

Université de Sherbrooke

**LRP10 (LDL-related protein 10), un nouveau régulateur du trafic et du clivage de la protéine APP (amyloid precursor protein), est réduit dans la maladie d'Alzheimer**

Par  
Julie Brodeur  
Département de Pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention  
du diplôme de maître ès sciences (M. Sc.) en pharmacologie

Sherbrooke, Québec, Canada  
Janvier, 2012

Membres du jury d'évaluation  
Pr Christine Lavoie, Pharmacologie  
Pr Jean-Bernard Denault, Pharmacologie  
Pr Xavier Roucou, Biochimie

© Julie Brodeur, 2012



Library and Archives  
Canada

Published Heritage  
Branch

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*ISBN: 978-0-494-90982-9*

*Our file Notre référence*

*ISBN: 978-0-494-90982-9*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

# **LRP10 (LDL-related protein 10), un nouveau régulateur du trafic et du clivage de la protéine APP (amyloid precursor protein), est réduit dans la maladie d'Alzheimer**

Par  
Julie Brodeur  
Département de Pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M. Sc.) en pharmacologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative progressive et irréversible. Une étape précoce de la MA est la relâche neuronale excessive du peptide amyloïde- $\beta$  ( $A\beta$ ), qui s'accumule dans le cerveau, s'assemble et se dépose sous forme de plaques  $A\beta$  insolubles et neurotoxiques. L' $A\beta$  est produit suite au clivage amyloïdogénique de la protéine APP, effectué par les sécrétases  $\beta$  et  $\gamma$  au niveau des endosomes. Il est bien connu que le trafic intracellulaire de l'APP affecte son clivage. L'étude du trafic intracellulaire de cette protéine est donc cruciale pour comprendre ce qui régit la production d' $A\beta$ . Certains membres de la famille des récepteurs de lipoprotéines de faibles densités (LDLR), dont SorLA/LR11, interagissent avec l'APP et modulent son clivage en régulant son trafic et/ou en s'associant avec les sécrétases. LRP10, un nouveau membre peu connu des LDLR, trafique entre le Golgi et les endosomes, tout comme SorLA/LR11. Conséquemment, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle LRP10 serait un nouveau récepteur de la protéine APP, impliqué dans la régulation du trafic et du clivage de cette dernière ainsi que dans la relâche d' $A\beta$ .

Nos résultats démontrent que LRP10 et la protéine APP colocalisent au TGN (*trans-Golgi network*) et interagissent de façon directe. La surexpression stable de LRP10 dans les cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y, provoque une accumulation de la forme mature de l'APP, ainsi qu'une diminution de son clivage et de la production d' $A\beta$ . La déplétion de LRP10, par la technique d'ARN interférant, provoque l'augmentation de la production d' $A\beta$ . De plus, l'expression d'un mutant de LRP10, redistribué aux endosomes précoces, induit la redistribution intracellulaire de l'APP au niveau de ces mêmes endosomes dans les cellules HeLa et SH-SY5Y, tel qu'observé en microscopie confocale. La surexpression stable du mutant de LRP10 dans les SH-SY5Y a aussi démontré une augmentation du clivage amyloïdogénique de l'APP normalement effectué aux endosomes et donc une augmentation de la production d' $A\beta$ . Enfin, la comparaison des niveaux d'expression protéique de LRP10 retrouvés dans le cortex frontal et l'hippocampe de cerveaux de patients âgés sains ou atteints de la MA, révèle que l'expression de LRP10 est réduite dans le cerveau des patients atteints de la MA.

En conclusion, LRP10 est un nouveau récepteur de l'APP participant à son triage entre le TGN et les endosomes, protégeant ainsi l'APP du clivage amyloïdogénique et de l'accumulation d' $A\beta$ . Ainsi, la réduction de l'expression de LRP10 dans le cerveau pourrait augmenter la production de l' $A\beta$  et représenter un facteur de risque dans la MA.

**Mots clés :** LDLR-related protein 10 (LRP10), amyloid precursor protein (APP), amyloïde- $\beta$ , trafic intracellulaire, maladie d'Alzheimer, endosome, réseau *trans*-Golgien (TGN)

## Table des matières

Table des matières .....	III
Liste des figures .....	V
Liste des abréviations.....	VI
<b>Introduction</b> .....	1
1.1. La maladie d'Alzheimer .....	1
1.1.1. Caractéristiques de la MA .....	1
1.1.1.1. Zones cérébrales atteintes.....	1
1.1.1.2. Lésions physiopathologiques .....	2
1.1.2. Étiologie de la MA .....	3
1.1.2.1. Forme familiale (précoce) .....	3
1.1.2.2. Forme sporadique (tardive) .....	4
1.2. Le peptide Amyloïde- $\beta$ .....	5
1.2.1. Rôles physiologiques .....	5
1.2.2. Métabolisme normal.....	6
1.2.3. Différentes formes.....	8
1.2.4. Neurotoxicité du peptide A $\beta$ dans la MA .....	9
1.3. L'APP : protéine clé dans la pathogénèse de la MA .....	13
1.3.1. La protéine APP .....	13
1.3.1.1. Structure, isoformes et maturation .....	13
1.3.1.2. Rôles physiologiques.....	15
1.3.2. Processus de clivage de l'APP et sécrétases membranaires.....	17
1.3.2.1. Clivage non amyloïdogénique.....	17
1.3.2.2. Clivage amyloïdogénique.....	19
1.3.2.3. Clivage $\gamma$ .....	19
1.3.2.4. Régulation du processus de clivage de l'APP .....	20
1.3.3. Trafic et localisation intracellulaire .....	21
1.4. Problématiques dans l'étude de la MA.....	24
1.5. Protéines adaptatrices et rétromères acteurs dans la MA .....	25
1.5.1. Les GGA .....	25
1.5.2. Le complexe rétromère .....	27
1.6. Les récepteurs de lipoprotéines de faibles densités impliqués dans la MA.....	28
1.6.1. LRP1 .....	31
1.6.2. LRP1B.....	32
1.6.3. ApoER2.....	32
1.6.4. SorLA/LR11.....	33
1.6.4.1. Les récepteurs à domaine Vps10p impliqués dans la MA .....	34

1.7. LRP10, un nouveau membre de la famille des LDLR .....	35
1.7.1. Structure et domaines fonctionnels .....	35
1.7.2. Localisation et trafic intracellulaire.....	36
1.8. Hypothèse et objectifs de l'étude.....	37
<b>Résultats</b> .....	39
Avant propos .....	39
Résumé .....	40
Manuscrit : LDLR-Related Protein 10 (LRP10) alters amyloid precursor protein (APP) trafficking and processing: evidence for a role in Alzheimer's disease .....	41
Abstract .....	42
Introduction .....	43
Results .....	45
Discussion .....	58
Conclusions .....	61
Materials and methods .....	62
Acknowledgments .....	69
References .....	72
<b>Discussion</b> .....	75
3.1. LRP10 interagit avec la protéine APP .....	76
3.1.1. LRP10 impliqué dans le trafic intracellulaire de l'APP .....	78
3.1.2. LRP10 influence le clivage de l'APP et la production de l'A $\beta$ .....	80
3.2. LRP10 et la MA.....	85
<b>Conclusions</b> .....	88
Remerciements.....	89
Liste des publications.....	90

## Liste des figures

### **Introduction**

<b>Figure 1.1.</b> Mécanismes possibles d'entrée et d'élimination de l'A $\beta$ au cerveau.....	7
<b>Figure 1.2.</b> Hypothèse de la cascade amyloïdogénique dans la pathogénèse de la MA.....	12
<b>Figure 1.3.</b> Représentation schématique de la structure de l'APP.....	14
<b>Figure 1.4.</b> Processus de clivage de l'APP.....	18
<b>Figure 1.5.</b> Trafic intracellulaire de l'APP.....	23
<b>Figure 1.6.</b> Représentation schématique des membres de la famille des LDLR.....	29
<b>Figure 1.7.</b> Modèle représentant les différentes voies du processus de clivage de l'APP, modulées par les membres de la famille des LDLR.....	30

### **Résultats**

<b>Figure 1.</b> LRP10 interacts with APP.....	46
<b>Figure 2.</b> LRP10 colocalizes with APP and modulates its intracellular distribution.....	47
<b>Figure 3.</b> LRP10 colocalizes and alters the distribution of endogenous APP in neuronal SH-SY5Y cells.....	50
<b>Figure 4.</b> Level of expression and maturation of APP in SH-SY5Y cells expressing wild-type and mutant forms of LRP10.....	51
<b>Figure 5.</b> LRP10 overexpression alters APP processing in SH-SY5Y cells.....	53
<b>Figure 6.</b> LRP10 knockdown increases amyloidogenic cleavage.....	55
<b>Figure 7.</b> LRP10 levels in healthy and AD brains.....	56
<b>Supplemental Figure 1.</b> Interaction of untagged APP with LRP10 wild-type and trafficking mutant.....	70
<b>Supplemental Figure 2.</b> Comparison of LRP10 distribution with Golgi and endosomal markers in HeLa cells.....	71

### **Discussion**

<b>Figure 3.1.</b> Modèle proposé du rôle de LRP10 dans le trafic intracellulaire de l'APP.....	84
---	----

## Liste des abréviations

A $\beta$	Amyloïde- $\beta$
ACE	<i>angiotensin-converting enzyme</i> ; enzyme de conversion de l'angiotensine
Ach	Acétylcholine
ADAM	<i>A disintegrin and metalloprotease</i> ; A désintégrine et métalloprotéase
AICD	<i>APP intracellular cytosolic domain</i> ; domaine intracellulaire cytoplasmique de l'APP
AP	<i>adaptor protein</i> ; protéine adaptatrice
APH-1	<i>anterior pharynx-defective-1</i>
APLP	<i>APP-like protein</i> ; protéine de type APP
ApoE	Apolipoprotéine E
ApoER2	<i>Apolipoprotein E receptor 2</i> ; récepteur 2 de l'apolipoprotéine E
ApoJ	Apolipoprotéine J
APP	<i>Amyloid precursor protein</i> ; protéine précurseur de l'amyloïde
APPs	APP soluble
BACE1	<i><math>\beta</math>-site APP cleaving-enzyme 1</i> ; enzyme de clivage d'APP au site $\beta$
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CTF	<i>C-terminal fragment</i> ; fragment C-terminal
CUB	<i>Complement C1r/C1s, Uegf, Bmp1</i>
Dab	<i>Disable</i>
ECE	<i>endothelin-converting enzyme</i> ; enzyme de conversion de l'endothéline
EEA1	<i>Early endosome-associated protein</i> ; protéine associée aux endosomes précoces
GAE	<i><math>\gamma</math>-adaptin-ear</i>
GGA	<i>Golgi-localized, <math>\gamma</math>-ear-containing, Arf (ADP-ribosylation factor)-binding protein</i>
GST	Glutathione-s-transférase
IDE	<i>insulin-degrading enzyme</i> ; enzyme de dégradation de l'insuline
Jip	<i>JNK interacting protein</i> ; protéine interagissant avec les JNK
KPI	<i>kunitz-type protease inhibitor domain</i> ; domaine inhibiteur de protéase de type kunitz
LCR	Liquide céphalorachidien
LDLR	<i>Low density lipoprotein receptor</i> ; récepteur de lipoprotéines de faibles densités
LRP	<i>LDLR-related protein</i> ; protéine relié au LDLR
LTP	<i>Long term potentiation</i> ; potentialisation à long term
MA	Maladie d'Alzheimer
Mint	<i>Munc-18 interacting protein</i> ; protéine interagissant avec munc-18
MPR	Récepteur manose-6-phosphate
NEP	<i>Neprilysin</i> ; néprilysine
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
PS	<i>Presenilin</i> ; préséniline
PTB	<i>phosphotyrosin binding</i> ; liaison au phosphotyrosine

RAGE	<i>Receptor advanced glycation end products</i> ; récepteur de produits de glycation avancés
RCPG	récepteur couplé aux protéines G
RE	Réticulum endoplasmique
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> ; dérivés réactifs de l'oxygène
SAP	<i>Serum amyloid-P component</i> ; substance amyloïde P sérique
SH2	<i>Src-homology 2</i> ; Src-homologie 2
SNC	Système nerveux central
SNP	<i>Single-nucleotide polymorphism</i> ; polymorphisme à nucléotide unique
SNX	<i>Sorting nexin</i>
SorLA/LR11	<i>Sorting-protein related receptor containing LDLR Class A repeats</i>
TGN	<i>Trans-Golgi network</i> ; réseau <i>trans</i> -Golgien
tPA/uPA	<i>Tissue ou urokinase-type plasminogen activator</i> ; activateur du plasminogène de type tissulaire ou urokinase
VLDLR	<i>Very low density lipoprotein receptor</i> ; récepteur de lipoprotéines de très faibles densités
Vps	<i>Vacuolar protein sorting</i>



## **Introduction**

### **1.1. La maladie d'Alzheimer**

La maladie d'Alzheimer (MA) représente aujourd'hui la principale forme de démence au Canada (63% des cas). Une étude publiée par la Société Alzheimer du Canada en 2010 dénombrait, en 2008, près d'un demi-million de Canadiens atteints de la MA ou d'une affection connexe (telles la démence vasculaire, la maladie de Creutzfeldt-Jakob, la maladie de Parkinson et la maladie d'Huntington) et affirmait que ce nombre pourrait doubler d'ici 25 ans. Ainsi, ces statistiques reflètent toute l'importance du combat mené contre la MA, afin d'être en mesure de mieux prévenir, diagnostiquer, comprendre et traiter cette maladie.

#### **1.1.1. Caractéristiques de la MA**

La MA se caractérise entre autres par les déficits de mémoire et la diminution marquée des capacités cognitives observables chez les gens atteints de la maladie. Cette dernière altère donc les fonctions cérébrales de façon graduelle, en modifiant l'activité du cerveau suite au développement de lésions caractéristiques visibles, perturbant l'environnement immédiat des neurones et leur métabolisme.

##### **1.1.1.1. Zones cérébrales atteintes**

La MA est une maladie neurodégénérative progressive et irréversible. Cette neurodégénérescence du cerveau entraîne ultimement des déficits aux niveaux de la mémoire et des fonctions cognitives, ainsi que des troubles du langage et du comportement, comme l'agressivité, et finalement un état de confusion général, altérant la capacité de raisonner et d'exécuter certaines activités de la vie quotidienne (Waldemar *et al.*, 2007). Au cours de l'évolution de la maladie, une mort neuronale progressive envahit et atrophie le cerveau des gens atteints, altérant ainsi les facultés intellectuelles associées aux différentes régions touchées. Les principales régions affectées par cette perte neuronale sont notamment, le cortex cérébral, l'hippocampe, les amygdales et le noyau basal de Meynert (Wenk, 2003). Ces régions sont particulièrement riches en neurones cholinergiques, les

principaux responsables de la synthèse d'acétylcholine (ACh), un important neurotransmetteur. En effet, il a été démontré que certaines des régions cérébrales touchées par la MA présentent un déficit cholinergique important dû à une perte sélective des neurones cholinergiques, une réduction des niveaux d'ACh ou une diminution de l'activité de la choline acétyltransférase et de l'acétylcholinestérase, deux enzymes impliquées dans le métabolisme de l'ACh (Mufson *et al.*, 2008; Schliebs et Arendt, 2011; Wenk, 2003). Les symptômes de la MA ont d'ailleurs été associés aux fonctions cholinergiques altérées (Wenk, 2003). Depuis, la majorité des traitements pharmacologiques développés et administrés dans le but de ralentir l'apparition des symptômes de la MA ciblent la voie cholinergique (Fan et Chiu, 2010).

#### **1.1.1.2. Lésions physiopathologiques**

La mort neuronale coïncide avec la présence de deux types de lésions neuropathologiques caractéristiques de la MA et observées dans les mêmes régions du cerveau. Il s'agit des enchevêtrements neurofibrillaires intracellulaires et des plaques amyloïdes (ou plaques séniles) extracellulaires. Les enchevêtrements neurofibrillaires sont observés à l'intérieur des neurones et sont constitués de la protéine tau hyperphosphorylée. Cette dernière s'associe aux microtubules et altère leur structure pour entraîner la formation de fibrilles en hélice, participant à la neurodégénérescence (Buee *et al.*, 2000; Gendron et Petrucelli, 2009; Selkoe, 2001). Les plaques amyloïdes sont composées d'agrégats du peptide amyloïde- $\beta$  (A $\beta$ ). Ce peptide est produit et sécrété par les neurones, puis s'accumule dans le milieu extracellulaire sous forme de monomères, dimères, d'oligomères et de polymères, pour ainsi former des dépôts ou des plaques amyloïdes insolubles (Glabe, 2001; Selkoe, 2001). Ces plaques s'accumulent au travers du réseau de neurones et participent à la dégénérescence neuronale, en causant des dommages aux axones et aux dendrites (Selkoe, 2002). Des prolongements neuronaux dystrophiques se retrouvent autour ainsi qu'au cœur des plaques (Selkoe, 2001). Enfin, bien que ces deux types de lésions caractéristiques peuvent se produire indépendamment l'une de l'autre, de plus en plus d'évidences laissent croire que le développement des enchevêtrements serait secondaire à l'accumulation de l'A $\beta$  et la formation des plaques, qui se produiraient en premier lieu (Selkoe, 2001).

### 1.1.2. Étiologie de la MA

La MA existe sous deux formes très similaires tant au niveau phénotypique que symptomatique. Cependant, les causes sous-jacentes du développement de la maladie, ainsi que la vitesse de sa progression, varient selon la forme d'atteinte.

#### 1.1.2.1. Forme familiale (précoce)

La forme familiale, aussi appelée forme précoce de la maladie, est connue pour se manifester à un âge moins avancé, soit avant 65 ans. Cette forme, plus rare, ne représente que 5 à 10% des cas de MA. La forme familiale de cause génétique est héréditaire. Plusieurs mutations génétiques autosomales dominantes ont été identifiées au niveau de trois gènes codant pour des protéines clés impliquées dans la pathogénèse de la MA. Parmi ces trois protéines clés on retrouve tout d'abord, la protéine « amyloid precursor protein » (APP), précurseur du peptide A $\beta$ . Dans la cellule, la protéine APP subit différents clivages endoprotéolytiques menant ou non à la production d'A $\beta$ . Bien que les mutations dans l'APP soient très rarement en cause, toutes les mutations faux-sens retrouvées dans la séquence de la protéine et ayant été directement associées à la forme familiale de la MA se retrouvent près de ses différents sites de clivages. En conséquence, toutes ces mutations entraînent l'augmentation de la production totale d'A $\beta$  et même la production d'une forme plus hydrophobe qui agglomère plus rapidement et favorise l'apparition des plaques amyloïdes (Brouwers *et al.*, 2008; Evin et Weidemann, 2002; Gandy, 2005; Selkoe, 2001; Selkoe et Podlisny, 2002; Williamson *et al.*, 2009). Des mutations retrouvées dans le promoteur du gène de l'APP ont aussi été liées à la MA. Celles-ci entraîneraient une plus grande production d'A $\beta$ , en augmentant le niveau d'expression de l'APP, donc sa disponibilité pour son clivage éventuel en A $\beta$  (Theuns *et al.*, 2006). De plus, des homologues de la protéine préséniline (PS; *presenilin*), PS1 et PS2 provenant de deux gènes distincts chez l'humain et impliqués dans le clivage de l'APP, peuvent présenter certaines mutations faux-sens associées au développement de la maladie. Les mutations retrouvées dans ces deux gènes représentent la cause la plus commune du développement de la forme autosomale dominante de la MA. Les mutations retrouvées dans la protéine PS1 mèneraient à la forme la plus précoce, dès l'âge de 50 ans (parfois même avant), et la plus agressive de la MA familiale. Enfin, les mutations dans PS1 et PS2 augmentent aussi

la production d'A $\beta$  et principalement la production de la forme plus hydrophobe à agrégation rapide, favorisant le dépôt de l'A $\beta$  sous forme de plaques (Brouwers *et al.*, 2008; Evin et Weidemann, 2002; Gandy, 2005; Selkoe, 2001; Selkoe et Podlisny, 2002; Williamson *et al.*, 2009).

### **1.1.2.2. Forme sporadique (tardive)**

La forme sporadique de la MA représente la grande majorité des cas d'Alzheimer. Aussi nommée forme tardive, elle se manifeste plus tard dans la vie des gens atteints, soit après l'âge de 65 ans. La cause de cette forme d'Alzheimer est toujours mal comprise, mais il semble qu'elle serait de nature multifactorielle. Elle dépendrait donc d'un ensemble de facteurs qui, réunis, pourraient prédisposer au développement de la MA. Parmi ces facteurs de risques on retrouve bien évidemment l'âge, qui est probablement un des facteurs les plus importants. Le sexe serait aussi un facteur de risque, puisque l'incidence de la MA serait plus élevée chez la femme que chez l'homme et qu'il existerait des variations génétiques dans le chromosome X qui prédisposeraient davantage les femmes à la MA (Barnes *et al.*, 2005; Carrasquillo *et al.*, 2009). De plus, certains facteurs génétiques représenteraient un risque accru pour la forme sporadique. Le plus connu est l'allèle  $\epsilon 4$  du gène codant pour l'apolipoprotéine E (ApoE4), dont l'expression favoriserait la production d'A $\beta$  et la formation de plaques amyloïdes plus denses (Gandy, 2005; Selkoe, 2001; Selkoe et Podlisny, 2002; Williamson *et al.*, 2009). Des polymorphismes à nucléotide unique (SNP; *single-nucleotide polymorphisms*) au niveau de gènes codant pour des protéines impliquées dans la formation d'A $\beta$  (par exemple SorLA/LR11 (Rogaeva *et al.*, 2007) dont il sera question un peu plus loin) représenteraient aussi des facteurs de risque (Selkoe, 2001; Selkoe et Podlisny, 2002; Williamson *et al.*, 2009). Finalement, l'environnement, les maladies cérébrovasculaires et cardiovasculaires, le diabète, l'obésité, les niveaux élevés de lipides plasmatiques, le syndrome métabolique, la dépression, le stress, les lésions à la tête, le tabagisme, l'alcoolisme et la toxicomanie seraient tous également des facteurs de risques prédisposant de manière non négligeable à la MA. À l'inverse une bonne alimentation, l'exercice physique et la stimulation intellectuelle soutenue tout au long de la vie pourraient avoir des effets protecteurs contre la MA (Reitz *et al.*, 2011a).

## 1.2. Le peptide Amyloïde- $\beta$

De façon générale, tous les facteurs génétiques reliés à la MA ayant été découverts jusqu'à maintenant pointent vers un suspect commun, le peptide amyloïde- $\beta$  ( $A\beta$ ) jouant possiblement un rôle déterminant dans la pathogénèse. Ainsi, l'altération du processus de synthèse ou de dégradation du peptide  $A\beta$  causant son accumulation dans le cerveau pourrait être une cause directe de la maladie (Evin et Weidemann, 2002; Gandy, 2005).

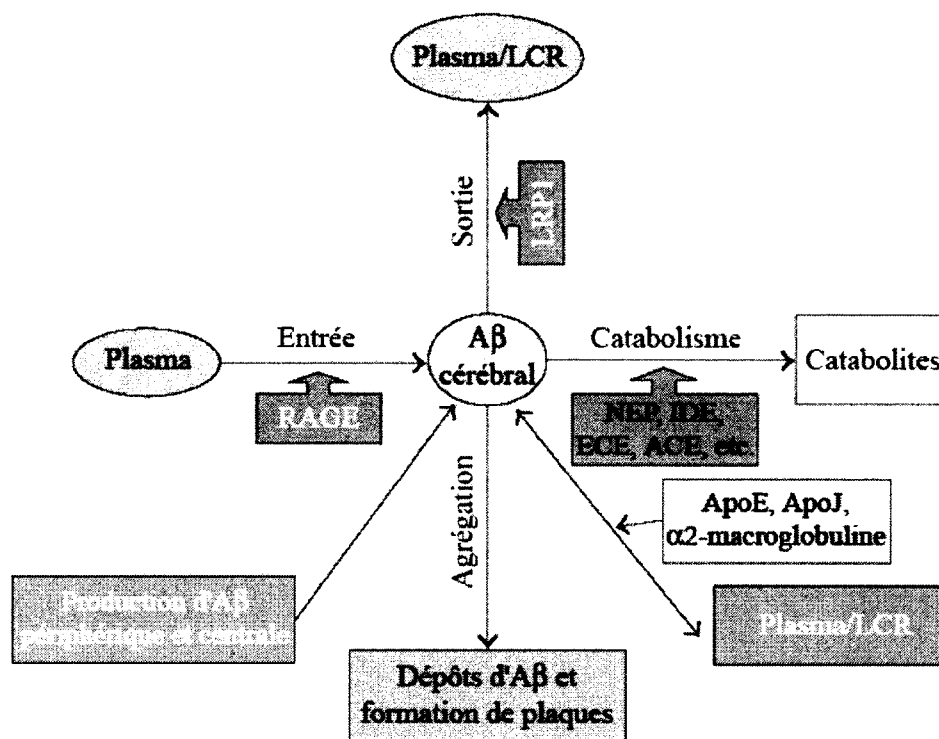
### 1.2.1. Rôles physiologiques

Le peptide  $A\beta$  est un produit normal du métabolisme cellulaire, qui se retrouve dans les liquides biologiques humains tels le liquide céphalorachidien et le plasma (Haass *et al.*, 1992; Seubert *et al.*, 1992; Shoji *et al.*, 1992; Tamaoka *et al.*, 1997). Précédemment, il a été démontré que la production d' $A\beta$  endogène jouerait un rôle critique pour la viabilité des cellules neuronales, mais n'aurait pas cet effet pour d'autres types cellulaires (Plant *et al.*, 2003). Bien que ces évidences suggèrent un rôle physiologique de l' $A\beta$ , les études sur ce peptide sont surtout concentrées sur ses effets neurotoxiques et ainsi sa fonction précise reste toujours à découvrir. Toutefois, il est connu que l' $A\beta$  est capable de faire compétition aux lipides pour la liaison à l'ApoE et pourrait ainsi influencer l'apport et l'homéostasie du cholestérol (Grosgen *et al.*, 2010; Turner *et al.*, 2003). Une étude récente a démontré que l' $A\beta$  influence effectivement les niveaux de cholestérol retrouvés dans le cerveau de souris et participe à son transport, du cerveau vers la circulation sanguine, suggérant donc un rôle physiologique de l' $A\beta$  dans la régulation et le transport du cholestérol (Umeda *et al.*, 2010). De plus, le peptide  $A\beta$  pourrait être impliqué dans l'activité, la transmission et la plasticité synaptique, puisque ce dernier est capable de lier et d'affecter la signalisation des récepteurs nicotiques de l'Ach, des récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) ainsi que d'influencer l'ouverture de canaux calciques dépendants du voltage (Pearson et Peers, 2006; Turner *et al.*, 2003). Récemment, un groupe de recherche a démontré que l' $A\beta$  endogène est essentiel à la plasticité synaptique de l'hippocampe et au développement de la mémoire chez la souris, appuyant ainsi une implication physiologique indispensable (Garcia-Osta et Alberini, 2009; Puzzo *et al.*, 2011). Somme toute, l' $A\beta$  semble participer

activement à certains processus physiologiques neuronaux, démontrant ainsi que l'A $\beta$  ne serait pas seulement un facteur neurotoxique.

### 1.2.2. Métabolisme normal

L'A $\beta$  est un petit peptide de 4 kDa, produit suite au clivage endoprotéolytique de l'APP dans la plupart des types cellulaires neuronaux et non-neuronaux (Busciglio *et al.*, 1993; Haass *et al.*, 1992; Shoji *et al.*, 1992). Une portion de l'A $\beta$  intracellulaire peut être dégradée par la voie lysosomiale avant d'être sécrétée dans le milieu extracellulaire. En effet, la cathepsine B, une protéase à cystéine lysosomiale, peut participer à la dégradation de l'A $\beta$ , principalement de sa forme dite insoluble qui agrège plus rapidement (Mueller-Steiner *et al.*, 2006). Plusieurs autres enzymes non lysosomiales pourraient participer à la dégradation intra et/ou extracellulaire de l'A $\beta$ . On retrouve entre autres la néprilysine aussi nommé endopeptidase-24.11 neutre ou enképhalinase (NEP; *neprilysin*), l'enzyme de conversion de l'endothéline 1 et 2 (ECE; *endothelin-converting enzyme*), l'enzyme de dégradation de l'insuline aussi connu sous le nom d'insulysine ou insulinasé (IDE; *insulin-degrading enzyme*), l'enzyme de conversion de l'angiotensine ou encore la peptidyl-dipeptidase A (ACE; *angiotensin-converting enzyme*), le système plasmine/tPA/uPA (*tissue* ou *urokinase-type plasminogen activator*) et certains membres de la famille des métalloprotéases de la matrice extracellulaire, tels MMP-2, MMP-3 et MMP-9 (*matrix metalloproteinases*) toutes capables de dégrader l'A $\beta$  (Miners *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2006). Des métalloprotéases de la matrice extracellulaire sécrétées par les cellules microgliales ou par d'autres types cellulaires neuronaux ou non, participeraient aussi à la dégradation du peptide dans le cerveau (Qiu *et al.*, 1997). De plus, l'A $\beta$  sécrété pourrait, suite à son endocytose via certains récepteurs spécifiques ou sa phagocytose, être dégradé grâce à ces mêmes enzymes par les astrocytes, et dans une moindre mesure, les macrophages et les cellules microgliales du système nerveux central (SNC) (Funato *et al.*, 1998; Guenette, 2003; Miners *et al.*, 2008; Nielsen *et al.*, 2009; Shaffer *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2006). Toutefois, l'A $\beta$  non dégradé peut être éliminé via la circulation sanguine par le foie ou les reins. Ainsi, l'A $\beta$  pourrait passer la barrière hémato-encéphalique (BHE) vers la circulation ou même atteindre le liquide céphalorachidien (LCR) grâce à sa liaison au



**Figure 1.1. Mécanismes possibles d'entrée et d'élimination de l'Aβ au cerveau.** L'Aβ retrouvé au niveau du cerveau est produit par les neurones du système nerveux central et périphérique. L'Aβ cérébral peut aussi provenir ou être éliminé par le sang ou le liquide céphalorachidien (LCR) via son transport par des récepteurs ou des molécules cargos tels; le récepteur de produits de glycation avancés RAGE, les apolipoprotéines ApoE et ApoJ, l' $\alpha_2$ -macroglobuline et le récepteur de lipoprotéine de faible densité LRP1. L'Aβ peut aussi être dégradé par des enzymes présentes au niveau du parenchyme cérébral comme par exemple, la néprilysine (NEP), l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE), l'enzyme de dégradation de l'insuline (IDE), l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE). Le maintien de l'équilibre du métabolisme normal de l'Aβ au cerveau dépend donc d'une balance entre la production ou l'entrée et l'élimination de l'Aβ. Le débalancement de cet équilibre pourrait entraîner une accumulation de l'Aβ au cerveau, son agrégation, la formation de dépôts, puis de plaques. (Figure modifiée de Wang *et al.*, 2006)

récepteur de lipoprotéine de faible densité LRP1 (LRP; *LDLR-related protein*) permettant l'endocytose ou via le transport de l'apolipoprotéine J (ApoJ) et de l'ApoE. Alors que son passage de la circulation vers le SNC s'effectuerait via sa liaison au récepteur de produits de glycation avancés RAGE (*receptor advanced glycation end products*) (Bates *et al.*, 2009; Miners *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2006). De plus, plusieurs protéines du plasma

pourraient lier et séquestrer l'A $\beta$  pour éviter son retour au niveau du SNC et l'assemblage des monomères en plaques. Le caractère amphiphile de l'A $\beta$  lui confère la capacité de lier une variété de protéines plasmatiques comme l'albumine, l' $\alpha_2$ -macroglobuline, l' $\alpha_1$ -antichymotrypsine, la substance amyloïde P sérique (SAP; *serum amyloid-P component*), les protéines du complément, la transthyrétine, l'apoferritine, les apolipoprotéines et les lipoprotéines (Bates *et al.*, 2009). Enfin, le niveau d'oligomérisation de l'A $\beta$  pourrait influencer tous ses processus de dégradation et d'élimination du SNC. Par exemple, certaines enzymes dégraderaient de façon sélective les monomères et oligomères solubles, alors que d'autres seraient capable de dégrader les oligomères et même les agrégats fibrillaires, qui ne peuvent être éliminés directement via le sang ou le liquide céphalorachidien (Miners *et al.*, 2008). Finalement, les concentrations physiologiques d'A $\beta$  au cerveau résulteraient d'une balance entre 1) sa production suite au clivage de l'APP, 2) son élimination, soit par son passage vers le sang (BHE) et le liquide céphalorachidien ou sa dégradation protéolytique et 3) son oligomérisation et sa liaison à d'autres protéines séquestrant l'A $\beta$ , pouvant influencer son élimination ou son agrégation (Bates *et al.*, 2009). La figure 1.1 montre cette balance et fait le résumé des mécanismes possibles d'élimination de l'A $\beta$  cérébral qui, de concert avec sa production, seraient impliqués dans le maintien de l'équilibre du peptide à l'état basal.

### 1.2.3. Différentes formes

Le peptide A $\beta$  existe sous plusieurs formes possédant de 38 à 43 acides aminés. Les deux principales formes produites ont 40 et 42 acides aminés (A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42) (Kuo *et al.*, 1996; Naslund *et al.*, 1994). L'A $\beta$ 40 représente la forme majoritaire de la production totale d'A $\beta$  sécrété par les différents types cellulaires et est répartie dans le SNC, le liquide céphalorachidien et la circulation sanguine (Busciglio *et al.*, 1993; Haass *et al.*, 1992; Shoji *et al.*, 1992). La forme A $\beta$ 40, étant plutôt hydrophile, se retrouverait principalement sous forme soluble et aurait moins tendance à former des agrégats insolubles. La forme A $\beta$ 42, tant qu'a elle plus hydrophobe, serait plutôt insoluble et aurait tendance à agglomérer plus rapidement pour former des agrégats. L'A $\beta$ 42 possède exactement la même séquence en acides aminés que l'A $\beta$ 40, cependant, deux acides aminés supplémentaires se retrouvent à



son extrémité C-terminale en position 41 et 42, soit l'Ile et l'Ala, alors que l'A $\beta$ 40 se termine par la Val en position 40 (Naslund *et al.*, 1994). Cette petite variance dans la séquence du peptide est suffisante pour en modifier le repliement, exposant de cette manière différentes régions du peptide au milieu ambiant (Yang et Teplow, 2008). L'extrémité C-terminale du peptide A $\beta$  jouerait donc un rôle important dans l'amyloïdogénèse en conférant différentes propriétés physico-chimiques aux deux espèces (Glabe, 2001; Jarrett *et al.*, 1993; Roher *et al.*, 1993). Des études ont précédemment démontré que l'A $\beta$ 42 est le constituant majeur des dépôts d'A $\beta$  insolubles (Roher *et al.*, 1993) et forme le cœur insoluble des plaques amyloïdes, auquel pourrait adhérer l'A $\beta$ 40 soluble (Tamaoka *et al.*, 1994) lors d'excès d'A $\beta$ . L'A $\beta$ 42 faciliterait donc l'agrégation de l'A $\beta$ 40, contribuant ainsi à la formation des plaques.

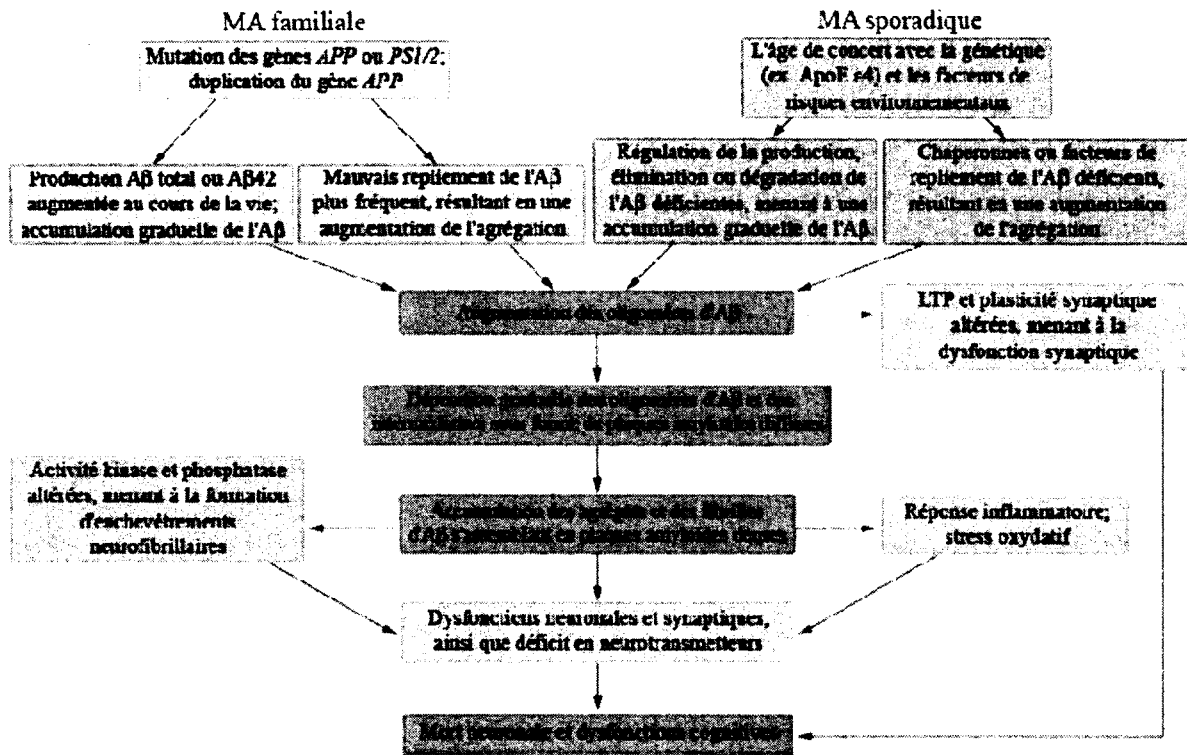
#### **1.2.4. Neurotoxicité du peptide A $\beta$ dans la MA**

Au niveau du cerveau âgé normal on retrouverait un ratio A $\beta$ 40/A $\beta$ 42 inférieur à 1,0. La quantité d'A $\beta$ 40 soluble serait donc plus faible que celle d'A $\beta$ 42 plutôt insoluble. L'A $\beta$ 40, plus hydrophile, formerait des oligomères solubles moins complexes que l'A $\beta$ 42, plus hydrophobe, ayant la capacité de former des oligomères insolubles de niveau plus complexe, favorisant leur agglomération éventuelle en plaques amyloïdes insolubles (Glabe, 2001; Jarrett *et al.*, 1993; Roher *et al.*, 1993; Tamaoka *et al.*, 1994). Ainsi, malgré une production plus importante d'A $\beta$ 40 au cerveau, la concentration d'A $\beta$  contenue dans la fraction soluble, majoritairement constituée d'A $\beta$ 40, serait plus faible que celle de la fraction insoluble constituée d'agrégats d'A $\beta$  non dissouts, beaucoup plus riche en A $\beta$ 42. La plus grande quantité de produits insolubles normalement retrouvés dans le cerveau vieillissant pourrait s'expliquer en partie par le fait que la forme soluble A $\beta$ 40 aurait une plus courte demi-vie et serait plus facilement dégradée ou éliminée du SNC vers le liquide céphalorachidien et le sang. L'A $\beta$ 42, quant à elle, demeurerait plus longtemps dans le cerveau avant d'être dégradé ou éliminé puisque sa demi-vie serait plus longue et sa résistance à la dégradation plus grande (Kuo *et al.*, 1996; Naslund *et al.*, 1994). Toutefois, dans des conditions saines, la concentration physiologique de l'A $\beta$  total retrouvée dans le cerveau ne serait pas suffisante pour entraîner la formation et l'accumulation d'agrégats

puis de plaques insolubles. Comme mentionné précédemment, pour la forme familiale de la MA de cause génétique, une augmentation de la production d'A $\beta$  total, principalement de l'A $\beta$ 42 et donc une diminution du ratio A $\beta$ 40/A $\beta$ 42, serait observé dans la plupart des cas (Brouwers *et al.*, 2008; Evin et Weidemann, 2002; Gandy, 2005; Selkoe, 2001; Selkoe et Podlisny, 2002; Williamson *et al.*, 2009). Pour ce qui est de la forme sporadique de la MA, une augmentation de l'A $\beta$  total et surtout de l'A $\beta$ 40 serait observée, causant une augmentation du ratio A $\beta$ 40/A $\beta$ 42 (Gandy, 2005; Miners *et al.*, 2008; Naslund *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2006). Cette augmentation d'A $\beta$  dans la forme tardive pourrait être due non seulement à une augmentation de la production, comme il sera discuté dans cette étude, mais aussi à une réduction de son élimination (Mawuenyega *et al.*, 2010), puisque certaines des enzymes responsables de la dégradation de l'A $\beta$  seraient aussi réduites dans la MA (Miners *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2006). Dans les deux formes de la MA, l'équilibre précaire entre la production et l'élimination de l'A $\beta$  au niveau du cerveau, maintenu dans le processus de vieillissement normal, est perturbé (Portelius *et al.*, 2010). Ce déséquilibre provoquerait l'accumulation d'A $\beta$  et l'augmentation graduelle de la formation d'oligomères, de protofibrilles, de fibrilles, de plaques diffuses et de plaques matures insolubles dans le cerveau.

L'excès de peptide A $\beta$  dans le cerveau induirait, d'une certaine façon, sa neurotoxicité et provoquerait plusieurs effets néfastes pour les cellules neuronales. Tout d'abord, il est connu que l'accumulation d'A $\beta$  entraîne une augmentation des différents niveaux d'oligomères qui vont ensuite s'accumuler à l'intérieur comme à l'extérieur des cellules pour mener à la formation de plaques. Tant les oligomères intra et extracellulaires auraient des effets toxiques pour les cellules, tout comme les plaques d'A $\beta$  (Glabe, 2001; Knauer *et al.*, 1992; Lublin et Gandy, 2010; Walsh *et al.*, 1999). Entre autres, l'A $\beta$  pourrait altérer la plasticité neuronale en inhibant la potentialisation à long terme (LTP; *long term potentiation*), un type de plasticité neuronale (Li *et al.*, 2011). Cet effet sur la plasticité synaptique serait modulé par l'activité de l'A $\beta$  sur la neurotransmission. En effet, l'A $\beta$  viendrait interférer dans la transmission synaptique de l'Ach et des récepteurs NMDA (Li *et al.*, 2011; Yankner et Lu, 2009). De plus, l'A $\beta$  pourrait altérer la signalisation

intracellulaire des kinases et phosphatases participant ainsi à l'augmentation de l'hyperphosphorylation de la protéine tau impliquée dans la formation des enchevêtrements neurofibrillaires (Jin *et al.*, 2011). Via les mêmes dérèglements de la signalisation intracellulaire, l'A $\beta$  pourrait participer à l'altération du cytosquelette et ainsi interférer dans les processus de transport intracellulaire (Henriques *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 1998). Ensuite, l'A $\beta$  aurait la capacité de s'assembler pour former des pores dans les membranes cellulaires et pourrait de cette manière affecter l'homéostasie du calcium intracellulaire (Arispe *et al.*, 1993; Itkin *et al.*, 2011; Kawahara et Kuroda, 2000; Lin *et al.*, 1999; Rhee *et al.*, 1998). La capacité de l'A $\beta$  d'interférer dans l'intégrité des membranes pourrait aussi entraîner la perte de l'imperméabilité des endosomes et lysosomes déversant ainsi leurs contenus dans le cytoplasme (Yang *et al.*, 1998). Le peptide A $\beta$  pourrait aussi interférer dans plusieurs processus se déroulant dans la mitochondrie, dérégulant l'homéostasie énergétique cellulaire (Calkins et Reddy, 2011; Pagani et Eckert, 2011; Rhein *et al.*, 2009). La réponse inflammatoire induite par l'A $\beta$  entraînerait la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS; *reactive oxygen species*) et de chémokines pouvant participer à la neurodégénérescence (El Khoury *et al.*, 1996; Tuppo et Arias, 2005). De plus, l'A $\beta$  pourrait inhiber le protéasome ce qui non seulement affecterait la dégradation des protéines empruntant cette voie, mais aussi participerait à l'accumulation d'A $\beta$  et de tau (Tseng *et al.*, 2008). Enfin, l'A $\beta$  aurait la capacité d'induire l'apoptose via l'activation de certaines caspases (Kienlen-Campard *et al.*, 2002; Loo *et al.*, 1993; Nakagawa *et al.*, 2000; Troy *et al.*, 2000). Tous les processus cellulaires altérés par l'A $\beta$  pourraient mener éventuellement vers la mort neuronale. C'est pourquoi l'hypothèse de la cascade amyloïdogénique est née, pour tenter d'expliquer la cause des processus pathogéniques observés dans la MA. Cette hypothèse voudrait donc que l'accumulation et la cytotoxicité du peptide A $\beta$  soient à l'origine des divers processus neuronaux altérés, menant au déficit synaptique et cognitif dans la MA (Hardy et Selkoe, 2002; Selkoe, 2000; Selkoe, 2002; Wirths *et al.*, 2004). La figure 1.2 résume la suite des événements de cette cascade hypothétique, qui serait initiée par l'accumulation toxique de l'A $\beta$  au niveau du cerveau, suite au déséquilibre de sa production ou de son élimination, interférant graduellement dans les divers mécanismes cellulaires précédemment décrits et menant ultimement vers la neurodégénérescence puis le dysfonctionnement du cerveau.



**Figure 1.2. Hypothèse de la cascade amyloïdogénique dans la pathogénèse de la MA.** Un déséquilibre entre la production et l'élimination de l'Aβ au cerveau entraînerait l'accumulation graduelle de l'Aβ, un événement précoce dans la pathogénèse de la MA, initiant une cascade d'événements neurotoxiques, menant ultimement à la mort neuronale et la perte de fonctions cognitives. Dans le cas de la forme familiale de la MA, des mutations dans les gènes *APP*, *préséniline 1* ou *2* (*PS1* ou *PS2*), seraient à l'origine de l'augmentation de la production d'Aβ total ou d'Aβ42. Pour ce qui est de la forme sporadique, certains facteurs dont l'âge, la génétique ou l'environnement pourraient entraîner un dérèglement du clivage de l'APP, donc de la production d'Aβ, ou encore de l'élimination de l'Aβ du cerveau, résultant en l'accumulation d'Aβ. Dans les deux formes de la MA, il aurait été démontré que l'Aβ adopterait des conformations favorisant son agglomération, bien que les mécanismes en jeu dans ce changement d'état soient mal connus. Ainsi, l'augmentation des oligomères d'Aβ se déposant graduellement sous forme de plaques diffuses puis de plaques amyloïdes denses dans le cerveau aurait plusieurs effets neurotoxiques. Parmi ces effets, les oligomères solubles causeraient entre autres la dysfonction des synapses, en inhibant la potentialisation à long terme (LTP) et la plasticité synaptique. Par la suite, l'altération des processus de phosphorylation intracellulaire, dont l'hyperphosphorylation de la protéine tau responsable de la formation des enchevêtrements neurofibrillaires, ainsi que le déclenchement de la réponse inflammatoire, le stress oxydatif, les dysfonctions neuronales et synaptiques menant au déficit de neurotransmetteurs, seraient tous des événements secondaires à l'accumulation du peptide Aβ neurotoxique. (Figure modifiée de Blennow *et al.*, 2010)

### 1.3 L'APP : protéine clé dans la pathogénèse de la MA

Comme il a été mentionné plus haut, l'A $\beta$  est produite suite au double clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde, l'APP (*amyloid precursor protein*). Ainsi, les processus régulant les niveaux de synthèse et de clivage de la protéine APP, et du même coup la production du peptide A $\beta$ , peuvent aussi entrer en jeu dans la pathogénèse de la MA. Les études sur la régulation de la synthèse et du processus de clivage de la protéine APP mèneront vers une meilleure compréhension de la maladie.

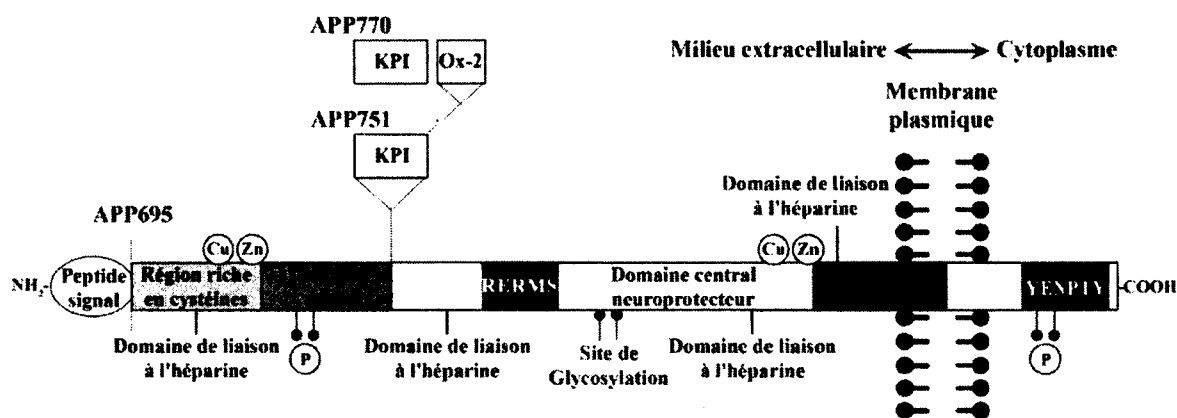
#### 1.3.1. La protéine APP

Chez l'humain, l'APP fait partie d'une petite famille de protéines incluant deux autres membres, APLP1 et APLP2 (*APP-like protein*). Cependant, le domaine du peptide A $\beta$  retrouvé dans la séquence de la protéine APP est unique à cette dernière. La protéine APP est produite à partir du gène *APP* retrouvé sur le chromosome 21 (21q21.2–3). Ainsi, les gens atteints du syndrome de Down (Trisomie 21) possédant une copie supplémentaire du chromosome 21 seraient prédisposés à développer une forme plus précoce de la MA (De Strooper et Annaert, 2000; Kang *et al.*, 1987; Thinakaran et Koo, 2008; Turner *et al.*, 2003).

##### 1.3.1.1. Structure, isoformes et maturation

La protéine APP est une protéine transmembranaire de type I (Figure 1.3) exprimée de façon ubiquitaire et possédant plusieurs isoformes produites par épissage alternatif. Les trois principales isoformes possèdent 695, 751 et 770 résidus et un poids moléculaire variant entre 110 et 140 kDa. La forme APP695 serait la forme prédominante dans les neurones alors que les formes APP751/770 seraient plus largement exprimées dans la majorité des autres tissus. Les trois formes possèdent la séquence du peptide A $\beta$  ainsi qu'une extrémité C-terminale cytoplasmique et un domaine transmembranaire identiques. Toutefois, les portions N-terminales extracellulaires de l'APP751/770 contiennent un domaine homologue au domaine inhibiteur de protéase de type kunitz (KPI; *kunitz-type protease inhibitor domain*) de 56 acides aminés, qui n'est pas retrouvé dans la forme APP695. De plus, la forme APP770 possède un domaine homologue antigène Ox-2 de 19

résidus supplémentaires juste en aval de son domaine KPI (Selkoe, 2001; Turner *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2011). Le rôle de ces domaines KPI et antigène Ox-2 ne semble pas avoir été défini jusqu'à aujourd'hui, bien que le domaine KPI pourrait jouer un rôle inhibiteur de protéases. L'APP est donc constituée en N-terminale d'un peptide signal, d'un domaine riche en cystéines, d'un domaine KPI (absent pour l'APP695), d'un domaine Ox-2 antigène (absent pour l'APP695/751), et d'un domaine dit neuroprotecteur. Ensuite, on retrouve la séquence du peptide A $\beta$  en partie enchâssée dans son domaine transmembranaire (TM), puis sa queue C-terminale contenant entre autres un motif YENPTY important pour son trafic intracellulaire (Turner *et al.*, 2003). Le peptide signal de l'APP est clivé suite à son insertion dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) lors de sa traduction. L'APP nouvellement synthétisée au niveau des ribosomes du RE rugueux est transloquée simultanément dans la membrane du RE grâce à son peptide signal et subit ensuite plusieurs modifications post-traductionnelles lors de son processus de maturation. Tout d'abord, l'APP est N-glycosylée au niveau du RE et subit ensuite une



**Figure 1.3. Représentation schématique de la structure de l'APP.** La protéine précurseur de l'amyloïde est une protéine transmembranaire de type I insérée dans la membrane grâce à un peptide signal présent à l'extrémité NH<sub>2</sub> qui est ensuite clivé. L'APP possède un long domaine extracellulaire constitué d'une région riche en cystéines, d'un domaine acide, d'une séquence fonctionnelle RERMS, d'un domaine dit neuroprotecteur, de trois domaines de liaison à l'héparine, de sites de liaison au cuivre (Cu) et au zinc (Zn) ainsi que de sites de glycosylation et de phosphorylation. Contrairement à l'APP695, les isoformes APP751/770 possèdent un domaine KPI et la forme 770 un domaine antigène Ox-2. La séquence du peptide A $\beta$  (en rouge) est constituée de la portion juxtamembranaire de l'APP et est en partie enchâssée dans son domaine transmembranaire. L'APP possède une courte queue cytoplasmique qui comprend entre autres un motif YENPTY dont les tyrosines sont des cibles de phosphorylation.

O-glycosylation lors de son passage dans les citernes de l'appareil de Golgi. Par la suite, l'APP peut aussi subir l'ajout de groupes sulfatés et phosphatés lorsqu'elle se trouve au réseau *trans*-Golgien (TGN; *trans*-Golgi network) ou à la membrane plasmique (De Strooper et Annaert, 2000; Turner *et al.*, 2003). Enfin, il est connu que l'expression de l'APP pourrait être régulée par certains facteurs de croissance, par des esters de phorbol ou des ligands de la superfamille des récepteurs nucléaires d'hormones stéroïde/thyroïde. Plus récemment, il a été démontré que le facteur de transcription p53 pourrait aussi participer à cette régulation (Cuesta *et al.*, 2009).

### 1.3.1.2. Rôles physiologiques

Jusqu'à aujourd'hui, aucune fonction précise n'a été attribuée à la protéine APP. Comme l'APP n'est pas seulement exprimée au niveau du cerveau, mais dans tous les tissus, on pourrait croire que cette protéine joue un rôle important dans la cellule. Toutefois, la déficience d'expression de l'APP chez les souris (*APP knockout*) ne présente que des déficits neurologiques subtils, tels une diminution de l'activité locomotrice et de la force de préhension des membres antérieures (De Strooper et Annaert, 2000). Il a aussi été rapporté grâce à des études effectuées avec des souris déficientes en APP, que l'APP est impliqué dans le développement normal de la rétine de l'œil. L'APP serait impliqué dans la différenciation des cellules amacrines (Dinet *et al.*, 2011) et le fonctionnement normal des cônes et des bâtonnets de la rétine (Ho *et al.*, 2012). Au fil des ans, des études ont permis de soulever certains rôles possibles. Premièrement, l'ensemble de la structure de l'APP suggère que cette protéine pourrait agir à titre de récepteur de surface (De Strooper et Annaert, 2000; Kang *et al.*, 1987). Cependant, la recherche de ligand précis n'a pas été très fructueuse jusqu'à maintenant. Plus récemment, il a été rapporté que la glycoprotéine F-spondine, sécrétée par les neurones et impliquée dans le développement et la réparation neuronale, pourrait interagir comme un ligand avec l'extrémité N-terminale de l'APP. Une fois liée, la F-spondine aurait la capacité d'intervenir dans le processus de clivage de l'APP, modulant ainsi le niveau de translocation nucléaire du fragment intracellulaire AICD (*APP intracellular cytosolic domain*) produit suite au clivage de l'APP, qui à son tour pourrait moduler la transcription de gènes. L'APP agirait ainsi comme récepteur participant à la signalisation, à la manière du récepteur Notch, lui aussi clivé (Thinakaran et Koo, 2008).

De plus, plusieurs domaines fonctionnels ont été identifiés dans la séquence protéique de l'APP (Figure 1.3), tant dans sa région extra qu'intracellulaire. Tout d'abord, l'APP possède des domaines de liaison à l'héparine dans sa portion extracellulaire qui seraient responsables de la liaison aux portions glycanes de protéoglycans. On retrouve aussi un domaine actif extracellulaire, soit le pentapeptide RERMS, qui aurait la capacité d'agir comme un promoteur de croissance cellulaire. Ces domaines fonctionnels de liaison à l'héparine et la séquence RERMS pourraient apparemment être impliqués dans le rôle que jouerait l'APP dans la croissance des neurites et la synaptogénèse (De Strooper et Annaert, 2000; Qiu *et al.*, 1995; Thinakaran et Koo, 2008; Turner *et al.*, 2003). Dans le même ordre d'idée, comme il est difficile de dissocier la croissance des neurites de l'adhésion cellulaire, l'APP pourrait aussi avoir un rôle à jouer dans l'adhésion des cellules. En effet, la région extracellulaire de l'APP possède deux domaines d'adhésion RHDS qui pourraient lier des composantes de la matrice extracellulaire comme l'héparine, le collagène et la laminine. L'APP est retrouvé aux niveaux des points focaux d'adhésion et aurait même possiblement un rôle à jouer dans la motilité cellulaire (Thinakaran et Koo, 2008; Turner *et al.*, 2003). La protéine APP possède aussi plusieurs domaines de liaison au cuivre et au zinc dans toute sa séquence. L'APP catalyserait la réduction du Cu(II) en Cu(I) alors que la liaison au zinc jouerait plutôt un rôle structural (De Strooper et Annaert, 2000). Ensuite, il a été démontré que l'APP pourrait aussi être impliquée dans le transport axonal. La queue cytosolique de l'APP agirait comme récepteur cargo de la kinésine, protéine complexée aux microtubules, afin de relier la vésicule contenant l'APP à la kinésine permettant le transport de la vésicule du corps cellulaire vers l'extrémité des axones (Groemer *et al.*, 2011; Kamal *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2011). Étant présente à la synapse, l'APP pourrait participer à la transmission et la plasticité synaptique. Il a été démontré que l'APP influence les niveaux de la synaptophysine, protéine participant à la transmission synaptique des neurones, ainsi que l'induction et le maintien de la LTP, impliquée dans la plasticité neuronale, et ce entre autres, au niveau de l'hippocampe. Ceci pourrait donc conférer un rôle à l'APP dans le maintien et le développement de la mémoire (Groemer *et al.*, 2011; Kamenetz *et al.*, 2003; Turner *et al.*, 2003). Enfin, l'APP pourrait potentiellement fonctionner comme un récepteur couplé aux protéines G (RCPG), puisque l'extrémité cytoplasmique de l'APP est capable d'interagir avec la protéine hétérotrimérique G<sub>o</sub> et de stimuler ou d'inhiber l'activation de



cette dernière. Toutefois, la signalisation et les effets engendrés par l'activation ou l'inhibition de la protéine  $G_o$  par l'APP demeurent toujours inconnus (De Strooper et Annaert, 2000; Turner *et al.*, 2003).

Bien que ces différents rôles possibles ont été attribués à l'APP, il n'est pas exclu que les fragments issus du clivage de l'APP y contribuent, puisqu'il semble difficile, expérimentalement parlant, de dissocier totalement les effets physiologiques de l'APP de ceux de ses fragments. Bien des confirmations *in vivo* restent à obtenir avant de définir un rôle précis et officiel à l'APP.

### **1.3.2. Processus de clivage de l'APP et sécrétases membranaires**

Dans la cellule, l'APP peut être clivée pour produire différents fragments solubles sécrétés, transmembranaires et cytosoliques. Le double clivage de l'APP s'effectue de façon séquentielle par la combinaison de deux des trois principales enzymes responsables du clivage de l'APP en position  $\alpha$  ou  $\beta$  dans sa portion extracellulaire, puis en position  $\gamma$ , à l'intérieur du domaine transmembranaire de l'APP (Figures 1.4-A). Ainsi, la protéine APP peut subir deux types de clivage endoprotéolytique bien distincts, soient : le clivage non amyloïdogénique (Figure 1.4-B) ne menant pas à la production d'A $\beta$  ou le clivage amyloïdogénique (Figure 1.4-C) produisant le peptide A $\beta$  et étant problématique dans la MA.

#### **1.3.2.1. Clivage non amyloïdogénique**

Dans un premier temps, l'APP peut subir un clivage non amyloïdogénique aussi appelé clivage  $\alpha$  (Figure 1.4-B). Dans cette voie, la portion extracellulaire de l'APP est clivée en premier lieu par l' $\alpha$ -sécrétase membranaire, une métalloprotéinase au zinc transmembranaire de type I de la famille ADAM (ADAM9, ADAM10 ou ADAM17; *A disintegrin and metalloprotease*). Ce premier clivage s'effectue à l'intérieur de la séquence du peptide A $\beta$  que contient l'APP et entraîne la production de l'APP $\alpha$  soluble (APP $\alpha$ s) d'environ 110-120 kDa, libéré dans le milieu extracellulaire, ainsi que celle du fragment transmembranaire C-terminal, CTF $\alpha$  (*C-terminal fragment  $\alpha$* ) ou C83 de 10-11 kDa



approximativement. Le fragment CTF $\alpha$  subit ensuite un second clivage par la  $\gamma$ -sécrétase membranaire, à l'intérieur de son domaine transmembranaire, soit juste à l'extrémité C-terminale de la séquence de l'A $\beta$ . De cette manière, un peptide A $\beta$  tronqué n'ayant aucune propriété neurotoxique, le peptide P3 de 3 kDa et un fragment intracellulaire AICD (*APP intracellular cytosolic domain*) de près de 6-8 kDa sont produits. Ce processus de clivage  $\alpha$  se produirait davantage à la membrane plasmique simplement parce que l' $\alpha$ -sécrétase se retrouve principalement à la surface membranaire où elle serait active de façon constitutive (Figure 1.5) (Chow *et al.*, 2010; De Strooper et Annaert, 2000; Tang, 2009; Thinakaran et Koo, 2008; Turner *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2011).

### 1.3.2.2. Clivage amyloïdogénique

En second lieu, le clivage de l'APP par la voie amyloïdogénique, aussi nommé clivage  $\beta$  (Figure 1.4-C), implique la  $\beta$ -sécrétase membranaire BACE1 ( *$\beta$ -site APP cleaving-enzyme 1*) une aspartyl-protéase transmembranaire de type I. Cette dernière effectue le clivage de l'APP dans sa région extracellulaire, soit à l'extrémité N-terminale de la séquence du peptide A $\beta$ . Ce clivage produit le fragment APP $\beta$  soluble (APP $\beta$ s) de 110-120 kDa, qui est libéré dans le milieu extracellulaire et le fragment transmembranaire C-terminal  $\beta$ , CTF $\beta$  (*C-terminal fragment  $\beta$* ) ou C99 d'environ 12 kDa. Ce dernier est ensuite clivé à l'intérieur de son domaine transmembranaire par la  $\gamma$ -sécrétase, pour permettre la libération de l'extrémité C-terminale du peptide A $\beta$  et la production d'A $\beta$  de 4 kDa ainsi que celle du fragment cytosolique AICD. Cette voie de clivage  $\beta$ , menant à la production de l'A $\beta$ , survient principalement au niveau des endosomes puisque la  $\beta$ -sécrétase BACE1 est enrichie à ce niveau et possède une activité catalytique optimale au pH acide retrouvé dans les endosomes (Figure 1.5) (Chow *et al.*, 2010; De Strooper et Annaert, 2000; Tang, 2009; Thinakaran et Koo, 2008; Turner *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2011).

### 1.3.2.3. Clivage $\gamma$

Le clivage  $\gamma$  retrouvé dans les deux voies de clivage de l'APP s'effectue grâce à la  $\gamma$ -sécrétase (Figure 1.4-B et 1.4-C). Il s'agit en fait d'un complexe de quatre protéines, composé de l'APH-1 (*anterior pharynx-defective-1*), la nicastrine, la PEN-2 (*presenilin*

*enhancer-2*) et la préséniline (PS, PS1 ou PS2; *presenilin*). L'activité catalytique du complexe est assurée par la sous-unité préséniline. Il s'agit de cette même sous-unité présentant parfois des mutations, principalement dans PS1 et PS2, serait en cause dans certains cas de la forme familiale de la MA. Le complexe  $\gamma$ -sécrétase se retrouve notamment au niveau de la membrane plasmique et des endosomes assurant ainsi le clivage des fragments CTF (Figure 1.5). De plus, la  $\gamma$ -sécrétase peut cliver tant en position  $\gamma$ 40 que  $\gamma$ 42 de la séquence C-terminale de l'A $\beta$  (Figure 1.4-A). Ainsi dans des conditions physiologiques saines, la  $\gamma$ -sécrétase produit environ 90% d'A $\beta$ 40 par rapport à moins de 10% d'A $\beta$ 42. Les mutations identifiées dans la préséniline augmenteraient le niveau de clivage en position  $\gamma$ 42 pour renverser le ratio de production A $\beta$ 40/A $\beta$ 42 (Chow *et al.*, 2010; De Strooper et Annaert, 2000; Krishnaswamy *et al.*, 2009; Tang, 2009; Thinakaran et Koo, 2008; Turner *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2011).

#### **1.3.2.4. Régulation du processus de clivage de l'APP**

En résumé, l' $\alpha$ - et la  $\beta$ -sécrétase sont en compétition pour le clivage de l'APP, de sorte que le clivage  $\alpha$  protège l'APP du clivage  $\beta$ , produisant l'A $\beta$  (Chow *et al.*, 2010; Cole et Vassar, 2007; De Strooper et Annaert, 2000; Turner *et al.*, 2003). Ainsi, favoriser la voie de clivage  $\alpha$  permettrait de prévenir la production du peptide A $\beta$ . Puisque les différents processus de clivage de l'APP se produisent au niveau de compartiments cellulaires distincts, il est facile de comprendre que le temps passé par l'APP au niveau de ces compartiments détermine les niveaux de production d'A $\beta$ . De plus, tout ce qui influence le trafic et la localisation intracellulaire de l'APP affecte le type de clivage que subit l'APP et la production d'A $\beta$ . Il existe donc un lien étroit entre la localisation, le trafic et le clivage de l'APP se répercutant sur la production d'A $\beta$  (Selkoe *et al.*, 1996). De la même façon, les niveaux de synthèse, l'activité, la localisation ainsi que la régulation du trafic des différentes enzymes responsables du clivage de l'APP peuvent aussi influencer son clivage et les niveaux d'A $\beta$ . De façon plus spécifique, comme BACE1 serait l'enzyme limitant la production d'A $\beta$ , les protéines impliquées dans la régulation de son trafic, dont les GGA [*Golgi-localized,  $\gamma$ -ear-containing, Arf (ADP-ribosylation factor)-binding protein*], le récepteur Sortiline et le complexe rétromère, ont aussi leur importance au niveau de la

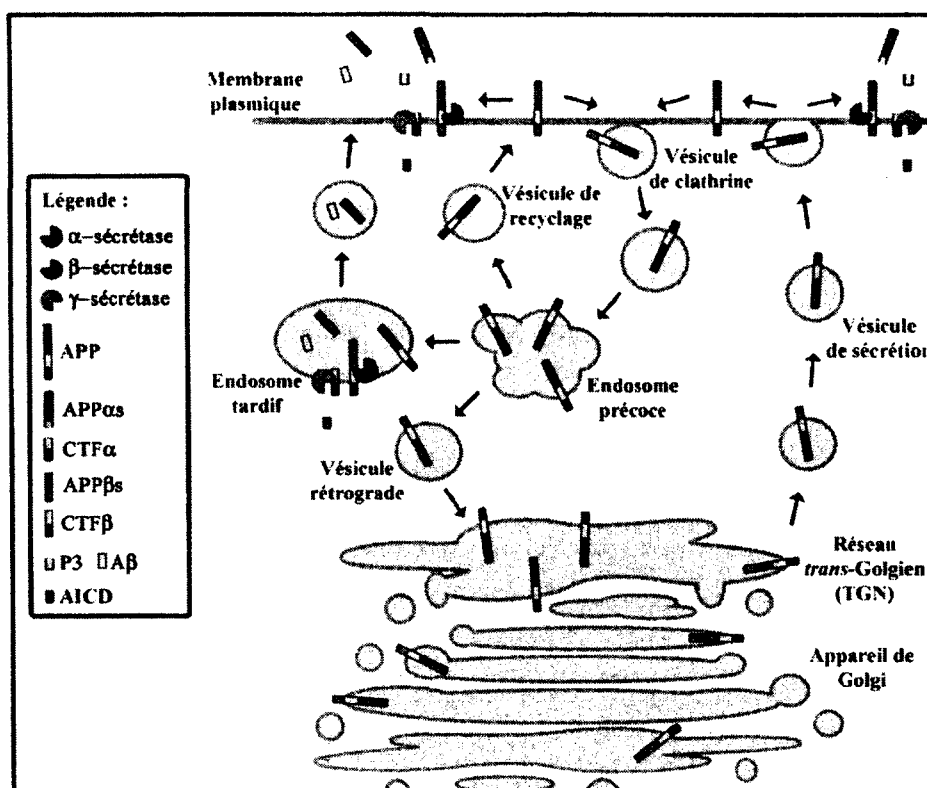
production du peptide (Wang *et al.*, 2010). De plus, les radeaux lipidiques et le cholestérol joueraient un rôle dans la régulation du clivage de l'APP. En effet, il est connu que le clivage  $\beta$  se déroule de façon préférentielle au niveau des radeaux lipidiques, des microdomaines membranaires riches en glycosphingolipides, en récepteurs et en cholestérol. Le cholestérol assiste d'ailleurs à la formation des radeaux en liant les sphingolipides. Ainsi, le niveau de cholestérol sanguin influence la formation et le nombre de radeaux lipidiques dans les membranes cellulaires et par le fait même le clivage  $\beta$  de l'APP (Marzolo et Bu, 2009; Wang *et al.*, 2010). De cette manière, un excès de cholestérol est un facteur de risque de la MA, puisque les membranes moins riches en cholestérol et en radeaux lipidiques favorisent le clivage  $\alpha$ , alors que le contraire favorise plutôt le clivage  $\beta$  (Simons *et al.*, 2001). Il est aussi connu que l'activité neuronale et la transmission synaptique stimulent la voie de clivage amyloïdogénique et la production d'A $\beta$ . L'accumulation d'A $\beta$  sécrété produit un effet dépresseur sur la transmission synaptique via les récepteurs NMDA extrasynaptiques, suggérant qu'à l'état physiologique, l'A $\beta$  exercerait un rétrocontrôle négatif sur l'activité neuronale dans le but de réguler le niveau d'excitation neuronal (Kamenetz *et al.*, 2003). Récemment, un mécanisme a été suggéré pour tenter d'expliquer cette augmentation de sécrétion d'A $\beta$ . La stimulation de l'activité neuronale pourrait causer l'augmentation du niveau d'endocytose via des vésicules de clathrine, et ainsi augmenter la quantité d'APP de surface internalisée vers les endosomes où se produit le clivage amyloïdogénique de l'APP (Wang *et al.*, 2010). Enfin, il a été démontré que l'ion métallique magnésium présent dans le milieu extracellulaire a la capacité de favoriser le clivage  $\alpha$  de l'APP à la membrane plasmique, réduisant ainsi la portion d'APP clivé en A $\beta$ . Il s'agirait simplement d'un effet dépendant de la dose de magnésium, augmentant le niveau de l'APP à la membrane plasmique favorisant ainsi le clivage non amyloïdogénique et permettant à l'APP d'éviter son clivage en A $\beta$  (Wang *et al.*, 2010).

### **1.3.3. Trafic et localisation intracellulaire**

Comme mentionné un peu plus haut, la protéine APP est synthétisée dans le RE et incorporée à la membrane simultanément. L'APP 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; *trans-Golgi network*), là où l'APP 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, l'APP est empaquetée dans des vésicules de la voie de sécrétion constitutive. Par cette voie, l'APP atteint la membrane plasmique, mais ne semble pas y demeurer longtemps puisqu'à l'état basal, l'APP de surface ne représente que 10% de l'APP total (Thinakaran et Koo, 2008). À cet endroit, l'APP 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, l'APP peut emprunter quatre voies distinctes. Premièrement, l'APP peut évoluer dans la voie endosomale vers le lysosome où une portion de l'APP est dégradée (De Strooper et Annaert, 2000; Lorenzen *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011). Deuxièmement, l'APP peut aussi être recyclée à la membrane plasmique via des vésicules de recyclage. Troisièmement, de l'endosome précoce, l'APP peut être transportée de façon rétrograde vers le TGN et enfin, l'APP 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 1.5 résume l'ensemble du trafic intracellulaire de la protéine APP (Tang, 2009; Thinakaran et Koo, 2008; Turner *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2011). De façon générale, la demi-vie de l'APP serait d'environ 45 à 65 minutes dans la plupart des types cellulaires (Selkoe, 2001).

Plusieurs protéines sont impliquées dans le transport intracellulaire de l'APP. En effet, la queue cytoplasmique de l'APP 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 l'APP 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 l'APP, 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 (*disable*), la famille de



**Figure 1.5. Trafic intracellulaire de l'APP.** La protéine APP est synthétisée dans le réticulum endoplasmique. L'APP immature évolue ensuite dans les citernes de l'appareil de Golgi, où l'APP subit son processus de maturation. Une fois au réseau *trans*-Golgien (TGN) l'APP est empaquetée dans des vésicules de la voie de sécrétion constitutive et rejoint la membrane plasmique. À la membrane, l'APP peut être clivée par les sécrétases  $\alpha$  et  $\gamma$  dans la voie de clivage non amyloïdogénique produisant les fragments APP $\alpha$  soluble (APP $\alpha$ s), C-terminal  $\alpha$  (CTF $\alpha$ ), APP intracellulaire AICD et le peptide P3 non toxique. Lorsque la protéine APP échappe au clivage à la surface, elle peut être internalisée via des vésicules de clathrine vers la voie endosomale. Au niveau des endosomes précoces l'APP peut soit être recyclée à la membrane plasmique, transportée de façon rétrograde vers le TGN, être clivée par les sécrétases  $\beta$  et  $\gamma$  présentes dans les endosomes ou encore évoluer dans la voie endosomale pour être dégradé dans les lysosomes. Ce dernier clivage amyloïdogénique entraîne la production de l'APP $\beta$  soluble (APP $\beta$ s), du fragment C-terminal  $\beta$  (CTF $\beta$ ), du fragment cytosolique AICD et du peptide A $\beta$ , neurotoxique dans la MA.

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, l'APP interagit aussi via ce même motif avec la protéine adaptatrice SNX17 (*sorting nexin 17*) qui intervient plutôt dans le trafic de l'APP 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 l'APP peuvent avoir un effet sur le trafic de l'APP et la production d'A $\beta$ . 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, influence aussi le trafic intracellulaire de l'APP et son clivage en A $\beta$ . Ensuite, le trafic de l'APP 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 l'APP. Ainsi, l'APP est capable d'interagir avec certains membres de la famille des récepteurs de lipoprotéine de faible densité (LDLR; *low density lipoprotein receptor*) comme LRP1, LRP1B, ApoER2 et SorLA/LR11, 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 l'APP participe à son trafic soit en stimulant sa sortie du TGN et son exocytose à la membrane ou encore sont transport rétrograde des endosomes vers le TGN (Da Cruz E Silva et Da Cruz E Silva, 2003).

#### **1.4. Problématiques dans l'étude de la MA**

Il est connu que les processus de clivage de l'APP subissent de profonds changements dans la MA (Tyler *et al.*, 2002). Brièvement, dans des conditions saines la voie de clivage non amyloïdogénique, où l'APP est clivé par les sécrétases  $\alpha$  et  $\gamma$ , est la voie de clivage majoritaire (De Strooper et Annaert, 2000). Dans les cas de MA, l'activité de l' $\alpha$ -sécrétase serait réduite, alors que celle de la  $\beta$ -sécrétase serait augmentée de façon significative (Tyler *et al.*, 2002). De plus, il est connu que les niveaux d'expression de la  $\beta$ -sécrétase BACE1 et de l'APP, entre autres des isoformes APP751/770 normalement moins exprimées dans les neurones, pourraient aussi être augmentés dans la MA (Cole et Vassar, 2007; Fukumoto *et al.*, 2002; Santosa *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Ainsi, tous ces facteurs peuvent très certainement contribuer à l'accumulation cérébrale du peptide A $\beta$  dans la MA. Somme toute, la régulation du processus de clivage de l'APP est très complexe, puisqu'elle dépend non seulement des niveaux d'expression et de l'activité des



enzymes, mais aussi de la localisation de l'APP et de son trafic intracellulaire (Selkoe *et al.*, 1996). Il semble que dans les cas de MA plus tardifs, il y aurait aussi plusieurs protéines impliquées dans le trafic de l'APP et même dans celui de BACE1, dont la synthèse ou le métabolisme seraient dérégulés (Tang, 2009). De cette manière, non seulement les changements observés au niveau même des deux voies de clivage possibles contribue à l'augmentation de la production d'A $\beta$ , mais le dérèglement de plusieurs autres protéines impliquées dans le trafic de l'APP peut aussi y participer. En effet, il est connu que l'expression de certaines protéines adaptatrices GGA (Santosa *et al.*, 2011), certains membres du complexe rétromère (Muhammad *et al.*, 2008; Small, 2008; Small *et al.*, 2005; Sullivan *et al.*, 2011) et de la famille des récepteurs de lipoprotéines de faibles densités (Dodson *et al.*, 2006; Scherzer *et al.*, 2004), tous impliqués dans le trafic de l'APP ou de BACE1, est modifiée dans la MA. Ainsi, le changement de localisation probable de l'APP et de BACE1 par rapport à l'état normal, peut être en partie responsable de la production aberrante du peptide. L'étude du trafic intracellulaire de la protéine APP serait donc un passage essentiel pour une meilleure compréhension de la pathogénèse de la MA et de la production d'A $\beta$ .

### **1.5. Protéines adaptatrices et rétromères acteurs dans la MA**

Comme mentionné précédemment, les protéines adaptatrices GGA ainsi que les protéines du complexe rétromère jouent un rôle important dans le trafic intracellulaire non seulement de l'APP, mais aussi de BACE1, responsable du clivage  $\beta$  de l'APP et de la production d'A $\beta$  au niveau des endosomes. De plus, certains de ces acteurs dans le trafic de l'APP et de BACE1 pourraient être impliqués dans la pathogénèse de la MA, en favorisant la production d'A $\beta$  et de cette manière contribuer au développement de la maladie.

#### **1.5.1. Les GGA**

Identifiée au début des années 2000, la famille des protéines adaptatrices de clathrine GGA [*Golgi-localized,  $\gamma$ -ear-containing, Arf (ADP-ribosylation factor)-binding protein*] est représentée par trois membres : GGA1, GGA2 et GGA3. Ces protéines modulaires exprimées de façon ubiquitaire sont constituées d'un domaine VHS (Vps27,

Hrs, Stam) en N-terminale, suivi d'un domaine GAT (GGA and Tom) à double hélices, d'une région hinge variable et d'une extrémité C-terminale contenant un domaine GAE (*γ-adaptin-ear*) homologue à celui de la sous-unité  $\gamma$  retrouvée dans le complexe AP-1 (*adaptor protein-1*). Les GGA sont des protéines cytoplasmiques associées à la surface des endosomes et du TGN. Ces dernières sont capables de lier entre autres la protéine Arf de la superfamille des protéines Ras via leur domaine GAT, la clathrine par leurs régions hinge et GAE, ainsi que la queue cytoplasmique de certains récepteurs ou protéines transmembranaires comme les récepteurs mannose-6-phosphate (MPR) (Bonifacino, 2004; Ghosh et Kornfeld, 2004) et SorLA/LR11 (Schmidt *et al.*, 2007) ou l'enzyme BACE1 (He *et al.*, 2005; Wahle *et al.*, 2005) via leur domaine VHS. Ainsi, les GGA sont impliquées dans le trafic de ces récepteurs et protéines transmembranaires entre le TGN et les endosomes tant dans le transport antérograde que rétrograde. Les GGA assurent donc le lien entre les protéines dont elles influencent le trafic et les composantes du manteau de clathrine (Bonifacino, 2004; Ghosh et Kornfeld, 2004; Wahle *et al.*, 2005).

Le domaine VHS des GGA reconnaît et lie le motif de triage dileucine DXXLL. Ce motif se retrouve dans la queue cytoplasmique de la  $\beta$ -sécrétase BACE1. En effet, le trafic de BACE1 est modulé par les GGA via ce motif. Ces protéines adaptatrices participent à la régulation du recyclage de BACE1 à la membrane plasmique (He *et al.*, 2005). Il a été démontré que GGA1 régule plus particulièrement le transport rétrograde de BACE1 des endosomes vers le TGN (Wahle *et al.*, 2005). Alors que GGA3 est plutôt impliquée dans la dégradation et le maintien des niveaux protéiques de BACE1 en transportant l'enzyme des endosomes précoces puis tardifs vers les lysosomes (Kang *et al.*, 2010). De cette manière, lorsque BACE1 ne serait pas prise en charge par les GGA, soit pour être transportée de façon rétrograde vers le TGN ou transportée dans la voie endosomale vers les lysosomes, l'enzyme serait recyclée à la membrane, où elle serait beaucoup moins active puisque son activité catalytique est optimale au pH acide. De plus, il a été démontré que GGA1 se retrouve à proximité (<10 nm) de l'APP au niveau du Golgi et a la capacité d'influencer son trafic. De façon indirecte GGA1 retient l'APP au Golgi, modulant et réduisant ainsi son accès tant à l'enzyme BACE1 qu'à la  $\gamma$ -sécrétase et du même coup, la production d'A $\beta$  (Von Arnim *et al.*, 2006; Wahle *et al.*, 2006). Récemment, il a été rapporté que les niveaux

protéiques de GGA1 et GGA3 sont réduits dans le cerveau des gens atteints de la MA (Santosa *et al.*, 2011; Tesco *et al.*, 2007; Wahle *et al.*, 2006). Ainsi les GGA pourraient jouer un rôle dans la MA, puisque leur réduction aurait le potentiel d'augmenter le niveau intracellulaire de BACE1 en réduisant son trafic vers les lysosomes. Ceci aurait pour effet de stabiliser l'enzyme, d'augmenter son activité, de même que de faciliter son accès à l'APP au niveau des endosomes, accroissant de cette manière la production d'A $\beta$  (Santosa *et al.*, 2011; Tesco *et al.*, 2007; Vassar, 2007; Wahle *et al.*, 2006).

### 1.5.2. Le complexe rétromère

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 (Vps; *vacuolar protein sorting*). Les dimères de SNX sont composés de différentes combinaisons non définies des SNX1, SNX2, SNX5 et SNX6. Vps35 former 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/LR11. Les rétromères modulent le trafic rétrograde de l'APP directement ou indirectement via certains récepteurs capables de lier et d'affecter le trafic de la protéine APP comme SorLA/LR11 (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/LR11 (Spoelgen *et al.*, 2006) ou Sortiline (Finan *et al.*, 2011). Ainsi, en participant au transport rétrograde de l'APP et de BACE1, les rétromères permettent de restreindre le clivage amyloïdogénique et la production d'A $\beta$  en éloignant l'APP et BACE1 des endosomes, où le clivage  $\beta$  s'effectue majoritairement. Plus précisément, il est connu que Vps35 et SNX6 régulent directement le trafic de l'APP et de BACE1, respectivement. Vps35 module positivement la phosphorylation de l'APP, essentielle pour son transport rétrograde vers le TGN, ainsi que sa demi-vie, puisque la phosphorylation de l'APP réduit

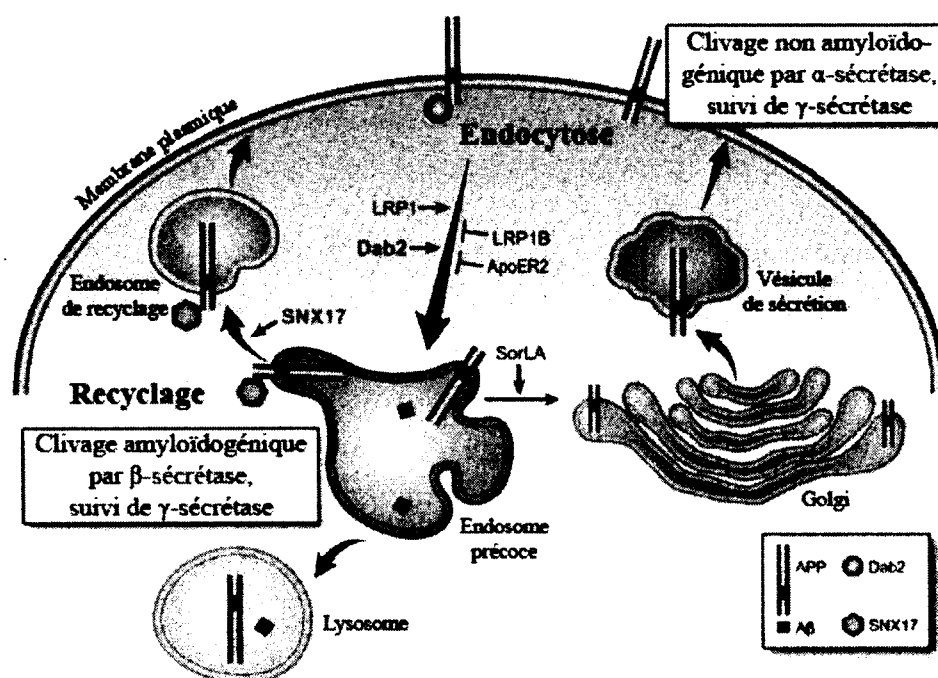
son trafic vers le lysosome (Vieira *et al.*, 2010). SNX6 a été retrouvé au sein d'un complexe avec BACE1 et module plutôt les niveaux de BACE1 intracellulaire et son transport rétrograde, puisqu'une réduction de SNX6 dans les neurones augmente le niveau basal de BACE1 ainsi que la production d'A $\beta$  (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 gens 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 autres d'augmenter le temps de passage de l'APP dans les endosomes en réduisant le transport rétrograde de l'APP directement ou indirectement, et pourrait aussi favoriser la proximité de l'APP avec BACE1, participant de cette manière à l'augmentation de la production d'A $\beta$  (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'A $\beta$  et de la neurodégénérescence (Muhammad *et al.*, 2008).

### **1.6. Les récepteurs de lipoprotéines de faibles densités impliqués dans la MA**

La famille des récepteurs de lipoprotéines de faibles densités LDLR (*Low density lipoprotein receptor*) est constituée de protéines transmembranaire de type I qui se caractérisent entre autres par la capacité de tous ces 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/LR11 (*sorting-protein related receptor containing LDLR Class A repeats*), en plus d'une nouvelle sous-famille plus récemment découverte et composée de 3 membres distincts LRP3, LRP12 et LRP10 (voir Figure 1.6 modifiée de Cam et Bu, 2006). 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



l'allèle  $\epsilon 4$  représente un facteur de risque génétique pour la MA, corrélant avec une augmentation de l'A $\beta$  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'A $\beta$  dans la MA. Parmi les récepteurs de la famille des LDLR, les récepteurs LRP1, LRP1B, ApoER2 et SorLA/LR11 ont été identifiés comme partenaires d'interaction de la protéine APP capables de moduler son trafic intracellulaire (Figure 1.7). Ainsi ces récepteurs interviennent de diverses manières dans le clivage de



**Figure 1.7. Modèle représentant les différentes voies du processus de clivage de l'APP, modulées par les membres de la famille des LDLR.** L'endocytose très rapide du récepteur LRP1 favoriserait l'endocytose de l'APP vers les endosomes et du même coup la production d'A $\beta$ . Alors que le rythme d'internalisation plus lent des récepteurs LRP1B et ApoER2, retiendrait l'APP à la surface. Bien que LRP1B favoriserait ainsi l'accessibilité de l'APP à la voie de clivage  $\alpha$ , réduisant ainsi la production de l'A $\beta$ , ApoER2 aurait aussi tendance à favoriser le clivage  $\alpha$ , mais des effets divergeant seraient aussi observés en fonction de son interaction avec ses différents ligands et protéines adaptatrices modulant son trafic. SorLA/LR11, effectuant un cycle entre le TGN et les endosomes, pourrait favoriser le transport rétrograde de l'APP des endosomes vers le TGN ou avoir un effet de rétention sur l'APP au niveau du TGN, réduisant son clivage  $\beta$  aux endosomes et la relâche de l'A $\beta$ . Les protéines adaptatrices Dab2 et SNX17 influenceraient aussi directement le trafic de l'APP. (Figure modifiée de Marzolo et Bu, 2009)

l'APP et la production d'A $\beta$ . 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).

### 1.6.1. LRP1

Le récepteur LRP1 (*LDLR-related protein 1*) est un récepteur de surface hautement exprimé dans le cerveau qui trafique entre la membrane plasmique et les endosomes. Une caractéristique unique de ce récepteur est son rythme d'endocytose très rapide avec un temps de demi-vie à la surface de moins de 30 secondes. Ainsi, l'interaction entre LRP1 et l'APP se produirait à la membrane plasmique et favoriserait l'endocytose de l'APP vers les endosomes via des vésicules de clathrine (Figure 1.7). De cette manière, LRP1 réduirait l'APP à la surface cellulaire et favoriserait le clivage amyloïdogénique et la production d'A $\beta$  (Bu *et al.*, 2006; Cam *et al.*, 2005; Ulery *et al.*, 2000). D'un autre côté, LRP1 est capable d'interagir avec BACE1 et la sous-unité catalytique PS1 du complexe  $\gamma$ -sécrétase et est même clivée par ces enzymes. LRP1 serait donc capable d'agir à titre de substrat compétitif à l'APP pour le clivage par les enzymes de la voie amyloïdogénique (Lleo *et al.*, 2005; Von Arnim *et al.*, 2005; Von Einem *et al.*, 2010). En plus de son interaction avec l'APP, BACE1 et PS1, plusieurs évidences relient LRP1 à la MA. Tout d'abord, la majorité des ligands de LRP1 sont aussi impliqués dans la MA, tels  $\alpha_2$ -macroglobuline, ApoE, et l'A $\beta$ . Ensuite, LRP1 est capable de moduler l'apport intracellulaire de l'A $\beta$  et aussi sa sortie du SNC vers le sang par la BHE, soit en liant directement l'A $\beta$  ou un autre ligand comme l'ApoE et l' $\alpha_2$ -macroglobuline complexé à l'A $\beta$  (Andersen et Willnow, 2006; Bu *et al.*, 2006; Deane *et al.*, 2008; Deane *et al.*, 2009; Marzolo et Bu, 2009). Ainsi, LRP1 est important tant dans la production d'A $\beta$  que dans son élimination afin de maintenir l'homéostasie cérébrale de l'A $\beta$  à l'état basal. De plus, la présence de LRP1 et de ses ligands a été rapportée au niveau des plaques amyloïdes (Marzolo et Bu, 2009). Enfin, bien que ces résultats soient controversés, il semble qu'il pourrait y avoir une association génétique significative entre plusieurs polymorphismes retrouvés dans le gène de LRP1 et la MA (Andersen et Willnow, 2006; Cam et Bu, 2006; Kang *et al.*, 1997; Marzolo et Bu, 2009; Panza *et al.*, 2006; Scott *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 2006).

### 1.6.2. LRP1B

Tout comme LRP1, LRP1B, qui a 59% d'identité de séquence avec ce dernier, est un récepteur de surface qui se retrouve principalement à la membrane plasmique et qui trafic entre la membrane plasmique et les endosomes. Toutefois, le rythme d'internalisation de ce récepteur serait beaucoup moins rapide avec un temps de demi-vie à la surface d'environ 8 à 10 minutes. Son interaction avec l'APP au niveau de la membrane plasmique retiendrait donc d'avantage l'APP à la surface en retardant son endocytose, favorisant ainsi son accès aux enzymes  $\alpha$ - et  $\gamma$ -sécrétases de la voie de clivage non amyloïdogénique (Figure 1.7). Cette rétention de l'APP à la surface cellulaire par LRP1B coïncide avec une réduction de la production du peptide A $\beta$ . Enfin, il est connu que LRP1B est exprimé au niveau de l'hippocampe, du cortex cérébral et du cervelet. Somme toute, le rôle de LRP1B dans le trafic et le processus de clivage de l'APP suggèrent que LRP1B pourrait réduire la relâche extracellulaire du peptide A $\beta$ . Ainsi une meilleure connaissance du trafic de LRP1B pourrait être un atout pour le développement de thérapie dans la MA (Andersen et Willnow, 2006; Bu *et al.*, 2006; Cam et Bu, 2006; Marzolo et Bu, 2009).

### 1.6.3. ApoER2

Exprimé au niveau des neurones, le récepteur ApoER2 (*Apolipoprotein E receptor 2*) se retrouve aussi à la membrane plasmique et est internalisé lentement dans les endosomes, de manière similaire à LRP1B (Figure 1.7). Ainsi, l'ApoER2 aurait la capacité de retenir l'APP à la membrane plasmique augmentant son clivage  $\alpha$  et réduisant la production d'A $\beta$ . Toutefois, l'interaction entre l'ApoER2 et l'APP est influencée par les différents ligands de l'ApoER2 comme la F-spondine, l'ApoE, la Reelin et l' $\alpha_2$ -macroglobuline. De cette manière, les effets de l'ApoER2 sur le trafic et le clivage de l'APP pourraient diverger en fonction des ligands présents à proximité et/ou des protéines adaptatrices recrutées pour moduler le trafic de l'ApoER2 et l'APP. Par exemple, l'ApoER2 pourrait lier simultanément l'APP et la F-spondine, favorisant la rétention de l'APP à la membrane et son clivage  $\alpha$ , alors que la liaison de l'ApoE au récepteur viendrait plutôt interférer dans la liaison entre l'ApoER2 et l'APP en bloquant l'interaction des deux protéines, ce qui favoriserait l'internalisation de l'APP ainsi que son clivage en A $\beta$ . Ensuite, la liaison de protéines adaptatrices telles Dab2 et Mint/X11 sur la queue



cytoplasmique de l'APP et de l'ApoER2 pourrait soit, favoriser l'endocytose des protéines et la voie de clivage amyloïdogénique ou encore stabiliser le complexe à la membrane plasmique et favoriser la voie de clivage non amyloïdogénique. De plus, la liaison de la Reelin et de la protéine adaptatrice Dab1 favoriserait le clivage  $\alpha$  tant de l'APP que du récepteur, puisque l'ApoER2 est aussi clivé par l' $\alpha$ - et la  $\gamma$ -sécrétase. Finalement, la présence de polymorphismes dans le gène de l'ApoER2 a été associés directement à la MA et il est connu que le niveau de Reelin est réduit dans la MA (Cam et Bu, 2006; Marzolo et Bu, 2009). Dans l'ensemble, on peut donc croire que le récepteur ApoER2 serait impliqué dans la MA, suite à la diminution de sa capacité de rétention de la protéine APP à la membrane plasmique.

#### 1.6.4. SorLA/LR11

Le récepteur SorLA/LR11 (*sorting-protein related receptor containing LDLR Class A repeats*) 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/LR11 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). Contrairement aux autres membres majoritairement retrouvés à la surface cellulaire, SorLA/LR11 serait retrouvé principalement au niveau du TGN et des endosomes et dans une moins grande proportion à la membrane plasmique. En fait, ce récepteur nouvellement synthétisé trafique du TGN 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 TGN (Willnow *et al.*, 2010). Par la suite, SorLA/LR11 effectuerait des cycles entre le TGN et les endosomes (Andersen *et al.*, 2005; Jacobsen *et al.*, 2001) grâce à son interaction avec les protéines adaptatrices GGA (Jacobsen *et al.*, 2002) et le complexe rétromère (Rogaeva *et al.*, 2007). Il est connu que SorLA/LR11 est capable d'interagir avec l'APP ainsi que BACE1 et d'en moduler le trafic intracellulaire (Andersen *et al.*, 2006; Spoelgen *et al.*, 2006). De cette manière, SorLA/LR11 influence le processus de clivage de l'APP et la production d'A $\beta$ . Dans des conditions physiologiques normales, SorLA/LR11 entraîne une diminution de la quantité

d'APP de surface, réduisant ainsi le clivage  $\alpha$  de l'APP et peut participer au transport rétrograde de l'APP des endosomes précoces vers le TGN ou encore exercer un effet de rétention sur l'APP au TGN, ce qui a pour effet de réduire le clivage  $\beta$  de l'APP et la production d'A $\beta$ . Ainsi, SorLA/LR11 a un effet protecteur, permettant de réduire le temps que passe l'APP aux endosomes tardifs, là où son clivage amyloïdogénique est optimal (Andersen *et al.*, 2005; Offe *et al.*, 2006). De plus, l'interaction de SorLA/LR11 avec BACE1, peut faire compétition avec l'APP, réduisant le niveau d'interaction entre l'APP et BACE1 (Spoelgen *et al.*, 2006). SorLA/LR11 est aussi clivé par la  $\gamma$ -sécrétase, faisant compétition une fois de plus avec l'APP pour son clivage (Marzolo et Bu, 2009; Nyborg *et al.*, 2006). Il a également été rapporté que le trafic de l'APP par SorLA/LR11 peut être modulé par l'interaction de ce dernier avec les GGA (Schmidt *et al.*, 2007) et les rétromères (Small et Gandy, 2006; Small *et al.*, 2005) (comme précédemment mentionné dans la section 1.5.). SorLA/LR11 agit donc à titre de récepteur de triage de la protéine APP 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). Effectivement, il est connu que le niveau d'expression de SorLA/LR11 est réduit dans la forme sporadique de la MA (Dodson *et al.*, 2006; Scherzer *et al.*, 2004) tout comme celui des GGA et des rétromères. Donc, la perte de l'effet protecteur de SorLA/LR11 provoquerait l'augmentation du clivage de l'APP et de la production d'A $\beta$  (Dodson *et al.*, 2008). Finalement, des polymorphismes (SNP) retrouvés dans le gène de SorLA/LR11 ont été directement associés au développement de la MA et ainsi, SorLA représente un facteur de risque de la maladie (Rogaeva *et al.*, 2007).

#### **1.6.4.1 Les récepteurs à domaine Vps10p impliqués dans la MA**

La famille des récepteurs à domaine Vps10p (*vacuolar protein sorting 10 p*) est constituée des récepteurs Sortiline, SorCS1, SorCS2 et SorCS3 ainsi que de SorLA/LR11. Ce sont des récepteurs cargo transmembranaires de type I liant la sous-unité centrale Vps35 du complexe rétromère (Hermey, 2009). En plus de LRP1 et SorLA/LR11, certains membres de cette famille dont Sortiline et SorCS1 interagissent avec BACE1 et l'APP respectivement et sont aussi des substrats de la  $\gamma$ -sécrétase (Nyborg *et al.*, 2006). Sortiline, un récepteur cargo impliqué dans le triage des protéines entre le TGN et les lysosomes, est

un partenaire d'interaction intervenant dans le transport rétrograde de BACE1 au TGN (Finan *et al.*, 2011). L'interaction de SorCS1 avec l'APP a pour effet de réduire la production d'A $\beta$ . Ainsi, des souris SorCS1 hypomorphiques voient leurs processus de clivage de l'APP et de production d'A $\beta$  augmentés dans leurs cerveaux (Lane *et al.*, 2010). De plus, SorCS1 a été génétiquement relié à la MA (Liang *et al.*, 2009; Reitz *et al.*, 2011b).

## 1.7. LRP10, un nouveau membre de la famille des LDLR

LRP10 (*LDLR-related protein 10*) (NCBI protein : NP\_054764) est un nouveau membre encore peu connu de la famille des LDLR. En 2000, l'équipe de Sugiyama et collègues a identifié pour la première fois la forme murine de ce récepteur nommé LRP9 et son orthologue humain LRP10, présentant 87% d'identité dans leurs séquences protéiques (ClustalW). Le gène codant pour LRP10 a été localisé au niveau du chromosome 14q11.2. Le récepteur LRP10 est exprimé de façon pratiquement ubiquitaire chez l'humain, donc dans pratiquement tous les tissus dont le cerveau (Sugiyama *et al.*, 2000).

### 1.7.1. Structures et domaines fonctionnels

Tout comme les autres membres de la famille des LDLR, LRP10 est une protéine transmembranaire de type I. LRP10 est un membre distinct de la famille des LDLR, faisant partie d'un sous groupe contenant LRP3 et LRP12 (Figure 1.6) (Sugiyama *et al.*, 2000). LRP10 présente une identité de séquence protéique de 37% et 33% (ClustalW) avec les formes humaines de LRP3 et LRP12 respectivement. La structure des récepteurs de cette sous-famille se distingue par l'absence de répétitions d'un domaine homologue au récepteur EGF ainsi que du domaine d'espacement YWTD dans leurs domaines extracellulaires. On retrouve plutôt dans leurs régions extracytoplasmiques deux domaines CUB (*complement C1r/C1s*, *Uegf*, *Bmp1*). Ces domaines sont connus pour être présents dans plusieurs autres protéines et interviendraient dans la liaison de ligands ainsi que des répétitions de domaine de liaison au ligand riche en cystéines LDLR de classe A, typique des LDLR. De plus, les membres de ce sous-groupe possèdent une large queue cytoplasmique contenant un ou deux motifs de triage intracellulaire dileucine DXXLL. Ces motifs sont importants dans le trafic intracellulaire pour l'interaction avec les protéines

adaptatrices de clathrine telles les GGA et les complexes AP-1/AP-2 (Battle *et al.*, 2003; Ishii *et al.*, 1998; Sugiyama *et al.*, 2000). De façon plus précise, LRP10 possède dans sa queue cytoplasmique un motif tyrosine YXXØ (ou X représente n'importe quel acide aminé et Ø n'importe quel acide aminé hydrophobe) impliqué dans l'endocytose, un domaine riche en arginine, deux domaines de liaison PDZ, une région riche en proline et deux motifs dileucine DXXLL de triage. Enfin, bien qu'aucune fonction précise n'a encore été attribuée à LRP10 jusqu'à maintenant, LRP10 a la capacité d'interagir avec des lipoprotéines contenant de l'ApoE, tout comme les autres membres de la famille des LDLR. En effet, il a été démontré que LRP10 pouvait moduler l'apport cellulaire des  $\beta$ -VLDL enrichies en ApoE (Sugiyama *et al.*, 2000).

### **1.7.2. Localisation et trafic intracellulaire**

Récemment, notre équipe (Boucher *et al.*, 2008) a démontré que LRP10 est localisé principalement au niveau du TGN et des endosomes dans les cellules à l'état basal. De plus, une faible portion du récepteur peut atteindre la membrane plasmique de manière très transitoire. En effet, LRP10 est très peu détecté à la membrane plasmique, probablement en raison du fait que LRP10 posséderait un rythme d'internalisation rapide (Boucher *et al.*, 2008; Doray *et al.*, 2007; Doray *et al.*, 2008). Deux motifs dileucine DXXLL ayant le potentiel de lier les protéines adaptatrices GGA sont retrouvés dans la queue cytoplasmique de LRP10. Le motif DXXLL distal est situé à l'extrémité carboxy-terminale de LRP10 tandis que le motif DXXLL proximal est 13 acides aminés en amont du motif distal. Ces deux motifs sont fonctionnels et permettent l'interaction non seulement avec le domaine VHS des GGA, mais aussi les complexes AP-1 et AP-2 (Boucher *et al.*, 2008; Doray *et al.*, 2007; Doray *et al.*, 2008). Chacun des motifs, seul, semblerait suffisant pour maintenir la localisation de LRP10 au TGN et aux endosomes. Toutefois, nous avons démontré que la mutation des deux motifs DXXLL en DXXAA, entraîne une perte d'interaction avec les GGA (tant GGA1, GGA2 que GGA3) ainsi qu'une redistribution du récepteur vers la membrane plasmique et les endosomes, en périphérie cellulaire (Boucher *et al.*, 2008). Comme les GGA sont connus pour participer au trafic, tant antérograde que rétrograde, de récepteur qui effectuent des cycles entre le TGN et les endosomes (Bonifacino, 2004; Ghosh et Kornfeld, 2004; Wahle *et al.*, 2005), la perte d'interaction de LRP10 avec les

GGA provoque un mauvais triage de LRP10 premièrement au niveau du TGN. Ceci a donc pour conséquence de redistribuer LRP10, de sorte qu'il quitterait le TGN de façon prématurée, n'étant plus retenu par les GGA, en étant empaqueté dans des endosomes précoces se dirigeant vers la périphérie cellulaire. Par la suite, LRP10 serait ainsi coincé dans ces endosomes où il s'accumulerait, puisqu'il ne pourrait plus retourner vers le TGN n'ayant plus de motif permettant le recrutement des GGA qui participent à son transport rétrograde des endosomes vers le TGN. Ainsi, nous avons suggéré qu'à l'état basal, LRP10 effectuerait des cycles entre le TGN et les endosomes via son interaction avec les GGA, modulant ainsi son transport tant antérograde que rétrograde. Une faible portion du récepteur LRP10 endogène peut possiblement être envoyée à la membrane plasmique ou encore est rapidement internalisée, expliquant pourquoi on peut observer la redistribution du mutant à la membrane plasmique. Il est connu que la mutation des deux motifs DXXLL entraîne aussi la perte d'interaction avec les complexes AP-1 et AP-2, qui sont potentiellement impliqués dans le processus d'internalisation de LRP10 (Doray *et al.*, 2007; Doray *et al.*, 2008). Cette perte d'interaction pourrait expliquer l'accumulation de LRP10 à la membrane plasmique, puisque la faible portion de récepteurs atteignant la surface cellulaire ne serait plus internalisée. La régulation du trafic intracellulaire de LRP10 est peu connue. Nous avons récemment démontré que la protéine Calnuc, une protéine liant le calcium, interagit avec la queue cytoplasmique de LRP10 et module son routage intracellulaire. Nous avons observé que la déplétion de Calnuc redirige le trafic de LRP10 vers les lysosomes, entraînant ainsi une diminution du niveau intracellulaire de la protéine (Brodeur *et al.*, 2009). De façon intéressante, il est connu que Calnuc joue un rôle dans la pathogénèse de la MA, puisque son expression est réduite de façon significative dans le cerveau de patients atteints de la MA (Lin *et al.*, 2007).

### **1.8. Hypothèse et objectifs de l'étude**

La protéine APP est responsable de la relâche du peptide A $\beta$  neurotoxique dans la MA. L'APP peut subir deux voies de clivage distinctes soient, non amyloïdogénique à la membrane plasmique, qui ne produit pas d'A $\beta$ , ou amyloïdogénique au niveau des endosomes, entraînant la production d'A $\beta$ . Il est connu que le trafic de l'APP est primordial dans la régulation de son clivage et la production d'A $\beta$ . Plusieurs membres de la famille

des LDLR seraient impliqués dans le trafic et le processus de clivage de l'APP, ainsi que dans la production du peptide A $\beta$ . Ces récepteurs joueraient un rôle potentiel dans la MA non seulement grâce à leurs capacités de moduler la production d'A $\beta$ , mais certains, dont SorLA/LR11, verraient aussi leurs expressions modulées dans la maladie et seraient même génétiquement reliés. LRP10, un nouveau membre relativement récent de la famille des LDLR, possède une localisation et un trafic intracellulaire similaire à SorLA/LR11 au niveau du TGN et des endosomes. Dans une étude précédente, notre équipe a suggéré que LRP10 pourrait jouer le rôle d'un récepteur cargo, participant au transport d'autres protéines entre le TGN et les endosomes. De plus, il est connu que LRP10 possède des partenaires d'interaction tels les protéines GGA et Calnuc dont les niveaux d'expression seraient réduits dans la MA.

Conséquemment, nous avons émis l'hypothèse que LRP10 serait un nouveau récepteur de la protéine APP, intervenant dans son trafic entre le TGN et les endosomes, en modulant par le fait même ses différents processus de clivage et la production d'A $\beta$ . Nous explorerons aussi la possibilité que LRP10 soit impliqué dans la MA.

Dans cette étude, afin de vérifier notre hypothèse de départ nous avons identifié les quatre objectifs de recherche suivants :

- **Objectif 1** : Déterminer si LRP10 et l'APP sont des partenaires d'interaction et identifier le type d'interaction; directe ou indirecte.
- **Objectif 2** : Déterminer si LRP10 influence le trafic de l'APP et à quel niveau LRP10 intervient dans son trafic.
- **Objectif 3** : Déterminer si LRP10 est capable de moduler les processus de clivage de l'APP ainsi que la production d'A $\beta$ .
- **Objectif 4** : Déterminer si le niveau d'expression de LRP10 est altéré dans la MA.

## **Résultats**

### **LDLR-Related Protein 10 (LRP10) alters amyloid precursor protein (APP) trafficking and processing: evidence for a role in Alzheimer's disease**

**Auteurs de l'article :** Julie Brodeur, Caroline Thériault, Mélissa Lessard-Beaudoin, Alexandre Marcil, Sophie Dahan et Christine Lavoie

**Statut de l'article :** En révision

Molecular Neurodegeneration

#### **Avant-propos:**

Ma contribution à la production des résultats de ce manuscrit est majoritaire. J'ai développé les lignées cellulaires stables et effectué l'analyse des produits du clivage de l'APP par immunobuvardage et dosage AlphaLISA. J'ai aussi effectué la majeure partie des expériences d'immunoprécipitation et d'immunofluorescence. J'ai exécuté les expériences de déplétion de LRP10 par petits ARN interférents (siRNA), les essais de qRT-PCR et l'analyse protéique des extraits de cerveaux. De plus, j'ai participé de façon active à la rédaction du manuscrit, entre autres, pour la conception des figures et la rédaction de la section matériel et méthodes, ainsi qu'à la révision du manuscrit avant sa soumission.

## Résumé

### Avant-propos

Le peptide amyloïde- $\beta$  ( $A\beta$ ), s'accumulant dans la maladie d'Alzheimer (MA), est dérivé de la protéine APP (*amyloid precursor protein*) suite à son clivage endoprotéolytique par les sécrétases  $\beta$  et  $\gamma$ . Plusieurs évidences indiquent que l'altération du trafic des voies sécrétoire et endocytique de l'APP, a un impact direct sur l'interaction de l'APP avec ces sécrétases et subséquemment, sur la production d' $A\beta$ . Une variété de membres de la famille des récepteurs de lipoprotéines de faibles densités (LDLR; *low density lipoprotein receptor*) sont connus pour jouer un rôle dans le trafic, ainsi que dans le processus de clivage de l'APP et représentent d'importants facteurs de risque dans la MA. Nous avons récemment caractérisé un membre de la famille des LDLR nommé LRP10 (*LDLR-related protein 10*) qui trafic entre le TGN (*trans-Golgi Network*) et les endosomes. Dans cette étude, nous déterminons comment LRP10 participe au trafic intracellulaire de l'APP et à la production d' $A\beta$ .

### Résultats

Dans cet article, nous apportons l'évidence que LRP10 est un récepteur fonctionnel de la protéine APP, impliqué dans son trafic et son clivage. LRP10 interagit directement avec l'APP et colocalise avec l'APP au TGN. L'augmentation d'expression de LRP10 dans les cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y induit l'accumulation de l'APP mature au Golgi et réduit son clivage en  $A\beta$ , alors que la déplétion de l'expression de LRP10 augmente la production d' $A\beta$ . La mutation de motifs clés responsables du recyclage de LRP10 au TGN, résulte en une redistribution aberrante de l'APP avec LRP10 aux endosomes précoces et une augmentation concomitante du clivage  $\beta$  de l'APP en  $A\beta$ . De plus, l'expression de LRP10 est réduite de façon significative dans les tissus post-mortem de cerveaux de patients atteints de la MA, supportant ainsi le rôle possible de LRP10 dans la MA.

### Conclusions

Dans cette étude, nous identifions LRP10 comme un nouveau récepteur de triage de la protéine APP, qui protège l'APP de son clivage amyloïdogénique, suggérant qu'une diminution de LRP10 pourrait contribuer à la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer.



## **Abstract**

### **Background**

The A $\beta$  peptide that accumulates in Alzheimer's disease (AD) is derived from amyloid precursor protein (APP) following proteolysis by  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases. Substantial evidence indicates that alterations in APP trafficking within the secretory and endocytic pathways directly impact the interaction of APP with these secretases and subsequent A $\beta$  production. Various members of the low-density lipoprotein receptor (LDLR) family have been reported to play a role in APP trafficking and processing and are important risk factors in AD. We recently characterized a distinct member of the LDLR family called LDLR-related protein 10 (LRP10) that shuttles between the trans-Golgi Network (TGN) and endosomes. Here we investigate whether LRP10 participate in APP intracellular trafficking and A $\beta$  production.

### **Results**

In this report, we provide evidence that LRP10 is a functional APP receptor involved in APP trafficking and processing. LRP10 interacts directly with APP and colocalizes with APP at the TGN. Increased expression of LRP10 in human neuroblastoma SH-SY5Y cells induces the accumulation of mature APP in the Golgi and reduces its processing into A $\beta$ , while knockdown of LRP10 expression increases A $\beta$  production. Mutations of key motifs responsible for the recycling of LRP10 to the TGN results in the aberrant redistribution of APP with LRP10 to early endosomes and a concomitant increase in APP  $\beta$ -cleavage into A $\beta$ . Furthermore, expression of LRP10 is significantly reduced in the post-mortem brain tissues of AD patients, supporting a possible role for LRP10 in AD.

### **Conclusions**

This study identifies LRP10 as a novel APP sorting receptor that protects APP from amyloidogenic processing, suggesting that a decrease in LRP10 function may contribute to the pathogenesis of Alzheimer's disease.

**Keywords:** LDLR-related protein 10 (LRP10), amyloid precursor protein, amyloid beta (A $\beta$ ), intracellular trafficking, Alzheimer's disease, endosome, trans-Golgi Network (TGN), Low density lipoprotein receptor (LDLR)

## Introduction

Amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) peptide accumulation in the brain is central to the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD).  $A\beta$  is produced by serial proteolysis of amyloid precursor protein (APP) by secretases [1]. APP processing to amyloidogenic and nonamyloidogenic products is greatly affected by the subcellular localization of APP, presumably because of the specific subcellular localizations of secretases [2]. Nonamyloidogenic processing occurs mainly at the cell surface, where  $\alpha$ -secretase and  $\gamma$ -secretases cleave APP into a soluble sAPP $\alpha$  fragment and non-toxic peptide p3. Amyloidogenic processing involves transit through endocytic organelles, where APP encounters  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases that cleave it into a soluble sAPP $\beta$  fragment and toxic  $A\beta$  peptides [2]. APP-interacting proteins that alter APP trafficking thus impact  $A\beta$  production.

Many members of the low-density lipoprotein receptor (LDLR) family interact with APP and regulate its intracellular trafficking [3]. The LDLR family consists of a large class of surface receptors usually involved in endocytosis and lipid metabolism [4]. However, recent reports have indicated that various members of this family play a role in APP trafficking and processing and are important risk factors in AD (reviewed in [2]). LDLR-related protein 1 (LRP1), a multifunctional endocytic receptor, interacts with APP and facilitates its internalization in endosomes and, consequently, its cleavage into  $A\beta$  [5]. Genetic studies have also linked LRP1 to AD [6]. SorLA (also called LR11 or SorL1) is a unique member of the LDLR family that is mainly localized in the trans Golgi network (TGN) and endosomes [7]. SorLA interacts with APP and acts as a retention factor for APP in the Golgi, reducing its processing by secretases [8, 9]. Decreased levels of SorLA in the brain of AD patients as well as epidemiological studies [8, 10] have associated SorLA with AD.

Human LDLR-related protein 10 (LRP10, called LRP9 in mice) is a member of a new subfamily of LDLR that includes two other receptors, LRP3 and LRP12 [11]. This unique subfamily of LDLR is characterized by extracellular CUB domains and large cytoplasmic

tails containing acidic dileucine (DXXLL) motifs [12]. Little is known about LRP10 apart from the fact that it is expressed in various tissues (including the brain), may be involved in apolipoprotein internalization [13], and is localized in the TGN and endosomes [12]. Two DXXLL motifs in the cytoplasmic tail of LRP10 interact with the clathrin adaptor GGA and AP proteins and are involved in LRP10 shuttling between the TGN and endosomes [12, 14]. This strongly suggests that LRP10 plays a role in ligand trafficking between these intracellular compartments.

In the present study, we tested the hypothesis that LRP10 is a novel APP receptor involved in APP trafficking and processing to A $\beta$  and explored its potential involvement in AD.

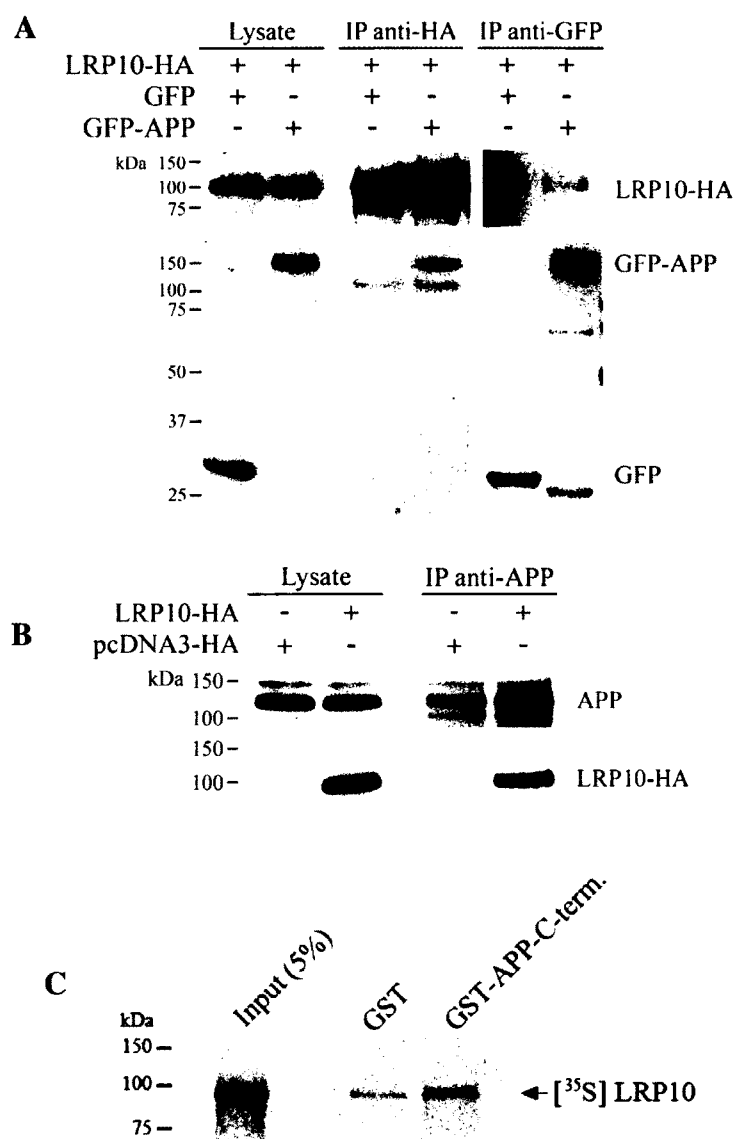
## RESULTS

### **LDLR-related protein 10 (LRP10) is a novel APP-interacting protein.**

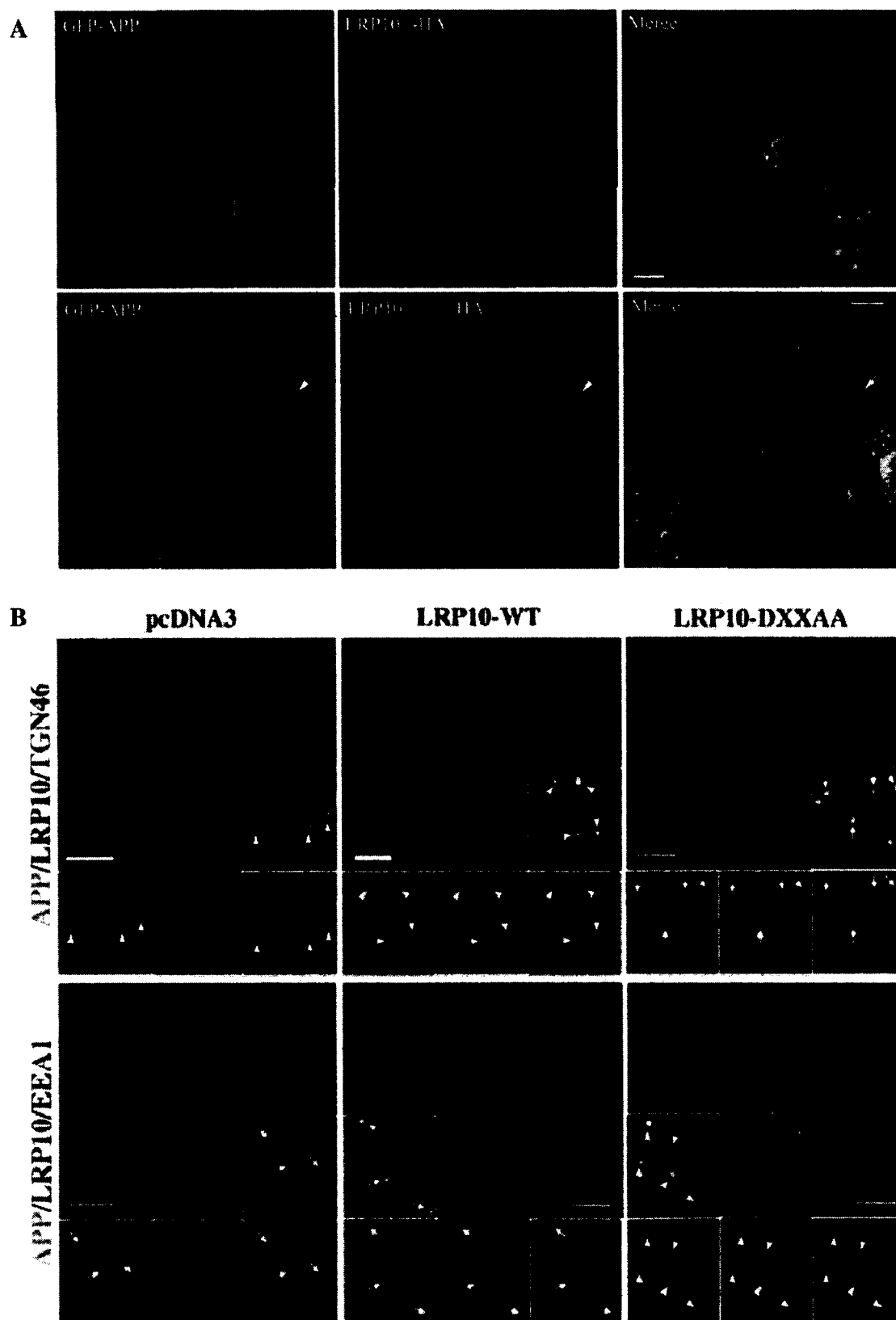
We initially evaluated the ability of LRP10 to bind APP since such binding would indicate that LRP10 plays a role as an intracellular APP receptor. We first performed immunoprecipitation experiments on HEK293 cells transfected with HA-tagged LRP10 and green fluorescent protein (GFP)-tagged APP. GFP-APP coprecipitated with LRP10-HA when we performed the immunoprecipitation with anti-HA immunoglobulin (IgG) (Fig. 1A). Similarly, LRP10-HA coprecipitated with GFP-APP when we used anti-GFP IgG (Fig. 1A). This interaction was confirmed using untagged APP (Supplemental Fig. 1). We next looked at whether endogenous APP interacts with LRP10 in HEK cells transfected only with HA-tagged LRP10. LRP10-HA coimmunoprecipitated with APP in the presence of anti-APP, confirming that LRP10 interacts specifically with endogenous APP in intact cells (Fig. 1B). Lastly, we verified the *in vitro* interactions between APP and LRP10 using pull-down assays. The interaction between <sup>35</sup>S-labeled *in vitro*-translated LRP10 and the GST-APP-C-terminus was stronger than the interaction between LRP10 and GST alone (Fig. 1C), indicating that LRP10 interacts directly with APP, both *in vitro* and *in vivo*.

### **LRP10 colocalizes with APP in the TGN.**

To determine whether LRP10 colocalizes with APP, we compared the intracellular distribution of HA-tagged LRP10 with GFP-tagged APP in HeLa cells by confocal microscopy. We mainly detected wild-type LRP10-HA in the juxtannuclear region and surrounding vesicles (Fig. 2A). This was in agreement with our previous findings showing that LRP9, the mouse homolog of LRP10, localizes in the trans-Golgi network (TGN) and in endosomes in the Golgi area [12]. A comparison of the distribution of LRP10-HA with TGN46 and EEA1, which are TGN and early endosome markers respectively, confirmed that LRP10 resides predominantly in the TGN and, to a lesser extent, in endosomes (Supplemental Fig. 2A). GFP-tagged APP was concentrated in the Golgi region (Fig. 2A), where it extensively colocalized with LRP10<sup>wt</sup>-HA (Fig. 2A, Merge). Partial colocalization was also observed in the vesicles surrounding the TGN (Fig. 2A, Merge). The results of the IF and biochemical interaction assays suggested that LRP10 interacts with APP in the TGN cisternae and in the surrounding endosomes.



**Figure 1. LRP10 interacts with APP.** (A) *In vivo* interaction of LRP10-HA and GFP-APP<sub>695</sub> proteins. Lysates of HEK cells transfected with HA-tagged LRP10 and GFP or GFP-tagged APP were immunoprecipitated with anti-HA or anti-GFP antibody and then immunoblotted with anti-HA or anti-GFP antibody to detect LRP10 and GFP, respectively. (B) LRP10-HA interacts with endogenous APP. Lysates of HEK cells transfected with pcDNA3-HA or LRP10-HA were immunoprecipitated with anti-APP antibody and then immunoblotted with anti-HA antibody. (C) *In vitro* interaction of LRP10 with APP. GST-APP<sub>695</sub> cytoplasmic tail or GST protein (15  $\mu$ g each) immobilized on glutathione beads was incubated with *in vitro* translated <sup>35</sup>S-labeled LRP10. Bound proteins were separated by SDS-PAGE and detected by autoradiography. Input equaled 5% of the total *in vitro*-translated product.



**Figure 2. LRP10 colocalizes with APP and modulates its intracellular distribution. (A)** Comparison of the intracellular distribution of APP and LRP10 wild-type (LRP10<sup>wt</sup>) or trafficking mutant (LRP10<sup>2DXXAA</sup>). HeLa cells were transfected with GFP-APP and wild-type LRP10-HA (LRP10<sup>wt</sup>-HA) or HA-tagged-LRP10 in which two DXXLL motifs (that bind the clathrin adaptors GGAs) in the cytoplasmic tail were mutated (LRP10<sup>2DXXAA</sup>-HA). Cells were fixed, permeabilized, and immunostained with anti-GFP and anti-HA antibodies. The labeled cells were examined by confocal fluorescence microscopy. Top panel shows that LRP10<sup>wt</sup>-HA was detected in the juxtannuclear region and surrounding vesicles (inset). GFP-tagged APP was detected mainly in the Golgi region, where it partially overlapped with LRP10<sup>wt</sup>-HA (inset). The merged image (yellow) shows a partial overlap between LRP10<sup>wt</sup>-HA and GFP-APP in the Golgi cisternae and peripheral endosomes. Bottom panel shows that HA-tagged LRP10<sup>2DXXAA</sup> is redistributed to the plasma membrane (arrow) and peripheral early endosomes (inset). GFP-APP was also detected on the plasma membrane (arrows) and in peripheral endosomes (inset), where it colocalized with LRP10<sup>2DXXAA</sup>-HA (yellow, inset). Scale bar, 10  $\mu$ m. **(B)** LRP10<sup>2DXXAA</sup> inhibits the retrograde transport of APP from the endosome to the TGN. Internalization of APP was evaluated in HeLa cells transfected with APP<sub>695</sub> and pcDNA3, HA-tagged LRP10<sup>wt</sup> or LRP10<sup>2DXXAA</sup>. The cells were pre-incubated on ice to arrest endocytosis, and APP molecules exposed on the cell surface were immunolabeled with antiserum directed against APP ( $\alpha$ -22C11) at 4°C. Endocytosis and TGN targeting of APP were evaluated after 60-min chase periods at 37°C. Cells were then fixed, permeabilized, and immunostained with anti-HA (red) and anti-TGN46 or anti-EEA1 (blue) antibodies. The labeled cells were examined by confocal fluorescence microscopy. In cells expressing pcDNA3 and LRP10<sup>wt</sup>-HA, internalized APP (int-APP, green) was localized in the Golgi region and partially colocalized with the TGN marker TGN46. However, in cells expressing LRP10<sup>2DXXAA</sup>-HA, internalized APP (int-APP) was distributed mainly in vesicles labeled with the endosomal marker EEA1 and LRP10<sup>2DXXAA</sup>-HA. Arrowheads indicate structures where APP colocalized with TGN46 or EEA1 while arrows indicate structures in which APP and TGN46 or EEA1 did not colocalize. Scale bar, 10  $\mu$ m.

### **LRP10 affects the intracellular distribution of APP.**

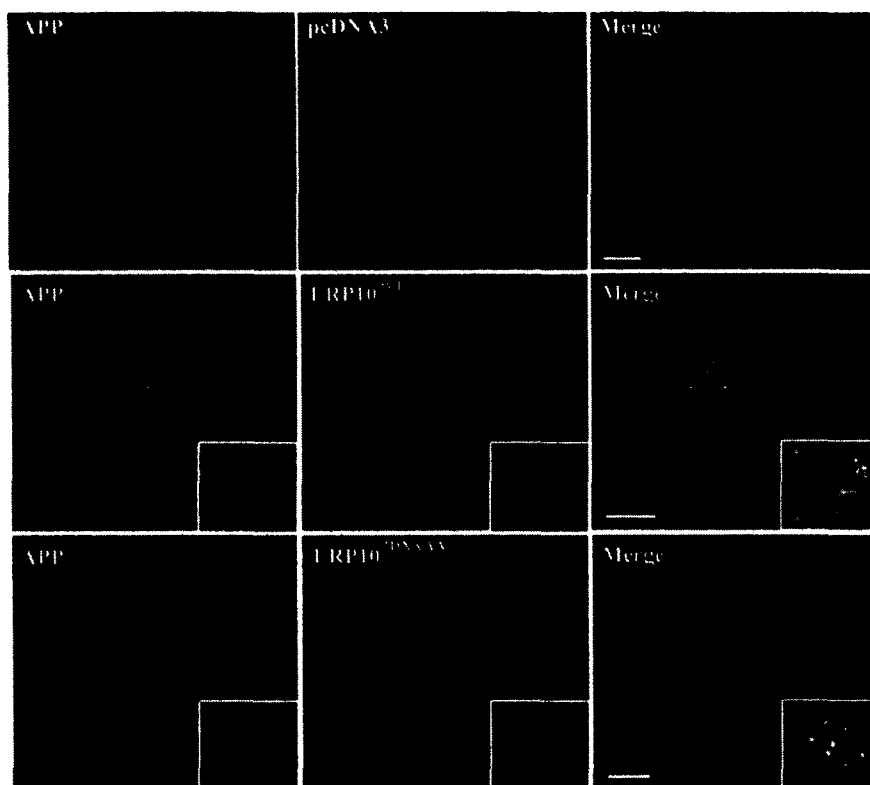
To investigate the functional role of LRP10 on APP intracellular transport, we examined the subcellular distribution of APP in HeLa cells expressing an LRP10-trafficking mutant (LRP10<sup>2DXXAA</sup>). We and others recently showed that the substitution of leucines by alanines in two DXXLL motifs of the cytoplasmic tail of LRP9 (mouse homolog of LRP10) inhibits the interaction of LRP9 with clathrin adaptors AP-1/AP-2 and GGAs (Golgi-localized,  $\gamma$ -ear containing ARF-binding proteins) and causes its mislocalization to the endosomes and plasma membrane [12, 14]. In concordance with the fact that the cytoplasmic tail of LRP10 has 83% homology with LRP9, the mutation of the two DXXLL motifs conserved in the cytoplasmic tail of LRP10 (LRP10<sup>2DXXAA</sup>) induced its redistribution to the cell surface and to peripheral punctate structures (Fig. 2A). As previously observed with LRP9<sup>2DXXAA</sup> [12],

a confocal microscopic assessment of the distribution of HA-tagged LRP10<sup>2DXXAA</sup> with TGN46 and EEA1 confirmed that the DXXAA mutations shifted the distribution of LRP10 from the TGN to the plasma membrane and peripheral early endosomes (Supplemental Fig. 2B). Interestingly, the intracellular distribution of GFP-APP was modified in cells expressing the LRP10<sup>2DXXAA</sup>-trafficking mutant. In addition to its distribution in the Golgi region, GFP-APP colocalized with LRP10<sup>2DXXAA</sup> in peripheral endosomes and at the plasma membrane (Fig. 2A). Furthermore, co-immunoprecipitation assays confirmed that HA-tagged LRP10<sup>2DXXAA</sup> interacted with APP (Supplemental Fig. 1). To determine whether LRP10 participates in the internalization and retrograde transport of cell surface APP to the TGN, we next analyzed the uptake of cell surface-labeled APP in cells overexpressing APP<sub>695</sub> and HA-tagged LRP10<sup>wt</sup> or LRP10<sup>2DXXAA</sup> (Fig. 2B). No altered internalization behavior was seen for APP coexpressed with LRP10<sup>wt</sup> since cell surface labeled-APP colocalizes with TGN46 after 60 min incubation, as observed in control cells (Fig. 2B, arrowheads), indicating that APP reached the Golgi. However, in cells expressing LRP10<sup>2DXXAA</sup>, APP colocalized with EEA1 (Fig. 2B, arrowheads) and did not redistribute to the TGN, even after 60 min (Fig. 2B, arrows), indicating that APP was retained in the endosomes. These results indicated that LRP10 activity does not influence APP uptake from the cell surface while LRP10<sup>2DXXAA</sup> inhibits the retrograde transport of APP from the endosome to the TGN.

To confirm the role of LRP10 in the redistribution of APP in a system that more closely mimics physiological conditions, we investigated the effect of LRP10 overexpression on the distribution of APP in SH-SY5Y cells, a human neuroblastoma cell line that expresses endogenous APP and produces very little LRP10 protein. We generated SH-SY5Y cells that stably expressed pcDNA3 (control), as well as high levels of HA-tagged LRP10<sup>wt</sup> or HA-tagged LRP10<sup>2DXXAA</sup>. In the control cells, endogenous APP was localized in the Golgi region and surrounding vesicles (Fig. 3). In cells expressing LRP10<sup>wt</sup>, APP labeling was stronger in the Golgi region, where it colocalized with LRP10<sup>wt</sup> (Fig. 3, Merge). As with HeLa cells, the expression of LRP10<sup>2DXXAA</sup> in SH-SY5Y cells led to a redistribution of APP from the TGN to peripheral early endosomes, where it colocalized with HA-tagged LRP10<sup>2DXXAA</sup> (Fig. 3, Merge). In these cells, plasma membrane labeling of LRP10<sup>2DXXAA</sup> was less prominent. These observations suggested that



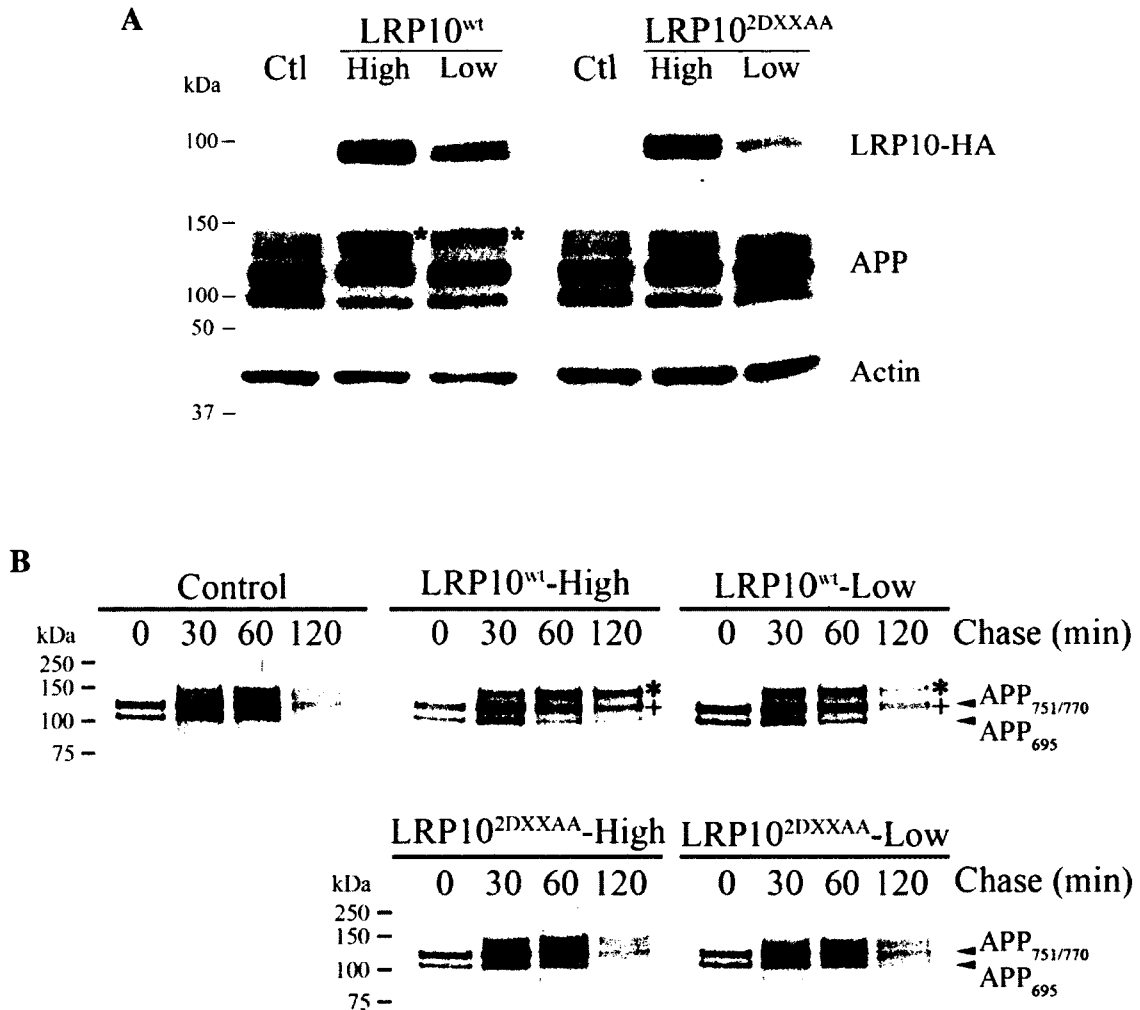
### LRP10 affects the intracellular distribution of APP.



**Figure 3. LRP10 colocalizes and alters the distribution of endogenous APP in neuronal SH-SY5Y cells.** SH-SY5Y cells were stably transfected with empty pcDNA3 vector or high levels of HA-tagged-LRP10<sup>wt</sup> or -LRP10<sup>2DXXAA</sup>. Cells were fixed, permeabilized, and immunostained with anti-APP and anti-HA antibodies. The labeled cells were examined by confocal fluorescence microscopy. Upper panel shows that endogenous APP was detected in the Golgi region and surrounding vesicles in control (pcDNA3) cells. Middle panel shows that LRP10<sup>wt</sup>-HA was detected in the juxtannuclear region and surrounding vesicles (inset). Endogenous APP was mainly detected in the Golgi region, where it partially overlapped with LRP10<sup>wt</sup>-HA (inset). The merged image (yellow) shows a partial overlap between LRP10<sup>wt</sup>-HA and endogenous APP in the Golgi cisternae. Bottom panel shows that LRP10<sup>2DXXAA</sup>-HA is redistributed to peripheral early endosomes (inset). Endogenous APP was also detected in peripheral endosomes (inset), where it colocalized with HA-tagged LRP10<sup>2DXXAA</sup> (yellow, inset). Scale bar, 10  $\mu$ m.

### LRP10 alters the processing of APP in SH-SY5Y cells

To establish a causal role for LRP10 in APP trafficking, we investigated the effect of LRP10 overexpression on the processing of APP in SH-SY5Y cells stably expressing pcDNA3, HA-tagged LRP10<sup>wt</sup>, or HA-tagged LRP10<sup>2DXXAA</sup>. Clones expressing low or high



**Figure 4. Level of expression and maturation of APP in SH-SY5Y cells expressing wild-type and mutant forms of LRP10.** SH-SY5Y stable cell clones expressing pcDNA3 vector alone (Ctl) or low or high levels of HA-tagged LRP10 (LRP10<sup>wt</sup>-Low or -High) or of HA-tagged LRP10 trafficking mutant (LRP10<sup>2DXXAA</sup>-Low or -High) were compared by Western blotting (A). Representative data showing lysates subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with antisera directed against HA or APP. The three APP variants (APP<sub>695</sub>, APP<sub>751</sub>, and APP<sub>770</sub>) were detected by the anti-APP antibodies. The asterisk indicates an accumulation of mature APP (glycosylated APP<sub>751/770</sub>) in the presence of LRP10<sup>wt</sup>. Actin was used as a loading control. (B) SH-SY5Y control cells or cells stably expressing high or low levels of LRP10<sup>wt</sup> or LRP10<sup>2DXXAA</sup> were pulse-labeled with [<sup>35</sup>S]methionine for 5 min and chased at 37°C for the indicated time. Radiolabeled APP was immunoprecipitated from the cell extracts and analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. The three APP variants (APP<sub>695</sub>, APP<sub>751</sub>, and APP<sub>770</sub>) are indicated by arrows. Accumulations of mature APP (\*, indicates mature APP<sub>751/770</sub>; +, indicates mature APP<sub>695</sub>) were observed in cells overexpressing high or low levels of LRP10<sup>wt</sup>.

levels of LRP10 were used to demonstrate that the effects were not an artifact of the expression levels, a concern commonly raised with overexpression studies. We first used Western blot analyses to compare the levels of APP in clones expressing low or high levels of LRP10<sup>wt</sup> and LRP10<sup>2DXXAA</sup> (Fig. 4A). As previously reported, APP<sub>695</sub>, APP<sub>751</sub>, and APP<sub>770</sub>, three variants of endogenous APP, were detected in these cells [15, 16]. The levels of the APP variants were similar in the different clones. However, overexpression of high and low levels of LRP10<sup>wt</sup> resulted in the accumulation of a higher molecular weight form of APP compare to control and LRP10<sup>2DXXAA</sup> cells (Fig. 4A, asterisks). This higher molecular weight form of APP correspond to the mature (glycosylated) forms of APP<sub>751/770</sub> [16, 17]. The accumulation of the mature APP species in the presence of LRP10<sup>wt</sup> was confirmed by studying the time course of APP maturation using [<sup>35</sup>S]methionine pulse-chase experiments (Fig. 4B). The emergence of mature forms of APP followed similar kinetics in cells without LRP10 and with LRP10<sup>wt</sup> or LRP10<sup>2DXXAA</sup> (30 min chase), but the half-life of the mature APP protein was significantly longer in the presence of LRP10<sup>wt</sup> (Fig. 4B).

We next investigated whether LRP10 altered the generation of APP processing products using Western blotting to detect total soluble APP fragment (sAPP $\alpha$  + sAPP $\beta$ ) as well as intracellular  $\beta$ -carboxy-terminal fragment ( $\beta$ -CTF) levels (Fig. 5A). In parallel, AlphaLISA assays were performed to specifically detect and quantify the secretion of sAPP $\alpha$ , sAPP $\beta$ , and the A $\beta$ <sub>40</sub> peptide into the cell culture media (Fig. 5B). The expression of low or high levels of LRP10<sup>wt</sup> in SH-SY5Y cells resulted in lower total sAPP and  $\beta$ -CTF levels as assessed by Western blotting (Fig. 5A). This was confirmed and quantified by AlphaLISA (Fig. 5B). Compared to control cells, both high and low levels of LRP10 expression caused a >20% decrease (p<0.001) in sAPP $\alpha$ , >45% (p<0.001) in sAPP $\beta$ , and nearly 50% (p<0.001) in A $\beta$ <sub>40</sub> levels (Fig. 5B). In contrast, the expression of low or high levels of LRP10<sup>2DXXAA</sup> increased sAPP and  $\beta$ -CTF levels as assessed by Western blotting (Fig. 5A). The AlphaLISA assays indicated that there was no significant effect on the secretion of sAPP $\alpha$  (p>0.05) but that sAPP $\beta$  levels increased by more than 60% (p<0.005) in both LRP10<sup>2DXXAA</sup> clones compared to control cells (Fig. 5B). However, low expression levels of LRP10<sup>2DXXAA</sup> increased A $\beta$ <sub>40</sub> secretion by 40% (p<0.005) while high expression levels caused a 26% decrease in A $\beta$ <sub>40</sub> levels (p<0.005) (Fig. 5B). In summary, the over-

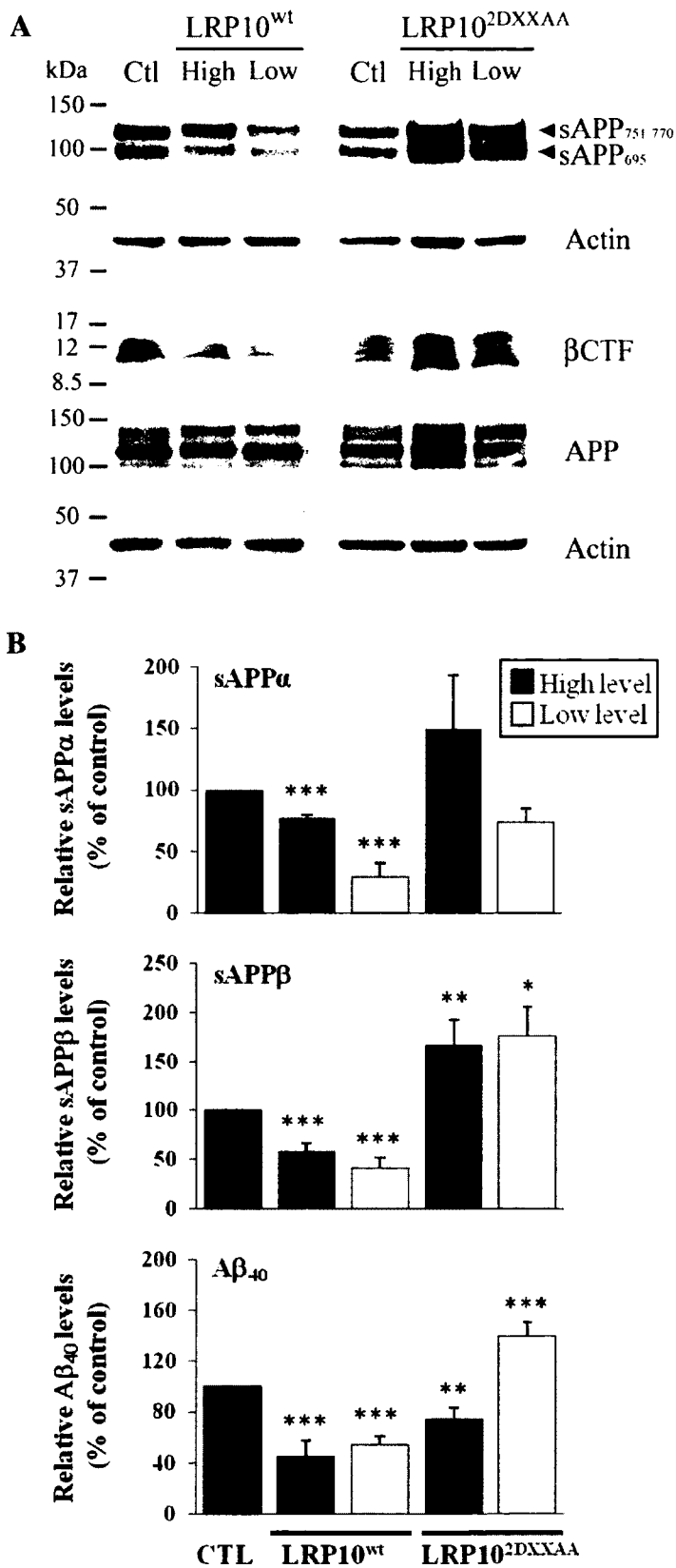
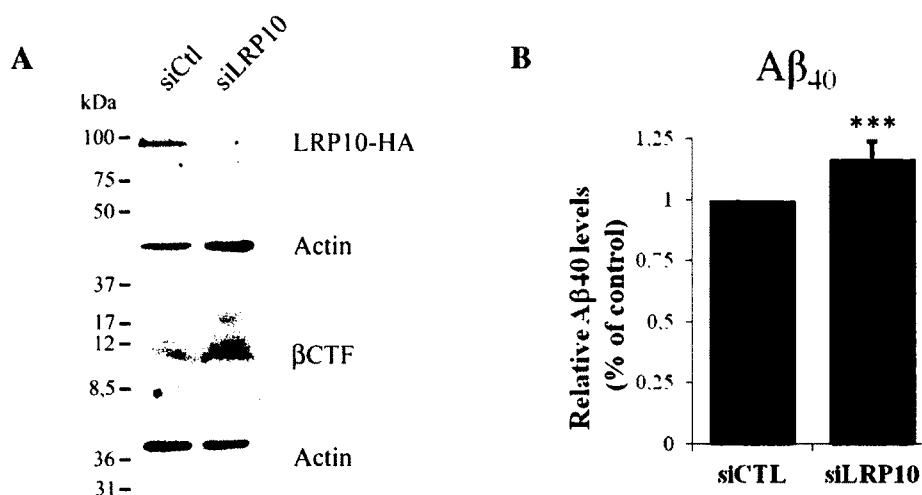


Figure 5. Legend on next page.

**Figure 5. LRP10 overexpression alters APP processing in SH-SY5Y cells.** APP cleavage products in SH-SY5Y stable clones expressing pcDNA3 vector alone (Ctl) or low or high levels of HA-tagged LRP10<sup>wt</sup> (LRP10<sup>wt</sup>-Low or -High) or LRP10 trafficking mutant LRP10<sup>2DXXAA</sup> (LRP10<sup>2DXXAA</sup>-Low or -High). **(A)** Representative Western blot of total sAPP secreted in the media and of  $\beta$ -CTF and total APP in the cell lysates of the indicated SH-SY5Y stable clones. Actin was used as loading control. **(B)** AlphaLISA quantitative analysis of sAPP $\alpha$ , sAPP $\beta$ , and A $\beta$ <sub>40</sub> in the media of the SH-SY5Y stable clones expressing pcDNA3 vector alone (Ctl, dark grey column), low level (white column) or high level (black column) of HA-tagged LRP10<sup>wt</sup> (LRP10<sup>wt</sup>) or of LRP10 trafficking mutant (LRP10<sup>2DXXAA</sup>). Results are expressed as means  $\pm$  SD (n=3). \*, p< 0.01; \*\*, p< 0.005; \*\*\*, P<0.001 (compared with control cells).

expression of LRP10<sup>wt</sup> resulted in decreased non-amyloidogenic and amyloidogenic processing. In contrast, low levels of LRP10<sup>2DXXAA</sup> expression increased the amyloidogenic processing of APP. However, while high levels of LRP10<sup>2DXXAA</sup> expression increased amyloidogenic processing, as indicated by the increases in sAPP $\beta$  and  $\beta$ -CTF, the A $\beta$ <sub>40</sub> levels was unexpectedly decreased. The expression of LRP10<sup>2DXXAA</sup> thus increased the amyloidogenic processing of APP, which was expected since this LRP10 mutant increased the presence of APP in endosomes, the principal location of  $\beta$ -secretase. However, high LRP10<sup>2DXXAA</sup> levels seemed to affect the  $\gamma$ -secretase cleavage of  $\beta$ -CTF and in turn reduce A $\beta$ <sub>40</sub> production.

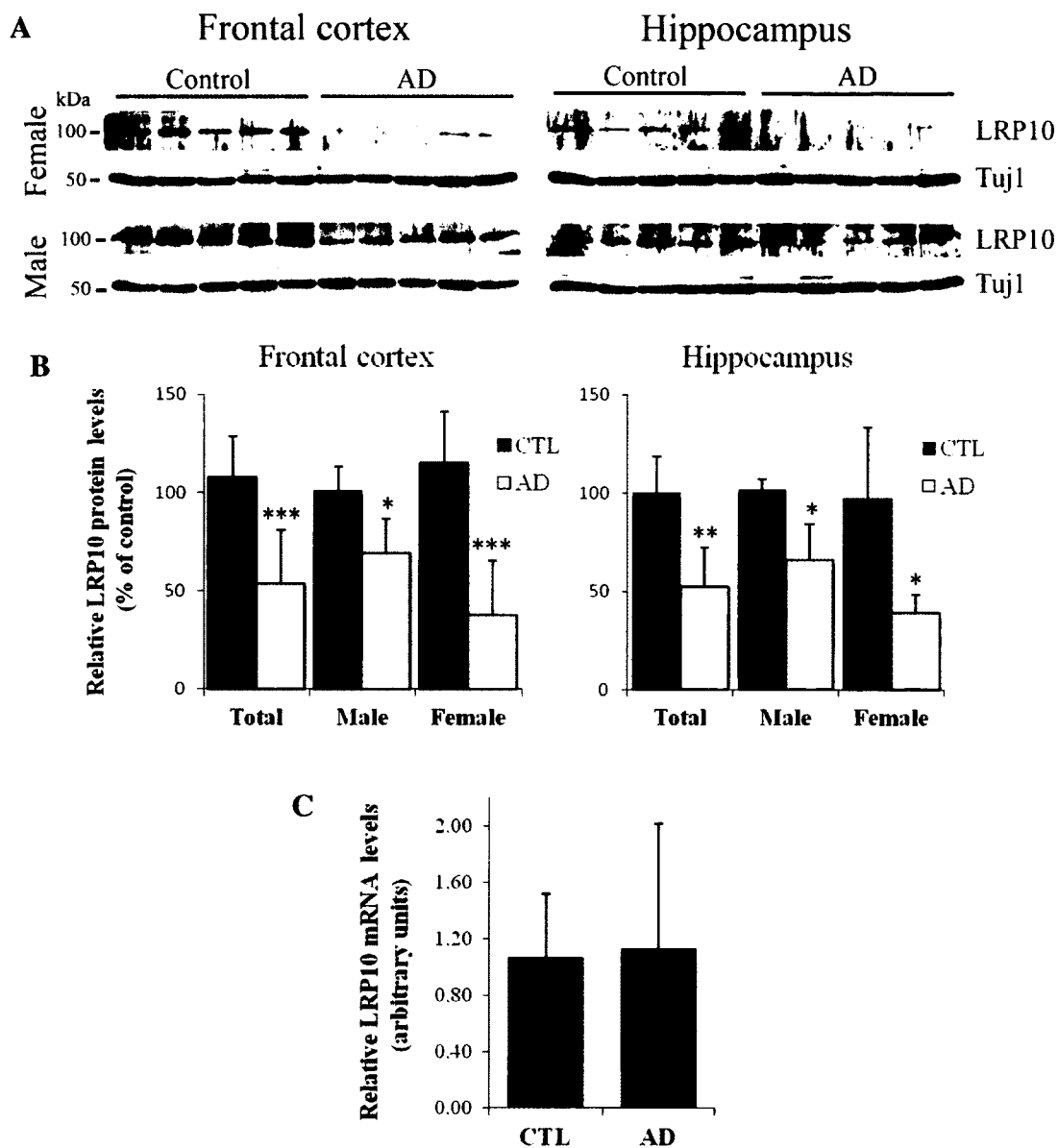
Given that the overexpression of LRP10 decreased APP processing, we theorized that a decrease in LRP10 expression would result in the opposite effect. To test this possibility, we performed siRNA experiments in which LRP10 siRNA was transiently transfected into SH-SY5Y cells stably expressing low levels of HA-tagged LRP10-HA. The siRNA treatment resulted in significantly lower LRP10 protein levels in these cells than in the control cells (Fig. 6A). We used Western blots and AlphaLISA assays to determine the levels of  $\beta$ -CTF and A $\beta$ <sub>40</sub>, respectively (Fig. 6A and B).  $\beta$ -CTF levels were higher in the LRP10 knockdown cells than in the control cells (Fig. 6A). Similarly, A $\beta$ <sub>40</sub> levels were 17% higher in LRP10-depleted cells than in the control cells (p=0.001, Fig 6B). These results indicated that reducing LRP10 levels causes a significant increase in amyloidogenic processing of APP. The low transfection efficiency of SH-SY5Y cells as well as the presence of other APP receptors in these cells could explain the weak effect of the LRP10 knockdown on the production of A $\beta$ <sub>40</sub>.



**Figure 6. LRP10 knockdown increases amyloidogenic cleavage.** LRP10-depleted cells contained higher levels of Aβ<sub>40</sub> and β-CTF. SH-SY5Y stable clones expressing low levels of HA-tagged LRP10<sup>wt</sup> were transfected with control (siCTL) or LRP10 siRNA (siLRP10) for 3 days. **(A)** Representative Western blots of β-CTF and LRP10 in cell lysates of the SH-SY5Y stable clones treated with control or LRP10 siRNA. Actin served as a loading control. **(B)** AlphaLISA quantitative analysis of Aβ<sub>40</sub> in media of the LRP10 low expressor SH-SY5Y stable clones transfected with control (siCTL) or LRP10 siRNA (siLRP10). Results are expressed as means ± SD (n=3). \*\*\*, p< 0.001 (compared with control cells).

### LRP10 levels are reduced in Alzheimer's disease brains.

Based on the results obtained with the SH-SY5Y and HeLa cells, LRP10 is a functional APP receptor that modulates APP trafficking and reduces its processing into Aβ. This finding raised the intriguing possibility that the increased Aβ production in patients with AD may involved loss of LRP10 expression in the brain. This hypothesis was tested using biopsies from AD patients (Fig. 7). Expression profiling of LRP10 in AD was performed by comparing LRP10 protein and mRNA levels in human frontal cortex and hippocampal tissue samples from ten autopsy-confirmed cases of AD and ten age-matched controls (Fig. 7). The mean age at the time of death was 71.7±7.2 years (range, 57-82 years) for the control subjects and 76.4±3.1 years (range, 70-82 years) for the AD subjects. Patients suffering from AD expressed less LRP10 protein than the healthy controls as assessed by Western blotting (Fig. 7A). Given that neuronal loss is a characteristic of AD brains, we normalized our Western blot findings to relevant markers to account for neuron-specific cell loss. When normalized to neuron-specific Class III β-tubulin (Tuj1), we found that LRP10 expression in the frontal cortex and hippocampus of AD brains was 50% and 47%



**Figure 7. LRP10 levels in healthy and AD brains.** Analysis of LRP10 protein and mRNA levels in healthy and AD brains. **(A)** LRP10 protein expression in the frontal cortex and hippocampus of healthy (Control) and Alzheimer's disease (AD) patients was compared by Western blotting. Representative data showing lysates subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with antisera directed against LRP10 and neuron-specific Class III  $\beta$ -tubulin (TUJ1). **(B)** Densitometric analysis of Western blots, such as those shown in (A), and normalized to the signal of TUJ1. Results are expressed as means  $\pm$  SD ( $n \geq 3$ ). \*,  $p < 0.01$ ; \*\*,  $p < 0.005$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  (compared with healthy patients). **(C)** LRP10 mRNA levels in the frontal cortex of healthy (CTL) and AD patients were compared by qRT-PCR. Total mRNA was reverse transcribed, and the levels of LRP10 cDNA were analyzed by qPCR with SYBR Green and expressed relative to the endogenous control (RPL13) using the comparative CT method. Results are expressed as means  $\pm$  SD ( $n = 5$  samples, in duplicate). The difference between CTL and AD was not significant ( $p = 0.4$ ).

lower ( $p < 0.001$ ) respectively, than in control brains (Fig. 7B). Interestingly, the decrease in LRP10 levels in AD brains from the female subjects was significantly higher than in those from the male subjects. LRP10 levels in the frontal cortex and hippocampus tissues of the male AD subjects were 31% and 36% lower than in the control subjects, but 67% and 60% lower in the female AD subjects (Fig. 7B). To determine whether the decrease in LRP10 protein levels was due to a change in gene expression, total quantitative RT-PCR assays were performed on frontal cortex tissues from five AD and five control brains (Fig. 7C). There was no significant difference between LRP10 mRNA levels in the AD samples and the control samples (normalized LRP10 expression:  $1.07 \pm 0.44$  in AD brains vs.  $1.13 \pm 0.88$  in control brains,  $p = 0.4$ ). In summary, our results indicated that neuronal LRP10 protein levels are lower in the post-mortem brain tissues of AD patients.



## DISCUSSION

LRP10 is a distinct member of the LDLR family that transits between the TGN and endosomes. However, the physiological role of LRP10 is unknown. The similarities between LRP10 and SorLA trafficking led us to hypothesize that LRP10 plays a role in APP metabolism. Our study shows that LRP10 is a novel APP sorting receptor that regulates APP trafficking and processing and provide evidence of its potential involvement in the pathophysiology of AD.

Our results revealed that there is a direct interaction between LRP10 and APP. *In vitro* pull-down assays indicated that the cytoplasmic tail of LRP10 is involved in this interaction, much like SorLA and LRP1, two other APP receptors that interact with APP via their cytoplasmic regions [18, 19]. However, a second APP binding site has also been reported in the luminal domain of SorLA [20]. Further studies will be needed to map the precise APP binding regions in LRP10. A confocal microscopy analysis indicated that exogenous APP in HeLa cells and endogenous APP in human neuronal SH-SY5Y cells mainly colocalizes with LRP10 in the TGN and, to a lesser extent, in early endosomes, suggesting that LRP10 and APP interact in these subcellular compartments.

Various LDLR members have been shown to be involved in the regulation of APP trafficking [2]. Our findings uncover LRP10 as a new LDLR member implicated in APP sorting. This is supported by the APP phenotypes resulting from the overexpression of wild-type LRP10 as well as the LRP10 trafficking mutant. The overexpression of LRP10<sup>wt</sup> in neuronal SH-SY5Y cells resulted in an accumulation of APP in the TGN and higher amounts of mature APP with a longer half-life. This suggested that the time of residence of APP in the TGN is prolonged by either the retention of APP molecules en route through the TGN to the cell surface or by retrograde transport of internalized APP from the endosomes to the TGN. The second possibility is in line with a proposed role for LRP10 in endosome-to-Golgi trafficking [12, 21]. However, there were no clear differences in the appearance of internalized APP in the TGN of HeLa cells transfected with APP in the absence or presence

of LRP10<sup>wt</sup>, suggesting that LRP10 may control the exit of APP from the TGN. Further studies are needed to clearly identify the trafficking steps regulated by LRP10 as well as the molecular mechanisms involved. The ability of LRP10 to regulate APP routing was confirmed by targeting LRP10 to the endosomes, which caused an accumulation of APP in the same compartment. We showed that the expression of mutated LRP10<sup>2DXXAA</sup>, which could not bind GGA proteins, impaired APP recycling to the TGN, since LRP10 was unable to retrogradely transport it out of the endosomes. These findings suggested that APP is a likely physiological target for LRP10-mediated protein sorting in neurons.

Mounting evidence has shown that alteration in the intracellular distribution of APP have a direct impact on amyloidogenic and non-amyloidogenic processing [2]. APP targeting and time of residence in endosomes is known to modulate  $\beta$ -secretase cleavage and A $\beta$  levels, while the transport of APP to the cell surface modulates its cleavage by  $\alpha$ -secretase [2, 22]. The relevance of LRP10-mediated Golgi retention of APP was confirmed by the distinct effect that LRP10<sup>wt</sup> and LRP10<sup>2DXXAA</sup> had on A $\beta$  production. The retrograde transport or retention processes induced by LRP10<sup>wt</sup> would allow for more APP to be kept in circulation for longer times and to be kept away from endosomes or the plasma membrane, where it would be processed. The lower levels of amyloidogenic and nonamyloidogenic processing products detected in these cells corroborate this hypothesis. The relevance of LRP10-mediated Golgi retention/retrieval of APP was confirmed by the significant increase in amyloidogenic processing induced by siRNA depletion of LRP10. We also showed that the targeting and retention of APP in endosomes when LRP10<sup>2DXXAA</sup> is expressed increased APP cleavage by the amyloidogenic pathway but did not affect non-amyloidogenic processing. As such, APP cleavage by endosomal  $\beta$ -secretase increased and resulted in the production of more A $\beta$ . LRP10 also affected  $\beta$ -CTF cleavage, with high expression levels of LRP10<sup>2DXXAA</sup> appearing to increase sAPP $\beta$  and  $\beta$ -CTF levels but decrease A $\beta$  levels, suggesting lower  $\gamma$ -secretase cleavage of  $\beta$ -CTF. Interestingly, previous studies indicated that members of the LDLR family such as LRP and SorLA interact with and are cleaved by  $\gamma$ -secretase [23, 24] and also compete with APP for this enzyme [23]. LRP10 may thus also be a substrate for  $\gamma$ -secretase and compete with APP for this enzyme. We intend to investigate this possibility in future studies. In summary, our findings

suggested that LRP10 is a sorting receptor that prolongs the time of residence of APP in the TGN either by TGN retrieval or retention and, such, regulates the presence of APP at the cell surface and in endosomes as well as its cleavage by the secretases in these compartments. Therefore, changes in LRP10 distribution or expression modify the balance between amyloidogenic and non-amyloidogenic processing.

Several LDL receptor family members play an important role in amyloidogenic processing. Most of these LDLR are localized at the plasma membrane and modulate APP endocytosis rates and cleavage in endosomes [2, 3]. To date, only SorLA has been reported to regulate APP trafficking to the TGN. SorLA, like LRP10, retains APP in the Golgi compartment, increases the half-life of mature APP, and reduces APP processing by  $\beta$ -secretase in the early endosome, thus decreasing the production of A $\beta$  [8, 9]. LRP10 and SorLA are distinct LDLR members. Their only common domain is a ligand-binding repeat. However, they are homologous in terms of their trafficking pathways and regulation of APP trafficking and processing and are both present at lower levels in AD. These observations suggest that the regulation of every trafficking steps targeting APP to distinct subcellular compartments is shared by many sorting receptors, which highlights the importance of proper APP distribution.

The relevance of LRP10 for APP processing and potential contribution to the pathogenesis of AD is supported by the observation that LRP10 is expressed at much lower levels in the brains of AD patients, which would result in higher A $\beta$  levels in these patients. Interestingly, we observed that LRP10 levels in the brains of female AD patients were significantly lower than those of male AD patients, suggesting that LRP10 may affect AD through a female-specific mechanism. This observation requires further confirmation since it was based on a limited sample size (5 men and 5 women). Nevertheless, similar observation of AD sexual dimorphisms have been reported for two other members of the LDLR family that are known to be APP receptors and that share trafficking homology with LRP10. Indeed, there is a stronger genetic linkage to SorLA and SorCS1 (a homolog of SorLA) in women than in men in AD populations [25, 26]. Higher A $\beta$  levels have also been observed in the brains of female *Sorcs1* hypomorphic mice but not in males [27]. The

higher susceptibility of the alteration of these APP receptors (including LRP10) in women is an important outcome since women account for 72% of all AD cases. However, the reasons for this are poorly understood.

In summary, our results suggested that altered LRP10 activity may be a potential risk factor for AD. The reason for reduced LRP10 expression in AD individuals remains to be determined. LRP10 mRNA levels do not change in AD. As such, the lower LRP10 protein levels seen in AD are not due to LRP10 gene transcription problems but rather to changes in protein translation or trafficking and stability of the receptor. Therefore, identification of the molecular events responsible for the proper localization and expression of this receptor is crucial. Interestingly, decreases in Calnuc and GGA proteins, which modulate the trafficking and level of LRP10 [12, 21], have been associated with AD [28-30]. To validate our observations *in vivo*, we plan to establish LRP10 knockout mice and determine whether these mice show an increase in neuron-associated A $\beta$  immunoreactivity and amyloid plaque deposition. Efforts will also be carried out to identify and study human genetic variants of LRP10 to determine whether they are associated with AD in a sex-dependent fashion. The identification of functional causative variants influencing LRP10 expression and/or levels may help clarify their role in the pathogenesis of AD and may lead to possible future therapeutic strategies.

### **Conclusions**

Our experiments identified LRP10 as a novel APP sorting receptor that protects against amyloidogenic processing of APP and the accumulation of the A $\beta$  peptide. Consequently, reduced LRP10 receptor expression observed in the human brain may increase A $\beta$  production and plaque formation and may be a risk factor in AD.

## **Materials and Methods**

### **Antibodies and reagents**

Anti-HA mouse monoclonal antibodies (mAbs) and rabbit polyclonal antibodies (pAbs) were purchased from Covance (Berkley, CA, USA). Anti-GFP mouse mAbs and rabbit pAbs were from Clontech (Mountain View, CA, USA) and Molecular Probes (Eugene, OR, USA), respectively. Mouse anti-APPA4 clone 22C11 mAbs (a.a. 66-81, N-term.) and rabbit anti-APP pAbs (C-term.) were from Millipore (Billerica, MA, USA) and Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), respectively. Rabbit anti-LRP10 pAbs were from Abnova (Walnut, CA, USA). Mouse anti-actin AC-40 mAbs were from Sigma (Oakville, ON, Canada). Rabbit anti-EEA1 pAbs were from Thermo Scientific (Ottawa, ON, Canada) and were used for IB while goat anti-EEA1 was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) and was used for IF. Sheep anti-TGN46 pAbs were from Novus Biologicals (Littleton, CO, USA).

### **DNA constructs**

Mammalian expression vector pCMV6-Entry encoding the human LRP10 was purchased from OriGene (Rockville, MD, USA). LRP10 was subcloned in the pcDNA3.1 vector, and PCR-based mutagenesis was used to insert an HA-tag at the C-terminus of LRP10. The LRP10 double DXXLL mutant construct was generated as described previously [12, 14]. Mammalian expression vectors GFP-APP695 and GST-APP695 C-term were kindly provided by Dr. Ritva Tikkanen (University Clinic of Frankfurt, Germany) [31].

### **Cell cultures and transfections**

HeLa and SH-SY5Y cells were purchased from ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). HEK cells were kindly provided by Dr. Alexandra Newton (University of California, San Diego, CA, USA). HEK and HeLa cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's high glucose medium (Invitrogen) containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA) and 1% penicillin and streptomycin. SH-SY5Y cells were grown in MEM:Ham's F12 (1:1) (Invitrogen)

containing 10% FBS, 2 mM sodium pyruvate (Invitrogen), and 1% penicillin and streptomycin. HeLa cells were transfected using Fugene6 transfection reagent (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), and HEK cells were transfected with Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen), both according to the manufacturers' instructions. SH-SY5Y cells were stably transfected using Fugene HD (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions, with expression constructs for pcDNA3.1 or LRP10 variants (in pcDNA3.1) and selected using 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of geneticin (G418; Invitrogen). For siRNA transfection of SH-SY5Y cells,  $2 \times 10^6$  cells were transfected with siRNA using Amaxa® Nucleofector® Cell Line Kit V with the Nucleofector® system and program A-023, as recommended by the manufacturer (Amaxa, Lonza, Walkerville, MD, USA).

### **Immunofluorescence**

Cells were seeded on coverslips. Twelve hours after transfection, the cells were fixed in 3% paraformaldehyde (PFA; Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA) in 100 mM phosphate buffer (pH 7.4) for 30 min, permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 10 min, blocked with 10% goat serum for 30 min, and incubated with primary antibodies for 1 h at RT, followed by Alexa Fluor 594- or 488-conjugated antibodies (Molecular Probes) for 1 h at RT. The specimens were visualized using an inverted confocal laser-scanning microscope (FV1000, Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a PlanApo 60x/1.42 oil immersion objective (Olympus). Olympus Fluoview software version 1.6b was used to acquire and analyze the images. The images were further processed using Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA, USA).

### **Antibody uptake assays**

HeLa cells transiently expressing APP695 and pcDNA3, LRP10<sup>wt</sup>-HA, or LRP10<sup>2DXXAA</sup>-HA were grown on glass coverslips. The cells were washed twice on ice with ice-cold DMEM. They were then incubated for 60 min on ice in cold DMEM containing an antibody against the ectodomain of APP ( $\alpha$ -APP 22C11, 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Cells were then washed, incubated at 37°C in complete medium for 60 min, fixed with 3% paraformaldehyde, and processed for immunocytochemistry.

### **Glutathione S-transferase pull-down assays**

GST fusion proteins were expressed in *E. coli* BL21 and purified on glutathione-Sepharose 4B beads (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA) according to the manufacturer's instructions. <sup>35</sup>S-labeled *in vitro* translation products of pcDNA3.1-human LRP10 were prepared using the TNT T7 rabbit reticulocyte Quick Coupled Transcription/Translation system (Promega, San Luis Obispo, CA, USA) in the presence of [<sup>35</sup>S]EasyTag EXPRESS labeling mix (73% met/22% cys; >1000 Ci/mmol, PerkinElmer). For the pull-down assays, GST fusion proteins (15 µg) immobilized on glutathione-Sepharose 4B beads were incubated overnight with *in vitro* translated products in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.1% NP-40, and 1 mM DTT in the presence of protease inhibitors at 4°C. The beads were washed four times in lysis buffer and were boiled in Laemmli sample buffer. The bound proteins were separated by SDS-PAGE and were detected by autoradiography.

### **Co-immunoprecipitation**

HEK cells were plated in 60-mm culture dishes and transfected with the various constructs. After 48 h, the cells were lysed in 50 mM Tris buffer (pH 7.4) containing 150 mM NaCl, 1% NP-40, and protease inhibitors for 1 h at 4°C and were then centrifuged at 13,000xg for 20 min. The cleared supernatants were incubated with primary antibodies (1 µg antibody per 1mg of proteins) overnight at 4°C and then with protein A-sepharose (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) or protein G-Sepharose (Zymed, San Francisco, CA, USA) beads for 1 h. The beads were washed three times in lysis buffer and were boiled in Laemmli sample buffer. Bound immune complexes were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting.

### **Immunoblotting**

The protein samples were boiled in Laemmli loading buffer, separated on 8% or 10% SDS-PAGE gels, and transferred to 0.45 µm pore-size nitrocellulose membranes (PerkinElmer, Woodbridge, ON, Canada). The membranes were blocked in Tris-buffered saline (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl) containing 0.1% Tween 20 and 5% nonfat dry milk and were incubated with primary antibodies for 1 h at RT and then with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse IgG (Bio-Rad, Richmond, ON, Canada) for 45

min at RT and enhanced chemiluminescence detection reagent (Pierce Chemical, Rockford, IL, USA).

### **Pulse-chase labeling**

For the pulse-chase experiments, the cells were incubated in cysteine- and methionine-free medium (Sigma) for 30 min prior to biolabeling using 150  $\mu$ Ci of L-[<sup>35</sup>S]cysteine and L-[<sup>35</sup>S]methionine/ml (EasyTag EXPRESS [<sup>35</sup>S]-labeling mix (73% met/22% cys; >1000 Ci/mmol, PerkinElmer)) for 5 min. The cells were then washed in ice-cold cysteine/methionine-free medium, chased for various time in complete medium, and lysed. Lysates were precipitated with 1  $\mu$ g of rabbit anti-APP pAbs (C-term.) overnight at 4°C and were then incubated with protein Asepharose beads for 1 h. The beads were washed three times in lysis buffer and prepared for standard SDS-PAGE and autoradiography.

### **APP processing products**

The amount of sAPP, carboxyl-terminal fragments (CTF), and A $\beta$ <sub>40</sub> products were determined by Western blotting and/or AlphaLISA detection. AlphaLISA kits were kindly provided by PerkinElmer (AL254 for sAPP $\alpha$ , AL255 for sAPP $\beta$ , and AL275 for A $\beta$ <sub>40</sub>). To detect sAPP by Western blotting, 4x10<sup>6</sup> SH-SY5Y cells were seeded on 60-mm dishes and cultured for 48 h in complete media. The culture media was then replaced by 1.5 ml of serum-free MEM:Ham's F12 (1:1). After 24 h, the conditioned medium was harvested and centrifuged at 500xg for 5 min at 4°C. Fifty  $\mu$ l of supernatant was boiled with Laemmli loading buffer and directly loaded on an SDS-PAGE gel. Immunoblotting was performed as described above using 22C11 antibodies. The cells in each dish in which secreted APP was collected were lysed in 50 mM Tris buffer (pH 7.4) containing 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100 and protease inhibitors in order to determine and compare the amount of cells in each dish. Ten  $\mu$ l of each lysates were loaded on SDS-PAGE gels and immunoblotted for actin.

For the  $\beta$ -CTF Western blot analyses, 80-120  $\mu$ g of cell lysate was separated on a 16.5% Tris-Tricine gel and transferred to a nitrocellulose membrane (0.20  $\mu$ m pore size) (350 mA for 35 min). Immunoblotting was performed as described above using anti-APP C-term antibody. For the AlphaLISA assays, cells were seeded in 96-well plates at a



density of  $2 \times 10^5$  cells per well in 100  $\mu$ l of SH-SY5Y culture media. After a 48-h incubation, the supernatants were harvested and the analytes were quantified in triplicate using 5  $\mu$ l of supernatant per assay with an EnVision Plate Reader (PerkinElmer). The counts were converted into pg/ml using standard curves. The cells were lysed in 100 mM NaOH to determine the total protein concentration using the BCA method (Pierce). The total protein concentrations in the lysates were used to normalize the concentrations of the analytes for the various samples and clones.

### **Human brain tissues**

Human hippocampal and frontal cortex samples from ten autopsy-confirmed cases of AD and ten age-matched control individuals were obtained from the Douglas Hospital Brain Bank in Montreal, Quebec, Canada. The mean age at death was  $76.4 \pm 3.1$  years for the AD patients and  $71.7 \pm 7.2$  years for the control group. The mean ages were not significantly different. The postmortem interval was  $22.9 \pm 13.5$  h for the AD patients and  $21.6 \pm 8.3$  h for the control group, which was not significantly different. The AD cases had a clinical diagnosis of probable AD, which was confirmed by a neuropathological evaluation. Control cases had a clinical diagnosis of nondemented elderly patients.

### **Tissue protein extraction**

Brain tissue samples (30 mg per sample) were homogenized on ice in RIPA lysis buffer solution containing protease inhibitors for 10 s using a Polytron homogenizer and were incubated on ice for 30 min. The homogenates were centrifuged at 13,000xg for 20 min. The protein concentrations in the extracts were estimated using the Bradford method (Bio-Rad), and 50  $\mu$ g of protein aliquots were stored at  $-80^\circ\text{C}$  in Laemmli sample buffer until used. The samples were separated on 10% SDS-PAGE gels, were transferred to nitrocellulose membranes (0.45  $\mu$ m pore size) and were immunoblotted as described above.

### **Tissue RNA isolation**

Total RNA was isolated from human frontal cortex tissues (30-50 mg per sample) using the RNeasy Lipid Tissue Mini kit (Qiagen, Toronto, ON, Canada), according to the

manufacturer's instructions. Briefly, the tissue samples were disrupted in Qiazol lysis reagent and homogenized for 1 min on ice using a Polytron homogenizer until a completely homogeneous lysate was obtained. Chloroform was added, and the homogenate was separated into aqueous and organic phase by centrifugation. The upper aqueous phase was removed and ethanol was added to it. The sample was then applied to an RNeasy mini spin column, which was washed several times. In the final step, the RNA was eluted with 50  $\mu$ l of RNase-free water. The RNA concentration of the samples was estimated based on *A260* measurements.

### **Quantitative real-time RT-PCR**

cDNA was synthesized using 1  $\mu$ g of DNase 1 (Invitrogen)-treated RNA and 0.5  $\mu$ g of oligo(dt)12-18 primer (Invitrogen) and 200 U of Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. A total of 25  $\mu$ l of real-time RT-PCR reactions (2  $\mu$ l of cDNA, 3.5  $\mu$ l of 10  $\mu$ M forward and reverse primers) were performed using PerfeCTa SYBR Green SuperMix with Low Rox (QUANTA Bioscience, Gaithersburg, MD, USA) and a Stratagene Mx3005P QPCR System. Primers were designed to selectively amplify human LRP10 and Ribosomal Protein L13 (*RPL13*) mRNA sequences and were selected according to the manufacturer's guidelines. *RPL13* is a good housekeeper for qRT-PCR studies in autopsy brain tissue samples from control and AD cases [32]. PCR primers were synthesized and purified by IDT (Coralville, IA, USA). The sequences of the PCR forward and reverse primers were as follows for human LRP10 and *RPL13*, respectively: 5'- GGGTAGACCACAGAAGCTCCGGG-3' (sense), 5'- GGGTTAAGCGCTCTGAGCCACAG-3' (antisense) and 5'- CTCGGCCCCCAAGAAGGGAGAC-3' (sense), 5'- CCATCCCAGGCCAGTTGTTCC-3' (antisense). Samples from five healthy and five AD patients were analyzed in duplicate. The final mRNA levels of the genes being studied were normalized to *RPL13* expression using the comparative CT method (Stratagene) [33]. Results are expressed as the means  $\pm$  SD of five independent controls and five AD brain samples analyzed in duplicate for each gene.

**Statistical analysis**

Experiments were performed in triplicate and results are expressed as means  $\pm$  SD. The statistical significance of differences between samples was assessed using the Student *t*-test. A  $p < 0.01$  was considered significant.

### **Competing interests**

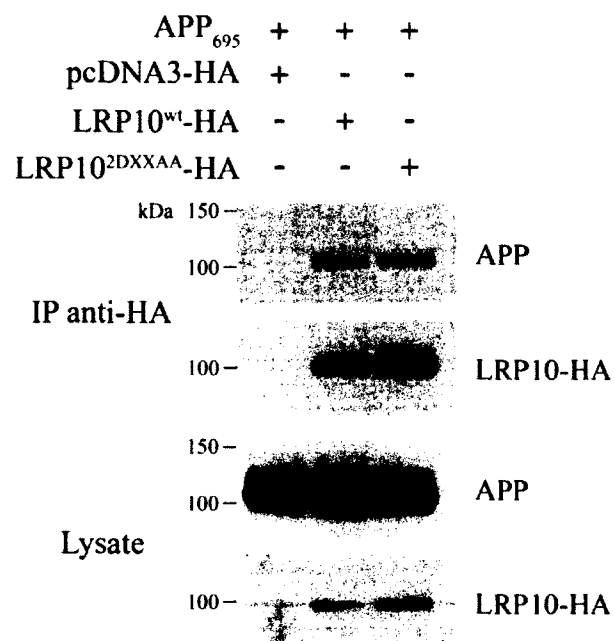
The authors do not have any competing interest to disclose.

### **Authors' contributions**

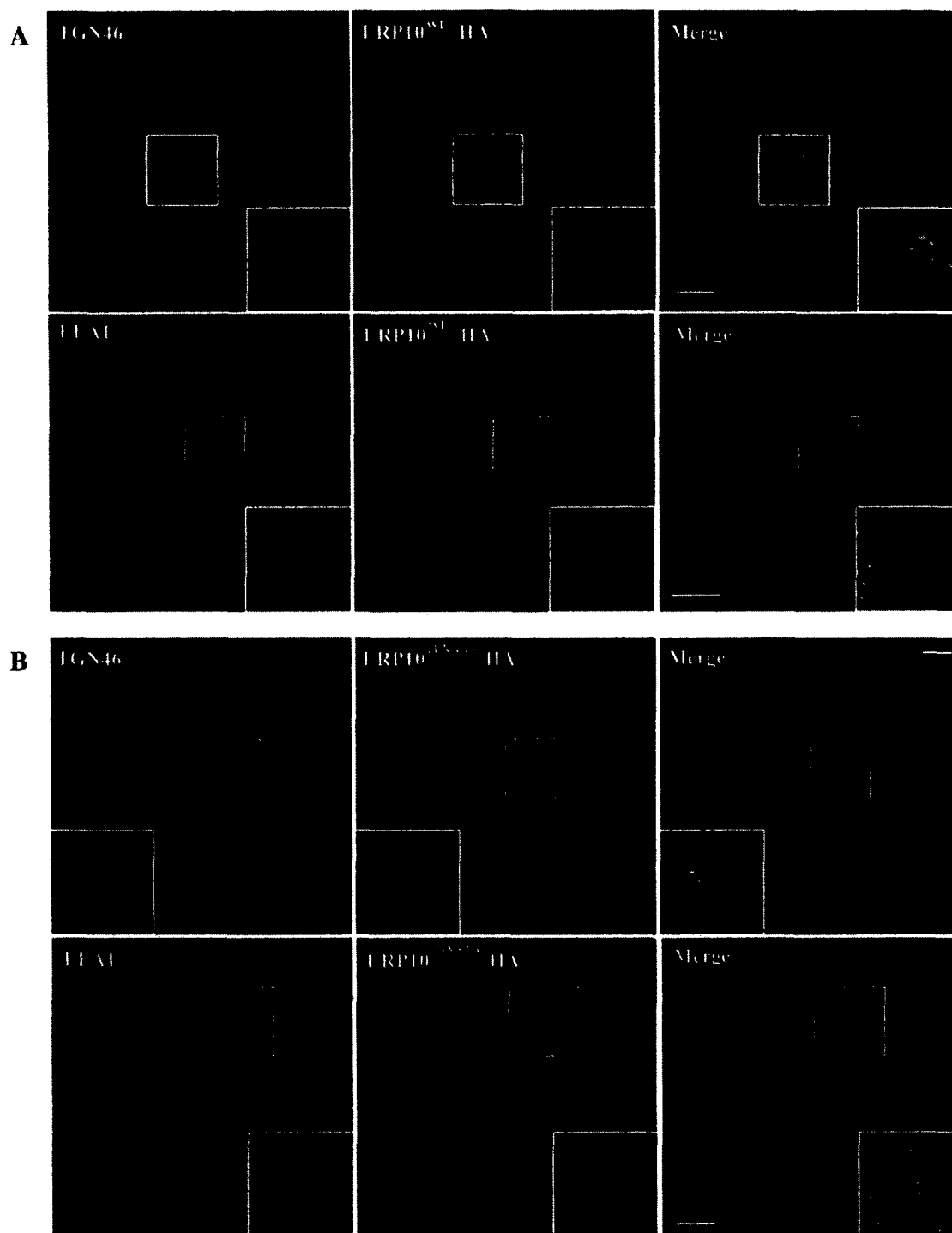
JB established the LRP10 stable cell lines, carried out the LRP10 knockdown, performed immunoprecipitation, immunofluorescence and qRT-PCR assays as well as the analysis of brain extract and APP processing products and help to draft the manuscript. CT performed the in vitro pull-down, pulse-chase and APP uptake immunofluorescence assays. MLB helped with the immunoprecipitation assays. AM and SD provided the AlphaLISA kits and valuable technical assistance to set up the AlphaLISA quantification assays for APP processing products. CL conceived the study, designed experiments, coordinated data analysis and prepared the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We are grateful to Ritva Tikkanen for the DNA constructs, Eric Chevet for critical reading of the manuscript and Danielle Cécylre from the Douglas Brain Bank for providing human brain tissues J.B. holds a FRSQ Master's studentship award and MLB holds a FRSQ summer studentship. C.L. is a Canada Research Chair in Cellular Pharmacology. This work was supported by grants from the Alzheimer Society of Canada.



**Supplemental Figure 1. Interaction of untagged APP with LRP10 wild-type and trafficking mutant.** Lysates from HEK cells transfected with untagged APP<sub>695</sub> and HA-pcDNA3, HA-tagged LRP10<sup>wt</sup> or LRP10<sup>2DXXAA</sup> were immunoprecipitated with anti-HA antibody and immunoblotted with anti-APP antibody to detect LRP10 and APP, respectively.



**Supplemental Figure 2. Comparison of LRP10 distribution with Golgi and endosomal markers in HeLa cells.** HeLa cells transfected with HA-tagged wild-type LRP10 (**A**) or trafficking mutant LRP10<sup>2DXXXAA</sup> (**B**) were fixed, permeabilized, and immunostained with anti-HA, anti-TGN46, or anti-EEA1 antibody. Stained cells were examined by confocal fluorescence microscopy. The yellow color in the merged images indicates co-localization. Scale bar, 10  $\mu$ m.

## References

- 1 De Strooper B and Annaert W: **Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein.** *Journal of cell science* 2000, **113** ( Pt 11): 1857-1870.
- 2 Marzolo MP and Bu G: **Lipoprotein receptors and cholesterol in APP trafficking and proteolytic processing, implications for Alzheimer's disease.** *Seminars in cell & developmental biology* 2009, **20**: 191-200.
- 3 Wagner T and Pietrzik CU: **The role of lipoprotein receptors on the physiological function of APP.** *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale* 2011.
- 4 Willnow TE: **The low-density lipoprotein receptor gene family: multiple roles in lipid metabolism.** *J Mol Med (Berl)* 1999, **77**: 306-315.
- 5 Ulery PG, Beers J, Mikhailenko I, Tanzi RE, Rebeck GW, Hyman BT and Strickland DK: **Modulation of beta-amyloid precursor protein processing by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence that LRP contributes to the pathogenesis of Alzheimer's disease.** *The Journal of biological chemistry* 2000, **275**: 7410-7415.
- 6 Kang DE, Pietrzik CU, Baum L, Chevallier N, Merriam DE, Kounnas MZ, Wagner SL, Troncoso JC, Kawas CH, Katzman R and Koo EH: **Modulation of amyloid beta-protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor-related protein pathway.** *The Journal of clinical investigation* 2000, **106**: 1159-1166.
- 7 Jacobsen L, Madsen P, Nielsen MS, Geraerts WP, Gliemann J, Smit AB and Petersen CM: **The sorLA cytoplasmic domain interacts with GGA1 and -2 and defines minimum requirements for GGA binding.** *FEBS letters* 2002, **511**: 155-158.
- 8 Andersen OM, Reiche J, Schmidt V, Gotthardt M, Spoelgen R, Behlke J, von Arnim CA, Breiderhoff T, Jansen P, Wu X, et al.: **Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**: 13461-13466.
- 9 Schmidt V, Sporbert A, Rohe M, Reimer T, Rehm A, Andersen OM and Willnow TE: **SorLA/LR11 regulates processing of amyloid precursor protein via interaction with adaptors GGA and PACS-1.** *The Journal of biological chemistry* 2007, **282**: 32956-32964.
- 10 Scherzer CR, Offe K, Gearing M, Rees HD, Fang G, Heilman CJ, Schaller C, Bujo H, Levey AI and Lah JJ: **Loss of apolipoprotein E receptor LR11 in Alzheimer disease.** *Archives of neurology* 2004, **61**: 1200-1205.
- 11 Battle MA, Maher VM and McCormick JJ: **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* 2003, **42**: 7270-7282.
- 12 Boucher R, Larkin H, Brodeur J, Gagnon H, Theriault C and Lavoie C: **Intracellular trafficking of LRP9 is dependent on two acidic cluster/dileucine motifs.** *Histochemistry and cell biology* 2008, **130**: 315-327.
- 13 Sugiyama T, Kumagai H, Morikawa Y, Wada Y, Sugiyama A, Yasuda K, Yokoi N, Tamura S, Kojima T, Nosaka T, et al.: **A novel low-density lipoprotein receptor-related protein mediating cellular uptake of apolipoprotein E-enriched beta-VLDL in vitro.** *Biochemistry* 2000, **39**: 15817-15825.

- 14 Doray B, Knisely JM, Wartman L, Bu G and Kornfeld S: **Identification of acidic dileucine signals in LRP9 that interact with both GGAs and AP-1/AP-2.** *Traffic* 2008, **9**: 1551-1562.
- 15 Tamboli IY, Prager K, Barth E, Heneka M, Sandhoff K and Walter J: **Inhibition of glycosphingolipid biosynthesis reduces secretion of the beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide.** *The Journal of biological chemistry* 2005, **280**: 28110-28117.
- 16 Belyaev ND, Kellett KA, Beckett C, Makova NZ, Revett TJ, Nalivaeva NN, Hooper NM and Turner AJ: **The transcriptionally active amyloid precursor protein (APP) intracellular domain is preferentially produced from the 695 isoform of APP in a {beta}-secretase-dependent pathway.** *The Journal of biological chemistry* 2010, **285**: 41443-41454.
- 17 Kitazume S, Tachida Y, Kato M, Yamaguchi Y, Honda T, Hashimoto Y, Wada Y, Saito T, Iwata N, Saido T and Taniguchi N: **Brain endothelial cells produce amyloid {beta} from amyloid precursor protein 770 and preferentially secrete the O-glycosylated form.** *The Journal of biological chemistry* 2010, **285**: 40097-40103.
- 18 Pietrzik CU, Busse T, Merriam DE, Weggen S and Koo EH: **The cytoplasmic domain of the LDL receptor-related protein regulates multiple steps in APP processing.** *The EMBO journal* 2002, **21**: 5691-5700.
- 19 Spoelgen R, von Arnim CA, Thomas AV, Peltan ID, Koker M, Deng A, Irizarry MC, Andersen OM, Willnow TE and Hyman BT: **Interaction of the cytosolic domains of sorLA/LR11 with the amyloid precursor protein (APP) and beta-secretase beta-site APP-cleaving enzyme.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2006, **26**: 418-428.
- 20 Andersen OM, Schmidt V, Spoelgen R, Gliemann J, Behlke J, Galatis D, McKinstry WJ, Parker MW, Masters CL, Hyman BT, et al.: **Molecular dissection of the interaction between amyloid precursor protein and its neuronal trafficking receptor SorLA/LR11.** *Biochemistry* 2006, **45**: 2618-2628.
- 21 Brodeur J, Larkin H, Boucher R, Theriault C, St-Louis SC, Gagnon H and Lavoie C: **Calnuc binds to LRP9 and affects its endosomal sorting.** *Traffic* 2009, **10**: 1098-1114.
- 22 Parvathy S, Hussain I, Karran EH, Turner AJ and Hooper NM: **Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by alpha-secretase occurs at the surface of neuronal cells.** *Biochemistry* 1999, **38**: 9728-9734.
- 23 Lleo A, Waldron E, von Arnim CA, Herl L, Tangredi MM, Peltan ID, Strickland DK, Koo EH, Hyman BT, Pietrzik CU and Berezovska O: **Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) interacts with presenilin 1 and is a competitive substrate of the amyloid precursor protein (APP) for gamma-secretase.** *The Journal of biological chemistry* 2005, **280**: 27303-27309.
- 24 Nyborg AC, Ladd TB, Zwizinski CW, Lah JJ and Golde TE: **Sortilin, SorCS1b, and SorLA Vps10p sorting receptors, are novel gamma-secretase substrates.** *Molecular neurodegeneration* 2006, **1**: 3.
- 25 Cellini E, Tedde A, Bagnoli S, Pradella S, Piacentini S, Sorbi S and Nacmias B: **Implication of sex and SORL1 variants in italian patients with Alzheimer disease.** *Archives of neurology* 2009, **66**: 1260-1266.



- 26 Liang X, Slifer M, Martin ER, Schnetz-Boutaud N, Bartlett J, Anderson B, Zuchner S, Gwirtsman H, Gilbert JR, Pericak-Vance MA and Haines JL: **Genomic convergence to identify candidate genes for Alzheimer disease on chromosome 10.** *Human mutation* 2009, **30**: 463-471.
- 27 Lane RF, Raines SM, Steele JW, Ehrlich ME, Lah JA, Small SA, Tanzi RE, Attie AD and Gandy S: **Diabetes-associated SorCS1 regulates Alzheimer's amyloid-beta metabolism: evidence for involvement of SorL1 and the retromer complex.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2010, **30**: 13110-13115.
- 28 Lin P, Li F, Zhang YW, Huang H, Tong G, Farquhar MG and Xu H: **Calnuc binds to Alzheimer's beta-amyloid precursor protein and affects its biogenesis.** *Journal of neurochemistry* 2007, **100**: 1505-1514.
- 29 Santosa C, Rasche S, Barakat A, Bellingham SA, Ho M, Tan J, Hill AF, Masters CL, McLean C and Evin G: **Decreased expression of GGA3 Protein in Alzheimer's disease frontal cortex and increased co-distribution of BACE with the amyloid precursor protein.** *Neurobiology of disease* 2011, **43**: 176-183.
- 30 Wahle T, Thal DR, Sastre M, Rentmeister A, Bogdanovic N, Famulok M, Heneka MT and Walter J: **GGA1 is expressed in the human brain and affects the generation of amyloid beta-peptide.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2006, **26**: 12838-12846.
- 31 Icking A, Amaddii M, Ruonala M, Honing S and Tikkanen R: **Polarized transport of Alzheimer amyloid precursor protein is mediated by adaptor protein complex AP1-1B.** *Traffic* 2007, **8**: 285-296.
- 32 Gebhardt FM, Scott HA and Dodd PR: **Housekeepers for accurate transcript expression analysis in Alzheimer's disease autopsy brain tissue.** *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 2010, **6**: 465-474.
- 33 Livak KJ and Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25**: 402-408.

## Discussion

LRP10 est un nouveau membre encore peu caractérisé de la famille des LDLR (Sugiyama *et al.*, 2000) qui se localise et trafique entre le TGN et les endosomes (Boucher *et al.*, 2008; Brodeur *et al.*, 2009; Doray *et al.*, 2008) de façon similaire au récepteur SorLA/LR11. Plusieurs membres des LDLR, dont SorLA/LR11 (Willnow *et al.*, 2010), interagissent avec l'APP pour réguler son trafic et son clivage, de même que la production du peptide A $\beta$  neurotoxique (Andersen et Willnow, 2006; Bu *et al.*, 2006; Cam et Bu, 2006; Jaeger et Pietrzik, 2008; Marzolo et Bu, 2009), qui est à la base de l'hypothèse de la cascade amyloïdogénique dans la MA (Hardy et Selkoe, 2002; Selkoe, 2000; Selkoe, 2002; Wirths *et al.*, 2004). Certains de ces LDLR sont aussi directement impliqués dans la MA (Andersen et Willnow, 2006; Marzolo et Bu, 2009). C'est pourquoi, nous avons débuté cette étude avec l'hypothèse selon laquelle LRP10 est un nouveau récepteur de la protéine APP, capable de moduler son trafic entre le TGN et les endosomes ainsi que son clivage en A $\beta$ . De cette manière, par son influence sur le métabolisme de l'APP, LRP10 pourrait potentiellement jouer un rôle dans la MA.

Dans cette étude, nous avons présenté une toute nouvelle interaction existant entre le récepteur LRP10 et l'APP, une protéine clé impliquée dans la pathogénèse de la MA. Nous avons ensuite démontré que LRP10 colocalise avec l'APP au niveau du TGN et plus faiblement aux endosomes précoces et est capable d'influencer le trafic de l'APP. Dans la cellule, l'A $\beta$  est produite suite au double clivage endoprotéolytique de l'APP par les enzymes membranaires BACE1 et  $\gamma$ -sécrétase au niveau des endosomes. Toutefois, avant d'atteindre ces derniers, l'APP peut aussi être clivé à la membrane plasmique par l' $\alpha$ - et la  $\gamma$ -sécrétase ne produisant pas d'A $\beta$  (Chow *et al.*, 2010; De Strooper et Annaert, 2000; Thinakaran et Koo, 2008). De plus, nous avons démontré que l'influence de LRP10 sur le trafic de l'APP peut, non seulement avoir un effet réducteur sur les deux voies de clivage de l'APP et la production du peptide A $\beta$ , mais aussi causer une accumulation de l'APP mature intracellulaire en augmentant sa demi-vie. La déplétion de LRP10 a aussi permis de révéler une augmentation du clivage  $\beta$  et de la production d'A $\beta$ . Finalement, dans ce

manuscrit nous fournissons une première évidence impliquant LRP10 dans la pathogénèse de la MA puisque le niveau protéique du récepteur LRP10 semble réduit dans l'hippocampe et le cortex frontal de patients atteints de la MA.

Nous avons donc démontré que LRP10 joue un rôle physiologique dans le métabolisme de l'APP en agissant à titre de récepteur de triage de l'APP entre le TGN et les endosomes, et pourrait être impliqué dans la MA. Dans la présente section, les résultats de cette étude seront analysés suite à leur remise en contexte cellulaire physiologique puis pathogénique de la MA. De plus, quelques perspectives futures suggérées par cette analyse seront aussi abordées.

### **3.1 LRP10 interagit avec la protéine APP**

Tout d'abord, ces travaux nous ont permis de démontrer que LRP10 interagit *in vivo* avec la protéine APP, qu'elle soit surexprimée ou endogène dans les cellules HEK. Grâce à la réaction de précipitation par affinité *in vitro* et l'utilisation d'une construction de l'extrémité C-terminale de l'APP comprenant les 49 derniers résidus de sa séquence correspondant au fragment AICD (Krishnaswamy *et al.*, 2009) fusionnée à la GST, nous avons démontré que LRP10 est capable d'interagir directement avec la portion C-terminale de l'APP. Bien qu'il ait été démontré que les LDLR interagissent avec l'APP, surtout via leurs domaines extracellulaires, il semble que l'interaction en C-terminal entre l'APP et certains LDLR soit également possible. Le domaine C-terminal de LRP1 interagit avec l'APP de façon indirecte via la protéine adaptatrice Fe65 (Cam *et al.*, 2005; Ulery *et al.*, 2000), alors que SorLA/LR11 interagit directement avec l'extrémité C-terminale de l'APP (Spoelgen *et al.*, 2006). De plus, les immunoprécipitations effectuées avec l'APP695 surexprimée, l'isoforme prédominante dans les neurones, prouvent que l'interaction de LRP10 avec l'APP ne dépend pas de la présence du domaine KPI dans sa séquence. Apparemment, ce serait le cas pour LRP1 qui n'interagit qu'avec les formes APP751/770 contenant le domaine KPI (Cam *et al.*, 2005; Ulery *et al.*, 2000), alors que SorLA/LR11 est capable d'interagir avec les trois isoformes (Andersen *et al.*, 2005). Des expériences d'immunoprécipitation réalisées à partir de lysat de cellules CHO exprimant de façon stable l'APP751 ainsi que LRP10-HA confirme l'interaction de LRP10 avec les isoformes

contenant le domaine KPI (résultats non présentés). Toutefois, une caractérisation plus poussée de cette nouvelle interaction nous permettra éventuellement d'identifier le site d'interaction précis entre les deux protéines.

De plus, il est connu que certains membres de la famille des LDLR sont capables d'interagir avec l'APP via leur extrémité extracellulaire. Effectivement, LRP1 et SorLA/LR11 interagissent de façon directe avec l'APP via leurs domaines de liaison au ligand constitués des répétitions LDLR de classe A situées au niveau de leur extrémité N-terminale (Andersen *et al.*, 2006; Cam *et al.*, 2005). SorLA/LR11 interagit avec la région centrale de l'APP riche en carbohydrates, quelque part entre les résidus 316 et 498. SorLA/LR11 est donc capable d'interagir avec l'APP, tant par son extrémité extracellulaire (Andersen *et al.*, 2006) qu'intracellulaire (Spoelgen *et al.*, 2006), de sorte que ces protéines possède deux sites d'interaction. Il serait donc possible que LRP10 interagisse aussi avec l'APP via sa région extracellulaire, impliquant par exemple, ses domaines de répétitions LDLR de classe A. Cette possibilité devra donc être explorée afin de déterminer si LRP10 et l'APP possèdent, tout comme SorLA/LR11, deux sites d'interaction directe. Une fois le ou les domaines d'interaction identifiés, il serait aussi intéressant d'observer l'effet de l'expression d'un mutant de LRP10 incapables d'interagir avec l'APP de type sauvage sur la localisation intracellulaire des deux protéines, ainsi que sur le trafic et le clivage de l'APP.

Ensuite, l'imagerie confocale a permis de démontrer que LRP10 colocalise avec l'APP, tant exogène dans les cellules HeLa qu'endogène dans les SH-SY5Y, au niveau du TGN et dans une moins grande proportion au niveau des endosomes précoces. Ceci confirme donc la possibilité que l'interaction se produise *in vivo* et suggère que LRP10 pourrait interagir avec l'APP au niveau de ces compartiments, tout comme SorLA/LR11 (Andersen *et al.*, 2005). En effet, ce récepteur semble jusqu'à maintenant le seul autre membre des LDLR à posséder une localisation plus faible à la surface et plus prédominante au TGN et aux endosomes précoces, comme LRP10. Les autres membres sont plutôt des récepteurs de surface retrouvés à la membrane plasmique et dans les endosomes périphériques (Cam *et al.*, 2005; Gent et Braakman, 2004).

### 3.1.1 LRP10 impliqué dans le trafic de l'APP

Il est connu que plusieurs membres de la famille des LDLR dont ApoER2, LRP1, LRP1B et SorLA/LR11 sont impliqués dans le trafic intracellulaire de l'APP, que ce soit dans son endocytose ou son triage au niveau des endosomes et du TGN. Jusqu'à aujourd'hui, SorLA/LR11 semblait le seul membre des LDLR à servir de récepteur de triage de l'APP entre le TGN et les endosomes. Toutefois notre équipe a précédemment suggéré que LRP10 serait un récepteur participant au triage de protéines cargos entre le TGN et les endosomes précoces (Boucher *et al.*, 2008; Brodeur *et al.*, 2009). Ainsi, dans cette étude, nous suggérons que l'APP pourrait être une de ses molécules cargos. Premièrement, nous avons démontré que LRP10 n'était pas impliqué dans l'internalisation de l'APP. La surexpression de LRP10 de type sauvage (LRP10<sup>ts</sup>) dans les cellules HeLa surexprimant l'APP695 n'affecte pas l'internalisation de l'APP. Aucune différence notable dans la localisation de l'APP de surface internalisé n'a été observée en présence ou en absence de LRP10<sup>ts</sup>. Néanmoins, nous avons tout de même montré que le mutant LRP10<sup>2DXXAA</sup>, redistribué au niveau des endosomes précoces et de la membrane plasmique suite à sa perte d'interaction avec les GGA et les protéines AP-1/AP-2 (Boucher *et al.*, 2008; Doray *et al.*, 2008), affecte le transport rétrograde de l'APP endocytée. En présence de LRP10<sup>2DXXAA</sup>, l'APP internalisée semble retenue dans les endosomes précoces avec LRP10 mutant, tous deux incapables de retourner au TGN. Ainsi, LRP10 semble être impliqué dans le transport rétrograde de l'APP, des endosomes précoces vers le TGN, de manière dépendante des GGA, plutôt que d'AP-1/AP-2. Les GGA interviennent dans le transport tant antérograde que rétrograde entre le TGN et les endosomes (Bonifacino, 2004; Ghosh et Kornfeld, 2004), tandis que le complexe AP-1, retrouvé au TGN, est davantage impliqué dans le triage des protéines sortantes, et le complexe AP-2, à la membrane plasmique, intervient plutôt dans l'endocytose (Doray *et al.*, 2007). L'effet de LRP10 sur le trafic de l'APP endogène a aussi été confirmé dans les cellules neuronales SH-SY5Y surexprimant stablement LRP10<sup>ts</sup> ou LRP10<sup>2DXXAA</sup>, bien que dans ce type cellulaire LRP10 mutant est moins redirigé à la surface ou encore internalisé plus rapidement. Il est intéressant de noter que des effets similaires sur la relocalisation de l'APP aux endosomes et à la membrane plasmique ont été observés suite à l'expression d'un mutant de SorLA/LR11 muté dans son domaine d'interaction avec les GGA et redistribué au niveau

de ces compartiments. Cette perte d'interaction entraîne le blocage du transport rétrograde de SorLA/LR11 au profit de son recyclage à la membrane plasmique (Schmidt *et al.*, 2007).

Par la suite, l'accumulation de l'APP mature, due à l'augmentation de sa demi-vie en présence de LRP10<sup>ts</sup>, nous indique que le métabolisme endogène de l'APP dans les SH-SY5Y est ralenti et donc que le clivage de l'APP est possiblement réduit puisqu'il ne semble pas y avoir d'augmentation de l'APP total pour expliquer cette accumulation. Il est à noter que l'accumulation de l'APP mature n'est pas observée dans le lysat des cellules HEK surexprimant de façon transitoire LRP10<sup>ts</sup>. Il est possible que cet effet soit observable seulement à plus long terme lors de surexpression stable, ou simplement dû aux différents types cellulaires. Effectivement, certaines divergences ont déjà été observées dans la localisation intracellulaire de l'interaction SorLA/LR11 avec l'APP entre les cellules HEK et les cellules SH-SY5Y et CHO (Andersen *et al.*, 2005; Offe *et al.*, 2006). Cette accumulation d'APP mature semble coïncider avec la colocalisation de LRP10<sup>ts</sup> et de l'APP observée majoritairement au niveau du TGN dans les cellules SH-SY5Y. L'APP, suite à sa maturation lors de son passage dans l'appareil de Golgi, quitte habituellement le TGN pour, soit atteindre la surface cellulaire ou les endosomes et être clivée, soit être envoyée vers le lysosome pour être dégradée. L'accumulation d'APP mature nous indique donc que la protéine passerait moins de temps au niveau de ces compartiments où elle est clivée ou dégradée. Ceci suggère que l'APP passerait plus de temps au niveau du TGN en présence de LRP10<sup>ts</sup>. Le temps de résidence de l'APP au TGN pourrait être augmenté en raison d'un effet de rétention qu'exercerait LRP10 sur l'APP en ralentissant sa sortie, ou encore, en raison d'une augmentation du niveau d'APP transporté de façon rétrograde par LRP10, des endosomes vers le TGN. Cette dernière possibilité est appuyée par l'expression du mutant LRP10<sup>2DXXAA</sup> qui semble aussi interférer à ce niveau dans le trafic de l'APP s'accumulant dans les endosomes précoces. Cette hypothèse viendrait confirmer une fois de plus la possibilité que LRP10 pourrait jouer un rôle physiologique dans le triage de l'APP entre le TGN et les endosomes. SorLA/LR11 et LRP10 ne possèdent que peu de similitudes dans leur séquence, ne serait-ce que des répétitions de domaine de liaison au ligand de classe A, communes à tous les LDLR. Ces deux récepteurs présentent une similarité plutôt par leur localisation et leur trafic intracellulaire dans la voie TGN/endosomes, ainsi que par leur

capacité à interagir avec les GGA et la protéine APP. De plus, il est connu que la surexpression de SorLA/LR11 entraîne aussi l'accumulation de l'APP au Golgi et une augmentation de l'APP mature intracellulaire en influençant le trafic de l'APP, soit par rétention au TGN ou par l'augmentation de son transport rétrograde (Andersen *et al.*, 2005; Schmidt *et al.*, 2007). De cette manière, comme SorLA/LR11, LRP10 influence le trafic intracellulaire de l'APP. Cependant, des expérimentations supplémentaires sont requises afin de confirmer à quel niveau plus précisément LRP10 intervient dans le trafic de l'APP. Néanmoins, nous avons identifié ici un second ligand potentiel du récepteur LRP10 : l'APP. Jusqu'à ce jour, un seul ligand potentiel de LRP10 avait été répertorié dans la littérature, soit les lipoprotéines  $\beta$ -VLDL enrichies en ApoE. Il a été démontré que, LRP9 (l'orthologue murin de LRP10) avait la capacité de moduler l'apport intracellulaire *in vitro* de ces lipoprotéines (Sugiyama *et al.*, 2000).

### **3.1.2 LRP10 influence le clivage de l'APP et la production d'A $\beta$**

Puisqu'il est connu que la localisation et le trafic de l'APP sont directement reliés à son processus de clivage, nous avons confirmé l'influence de LRP10 sur le trafic de l'APP en démontrant que LRP10 affectait le clivage de l'APP. Effectivement, la surexpression de LRP10<sup>ts</sup> réduit autant le clivage amyloïdogénique de l'APP se produisant au niveau des endosomes que son clivage non amyloïdogénique à la membrane plasmique. Ainsi, nous avons démontré que la production des différents fragments d'APP, dont le peptide A $\beta$ , était réduite par LRP10<sup>ts</sup>. Ceci vient corroborer notre hypothèse selon laquelle LRP10<sup>ts</sup> induirait une rétention ou un recyclage de l'APP au TGN et ainsi passerait moins de temps dans les compartiments cellulaires où elle est clivée. Ceci coïncide aussi avec la localisation prédominante au TGN des deux protéines. Précédemment, il a été démontré que la surexpression de SorLA/LR11 induit exactement les mêmes effets sur le clivage de l'APP (Andersen *et al.*, 2005; Schmidt *et al.*, 2007). De plus, l'augmentation de la production du fragment CTF $\beta$  et du peptide A $\beta$  suite à la déplétion de LRP10 appuie le rôle suggéré de LRP10 dans la rétention de l'APP au TGN ou l'augmentation de son transport rétrograde des endosomes vers le TGN.

L'effet du mutant LRP10<sup>2DXXAA</sup> séquestrant l'APP au niveau des endosomes explique facilement l'augmentation du clivage  $\beta$  reflété par l'augmentation des fragments sAPP $\beta$ , CTF $\beta$  et A $\beta$  produits dans les SH-SY5Y. Toutefois, un effet inattendu sur la production d'A $\beta$  a été observé dans les cellules SH-SY5Y exprimant fortement LRP10<sup>2DXXAA</sup>. En effet, dans ces cellules la production de l'A $\beta$  est réduite alors que celle du fragment précurseur CTF $\beta$  est augmentée, indiquant que le clivage  $\gamma$  du fragment CTF $\beta$  semble être réduit lors d'une forte expression du mutant LRP10<sup>2DXXAA</sup>. Il est connu que les récepteurs ApoER2, LRP1 et SorLA/LR11, de même que SorCS1, interagissent avec la  $\gamma$ -sécrétase et sont même clivés par cette dernière (Cam et Bu, 2006; Lleo *et al.*, 2005; Marzolo et Bu, 2009; Nyborg *et al.*, 2006). Il a aussi été démontré que le clivage de LRP1 par la  $\gamma$ -sécrétase peut faire compétition au clivage de l'APP ou du fragment CTF en agissant à titre de substrat compétitif (Lleo *et al.*, 2005). De cette manière, nous suggérons que LRP10 pourrait être un substrat de la  $\gamma$ -sécrétase et qu'une forte expression de LRP10<sup>2DXXAA</sup> viendrait ainsi faire compétition au clivage  $\gamma$  du fragment CTF, puisqu'une quantité anormale de récepteurs mutants se retrouve aux endosomes. Toutefois, cette hypothèse demeure à confirmer. Finalement, l'expression du mutant ne semble pas avoir d'effet significatif sur le clivage  $\alpha$ , probablement en raison du fait que LRP10<sup>2DXXAA</sup> ne semble pas redistribué fortement à la membrane plasmique dans les cellules SH-SY5Y. Ces effets de LRP10 sur le clivage de l'APP confirment l'implication de LRP10 dans le trafic de l'APP et son triage entre les endosomes et le TGN. Il est intéressant de noter que même si l'expression du mutant de SorLA/LR11 ayant perdu sa capacité d'interagir avec les GGA semble montrer une redistribution similaire à LRP10<sup>2DXXAA</sup> aux endosomes et à la membrane plasmique, les effets de ce mutant sur le clivage de l'APP sont tout autres. Il semble que la relocalisation du récepteur SorLA/LR11 muté se situe davantage dans les endosomes de recyclage (Schmidt *et al.*, 2007) plutôt que précoces, comme observé pour LRP10<sup>2DXXAA</sup> (Boucher *et al.*, 2008). Ceci suggère que le mutant SorLA/LR11 est recyclé à la surface au lieu d'être transporté de façon rétrograde par les GGA et augmente ainsi le clivage non amyloïdogénique de l'APP alors qu'il en réduit le clivage amyloïdogénique et la production d'A $\beta$  (Schmidt *et al.*, 2007). Donc, bien que la surexpression de ces récepteurs ait des conséquences très similaires sur la maturation, le trafic et le clivage de l'APP, le rôle précis de ces récepteurs n'est peut-être pas si redondant puisque le niveau



exact de leur intervention dans le trafic intracellulaire de l'APP peut néanmoins diverger. Il n'en demeure pas moins que plusieurs récepteurs sont impliqués dans le trafic de l'APP, collaborant tous au maintien de son métabolisme, et que nous avons démontré dans cette étude la capacité de LRP10 à participer à cette régulation.

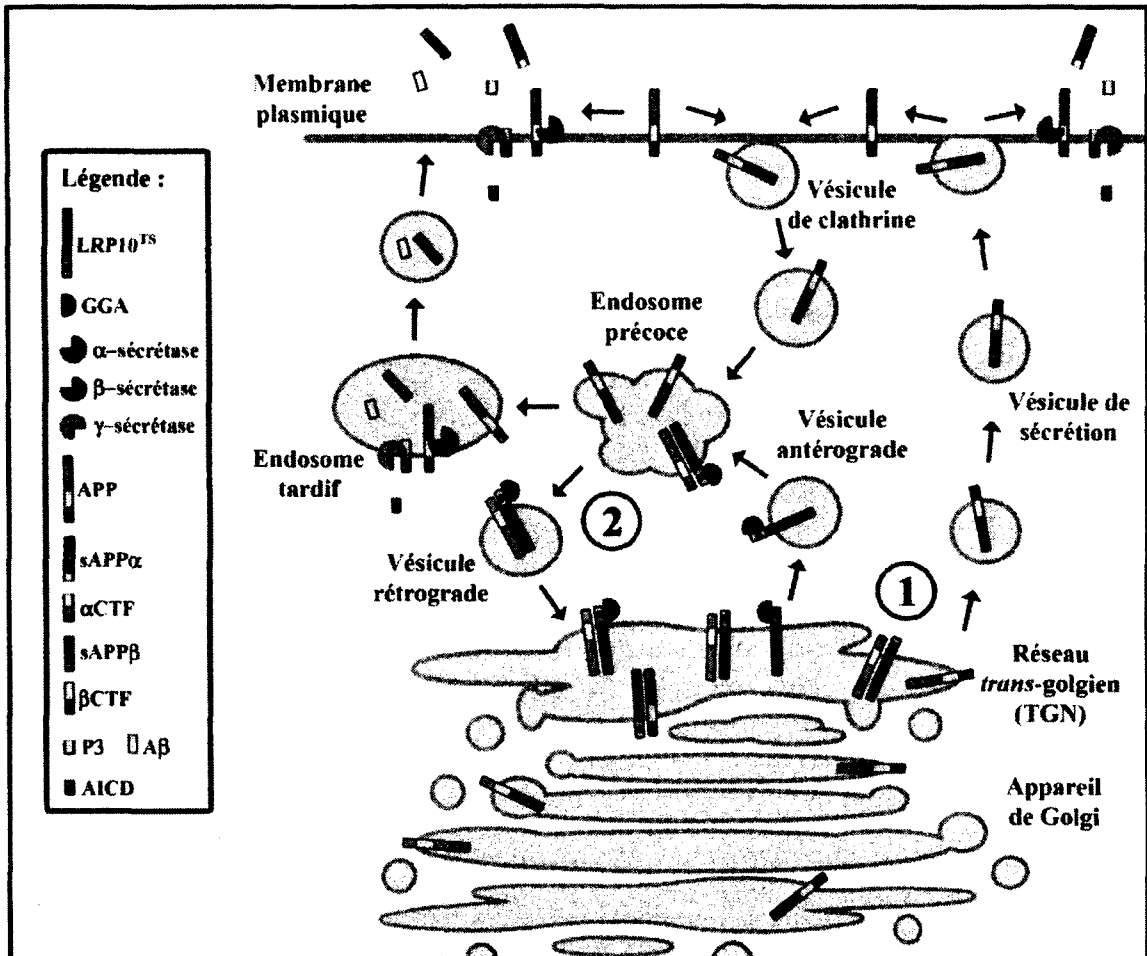
Certaines études ont précédemment impliqué les GGA dans la régulation du clivage de l'APP et la production d'A $\beta$ , mais de façon indirecte et indépendamment de son interaction directe avec BACE1. Il a donc été suggéré que d'autres protéines, comme le récepteur SorLA/LR11 capable d'interagir directement avec les GGA, pourraient servir d'intermédiaires et donc de récepteurs de triage de la protéine APP influençant par le fait même la production d'A $\beta$  (Schmidt *et al.*, 2007; Von Arnim *et al.*, 2006; Wahle *et al.*, 2006). Comme il a déjà été démontré, LRP10 est capable d'interagir directement avec les GGA régulant son trafic (Boucher *et al.*, 2008; Doray *et al.*, 2008). Dans cette étude, nous avons démontré que la perte de cette interaction suite à l'expression du mutant LRP10<sup>2DXXAA</sup> entraîne une augmentation de la production d'A $\beta$  et que lorsque LRP10<sup>ls</sup> est correctement transporté, la production d'A $\beta$  est plutôt réduite. Il est intéressant de noter qu'il a été rapporté que la déplétion de GGA1 entraîne aussi une augmentation de la sécrétion du peptide A $\beta$  alors que sa surexpression en réduit la production (Von Arnim *et al.*, 2006; Wahle *et al.*, 2006). Ces concordances entre GGA1 et LRP10 sur la production d'A $\beta$  nous permettent de croire que LRP10 serait un second exemple possible de récepteur de triage pouvant moduler le trafic de l'APP et la production d'A $\beta$  via les GGA.

LRP10 fait partie d'une sous-famille de LDLR incluant LRP3 et LRP12, qui possèdent respectivement 37 et 33% d'identité avec la séquence protéique de LRP10. Ces trois récepteurs possèdent certaines caractéristiques communes, comme la présence de deux domaines CUB dans leur extrémité extracellulaire, absent dans les autres LDLR, et une queue cytoplasmique plus longue possédant un ou deux motifs DXXLL. Il est connu que les protéines LRP3 et LRP12 sont exprimées au niveau du cerveau (Gibbons *et al.*, 2010; Ishii *et al.*, 1998). Il n'existe que très peu de données sur ces deux récepteurs. La localisation et le trafic intracellulaire de LRP3 sont toujours inconnus, toutefois nous

savons que LRP12 possède d'avantage une localisation à la membrane plasmique (Battle *et al.*, 2003). Afin de mieux comprendre le rôle des membres de cette sous-famille dans la cellule et au niveau du système nerveux, il serait intéressant de déterminer si LRP3 et LRP12 ont aussi la capacité d'interagir avec l'APP, d'en moduler le trafic et le clivage en A $\beta$ . Pour ce faire, il faudra donc réaliser le même type d'étude que nous avons présenté ici avec LRP10. De plus, il a été rapporté, suite à l'analyse de l'expression de différents membres des LDLR ainsi que de l'ApoE, un ligand commun au LDLR, que les niveaux d'expression de LRP10 et LRP12, de même que de l'ApoE, seraient spécifiquement altérés dans le cerveau de personnes atteintes de schizophrénie. L'expression de LRP10 et de l'ApoE sont augmentées alors que celle de LRP12 est réduite (Gibbons *et al.*, 2010). Ceci démontre la possibilité que les membres de cette sous-famille des LDLR, jouent des rôles complémentaires, qu'ils soient communs, divergents ou opposés dans la physiologie cellulaire.

En résumé, tout comme plusieurs autres membres de la famille des LDLR, LRP10 est un nouveau récepteur de la protéine APP influençant son trafic. De plus, comme la localisation intracellulaire de l'APP constitue un aspect primordial de la régulation de son clivage amyloïdogénique variant en fonction du compartiment cellulaire, il semble normal que le trafic de l'APP soit aussi finement régulé. Ainsi, le transport de l'APP est modulé à plusieurs niveaux via l'interaction avec différents récepteurs cargos dictant sa trajectoire et donc sa destinée dans la cellule. De cette manière, les récepteurs de la famille des LDLR (Andersen et Willnow, 2006; Bu *et al.*, 2006; Cam et Bu, 2006; Jaeger et Pietrzik, 2008; Marzolo et Bu, 2009) et d'autres récepteurs de triage comme SorCS1 (Lane *et al.*, 2010), liant l'APP et affectant son trafic, modulent son processus de clivage et donc la production d'A $\beta$ . Dans cette étude, nous avons démontré que LRP10 module aussi le trafic de l'APP, entre le TGN et les endosomes, et influence le temps de résidence de l'APP au niveau du TGN, soit 1) par effet de rétention ou 2) par augmentation de son transport rétrograde à partir des endosomes, protégeant ainsi l'APP de son clivage en A $\beta$  (figure 3.1). De cette manière, dans des conditions saines LRP10 aurait plutôt un effet préventif sur la production d'A $\beta$ . Ce qui suggère, qu'une diminution du niveau de LRP10 pourrait donc avoir des

conséquences négatives sur le métabolisme de l'APP et causer une augmentation de son clivage en  $A\beta$ .



**Figure 3.1. Modèle proposé du rôle de LRP10 dans le trafic intracellulaire de l'APP.** L'APP mature quitte l'appareil de Golgi pour atteindre la membrane plasmique via la voie de sécrétion constitutive. À la membrane, l'APP peut être clivée par l' $\alpha$ - et la  $\gamma$ -sécrétase ou être internalisée vers les endosomes par des vésicules de clathrine. Aux endosomes l'APP peut retourner au TGN par transport rétrograde ou encore être clivée par la  $\beta$ - et la  $\gamma$ -sécrétase en libérant le peptide  $A\beta$ . LRP10 trafic entre le TGN et les endosomes grâce à son interaction avec les protéines adaptatrices GGA qui assurent son transport tant antérograde que rétrograde entre ces compartiments cellulaires. Dans cette étude, nos résultats suggèrent que l'interaction de LRP10 avec l'APP prolonge le temps de résidence de l'APP au niveau du TGN soit 1) par effet de rétention ou 2) par augmentation de son transport rétrograde à partir des endosomes, éloignant l'APP des endosomes et le protégeant ainsi de son clivage en  $A\beta$ .

### 3.2 LRP10 et la MA

En dernier lieu, nos résultats suggèrent l'implication potentielle de LRP10 dans la pathogénèse de la MA. Effectivement, normalement LRP10 joue un rôle protecteur dans le métabolisme physiologique de l'APP en augmentant son temps de résidence au TGN et en limitant son clivage en A $\beta$  aux endosomes. Ainsi, la réduction du niveau protéique de LRP10 dans l'hippocampe et le cortex frontal de cerveaux de patients atteints de la MA nous indique que cette réduction, tel que démontré dans cette étude, pourrait contribuer à la production d'A $\beta$ , en permettant à l'APP de passer plus de temps au niveau des endosomes pour subir le clivage  $\beta$ . De cette manière, LRP10 pourrait contribuer à la pathogénèse de la MA. Il a été démontré que le niveau de récepteur SorLA/LR11, ayant aussi un rôle préventif sur la production d'A $\beta$ , est modulé à la baisse dans la MA (Dodson *et al.*, 2006; Scherzer *et al.*, 2004). De plus, des souris nulles pour SorLA/LR11 ont révélé une plus grande quantité d'A $\beta$  au niveau de leur cortex cérébral (Andersen *et al.*, 2005) et ont permis de démontrer que la perte de SorLA/LR11 contribue de façon précoce à la cascade d'événements de la pathogénèse de la MA (Dodson *et al.*, 2008). D'ailleurs, il serait très utile de développer des souris déficientes pour l'expression de LRP10, afin de confirmer le rôle probable de la perte de LRP10 dans l'augmentation de la production d'A $\beta$  et du dépôt de plaques amyloïde *in vivo*.

Par ailleurs, il serait aussi légitime de se demander si le trafic des récepteurs LRP10 présents dans les cerveaux atteints de la MA est affecté par la réduction de l'expression des protéines adaptatrices de clathrine GGA qui est connu dans la MA. Les niveaux de GGA1 et GGA3 sont réduits de façon significative dans la MA (Santosa *et al.*, 2011; Tesco *et al.*, 2007; Wahle *et al.*, 2006) et nous savons que le trafic de LRP10 dépend entre autres de son interaction avec les GGA (Boucher *et al.*, 2008; Doray *et al.*, 2008). Or, dans cette étude nous avons démontré à l'aide du mutant LRP10<sup>2DXXAA</sup> que la perte d'interaction de LRP10 avec les GGA entraîne sa redistribution et celle de l'APP majoritairement aux endosomes, favorisant ainsi son clivage en A $\beta$ . Il pourrait aussi être possible que la réduction des GGA chez les patients atteints de la MA, induise un mauvais triage de LRP10 au TGN et contribue ainsi à l'augmentation de la production du peptide A $\beta$  neurotoxique. Il serait

donc intéressant de démontrer l'effet de la réduction de l'expression des GGA sur le trafic de LRP10 et de l'APP ainsi que sur son clivage en A $\beta$ . Par la même occasion, ceci nous permettrait d'éliminer l'effet possible de la perte d'interaction avec les complexes AP-1/AP-2, aussi capable d'interagir avec les motifs DXXLL de LRP10 et pouvant contribuer à la redistribution du mutant LRP10<sup>2DXXAA</sup>.

Par la suite, nous avons aussi démontré que la réduction de LRP10 s'effectuait au niveau post-transcriptionnel dans les cerveaux atteints de la MA, puisque les niveaux de transcrits ne semblent pas altérés. Ainsi, le métabolisme de LRP10 serait affecté dans la MA. La traduction de la protéine pourrait être altérée, par exemple, par la présence de micro ARN (miARN) capables d'inhiber la traduction de l'ARN messenger (ARNm) de LRP10. Effectivement, les miARN dont l'hybridation à l'ARNm n'est que partielle vont entraîner une inhibition de la traduction de ce dernier, alors que lorsque l'hybridation est très bonne, les miARN provoquent plutôt la dégradation de l'ARNm. Ainsi, en ce qui concerne la diminution protéique de LRP10 dans la MA, il pourrait s'agir de miARN partiellement complémentaire à l'ARNm de LRP10. De plus, il est connu que l'expression de plusieurs miARN est dérégulée dans la MA et peut même directement affecter le niveau de traduction de plusieurs protéines importantes, telle BACE1 (Sato, 2010). La demi-vie de LRP10 pourrait aussi être réduite due à un plus grand niveau de dégradation suite à des modifications dans son trafic intracellulaire, ou encore à la traduction d'une protéine plus instable. Tout d'abord, il est connu que l'expression de la protéine Calnuc est réduite dans la MA (Lin *et al.*, 2007). Notre équipe a précédemment démontré que la diminution de Calnuc provoque la redistribution de LRP10 au niveau des lysosomes, entraînant sa dégradation prématurée et la diminution de sa demi-vie (Brodeur *et al.*, 2009). Ainsi, la diminution de Calnuc pourrait aussi être en partie responsable de la diminution protéique de LRP10 observée dans la MA. Une meilleure compréhension du métabolisme de LRP10 et des protéines participant à sa localisation et son trafic pourrait certainement nous aider à mieux comprendre le rôle de LRP10 dans la pathogénèse de la MA. Ensuite, il est connu que des polymorphismes ou SNP se retrouvent dans les gènes codant pour certains membres de la famille des LDLR, dont SorLA/LR11, LRP1 et ApoER2, et sont directement reliés à la MA (Cam et Bu, 2006; Marzolo et Bu, 2009; Reitz *et al.*, 2011c;

Rogaeva *et al.*, 2007). De cette manière, la présence de polymorphismes dans le gène codant pour LRP10 pourrait expliquer l'instabilité de la protéine dans la MA. Ainsi, LRP10 pourrait représenter un facteur de risque pour la MA. De façon intéressante, le gène codant pour LRP10 se situe sur le chromosome 14 au niveau du locus 14q11.2 (Sugiyama *et al.*, 2000). Sur ce même chromosome, au locus 14q24.3, est également localisé le gène de la protéine préséniline 1 (PS1), l'unité catalytique du complexe  $\gamma$ -sécrétase dans lequel plusieurs mutations différentes ont été répertoriées dans la forme génétique de la MA (Brouwers *et al.*, 2008; Tanzi et Bertram, 2005). Des études plus poussées sur les variantes génétiques du récepteur LRP10 devront être réalisées afin de déterminer si ces dernières peuvent être reliées à la MA. Finalement, nous avons observé une diminution plus importante du niveau protéique de LRP10 chez les femmes que chez les hommes. Ceci suggère que LRP10 pourrait être impliqué dans la MA d'une manière dépendante au genre féminin. Certains dimorphismes en lien avec le sexe féminin ont déjà été rapportés par le passé dans la MA. SorLA/LR11 et SorCS1, un homologue de SorLA/LR11 aussi membre de la famille des récepteurs à domaine Vps10p, sont tous les deux capables d'interagir avec l'APP et de moduler son trafic ainsi que son clivage en A $\beta$  de façon similaire à LRP10. Il est connu que ces récepteurs possèdent des variantes génétiques reliées au sexe féminin directement associées à la MA (Cellini *et al.*, 2009; Lane *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2009). La découverte de ces associations génétiques avec la MA étant relativement récente, les causes en demeurent toujours un mystère.

Enfin, la perte de LRP10 dans la MA pourrait s'expliquer par une combinaison de toutes ces raisons et donc être un facteur de risque ou une conséquence de la pathogénèse, contribuant dans tous les cas à la production d'A $\beta$ . La poursuite des efforts mis dans la compréhension du trafic de LRP10, le développement de souris transgéniques ou déficiente pour l'expression de LRP10, ainsi que l'étude des variantes génétiques possibles dans la séquence du gène codant pour LRP10 nous permettrons de mieux comprendre le rôle de LRP10 dans la pathogénèse de la MA. Une chose est sûre, l'identification éventuelle des causes modulants l'expression protéique de LRP10 à la baisse permettront certainement de clarifier son implication dans la MA et possiblement de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

## Conclusion

En conclusion, dans cette étude nous avons identifié LRP10, un membre peu connu de la famille des LDLR, comme nouveau récepteur de la protéine APP, potentiellement impliqué dans la pathogénèse de la MA. Le récepteur LRP10 est capable de moduler le trafic de la protéine APP entre le TGN et les endosomes de sorte qu'il semble influencer le temps de résidence de l'APP au niveau du TGN. De cette manière, LRP10 protège l'APP de son clivage amyloïdogénique au niveau des endosomes pour ainsi réduire la production d'A $\beta$ . La réduction de l'expression de LRP10, ou la modification de sa localisation intracellulaire provoque une augmentation de la production d'A $\beta$ . Ainsi, la diminution du niveau protéique de LRP10 dans la MA pourrait contribuer à l'augmentation de la production d'A $\beta$  et représenter un facteur de risque de développement de la maladie. L'étude des aspects génétique et métabolique de LRP10 nous permettra éventuellement de déterminer les causes de la réduction du niveau protéique de LRP10 et sa participation à la pathogénèse de la MA *in vivo*. Enfin, l'effet préventif de LRP10 sur la production d'A $\beta$  dans des conditions physiologiques pourrait faire de LRP10 une cible thérapeutique de choix, dans le but de rétablir son expression et de combattre la MA.

## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier sincèrement la directrice de mes travaux de maîtrise Dre Christine Lavoie, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, ainsi que pour sa présence, son enseignement et son support tout au long de mes études graduées. Elle m'a donné la chance de travailler sur un projet stimulant et rempli de beaux défis, ce fut une expérience très enrichissante. De plus, j'aimerais remercier l'assistante de recherche du laboratoire, Caroline Thériault pour nos nombreuses discussions, ses bons conseils, son soutien ainsi que son implication dans cette étude. Je remercie Mélissa Lessard-Beaudoin, stagiaire de passage dans le laboratoire, pour sa participation à ce projet. Merci à mes collègues de laboratoire Heidi Larkin, Stéphanie Rosciglione et Catherine Duclos pour l'entraide dans le laboratoire, ainsi que toutes les discussions et les bons moments que nous avons partagés, qui ont su rendre mon séjour agréable au sein de l'équipe. Je remercie aussi tous les membres du département de pharmacologie que j'ai côtoyés, pour leur générosité et l'aide technique qu'ils m'ont apporté.

Ensuite, j'aimerais souligner la contribution de PerkinElmer et remercier Alexandre Marcil ainsi que Sophie Dahan, pour leurs implications dans le développement des protocoles de dosage AlphaLISA utilisés dans ce projet et pour avoir gracieusement fourni les kits. Merci aux organismes subventionnaires, le FRSQ pour l'octroi de ma bourse de formation de maîtrise, et la Société d'Alzheimer du Canada pour avoir financé ce projet.

De plus, je tiens à remercier tout spécialement ma famille et plus particulièrement mes parents Ginette et Claude Brodeur, ma sœur Isabelle Brodeur ainsi que mon conjoint, Charles Gagné, pour leurs encouragements, leurs supports et la patience constante dont ils ont fait preuve au cours de ces dernières années. Mille fois Merci!

En terminant, merci aux Dr Jean-Bernard Denault et Dr Xavier Roucou pour avoir accepté de réviser ce mémoire.



## Liste des publications

- Andersen, O. M. et Willnow, T. E. (2006). "Lipoprotein receptors in Alzheimer's disease." Trends Neurosci **29**(12): 687-694.
- Andersen, O. M., Schmidt, V., Spoelgen, R., Gliemann, J., Behlke, J., Galatis, D., McKinstry, W. J., Parker, M. W., Masters, C. L., Hyman, B. T., Cappai, R. et Willnow, T. E. (2006). "Molecular dissection of the interaction between amyloid precursor protein and its neuronal trafficking receptor SorLA/LR11." Biochemistry **45**(8): 2618-2628.
- Andersen, O. M., Reiche, J., Schmidt, V., Gotthardt, M., Spoelgen, R., Behlke, J., von Arnim, C. A., Breiderhoff, T., Jansen, P., Wu, X., Bales, K. R., Cappai, R., Masters, C. L., Gliemann, J., Mufson, E. J., Hyman, B. T., Paul, S. M., Nykjaer, A. et Willnow, T. E. (2005). "Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(38): 13461-13466.
- Arispe, N., Rojas, E. et Pollard, H. B. (1993). "Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(2): 567-571.
- Barnes, L. L., Wilson, R. S., Bienias, J. L., Schneider, J. A., Evans, D. A. et Bennett, D. A. (2005). "Sex differences in the clinical manifestations of Alzheimer disease pathology." Arch Gen Psychiatry **62**(6): 685-691.
- Bates, K. A., Verdile, G., Li, Q. X., Ames, D., Hudson, P., Masters, C. L. et Martins, R. N. (2009). "Clearance mechanisms of Alzheimer's amyloid-beta peptide: implications for therapeutic design and diagnostic tests." Mol Psychiatry **14**(5): 469-486.
- Battle, M. A., Maher, V. M. et McCormick, J. J. (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.
- Blennow, K., Hampel, H., Weiner, M. et Zetterberg, H. (2010). "Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease." Nat Rev Neurol **6**(3): 131-144.
- Bonifacino, J. S. (2004). "The GGA proteins: adaptors on the move." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(1): 23-32.
- Bonifacino, J. S. et Hurley, J. H. (2008). "Retromer." Curr Opin Cell Biol **20**(4): 427-436.
- Boucher, R., Larkin, H., Brodeur, J., Gagnon, H., Theriault, C. et Lavoie, C. (2008). "Intracellular trafficking of LRP9 is dependent on two acidic cluster/dileucine motifs." Histochem Cell Biol **130**(2): 315-327.
- Brodeur, J., Larkin, H., Boucher, R., Theriault, C., St-Louis, S. C., Gagnon, H. et Lavoie, C. (2009). "Calnuc binds to LRP9 and affects its endosomal sorting." Traffic **10**(8): 1098-1114.
- Brouwers, N., Slegers, K. et Van Broeckhoven, C. (2008). "Molecular genetics of Alzheimer's disease: an update." Ann Med **40**(8): 562-583.
- Bu, G., Cam, J. et Zerbinatti, C. (2006). "LRP in amyloid-beta production and metabolism." Ann N Y Acad Sci **1086**: 35-53.
- Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A. et Hof, P. R. (2000). "Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders." Brain Res Brain Res Rev **33**(1): 95-130.

- Busciglio, J., Gabuzda, D. H., Matsudaira, P. et Yankner, B. A. (1993). "Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(5): 2092-2096.
- Calkins, M. J. et Reddy, P. H. (2011). "Amyloid beta impairs mitochondrial anterograde transport and degenerates synapses in Alzheimer's disease neurons." Biochim Biophys Acta **1812**(4): 507-513.
- Cam, J. A. et Bu, G. (2006). "Modulation of beta-amyloid precursor protein trafficking and processing by the low density lipoprotein receptor family." Mol Neurodegener **1**: 8.
- Cam, J. A., Zerbinatti, C. V., Li, Y. et Bu, G. (2005). "Rapid endocytosis of the low density lipoprotein receptor-related protein modulates cell surface distribution and processing of the beta-amyloid precursor protein." J Biol Chem **280**(15): 15464-15470.
- Carrasquillo, M. M., Zou, F., Pankratz, V. S., Wilcox, S. L., Ma, L., Walker, L. P., Younkin, S. G., Younkin, C. S., Younkin, L. H., Bisceglia, G. D., Ertekin-Taner, N., Crook, J. E., Dickson, D. W., Petersen, R. C., Graff-Radford, N. R. et Younkin, S. G. (2009). "Genetic variation in PCDH11X is associated with susceptibility to late-onset Alzheimer's disease." Nat Genet **41**(2): 192-198.
- Cellini, E., Tedde, A., Bagnoli, S., Pradella, S., Piacentini, S., Sorbi, S. et Nacmias, B. (2009). "Implication of sex and SORL1 variants in italian patients with Alzheimer disease." Arch Neurol **66**(10): 1260-1266.
- Chow, V. W., Mattson, M. P., Wong, P. C. et Gleichmann, M. (2010). "An overview of APP processing enzymes and products." Neuromolecular Med **12**(1): 1-12.
- Christensen, D. Z., Schneider-Axmann, T., Lucassen, P. J., Bayer, T. A. et Wirths, O. (2010). "Accumulation of intraneuronal A $\beta$  correlates with ApoE4 genotype." Acta Neuropathol **119**(5): 555-566.
- Cole, S. L. et Vassar, R. (2007). "The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1." Mol Neurodegener **2**: 22.
- Cuesta, A., Zambrano, A., Royo, M. et Pascual, A. (2009). "The tumour suppressor p53 regulates the expression of amyloid precursor protein (APP)." Biochem J **418**(3): 643-650.
- da Cruz e Silva, E. F. et da Cruz e Silva, O. A. (2003). "Protein phosphorylation and APP metabolism." Neurochem Res **28**(10): 1553-1561.
- 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.
- Deane, R., Sagare, A. et Zlokovic, B. V. (2008). "The role of the cell surface LRP and soluble LRP in blood-brain barrier A $\beta$  clearance in Alzheimer's disease." Curr Pharm Des **14**(16): 1601-1605.
- Deane, R., Bell, R. D., Sagare, A. et Zlokovic, B. V. (2009). "Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease." CNS Neurol Disord Drug Targets **8**(1): 16-30.
- Dinet, V., An, N., Ciccotosto, G. D., Bruban, J., Maoui, A., Bellingham, S. A., Hill, A. F., Andersen, O. M., Nykjaer, A., Jonet, L., Cappai, R. et Mascarrelli, F. (2011). "APP involvement in retinogenesis of mice." Acta Neuropathol **121**(3): 351-363.
- Dodson, S. E., Gearing, M., Lippa, C. F., Montine, T. J., Levey, A. I. et Lah, J. J. (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, S. E., Andersen, O. M., Karmali, V., Fritz, J. J., Cheng, D., Peng, J., Levey, A. I., Willnow, T. E. et Lah, J. J. (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): 12877-12886.
- Doray, B., Lee, I., Knisely, J., Bu, G. et Kornfeld, S. (2007). "The gamma/sigma1 and alpha/sigma2 hemicomplexes of clathrin adaptors AP-1 and AP-2 harbor the dileucine recognition site." *Mol Biol Cell* **18**(5): 1887-1896.
- Doray, B., Knisely, J. M., Wartman, L., Bu, G. et Kornfeld, S. (2008). "Identification of acidic dileucine signals in LRP9 that interact with both GGAs and AP-1/AP-2." *Traffic* **9**(9): 1551-1562.
- El Khoury, J., Hickman, S. E., Thomas, C. A., Cao, L., Silverstein, S. C. et Loike, J. D. (1996). "Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils." *Nature* **382**(6593): 716-719.
- Evin, G. et Weidemann, A. (2002). "Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptides." *Peptides* **23**(7): 1285-1297.
- Fan, L. Y. et Chiu, M. J. (2010). "Pharmacological treatment for Alzheimer's disease: current approaches and future strategies." *Acta Neurol Taiwan* **19**(4): 228-245.
- Finan, G. M., Okada, H. et Kim, T. W. (2011). "BACE1 retrograde trafficking is uniquely regulated by the cytoplasmic domain of sortilin." *J Biol Chem* **286**(14): 12602-12616.
- Fukumoto, H., Cheung, B. S., Hyman, B. T. et Irizarry, M. C. (2002). "Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease." *Arch Neurol* **59**(9): 1381-1389.
- Funato, H., Yoshimura, M., Yamazaki, T., Saido, T. C., Ito, Y., Yokofujita, J., Okeda, R. et Ihara, Y. (1998). "Astrocytes containing amyloid beta-protein (Abeta)-positive granules are associated with Abeta40-positive diffuse plaques in the aged human brain." *Am J Pathol* **152**(4): 983-992.
- Gandy, S. (2005). "The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease." *J Clin Invest* **115**(5): 1121-1129.
- Garcia-Osta, A. et Alberini, C. M. (2009). "Amyloid beta mediates memory formation." *Learn Mem* **16**(4): 267-272.
- Gendron, T. F. et Petrucelli, L. (2009). "The role of tau in neurodegeneration." *Mol Neurodegener* **4**: 13.
- Gent, J. et Braakman, I. (2004). "Low-density lipoprotein receptor structure and folding." *Cell Mol Life Sci* **61**(19-20): 2461-2470.
- Ghosh, P. et Kornfeld, S. (2004). "The GGA proteins: key players in protein sorting at the trans-Golgi network." *Eur J Cell Biol* **83**(6): 257-262.
- Gibbons, A. S., Thomas, E. A., Scarr, E. et Dean, B. (2010). "Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein and Apolipoprotein E Expression is Altered in Schizophrenia." *Front Psychiatry* **1**: 19.
- Glabe, C. (2001). "Intracellular mechanisms of amyloid accumulation and pathogenesis in Alzheimer's disease." *J Mol Neurosci* **17**(2): 137-145.
- Groemer, T. W., Thiel, C. S., Holt, M., Riedel, D., Hua, Y., Huve, J., Wilhelm, B. G. et Klingauf, J. (2011). "Amyloid precursor protein is trafficked and secreted via synaptic vesicles." *PLoS One* **6**(4): e18754.
- Grosen, S., Grimm, M. O., Friess, P. et Hartmann, T. (2010). "Role of amyloid beta in lipid homeostasis." *Biochim Biophys Acta* **1801**(8): 966-974.

- Guenette, S. Y. (2003). "Astrocytes: a cellular player in Abeta clearance and degradation." Trends Mol Med **9**(7): 279-280.
- Haass, C., Schlossmacher, M. G., Hung, A. Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B. L., Lieberburg, I., Koo, E. H., Schenk, D., Teplow, D. B. et al. (1992). "Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism." Nature **359**(6393): 322-325.
- Hardy, J. et Selkoe, D. J. (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics." Science **297**(5580): 353-356.
- He, X., Li, F., Chang, W. P. et Tang, J. (2005). "GGA proteins mediate the recycling pathway of memapsin 2 (BACE)." J Biol Chem **280**(12): 11696-11703.
- Henriques, A. G., Vieira, S. I., da Cruz, E. S. E. F. et da Cruz, E. S. O. A. (2010). "Abeta promotes Alzheimer's disease-like cytoskeleton abnormalities with consequences to APP processing in neurons." J Neurochem **113**(3): 761-771.
- Hermey, G. (2009). "The Vps10p-domain receptor family." Cell Mol Life Sci **66**(16): 2677-2689.
- Ho, T., Vessey, K. A., Cappai, R., Dinet, V., Mascarelli, F., Ciccotosto, G. D. et Fletcher, E. L. (2012). "Amyloid Precursor Protein Is Required for Normal Function of the Rod and Cone Pathways in the Mouse Retina." PLoS One **7**(1): e29892.
- Ishii, H., Kim, D. H., Fujita, T., Endo, Y., Saeki, S. et Yamamoto, T. T. (1998). "cDNA cloning of a new low-density lipoprotein receptor-related protein and mapping of its gene (LRP3) to chromosome bands 19q12-q13. 2." Genomics **51**(1): 132-135.
- Itkin, A., Dupres, V., Dufrene, Y. F., Bechinger, B., Ruyschaert, J. M. et Raussens, V. (2011). "Calcium ions promote formation of amyloid beta-peptide (1-40) oligomers causally implicated in neuronal toxicity of Alzheimer's disease." PLoS One **6**(3): e18250.
- Jacobsen, L., Madsen, P., Jacobsen, C., Nielsen, M. S., Gliemann, J. et Petersen, C. M. (2001). "Activation and functional characterization of the mosaic receptor SorLA/LR11." J Biol Chem **276**(25): 22788-22796.
- Jacobsen, L., Madsen, P., Nielsen, M. S., Geraerts, W. P., Gliemann, J., Smit, A. B. et Petersen, C. M. (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, C. U. (2008). "Functional role of lipoprotein receptors in Alzheimer's disease." Curr Alzheimer Res **5**(1): 15-25.
- Jarrett, J. T., Berger, E. P. et Lansbury, P. T., Jr. (1993). "The C-terminus of the beta protein is critical in amyloidogenesis." Ann N Y Acad Sci **695**: 144-148.
- Jin, M., Shepardson, N., Yang, T., Chen, G., Walsh, D. et Selkoe, D. J. (2011). "Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(14): 5819-5824.
- Kamal, A., Stokin, G. B., Yang, Z., Xia, C. H. et Goldstein, L. S. (2000). "Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I." Neuron **28**(2): 449-459.
- Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., Sisodia, S. et Malinow, R. (2003). "APP processing and synaptic function." Neuron **37**(6): 925-937.

- Kang, D. E., Saitoh, T., Chen, X., Xia, Y., Masliah, E., Hansen, L. A., Thomas, R. G., Thal, L. J. et Katzman, R. (1997). "Genetic association of the low-density lipoprotein receptor-related protein gene (LRP), an apolipoprotein E receptor, with late-onset Alzheimer's disease." *Neurology* **49**(1): 56-61.
- Kang, E. L., Cameron, A. N., Piazza, F., Walker, K. R. et Tesco, G. (2010). "Ubiquitin regulates GGA3-mediated degradation of BACE1." *J Biol Chem* **285**(31): 24108-24119.
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K. et Muller-Hill, B. (1987). "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor." *Nature* **325**(6106): 733-736.
- Kawahara, M. et Kuroda, Y. (2000). "Molecular mechanism of neurodegeneration induced by Alzheimer's beta-amyloid protein: channel formation and disruption of calcium homeostasis." *Brain Res Bull* **53**(4): 389-397.
- Kienlen-Campard, P., Miolet, S., Tasiaux, B. et Octave, J. N. (2002). "Intracellular amyloid-beta 1-42, but not extracellular soluble amyloid-beta peptides, induces neuronal apoptosis." *J Biol Chem* **277**(18): 15666-15670.
- Knauer, M. F., Soreghan, B., Burdick, D., Kosmoski, J. et Glabe, C. G. (1992). "Intracellular accumulation and resistance to degradation of the Alzheimer amyloid A4/beta protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(16): 7437-7441.
- Krishnaswamy, S., Verdile, G., Groth, D., Kanyenda, L. et Martins, R. N. (2009). "The structure and function of Alzheimer's gamma secretase enzyme complex." *Crit Rev Clin Lab Sci* **46**(5-6): 282-301.
- Kuo, Y. M., Emmerling, M. R., Vigo-Pelfrey, C., Kasunic, T. C., Kirkpatrick, J. B., Murdoch, G. H., Ball, M. J. et Roher, A. E. (1996). "Water-soluble Abeta (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains." *J Biol Chem* **271**(8): 4077-4081.
- Lane, R. F., Raines, S. M., Steele, J. W., Ehrlich, M. E., Lah, J. A., Small, S. A., Tanzi, R. E., Attie, A. D. 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.
- Lee, J., Retamal, C., Cuitino, L., Caruano-Yzermans, A., Shin, J. E., van Kerkhof, P., Marzolo, M. P. 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.
- Li, S., Jin, M., Koeglsperger, T., Shepardson, N. E., Shankar, G. M. et Selkoe, D. J. (2011). "Soluble Abeta oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors." *J Neurosci* **31**(18): 6627-6638.
- Li, Y., Cam, J. et Bu, G. (2001). "Low-density lipoprotein receptor family: endocytosis and signal transduction." *Mol Neurobiol* **23**(1): 53-67.
- Liang, X., Slifer, M., Martin, E. R., Schnetz-Boutaud, N., Bartlett, J., Anderson, B., Zuchner, S., Gwirtsman, H., Gilbert, J. R., Pericak-Vance, M. A. et Haines, J. L. (2009). "Genomic convergence to identify candidate genes for Alzheimer disease on chromosome 10." *Hum Mutat* **30**(3): 463-471.

- Lin, H., Zhu, Y. J. et Lal, R. (1999). "Amyloid beta protein (1-40) forms calcium-permeable, Zn<sup>2+</sup>-sensitive channel in reconstituted lipid vesicles." Biochemistry **38**(34): 11189-11196.
- Lin, P., Li, F., Zhang, Y. W., Huang, H., Tong, G., Farquhar, M. G. et Xu, H. (2007). "Calnuc binds to Alzheimer's beta-amyloid precursor protein and affects its biogenesis." J Neurochem **100**(6): 1505-1514.
- Liu, Y., Peterson, D. A. et Schubert, D. (1998). "Amyloid beta peptide alters intracellular vesicle trafficking and cholesterol homeostasis." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(22): 13266-13271.
- Lleo, A., Waldron, E., von Arnim, C. A., Herl, L., Tangredi, M. M., Peltan, I. D., Strickland, D. K., Koo, E. H., Hyman, B. T., Pietrzik, C. U. et Berezovska, O. (2005). "Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) interacts with presenilin 1 and is a competitive substrate of the amyloid precursor protein (APP) for gamma-secretase." J Biol Chem **280**(29): 27303-27309.
- Loo, D. T., Copani, A., Pike, C. J., Whittemore, E. R., Walencewicz, A. J. et Cotman, C. W. (1993). "Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(17): 7951-7955.
- Lorenzen, A., Samosh, J., Vandewark, K., Anborgh, P. H., Seah, C., Magalhaes, A. C., Cregan, S. P., Ferguson, S. S. et Pasternak, S. H. (2010). "Rapid and direct transport of cell surface APP to the lysosome defines a novel selective pathway." Mol Brain **3**: 11.
- Lublin, A. L. et Gandy, S. (2010). "Amyloid-beta oligomers: possible roles as key neurotoxins in Alzheimer's Disease." Mt Sinai J Med **77**(1): 43-49.
- Marzolo, M. P. 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.
- Mawuenyega, K. G., Sigurdson, W., Ovod, V., Munsell, L., Kasten, T., Morris, J. C., Yarasheski, K. E. et Bateman, R. J. (2010). "Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease." Science **330**(6012): 1774.
- May, P., Woldt, E., Matz, R. L. 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.
- Miners, J. S., Baig, S., Palmer, J., Palmer, L. E., Kehoe, P. G. et Love, S. (2008). "Abeta-degrading enzymes in Alzheimer's disease." Brain Pathol **18**(2): 240-252.
- Mueller-Stainer, S., Zhou, Y., Arai, H., Roberson, E. D., Sun, B., Chen, J., Wang, X., Yu, G., Esposito, L., Mucke, L. et Gan, L. (2006). "Antiamyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B: implications for Alzheimer's disease." Neuron **51**(6): 703-714.
- Mufson, E. J., Counts, S. E., Perez, S. E. et Ginsberg, S. D. (2008). "Cholinergic system during the progression of Alzheimer's disease: therapeutic implications." Expert Rev Neurother **8**(11): 1703-1718.
- Muhammad, A., Flores, I., Zhang, H., Yu, R., Staniszewski, A., Planel, E., Herman, M., Ho, L., Kreber, R., Honig, L. S., Ganetzky, B., Duff, K., Arancio, O. et Small, S. A. (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.

- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A. et Yuan, J. (2000). "Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta." *Nature* **403**(6765): 98-103.
- Naslund, J., Schierhorn, A., Hellman, U., Lannfelt, L., Roses, A. D., Tjernberg, L. O., Silberring, J., Gandy, S. E., Winblad, B., Greengard, P. et et al. (1994). "Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(18): 8378-8382.
- Nielsen, H. M., Veerhuis, R., Holmqvist, B. et Janciauskiene, S. (2009). "Binding and uptake of A beta1-42 by primary human astrocytes in vitro." *Glia* **57**(9): 978-988.
- Nordstedt, C., Caporaso, G. L., Thyberg, J., Gandy, S. E. et Greengard, P. (1993). "Identification of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein in clathrin-coated vesicles purified from PC12 cells." *J Biol Chem* **268**(1): 608-612.
- Nyborg, A. C., Ladd, T. B., Zwizinski, C. W., Lah, J. J. et Golde, T. E. (2006). "Sortilin, SorCS1b, and SorLA Vps10p sorting receptors, are novel gamma-secretase substrates." *Mol Neurodegener* **1**: 3.
- Offe, K., Dodson, S. E., Shoemaker, J. T., Fritz, J. J., Gearing, M., Levey, A. I. et Lah, J. J. (2006). "The lipoprotein receptor LR11 regulates amyloid beta production and amyloid precursor protein traffic in endosomal compartments." *J Neurosci* **26**(5): 1596-1603.
- Okada, H., Zhang, W., Peterhoff, C., Hwang, J. C., Nixon, R. A., Ryu, S. H. et Kim, T. W. (2010). "Proteomic identification of sorting nexin 6 as a negative regulator of BACE1-mediated APP processing." *FASEB J* **24**(8): 2783-2794.
- Pagani, L. et Eckert, A. (2011). "Amyloid-Beta interaction with mitochondria." *Int J Alzheimers Dis* **2011**: 925050.
- Panza, F., Colacicco, A. M., D'Introno, A., Capurso, C., Liaci, M., Capurso, S. A., Capurso, A. et Solfrizzi, V. (2006). "Candidate genes for late-onset Alzheimer's disease: focus on chromosome 12." *Mech Ageing Dev* **127**(1): 36-47.
- Pearson, H. A. et Peers, C. (2006). "Physiological roles for amyloid beta peptides." *J Physiol* **575**(Pt 1): 5-10.
- Peraus, G. C., Masters, C. L. 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, R. G., Soriano, S., Hayes, J. D., Ostaszewski, B., Xia, W., Selkoe, D. J., Chen, X., Stokin, G. B. et Koo, E. H. (1999). "Mutagenesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including A beta42." *J Biol Chem* **274**(27): 18851-18856.
- Plant, L. D., Boyle, J. P., Smith, I. F., Peers, C. et Pearson, H. A. (2003). "The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons." *J Neurosci* **23**(13): 5531-5535.
- Portelius, E., Bogdanovic, N., Gustavsson, M. K., Volkman, I., Brinkmalm, G., Zetterberg, H., Winblad, B. et Blennow, K. (2010). "Mass spectrometric characterization of brain amyloid beta isoform signatures in familial and sporadic Alzheimer's disease." *Acta Neuropathol* **120**(2): 185-193.
- Puzzo, D., Privitera, L., Fa, M., Staniszewski, A., Hashimoto, G., Aziz, F., Sakurai, M., Ribe, E. M., Troy, C. M., Mercken, M., Jung, S. S., Palmeri, A. et Arancio, O. (2011). "Endogenous amyloid-beta is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory." *Ann Neurol* **69**(5): 819-830.

- Qiu, W. Q., Ferreira, A., Miller, C., Koo, E. H. et Selkoe, D. J. (1995). "Cell-surface beta-amyloid precursor protein stimulates neurite outgrowth of hippocampal neurons in an isoform-dependent manner." *J Neurosci* **15**(3 Pt 2): 2157-2167.
- Qiu, W. Q., Ye, Z., Kholodenko, D., Seubert, P. et Selkoe, D. J. (1997). "Degradation of amyloid beta-protein by a metalloprotease secreted by microglia and other neural and non-neural cells." *J Biol Chem* **272**(10): 6641-6646.
- Reitz, C., Brayne, C. et Mayeux, R. (2011a). "Epidemiology of Alzheimer disease." *Nat Rev Neurol* **7**(3): 137-152.
- Reitz, C., Tokuhiro, S., Clark, L. N., Conrad, C., Vonsattel, J. P., Hazrati, L. N., Palotas, A., Lantigua, R., Medrano, M., I, Z. J.-V., Vardarajan, B., Simkin, I., Haines, J. L., Pericak-Vance, M. A., Farrer, L. A., Lee, J. H., Rogaeva, E., George-Hyslop, P. S. et Mayeux, R. (2011b). "SORCS1 alters amyloid precursor protein processing and variants may increase Alzheimer's disease risk." *Ann Neurol* **69**(1): 47-64.
- Reitz, C., Cheng, R., Rogaeva, E., Lee, J. H., Tokuhiro, S., Zou, F., Bettens, K., Slegers, K., Tan, E. K., Kimura, R., Shibata, N., Arai, H., Kamboh, M. I., Prince, J. A., Maier, W., Riemenschneider, M., Owen, M., Harold, D., Hollingworth, P., Cellini, E., Sorbi, S., Nacmias, B., Takeda, M., Pericak-Vance, M. A., Haines, J. L., Younkin, S., Williams, J., van Broeckhoven, C., Farrer, L. A., St George-Hyslop, P. H., Mayeux, R., Genetic et Environmental Risk in Alzheimer Disease, C. (2011c). "Meta-analysis of the association between variants in SORL1 and Alzheimer disease." *Arch Neurol* **68**(1): 99-106.
- Rhee, S. K., Quist, A. P. et Lal, R. (1998). "Amyloid beta protein-(1-42) forms calcium-permeable, Zn<sup>2+</sup>-sensitive channel." *J Biol Chem* **273**(22): 13379-13382.
- Rhein, V., Baysang, G., Rao, S., Meier, F., Bonert, A., Muller-Spahn, F. et Eckert, A. (2009). "Amyloid-beta leads to impaired cellular respiration, energy production and mitochondrial electron chain complex activities in human neuroblastoma cells." *Cell Mol Neurobiol* **29**(6-7): 1063-1071.
- Rogaeva, E., Meng, Y., Lee, J. H., Gu, Y., Kawarai, T., Zou, F., Katayama, T., Baldwin, C. T., Cheng, R., Hasegawa, H., Chen, F., Shibata, N., Lunetta, K. L., Pardossi-Piquard, R., Bohm, C., Wakutani, Y., Cupples, L. A., Cuenco, K. T., Green, R. C., Pinessi, L., Rainero, I., Sorbi, S., Bruni, A., Duara, R., Friedland, R. P., Inzelberg, R., Hampe, W., Bujo, H., Song, Y. Q., Andersen, O. M., Willnow, T. E., Graff-Radford, N., Petersen, R. C., Dickson, D., Der, S. D., Fraser, P. E., Schmitt-Ulms, G., Younkin, S., Mayeux, R., Farrer, L. A. et St George-Hyslop, P. (2007). "The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease." *Nat Genet* **39**(2): 168-177.
- Roher, A. E., Lowenson, J. D., Clarke, S., Woods, A. S., Cotter, R. J., Gowing, E. et Ball, M. J. (1993). "beta-Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(22): 10836-10840.
- Santosa, C., Rasche, S., Barakat, A., Bellingham, S. A., Ho, M., Tan, J., Hill, A. F., Masters, C. L., McLean, C. et Evin, G. (2011). "Decreased expression of GGA3 Protein in Alzheimer's disease frontal cortex and increased co-distribution of BACE with the amyloid precursor protein." *Neurobiol Dis* **43**(1): 176-183.
- Satoh, J. (2010). "MicroRNAs and their therapeutic potential for human diseases: aberrant microRNA expression in Alzheimer's disease brains." *J Pharmacol Sci* **114**(3): 269-275.



- Scherzer, C. R., Offe, K., Gearing, M., Rees, H. D., Fang, G., Heilman, C. J., Schaller, C., Bujo, H., Levey, A. I. et al. (2004). "Loss of apolipoprotein E receptor LR11 in Alzheimer disease." *Arch Neurol* **61**(8): 1200-1205.
- Schliebs, R. et al. (2011). "The cholinergic system in aging and neuronal degeneration." *Behav Brain Res* **221**(2): 555-563.
- Schmidt, V., Sporbert, A., Rohe, M., Reimer, T., Rehm, A., Andersen, O. M. et al. (2007). "SorLA/LR11 regulates processing of amyloid precursor protein via interaction with adaptors GGA and PACS-1." *J Biol Chem* **282**(45): 32956-32964.
- Scott, W. K., Yamaoka, L. H., Bass, M. P., Gaskell, P. C., Conneally, P. M., Small, G. W., Farrer, L. A., Auerbach, S. A., Saunders, A. M., Roses, A. D., Haines, J. L. et al. (1998). "No genetic association between the LRP receptor and sporadic or late-onset familial Alzheimer disease." *Neurogenetics* **1**(3): 179-183.
- Selkoe, D. J. (2000). "Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein." *Ann N Y Acad Sci* **924**: 17-25.
- Selkoe, D. J. (2001). "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy." *Physiol Rev* **81**(2): 741-766.
- Selkoe, D. J. (2002). "Alzheimer's disease is a synaptic failure." *Science* **298**(5594): 789-791.
- Selkoe, D. J. et al. (2002). "Deciphering the genetic basis of Alzheimer's disease." *Annu Rev Genomics Hum Genet* **3**: 67-99.
- Selkoe, D. J., Yamazaki, T., Citron, M., Podlisny, M. B., Koo, E. H., Teplow, D. B. et al. (1996). "The role of APP processing and trafficking pathways in the formation of amyloid beta-protein." *Ann N Y Acad Sci* **777**: 57-64.
- Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schlossmacher, M., Whaley, J., Swindlehurst, C. et al. (1992). "Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids." *Nature* **359**(6393): 325-327.
- Shaffer, L. M., Dority, M. D., Gupta-Bansal, R., Frederickson, R. C., Younkin, S. G. et al. (1995). "Amyloid beta protein (A beta) removal by neuroglial cells in culture." *Neurobiol Aging* **16**(5): 737-745.
- Shah, S. et al. (2006). "sorLA: sorting out APP." *Mol Interv* **6**(2): 74-76.
- Shi, J., Tian, J., Pritchard, A., Lendon, C., Lambert, J. C., Iwatsubo, T. et al. (2006). "A 3'-UTR polymorphism in the oxidized LDL receptor 1 gene increases Aβ40 load as cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease." *Acta Neuropathol* **111**(1): 15-20.
- Shoji, M., Golde, T. E., Ghiso, J., Cheung, T. T., Estus, S., Shaffer, L. M., Cai, X. D., McKay, D. M., Tintner, R., Frangione, B. et al. (1992). "Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing." *Science* **258**(5079): 126-129.
- Simons, M., Keller, P., Dichgans, J. et al. (2001). "Cholesterol and Alzheimer's disease: is there a link?" *Neurology* **57**(6): 1089-1093.
- Small, S. A. (2008). "Retromer sorting: a pathogenic pathway in late-onset Alzheimer disease." *Arch Neurol* **65**(3): 323-328.
- Small, S. A. et al. (2006). "Sorting through the cell biology of Alzheimer's disease: intracellular pathways to pathogenesis." *Neuron* **52**(1): 15-31.

- Small, S. A., Kent, K., Pierce, A., Leung, C., Kang, M. S., Okada, H., Honig, L., Vonsattel, J. P. et Kim, T. W. (2005). "Model-guided microarray implicates the retromer complex in Alzheimer's disease." Ann Neurol **58**(6): 909-919.
- Spoelgen, R., von Arnim, C. A., Thomas, A. V., Peltan, I. D., Koker, M., Deng, A., Irizarry, M. C., Andersen, O. M., Willnow, T. E. et Hyman, B. T. (2006). "Interaction of the cytosolic domains of sorLA/LR11 with the amyloid precursor protein (APP) and beta-secretase beta-site APP-cleaving enzyme." J Neurosci **26**(2): 418-428.
- Sugiyama, T., Kumagai, H., Morikawa, Y., Wada, Y., Sugiyama, A., Yasuda, K., Yokoi, N., Tamura, S., Kojima, T., Nosaka, T., Senba, E., Kimura, S., Kadowaki, T., Kodama, T. et Kitamura, T. (2000). "A novel low-density lipoprotein receptor-related protein mediating cellular uptake of apolipoprotein E-enriched beta-VLDL in vitro." Biochemistry **39**(51): 15817-15825.
- Sullivan, C. P., Jay, A. G., Stack, E. C., Pakaluk, M., Wadlinger, E., Fine, R. E., Wells, J. M. et Morin, P. J. (2011). "Retromer disruption promotes amyloidogenic APP processing." Neurobiol Dis **43**(2): 338-345.
- Tamaoka, A., Kondo, T., Odaka, A., Sahara, N., Sawamura, N., Ozawa, K., Suzuki, N., Shoji, S. et Mori, H. (1994). "Biochemical evidence for the long-tail form (A beta 1-42/43) of amyloid beta protein as a seed molecule in cerebral deposits of Alzheimer's disease." Biochem Biophys Res Commun **205**(1): 834-842.
- Tamaoka, A., Sawamura, N., Fukushima, T., Shoji, S., Matsubara, E., Shoji, M., Hirai, S., Furiya, Y., Endoh, R. et Mori, H. (1997). "Amyloid beta protein 42(43) in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease." J Neurol Sci **148**(1): 41-45.
- Tang, B. L. (2009). "Neuronal protein trafficking associated with Alzheimer disease: from APP and BACE1 to glutamate receptors." Cell Adh Migr **3**(1): 118-128.
- Tanzi, R. E. et Bertram, L. (2005). "Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective." Cell **120**(4): 545-555.
- Tesco, G., Koh, Y. H., Kang, E. L., Cameron, A. N., Das, S., Sena-Esteves, M., Hiltunen, M., Yang, S. H., Zhong, Z., Shen, Y., Simpkins, J. W. et Tanzi, R. E. (2007). "Depletion of GGA3 stabilizes BACE and enhances beta-secretase activity." Neuron **54**(5): 721-737.
- Theuns, J., Brouwers, N., Engelborghs, S., Sleegers, K., Bogaerts, V., Corsmit, E., De Pooter, T., van Duijn, C. M., De Deyn, P. P. et Van Broeckhoven, C. (2006). "Promoter mutations that increase amyloid precursor-protein expression are associated with Alzheimer disease." Am J Hum Genet **78**(6): 936-946.
- Thinakaran, G. et Koo, E. H. (2008). "Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function." J Biol Chem **283**(44): 29615-29619.
- Troy, C. M., Rabacchi, S. A., Friedman, W. J., Frappier, T. F., Brown, K. et Shelanski, M. L. (2000). "Caspase-2 mediates neuronal cell death induced by beta-amyloid." J Neurosci **20**(4): 1386-1392.
- Tseng, B. P., Green, K. N., Chan, J. L., Blurton-Jones, M. et LaFerla, F. M. (2008). "Abeta inhibits the proteasome and enhances amyloid and tau accumulation." Neurobiol Aging **29**(11): 1607-1618.
- Tuppo, E. E. et Arias, H. R. (2005). "The role of inflammation in Alzheimer's disease." Int J Biochem Cell Biol **37**(2): 289-305.

- Turner, P. R., O'Connor, K., Tate, W. P. et Abraham, W. C. (2003). "Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory." Prog Neurobiol **70**(1): 1-32.
- Tyler, S. J., Dawbarn, D., Wilcock, G. K. et Allen, S. J. (2002). "alpha- and beta-secretase: profound changes in Alzheimer's disease." Biochem Biophys Res Commun **299**(3): 373-376.
- Ulery, P. G., Beers, J., Mikhailenko, I., Tanzi, R. E., Rebeck, G. W., Hyman, B. T. et Strickland, D. K. (2000). "Modulation of beta-amyloid precursor protein processing by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence that LRP contributes to the pathogenesis of Alzheimer's disease." J Biol Chem **275**(10): 7410-7415.
- Umeda, T., Mori, H., Zheng, H. et Tomiyama, T. (2010). "Regulation of cholesterol efflux by amyloid beta secretion." J Neurosci Res **88**(9): 1985-1994.
- Vassar, R. (2007). "Caspase-3 cleavage of GGA3 stabilizes BACE: implications for Alzheimer's disease." Neuron **54**(5): 671-673.
- Vieira, S. I., Rebelo, S., Esselmann, H., Wiltfang, J., Lah, J., Lane, R., Small, S. A., Gandy, S., da Cruz, E. S. E. F. et da Cruz, E. S. O. A. (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.
- von Arnim, C. A., Spoelgen, R., Peltan, I. D., Deng, M., Courchesne, S., Koker, M., Matsui, T., Kowa, H., Lichtenthaler, S. F., Irizarry, M. C. et Hyman, B. T. (2006). "GGA1 acts as a spatial switch altering amyloid precursor protein trafficking and processing." J Neurosci **26**(39): 9913-9922.
- von Arnim, C. A., Kinoshita, A., Peltan, I. D., Tangredi, M. M., Herl, L., Lee, B. M., Spoelgen, R., Hshieh, T. T., Ranganathan, S., Battey, F. D., Liu, C. X., Bacskai, B. J., Sever, S., Irizarry, M. C., Strickland, D. K. et Hyman, B. T. (2005). "The low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a novel beta-secretase (BACE1) substrate." J Biol Chem **280**(18): 17777-17785.
- von Einem, B., Schwanzar, D., Rehn, F., Beyer, A. S., Weber, P., Wagner, M., Schneckeburger, H. et von Arnim, C. A. (2010). "The role of low-density receptor-related protein 1 (LRP1) as a competitive substrate of the amyloid precursor protein (APP) for BACE1." Exp Neurol **225**(1): 85-93.
- Wahle, T., Prager, K., Raffler, N., Haass, C., Famulok, M. et Walter, J. (2005). "GGA proteins regulate retrograde transport of BACE1 from endosomes to the trans-Golgi network." Mol Cell Neurosci **29**(3): 453-461.
- Wahle, T., Thal, D. R., Sastre, M., Rentmeister, A., Bogdanovic, N., Famulok, M., Heneka, M. T. et Walter, J. (2006). "GGA1 is expressed in the human brain and affects the generation of amyloid beta-peptide." J Neurosci **26**(49): 12838-12846.
- Waldemar, G., Dubois, B., Emre, M., Georges, J., McKeith, I. G., Rossor, M., Scheltens, P., Tariska, P., Winblad, B. et Efns (2007). "Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline." Eur J Neurol **14**(1): e1-26.
- Walsh, D. M., Hartley, D. M., Kusumoto, Y., Fezoui, Y., Condron, M. M., Lomakin, A., Benedek, G. B., Selkoe, D. J. et Teplow, D. B. (1999). "Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates." J Biol Chem **274**(36): 25945-25952.

- Wang, D. S., Dickson, D. W. et Malter, J. S. (2006). "beta-Amyloid degradation and Alzheimer's disease." J Biomed Biotechnol **2006**(3): 58406.
- Wang, J. F., Lu, R. et Wang, Y. Z. (2010). "Regulation of beta cleavage of amyloid precursor protein." Neurosci Bull **26**(5): 417-427.
- Wenk, G. L. (2003). "Neuropathologic changes in Alzheimer's disease." J Clin Psychiatry **64 Suppl 9**: 7-10.
- Williamson, J., Goldman, J. et Marder, K. S. (2009). "Genetic aspects of Alzheimer disease." Neurologist **15**(2): 80-86.
- Willnow, T. E., Carlo, A. S., Rohe, M. et Schmidt, V. (2010). "SORLA/SORL1, a neuronal sorting receptor implicated in Alzheimer's disease." Rev Neurosci **21**(4): 315-329.
- Wirhbs, O., Multhaup, G. et Bayer, T. A. (2004). "A modified beta-amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the beta-amyloid peptide--the first step of a fatal cascade." J Neurochem **91**(3): 513-520.
- Yang, A. J., Chandswangbhuvana, D., Margol, L. et Glabe, C. G. (1998). "Loss of endosomal/lysosomal membrane impermeability is an early event in amyloid Abeta1-42 pathogenesis." J Neurosci Res **52**(6): 691-698.
- Yang, M. et Teplow, D. B. (2008). "Amyloid beta-protein monomer folding: free-energy surfaces reveal alloform-specific differences." J Mol Biol **384**(2): 450-464.
- Yankner, B. A. et Lu, T. (2009). "Amyloid beta-protein toxicity and the pathogenesis of Alzheimer disease." J Biol Chem **284**(8): 4755-4759.
- Zhang, Y. W., Thompson, R., Zhang, H. et Xu, H. (2011). "APP processing in Alzheimer's disease." Mol Brain **4**: 3.
- Zhi, P., Chia, C. et Gleeson, P. A. (2011). "Intracellular trafficking of the beta-secretase and processing of amyloid precursor protein." IUBMB Life **63**(9): 721-729.