésions neurofibrillaires (la couronne). La substance amyloïde située au cœur de la plaque sénile a une structure hydrophobe en feuillets β. Le composant majeur de cette substance est le peptide amyloïde Aβ sous une forme agrégée, issu de la maturation de son précurseur la protéine βAPP (Amyloïd Beta Peptide Precursor Protein). Les plaques diffuses ont une structure beaucoup plus volumineuse, moins dense, plus irrégulière et beaucoup moins bien délimitée. Ces plaques diffuses sont constituées d'Aβ amorphe, elles n'ont pas la structure en feuillets β et ne sont pas entourées de neurites dystrophiques. Ces plaques s'observent dans le vieillissement normal. Les dépôts amyloïdes vasculaires (ou angiopathie amyloïde) sont constitués essentiellement de peptide Aβ agrégé qui se dépose sur les parois des artérioles et des capillaires sanguins de certains patients atteints de la MA.

1.3 L'étiologie de la MA

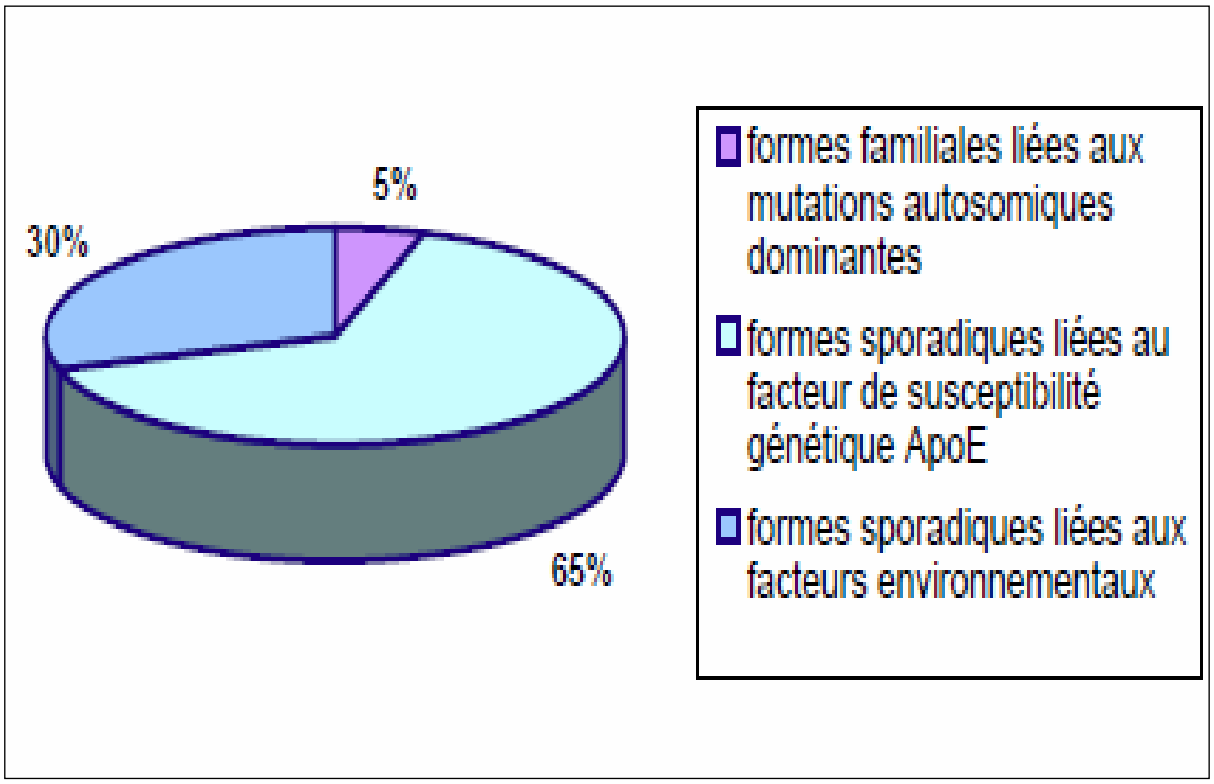

Figure 2 : les différentes formes de la MA

La MA est une pathologie multifactorielle faisant intervenir une combinaison de plusieurs facteurs génétiques et environnementaux *(Figure2)*. Les rares formes héréditaires concernent entre 1 et 5% des personnes atteintes de la MA. Les symptômes sont identiques aux formes sporadiques mais l'évolution de la maladie est plus rapide et plus agressive. La transmission est autosomique dominante, c'est-à-dire que chaque génération peut être affectée par la maladie. De manière intéressante, les mutations identifiées touchent 3 gènes impliqués dans la production du peptide amyloïde Aβ. Il s'agit de son précurseur la βAPP (mutation portée par le gène situé sur le chromosome 21) et deux protéines participant à son clivage par l'activité γ-sécrétase : les présénilines 1 et 2 (mutations portées par les gènes situés sur les chromosomes 14 et 1). A ce jour, on compte une vingtaine de mutations pathogènes sur le gène codant pour la protéine βAPP, plus d'une centaine de mutations pathogènes sur le gène codant pour la préséniline 1 et une dizaine de mutations pathogènes sur le gène codant pour la préséniline 2. La grande majorité de ces mutations altère le

métabolisme de la protéine βAPP induisant une modulation du peptide amyloïde Aβ (St George-Hyslop et al, 2000). Les formes familiales de la MA présentant la même progression des symptômes et la même histopathologie que les formes sporadiques suggèrent des mécanismes communs aux deux formes et notamment l'implication du peptide amyloïde Aβ. Les formes sporadiques de la MA sont les plus fréquentes et les plus tardives (après 65 ans). Ces formes sont liées soit à un facteur de susceptibilité génétique comme l'apolipoprotéine E (ApoE), soit à divers facteurs environnementaux identifiés à partir d'études épidémiologiques. Les facteurs de risque environnementaux sont l'âge, le sexe, le niveau d'éducation, l'alimentation et les antécédents de traumatismes crâniens, dépression … (Dartigues et al, 2002). Les facteurs de risque génétiques influencent de manière variable le processus pathologique de la MA. Ils peuvent être directement responsables des formes précoces et agressives de la maladie (avant 65 ans), c'est le cas de mutations autosomiques dominantes de gènes situés sur les chromosomes 1, 14 et 21, mais ils peuvent aussi n'influencer que le déroulement de la maladie, on parle alors de facteurs de susceptibilité génétique. C'est le cas du gène de l'ApoE porté par le chromosome 19. La protéine ApoE, glycoprotéine de 299 acides aminés, est impliquée dans le transport du cholestérol et dans le métabolisme des lipides. Le gène codant pour cette protéine, situé sur le chromosome 19, présente 3 allèles différents, ε2, ε3 et ε4. De nombreuses études ont montré une forte corrélation entre la présence de l'allèle ε4 et le risque d'apparition des formes sporadiques tardives de la MA. En effet, la présence de l'allèle ε4 accroît de manière dose-dépendante le risque de développer la maladie, ainsi les hétérozygotes ε3/ε4 et les homozygotes ε4/ε4 voient leur susceptibilité de développer la MA augmentée (Corder et al, 1993). D'autres facteurs de risque génétiques ont été identifiés par des études GWAS (Genome-Wide Association Study) qui sont des outils performants pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. En effet, la génomique actuelle utilise les informations obtenues depuis le séquençage du génome humain en 2004. La diversité du message génétique a révélé l'existence de variants, c'est-à-dire d'un changement du message génétique correspondant le plus souvent à la substitution d'une base par une autre à une localisation définie. Ces variants dénommés SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) sont bi-alléliques c'est-à-dire que le changement du message est présent à l'état homozygote ou hétérozygote. Il existe plus de 14 millions de SNP dans le génome humain dont environ 3 millions sont différents lorsque l'on compare la séquence génomique de deux individus non apparentés pris au hasard. L'arrivée des techniques de puces de génotypage en 2002 et d'autres progrès ont permis aux chercheurs de réaliser des études d'association sur l'ensemble de ces SNP, c'est-à-dire comparer la fréquence génotypique de chaque variant entre une population témoin et une population atteinte d'une maladie. A la fin de l'année 2011, le catalogue international des études de GWAS répertoriait environ 5000 SNP associés à des pathologies diverses. Ainsi les premiers gènes identifiés, très probablement en relation avec la survenue de la MA, codent pour les protéines CLU (clusterin), CR1 (complement component 3b/4b receptor 1), BIN1 (bridging integrator 1) et PICALM

(phosphotidylinositol-binding clathrin assembly protein). Ces protéines seraient impliquées dans la clairance du peptide amyloïde Aβ (CLU, CR1) ou le métabolisme de la βAPP par leur rôle d'endocytose (BIN1, PICALM) (Lambert and Amouyel, 2011). Depuis, les GWAS ont déjà permis d'identifier 21 gènes et régions du génome. Une quinzaine d'autres sont en cours de validation. Parmi ces découvertes, un nouveau gène, impliqué dans les formes précoces de la MA, a été identifié. *SORL1* (sortilin-related receptor 1) code pour la protéine SorLA qui régulerait la production du peptide amyloïde Aβ dans la MA.

2 - LA βAPP ET SES CLIVAGES

2. 1 La protéine βAPP

La βAPP est une glycoprotéine transmembranaire de type 1 constituée d'un large domaine extracellulaire, d'un segment transmembranaire hydrophobe et d'un court domaine intracellulaire, subissant des modifications post-traductionnelles complexes telles que des sulfatations, des N- et O-glycosylations ainsi que des phosphorylations (Weidemann et al, 1989). Elle est la première protéine impliquée dans les formes familiales de la MA dont le gène a été cloné (Kang et al, 1987). La protéine βAPP est exprimée de façon ubiquitaire et trois isoformes sont générées par épissage alternatif. Parmi ces isoformes, la forme que l'on trouve dans le système nerveux central compte 695 acides aminés (Kitaguchi et al, 1988) tandis que la forme du tissu périphérique compte 751 acides aminés. Le gène codant pour la protéine βAPP est porté par le chromosome 21 et actuellement environ 30 mutations ponctuelles sur celui-ci ont été rapportées. Nombre de ces mutations, responsables de formes familiales de la MA, sont situées au niveau ou à proximité des sites de clivage par les enzymes impliquées dans les processus amyloïdogène ou voie non-amyloïdogène de maturation *(Figure 3)* de la protéine βAPP. Ces mutations ne se traduisent pas forcément toutes par une augmentation de la production du peptide amyloïde Aβ, mais aussi parfois par une augmentation du ratio Aβ42/Aβ40, qui sont les formes majoritairement produites et qui diffèrent par leur longueur (40 ou 42 acides aminés). En effet, la mutation suédoise, par exemple, située à l'extrémité N-terminale d'Aβ augmente la production totale d'Aβ en fournissant un meilleur substrat pour l'activité β-sécrétase (Citron et al, 1992 ; Cai et al, 1993 ; Sinha et al, 1999 ; Vassar et al, 1999). D'autres mutations augmentent l'agrégation des peptides amyloïdes en favorisant la production des espèces d'Aβ plus longues (Aβ42) qui s'agrègent plus rapidement : c'est le cas des mutations situées après la partie C-terminale d'Aβ (mutations autrichienne, iranienne, française, allemande, londonienne, de Floride) (Suzuki et al, 1994). Un autre moyen d'augmenter l'agrégation des peptides amyloïdes est d'affecter la séquence primaire d'Aβ, comme dans les mutations dans la région médiane, avec les mutations arctique (Nilsberth et al, 2001) et hollandaise (Levy et al, 1990). Récemment une mutation réduisant le clivage β-sécrétase et la formation d'Aβ a été identifiée sur une cohorte d'islandais. Cette mutation protège des troubles cognitifs et de la MA (Jonsson et al, 2012). Les mutations sur la protéine βAPP sont la cause d'environ 20%

des cas de forme familiale de la MA. Parallèlement, le locus contenant le gène codant pour la protéine βAPP peut être dupliqué, ce qui conduit systématiquement à l'apparition d'une MA associée à une angiopathie amyloïde cérébrale (Rovelet-Lecrux et al, 2006). La fonction de la protéine βAPP demeure relativement peu connue. Des souris invalidées pour la protéine βAPP ont été générées. Ces souris, bien que viables et fertiles présentent certaines anomalies parmi lesquelles, un défaut global de croissance avec une taille et un poids nettement inférieurs à ceux des souris sauvages, un développement cérébral altéré, des troubles de l'homéostasie du cuivre et des lipides ainsi qu'une diminution des capacités d'apprentissage et de mémorisation (Dawson et al, 1999 ; Seabrook et al, 1999 ; Tremml et al, 1998 ; White et al, 1999).

2.2 Le métabolisme de la protéine βAPP

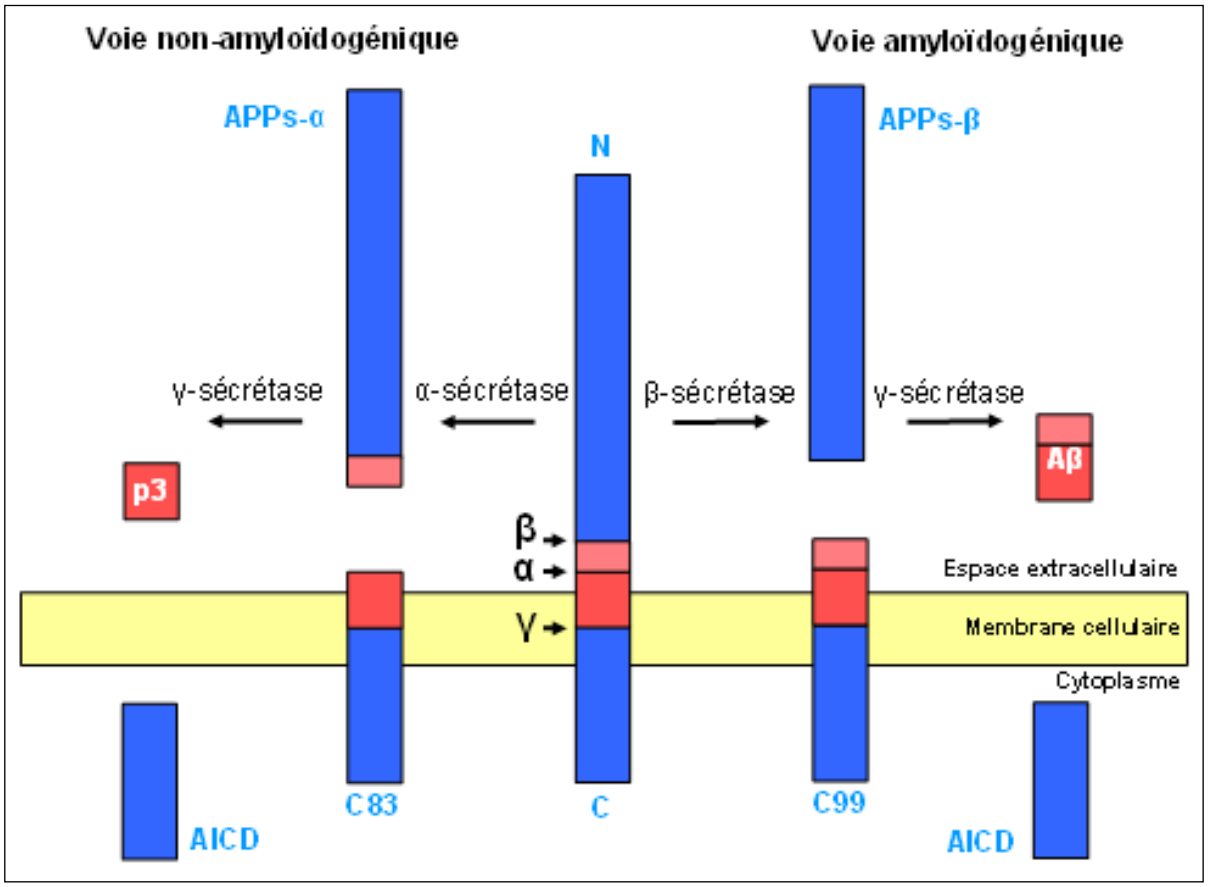

Figure 3 : le processus protéolytique de la protéine βAPP

I- La voie de maturation non-amyloïdogénique

Une fois la protéine βAPP produite, celle-ci subit une attaque protéolytique de nature non-amyloïdogène. Ce clivage implique l'action d'une activité enzymatique appelée α-sécrétase. Dans cette voie de maturation, la protéine βAPP est clivée par l'activité α-sécrétase, à l'intérieur de la séquence peptidique du peptide amyloïde Aβ, après le résidu lysine 612 de l'isoforme βAPP_{695}. Ce clivage produit d'une part un fragment amino-terminal de 120 kDa,

sAPPα, et d'autre part, un fragment carboxy-terminal d'environ 10 kDa, C83 ou p10 qui reste ancré à la membrane et qui subit un clivage intra-membranaire par la γ-sécrétase qui libére le peptide p3 (séquence comprise entre les résidus 17 et 40/42 du peptide amyloïde Aβ). Les clivages intramembranaires de C83 au site γ- ou ε-sécrétase libèrent les fragments cytosoliques AICD C57, AICD C59 et AICD C50 respectivement. Le type de clivage α-sécrétase a lieu essentiellement au niveau des compartiments tardifs du Golgi, et une fraction de βAPP qui échappe à cette protéolyse Golgienne est clivée au niveau de la membrane plasmique. Ces différentes localisations de productions des fragments sAPPα, dans des compartiments cellulaires ayant des propriétés physicochimiques différentes, suggèrent l'existence d'au moins deux protéases distinctes, l'une intracellulaire, l'autre au niveau de la membrane plasmique (Checler et al, 2002).

A l'origine, ce sont des études pharmacologiques couplées à des expériences de biologie cellulaire qui ont permis de déterminer que les protéases impliquées dans l'activité α-sécrétase étaient des métalloprotéases dont le site catalytique se trouve sur la face externe de la membrane plasmique (ectoprotéases). Par la suite, trois membres de la famille des désintégrines ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease), ADAM9, ADAM10 et TACE/ADAM17, ont été identifiés comme étant capables d'induire la coupure de la protéine βAPP au site α-sécrétase lorsqu'elles sont surexprimées dans des cellules en culture (Buxbaum et al, 1998 ; Koike et al, 1999 ; Lammich et al, 1999). Depuis, on sait qu'ADAM9 n'agit pas directement sur le clivage α-sécrétase mais joue sur la maturation d'ADAM10. En effet la surexpression d'ADAM9 dans des cellules dépourvues d'ADAM10 n'induit pas d'augmentation de la production de sAPPα (Cissé et al, 2005). Il n'y a donc à priori que deux α-sécrétases : TACE/ADAM17 qui est principalement impliquée dans la voie régulée et ADAM10 qui est plutôt responsable d'une voie constitutive mais modulable, en amont, par l'action d'ADAM9. Les désintégrines ADAM9, ADAM10 et ADAM17 sont également responsables du clivage de nombreux autres substrats et par la même, impliquées dans diverses fonctions physiologiques. La voie de maturation non-amyloïdogénique de la protéine βAPP, qui n'engendre pas de peptide amyloïde Aβ et qui est donc non pathogène, est largement majoritaire puisque près de 98% des protéines βAPP empruntent cette voie de maturation.

II- La voie de maturation amyloïdogénique

Dans cette voie de maturation, la protéine βAPP est clivée par l'activité β-sécrétase, dans sa partie amino-terminale entre la méthionine 596 et l'aspartate 597 de l'isoforme βAPP_{695}. Ce clivage produit d'une part un fragment amino-terminal de 110 kDa, sAPPβ, d'autre part un fragment carboxy-terminal d'environ 12 kDa, C99 ou p12 qui reste ancré à la membrane et qui subit le clivage protéolytique de type γ-sécrétase pour libérer les peptides Aβ1-40 et Aβ1-42, et les fragments cytosoliques AICD C50, AICD C57 et AICD C59. Ces clivages libèrent respectivement les extrémités amino- et carboxy-terminales du peptide amyloïde Aβ qui

sont hétérogènes, la longueur du peptide amyloïde Aβ étant étroitement liée à sa pathogénicité. La production du peptide amyloïde Aβ a lieu principalement dans deux compartiments cellulaires différents selon une voie de sécrétion constitutive et une voie d'endocytose (Checler et al, 2002). Le peptide amyloïde Aβ et plus particulièrement la forme pathogène Aβ1-42 est détectable très tôt dans la voie de sécrétion, au niveau du réticulum endoplasmique (RE), le peptide Aβ1-40 est lui plus abondant dans les compartiments Golgiens. Le peptide Aβ1-42 produit dans le RE a tendance à s'accumuler à l'intérieur de la cellule, alors que le peptide Aβ1-40 est destiné à la sécrétion (Greenfield et al, 1998 ; Wilson et al, 1999). Une fraction des protéines βAPP qui échappe aux protéolyses intracellulaires parvient jusqu'à la membrane et est réinternalisée par endocytose pour accéder aux compartiments endosomaux et lysosomaux où les activités β- et γ-sécrétase sont également présentes (Checler et al, 1995).

La β-sécrétase est l'activité enzymatique responsable de la libération de l'extrémité N-terminale du peptide amyloïde Aβ. Elle est présente dans tous les tissus (Haass et al, 1992) et très importante dans les neurones et les cellules d'origine neuronale (Seubert et al, 1993). La caractérisation des substrats de la β-sécrétase, tous membranaires, a suggéré que l'enzyme porteuse de l'activité était soit transmembranaire soit fortement liée à la membrane (Citron et al, 1995). D'autres études ont ensuite montré que l'activité β-sécrétase est majoritairement active à pH acide, dans les compartiments subcellulaires de la voie de sécrétion, trans-Golgi compris, ainsi que dans les endosomes (Haass et al, 1995 ; Koo and Squazzo, 1994). Entre 1999 et 2000, pas moins de cinq groupes ont publié, presque en même temps, la découverte de l'enzyme impliquée dans la coupure β de la protéine βAPP (Hussain et al, 1999 ; Lin et al, 2000 ; Sinha et al, 1999 ; Vassar et al, 1999 ; Yan et al, 1999). BACE1 (Beta-site APP Cleaving Enzyme 1) est une aspartyl protéase transmembranaire de type 1. Elle est porteuse de la seule activité enzymatique capable de cliver la protéine βAPP au niveau du site β, cependant elle n'est pas responsable que de la coupure en 1 (en numérotation Aβ) mais aussi d'une coupure en 11, générant ainsi des peptides Aβ11-*x* (Vassar et al, 1999). A ce jour, aucune mutation directement impliquée dans le développement de la MA n'a pu être identifiée sur BACE1 (Cruts et al, 2001 ; Liu et al, 2003). Toutefois, il est maintenant établi que l'activité β-sécrétase augmente de façon significative dans les cerveaux de patients atteints de formes sporadiques d'Alzheimer (Fukumoto et al, 2002 ; Holsinger et al, 2002 ; Tyler et al, 2002). Cette élévation, dont la conséquence reste inconnue, est également observée dans le cerveau du vieillissement normal, chez la souris, le singe et l'humain non dément (Fukumoto et al, 2004).

III- Le clivage γ-sécrétase

Suite à l'action de la β- ou des α-sécrétases, les fragments C-terminaux C99 ou C83, ancrés à la membrane vont subir une protéolyse particulière : le clivage γ-sécrétase qui libère, pour la voie amyloïdogène deux peptides, le peptide amyloïde Aβ et sa contrepartie

intracellulaire AICD (Beta-APP Intracellular Domain) et pour la voie non-amyloïdogène deux peptides, le peptide p3 et sa contrepartie intracellulaire AICD. Cette activité protéolytique est portée par un complexe multimérique de haut poids moléculaire composé au minimum par quatre protéines transmembranaires : PS1 ou PS2 (présénilines), Aph-1 (Anterior pharynx defective-1), Pen-2 (Presenilin-enhancer-2) et NCT (nicastrine). L'activité γ-sécrétase est abolie lorsqu'une de ces quatre protéines est invalidée. Ainsi elles sont nécessaires et suffisantes pour obtenir un complexe fonctionnel (Edbauer et al, 2003). La stœchiométrie du complexe γ-sécrétase serait de 1 :1 :1 :1 pour chaque protéine (Kimberly et al, 2003 ; Sato et al, 2007 ; Osenkowski et al, 2009). Différents complexes γ-sécrétase sont possibles car il existe deux gènes présénilines (PS1 et PS2), deux gènes Aph-1 chez l'homme (Aph-1a et Aph-1b) et deux variants d'épissage pour Aph-1a (Aph-1aS et Aph-1aL) (Alzheimer's Disease Collaborative Group, 1995 ; De Strooper, 2003 ; Gu et al, 2003). Ces complexes ont probablement des spécificités concernant leurs substrats car les phénotypes des souris invalidées pour certaines sous-unités (PS1 *vs* PS2, ou Aph-1a *vs* Aph-1b) sont différents.

Les présénilines (PS1 et PS2) sont les deux enzymes qui constituent le cœur catalytique du complexe γ-sécrétase (Wolfe et al, 1999). Ce sont des protéines transmembranaires de 50 kDa homologues présentant 67% d'identité au niveau de leur séquence protéique. Elles sont ubiquistes et particulièrement importantes dans le cerveau (Lee et al, 1996). Au niveau subcellulaire, les présénilines (PS) sont exprimées majoritairement dans le RE et l'appareil de Golgi, mais une faible quantité a également été mise en évidence au niveau de la membrane plasmique. Leur structure exacte a longtemps été discutée mais la topologie maintenant admise est un modèle à 9 domaines transmembranaires exposant les extrémités amino- et carboxy-terminales et la boucle hydrophile située entre les domaines transmembranaires 6 et 7, dans le cytoplasme (Doan et al, 1996 ; Fortini, 2002). Elles vont ensuite subir, dans le RE (Kaether et al, 2004), un clivage endoprotéolytique (Thinakaran et al, 1996) engendrant deux fragments N-terminal et C-terminal respectivement de 28-30 et 18-20 kDa (Capell et al 2005 ; Kim et al, 2004). Ensemble ces deux fragments forment un complexe hétérodimérique biologiquement stable et fonctionnel (Capell et al, 1998).

La nicastrine (NCT) est une glycoprotéine transmembranaire de type 1 (Fortini, 2002), identifiée et clonée par co-immunoprécipitation avec les PS par l'équipe du Pr. P. St George-Hyslop. La NCT est colocalisée avec les PS dans le RE et l'appareil de Golgi. Elle possède un large ectodomaine subissant des glycosylations complexes durant sa maturation (Goutte et al, 2000 ; Yu et al, 2000). Elle interviendrait probablement en « reconnaissant » et fixant le substrat (Shah et al, 2005 ; Dries et al, 2009). L'invalidation de la NCT est létale chez la souris, avec un phénotype proche de l'invalidation des PS (Li et al, 2003). Aucune régulation transcriptionnelle n'a été rapportée à ce jour.

Aph-1 et Pen-2 sont des protéines exprimées dans le RE et l'appareil de Golgi, présentant respectivement 7 et 2 domaines transmembranaires (Fortini, 2002), qui ont été identifiées par criblage génétique. Elles interagissent fonctionnellement avec les PS et NCT dans la

régulation des activités de type γ-sécrétase dépendantes des PS (Francis et al, 2002 ; Goutte et al, 2000 ; Goutte et al, 2002 ; Steiner et al, 2002). Le rôle exact des protéines Aph-1 et Pen-2 dans le complexe γ-sécrétase n'est pas encore identifié mais elles pourraient être impliquées dans l'assemblage, la maturation, le transport ou la stabilisation du complexe.

Cependant, il semblerait qu'il existe aussi une activité γ-sécrétase indépendante des PS. En effet, des études mettent en évidence une production du peptide Aβ en absence des PS. En 2001, un laboratoire a pu observer la présence de peptide Aβ, produit à partir de la protéine βAPP endogène, dans le milieu intracellulaire ainsi que dans le milieu de sécrétion de cellules dépourvues de PS1 et PS2 (Armogida et al, 2001). Ces résultats ont été confirmés en 2002 avec la production d'Aβ40 et Aβ42 dans des cultures primaires de neurones corticaux dans lesquels les gènes codant pour les PS sont invalidés. L'équipe a montré que si la production d'Aβ40 et Aβ42 sécrétée est bien réduite en l'absence des PS, la production intracellulaire d'Aβ42 n'est, elle, pas affectée (Wilson et al, 2002). En 2004 une étude apporte la confirmation *in vivo* des précédents résultats. En effet, une réduction drastique de la production de peptide Aβ total a été observée dans les cerveaux de souris invalidées de façon conditionnelle pour PS1 (sur fond génétique PS2-/-). Cependant, une faible quantité de peptide Aβ42 demeure produite dans le cerveau de ces animaux, preuve d'une production *in vivo* de peptide Aβ par une activité γ-sécrétase indépendante des PS (Beglopoulos et al, 2004).

IV- Les fragments protéolytiques de la protéine βAPP

Comme décrit ci-dessus, les différents clivages de la protéine βAPP engendrent différents fragments au rôle tout aussi différent.

Le fragment AICD peut théoriquement être produit par les voies non- et amyloïdogènes mais il est majoritairement produit par la voie amyloïdogénique (Goodger et al, 2009 ; Belyaev et al, 2010 ; Flammang et al, 2012 ; Pardossi-Piquard and Checler, 2012). Selon le site de clivage de la γ-sécrétase sur la protéine βAPP, AICD peut avoir des longueurs différentes. Les espèces AICD50, AICD48 et AICD51 ont été détectées, la première forme étant majoritaire (Yu et al, 2001 ; Sato et al, 2003). Sa grande instabilité rend son étude difficile. AICD est rapidement clivé par la caspase-3, produisant le fragment C31 (Lu et al, 2000 ; Dumanchin-Njock et al, 2001). AICD est libéré dans le cytoplasme et transloque au noyau où il exerce des fonctions dans la signalisation nucléaire (Cao and Sudhof, 2001 ; von Rotz et al, 2004). AICD est stabilisé par la formation d'un complexe avec Fe65 et Tip60 et régule l'expression de gènes tels que la néprilysine, LRP1 (low density Lipoprotein Receptor-related Protein 1), p53, GSK-3β et le récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor) (Baek et al, 2002 ; Kim et al, 2003 ; Cao and Sudhof, 2004 ; Pardossi-Piquard et al, 2005 ; Alves da Costa et al, 2006 ; Liu et al, 2007 ; Zhang et al, 2007). AICD est impliqué dans de nombreuses fonctions, dont les homéostasies du calcium et de l'ATP (Hamid et al, 2007), la régulation du trafic intracellulaire et la dynamique du cytosquelette (Ghosal et al, 2009), la mort cellulaire

(Alves da Costa et al, 2006 ; Li et al, 2006) et la dégradation du peptide Aβ (Pardossi-Piquard et al, 2005 ; Pardossi-Piquard et al, 2006 ; Belyaev et al, 2009) contribuant à la MA (Pardossi-Piquard and Checler, 2012).

Le fragment sAPPα est un fragment neuroprotecteur de la protéine βAPP. Il permet la croissance neuritique, la synaptogénèse, l'adhésion cellulaire (Mattson, 1997 ; Gakhar-Koppole et al, 2008), c'est un facteur de croissance (Herzog et al, 2004 ; Siemes et al, 2006) qui régule la prolifération des cellules souches neurales (Ohsawa et al, 1999 ; Caillé et al, 2004), enfin il favorise l'apprentissage et la mémoire (Meziane et al, 1998 ; Taylor et al, 2008).

Le fragment C83 est le fragment membranaire résiduel, à l'inverse de sAPPα sécrété, de 83 acides aminés issu du clivage α-sécrétase. Il sera ultérieurement le siège du clivage par l'activité γ-sécrétase produisant le peptide p3 constitué de 23 à 25 acides aminés. De plus, le fragment C83 peut être issu du fragment C99. Contrairement à ce dernier, C83 n'est pas essentiel à la formation du peptide AICD (Flammang et al, 2012). Le fragment C83, produit par la voie non-amyloïdogénique, pourrait cependant être substrat des caspases pour produire le fragment C31 qui possède des fonctions toxiques.

Le fragment sAPPβ ne possède pas les effets bénéfiques du fragment sAPPα malgré la grande similitude dans leur séquence (Furukawa et al, 1996a ; Furukawa et al, 1996b). Ce fragment peut être clivé pour donner un fragment N-terminal ligand du DR6 (death receptor 6), qui active la caspase-6 et provoque la mort cellulaire (Nikolaev et al, 2009).

Le fragment C99 est le fragment transmembranaire, à l'inverse du fragment sAPPβ extracellulaire, constitué de 99 acides aminés. La nomenclature du peptide Aβ prend comme référence le fragment C99, ainsi Aβ1-40 contient les 40 premiers acides aminés de C99. L'activité γ-sécrétase sur le fragment C99 produit le peptide Aβ de 40 à 42 acides aminés. De plus, d'un point de vue enzymatique, le peptide AICD est produit préférentiellement à partir du fragment C99 (Flammang et al, 2012). En effet, le complexe γ-sécrétase possède une meilleure efficacité catalytique par le fragment C99 plutôt que C83.

2. 3 Le trafic de la protéine βAPP

La protéine βAPP est synthétisée dans le RE et incorporée à la membrane simultanément. βAPP subit ensuite un processus de maturation lors de son passage dans le RE et à travers l'appareil de Golgi pour atteindre le réseau trans-Golgien (TGN), là où βAPP serait le plus concentré dans les neurones à l'état basal. Une fois au niveau du TGN, servant de station de triage des protéines matures, βAPP est empaquetée dans des vésicules de la voie de sécrétion constitutive. Par cette voie, βAPP atteint la membrane plasmique, mais ne semble pas y demeurer longtemps puisqu'à l'état basal, la protéine βAPP de surface ne représente que 10% de la βAPP total (Thinakaran et Koo, 2008). À cet endroit, βAPP peut être clivée

dans la voie non amyloïdogénique ou encore internalisée via des vésicules de clathrine vers la voie endosomale (Nordstedt et al, 1993). Au niveau des endosomes précoces, βAPP peut emprunter quatre voies distinctes *(Figure 4)*. Premièrement, βAPP peut évoluer dans la voie endosomale vers le lysosome où une portion de βAPP est dégradée (De Strooper et Annaert, 2000 ; Lorenzen et al, 2010 ; Zhang et al, 2011). Deuxièmement, βAPP peut aussi être recyclée à la membrane plasmique via des vésicules de recyclage. Troisièmement, de l'endosome précoce, βAPP peut être transportée de façon rétrograde vers le TGN et enfin, βAPP peut aussi subir le clivage amyloïdogénique au niveau des endosomes tardifs. Les fragments produits sont ensuite sécrétés dans le milieu extracellulaire ou dégradés dans le lysosome (Peraus et al, 1997). La figure 4 résume l'ensemble du trafic intracellulaire de la protéine βAPP (Tang, 2009 ; Thinakaran et Koo, 2008 ; Turner et al, 2003 ; Zhang et al, 2011). De façon générale, la demi-vie de βAPP serait d'environ 45 à 65 minutes dans la plupart des types cellulaires (Selkoe, 2001).

Plusieurs protéines sont impliquées dans le transport intracellulaire de βAPP. En effet, la queue cytoplasmique de βAPP contenant entre autres un motif YENPTY (Perez et al, 1999) responsable de son internalisation, interagit avec plusieurs protéines adaptatrices impliquées dans le trafic intracellulaire. Ainsi, les résidus tyrosines phosphorylés dans ce motif et les régions de part et d'autre permettent à βAPP d'interagir avec les domaines PTB (phosphotyrosin binding) ou SH2 (Src-homology 2) des protéines adaptatrices impliquées dans son trafic. Parmi ces protéines adaptatrices impliquées dans l'exocytose ou l'internalisation de βAPP, on dénote entre autres, le complexe de protéines adaptatrices de clathrine AP-2 (adaptor protein-2), certains membres de la famille de protéines Mints (munc-18 interacting protein)/X11, les protéines Dab1/Dab2 (disabled), la famille de protéines Fe65 ainsi que les protéines Jip (JNK-interacting protein) (De Strooper et Annaert, 2000 ; Tang, 2009 ; Thinakaran et Koo, 2008 ; Wang et al, 2010 ; Zhang et al, 2011 ; Zhi et al, 2011). De plus, βAPP interagit aussi via ce même motif avec la protéine adaptatrice SNX17 (sorting nexin 17) qui intervient plutôt dans le trafic de βAPP au niveau des endosomes précoces et de son recyclage à la membrane (Lee et al, 2008). Dans tous les cas, il a été démontré que ces protéines interagissant avec βAPP peuvent avoir un effet sur son trafic et la production d'Aβ.

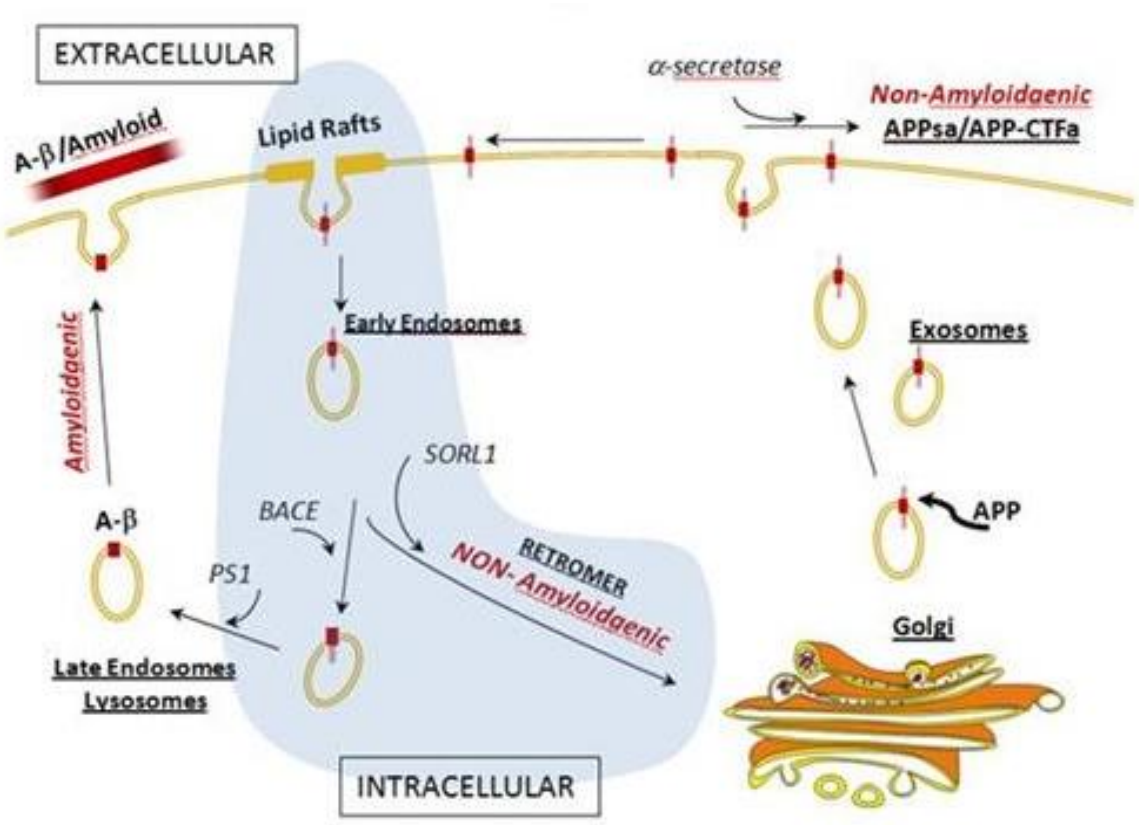

Figure 4 : le trafic intracellulaire de βAPP

De façon plus indirecte, certaines protéines adaptatrices de clathrine telles les GGA impliquées dans le transport entre le TGN et les endosomes, ainsi que certains membres du complexe rétromère (Small et al, 2005 ; Sullivan et al, 2011 ; Wang et al, 2010 ; Zhi et al, 2011), intervenant dans le transport rétrograde entre les endosomes et le TGN, influencent aussi le trafic intracellulaire de βAPP et son clivage en Aβ. Ensuite, le trafic de βAPP est aussi modulé par son interaction avec des récepteurs membranaires qui sont en partie responsables des effets indirects des protéines GGA et rétromères observés sur βAPP. Ainsi, βAPP est capable d'interagir avec certains membres de la famille des récepteurs de lipoprotéine de faible densité (LDLR ; low density lipoportein receptor) comme LRP1, LRP1B, ApoER2 et SorLA, dont il sera question un peu plus loin (Cam et Bu, 2006 ; Marzolo et Bu, 2009). Finalement, la phosphorylation de certains résidus serines/thréonines dans la queue cytoplasmique de βAPP participe à son trafic soit en stimulant sa sortie du TGN et son exocytose à la membrane ou encore son transport rétrograde des endosomes vers le TGN (Da Cruz E Silva et Da Cruz E Silva, 2003).

I- Le complexe rétromère

Les protéines adaptatrices GGA ainsi que les protéines du complexe rétromère jouent un rôle important dans le trafic intracellulaire non seulement de βAPP, mais aussi de BACE1, responsable du clivage β de βAPP et de la production d'Aβ au niveau des endosomes. De

plus, certains de ces acteurs dans le trafic de βAPP et de BACE1 pourraient être impliqués dans la pathogénèse de la MA, en favorisant la production d'Aβ et de cette manière contribuer au développement de la maladie.

Le complexe rétromère retrouvé à la surface cytosolique des endosomes est impliqué dans le transport rétrograde des endosomes vers le TGN de certaines protéines ou récepteurs cargo transmembranaires de type I. Les rétromères existent sous la forme d'un complexe hétéropentamérique constitué d'un dimère de protéines SNX (sorting nexin) et d'un trimère composé de Vps26, Vps29 et Vps35 (vacuolar protein sorting). Les dimères de SNX sont composés de différentes combinaisons non définies des SNX1, SNX2, SNX5 et SNX6. Vps35 forme le cœur du complexe, assurant le lien entre le récepteur cargo ou la protéine transportée et les autres membres du complexe rétromère (Bonifacino et Hurley, 2008). Les rétromères interagissent avec une famille de récepteurs contenant le domaine Vps10p (vacuolar protein sorting 10p) comprenant Sortiline, SorCS1, SorCS2, SorCS3 et SorLA. Les rétromères modulent le trafic rétrograde de βAPP directement ou indirectement via certains récepteurs capables de lier et d'affecter le trafic de la protéine βAPP comme SorLA (Small et Gandy, 2006 ; Small et al, 2005) ou SorCS1 (Lane et al, 2010). De plus, les rétromères sont aussi impliqués dans le transport rétrograde de BACE1 autant de façon directe qu'indirecte via, par exemple, les récepteurs SorLA (Spoelgen et al, 2006) ou Sortiline (Finan et al, 2011). Ainsi, en participant au transport rétrograde de βAPP et de BACE1, les rétromères permettent de restreindre le clivage amyloïdogénique et la production d'Aβ en éloignant βAPP et BACE1 des endosomes, où le clivage β s'effectue majoritairement. Plus précisément, il est connu que Vps35 et SNX6 régulent directement le trafic de βAPP et de BACE1, respectivement. Vps35 module positivement la phosphorylation de βAPP, essentielle pour son transport rétrograde vers le TGN, ainsi que sa demi-vie, puisque la phosphorylation de βAPP réduit son trafic vers le lysosome (Vieira et al, 2010). SNX6 a été retrouvé au sein d'un complexe avec BACE1 et module plutôt les niveaux de BACE1 intracellulaire et son transport rétrograde, puisqu'une réduction de SNX6 dans les neurones augmente le niveau basal de BACE1 ainsi que la production d'Aβ (Okada et al, 2010). Le trafic de BACE1 est aussi affecté par Vps26, car sa réduction entraîne une relocalisation de BACE1 au niveau de structures en périphéries cellulaires (He et al, 2005). Enfin, il est connu que le complexe rétromère est altéré dans le cerveau des patients atteints de la MA (Small et al, 2005). En effet, une réduction des niveaux protéiques de Vps26 et Vps35 a été observée, suggérant que les rétromères participent aussi à la pathogénèse de la MA (Small, 2008 ; Sullivan et al, 2011). Cette réduction aurait pour effets entre autre d'augmenter le temps de passage de βAPP dans les endosomes en réduisant le transport rétrograde de βAPP directement ou indirectement, et pourrait aussi favoriser la proximité de βAPP avec BACE1, participant de cette manière à l'augmentation de la production d'Aβ (Small, 2008 ; Small et al, 2005 ; Sullivan et al, 2011). Finalement, il a été démontré que l'altération de l'expression de Vps26 chez des souris entraîne des dysfonctions synaptiques au niveau de l'hippocampe, une

augmentation de la production d'Aβ et de la neurodégénérescence (Muhammad et al, 2008).

II- Les récepteurs de lipoprotéines de faibles densités

La famille des récepteurs de lipoprotéines de faibles densités LDLR (Low Density Lipoprotein Receptor) est constituée de protéines transmembranaires de type I qui se caractérisent entre autre par la capacité de tous ses membres à lier l'ApoE, impliquée dans le transport du cholestérol, et par l'homologie de certains domaines structuraux ou fonctionnels dans leur séquence. Cette famille inclus 10 membres soient LRP1 (ou LRP ; LDLR-related protein), LRP1B, Megalin (LRP2), LDLR, VLDLR (Very Low Density Lipoprotein Receptor), ApoER2 (Apolipoprotein E receptor 2 ou LRP8), LRP4 (MEGF7), LRP5, LRP6 et SorLA (Sorting-protein related receptor containing LDLR Class A repeats), en plus d'une nouvelle sous-famille plus récemment découverte et composée de 4 membres distincts LRP3, LRP12, LRP10 et Lrad3 (LDL receptor class A domain containing 3) *(Figure 5)*.

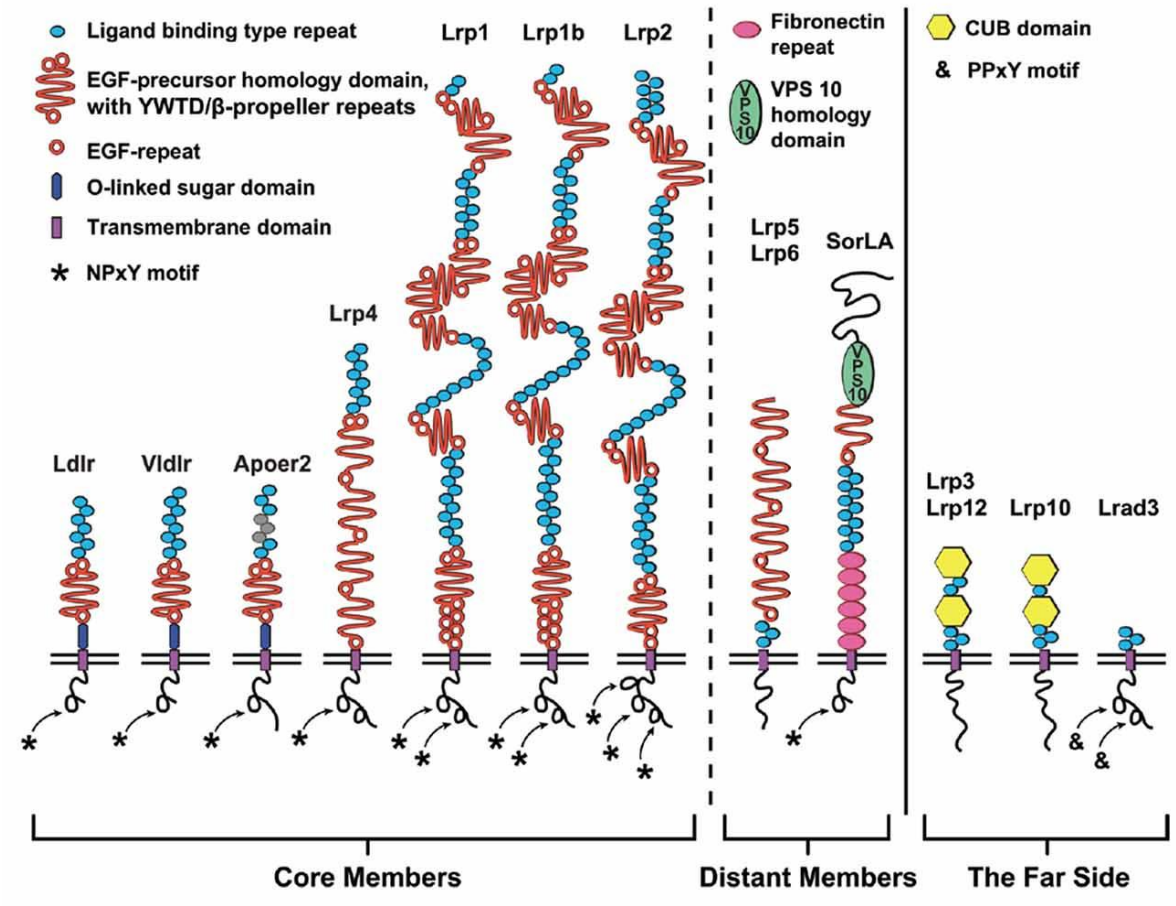

Figure 5 : représentation schématique des membres de la famille des LDLR.

La grande famille des LDLR joue plusieurs rôles importants dans la cellule, que ce soit en intervenant dans le métabolisme du cholestérol via le transport de l'ApoE, l'endocytose, la signalisation intracellulaire (survie cellulaire, apoptose), la plasticité synaptique ou le trafic

intracellulaire (Battle et al, 2003 ; Li et al, 2001 ; May et al, 2007). Puisque les LDLR constituent la classe majeure de récepteurs de l'ApoE, il est intéressant de se rappeler que l'ApoE existe sous 3 isoformes, soient ε2, ε3 et ε4 et que la présence de l'allèle ε4 représente un facteur de risque génétique pour la MA, corrélant avec une augmentation de l'Aβ intraneuronale (Christensen et al, 2010). De plus, tous les membres des LDLR semblent exprimés au niveau du cerveau et particulièrement dans les zones propices à l'accumulation de l'Aβ dans la MA. Parmi les récepteurs de la famille des LDLR, les récepteurs LRP1, LRP1B, ApoER2 et SorLA ont été identifiés comme partenaires d'interaction de la protéine βAPP capables de moduler son trafic intracellulaire *(Figure 6)*. Ainsi ces récepteurs interviennent de diverses manières dans le clivage de βAPP et la production d'Aβ. De plus, certains seraient même reliés génétiquement à la MA (Andersen et Willnow, 2006 ; Cam et Bu, 2006 ; Jaeger et Pietrzik, 2008 ; Marzolo et Bu, 2009).

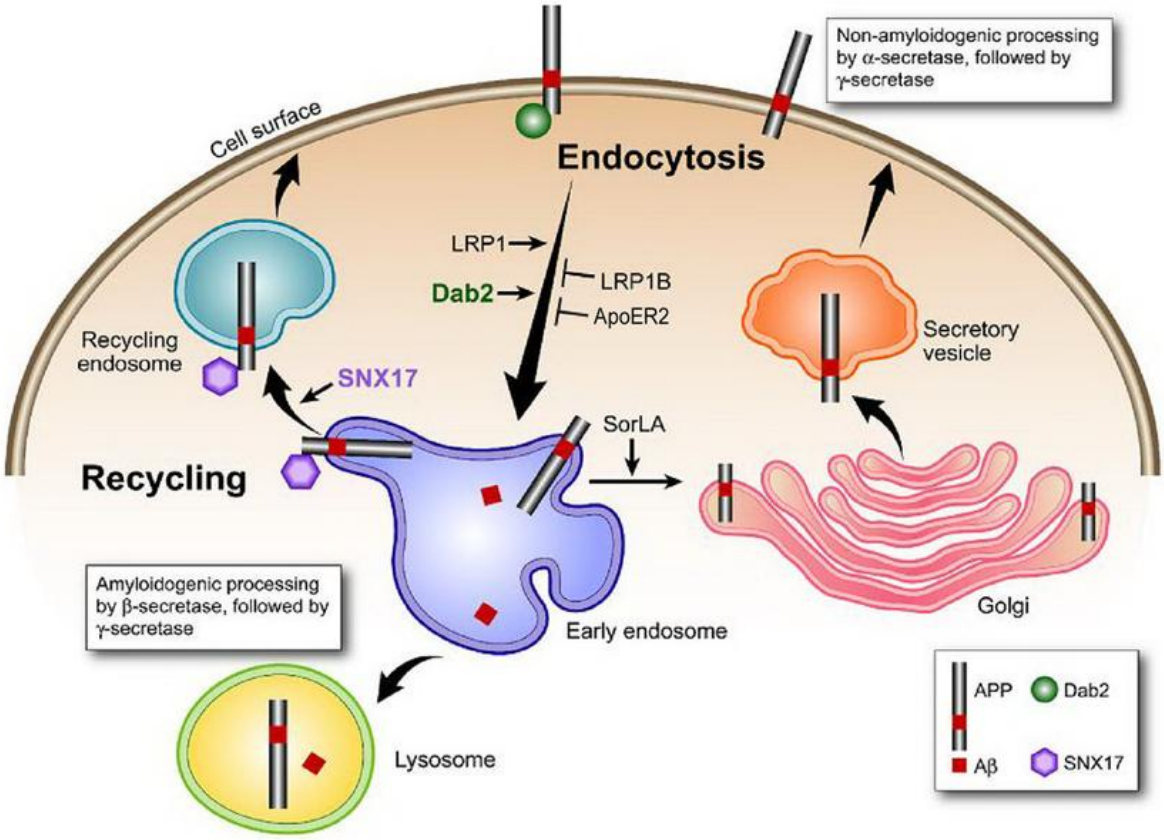

Figure 6 : différentes voies du processus de clivage de βAPP modulés par les membres de la famille LDLR.

L'endocytose très rapide du récepteur LRP1 favoriserait l'endocytose de βAPP vers les endosomes et du même coup la production d'Aβ. Alors que le rythme d'internalisation plus lent des récepteurs LRP1B et ApoER2 retiendrait βAPP à la surface. Bien que LRP1B favoriserait ainsi l'accessibilité de βAPP à la voie de clivage α, réduisant ainsi la production

d'Aβ, ApoER2 aurait aussi tendance à favoriser le clivage α, mais des effets divergents seraient aussi observés en fonction de son interaction avec ses différents ligands et protéines adaptatrices modulant son trafic. SorLA, effectuant un cycle entre le TGN et les endosomes, pourrait favoriser le transport rétrograde de βAPP des endosomes vers le TGN ou avoir un effet de rétention sur βAPP au niveau du TGN, réduisant son clivage β aux endosomes et le relargage d'Aβ. Les protéines adaptatrices Dab2 et SNX17 influenceraient aussi directement le trafic de βAPP.

3 - LE PEPTIDE AMYLOIDE Aβ

Le peptide amyloïde Aβ, d'un poids moléculaire de 4 kDa a été identifié, purifié et séquencé parallèlement par 2 équipes. D'une part, Glenner et Wong en 1984 ont isolé le peptide Aβ à partir de dépôts amyloïdes vasculaires de patients atteints de la MA (Glenner and Wong, 1994). D'autre part, l'équipe de Colin Master en 1985 a isolé ce même peptide Aβ à partir de plaques séniles issues aussi bien de patients Alzheimer que de patients atteints du syndrome de Down (Master et al, 1985). Les premiers anticorps dirigés contre le peptide Aβ ont rapidement été produits et utilisés pour marquer de façon spécifique les cerveaux de patients atteints de la MA. Le peptide amyloïde Aβ est en effet le composant majeur des plaques séniles et près de 70% des protéines composant une plaque sénile possèdent la séquence du peptide Aβ (Miller et al, 1993). Ces premières observations mettant le peptide Aβ au centre des lésions pathologiques de la MA, ont conduit Hardy J.A. et Higgins G.A. à émettre l'hypothèse amyloïde selon laquelle l'accumulation et l'agrégation du peptide Aβ serait la principale cause des dysfonctionnements neuropathologiques rencontrés dans la MA (Hardy and Higgins, 1992). Depuis les années 1990, de nombreuses études portant sur le peptide amyloïde Aβ, sur sa structure et sa fonction, ont vérifié cette hypothèse en apportant toujours une pierre de plus à l'édifice dont le but principal est de comprendre les mécanismes moléculaires responsables de ces dysfonctionnements.

3. 1 Les différentes espèces de peptide amyloïde Aβ

Dans les dépôts amyloïdes et les cellules, les différentes espèces de peptide amyloïde varient par leur longueur et leurs propriétés biochimiques. Outre les formes majoritairement produites Aβ40 et Aβ42, des espèces de différentes longueurs et des espèces tronquées en N-terminal sont décrites (Iwatsubo et al, 1996 ; Thal et al, 1999 ; Takeda et al, 2004). Le clivage de la protéine βAPP par la γ-sécrétase est séquentiel (Qi-Takahara et al, 2005 ; Kakuda et al, 2006 ; Yagishita et al, 2008). Le premier clivage est effectué près du côté cytoplasmique de la membrane. Ce clivage appelé ε libère AICD et Aβ48 ou Aβ49 (Gu et al, 2001 ; Weidemann et al, 2002). Ces longs peptides Aβ seraient ensuite raccourcis par des clivages γ successifs qui diminueraient l'hydrophobicité du peptide et augmenteraient la probabilité de sa libération dans l'environnement extracellulaire (Takami et al, 2009). Les propriétés biophysiques du peptide Aβ varient selon sa longueur. La forme Aβ42 est plus

hydrophobe que les autres, elle tend à s'agréger plus fortement (Burdick et al, 1992 ; Jarrett et al, 1993 ; Jarrett and Lansbury, 1993). Plutôt que les niveaux totaux de peptide Aβ, c'est le ratio Aβ42/Aβ40 qui influence fortement les effets biologiques du mélange de peptides Aβ (Kuperstein et al, 2010). Le peptide amyloïde synthétisé sous forme monomérique soluble s'agrège rapidement en oligomères, protofibrilles puis fibrilles. Certaines de ces formes sont plus toxiques que les autres.

3.2 Les fonctions physiologiques du peptide amyloïde Aβ

Le peptide amyloïde Aβ est un métabolite physiologique du clivage de la protéine βAPP dans les neurones (Haass et al, 1992) et pourrait avoir de nombreuses fonctions physiologiques. Il modulerait la viabilité neuronale (Plant et al, 2003 ; Giuffrida et al, 2009), protègerait contre les toxicités du glutamate et de l'acide N-methyl-D-aspartique (Baba et al, 2003 ; Giuffrida et al, 2009), contrôlerait l'excitabilité neuronale (Kamenetz et al, 2003) et réduirait les dommages oxydatifs (Nunomura et al, 2001 ; Zou et al, 2002 ; Atwood et al, 2003). De récents travaux montrent qu'il présente des propriétés de facteur de transcription (Bailey et al, 2011 ; Maloney and Lahiri, 2011). De plus, de très faibles doses de peptide Aβ, de l'ordre du picomolaire, pourraient moduler positivement la plasticité et la mémoire en augmentant la potentialisation à long terme (Morley et al, 2010 ; Puzzo et al, 2008). Une fois sécrété, le peptide Aβ pourrait se lier à des récepteurs cellulaires. Plusieurs récepteurs ont été identifiés, dont la protéine prion cellulaire (PrPc) à laquelle Aβ se fixe sur l'ectodomaine (Lauren et al, 2009 ; Kessels et al, 2010). Aβ se fixe également sur les récepteurs glutamatergiques NMDA et AMPA, ce qui régule ses effets sur la plasticité synaptique (Snyder et al, 2005 ; Rui et al, 2010). Enfin, l'Aβ « full-length », qui n'est pas tronqué en N-terminal et donc dont le premier résidu est l'acide aspartique, pourrait avoir une fonction neuroprotectrice. En effet, l'inhibition de l'enzyme aminopeptidase A (APA), qui dégrade l'extrémité N-terminale du peptide Aβ, diminue l'activation de la caspase-3, associée au traitement à la staurosporine, dans des cellules HEK293 transfectées mock ou des fibroblastes sauvages qui présentent toutes les deux des niveaux endogènes d'Aβ (Sevalle et al, 2009).

3.3 Localisation du peptide Aβ

Jusqu'au milieu des années 90, les études faites sur la production du peptide Aβ suggéraient une localisation du peptide Aβ essentiellement extracellulaire. En effet, aucune immunoréactivité de type Aβ n'avait été mise en évidence à l'intérieur de la cellule, et le peptide Aβ ne se visualisait qu'au niveau des plaques séniles extracellulaires. La production du peptide Aβ intracellulaire a été mise en évidence pour la première fois par Wertkin et collaborateurs en 1994 à partir d'homogénat de cellules neuronales en culture (Wertkin et al, 1993). Celle-ci a ensuite été confirmée par de nombreuses équipes (Greenfield et al, 1998 ; Martin et al, 1995 ; Tienari et al, 1997 ; Wild-Bode et al, 1993) et sa contribution dans

les dysfonctionnements pathologiques de la MA s'est révélée déterminante (Glabe, 2001). En effet, la présence spécifique du peptide Aβ42 intracellulaire a été mise en évidence dans des neurones hippocampiques d'individus présentant les symptômes cliniques prédémentiels ou démentiels (Gouras et al, 2000). De plus, l'équipe du Pr. J-N. Octave associe la mort neuronale observée dans des cellules surexprimant la protéine βAPP à une production du peptide Aβ42 intracellulaire (Kienlen-Campard et al, 2002). De la même manière, Zhang et collaborateurs montrent que l'incubation de cultures primaires neuronales avec une solution de peptide Aβ40 ou Aβ42 n'a aucun effet sur la viabilité des cellules, et seule une micro-injection dans ces mêmes cellules de peptide Aβ42 (mais pas d'Aβ40) sous forme fibrillaire ou non fibrillaire induit une forte mortalité neuronale dépendante des effecteurs pro-apoptotiques que sont les protéines Bax et p53 (Zhang et al, 2002). Il semblerait également que l'oligomérisation du peptide Aβ se fasse à l'intérieur de la cellule (Walsh et al, 2000). Pour finir, une étude publiée dans *Neuron* met en évidence une forte corrélation entre la production de peptide Aβ intracellulaire et l'apparition des premiers troubles cognitifs chez la souris transgénique 3xTgAD (Billings et al, 2005).

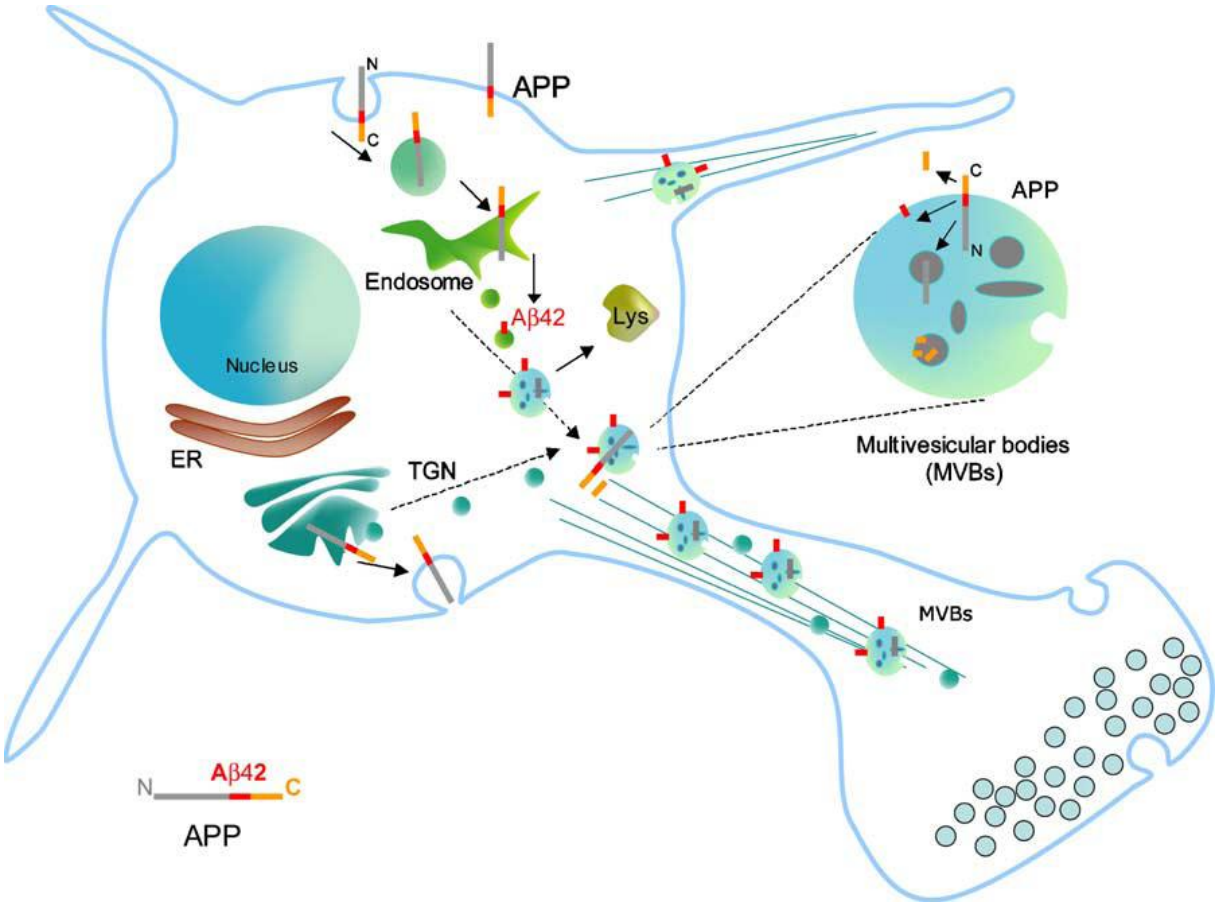

Figure 7 : hypothèse proposée par Gouras et collaborateurs

Ainsi, l'une des hypothèses proposées par Gouras et collaborateurs est une accumulation précoce et progressive du peptide Aβ intracellulaire dans des corps vésiculaires neuronaux (Multivesicular bodies, MVBs) qui altèrerait le transport axonal des organelles ce qui

engendrerait un dysfonctionnement synaptique important avant même la sécrétion du peptide Aβ extracellulaire *(Figure 7)* (Gouras et al, 2005). Cette hypothèse mettant au premier plan la neurotoxicité de la production du peptide Aβ42 intracellulaire expliquerait aussi la mauvaise corrélation existant entre le déclin cognitif et l'apparition des plaques séniles.

4 - LA PROTEINE SorLA DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER

SORL1 (sortilin-related receptor, L (DLR clasA)) est un gène situé sur le bras long du chromosome 11. Il code pour une protéine transmembranaire SorLA de 250 kDa exprimée dans les neurones du système nerveux périphérique et central (*Figure 8*). Le récepteur SorLA est un membre un peu moins apparenté au reste de la famille des LDLR, non seulement au niveau de sa structure, mais aussi de sa localisation et son trafic intracellulaire. Dans sa structure SorLA ne possède pas de domaine homologue au récepteur EGF dans sa région luminale, mais possède plutôt un domaine Vps10p (vacuolar protein sorting 10p) et des répétitions d'un domaine fibronectine III (FNIII) (Cam et Bu, 2006). Les autres membres de la famille du récepteur Vps10p sont la sortiline (Petersen et al, 1997), SORCS-1 (sortilin related VPS10 domain containing receptor 1) (Hermey et al, 1999), SORCS-2 (Rezgaoui et al, 2001) et SORCS-3 (Hampe et al, 2001). Leur motif structural commun, le domaine Vps10p, est un domaine de liaison, identifié pour la première fois chez la levure (Marcusson et al, 1994). Les séquences de ces domaines Vps10p et leurs profils d'expression varient considérablement entre les membres de cette famille (Westergaard et al, 2004) suggérant différentes fonctions de ces récepteurs (Willnow et al, 2008).

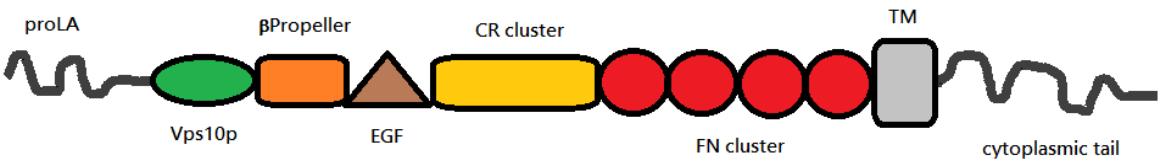

Figure 8 : la protéine SorLA

Contrairement aux autres membres de la famille LDLR majoritairement retrouvés à la surface cellulaire, SorLA serait retrouvé principalement au niveau du réseau trans-golgien et des endosomes et dans une moins grande proportion à la membrane plasmique. En fait, ce récepteur nouvellement synthétisé se dirige du réseau trans-golgien vers la membrane plasmique via la voie constitutive, pour ensuite être rapidement internalisé vers les endosomes précoces et, sans atteindre les endosomes tardifs, retournerait rapidement vers le réseau trans-golgien (Willnow et al, 2010). Par la suite, SorLA effectuerait des cycles entre le réseau trans-golgien et les endosomes (Andersen et al, 2005 ; Jacobsen et al, 2001) grâce à son interaction avec les protéines adaptatrices GGA (Golgi-localized, γ-ear-containing, Arf

(ADP-ribosylation factor) - binding protein) (Jacobsen et al, 2002) et le complexe rétromère (Rogaeva et al, 2007).

Il est connu que SorLA est capable d'interagir avec βAPP ainsi que BACE1 et d'en moduler le trafic intracellulaire (Andersen et al, 2006 ; Spoelgen et al, 2006). SorLA joue un rôle clé dans le métabolisme de βAPP en le redirigeant de la membrane cellulaire (où a lieu la voie amyloïdogénique) vers l'appareil de Golgi permettant donc son recyclage. Ainsi l'utilisation de cette voie métabolique permet une réduction de l'amyloïdogénèse. De plus, il a été montré que SorLA permettrait de rediriger les peptides Aβ vers le compartiment lysosomial et permettrait ainsi de réduire son accumulation. En somme, via 2 mécanismes, SorLA aurait un rôle protecteur en permettant de réduire la production de peptides Aβ, évènement central dans la pathogénèse de la MA (Andersen et al, 2005 ; Rogaeva et al, 2007 ; Dodson et al, 2008). De plus, l'interaction de SorLA avec BACE1 peut faire compétition avec βAPP, réduisant le niveau d'interaction entre βAPP et BACE1 (Spoelgen et al, 2006). SorLA est aussi clivé par la γ-sécrétase, faisant compétition une fois de plus avec βAPP pour son clivage (Marzolo et Bu, 2009 ; Nyborg et al, 2006). Il a également été rapporté que le trafic de βAPP par SorLA peut être modulé par l'interaction de ce dernier avec les GGA (Schmidt et al, 2007) et les protéines du complexe rétromère (Small et Gandy, 2006 ; Small et al, 2005). SorLA agit donc à titre de récepteur de triage de la protéine βAPP pouvant potentiellement être impliqué dans la MA (Andersen et al, 2005 ; Schmidt et al, 2007 ; Shah et Yu, 2006 ; Small et Gandy, 2006 ; Willnow et al, 2010).

Une réduction de l'expression de SorLA dans les neurones, mais pas dans la glie, de cerveaux de patients souffrant de la MA, a été montré, sans que cela puisse être interprété comme une conséquence de la pathologie puisque son expression n'était pas modifiée dans les cas liés à une mutation de PS1 (Reitz et al, 2011). Il est connu que le niveau d'expression de SorLA est réduit dans la forme sporadique de la MA (Dodson et al, 2006 ; Scherzer et al, 2004) tout comme celui des GGA et des protéines du complexe rétromère. Donc la perte de l'effet protecteur de SorLA provoquerait l'augmentation du clivage de βAPP et de la production d'Aβ (Dodson et al, 2008). De récentes études ont montré que certains variants, entrainant une perte de fonction du gène, étaient considérés comme facteur de risque de survenue d'une MA (Rogaeva et al, 2007 ; Reitz et al, 2011). Ces derniers ont également été retrouvés dans les cas de MA précoce, d'autant plus s'il existe des antécédents familiaux au premier degré avec respectivement un OR (odds ratio, rapport des chances) à 5.03, $IC_{95\%}$ (intervalle de confiance à 95%) [2.02-14.99] et 8.86, $IC_{95\%}$ [3.35-27.31] pour une fréquence cumulée dans une population contrôle de 0.6% (Nicolas et al, 2016a et 2016b). Ainsi, des polymorphismes (SNP) retrouvés dans le gène de SORL1 ont été directement associés au développement de la MA et ainsi, il représente un facteur de risque de la maladie (Rogaeva et al, 2007).

5 - OBJECTIFS

La protéine SorLA, appartenant à la famille de la sortiline, a été décrite pour la première fois en 1997. Ces travaux, réalisés à partir d'autopsies de cerveaux humains, suggèrent l'importance de la protéine dans cet organe. Dix ans plus tard, en 2007, une association entre des variants génétiques de SORL1 (mutations ou polymorphismes nucléotidiques simples « SNPs ») et des formes familiales tardives de maladie d'Alzheimer (MA) a été décrite. Entre 1997 et 2007, plusieurs chercheurs proposent que SorLA soit engagée dans le recyclage par endocytose de la protéine βAPP.

La βAPP joue un rôle clé dans la formation du peptide bêta-amyloïde, qui s'accumule dans les plaques séniles dans la MA.

En 2012, l'étude du génome par séquençage complet de 14 patients atteints de la MA a permis de découvrir 7 mutations du gène SORL1 *(Figure 9)* dans certaines formes précoces de la MA. La réduction d'expression du récepteur SorLA dans la MA, exprimé plus particulièrement dans les neurones du système nerveux central et périphérique, serait associée à la surproduction du peptide Aβ.

Table 1 Unknown mutations identified in the *SORL1* gene

Patients ID	*cDNA level change*	*Protein level change*	*GERP score*	*Grantham score*	*Pathogenicity (MutationTaster)*	*Pathogenicity (PolyPhen2)*	*Pathogenicity (SIFT)*	*Segregation*	*Protein domain*
ALZ 426	c.422A>G	Tyr141Cys	5.4	194	Disease-causing (0.89)	Probably damaging (1)	Deleterious (0.04)	N.A.	VPS10p
EXT 049	c.1531G>C	Gly511Arg	5.44	125	Disease-causing (0.85)	Probably damaging (1)	Deleterious (0.00)	Yes	VPS10p
EXT 181	c.2771A>G	Asn924Ser	5.53	46	Disease-causing (0.81)	Benign (0.332)	Tolerated (0.15)	N.A.	LDLR, YWTD repeat
EXT 077	c.4073A>G	Asn1358Ser	−3.43	46	Disease-causing (0.56)	Benign (0.01)	Tolerated (0.27)	N.A.	LDLR, class A repeats
EXT 050	c.4434C>A	Cys1478X	1.37	N.A.	Disease-causing (1)	N.A.	N.A.	N.A.	LDLR, class A repeats
ALZ 244	c.5042G>A	Gly1681Asp	5.77	94	Disease-causing (0.63)	Probably damaging (1)	Deleterious (0.00)	N.A.	Fibronectin-type III repeats
EXT 017	c.5463G>A	Trp1821X	5.91	N.A.	Disease-causing (1)	N.A.	N.A.	N.A.	Fibronectin-type III repeats

Abbreviations: GERP, Genomic Evolutionary Rate Profiling; LDLR, low-density lipoprotein receptor; N.A., not applicable.

Figure 9 : les mutations identifiées sur le gène SORL1

Au cours de mon projet de recherche dans le cadre du diplôme de l'EPHE « Sciences de la Vie et de la Terre », j'ai étudié les conséquences biologiques et fonctionnelles de différentes mutations du gène SORL1 sur le métabolisme de la protéine βAPP.

6 - MATERIEL ET METHODES

6.1 CONSTRUCTIONS ET MUTAGENESE DIRIGEE

L'ADNc de SORL1 sauvage humain, cloné dans le vecteur pcDNA3.1 (+), nous a été donné par le Dr Peter St George-Hyslop (Toronto, Canada). Un kit de mutagénèse dirigée de Stratagene (QuikChange II) et des amorces de mutagénèse (Eurogentec) ont été utilisés en suivant les instructions du fabricant pour convertir l'ADNc de SORL1 sauvage en différentes formes mutées. Les mutants 422 (SorLA^{141}), 1531 (SorLA^{511}) et 2771 (SorLA^{924}) de SORL1 ont été générés par substitution de l'adénine en guanine en position 422, de la guanine en cytosine en position 1531 et de l'adénine en guanine en position 2771. Ces mutations de SORL1 sont

responsables de la MA à prédominance autosomique dominante (Pottier et al, 2012). Toutes les constructions ont été vérifiées par séquençage.

6.2 CULTURE CELLULAIRE ET TRANSFECTION

Les cellules HEK293 (Human Embryonic Kidney 293) exprimant βAPP sauvage (APP-WT) ou βAPP portant la mutation suédoise $APP_{670/671}$ (APP-SWE) sont cultivées dans le milieu DMEM (Invitrogen) + 10% SVF (sérum de veau fœtal, Sigma) + antibiotiques (50U/ml pénicilline – 50μg/ml streptomycine, Invitrogen), 5% CO2, 37°C. Quand les cellules ont atteint 80% de confluence, l'ADNc de SORL1 sauvage ou muté est transitoirement transfecté (24h) en utilisant le réactif jetPRIME (Polyplus) (2μg d'ADNc pour un diamètre 35 mm (plaque 6 puits) ou 10μg d'ADNc pour un diamètre 100 mm). Pour observer les effets du NH4Cl (altération du pH lysosomal, blocage de l'autophagie) sur le métabolisme de βAPP, les cellules sont traitées avec 10mM, 16h, 37°C. Pour observer les effets de la lactacystine (inhibiteur spécifique de l'activité catalytique du protéasome) sur le métabolisme de βAPP, les cellules sont traitées avec 5μM, 16h, 37°C. Pour observer les effets de la pifithrine-α (inhibiteur de l'activité de transcription de p53) sur le métabolisme de βAPP, les cellules sont traitées avec 10μM, 16h, 37°C.

6.3 IMMUNOPRECIPITATION D'Aβ SECRETE

Les cellules HEK293 surexprimant βAPP sauvage ou βAPP portant la mutation suédoise sont cultivées en plaques 6 puits jusqu'à atteindre 80% de confluence. La sécrétion de peptides Aβ se fait sur 16h dans le milieu OptiMEM (1ml, Invitrogen) + 1% SVF (Sigma) en présence de phosphoramidon (10μM, Sigma) afin de prévenir la dégradation d'Aβ par la néprilysine. Le milieu est collecté, complété avec un dizième de tampon RIPA 10X (Tris-HCl pH 8.0, 100mM) contenant du NaCl (1.5M), de l'EDTA (50mM) et incubé sur la nuit avec l'anticorps monoclonal 6E10 (1/100ème, anti-Aβ, épitope sur les acides aminés 3-8 du peptide, BioLegend) et des billes d'agarose couplées à la protéine A (Invitrogen). Les billes sont ensuite lavées deux fois avec du RIPA 1X et déposées sur gel de polyacrylamide Tris/Tricine 16.5%. Les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose et incubées sur la nuit avec l'anticorps primaire monoclonal 6E10 (1/1000ème). Les complexes immunologiques Aβ-6E10 sont détectés avec un anticorps secondaire de chèvre anti-souris conjugué à la péroxydase (1/2000ème). La chimioluminescence est mesurée en utilisant un système d'imagerie biomoléculaire, l'ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) et les quantifications sont réalisées en utilisant le logiciel Multi Gauge v3.0.

6.4 DOSAGES DE γ-SECRETASE IN VITRO

Les cellules sont cultivées en diamètre 100 mm jusqu'à 80% de confluence, transfectées 24h, collectées et utilisées pour un dosage γ-sécrétase in vitro comme décrit auparavant (Sevalle et al, 2009). Brièvement, les cellules sont lysées avec du Tris 10mM pH7.5 et les membranes

sont isolées par centrifugation (22000g, 1h). Une quantité égale de protéines membranaires est incubée sur la nuit avec la protéine recombinante C100-FLAG qui mime la séquence de βAPP ciblée par la γ-sécrétase. Les produits de clivage Aβ et AICD-FLAG sont détectés par immunoempreinte sur gel de polyacrylamide Tris/Tricine 16.5% et révélés simultanément avec l'anticorps anti-Aβ 2H3 et l'anticorps anti-FLAG, respectivement.

6.5 IMMUNOEMPREINTE

SorLA, la néomycine, βAPP, sAPPα, les fragments C-terminaux CTF, PS1, PS2, Aph1, Pen2, NCT et la β-tubuline sont séparés sur gels de polyacrylamide Tris/Glycine (8 à 12%) ou gels Tris/Tricine (16.5%). Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose Hybond-C (GE Healthcare) puis incubées avec les anticorps primaires suivants : anti-SorLA (antibodies-online), anti-néomycine (Abcam), 22C11 (anti-Nter de βAPP), Br188 (anti-Cter de βAPP), 2H3 (anti-Aβ, épitope sur résidus 1-12 d'Aβ humain), anti-PS1 Nter (Paul Fraser, Toronto), anti-loop PS2 (Gopal Thinakaran, Chicago), anti-Aph1 (Paul Fraser, Toronto), anti Pen2 (Covance), anti-nicastrine (Sigma) et anti-tubuline (Sigma). Les complexes immunologiques sont révélés avec les anticorps secondaires anti-souris ou lapin couplés à la péroxydase (Interchim) puis par chimioluminescence.

6.6 MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA NEPRILYSINE

Les cellules sont collectées 24h après transfection et lysées avec du Tris 10mM pH7.5, puis les homogénats sont testés pour leur activité néprylisine (NEP) comme décrit auparavant (Pardossi-Piquard et al, 2005). Brièvement, les échantillons (50μg de protéines) sont incubés dans un volume final de 100μl contenant le substrat de NEP (Suc-Ala-Ala-Phe-7AMC, 20μM, Sigma) en absence ou en présence de l'inhibiteur phosphoramidon (10μM, Sigma). L'activité de NEP correspond à la fluorescence sensible au phosphoramidon enregistrée à 390 nm (excitation) et 460 nm (émission).

6.7 MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE BACE1

Les cellules sont collectées 24h après transfection et lysées avec du Tris 10mM pH7.5, puis les homogénats sont testés pour leur activité BACE1 comme décrit précédemment (Andrau et al, 2003). Brièvement, les échantillons (30μg de protéines dans 25mM de tampon acétate pH4.5) sont incubés dans un volume final de 100μl du tampon acétate décrit ci-dessus contenant le sustrat de BACE1 ((7-methoxycoumarin-4-yl) acetyl-SEVNLDAEFRK(2,4-dinitrophenyl)-RR-NH2, 10μM, R&D Systems) en absence ou en présence de l'inhibiteur I de β-sécrétase (50μM,PromoCell). L'activité de BACE1 correspond à la fluorescence sensible à l'inhibiteur de β-sécrétase enregistrée à 320 nm (excitation) et 420 nm (émission).

6.8 MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE L'α-SECRETASE SUR CELLULES INTACTES

Les cellules HEK293 sont cultivées en diamètre 35 mm (plaque 6 puits) jusqu'à 80% de confluence. Après 24h de transfection transitoire, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS 1X (phosphate-buffered saline) et prétraitées pendant 30mn à 37°C avec 1ml de PBS1X avec ou sans l'inhibiteur o-Phenanthroline (100μM). Ensuite, le JMV2770, substrat de l'α-sécrétase (10μM), est directement ajouté sur les cellules en culture pour différentes périodes à 37°C. A la fin de chaque période d'incubation, 100μl de milieu sont collectés et la fluorescence est mesurée en plaque 96 puits à 320 nm (excitation) et 420 nm (émission). Après le dernier temps d'incubation, les cellules sont resuspendues dans un tampon de lyse (Tris/HCl 10mM pH7.5, NaCl 150mM, Triton X-100 0.5%, deoxycholate 0.5% et EDTA 5mM), la concentration des protéines est mesurée par la méthode de Bradford, et toutes les valeurs fluorimétriques sont normalisées par rapport à la quantité de protéines dans les échantillons.

6.9 MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA CATHEPSINE B IN VITRO

Les cellules HEK293 sont lysées mécaniquement dans un tampon d'homogénéisation (sucrose 250mM, EDTA 1mM, Hepes 5mM pH7.4) en utilisant d'abord un homogénéiseur de Dounce et ensuite une seringue. La suspension cellulaire est centrifugée 5min à 850g puis le surnageant est centrifugé 90mn à 20000g. Le culot (fraction enrichie en membranes) est resuspendu dans du Tris/HCl (10mM, pH 7.5) et les échantillons sont équilibrés à 6μg/μl avant l'analyse. Pour mesurer l'activité enzymatique de la cathepsine B, les échantillons (60μg d'extrait protéique) sont incubés dans un volume final de 100μl de tampon acétate (25mM pH5.5) + L-cystéine HCl (8mM) contenant le substrat de la cathepsine B (Na-CBZ-Arg-Arg-7-Amido-4-methylcoumarin ; [CBZ = carbobenzozy] (Z-Arg-Arg-AMC) 100μM, Sigma) en absence ou en présence de leupeptine (10μM, Sigma). L'activité spécifique de la cathepsine B correspond à la fluorescence sensible à la leupeptine enregistrée à 320 nm (excitation) et 420 nm (émission) en utilisant un lecteur de plaques à fluorescence (FLUOstar Omega, BMG Labtech, France). La fluorecence est mesurée toutes les 5 min pendant 150 min et l'activité de la cathepsine B est calculée dans la partie linéaire de la courbe correspondant aux 30 premières minutes.

6.10 TECHNIQUE ELISA EN SANDWICH SUR L'Aβ SECRETE ET INTRACELLULAIRE

Les cellules sont cultivées en plaques 6 puits jusqu'à atteindre 80% de confluence. La sécrétion de peptides Aβ se fait sur 16h dans le milieu OptiMEM (1ml, Invitrogen) + 1% SVF (Sigma) en présence de phosphoramidon (10μM, Sigma) afin de prévenir la dégradation d'Aβ par la néprilysine. Pour mesurer la quantité de peptides Aβ en intracellulaire, les cellules sont lysées avec du RIPA 1X. Les niveaux d'Aβ 1-40 et 1-42 sont mesurés en utilisant les kits ELISA Aβ 1-40 et 1-42 humain (Invitrogen), selon les instructions du fabriquant. Brièvement, un anticorps monoclonal spécifique du N-ter de l'Aβ humain recouvre les puits des barettes de microtitration fournies (12 barettes de 8 puits = 96 tests possibles). Les standards, contrôles et échantillons sont co-incubés avec un anticorps de lapin spécifique du C-ter de

l'Aβ 1-40 ou 1-42. L'anticorps de lapin lié est détecté par l'utilisation d'un anticorps anti-lapin marqué à la péroxydase de raifort. Une solution de substrat est ajoutée, sur laquelle agit l'enzyme liée pour produire de la couleur. L'intensité de ce produit coloré est directement proportionnelle à la concentration d'Aβ 1-40 ou 1-42 humain présente dans l'échantillon original. La quantité minimale détectable d'Aβ 1-40 est < 6pg/ml et < 10 pg/ml pour Aβ 1-42.

6.11 ANALYSES STATISTIQUES

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel PRISM (logiciel Graph-Pad, San Diego) en utilisant le test t de Student non apparié pour les comparaisons par paires avec application de la distribution Gaussienne pour utiliser un test paramétrique.

7 - RESULTATS

Sept mutations sur le gène SORL1 codant pour la protéine SorLA ont été décrites comme impliquées dans les formes précoces de la MA autosomique dominante (Pottier et al, 2012). Nous avons examiné en profondeur l'influence de trois de ces septs mutations sur la maturation physiopathologique de βAPP, responsables de pathogénicités soit bénigne (Asn924Ser, SorLA^{924}), soit délétères (Tyr141Cys, SorLA^{141} et Gly511Arg, SorLA^{511}).

7.1 Expression et devenir des mutants de la protéine SorLA dans les cellules exprimant APPwt et APPswe

Parce qu'il a été décrit que la protéine SorLA est impliquée dans le trafic lysosomal de βAPP (Andersen et al, 2005) et parce que la forme APP-WT a un trafic différent de la forme APP-SWE (Haass et al, 1995), nous avons examiné l'influence de mutations du gène SORL1 sur la maturation physiopathologique de βAPP dans les cellules HEK293 exprimant APP-WT et APP-SWE. Dans un premier temps, nous avons évalué l'expression de SorLA sauvage (SorLA^{WT}) et de ses mutants (SorLA^{141}, SorLA^{511} et SorLA^{924}) après une transfection transitoire de l'ADNc de SORL1 sauvage ou muté. Nous montrons que l'expression (*Figure 10*) de SorLA^{WT}, SorLA^{511} et SorLA^{924} est la même dans les cellules HEK293 APP-WT et APP-SWE alors que l'on ne détecte pas SorLA^{141}.

Figure 10 : expression de SorLA dans les HEK293 APP-WT et APP-SWE

L'absence de détection de SorLA^{141} n'est pas due à une mauvaise transfection comme l'indique l'expression (*Figure 11*) efficace et homogène de la néomycine.

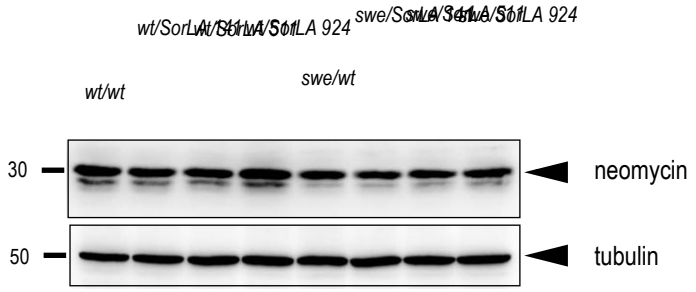

Figure 11 : expression de la néomycine après transfection des constructions SORL1

Ainsi, nous envisageons la possibilité que l'absence d'expression de SorLA^{141} peut être liée à son instabilité en raison de sa rapide dégradation comme nous l'avons précédement montré pour certains mutants de la protéine Parkin (da Costa et al, 2009). La lactacystine, un inhibiteur du protéasome (Fenteany et al, 1998) qui protège de la dégradation des protéines impliquées dans la MA (Marambaud et al, 1998 ; Dunys et al, 2007), améliore en effet l'expression de SorLA^{WT}, SorLA^{511} et SorLA^{924} dans les cellules HEK293 APP-WT (*Figure 12*) et APP-SWE (*Figure 13*) mais n'a pas réussi à améliorer l'expression de SorLA^{141}.

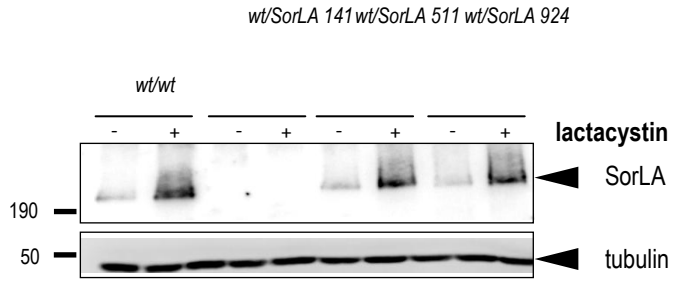

Figure 12 : expression de SorLA après traitement à la lactacystine dans les cellules HEK293 APP-WT

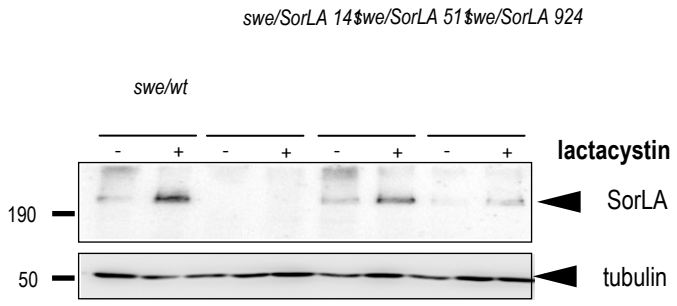

Figure 13 : expression de SorLA après traitement à la lactacystine dans les cellules HEK293 APP-SWE

De même que l'alcalinisation au NH4Cl (*Figures 14 et 15*) visant à inactiver les hydrolases lysosomales ou le blocage de p53 à la pifithrine-α (*Figures 16 et 17*) n'ont pas permis d'observer l'expression de SorLA[141].

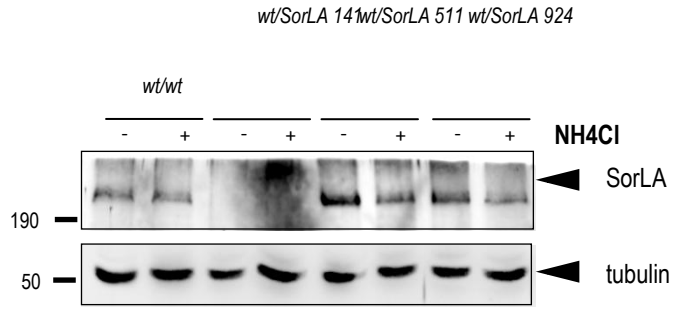

Figure 14 : expression de SorLA après traitement au NH4Cl dans les cellules HEK293 APP-WT

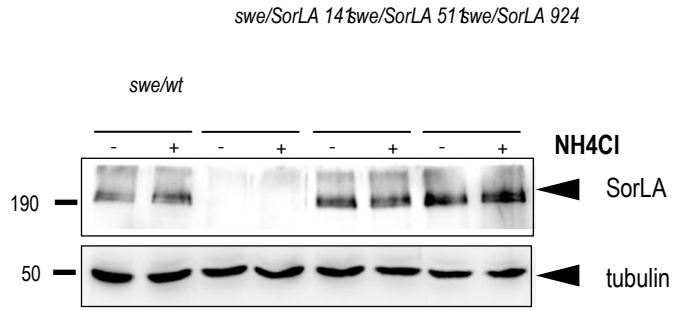

Figure 15 : expression de SorLA après traitement au NH4Cl dans les cellules HEK293 APP-SWE

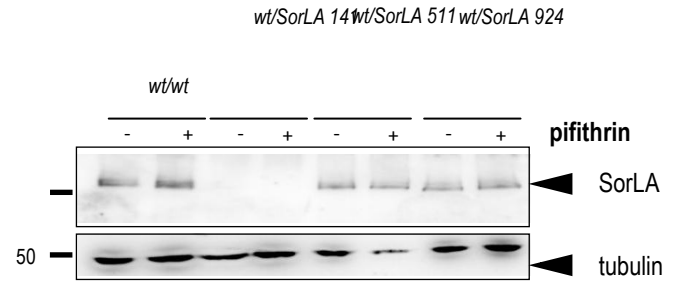

Figure 16 : expression de SorLA après traitement à la pifithrine-α dans les cellules HEK-293 APP-WT

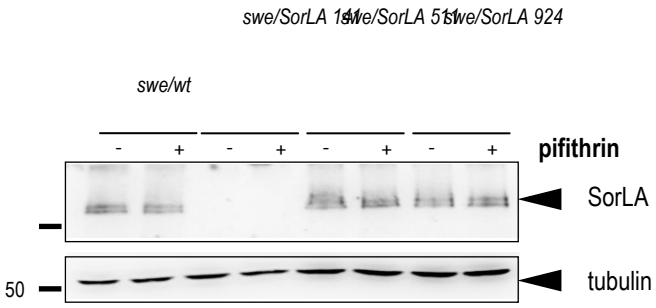

Figure 17 : expression de SorLA après traitement à la pifithrine-α dans les cellules HEK-293 APP-SWE

Ce premier ensemble d'expériences préliminaires permet de conclure que : 1) l'expression de SorLA^{WT}, SorLA^{511} et SorLA^{924} n'est pas modulée par la nature de l'APP exprimé (WT ou SWE) ; 2) l'expression de SorLA^{WT}, SorLA^{511} et SorLA^{924} est potentialisée par l'inhibiteur de protéasome mais pas par l'alcalinisation ou le blocage de l'activité de p53 ; 3) SorLA^{141} n'est pas détectable dans les cellules HEK293 APP-WT et APP-SWE, même après une modulation pharmacologique protéosomale, lysosomale ou de p53.

7.2 Influence de SorLA^{WT} et de ses mutants sur l'expression de βAPP et sur ses protéolyses non-amyloïdogéniques dans les cellules exprimant APPwt et APPswe

Puisque SorLA module le trafic de βAPP, nous avons d'abord examiné si l'expression d'APP-WT et/ou d'APP-SWE peut être affectée par les mutations de SorLA. Des analyses quantitatives indiquent que ni la forme sauvage (SorLA^{WT}) ni les mutants (SorLA^{141}, SorLA^{511} et SorLA^{924}) n'altèrent l'expression de la protéine βAPP dans les cellules HEK293 APP-WT (*Figure 18*) et APP-SWE (*Figure 19*).

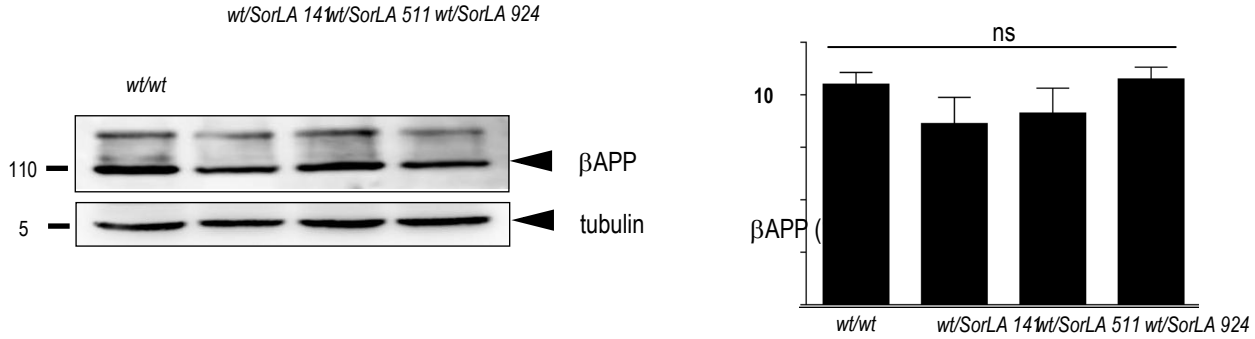

Figure 18 : expression de βAPP dans les cellules HEK293 APP-WT

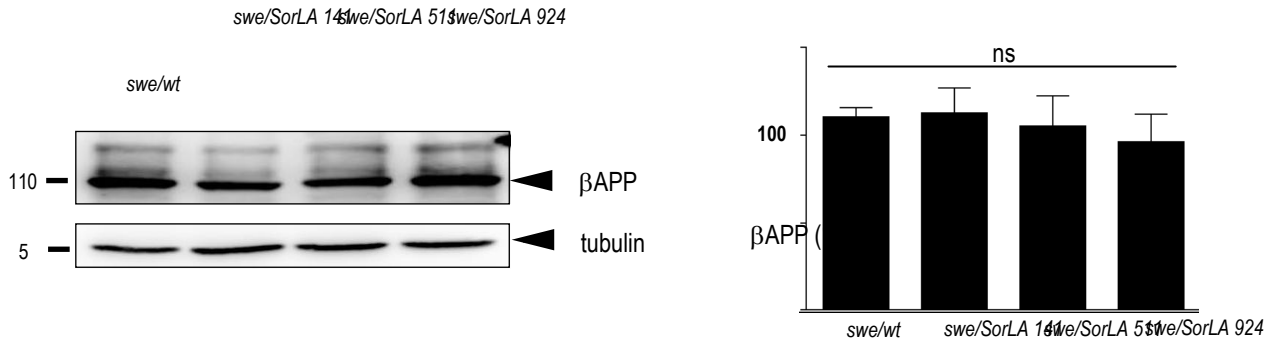

Figure 19 : expression de βAPP dans les cellules HEK293 APP-SWE

βAPP subit un clivage non-amyloïdogénique constitutif et régulé par l'α-sécrétase, qui conduit à la sécrétion de sAPPα et à la formation simultanée de sa contre-partie C-terminale C83 (Checler, 1995). Les *figures 20 et 21* montrent que SorLA^{WT} et ses mutants n'affectent pas la production de sAPPα par la sécrétase dans les cellules exprimants APP-WT et APP-SWE.

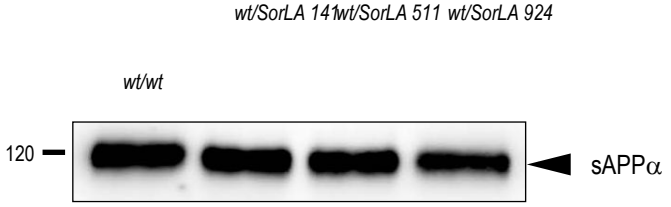

Figure 20 : sécrétion de sAPPα dans les cellules HEK293 APP-WT

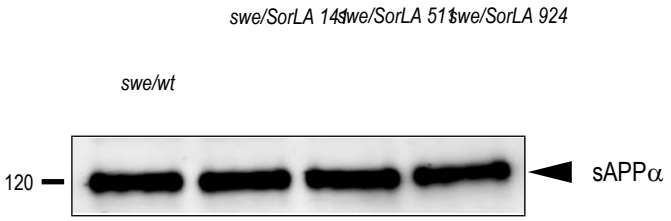

Figure 21 : sécrétion de sAPPα dans les cellules HEK293 APP-SWE

Ces données sont confirmées par mesure fluorimétrique directe de l'activité α-sécrétase en enregistrant l'activité d'hydrolyse du JMV2770 sensible à la phénanthroline (Cissé et al, 2006) sur cellules intactes APP-WT et APP-SWE. Les *figures 22 et 23* montrent qu'il n'y a pas de différence d'activité d'α-sécrétase entre SorLA^{WT} et ses mutants dans les cellules APP-WT et dans les cellules APP-SWE.

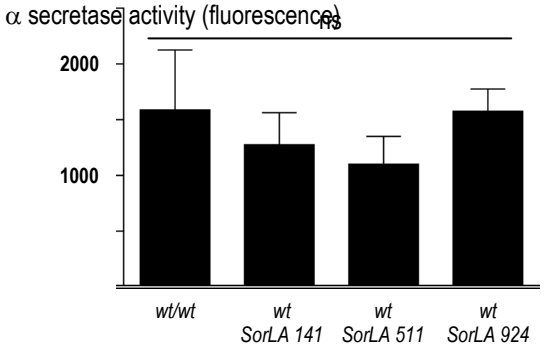

Figure 22 : activité α-sécrétase dans les cellules HEK293 APP-WT

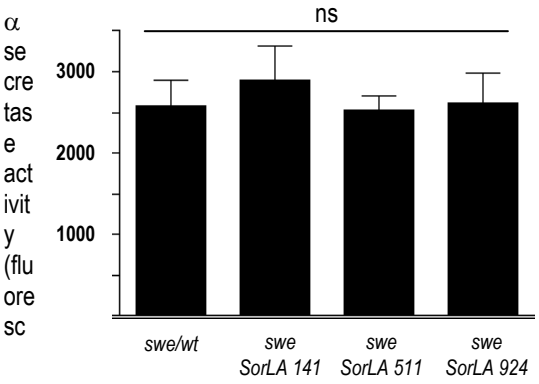

Figure 23 : activité α-sécrétase dans les cellules HEK293 APP-SWE

7.3 Influence de SorLA^{WT} et ses mutants sur le peptide Aβ et sur l'expression et l'activité γ-sécrétase

Nous avons d'abord mesuré la production de peptide Aβ total sécrété dans les cellules APP-WT et APP-SWE par immunoprécipitation avec l'anticorps 6E10 en présence de l'inhibiteur phosphoramidon afin de prévenir de la dégradation dépendante de la néprilysine (Pardossi-Piquard et al, 2005 ; Carson and Turner, 2002 ; Miners et al, 2008 ; Shirotami et al, 2001). Comme l'illustrent les *figures 24 et 25*, dans les deux modèles cellulaires (APP-WT et APP-SWE), nous sommes incapables de détecter une modification de production du peptide Aβ par les sécrétases qui dépendrait de la nature de la protéine SorLA examinée.

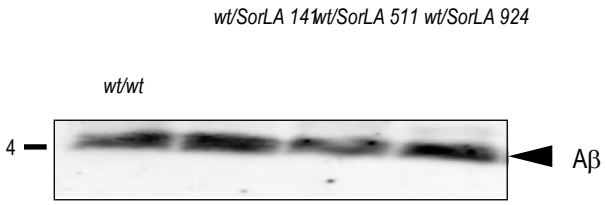

Figure 24 : immunoprécipitation du peptide Aβ dans les cellules HEK293 APP-WT

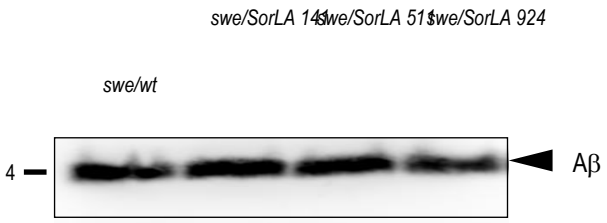

Figure 25 : immunoprécipitation du peptide Aβ dans les cellules HEK293 APP-SWE

Il est cependant bien connu qu'Aβ est principalement un mélange d'Aβ40 et Aβ42 (Checler, 1995), que ce dernier ne représente qu'environ 10% de l'Aβ total et que de légères modifications du ratio Aβ42/Aβ40 pourraient conduire à des phénotypes toxiques dans les cellules (Kuperstein et al, 2010). Ainsi, pour pouvoir distinguer de faibles modulations d'Aβ42 dans la procédure d'immunoprécipitation de l'Aβ total, nous avons mesuré les sécrétions respectives d'Aβ40 et Aβ42 par ELISA, une technique plus sensible. Comme décrit précédemment, les niveaux d'Aβ42 correspondent à environ 10-15% d'Aβ40. Cependant, nous n'avons pas observé de modifications liées à SorLA sur la production d'Aβ40 et Aβ42 dans les deux types cellulaires APP-WT (*Figure 26*) et APP-SWE (*Figure 27*).

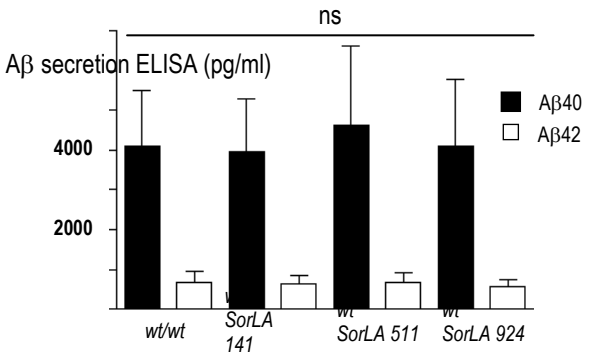

Figure 26 : sécrétion du peptide Aβ40 et Aβ42 par ELISA dans les cellules HEK293 APP-WT

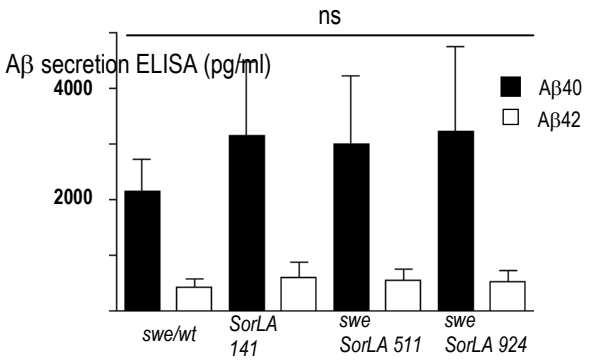

Figure 27 : sécrétion du peptide Aβ40 et Aβ42 par ELISA dans les cellules HEK293 APP-SWE

Le peptide Aβ peut également s'agréger et se déposer intracellulairement (Chui et al, 2001). Aβ42 est particulièrement sensible à l'agrégation (Burdick et al, 1992) et son niveau intracellulaire par rapport à l'Aβ total est augmenté. Ainsi, nous avons examiné les niveaux intracellulaires des peptides Aβ40 et Aβ42. Comme décrit ci-dessus, le niveau d'Aβ42 intracellulaire par rapport à Aβ40 est considérablement augmenté (*Figures 28 et 29*).

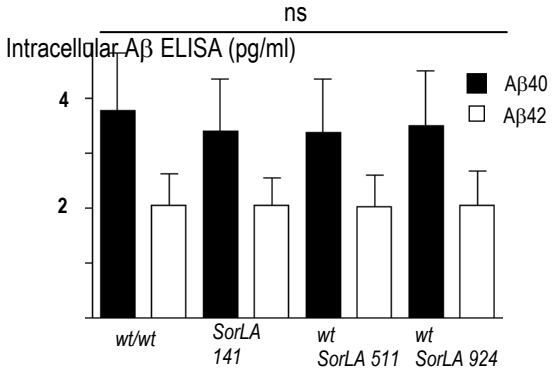

Figure 28 : Aβ40 et Aβ42 intracellulaires par ELISA dans les cellules HEK293 APP-WT

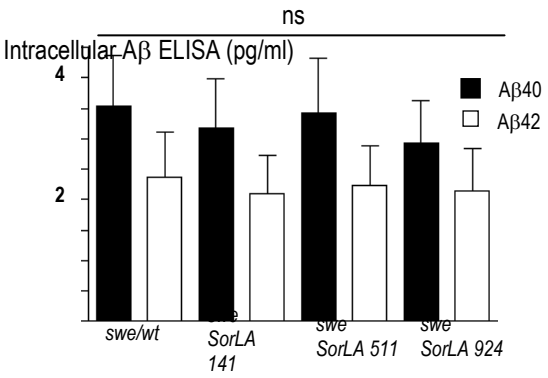

Figure 29 : Aβ40 et Aβ42 intracellulaires par ELISA dans les cellules HEK293 APP-SWE

Cependant, là encore, les expressions de SorLA^{WT} et de ses mutants n'affectent pas les niveaux intracellulaires d'Aβ40 et Aβ42, quel que soit le système cellulaire utilisé.

La dernière étape protéolytique donnant du peptide Aβ est initialisée par la γ-sécrétase, un complexe hétérotétramérique composé des protéines Aph-1, nicastrine, Pen-2 et de la préséniline 1 ou 2 qui contiennent le noyau catalytique (Takasugi et al, 2003 ; Haass, 2004 ; De Strooper, 2003 ; De Strooper et al, 1998 ; Wolfe et al, 1999). Ainsi, nous avons tenté de confirmer l'absence d'effet des protéines SorLA sur le peptide Aβ sécrété et intracellulaire en examinant l'expression de tous les membres du complexe γ-sécrétase et en mesurant son activité catalytique. Les *figures 30 et 31* montrent clairement qu'aucun des constituants n'est affecté par SorLA^{WT} et ses mutants, dans les cellules exprimant APP-WT et APP-SWE dans les conditions contrôles ou traitées avec le NH4Cl.

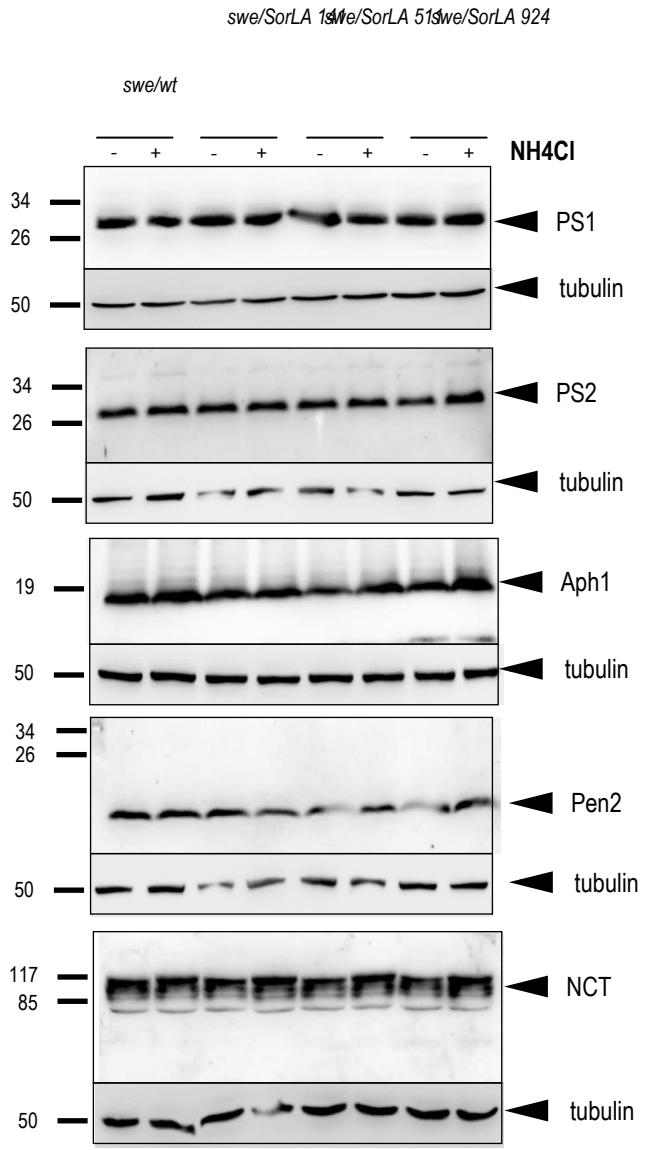

Figure 31 : expressions des membres du complexe γ-sécrétase dans les cellules HEK293 APP-SWE

Enfin, nous avons utilisé une procédure, déjà décrite, visant à reconstituer la γ-sécrétase fonctionelle dans les membranes cellulaires et en mesurant son activité au moyen du C100 recombinant (Sevalle et al, 2009). Ce fragment, correspondant au clivage de βAPP par la β-sécrétase (auquel a été ajoutée en N-terminal une méthionine, voir Matériel et Méthodes) permet de suivre la production du peptide Aβ et la production d'AICD, sa contre-partie C-terminale (Pardossi-Piquard and Checler, 2012), uniquement par le clivage de la γ-sécrétase (Sevalle et al, 2009) en s'affranchissant de la coupure β-sécrétase. La *figure 32* indique que l'expression de SorLA^{WT} et de ses mutants ne modifie pas l'activité γ-sécrétase mesurée dans les cellules HEK293 APP-SWE.

Figure 32 : activité γ-sécrétase dans les cellules HEK293 APP-SWE

Dans l'ensemble, les données décrites ci-dessus, obtenues par des approches multiples et complémentaires, démontrent systématiquement que les mutations de SorLA n'affectent pas l'Aβ total sécrété et les formes Aβ40/42 intracellulaires, et ne modulent pas l'expression et l'activité de la γ-sécrétase.

7.4 Influence de SorLA^{WT} et ses mutants sur les fragments C-terminaux de βAPP et sur l'activité β-sécrétase

La voie amyloïdogénique qui se produit sur la protéine βAPP comprend toujours une étape catalytique par la β-sécrétase BACE1 (Cole and Vassar, 2007) qui donne un fragment C-terminal appelé C99. C99 peut subir une autre hydrolyse par l'α-sécrétase, générant un autre fragment C-terminal appelé C83 (Flammang et al, 2012 ; Goodger et al, 2009 ; Belyaev et al, 2010). Par la suite, à la fois C99 et C83 produisent le facteur de transcription AICD suite au clivage par la γ-sécrétase (Pardossi-Piquard and Checler, 2012). Nous avons examiné l'influence des expressions de SorLA^{WT} et de ses mutants sur les fragments C-terminaux. Nous avons observé une faible expression de C99 et une plus abondante de C83 dans les cellules exprimant APP-WT (*Figure 33*).

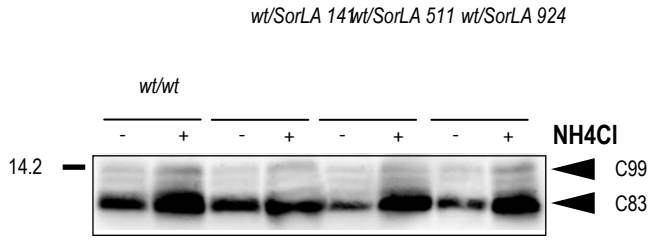

Figure 33 : expressions de C99 et C83 dans les cellules HEK293 APP-WT

Comme prévu, les expressions des deux fragments C-terminaux ont été augmentées (*Figure 34)* par la mutation suédoise (APP-SWE), en accord avec des résultats précédents sur l'influence de cette mutation sur l'activité β-sécrétase (Citron et al, 1992 ; Perez et al, 1996) et selon une précédente observation de la production de C83 dérivée de C99 (Flammang et al, 2012).

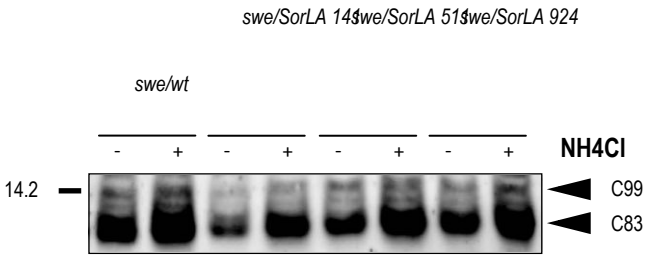

Figure 34 : expressions de C99 et C83 dans les cellules HEK293 APP-SWE

De précédents travaux ont également indiqué que l'expression des fragments C-terminaux pouvait être améliorée par une alcalinisation (Vingtdeux et al, 2007), probablement grâce à une protection contre la protéolyse par des hydrolases acides (Lauritzen et al, 2012 ; Lauritzen et al, 2016). Cela a été clairement confirmé dans les *figures 33 et 34* où NH4Cl a considérablement amélioré les expressions de C99 et C83. Cependant les expressions de SorLA^{511} et SorLA^{924} n'affectent pas l'expression de C99 et C83 dans les conditions contrôles ou traitées au NH4Cl dans les cellules exprimant APP-WT et APP-SWE. Il convient de noter la réduction surprenante (*Figures 35 et 36*) des fragments C-terminaux observée dans les cellules exprimant SorLA^{141} par rapport à SorLA^{WT} qui pourrait probablement s'expliquer par des mécanismes non spécifiques et encore à découvrir.

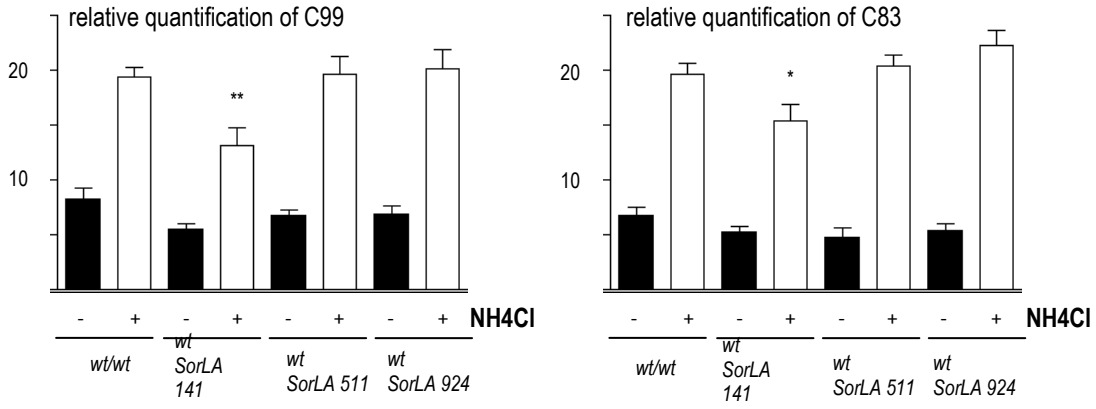

Figure 35 : analyses statistiques de l'expression de C99 et C83 dans les cellules HEK293 APP-WT

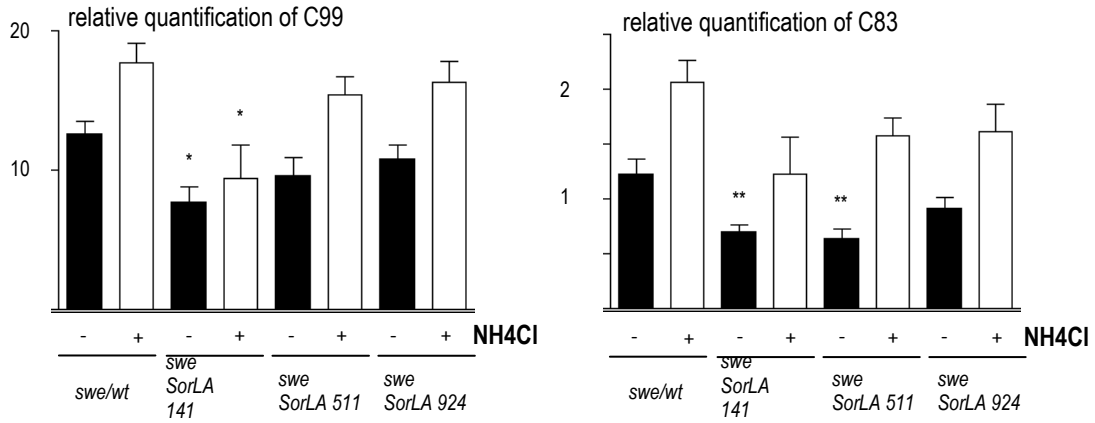

Figure 36 : analyses statistiques de l'expression de C99 et C83 dans les cellules HEK293 APP-SWE

La production, à la fois, du peptide Aβ et de C99 qui nécessite le clivage de la protéine βAPP par BACE1 est insensible aux mutations de SorLA. Cet ensemble de données a été renforcé par l'analyse fluorimétrique directe de l'activité de BACE1 (Andrau et al, 2003). Ainsi, nous n'avons détecté aucune modulation de BACE1 par $SorLA^{WT}$ et ses mutants dans les cellules exprimant APP-WT (*Figure 37*) et APP-SWE (*Figure 38*).

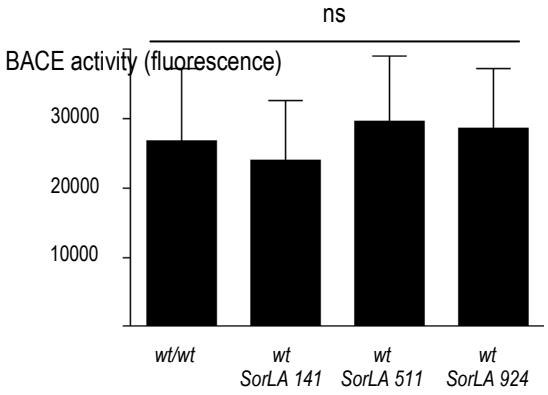

Figure 37 : activité de BACE1 dans les cellules HEK293 APP-WT

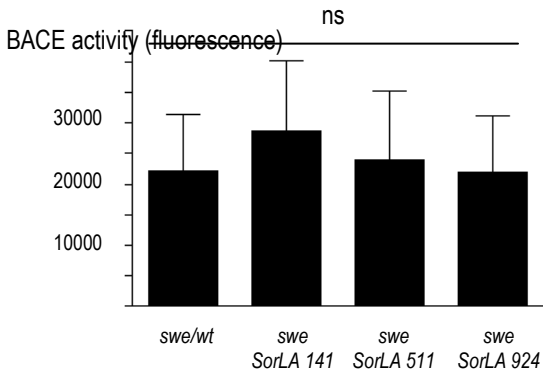

Figure 38 : activité de BACE1 dans les cellules HEK293 APP-SWE

7.5 Influence de SorLA^{WT} et ses mutants sur la néprilysine et la cathepsine B

Dans les formes sporadiques de la MA, l'accumulation du peptide Aβ et des fragments C-terminaux n'est pas due à une augmentation de la production mais plutôt à des défauts liés à l'âge dans leurs processus cataboliques. Plusieurs enzymes sont impliquées dans la dégradation du peptide Aβ mais la néprilysine apparait invariablement comme la principale enzyme dégradante (Miners et al, 2008 ; Nalivaeva et al, 2008 ; Hersh and Rodgers, 2008). Concernant C99 et C83, nous avons, comme d'autres, montré leur dégradation dans le compartiment lysosomial par des hydrolases acides, incluant la cathepsine B (Lauritzen et al, 2012 ; Lauritzen et al, 2016 ; Gonzalez et al, 2017). Dans ce contexte, pour compléter notre vision globale des processus de maturation et de dégradation, nous avons évalué l'influence de SorLA^{WT} et ses mutants sur les activités de la néprilysine et de la cathepsine B. Les *figures 39 et 40*, et les *figures 41 et 42*, illustrent l'absence de modulation des mutations de SorLA sur, respectivement, les activités de la néprilysine et de la cathepsine B dans les cellules exprimant APP-WT et APP-SWE.

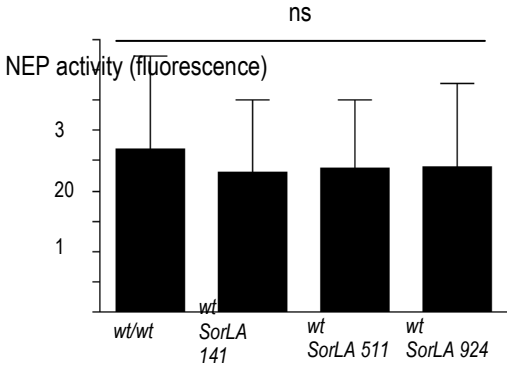

Figure 39 : activité de NEP dans les cellules HEK293 APP-WT

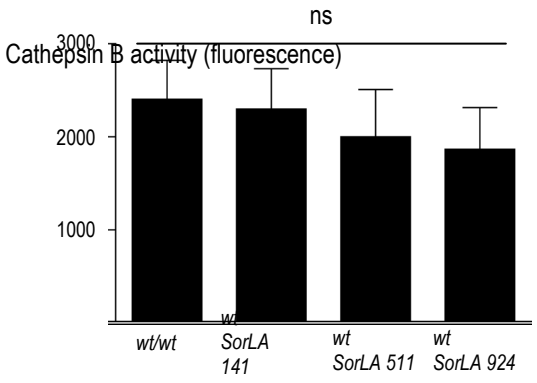

Figure 41 : activité de la cathepsine B dans les cellules HEK293 APP-WT

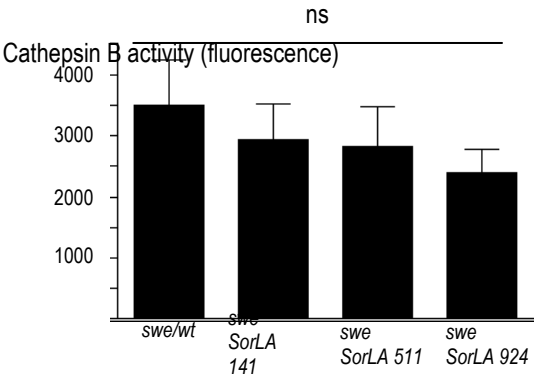

Figure 42 : activité de la cathepsine B dans les cellules HEK293 APP-SWE

8 - DISCUSSION

La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie neurodégénérative avec une éthiologie complexe. Un certain nombre de cas, avec un début précoce et une progression rapide, est dû à des mutations autosomiques dominantes rares sur les gènes de βAPP, PS1 et PS2, alors que la plupart des cas survient tardivement et est d'origine sporadique. Cependant, les cas sporadiques peuvent aussi être influencés par une composante génétique puisque certains sont liés à des facteurs de risque.

Le gène SORL1 est le seul gène qui a été proposé pour contribuer à la fois aux formes précoces et aux formes tardives de la MA (Rogaeva et al, 2007). Ce gène code pour une protéine SorLA qui conduit βAPP à la surface cellulaire (Vardarajan et al, 2015) et qui est impliquée dans l'adressage du peptide Aβ vers le compartiment lysosomal (Caglayan et al,

2014). Globalement, cela suggère que les mutations associées à SORL1 pourraient bien contribuer à la pathologie de la MA en modulant le trafic et le process protéolytique de βAPP. Cependant, une analyse approfondie des données n'a pas permis de tirer de conclusions fermes sur la dérégulation des mécanismes dans les cellules ou dans des modèles animaux exprimant SorLA muté. Notamment, il existe une discordance entre la modulation *in cellulo* et *in vivo* de l'expression de βAPP initiée par SorLA (Caglayan et al, 2014). De plus, les conséquences fonctionnelles sur la maturation protéolytique de βAPP et plus particulièrement sur la modulation d'Aβ40 et Aβ42 sont apparues très variables selon la nature de la mutation de SORL1 et l'espèce d'Aβ étudiée (Vardarajan et al, 2015 ; Cuccaro et al, 2016). Ceci nous a conduit à examiner en profondeur l'influence présumée des mutations de SORL1 sur la maturation physiopathologique de βAPP ainsi que sur le devenir de ses divers métabolites.

Parce que SorLA est impliquée dans le trafic de βAPP (Jacobsen et al, 2001)) et parce que le transport de βAPP est affecté par les mutations suédoises, nous avons mené notre étude sur les cellules exprimant APP-WT ou APP-SWE. Tout d'abord, afin de mieux comprendre les expressions et le devenir des mutants de SorLA, nous avons évalué l'influence de la lactacystine, un inhibiteur du protéasome (Fenteany et al, 1998), de la pifithrine-α, un inhibiteur de l'activité de p53 (Komarov et al, 1999), et de l'agent alcalinisant cellulaire NH4Cl. Il a déjà été montré que tous ces agents affectaient les protéines apparentées à βAPP ou aux sécrétases (Checler et al, 2010 ; Checler and Alves da Costa, 2014 ; Dunys et al, 2007 ; Dunys et al, 2009). Nous avons observé une potentialisation de SorLA^{924} et SorLA^{511} lors de l'inhibition du protéasome et aucun effet de la modulation de p53 dans les cellules exprimant APP-WT et APP-SWE. Il convient de noter que SorLA^{141} n'a jamais été détectable, même après le blocage pharmacologique du protéasome et p53 ou après l'alcalinisation, bien que l'efficacité de transfection ait été vérifiée comme normale. Ceci devrait être expliqué par une labilité extrême comme nous l'avons précédemment documenté pour un mutant Parkin (da Costa et al, 2009). D'une certaine manière, nous pouvons estimer que les cellules tranfectées SorLA^{141} peuvent être considérées comme un type de contrôle négatif dans nos expériences ultérieures. Les expressions de SorLA^{924} et SorLA^{511} n'ont pas affecté l'expression de βAPP dans les deux modèles cellulaires. Nos données tiennent compte de la quantité totale de βAPP car nous considérons que globalement cela reflète à la fois les homologues intracellulaires et membranaires, et consiste donc en une lecture finale de l'expression, du trafic et de la clairance de βAPP. Nos données concordent avec une étude antérieure montrant que des mutants de SORL1 n'affectent pas l'expression totale de βAPP dans les cellules HEK293 (Vardarajan et al, 2015).

Nous n'avons pas observé de modulation de sAPPα associée aux variants de SorLA. Les données précédentes ont conduit à des observations différentes. Ainsi, Vardarajan et ses collaborateurs ont rapporté une amélioration de sAPPα par des variants communs ou rares de SorLA sans changement lié à SorLA^{WT} (Vardarajan et al, 2015). Inversement, Cuccaro et

ses collaborateurs montrent une réduction drastique de sAPPα déclenchée par SorLA^{WT} et une augmentation observée après l'expression de deux mutants de SorLA liés à la forme précoce de la MA (Cuccaro et al, 2016). Cela n'a pas pu être expliqué par des modèles cellulaires distincts car les deux études ont été réalisées sur des cellules HEK293 exprimant APP-SWE. Ceci souligne le fait que l'influence sur le métabolisme, induit par l'α-sécrétase, de βAPP pourrait être affectée différement par la nature des mutations de SorLA. Dans notre étude, pour renforcer nos observations, nous avons mesuré directement l'activité α-sécrétase sur des cellules vivantes en plaque. Nous confirmons que l'activité α-sécrétase et C83 (α-CTF, son homologue C-terminal) n'ont pas été modulés par les expressions de SorLA^{924} et SorLA^{511}. Fait important, l'expression in vivo de SorLA^{WT} n'a pas affecté l'expression de βAPP ni altéré les niveaux de sAPPα (Caglayan et al, 2014).

Des études antérieures sur l'influence des mutants de SorLA sur les niveaux d'Aβ ont également conduit à des conclusions contradictoires. Par exemple, Cuccaro et ses collègues ont rapporté de très faibles augmentations d'Aβ42 sécrété par deux mutants de SorLA à des niveaux restés plus bas ou proches de ceux retrouvés dans des cellules transfectées mock (Cuccaro et al, 2016). Certains de ces mutants (SorLA T588I) n'ont même pas modifié les niveaux sécrétés d'Aβ40. Quel que soit le mutant étudié, les niveaux de sAPPβ restent au niveau des cellules APP-SWE transfectées mock (Cuccaro et al, 2016). Dans une autre étude, le niveau d'Aβ40 sécrété est affecté par des variants de SorLA rares mais pas par des variants communs tandis qu'Aβ42 sécrété est modulé par les deux variants (Vardarajan et al, 2015). Ces données discordantes pourraient s'expliquer par la nature de la mutation examinée mais aussi par le fait qu'Aβ sécrété représente seulement un sous-groupe d'Aβ total et qu'il est important d'évaluer également les niveaux d'Aβ intracellulaire. Dans l'ensemble, notre étude indique qu'Aβ40 et Aβ42 intracellulaires et sécrétés ne sont pas affectés par les surexpressions de SorLA^{924} et SorLA^{511} dans les cellules exprimant APP-WT et APP-SWE. Cette conclusion a été corroborée par trois lignes de résultats indépendantes : 1) l'activité β-sécrétase n'était pas modulée par les variants de SorLA ; 2) l'activité γ-sécrétase et les expressions de ses quatre composants protéiques n'ont pas été modifiées avec les expressions des variants ; 3) l'expression de C99, qui est le précurseur du peptide Aβ, n'est pas affectée par les variants de SorLA. Il convient de noter ici que certaines de ces données sont supportées par des observations précédentes obtenues avec d'autres variants. Ainsi, Vardarajan et ses collègues n'ont observé aucune modulation des niveaux de PS1 (core catalytique de la γ-sécrétase) sur les expressions de variants liés à la fois à des formes précoces et tardives de la MA (Vardarajan et al, 2015). En outre, de manière importante, Caglayan et ses collaborateurs n'ont pas observé d'altérations des niveaux de sAPPβ et d'Aβ, in vivo, chez des souris exprimant SorLA^{WT} (Caglayan et al, 2014).

Enfin, nous avons analysé l'influence supposée des mutants de SorLA sur les évènements se déroulant en aval de la production des catabolites de βAPP. Le peptide Aβ est principalement dégradé par la néprilysine tandis que les CTF (C99 et C83) subissent une

protéolyse par des protéases lysosomales acides, incluant la cathepsine B. Comme cela est prévisible à partir de nos données décrites ci-dessus, les mutants de SorLA n'ont pas modifié l'activité de la néprilysine et de la cathepsine B. Ainsi, les mécanismes de suppression de production ne sont pas affectés par les mutations SorLA examinées dans notre travail.

Notre étude n'exclut pas la possibilité que des mutations différentes puissent influencer le traitement physiopathologique de βAPP. Cependant, nous pouvons conclure que nos mutations étudiées, rapportées être liées à des cas bénins ou sévères de MA, ne provoquent pas de phénotype pathogène sur la modulation de la maturation physiopathologique de βAPP. En particulier, d'autres études restent à être réalisées pour évaluer l'influence possible de ces variants sur la pathologie liée à Tau ou sur l'atrophie de l'hippocampe, comme cela a été décrit pour un sous-groupe de mutants de SORL1 (Louwersheimer et al, 2015).

9- BIBLIOGRAPHIE

Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, Gamst A, Holtzman DM, Jagust WJ, Petersen RC, Snyder PJ, Carrillo MC, Thies B, Phelps CH (2011). The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimers Dement 7(3):270-9. doi : 10.1016/j.jalz.2011.03.008. Epub 2011 Apr 21.

Alves da Costa C, Sunyach C, Pardossi-Piquard R, Sévalle J, Vincent B, Boyer N, Kawarai T, Girardot N, St George-Hyslop P, Checler F (2006). Presenilin-dependent gamma-secretase-mediated control of p53-associated cell death in Alzheimer's disease. J Neurosci 26(23):6377-6385.

Alzheimer's Disease Collaborative Group (1995). The structure of the presenilin 1 (S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD families. Nat Genet 11(2):219-22.

Andersen OM, Reiche J, Schmidt V, Gotthardt M, Spoelgen R, Behlke J et al (2005). Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. Proc Natl Acad Sci USA 102(38):13461-6.

Andersen OM, Schmidt V, Spoelgen R, Gliemann J, Behlke J, Galatis D, McKinstry WJ, Parker MW, Masters CL, Hyman BT, Cappai R et Willnow TE (2006). Molecular dissection of the interaction between amyloid precursor protein and its neuronal trafficking receptor SorLA/LRl 1. Biochemistry 45(8): 2618-2628.

Andersen OM et Willnow TE (2006). "Lipoprotein receptors in Alzheimer's disease." Trends Neurosci 29(12): 687-694.

Andrau D, Dumanchin-Njock C, Ayral E, Vizzavona J, Farzan M, Boisbrun M, Fulcrand P, Hernandez JF, Martinez J, Lefranc-Jullien S, Checler F (2003). BACE1- and BACE2-expressing human cells: characterization of beta-amyloid precursor protein-derived catabolites, design of a novel fluorimetric assay, and identification of new in vitro inhibitors. J Biol Chem. 278(28):25859-66.

Andreasen N, **Blennow K**. (2005). CSF biomarkers for mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. Clin Neurol Neurosurg 107(3):165-173.

Armogida M, Petit A, Vincent B, Scarzello S, da Costa CA, Checler F (2001). Endogenous beta-amyloid production in presenilin-deficient embryonic mouse fibroblasts. Nat Cell Biol 3(11):1030-1033.

Atwood CS, Obrenovich ME, Liu T, Chan H, Perry G, Smith MA, Martins RN (2003). Amyloid-beta: a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid-beta. Brain Res Brain Res Rev 43(1):1-16.

Baek SH, Ohgi KA, Rose DW, Koo EH, Glass CK, Rosenfeld MG (2002). Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF-kappaB and beta-amyloid precursor protein. Cell 110(1):55-67.

Bailey JA, Maloney B, Ge YW, Lahiri DK (2011). Functional activity of the novel Alzheimer's amyloid β-peptide interacting domain (AβID) in the APP and BACE1 promoter sequences and implications in activating apoptotic genes and in amyloidogenesis. Gene 488(1-2):13-22.

Battle MA, Maher VM et McCormick JJ (2003). "ST7 is a novel low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) with a cytoplasmic tail that interacts with proteins related to signal transduction pathways." Biochemistry 42(24): 7270-7282.

Beglopoulos V, Sun X, Saura CA, Lemere CA, Kim RD, Shen J (2004). Reduced beta-amyloid production and increased inflammatory responses in presenilin conditional knock-out mice. J Biol Chem 279(45):46907-46914.

Belyaev ND, Nalivaeva NN, Makova NZ, Turner AJ (2009). Neprilysin gene expression requires binding of the amyloid precursor protein intracellular domain to its promoter: implications for Alzheimer disease. EMBO Rep 10(1):94-100.

Belyaev ND, Kellett KA, Beckett C, Makova NZ, Revett TJ, Nalivaeva NN, Hooper NM, Turner AJ (2010). The transcriptionally active amyloid precursor protein (APP) intracellular domain is preferentially produced from the 695 isoform of APP in a {beta}-secretase-dependent pathway. J Biol Chem 285(53):41443-54.

Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM (2005). Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. Neuron. 45(5):675-88.

Bonifacino JS et Hurley JH (2008). Retromer. Curr Opin Cell Biol 20(4): 427-436.

Buerger K, Ewers M, Pirttilä T, Zinkowski R, Alafuzoff I, Teipel SJ, et al (2006). CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. Brain 129(11):3035-41.

Burdick D, Soreghan B, Kwon M, Kosmoski J, Knauer M, Henschen A, Yates J, Cotman C, Glabe C (1992). Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. J Biol Chem 267(1):546-554.

Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, Slack JL, Stocking KL, Peschon JJ, Johnson RS, Castner BJ, Cerretti DP, Black RA (1998). Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. J Biol Chem 273(43):27765-27767.

Caglayan S, Takagi-Niidome S, Liao F, Carlo AS, Schmidt V, Burgert T, Kitago Y, Füchtbauer EM, Füchtbauer A, Holtzman DM, Takagi J, Willnow TE (2014). Lysosomal sorting of amyloid-β by the SORLA receptor is impaired by a familial Alzheimer's disease mutation. Sci Transl Med 6(223):223ra20. doi: 10.1126/scitranslmed.3007747.

Cai XD, Golde TE, Younkin SG (1993). Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor. Science 259(5094):514-6.

Caillé I, Allinquant B, Dupont E, Bouillot C, Langer A, Müller U, Prochiantz A (2004). Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. Development 131(9):2173-2181.

Cam JA et Bu G (2006). Modulation of beta-amyloid precursor protein trafficking and processing by the low density lipoprotein receptor family. Mol Neurodegener 1: 8.

Cao X, Südhof TC (2001). A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. Science 293(5527):115-120.

Cao X, Südhof TC (2004). Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation. J Biol Chem 279(23):24601-24611.

Capell A, Grünberg J, Pesold B, Diehlmann A, Citron M, Nixon R, Beyreuther K, Selkoe DJ, Haass C (1998). The proteolytic fragments of the Alzheimer's disease-associated presenilin-1 form heterodimers and occur as a 100-150-kDa molecular mass complex. J Biol Chem 273(6):3205-11.

Capell A, Beher D, Prokop S, Steiner H, Kaether C, Shearman MS, Haass C (2005). Gamma-secretase complex assembly within the early secretory pathway. J Biol Chem 280(8):6471-8. Epub 2004 Dec 10.**Carson JA, Turner AJ** (2002). Beta-amyloid catabolism: roles for neprilysin (NEP) and other metallopeptidases? J Neurochem 81(1):1-8.

Checler F (1995). Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. J Neurochem 65(4):1431-44.

Checler F, Alves da Costa C, Dumanchin-Njock C, Lopez-Perez E, Marambaud P, Paitel E, Petit A and Vincent B (2002). Métabolisme du précurseur du peptide amyloïde et présénilines. Medecine/Sciences 18, 717-724.

Checler F, Dunys J, Pardossi-Piquard R, Alves da Costa C (2010). p53 is regulated by and regulates members of the gamma-secretase complex. Neurodegener Dis 7(1-3):50-5. doi: 10.1159/000283483.

Checler F, Alves da Costa C (2014). p53 in neurodegenerative diseases and brain cancers. Pharmacol Ther 142(1):99-113. doi : 10.1016/j.pharmthera.2013.11.009.

Christensen DZ, Schneider-Axmann T, Lucassen PJ, Bayer TA et Wirths O (2010). "Accumulation of intraneuronal Abeta correlates with ApoE4 genotype." Acta Neuropathol 119(5) : 555-566.

Chui DH, Dobo E, Makifuchi T, Akiyama H, Kawakatsu S, Petit A, Checler F, Araki W, Takahashi K, Tabira T (2001). Apoptotic neurons in Alzheimer's disease frequently show intracellular Abeta42 labeling. J Alzheimers Dis 3(2):231-239.

Cissé MA, Sunyach C, Lefranc-Jullien S, Postina R, Vincent B, Checler F (2005). The disintegrin ADAM9 indirectly contributes to the physiological processing of cellular prion by modulating ADAM10 activity. J Biol Chem 280(49):40624-40631.

Cissé MA, Gandreuil C, Hernandez JF, Martinez J, Checler F, Vincent B (2006). Design and characterization of a novel cellular prion-derived quenched fluorimetric substrate of alpha-secretase. Biochem Biophys Res Commun 347(1):254-60.

Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ (1992). Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. Nature 360(6405):672-4.

Citron M, Teplow DB, Selkoe DJ (1995). Generation of amyloid beta protein from its precursor is sequence specific. Neuron 14(3):661-670.

Cole SL, Vassar R (2007). The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1. Mol Neurodegener 2:22.

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. Science 261(5123):921-923.

Cruts M, Dermaut B, Rademakers R, Roks G, Van den Broeck M, Munteanu G, van Duijn CM, Van Broeckhoven C (2001). Amyloid beta secretase gene (BACE) is neither mutated in nor associated with early-onset Alzheimer's disease. Neurosci Lett 313(1-2):105-107.

Cuccaro ML, Carney RM, Zhang Y, Bohm C, Kunkle BW, Vardarajan BN, Whitehead PL, Cukier HN, Mayeux R, St George-Hyslop P and Pericak-Vance MA (2016). SORL1 mutations in early- and late-onset Alzheimer disease. Neurol Genet 2(6):e116. eCollection.

da Costa CA, Sunyach C, Giaime E, West A, Corti O, Brice A, Safe S, Abou-Sleiman PM, Wood NW, Takahashi H, Goldberg MS, Shen J, Checler F (2009). Transcriptional repression of p53 by parkin and impairment by mutations associated with autosomal recessive juvenile Parkinson's disease. Nat Cell Biol 11(11):1370-5.

da Cruz e Silva EF et da Cruz e Silva OA (2003). Protein phosphorylation and APP metabolism. Neurochem Res 28(10) : 1553-1561.

Dartigues J-F, Berr C, Helmer C, and Letenneur L (2002). Epidémiologie de la maladie d'Alzheimer. Medecine/Sciences 18, 737-743.

Dawson GR, Seabrook GR, Zheng H, Smith DW, Graham S, O'Dowd G, Bowery BJ, Boyce S, Trumbauer ME, Chen HY, Van der Ploeg LH, Sirinathsinghji DJ (1999). Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. Neuroscience 90(1):1-13.

De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, Von Figura K, Van Leuven F (1998). Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. Nature 391(6665):387-90.

De Strooper B (2003). Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. Neuron 38(1):9-12.

De Strooper B et Annaert W (2000). Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. J Cell Sci 113 (Pt 11): 1857-1870.

Dhenain M, Lehéricy S, and Duyckaerts C (2002). Le diagnostic : de la neuropathologie à l'imagerie cérébrale. Medecine/Sciences 18, 697-708.

Doan A, Thinakaran G, Borchelt DR, Slunt HH, Ratovitsky T, Podlisny M, Selkoe DJ, Seeger M, Gandy SE, Price DL, Sisodia SS (1996). Protein topology of presenilin 1. Neuronn17(5):1023-1030.

Dodson SE, Gearing M, Lippa CF, Montine TJ, Levey AI et Lah JJ (2006). LR11/SorLA expression is reduced in sporadic Alzheimer disease but not in familial Alzheimer disease. J Neuropathol Exp Neurol 65(9) : 866-872.

Dodson SE, Andersen OM, Karmali V, Fritz JJ, Cheng D, Peng J, et al (2008). Loss of LR11/SORLA enhances early pathology in a mouse model of amyloidosis: evidence for a proximal role in Alzheimer's disease. J Neurosci 28(48):12877-86.

Dries DR, Shah S, Han YH, Yu C, Yu S, Shearman MS, Yu G (2009). Glu-333 of nicastrin directly participates in gamma-secretase activity. J Biol Chem 284(43):29714-29724.

Dumanchin-Njock C, Alves da Costa CA, Mercken L, Pradier L, Checler F (2001). The caspase-derived C-terminal fragment of betaAPP induces caspase-independent toxicity and triggers selective increase of Abeta42 in mammalian cells. J Neurochem 78(5):1153-1161.

Dunys J, Kawarai T, Giaime E, Wilk S, Herrant M, Auberger P, St George-Hyslop P, Alves da Costa C, Checler F (2007). Study on the putative contribution of caspases and the proteasome to the degradation of Aph-1a and Pen-2. Neurodegener Dis 4(2-3):156-63.

Dunys J, Kawarai T, Sevalle J, Dolcini V, George-Hyslop PS, Da Costa CA, Checler F (2007). p53-Dependent Aph-1 and Pen-2 anti-apoptotic phenotype requires the integrity of the gamma-secretase complex but is independent of its activity. J Biol Chem 282(14):10516-25.

Dunys J, Sevalle J, Giaime E, Pardossi-Piquard R, Vitek MP, Renbaum P, Levy-Lahad E, Zhang YW, Xu H, Checler F, da Costa CA (2009). p53-dependent control of transactivation of the Pen2 promoter by presenilins. J Cell Sci 122(Pt 21):4003-8. doi: 10.1242/jcs.051169.

Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesold B, Steiner H, Haass C (2003). Reconstitution of gamma-secretase activity. Nat Cell Biol 5(5):486-488.

Fenteany G, Standaert RF, Lane WS, Choi S, Corey EJ, Schreiber SL (1995). Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. Science 268(5211):726-31.

Fenteany G, Schreiber SL (1998). Lactacystin, proteasome function, and cell fate. J Biol Chem 273(15):8545-8.

Finan GM, Okada H et Kim TW (2011). BACE1 retrograde trafficking is uniquely regulated by the cytoplasmic domain of sortilin. J Biol Chem 286(14): 12602- 12616.

Flammang B, Pardossi-Piquard R, Sevalle J, Debayle D, Dabert-Gay AS, Thévenet A, Lauritzen I, Checler F (2012). Evidence that the amyloid-β protein precursor intracellular domain, AICD, derives from β-secretase-generated C-terminal fragment. J Alzheimers Dis 30(1):145-153.

Fortini ME (2002). Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 3(9):673-684.

Fox NC, Freeborough PA, Rossor MN (1996). Visualisation and quantification of rates of atrophy in Alzheimer's disease. Lancet 348(9020):94-97.

Francis R, McGrath G, Zhang J, Ruddy DA, Sym M, Apfeld J, Nicoll M, Maxwell M, Hai B, Ellis MC, Parks AL, Xu W, Li J, Gurney M, Myers RL, Himes CS, Hiebsch R, Ruble C, Nye JS, Curtis D (2002). aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. Dev Cell 3(1):85-97.

Fukumoto H, Cheung BS, Hyman BT, Irizarry MC (2002). Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. Arch Neurol 59(9):1381-1389.

Fukumoto H, Rosene DL, Moss MB, Raju S, Hyman BT, Irizarry MC (2004). Beta-secretase activity increases with aging in human, monkey, and mouse brain. Am J Pathol 164(2):719-725.

Furukawa K, Barger SW, Blalock EM, Mattson MP (1996a). Activation of K+ channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein. Nature 379(6560):74-78.

Furukawa K, Sopher BL, Rydel RE, Begley JG, Pham DG, Martin GM, Fox M, Mattson MP. Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain (1996). J Neurochem 67(5):1882-1896. Erratum in: J Neurochem 68(3):1331.

Gakhar-Koppole N, Hundeshagen P, Mandl C, Weyer SW, Allinquant B, Müller U, 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(5):871-882.

Ghosal K, Vogt DL, Liang M, Shen Y, Lamb BT, Pimplikar SW (2009). Alzheimer's disease-like pathological features in transgenic mice expressing the APP intracellular domain. Proc Natl Acad Sci U S A 106(43):18367-18372.

Giuffrida ML, Caraci F, Pignataro B, Cataldo S, De Bona P, Bruno V, Molinaro G, Pappalardo G, Messina A, Palmigiano A, Garozzo D, Nicoletti F, Rizzarelli E, Copani A (2009). Beta-amyloid monomers are neuroprotective. J Neurosci 29(34):10582-7.

Glabe C. (2001). Intracellular mechanisms of amyloid accumulation and pathogenesis in Alzheimer's disease. J Mol Neurosci. 17(2):137-45.

Glenner GG, Wong CW (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. Biochem Biophys Res Commun 120(3):885-890.

González AE, Muñoz VC, Cavieres VA, Bustamante HA, Cornejo VH, Januário YC, González I, Hetz C, daSilva LL, Rojas-Fernández A, Hay RT, Mardones GA, Burgos PV (2017). Autophagosomes cooperate in the degradation of intracellular C-terminal fragments of the amyloid precursor protein *via* the MVB/lysosomal pathway. FASEB J 31(6):2446-2459. doi : 10.1096/fj.201600713R.

Goodger ZV, Rajendran L, Trutzel A, Kohli BM, Nitsch RM, Konietzko U (2009). Nuclear signaling by the APP intracellular domain occurs predominantly through the amyloidogenic processing pathway. J Cell Sci 122(Pt 20):3703-3714.

Gouras GK, Tsai J, Naslund J, Vincent B, Edgar M, Checler F, Greenfield JP, Haroutunian V, Buxbaum JD, Xu H, Greengard P, Relkin NR (2000). Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. Am J Pathol. 156(1):15-20.

Gouras GK, Almeida CG, Takahashi RH (2005). Intraneuronal Abeta accumulation and origin of plaques in Alzheimer's disease. Neurobiol Aging. 26(9):1235-44.

Goutte C, Hepler W, Mickey KM, Priess JR (2000). aph-2 encodes a novel extracellular protein required for GLP-1-mediated signaling. Development 127(11):2481-2492.

Goutte C, Tsunozaki M, Hale VA, Priess JR (2002). APH-1 is a multipass membrane protein essential for the Notch signaling pathway in Caenorhabditis elegans embryos. Proc Natl Acad Sci U S A 99(2):775-9.

Greenfield JP, Tsai J, Gouras GK, Hai B, Thinakaran G, Checler F, Sisodia SS, Greengard P, Xu H (1998). Endoplasmic reticulum and trans-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer beta-amyloid peptides. Proc Natl Acad Sci U S A 96(2):742-747.

Greenfield JP, Gouras GK, Xu H (1998). Cellular and molecular basis of beta-amyloid precursor protein metabolism. Front Biosci. 3 : d399-407.

Gu Y, Misonou H, Sato T, Dohmae N, Takio K, Ihara Y (2001). Distinct intramembrane cleavage of the beta-amyloid precursor protein family resembling gamma-secretase-like cleavage of Notch (2001). J Biol Chem 276(38):35235-35238.

Gu Y, Chen F, Sanjo N, Kawarai T, Hasegawa H, Duthie M, Li W, Ruan X, Luthra A, Mount HT, Tandon A, Fraser PE, St George-Hyslop P (2003). APH-1 interacts with mature and immature forms of presenilins and nicastrin and may play a role in maturation of presenilin.nicastrin complexes. J Biol Chem 278(9):7374-7380.

Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, et al (1992). Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. Nature 359(6393):322-325.

Haass C, Lemere CA, Capell A, Citron M, Seubert P, Schenk D, Lannfelt L, Selkoe DJ (1995). The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. Nat Med 1(12):1291-1296.

Haass C. Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation (2004). EMBO J 23(3):483-8.

Hamid R, Kilger E, Willem M, Vassallo N, Kostka M, Bornhövd C, Reichert AS, Kretzschmar HA, Haass C, Herms J (2007). Amyloid precursor protein intracellular domain modulates cellular calcium homeostasis and ATP content. J Neurochem 102(4):1264-1275.

Hampe W, Rezgaoui M et al (2001). The genes for the human VPS10 domain-containing receptors are large and contain many small exons. Hum Genet 108(6): 529-536.

Hardy JA, Higgins GA (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. Science 256(5054):184-185.

He X, Li F, Chang WP et Tang J (2005). GGA proteins mediate the recycling pathway of memapsin 2 (BACE). J Biol Chem 280(12): 11696-11703.

Hersh LB, Rodgers DW (2008). Neprilysin and amyloid beta peptide degradation. Curr Alzheimer Res 5(2):225-31.

Hermey G, Riedel IB, et al (1999). Identification and characterization of SorCS, a third member of a novel receptor family. Biochem Biophys Res Commun 266(2): 347-351.

Herzog V, Kirfel G, Siemes C, Schmitz A (2004). Biological roles of APP in the epidermis. Eur J Cell Biol 83(11-12):613-24.

Higuchi M, Iwata N, Matsuba Y, Sato K, Sasamoto K, Saido TC (2005). 19F and 1H MRI detection of amyloid beta plaques in vivo. Nat Neurosci 8(4):527-533.

Holsinger RM, McLean CA, Beyreuther K, Masters CL, Evin G (2002). Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease. Ann Neurol 51(6):783-786.

Hussain I, Powell D, Howlett DR, Tew DG, Meek TD, Chapman C, Gloger IS, Murphy KE, Southan CD, Ryan DM, Smith TS, Simmons DL, Walsh FS, Dingwall C, Christie G (1999). Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. Mol Cell Neurosci 14(6):419-427.

Iwatsubo T, Saido TC, Mann DM, Lee VM, Trojanowski JQ (1996). Full-length amyloid-beta (1-42(43)) and amino-terminally modified and truncated amyloid-beta 42(43) deposit in diffuse plaques (1996). Am J Pathol 149(6):1823-1830.

Jack CR Jr, Petersen RC, Xu Y, O'Brien PC, Smith GE, Ivnik RJ, Boeve BF, Tangalos EG, Kokmen E (2000). Rates of hippocampal atrophy correlate with change in clinical status in aging and AD. Neurology 55(4):484-489.

Jacobsen L, Madsen P, Jacobsen C, Nielsen MS, Gliemann J et Petersen CM (2001). Activation and functional characterization of the mosaic receptor SorLA/LRl 1. J Biol Chem 276(25): 22788-22796.

Jacobsen L, Madsen P, Nielsen MS, Geraerts WP, Gliemann J, Smit AB et Petersen CM (2002). The sorLA cytoplasmic domain interacts with GGA1 and - 2 and defines minimum requirements for GGA binding. FEBS Lett 511(1-3): 155- 158.

Jaeger S et Pietrzik CU (2008). Functional role of lipoprotein receptors in Alzheimer's disease. Curr Alzheimer Res 5(1): 15-25.

Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT 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(18):4693-4697.

Jarrett JT, Lansbury PT Jr (1993). Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? Cell 73(6):1055-1058.

Johnson GV, Jenkins SM (1999). Tau protein in normal and Alzheimer's disease brain. J Alzheimers Dis 1(4-5):307328.

Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, Snaedal J, Jonsson PV, Bjornsson S, Stefansson H, Sulem P, Gudbjartsson D, Maloney J, Hoyte K, Gustafson A, Liu Y, Lu Y, Bhangale T, Graham RR, Huttenlocher J, Bjornsdottir G, Andreassen OA, Jönsson EG, Palotie A, Behrens TW, Magnusson OT, Kong A, Thorsteinsdottir U, Watts RJ, Stefansson K (2012). A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. Nature 488(7409):96-9. doi: 10.1038/nature11283.

Kaether C, Capell A, Edbauer D, Winkler E, Novak B, Steiner H, Haass C (2004). The presenilin C-terminus is required for ER-retention, nicastrin-binding and gamma-secretase activity. EMBO J 23(24):4738-48. Epub 2004 Nov 18.

Khachaturian ZS (2011). Revised criteria for diagnosis of Alzheimer's disease: National Institute on Aging-Alzheimer's Association diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimers Dement 7(3):253-6. doi: 10.1016/j.jalz.2011.04.003.

Kakuda N, Funamoto S, Yagishita S, Takami M, Osawa S, Dohmae N, Ihara Y (2006). Equimolar production of amyloid beta-protein and amyloid precursor protein intracellular domain from beta-carboxyl-terminal fragment by gamma-secretase. J Biol Chem 281(21):14776-14786.

Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S, Malinow R (2003). APP processing and synaptic function. Neuron 37(6):925-937.

Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. Nature 325(6106):733-736.

Kása P, Rakonczay Z, Gulya K (1997). The cholinergic system in Alzheimer's disease. Prog Neurobiol 52(6):511-535.

Kessels HW, Nguyen LN, Nabavi S, Malinow R (2010). The prion protein as a receptor for amyloid-beta. Nature 466(7308):E3-4; discussion E4-5.

Kienlen-Campard P, Miolet S, Tasiaux B, Octave JN (2002). Intracellular amyloid-beta 1-42, but not extracellular soluble amyloid-beta peptides, induces neuronal apoptosis. J Biol Chem. 277(18):15666-70.

Kim HS, Kim EM, Lee JP, Park CH, Kim S, Seo JH, Chang KA, Yu E, Jeong SJ, Chong YH, Suh YH (2003). C-terminal fragments of amyloid precursor protein exert neurotoxicity by inducing glycogen synthase kinase-3beta expression. FASEB J 17(13):1951-1953.

Kim SH, Yin YI, Li YM, Sisodia SS (2004). Evidence that assembly of an active gamma-secretase complex occurs in the early compartments of the secretory pathway. J Biol Chem 279(47):48615-9.

Kimberly WT, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, Ye W, Wolfe MS, Selkoe DJ (2003). Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. Proc Natl Acad Sci U S A 100(11):6382-7.

Kitaguchi N, Takahashi Y, Tokushima Y, Shiojiri S, Ito H (1998). Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. Nature 331(6156):530-532.

Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP, Bergström M, Savitcheva I, Huang GF, Estrada S, Ausén B, Debnath ML, Barletta J, Price JC, Sandell J, Lopresti BJ, Wall A, Koivisto P, Antoni G, Mathis CA, Långström B (2004). Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. Ann Neurol 55(3):306-319.

Koike H, Tomioka S, Sorimachi H, Saido TC, Maruyama K, Okuyama A, Fujisawa-Sehara A, Ohno S, Suzuki K, Ishiura S (1999). Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. Biochem J 343 Pt 2:371-375.

Komarov PG, Komarova EA, Kondratov RV, Christov-Tselkov K, Coon JS, Chernov MV, Gudkov AV (1999). A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. Science 285(5434):1733-7.

Koo EH, Squazzo SL (1994). Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. J Biol Chem 269(26):17386-17389.

Kuperstein I, Broersen K, Benilova I, Rozenski J, Jonckheere W, Debulpaep M, Vandersteen A, Segers-Nolten I, Van Der Werf K, Subramaniam V, Braeken D, Callewaert G, Bartic C, D'Hooge R, Martins IC, Rousseau F, Schymkowitz J, De Strooper B (2010). Neurotoxicity of Alzheimer's disease Aβ peptides is induced by small changes in the Aβ42 to Aβ40 ratio. EMBO J 29(19):3408-3420.

Lambert JC, **Amouyel P** (2011). Genetics of Alzheimer's disease: new evidences for an old hypothesis? Curr Opin Genet Dev 21(3):295-301.

Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F (1999). Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. Proc Natl Acad Sci U S A 96(7):3922-3927.

Lane RF, Raines SM, Steele JW, Ehrlich ME, Lah JA, Small SA, Tanzi RE, Attie AD et Gandy S (2010). Diabetes-associated SorCS1 regulates Alzheimer's amyloid-beta metabolism: evidence for involvement of SorL1 and the retromer complex. J Neurosci 30(39): 13110-13115.

Laurén J, Gimbel DA, Nygaard HB, Gilbert JW, Strittmatter SM (2009). Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. Nature 457(7233):1128-32.

Lauritzen I, Pardossi-Piquard R, Bauer C, Brigham E, Abraham JD, Ranaldi S, Fraser P, St-George-Hyslop P, Le Thuc O, Espin V, Chami L, Dunys J, Checler F (2012). The β-secretase-derived C-terminal fragment of βAPP, C99, but not Aβ, is a key contributor to early intraneuronal lesions in triple-transgenic mouse hippocampus. J Neurosci 32(46):16243-1655a. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2775-12.

Lauritzen I, Pardossi-Piquard R, Bourgeois A, Pagnotta S, Biferi MG, Barkats M, Lacor P, Klein W, Bauer C, Checler F (2016). Intraneuronal aggregation of the β-CTF fragment of APP (C99) induces Aβ-independent lysosomal-autophagic pathology. Acta Neuropathol 132(2):257-76. doi: 10.1007/s00401-016-1577-6.

Lee J, Rétamai C, Cuitino L, Caruano-Yzermans A, Shin JE, van Kerkhof P, Marzolo MP et Bu G (2008). Adaptor protein sorting nexin 17 regulates amyloid precursor protein trafficking and processing in the early endosomes. J Biol Chem 283(17): 11501-11508.

Lee MK, Slunt HH, Martin LJ, Thinakaran G, Kim G, Gandy SE, Seeger M, Koo E, Price DL, Sisodia SS (1996). Expression of presenilin 1 and 2 (PS1 and PS2) in human and murine tissues. J Neurosci 16(23):7513-7525.

Levy E, Carman MD, Fernandez-Madrid IJ, Power MD, Lieberburg I, van Duinen SG, Bots GT, Luyendijk W, Frangione B (1990). Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. Science 248(4959):1124-6.

Li T, Ma G, Cai H, Price DL, Wong PC (2003). Nicastrin is required for assembly of presenilin/gamma-secretase complexes to mediate Notch signaling and for processing and trafficking of beta-amyloid precursor protein in mammals. J Neurosci 23(8):3272-3277.

Li Y, Cam J et Bu G (2001). "Low-density lipoprotein receptor family: endocytosis and signal transduction." Mol Neurobiol 23(1): 53-67.

Li Y, Zhou W, Tong Y, He G, Song W (2006). Control of APP processing and Abeta generation level by BACE1 enzymatic activity and transcription. FASEB J 20(2):285-292.

Lin X, Koelsch G, Wu S, Downs D, Dashti A, Tang J (2000). Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. Proc Natl Acad Sci U S A 97(4):1456-1460.

Liu HC, Leu SJ, Chang JG, Sung SM, Hsu WC, Lee LS, Hu CJ (2003). The association of beta-site APP cleaving enzyme (BACE) C786G polymorphism with Alzheimer's disease. Brain Res 961(1):88-91.

Liu Q, Zerbinatti CV, Zhang J, Hoe HS, Wang B, Cole SL, Herz J, Muglia L, Bu G (2007). Amyloid precursor protein regulates brain apolipoprotein E and cholesterol metabolism through lipoprotein receptor LRP1. Neuron 56(1):66-78.

Lorenzen A, Samosh J, Vandewark K, Anborgh PH, Seah C, Magalhaes AC, Cregan SP, Ferguson SS et Pasternak SH (2010). Rapid and direct transport of cell surface APP to the lysosome defines a novel selective pathway. Mol Brain 3: 11.

Louwersheimer E, Ramirez A, Cruchaga C, Becker T, Kornhuber J, Peters O, Heilmann S, Wiltfang J, Jessen F, Visser PJ, Scheltens P, Pijnenburg YA, Teunissen CE, Barkhof F, van Swieten JC, Holstege H, Van der Flier WM ; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative and Dementia Competence Network (2015). Influence of genetic variants in SORL1 gene on the manifestation of Alzheimer's disease. Neurobiol Aging 36(3):1605.e13-20. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.12.007.

Lu DC, Rabizadeh S, Chandra S, Shayya RF, Ellerby LM, Ye X, Salvesen GS, Koo EH, Bredesen DE (2000). A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid beta-protein precursor. Nat Med 6(4):397-404.

Maloney B, Lahiri DK (2011). The Alzheimer's amyloid β-peptide (Aβ) binds a specific DNA Aβ-interacting domain (AβID) in the APP, BACE1, and APOE promoters in a sequence-specific manner: characterizing a new regulatory motif. Gene 488(1-2):1-12.

Marambaud P, Ancolio K, Lopez-Perez E, Checler F (1998). Proteasome inhibitors prevent the degradation of familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 and potentiate A beta 42 recovery from human cells. Mol Med 4(3):147-57.

Marcusson EG, Horazdovsky BF et al (1994). The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the VPS10 gene. Cell 77(4): 579-586.

Martin BL, Schrader-Fischer G, Busciglio J, Duke M, Paganetti P, Yankner BA (1995). Intracellular accumulation of beta-amyloid in cells expressing the Swedish mutant amyloid precursor protein. J Biol Chem. 270(45):26727-30.

Marzolo MP et Bu G (2009). Lipoprotein receptors and cholesterol in APP trafficking and proteolytic processing, implications for Alzheimer's disease. Semin Cell Dev Biol 20(2): 191-200.

Master CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL and Beyreuther K (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. Proc Natl Acad Sci USA 82, 4245-4249.

Mattson MP (1997). Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. Physiol Rev 77(4):1081-1132.

May P, Woldt E, Matz RL et Boucher P (2007). "The LDL receptor-related protein (LRP) family: an old family of proteins with new physiological functions." Ann Med 39(3): 219-228.

Meziane H, Dodart JC, Mathis C, Little S, Clemens J, Paul SM, Ungerer A (1998). Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnestic mice. Proc Natl Acad Sci U S A 95(21):12683-8.

Miller DL, Papayannopoulos IA, Styles J, Bobin SA, Lin YY, Biemann K, Iqbal K (1993). Peptide compositions of the cerebrovascular and senile plaque core amyloid deposits of Alzheimer's disease. Arch Biochem Biophys 301(1):41-52.

Miners JS, Baig S, Palmer J, Palmer LE, Kehoe PG, Love S. Abeta-degrading enzymes in Alzheimer's disease (2008). Brain Pathol 18(2):240-52. doi: 10.1111/j.1750-3639.2008. 00132.x.

Morley JE, Farr SA, Banks WA, Johnson SN, Yamada KA, Xu L (2010). A physiological role for amyloid-beta protein: enhancement of learning and memory. J Alzheimers Dis 19(2):441-9.

Muhammad A, Flores I, Zhang H, Yu R, Staniszewski A, Planel E, Herman M, Ho L, Kreber R, Honig LS, Ganetzky B, Duff K, Arancio O et Small SA (2008). Retromer deficiency observed in Alzheimer's disease causes hippocampal dysfunction, neurodegeneration, and Abeta accumulation. Proc Natl Acad Sci U S A 105(20): 7327-7332.

Nalivaeva NN, Fisk LR, Belyaev ND, Turner AJ (2008). Amyloid-degrading enzymes as therapeutic targets in Alzheimer's disease. Curr Alzheimer Res 5(2):212-24.

Nicolas G, Wallon D, Charbonnier C, Quenez O, Rousseau S, Richard AC et al (2016a). Screening of dementia genes by whole-exome sequencing in early-onset Alzheimer disease: input and lessons. Eur J Hum Genet 24(5) :710-6.

Nicolas G, Charbonnier C, Wallon D, Quenez O, Bellenguez C, Grenier-Boley B et al (2016b). SORL1 rare variants: a major risk factor for familial early-onset Alzheimer’s disease. CNR-MAJ collaborators. Mol Psychiatry 21(6):831-6.

Nikolaev A, McLaughlin T, O'Leary DD, Tessier-Lavigne M (2009). APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. Nature 457(7232):981-989.

Nilsberth C, Westlind-Danielsson A, Eckman CB, Condron MM, Axelman K, Forsell C, Stenh C, Luthman J, Teplow DB, Younkin SG, Näslund J, Lannfelt L (2001). The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation. Nat Neurosci 4(9):887-93.

Nordstedt C, Caporaso GL, Thyberg J, Gandy SE et Greengard P (1993). Identification of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein in clathrincoated vesicles purified from PC12 cells. J Biol Chem 268(1): 608-612.

Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, Ghanbari H, Wataya T, Shimohama S, Chiba S, Atwood CS, Petersen RB, Smith MA (2001). Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. J Neuropathol Exp Neurol 60(8):759-767.

Nyborg AC, Ladd TB, Zwizinski CW, Lah JJ et Golde TE (2006). Sortilin, SorCSlb, and SorLA VpslOp sorting receptors, are novel gamma-secretase substrates. M o l N e u r o d e g e n e r 1: 3.

Ohsawa I, Takamura C, Morimoto T, Ishiguro M, Kohsaka S (1999). Amino-terminal region of secreted form of amyloid precursor protein stimulates proliferation of neural stem cells. Eur J Neurosci 11(6):1907-1913.

Okada H, Zhang W, Peterhoff C, Hwang JC, Nixon RA, Ryu SH et Kim TW (2010). Proteomic identification of sorting nexin 6 as a negative regulator of BACE1-mediated APP processing. FASEB J 24(8): 2783-2794.

Osenkowski P, Li H, Ye W, Li D, Aeschbach L, Fraering PC, Wolfe MS, Selkoe DJ, Li H (2009). Cryoelectron microscopy structure of purified gamma-secretase at 12 A resolution. J Mol Biol 385(2):642-652.

Pardossi-Piquard R, Petit A, Kawarai T, Sunyach C, Alves da Costa C, Vincent B, Ring S, D'Adamio L, Shen J, Müller U, St George Hyslop P, Checler F (2005). Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP. Neuron 46(4):541-554.

Pardossi-Piquard R, Dunys J, Yu G, St George-Hyslop P, Alves da Costa C, Checler F (2006). Neprilysin activity and expression are controlled by nicastrin. J Neurochem 97(4):1052-1056.

Pardossi-Piquard R, Checler F (2012)**.** The physiology of the β-amyloid precursor protein intracellular domain AICD. J Neurochem 120 Suppl 1:109-124.

Peraus GC, Masters CL et Beyreuther K (1997). Late compartments of amyloid precursor protein transport in SY5Y cells are involved in beta-amyloid secretion. J Neurosci 17(20): 7714-7724.

Perez RG, Squazzo SL, Koo EH (1996). Enhanced release of amyloid beta-protein from codon 670/671 "Swedish" mutant beta-amyloid precursor protein occurs in both secretory and endocytic pathways. J Biol Chem 271(15):9100-7.

Perez RG, Soriano S, Hayes JD, Ostaszewski B, Xia W, Selkoe DJ, Chen X, Stokin GB et Koo EH (1999). Mutagenesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including Abeta42. J Biol Chem 274(27): 18851-18856.

Petersen CM, Nielsen MS et al (1997). Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. J Biol Chem 272(6): 3599-3605.

Plant LD, Boyle JP, Smith IF, Peers C, Pearson HA (2003). The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. J Neurosci 23(13):5531-5535.

Pottier C, Hannequin D, Coutant S, Rovelet-Lecrux A, Wallon D, Rousseau S, Legallic S, Paquet C, Bombois S, Pariente J, Thomas-Anterion C, Michon A, Croisile B, Etcharry-Bouyx F, Berr C, Dartigues JF, Amouyel P, Dauchel H, Boutoleau-Bretonnière C, Thauvin C, Frebourg T, Lambert JC, Campion D; PHRC GMAJ Collaborators (2012). High frequency of potentially pathogenic SORL1 mutations in autosomal dominant early-onset Alzheimer disease. Mol Psychiatry 17(9):875-9.

Puzzo D, Privitera L, Leznik E, Fà M, Staniszewski A, Palmeri A, Arancio O (2008). Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. J Neurosci 28(53):14537-45.

Qi-Takahara Y, Morishima-Kawashima M, Tanimura Y, Dolios G, Hirotani N, Horikoshi Y, Kametani F, Maeda M, Saido TC, Wang R, Ihara Y (2005). Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase. J Neurosci 25(2):436-445.

Reitz C, Cheng R, Rogaeva E, Lee JH, Tokuhiro S, Zou F et al (2011). Meta-analysis of the association between variants in SORL1 and Alzheimer disease. Genetic and Environmental Risk in Alzheimer Disease 1 Consortium. Arch Neurol 68(1):99-106.

Rezgaoui M, Hermey G et al (2001). Identification of SorCS2, a novel member of the VPS10 domain containing receptor family, prominently expressed in the developing mouse brain. Mech Dev 100(2) : 335-338.

Rogaeva E, Meng Y, Lee JH, Gu Y, Kawarai T, Zou F, Katayama T et al (2007). The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. Nat Genet 39(2) :168-77.

Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerrière A, Vital A, Dumanchin C, Feuillette S, Brice A, Vercelletto M, Dubas F, Frebourg T, Campion D (2006). APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. Nat Genet 38(1):24-26.

Rui Y, Gu J, Yu K, Hartzell HC, Zheng JQ (2010). Inhibition of AMPA receptor trafficking at hippocampal synapses by beta-amyloid oligomers: the mitochondrial contribution. Mol Brain. 3:10.

Sato T, Dohmae N, Qi Y, Kakuda N, Misonou H, Mitsumori R, Maruyama H, Koo EH, Haass C, Takio K, Morishima-Kawashima M, Ishiura S, Ihara Y (2003). Potential link between amyloid

beta-protein 42 and C-terminal fragment gamma 49-99 of beta-amyloid precursor protein. J Biol Chem 278(27):24294-24301.

Sato T, Diehl TS, Narayanan S, Funamoto S, Ihara Y, De Strooper B, Steiner H, Haass C, Wolfe MS (2007). Active gamma-secretase complexes contain only one of each component. J Biol Chem 282(47):33985-33993.

Scherzer CR, Offe K, Gearing M, Rees HD, Fang G, Heilman CJ, Schaller C, Bujo H, Levey AI et Lah JJ (2004). Loss of apolipoprotein E receptor LR11 in Alzheimer disease. Arch Neurol 61(8): 1200-1205.

Schmidt V, Sporbert A, Rohe M, Reimer T, Rehm A, Andersen OM et Willnow TE (2007). SorLA/LRl 1 regulates processing of amyloid precursor protein via interaction with adaptors GGA and PACS-1. J Biol Chem 282(45): 32956-32964.

Seabrook GR, Smith DW, Bowery BJ, Easter A, Reynolds T, Fitzjohn SM, Morton RA, Zheng H, Dawson GR, Sirinathsinghji DJ, Davies CH, Collingridge GL, Hill RG (1999). Mechanisms contributing to the deficits in hippocampal synaptic plasticity in mice lacking amyloid precursor protein. Neuropharmacology 38(3):349-359.

Selkoe DJ (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. Physiol Rev 81(2): 741-766.

Seubert P, Oltersdorf T, Lee MG, Barbour R, Blomquist C, Davis DL, Bryant K, Fritz LC, Galasko D, Thal LJ, et al (1993). Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide. Nature 361(6409):260-263.

Sevalle J, Amoyel A, Robert P, Fournié-Zaluski MC, Roques B, Checler F (2009). Aminopeptidase A contributes to the N-terminal truncation of amyloid beta-peptide. J Neurochem 109(1):248-56. doi : 10.1111/j.1471-4159.2009.05950.x.

Sevalle J, Ayral E, Hernandez JF, Martinez J, Checler F (2009). Pharmacological evidences for DFK167-sensitive presenilin-independent gamma-secretase-like activity. J Neurochem 110(1):275-83.

Shah S, Lee SF, Tabuchi K, Hao YH, Yu C, LaPlant Q, Ball H, Dann CE 3rd, Südhof T, Yu G (2005). Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. Cell 122(3):435-447.

Shah S et Yu G (2006). sorLA: sorting out APP. Mol Interv 6(2): 74-76.

Shirotani K, Tsubuki S, Iwata N, Takaki Y, Harigaya W, Maruyama K, Kiryu-Seo S, Kiyama H, Iwata H, Tomita T, Iwatsubo T, Saido TC (2001). Neprilysin degrades both amyloid beta peptides 1-40 and 1-42 most rapidly and efficiently among thiorphan- and phosphoramidon-sensitive endopeptidases. J Biol Chem 276(24):21895-901.

Siemes C, Quast T, Kummer C, Wehner S, Kirfel G, Müller U, Herzog V (2006). Keratinocytes from APP/APLP2-deficient mice are impaired in proliferation, adhesion and migration in vitro. Exp Cell Res 312(11):1939-1949.

Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J, Jacobson-Croak K, Jewett N, Keim P, Knops J, Lieberburg I, Power M, Tan H, Tatsuno G, Tung J, Schenk D, Seubert P, Suomensaari SM, Wang S, Walker D, Zhao J, McConlogue L, John V (1999). Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. Nature 402(6761):537-540.

Small SA, Kent K, Pierce A, Leung C, Kang MS, Okada H, Honig L, Vonsattel JP et Kim TW (2005). Model-guided microarray implicates the retromer complex in Alzheimer's disease. Ann Neurol 58(6): 909-919.

Small SA (2008). Retromer sorting: a pathogenic pathway in late-onset Alzheimer disease. Arch Neurol 65(3): 323-328.

Small SA et Gandy S (2006). Sorting through the cell biology of Alzheimer's disease: intracellular pathways to pathogenesis. Neuron 52(1): 15-31.

Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK, Greengard P (2005). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. Nat Neurosci. (8):1051-8.

Sonkusare SK, Kaul CL, Ramarao P (2005). Dementia of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders--memantine, a new hope. Pharmacol Res. 51(1):1-17.

Spoelgen R, von Arnim CA, Thomas AV, Peltan ID, Koker M, Deng A, Irizarry MC, Andersen OM, Willnow TE et Hyman BT (2006). Interaction of the cytosolic domains of sorLA/LRl 1 with the amyloid precursor protein (APP) and beta-secretase beta-site APP-cleaving enzyme." J Neurosci 26(2): 418-428.

St George-Hyslop PH (2000). Molecular genetics of Alzheimer's disease. Biol Psychiatry 47(3):183-199.

Steiner H, Winkler E, Edbauer D, Prokop S, Basset G, Yamasaki A, Kostka M, 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(42):39062-39065.

Strozyk D, Blennow K, White LR, Launer LJ (2003). CSF A 42 levels correlate with amyloid-neuropathology in a population-based autopsy study. Neurology 60(4):652-6.

Sullivan CP, Jay AG, Stack EC, Pakaluk M, Wadlinger E, Fine RE, Wells JM et Morin PJ (2011). Retromer disruption promotes amyloidogenic APP processing. Neurobiol Pis 43(2): 338-345.

Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L Jr, Eckman C, Golde TE, Younkin SG (1994). An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. Science 264(5163):1336-40.

Takami M, Nagashima Y, Sano Y, Ishihara S, Morishima-Kawashima M, Funamoto S, Ihara Y (2009). gamma-Secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of beta-carboxyl terminal fragment. J Neurosci 29(41):13042-13052.

Takasugi N, Tomita T, Hayashi I, Tsuruoka M, Niimura M, Takahashi Y, Thinakaran G, Iwatsubo T (2003). The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. Nature 422(6930):438-41.

Takeda K, Araki W, Akiyama H, Tabira T (2004). Amino-truncated amyloid beta-peptide (Abeta5-40/42) produced from caspase-cleaved amyloid precursor protein is deposited in Alzheimer's disease brain. FASEB J 18(14):1755-1777.

Tang BL (2009). Neuronal protein trafficking associated with Alzheimer disease: from APP and BACE1 to glutamate receptors. Cell Adh Migr 3(1): 118-128.

Tapiola T, Alafuzoff I, Herukka S, et al (2009). Cerebrospinal fluid β-amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of alzheimer-type pathologic changes in the brain. Arch Neurol 66(3):382-9.

Taylor CJ, Ireland DR, Ballagh I, Bourne K, Marechal NM, Turner PR, Bilkey DK, Tate WP, Abraham WC (2008). Endogenous secreted amyloid precursor protein-alpha regulates hippocampal NMDA receptor function, long-term potentiation and spatial memory. Neurobiol Dis 31(2):250-260.

Thal DR, Sassin I, Schultz C, Haass C, Braak E, Braak H (1999). Fleecy amyloid deposits in the internal layers of the human entorhinal cortex are comprised of N-terminal truncated fragments of Abeta. J Neuropathol Exp Neurol 58(2):210-216.

Thinakaran G, Borchelt DR, Lee MK, Slunt HH, Spitzer L, Kim G, Ratovitsky T, Davenport F, Nordstedt C, Seeger M, Hardy J, Levey AI, Gandy SE, Jenkins NA, Copeland NG, Price DL, Sisodia SS (1996). Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. Neuron 17(1):181-190.

Thinakaran G et Koo EH (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. J Biol Chem 283(44): 29615-29619.

Tienari PJ, Ida N, Ikonen E, Simons M, Weidemann A, Multhaup G, Masters CL, Dotti CG, Beyreuther K (1997). Intracellular and secreted Alzheimer beta-amyloid species are generated by distinct mechanisms in cultured hippocampal neurons. Proc Natl Acad Sci U S A. 94(8):4125-30.

Tremml P, Lipp HP, Müller U, Ricceri L, Wolfer DP (1998). Neurobehavioral development, adult openfield exploration and swimming navigation learning in mice with a modified beta-amyloid precursor protein gene. Behav Brain Res 95(1):65-76.

Turner PR, O'Connor K, Tate WP et Abraham WC (2003). Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. Prog Neurobiol 70(1): 1-32.

Tyler SJ, Dawbarn D, Wilcock GK, Allen SJ (2002). alpha- and beta-secretase: profound changes in Alzheimer's disease. Biochem Biophys Res Commun 299(3):373-376.

Vardarajan BN, Zhang Y, Lee JH, Cheng R, Bohm C, Ghani M, Reitz C, Reyes-Dumeyer D, Shen Y, Rogaeva E, St George-Hyslop P, Mayeux R (2015). Coding mutations in SORL1 and Alzheimer disease. Ann Neurol 77(2):215-27. doi: 10.1002/ana.24305.

Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. Science 286(5440):735-741.

Vieira SI, Rebelo S, Esselmann H, Wiltfang J, Lah J, Lane R, Small SA, Gandy S, da Cruz ESEF et da Cruz ESOA (2010). Retrieval of the Alzheimer's amyloid precursor protein from the endosome to the TGN is S655 phosphorylation state-dependent and retromer-mediated. Mol Neurodegener 5 : 40.

Vingtdeux V, Hamdane M, Loyens A, Gelé P, Drobeck H, Bégard S, Galas MC, Delacourte A, Beauvillain JC, Buée L, Sergeant N (2007). Alkalizing drugs induce accumulation of amyloid precursor protein by-products in luminal vesicles of multivesicular bodies. J Biol Chem. 282(25):18197-205.

von Rotz RC, Kohli BM, Bosset J, Meier M, Suzuki T, Nitsch RM, Konietzko U (2004). The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. J Cell Sci 117(Pt 19):4435-4448.

Walsh DM, Tseng BP, Rydel RE, Podlisny MB, Selkoe DJ (2000). The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain. Biochemistry 39(35):10831-9.

Wang JF, Lu R et Wang YZ (2010). Regulation of beta cleavage of amyloid precursor protein. Neurosci Bull 26(5): 417-427.

Weidemann A, König G, Bunke D, Fischer P, Salbaum JM, Masters CL, Beyreuther K (1989). Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. Cell 57(1):115-126.

Weidemann A, Eggert S, Reinhard FB, Vogel M, Paliga K, Baier G, Masters CL, Beyreuther K, Evin G (2002). A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing. Biochemistry 41(8):2825-2835.

Wertkin AM, Turner RS, Pleasure SJ, Golde TE, Younkin SG, Trojanowski JQ, Lee VM (1993). Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular beta-amyloid or A4 peptides. Proc Natl Acad Sci U S A. 90(20):9513-7.

Westergaard UB, Sorensen ES, Hermey G, Nielsen MS, Nykjaer A, Kirkegaard K, Jacobsen C, Gliemann J, Madsen P, Petersen CM (2004). Functional organization of the sortilin Vps10p domain. J Biol Chem. 279(48):50221-9.

White AR, Reyes R, Mercer JF, Camakaris J, Zheng H, Bush AI, Multhaup G, Beyreuther K, Masters CL, Cappai R (1999). Copper levels are increased in the cerebral cortex and liver of APP and APLP2 knockout mice. Brain Res 842(2):439-444.

Wild-Bode C, Yamazaki T, Capell A, Leimer U, Steiner H, Ihara Y, Haass C (1997). Intracellular generation and accumulation of amyloid beta-peptide terminating at amino acid 42. J Biol Chem. 272(26):16085-8.

Willnow TE, Petersen CM et al (2008). VPS10P-domain receptors - regulators of neuronal viability and function. Nat Rev Neurosci 9(12):899-909.

Willnow TE, Carlo AS, Rohe M et Schmidt V (2010). SORLA/SORL1, a neuronal sorting receptor implicated in Alzheimer's disease. Rev Neurosci 21(4): 315-329.

Wilson CA, Doms RW, Lee VM (1999). Intracellular APP processing and A beta production in Alzheimer disease. J Neuropathol Exp Neurol 58(8):787-94.

Wilson CA, Doms RW, Zheng H, Lee VM (2002). Presenilins are not required for A beta 42 production in the early secretory pathway. Nat Neurosci 5(9):849-855.

Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT, Selkoe DJ (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. Nature 398(6727):513-7.

Yagishita S, Morishima-Kawashima M, Ishiura S, Ihara Y (2008). Abeta46 is processed to Abeta40 and Abeta43, but not to Abeta42, in the low density membrane domains. J Biol Chem 283(2):733-738.

Yan R, Bienkowski MJ, Shuck ME, Miao H, Tory MC, Pauley AM, Brashier JR, Stratman NC, Mathews WR, Buhl AE, Carter DB, Tomasselli AG, Parodi LA, Heinrikson RL, Gurney ME (1999). Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. Nature 402(6761):533-537.

Yu C, Kim SH, Ikeuchi T, Xu H, Gasparini L, Wang R, Sisodia SS (2001). Characterization of a presenilin-mediated amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment gamma. Evidence for distinct mechanisms involved in gamma -secretase processing of the APP and Notch1 transmembrane domains. J Biol Chem 276(47):43756-60.

Yu G, Nishimura M, Arawaka S, Levitan D, Zhang L, Tandon A, Song YQ, Rogaeva E, Chen F, Kawarai T, Supala A, Levesque L, Yu H, Yang DS, Holmes E, Milman P, Liang Y, Zhang DM, Xu DH, Sato C, Rogaev E, Smith M, Janus C, Zhang Y, Aebersold R, Farrer LS, Sorbi S, Bruni A, Fraser P, St George-Hyslop P (2000). Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. Nature 407(6800):48-54.

Zhang Y, McLaughlin R, Goodyer C, LeBlanc A (2002). Selective cytotoxicity of intracellular amyloid beta peptide1-42 through p53 and **Bax** in cultured primary human neurons. J Cell Biol. 156(3):519-29.

Zhang YW, Wang R, Liu Q, Zhang H, Liao FF, Xu H (2007). Presenilin/gamma-secretase-dependent processing of beta-amyloid precursor protein regulates EGF receptor expression. Proc Natl Acad Sci U S A 104(25):10613-10618.

Zhang YW, Thompson R, Zhang H et Xu H (2011). APP processing in Alzheimer's disease. Mol Brain 4: 3.

Zhi P, Chia C et Gleeson PA (2011). Intracellular trafficking of the beta-secretase and processing of amyloid precursor protein. IUBMB Life 63(9): 721-729.

Zou K, Gong JS, Yanagisawa K, Michikawa M (2002). A novel function of monomeric amyloid beta-protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage. J Neurosci. 2002 Jun 15;22(12):4833-41.