

Université de Sherbrooke

Les HDL et la PON1 dans la maladie d'Alzheimer

Par
Camponova Paméla
Programme de Physiologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de philosophiae doctor (Ph.D.) en Physiologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Avril, 2017

Membres du jury d'évaluation

Directeur du programme : Pr. Ahmed Chraïbi, programme de physiologie
Directeur de recherche : Pr. Abdelouahed Khalil, programme de physiologie
Co-directeur : Pr. Tamas Fulop, programme d'immunologie
Membre externe au programme : Pr. Xavier Roucou, programme de biochimie
Membre externe à l'université : Pr. Charles Ramassamy, Centre INRS–Institut Armand-Frappier, Laval

© Camponova Paméla, 2017

« Tout ce que je sais, c'est que je ne sais rien, tandis que les autres croient savoir ce qu'ils ne savent pas. »

Socrate

RESUME

Les HDL et la PON1 dans la maladie d'Alzheimer

Par

Camponova Paméla

Programme de physiologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de philosophiae doctor (Ph.D.) en physiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

La maladie d'Alzheimer (MA) touche environ 35 millions de personnes à travers le monde ce qui en fait la première forme de démence. Le principal facteur de risque de cette maladie est l'âge et donc, avec l'augmentation de l'espérance de vie, on pense que ce nombre va doubler d'ici 2025. C'est donc un problème de santé publique. Le mécanisme à l'origine de la MA n'est pas connu, et il n'existe aucun traitement permettant de guérir ou de ralentir efficacement l'évolution des symptômes. Il est donc urgent de mieux comprendre cette maladie afin de proposer aux patients des traitements efficaces. Certaines études épidémiologiques ont montré que l'hypercholestérolémie est un facteur de risque pour la MA. A l'inverse, la prise de statines diminuerait les risques de développer cette maladie. De plus, des études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont montré que le cholestérol peut favoriser la production des peptides amyloïdes qui sont à l'origine de la formation des plaques, caractéristiques de la MA. Enfin, certaines études ont montré qu'une baisse des niveaux de HDL peut être un facteur de risque pour la MA. Tous ces résultats nous amènent à penser que le métabolisme du cholestérol puisse être altéré dans la MA. La PON1 est une enzyme associée aux HDL. Elle possède des propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes. Certaines études ont montré que son activité est réduite dans la MA, et que certains de ses polymorphismes sont associés à cette maladie. La PON1 pourrait donc jouer un rôle dans la MA. Mon projet de thèse a pour but d'investiguer si l'efflux du cholestérol est altéré dans la MA, et de comprendre le mécanisme à l'origine de cette éventuelle altération. Il vise également à étudier la PON1 dans la MA. Nos résultats montrent que l'efflux du cholestérol est diminué dans la MA. Cette baisse est due à une perturbation de la fonctionnalité des HDL et non, à une baisse de l'expression du transporteur ABCA1 qui est impliqué dans la première étape de l'efflux du cholestérol. Nos résultats suggèrent que la baisse de fonctionnalité des HDL soit due à leur oxydation, et à une altération de leur structure. Notre étude montre que l'activité paraoxonase est réduite de manière non significative dans la MA supposant donc, une légère baisse de la fonctionnalité de la PON1. De plus, les polymorphismes 192Q/R et 55L/M de la PON1 ne sont pas associés à cette maladie. Enfin, nos résultats montrent que les HDL des personnes Alzheimer sont plus sensibles à l'oxydation probablement du fait d'une baisse de la fonctionnalité de la PON1. En conclusion, dans la MA, les HDL sont oxydés et leur structure est altérée ce qui entraîne une baisse de l'efflux du cholestérol. Une altération de la fonctionnalité de la PON1 pourrait expliquer, en partie, la sensibilité des HDL à l'oxydation.

Mots-clés : MA, cholestérol, HDL, efflux du cholestérol, PON1, peptides amyloïdes

Table des matières

Résumé.....	III
Table des matières.....	IV
Liste des figures.....	VI
Liste des tableaux.....	VIII
Liste des abréviations.....	IX
Introduction.....	1
I. La maladie d’Alzheimer	2
1) Forme familiale vs. forme sporadique de la maladie d’Alzheimer.....	3
2) Symptômes et diagnostic de la maladie d’Alzheimer.....	4
3) Pathophysiologie de la maladie d’Alzheimer.....	5
a) Les plaques amyloïdes.....	5
b) Les dégénérescences neurofibrillaires.....	8
4) Traitements.....	11
II. Cholestérol et maladie d’Alzheimer.....	12
1) Le cholestérol.....	13
2) Relation entre le cholestérol et la maladie d’Alzheimer.....	15
III. Le transport du cholestérol.....	22
1) Transport du cholestérol dans le système nerveux central.....	22
2) Le transport du cholestérol en périphérie.....	27
3) Efflux du cholestérol et maladie d’Alzheimer.....	29
IV. Les HDL.....	33
1) Généralités sur les HDL.....	33
2) HDL et maladie d’Alzheimer.....	39
V. Rôle de la PON1 dans la maladie d’Alzheimer.....	40
1) Généralités sur la PON1.....	41
2) La PON1 dans la MA.....	43
VI. Projet de recherche.....	46
1) Hypothèses.....	46
2) Objectifs.....	48
Article 1.....	49
Partie 2 : Etude de la PON1 dans la MA.....	81
I. Hypothèse et objectif.....	81

II. Matériel et méthodes.....	81
1) Recrutement des sujets.....	81
2) Collecte des échantillons biologiques (sang et plasma).....	82
3) Préparation des HDL.....	82
4) Expression et purification de la Paraoxonase recombinante humaine (PON1r).....	83
5) Mesure de l'activité PON1 plasmatique.....	83
6) Génotypage de la PON1.....	84
7) Mesure de l'efflux du cholestérol.....	85
8) Oxydation et mesure de l'état d'oxydation des HDL.....	86
9) Analyses statistiques.....	86
III. Résultats.....	87
1) Activité PON1 plasmatique.....	87
2) Le polymorphisme 192Q/R de la PON1 et la MA.....	89
3) Le polymorphisme 55L/M de la PON1 et la MA.....	90
4) Effet de la PON1 sur l'efflux du cholestérol réalisé par les HDL.....	93
5) Effet de la PON1 sur l'état d'oxydation des HDL.....	94
Discussion.....	97
Conclusion et perspectives.....	110
Remerciements.....	113
Liste des références.....	114

Liste des figures

Introduction :

Figure 1 : Clivage de la protéine APP selon les voies amyloïdogénique et non-amyloïdogénique.....	7
Figure 2 : Stabilisation des microtubules par la protéine tau.....	10
Figure 3 : Biosynthèse du cholestérol.....	14
Figure 4 : Localisation des sécrétases au niveau de la membrane plasmique.....	17
Figure 5 : Transport du cholestérol dans le SNC.....	24
Figure 6 : Homéostasie du cholestérol cellulaire.....	26
Figure 7 : Efflux du cholestérol et remodelage des HDL.....	29
Figure 8 : Structure des particules HDL.....	35

Article 1 :

Figure 1 : Alteration of cholesterol efflux in patients with cognitive decline is not caused by a decrease in the expression of the ABCA1 transporter.....	62
Figure 2 : Alteration of HDL-mediated cholesterol efflux in Alzheimer's disease patients.....	63
Figure 3 : Effect of cognitive decline on the oxidation states of proteins and lipids in the plasma.....	65
Figure 4 : Effect of cognitive decline on the oxidation states of proteins and lipids in the HDL.....	66
Figure 5 : Effect of cognitive decline on HDL fluidity.....	68
Figure 6 : Effect of A β 42 on HDL fluidity.....	70
Figure 7 : Effect of A β on cholesterol efflux.....	71

Partie 2 :

Figure 1 : Activité PON1 dans le plasma des sujets.....	87
Figure 2 : Activité PON1 plasmatique en fonction du polymorphisme 192Q/R.....	88
Figure 3 : Activité PON1 plasmatique en fonction du polymorphisme 55L/M.....	92
Figure 4 : Effet de la PON1 recombinante humaine sur l'efflux du cholestérol réalisé par les HDL.....	93
Figure 5 : Effet de la PON1 recombinante humaine sur l'état d'oxydation des HDL...	95

Liste des tableaux

Tableau 1 : Fasting plasma lipid parameters and Mini Mental State Examination (MMSE) scores of participating individuals.....	60
Tableau 2 : Polymorphisme 192Q/R de la PON1 dans la MA.....	89
Tableau 3 : Polymorphisme 55L/M de la PON1 dans la MA.....	91

Liste des abréviations

ABCA1 :	ATP-binding cassette transporter sub-family A member 1
ABCG1 :	ATP-binding cassette transporter sub-family G member 1
AMPc :	Adénosine monophosphate cyclique
ACAT1 :	Acetyl-CoA Acetyltransferase 1
APP :	Amyloid precursor protein
Apo :	Apolipoprotéine
BACE1 :	Beta-Site APP-Cleaving Enzyme 1
CE :	Cholestérol estérifié
CETP :	Cholesteryl ester transfer protein
CTF :	C-terminal fragment
CYP27A1 :	Cytochrome P450 family 27 subfamily A member 1
CYP46A1 :	Cytochrome P450 family 46 subfamily A member 1
FC :	Free cholesterol
HDL :	High density lipoprotein
HMG coA :	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A
HPLC :	High performance liquid chromatography
IDL :	Intermediate-density lipoproteins
LCAT :	Lecithin-cholesterol acyltransferase
LDL :	Low density lipoprotein
LE :	Lipase endothéliale
LH :	Lipase hépatique
LPS :	Lipopolysaccharide
LDLR :	Low density lipoprotein receptor
LRP :	LDL receptor-related protein
Lyso PC :	Lysophosphatidylcholine
MA :	Maladie d'Alzheimer
MβCD :	Methyl-bêta-cyclodextrin
MCI :	Mild cognitive impairment
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MDA :	Malondialdehyde
MFI :	Mean fluorescence intensity
MMSE :	Mini mental state examination
NPC :	Niemann-Pick de type C
PBMC :	Peripheral Blood Mononuclear Cells
Peptides Aβ :	Peptides amyloïdes bêta
PHF :	Paired helical filament
PL :	Phospholipides
PLTP :	phospholipid transfer protein
PON :	Paraoxonase
PS1 :	Préséniline 1
PS2 :	Préséniline 2
ROS :	Reactive oxygen species
SNC :	Système nerveux central
SNP :	Single Nucleotide Polymorphisme
SR-B1 :	Scavenger receptor class B type I
TG :	Triglycérides
VLDL :	Very low density lipoprotein

Introduction

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative qui touche environ 35 millions de personnes à travers le monde ce qui en fait la première forme de démence (=Troubles neurocognitifs majeurs). Au Québec, cette maladie concerne plus de 100 000 personnes (source : La société Alzheimer de Québec). Le principal facteur de risque de cette maladie est l'âge et donc, avec l'augmentation de l'espérance de vie, on pense que son incidence va doubler d'ici 2025. Cette maladie est un problème de santé publique, c'est pourquoi il est important de comprendre les mécanismes à l'origine de cette pathologie afin de mettre au point des traitements efficaces.

Il existe d'autres facteurs de risque de la MA comme le sexe (les femmes sont plus touchées que les hommes), l'hypertension artérielle, les carences alimentaires, le diabète de type 2 et l'hypercholestérolémie. Des études épidémiologiques ont montré que l'hypercholestérolémie augmente les risques de développer la forme sporadique de la MA (Xue-Shan *et al.*, 2016). De plus, des études réalisées *in vivo* chez la souris ont montré qu'un régime riche en cholestérol conduit à une accumulation de plaques amyloïdes (une des caractéristiques de la MA) dans leur cerveau (Refolo *et al.*, 2000). Le métabolisme du cholestérol pourrait donc être impliqué dans le développement de la MA.

L'efflux du cholestérol correspond au transfert (ou transport) du cholestérol de l'intérieur vers l'extérieur des cellules. L'efflux du cholestérol à partir des cellules constitue la première étape dans le processus menant au maintien de l'homéostasie du cholestérol cellulaire. Des études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont montré que le cholestérol régule l'activité des sécrétases ; des enzymes impliquées dans la synthèse des peptides amyloïdes (Allinquant *et al.*, 2014). Ces derniers sont à l'origine de la formation des plaques séniles retrouvées dans le cerveau des personnes atteintes de la MA. Ainsi, une perturbation de l'homéostasie du cholestérol, induite par une altération du mécanisme d'efflux du cholestérol, pourrait participer au développement de la MA.

L'efflux du cholestérol est réalisé par les particules HDL (High Density Lipoprotein) via l'implication de l'apolipoprotéine A1, une protéine caractéristique des

HDL. Toutefois, des études récentes (Berrougui *et al.*, 2012) montrent qu'une autre protéine (la Paraoxonase 1), associée exclusivement aux HDL, est impliquée dans cet efflux du cholestérol. D'autres études ont établi une implication de cette protéine dans les démences et plus particulièrement, dans la MA (Menini et Gugliucci, 2014). Nous pouvons donc penser qu'une altération de la fonctionnalité des HDL puisse conduire à une altération de l'homéostasie du cholestérol et ainsi, contribuer au développement de la MA.

La présente étude porte sur le rôle de l'efflux du cholestérol dans la forme sporadique de la MA et plus particulièrement, sur la fonctionnalité des HDL. Elle vise également à vérifier l'implication de la Paraoxonase 1 dans le développement de cette maladie. En effet, les études portant sur le sujet donnent des résultats contradictoires.

I. La maladie d'Alzheimer

En 1906, Aloïs Alzheimer a décrit le cas de sa patiente, Auguste D., âgée de 51 ans et internée à l'hôpital de Frankfurt par son mari en raison de ses troubles du comportement (perte de mémoire, jalousie exacerbée, désorientation, déplacement d'objet, changement de personnalité et, changement d'humeur). Au cours de son internement, les symptômes évolueront vers une perte de mémoire plus prononcée, des problèmes de compréhension, des hallucinations, des pensées délirantes, des problèmes d'écriture, de langage et de lecture. Elle décèdera 4 ans et demi après son internement. Elle passera ses derniers instants allongée sur son lit en position foetale et incontinente. L'analyse *post-mortem* de son cerveau permettra à Aloïs Alzheimer de mettre en évidence la présence de neurofilaments à l'intérieur des neurones, appelés également, enchevêtrements neurofibrillaires, et de plaques séniles ou plaques amyloïdes à l'extérieur des neurones. Ces deux altérations pathologiques sont caractéristiques de la MA et permettent un diagnostic *post-mortem* formel de la maladie (Alzheimer *et al.*, 1995 ; Möller et Graeber, 1998).

Le terme de MA a été employé pour la première fois, en 1910, par Emil Kraepelin dans son *Traité de Psychiatrie* (Maurer *et al.*, 1997 ; Strassnig et Ganguli, 2005 ; Cipriani *et al.*, 2011).

1) **Forme familiale vs. forme sporadique de la maladie d'Alzheimer**

Il existe deux formes de la MA: la forme familiale et la forme sporadique. La forme familiale représente seulement 5 à 8 % des cas de MA et elle se transmet selon le mode autosomale dominant. Elle apparaît avant l'âge de 65 ans c'est pourquoi on parle de MA à début précoce. Les mutations responsables de la forme familiale de la maladie touchent les gènes codant pour les protéines suivantes : Amyloid Protein Precursor (APP), Préséniline 1 (PS1) et Préséniline 2 (PS2) (Selkoe, 2001 ; Chartier-Harlin *et al.*, 2002).

La protéine APP est à l'origine de la formation des peptides amyloïdes 40 et 42 (A β 40 et A β 42). Dans les circonstances physiologiques, l'APP est clivée par l' α -sécrétase et c'est la voie non-amyloïdogénique. La voie amyloïdogénique fait appel au clivage par la β -sécrétase suivie par la γ -sécétase. La présence de mutations dans le gène codant pour cette protéine conduit à la surproduction d'un peptide neurotoxique ; le A β 42 composant principal des plaques séniles (Selkoe, 2001).

Les protéines PS1 et PS2 font partie du complexe γ -sécrétase dont le rôle est de cliver la protéine APP pour permettre ou non la production du peptide A β . Les mutations présentes dans les gènes *PS1* et *PS2* conduisent à une augmentation de l'activité γ -sécrétase ou au clivage d'APP en faveur de la production des peptides amyloïdes notamment A β 42 (Selkoe, 2001).

La forme sporadique de la MA représente environ 90 % des cas de MA. Elle apparaît après l'âge de 65 ans c'est pourquoi on parle de forme tardive de la MA. Le principal facteur de risque de la forme sporadique de la MA est l'âge.

Le gène codant pour l'apolipoprotéine E (ApoE) est également associé à la forme sporadique de la MA (Saunders *et al.*, 1993 ; Strittmatter *et al.*, 1993). L'Apo E est la principale apolipoprotéine du cerveau. Elle est associée aux HDL (High Density Lipoprotein), et elle est impliquée dans le transport du cholestérol et dans l'élimination des A β . Le gène codant pour l'Apo E, présent sur le chromosome 19, existe sous 3 formes : ApoE ϵ 2, ApoE ϵ 3 et ApoE ϵ 4. Ces formes diffèrent par leurs positions 112 et 158. Ainsi, l'ApoE ϵ 2 présente une cystéine en position 112 et une cystéine en position 158, l'ApoE ϵ 3 présente une cystéine en position 112 et une arginine en position 158,

l'ApoE ϵ 4 présente une arginine en position 112 et une arginine en position 158. Les porteurs de l'allèle ϵ 4 sont plus à risque de développer la MA que les porteurs des allèles ϵ 2 ou ϵ 3 (Chartier-Harlin *et al.*, 2002 ; Michaelson, 2014) probablement parce que l'isoforme Apo ϵ 4 réalise moins efficacement l'efflux de cholestérol (Michikawa *et al.*, 2000 ; Gong *et al.*, 2002 ; Minagawa *et al.*, 2009), parce que l'isoforme Apo ϵ 4 interagit moins efficacement avec les A β que l'isoforme Apo ϵ 3 (Ladu *et al.*, 1994 ; Ladu *et al.*, 1995) et enfin parce que l'isoforme Apo ϵ 4 élimine moins efficacement les A β (Castellano *et al.*, 2011).

2) Symptômes et diagnostic de la maladie d'Alzheimer

Les premiers signes de la MA sont : une perte légère de mémoire qui n'attire pas l'attention (souvent associée à un vieillissement normal) présentant la forme de « Mild cognitive impairment » ou trouble neurocognitif léger (TNC). Dans 50% des cas, dans une période de 3 ans, ces troubles progressent vers la démence avec apparition des troubles fonctionnels liés à la perte de mémoire. Au cours de l'évolution de la maladie, d'autres symptômes apparaissent comme l'aphasie (perturbation du langage), l'apraxie (altération de la capacité à réaliser des activités motrices), l'agnosie (impossibilité de reconnaître ou d'identifier des objets) et les perturbations des fonctions exécutives (faire des projets, avoir une pensée abstraite etc...). De plus, la perte de mémoire est plus sévère. A un stade avancé de la maladie, le patient présente des troubles du comportement, de la marche et des troubles moteurs. Il devient incapable de communiquer. Il s'écoule en moyenne entre 8 et 10 ans entre l'apparition des premiers symptômes et la mort du patient (McKhann *et al.*, 1984).

Le diagnostic probable d'une MA se fait essentiellement sur la base des symptômes et sur l'exclusion d'autres pathologies qui peuvent être à l'origine d'une démence (par exemple : carence en vitamine B12, neurosyphilis, hypothyroïdie etc...). Des tests cognitifs sont utilisés par les praticiens pour évaluer les fonctions cognitives du patient. Parmi ces tests, le Mini Mental State Examination (MMSE ou test de Folstein) est le plus utilisé. Il est composé de 18 questions et dure environ 5 minutes. Il a pour but de tester la capacité du patient à s'orienter dans l'espace et dans le temps, de tester sa

capacité d'apprentissage, de calcul, d'attention et de mémorisation. Il vise également à évaluer le langage et les praxies constructives. A l'issue de ce test, un score est attribué au patient (score compris entre 0 et 30) et permet de déterminer si l'individu souffre de problème cognitif et le degré de ce déclin cognitif (léger, modéré, sévère) (Folstein *et al.*, 1975). Une IRM cérébrale peut être réalisée pour appuyer le diagnostic. Au stade précoce de la maladie, une atrophie de l'hippocampe sera observée et à un stade plus avancé, on pourra également observer une atrophie des régions corticales et sous corticales. Toutefois, pour un diagnostic formel de la MA, une autopsie du patient devra être réalisée pour mettre en évidence la présence des plaques séniles et des enchevêtrements neurofibrillaires (Musicco *et al.*, 2004). Néanmoins, dernièrement avec les PET amyloïde (e.g. PET-PIB), on est capable de mettre en évidence les dépôts de peptides bêta amyloïde dans le cerveau *in vivo* (Witte *et al.*, 2015).

3) Pathophysiologie de la maladie d'Alzheimer

Les deux caractéristiques de la MA sont la formation des plaques amyloïdes ou plaques séniles à l'extérieur des neurones, et la présence d'enchevêtrements neurofibrillaires à l'intérieur des neurones encore appelés, dégénérescences neurofibrillaires. Les caractéristiques biochimiques de ces deux lésions à savoir, la présence du peptide amyloïde dans les plaques séniles et la présence de la protéine tau hyperphosphorylée dans les dégénérescences neurofibrillaires, ont été définies dans le milieu des années 80 (Glennner et Wong, 1984 ; Brion *et al.*, 1985).

a) Les plaques amyloïdes

Les plaques amyloïdes sont principalement constituées par les peptides A β 40 et A β 42. La protéine APP est le précurseur de la production des peptides amyloïdes. Le gène codant pour APP est situé sur le chromosome 21 et des mutations de ce gène sont responsables de la forme familiale de la MA. Ces mutations permettent le clivage de la protéine APP préférentiellement en faveur de la production des peptides A β et notamment d'A β 42. L'identification de ces mutations a permis de mettre au point des

modèles de souris exprimant une protéine APP humaine mutée et qui surproduisent les peptides A β ou uniquement le peptide A β 42. Ces souris sont caractérisées par un déclin cognitif et présentent une accumulation de plaques amyloïdes dans leur cerveau. Elles sont utilisées comme modèle de la MA (Balducci et Forloni, 2011).

La protéine APP est synthétisée dans le réticulum endoplasmique et elle est transportée vers l'appareil de Golgi pour rejoindre la membrane plasmique. Dans l'appareil de Golgi, la protéine APP subit des modifications post-traductionnelles (Claeysen *et al.*, 2012). Elle peut également rencontrer l' α -sécrétase dont l'activité principale se trouve associée à la membrane plasmique. L'appareil de Golgi renferme également une activité β -sécrétase. Cependant, de nombreuses études considèrent que le site principal de l'activité β -sécrétase est l'endosome tardif. Le transport de la protéine APP de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique favorise donc son clivage par la voie non-amyloïdogénique (Définie ci-dessous). Une altération de ce transport peut donc conduire à une augmentation de la production des A β . Une fois insérée à la membrane plasmique, la protéine APP peut être endocytosée via un mécanisme dépendant de la clathrine (Claeysen *et al.*, 2012). La β -sécrétase peut être endocytosée par une autre voie contrôlée par ARF6 (ADP Ribosylation Factor 6) (Claeysen *et al.*, 2012). Les protéines APP et β -sécrétase peuvent donc se rencontrer dans les endosomes précoces. L'activité γ -sécrétase est détectée dans les endosomes tardifs et dans les lysosomes. L'internalisation de la protéine APP peut donc conduire à une augmentation de la production des A β . L'endocytose de la protéine APP peut être inhibée par son ubiquitination (Claeysen *et al.*, 2012). Il faut savoir que la protéine APP peut être transportée des endosomes vers l'appareil de Golgi permettant ainsi une baisse de la production des A β (Claeysen *et al.*, 2012). Ce transport nécessite l'interaction de SorLA (Sorting protein-related receptor with A-type repeats) avec le complexe retromer. Inversement, la protéine APP peut être transportée de l'appareil de Golgi vers les endosomes via les protéines GGA (Golgi-localized, gamma ear-containing, ADP ribosylation factor-binding proteins) ou le complexe AP-4 (Adaptor protein 4) ce qui entraîne une augmentation de la production des A β (Claeysen *et al.*, 2012).

La protéine APP est clivée selon deux voies : une voie non-amyloïdogénique et une voie amyloïdogénique (Figure 1).

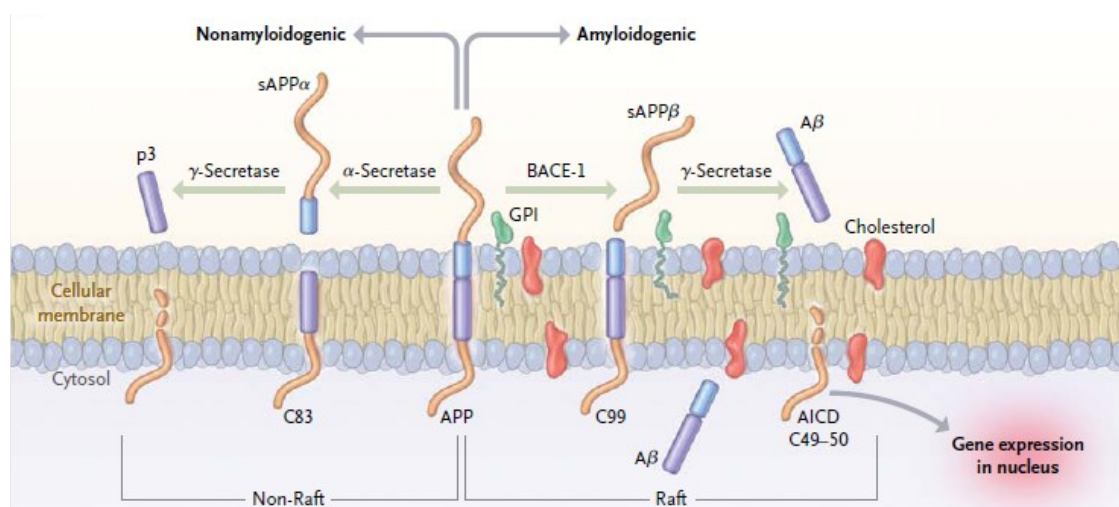


Figure 1 : Clivage de la protéine APP selon les voies amyloïdogénique et non-amyloïdogénique.

Reproduced with permission from (Querfurth et LaFerla, 2010), Copyright Massachusetts Medical Society.

La voie non-amyloïdogénique ne conduit pas à la formation des peptides A β et par conséquent elle n'est pas considérée comme pathogène. La protéine APP est clivée par une α -sécrétase ce qui conduit à la formation d'un peptide de 83 acides aminés appelé C83. Ce peptide est transmembranaire et correspond à l'extrémité C-terminale de la protéine APP. Ce clivage permet la libération dans le milieu extracellulaire d'un APP α soluble (Selkoe, 2001).

Le fragment C83 est clivé par le complexe multi-protéique γ -sécrétase. Ce dernier est constitué par les protéines suivantes : présénilines 1 et 2 (PS1 et PS2), la nicastrine, APH-1 (Anterior PHarynx defective one) et Presenilin Enhancer 2 (PEN2) (De Strooper, 2003). Ce clivage conduit à la production d'un fragment AICD (Amyloid IntraCellular Domain) qui est intra-membranaire et permet la libération, dans le milieu extracellulaire, d'un peptide de 3 acides aminés appelé P3. Le rôle physiologique des différents peptides générés n'a pas été clairement identifié (Selkoe, 2001).

La voie amyloïdogénique conduit à la production des peptides A β notamment A β 40. Cette voie est donc considérée comme pathogène. La protéine APP est coupée par une β -sécrétase ce qui conduit à la formation d'un fragment intra-membranaire de 99 acides

aminés appelé C99 et à la libération, dans le milieu extracellulaire, d'un APP β soluble. Le fragment C99 est clivé par le complexe γ -sécrétase ce qui conduit à la formation des peptides amyloïdes et d'un fragment AICD. Des études ont montré que le fragment AICD peut interagir avec la protéine adaptatrice Fe65 et l'histone acetyltransferase TIP60 pour réguler l'expression de nombreux gènes qui n'ont pas tous été identifiés (Cao et Sudhof, 2001 ; Nalivaeva et Turner, 2013). AICD régule, entre autres, l'expression d'APP, de la β -sécrétase, de la Stathmin 1 (protéine régulatrice importante de la dynamique des microtubules), de gènes impliqués dans le contrôle de la mort cellulaire et la dégradation des A β (Slomnicki et Lesniak, 2008 ; Pardossi-Piquard et Checler, 2012 ; Müller *et al.*, 2013 ; Nalivaeva et Turner, 2013). Des études ont également montré qu'AICD est capable d'activer la protéine GSK-3 β qui est impliquée dans la phosphorylation de la protéine tau, d'induire l'apoptose par un mécanisme dépendant de la protéine P53 et d'inhiber la voie de signalisation Wnt suggérant ainsi son rôle dans la régulation de la différenciation et la prolifération des cellules neuronales (Ozaki *et al.*, 2006 ; Slomnicki et Lesniak, 2008 ; Zhu *et al.*, 2012). Le clivage par le complexe γ -sécrétase étant très hétérogène, il permet la production de diverses espèces de peptides A β ayant une taille comprise entre 39 et 43 acides aminés. Le peptide majoritairement produit est le peptide A β 40. Le peptide A β 42 est une forme minoritaire cependant, il est considéré comme plus neurotoxique car il est plus insoluble et plus sujet à l'oligomérisation (Selkoe, 2001).

Pour la formation des plaques amyloïdes, les peptides A β doivent s'oligomériser puis former des proto-fibrilles. Pour cela, ils doivent passer d'une structure en hélice α à une structure en feuillet β (Querfurth et Laferla, 2010).

Les plaques amyloïdes sont présentes principalement dans les régions limbiques du cerveau comme l'hippocampe et le complexe amygdalien, mais également dans des régions corticales et sous-corticales spécialisées (Selkoe, 2001).

b) Les dégénérescences neurofibrillaires

Les dégénérescences neurofibrillaires sont constituées par l'accumulation de fibrilles à l'intérieur des neurones. Ces fibrilles sont composées de filaments appelés

paires de filaments appariés en hélice (PHF pour paired helical filament). Ces PHF sont constitués d'agrégats de protéines tau hyperphosphorylées (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986).

Les pathologies qui se caractérisent par la présence de dégénérescences neurofibrillaires sont appelées des tauopathies. En dehors de la MA, il existe d'autres tauopathies comme la trisomie 21 ou syndrome de Down, certains syndromes parkinsoniens, certaines démences fronto-temporales et la maladie de Steinert (dystrophie musculaire). La distribution cérébrale et le type cellulaire affecté sont spécifiques d'une pathologie. Ainsi, dans la MA, les dégénérescences neurofibrillaires touchent uniquement les neurones pyramidaux (Lovestone, 2000 ; Buée et Delacourte, 2002).

La protéine tau appartient à la famille des MAP pour microtubule-associated-proteins. Ces protéines sont exprimées principalement au niveau des neurones et sont impliquées dans la polymérisation des microtubules. La protéine tau est codée par un gène présent sur le chromosome 17. Il existe 6 isoformes de la protéine tau. 3 isoformes possèdent 3 domaines de liaison aux microtubules et 3 isoformes possèdent 4 domaines de liaison aux microtubules (Lovestone, 2000 ; Buée et Delacourte, 2002).

La protéine tau interagit avec la tubuline par l'intermédiaire de son domaine C-terminal composé de séquences répétées (environ 80 résidus sérine et thréonine dont une 20^{aine} capables d'être phosphorylés) ce qui permet la polymérisation de la tubuline et la formation des microtubules (Figure 2) (Lovestone, 2000 ; Buée et Delacourte, 2002).

La phosphorylation de la protéine tau permet de diminuer son affinité pour les microtubules et ainsi permet la dépolymérisation de ces derniers (Figure 2). Les protéines capables de phosphoryler tau sont, entre autres, les protéines du groupe PDK (proline-directed protein kinase). Ce groupe est composé par les CDK (kinases dépendantes de cyclines), la GSK-3 β (glycogen synthase kinase -3) et les protéines de la famille des MAPK (mitogen-activated proteins). Ces enzymes sont capables de phosphoryler tau au niveau d'un résidu sérine ou thréonine suivis d'une proline (Lovestone, 2000 ; Buée et Delacourte, 2002).

La régulation de l'état de phosphorylation de la protéine tau se fait par un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation. La déphosphorylation de la protéine

tau est réalisée par les phosphatases 1, 2A et 2B (Lovestone, 2000 ; Buée et Delacourte, 2002).

La protéine tau est très abondante dans les axones des neurones et permet l'assemblage et la stabilité des microtubules. Elle participe au transport axonal qui est le processus par lequel les vésicules et les organelles sont transportés du corps cellulaire vers la partie distale des neurones. La protéine tau hyperphosphorylée a peu d'affinité pour les microtubules et s'agrège pour donner des PHF qui conduiront à la formation des dégénérescences neurofibrillaires (Figure 2) (Lovestone, 2000 ; Buée et Delacourte, 2002).

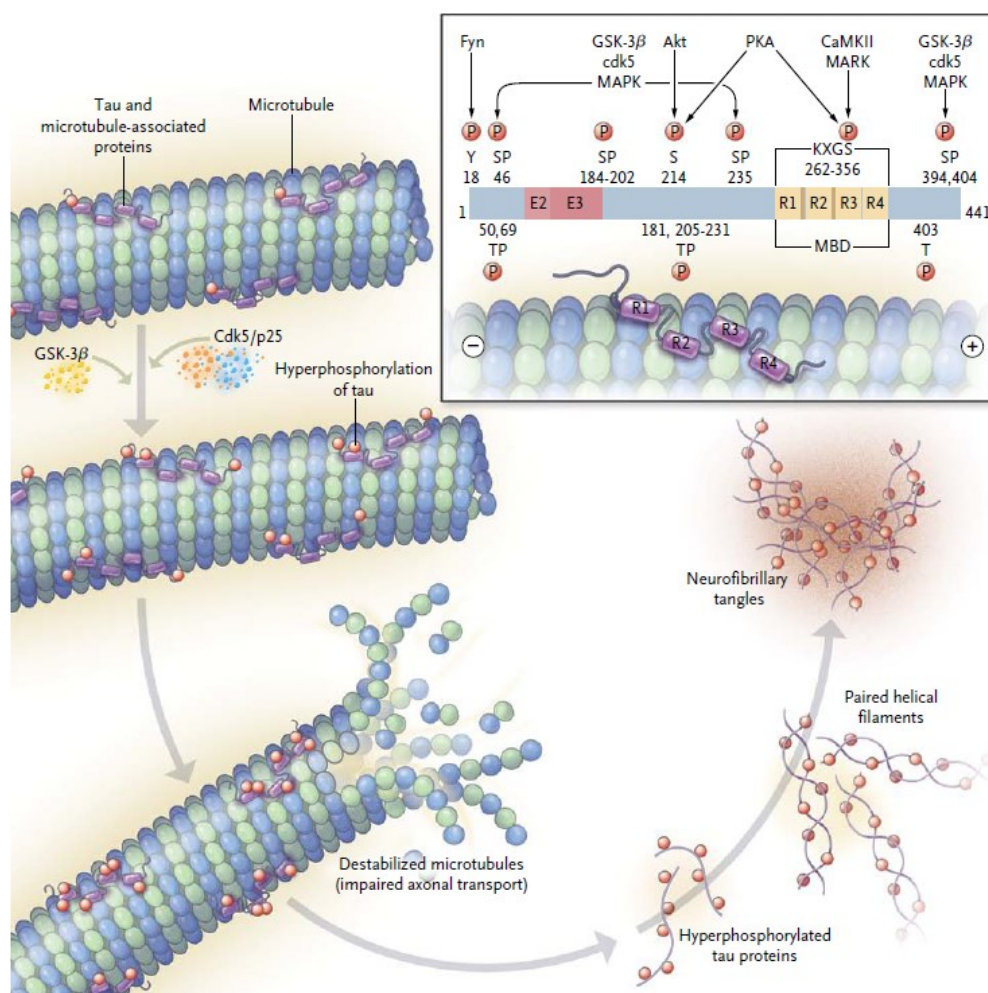


Figure 2 : Stabilisation des microtubules par la protéine tau.

La protéine tau est associée aux microtubules et permet leur stabilisation. Lorsqu'elle est hyperphosphorylée par les protéines GSK-3β ou CDK, elle va perdre son affinité pour les microtubules conduisant ainsi à leur déstabilisation. Le transport axonal va

donc être perturbé. Les protéines tau hyperphosphorylées vont s'associer pour donner des Paired helical filaments qui conduiront à la formation des dégénérescences neurofibrillaires. Reproduced with permission from (Querfurth et LaFerla, 2010), Copyright Massachusetts Medical Society.

Des études ont montré qu'il n'existe aucune relation entre le polymorphisme de la protéine tau et la forme tardive de la MA. Cependant, le nombre et la localisation des neurofibrilles sont caractéristiques de la sévérité de la MA (Lovestone, 2000 ; Buée et Delacourte, 2002).

4) Traitements

A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement permettant de guérir de la MA. En revanche, deux classes pharmacologiques de médicaments sont disponibles pour permettre de contrôler les symptômes et de retarder l'institutionnalisation. Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (donepézil, rivastigmine, galantamine) permettent d'empêcher la dégradation de l'acétylcholine dont les niveaux sont diminués dans la MA. Ils sont utilisés au stade léger, modéré et modérément sévère de la MA.

La mémantine est utilisée comme antagoniste du récepteur NMDA (N-méthyl-D-aspartique) du glutamate. Cet antagoniste permet d'éviter une suractivation du récepteur et donc, une excitotoxicité. La mémantine est utilisée au cours des stades modérés, modérément sévères et sévères de la MA. Toutes ces molécules permettent d'améliorer l'aspect clinique global du patient. En revanche, elles n'ont pas d'effet sur l'évolution de la maladie ni sur la mortalité.

Des psychotropes comme les antidépresseurs, les benzodiazépines et les neuroleptiques pourront être utilisés pour traiter les troubles du comportement. Enfin, des thérapies non médicamenteuses comme l'ergothérapie, l'orthophonie, l'aromathérapie, la musicothérapie etc... peuvent être utilisées pour stimuler les fonctions cognitives restantes afin d'améliorer la qualité de vie des patients.

Actuellement, de nouveaux traitements pour la MA sont en cours d'évaluation. Ainsi, des inhibiteurs des β -sécrétases, utilisés pour réduire la production des peptides

A β , sont en cours d'évaluation clinique. Il en est de même pour l'immunothérapie dirigée contre les peptides A β ou contre la protéine Tau dont le but est de réduire, respectivement, la formation des plaques amyloïdes et l'agrégation de la protéine Tau. Le stress oxydant et l'inflammation étant impliqués dans la MA, l'utilisation de molécules anti-oxydantes et anti-inflammatoires a été envisagée. Les essais cliniques réalisés pour tester les anti-oxydants suivants : vitamine C, vitamine E, coenzyme Q10, acide α -lipoïque, oméga-3 et sélénium ont donné des résultats plutôt décevants. Les études cliniques réalisées pour évaluer les effets des anti-inflammatoires non stéroïdiens pour le traitement de la MA n'ont pas montré de résultats concluants. Certains produits naturels ayant entre autres des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires ont été évalués pour leur utilisation dans le traitement de la MA. Ainsi, les polyphénols alimentaires comme la resvératrol, le curcumin et les catéchines de thé ont montré un intérêt thérapeutique au cours d'essais pré-cliniques. Les phytoestrogènes semblent intéressantes pour améliorer le déclin cognitif des patients atteints de la MA. De nombreuses études cliniques ont été réalisées pour tester l'utilisation du Ginkgo biloba dans la MA. Des méta-analyses regroupant les résultats de plusieurs essais cliniques ont montré que le Ginkgo peut potentiellement ralentir le déclin cognitif chez les patients atteints de la MA (Piau *et al.*, 2011 ; Geldenhuys et Darvesh, 2015).

II. Cholestérol et maladie d'Alzheimer

Les principaux facteurs de risque modifiables de la MA sont : le diabète, l'hypertension artérielle, l'obésité, le tabagisme, la dépression, le faible niveau d'instruction et l'inactivité physique (source : Société Alzheimer Canada).

De plus, des études épidémiologiques ont montré que l'hypercholestérolémie est un facteur de risque pour la forme sporadique de la MA (Xue-Shan *et al.*, 2016). En outre, des études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'activité des sécrétases, à l'origine de la production des peptides amyloïdes, est régulée par les niveaux de cholestérol plus particulièrement dans la membrane. Ainsi, une augmentation des niveaux de cholestérol cellulaire et membranaire, surtout au niveau des radeaux

lipidiques, conduirait à une augmentation des activités β et γ sécrétases et donc, à une augmentation de la production des peptides amyloïdes (Xue-Shan *et al.*, 2016). Il en résulterait une accumulation de plaques amyloïdes suggérant un lien entre le métabolisme du cholestérol et le développement de la MA.

1) Le cholestérol

Bien que le cerveau ne représente que 2 % du poids total du corps, il renferme environ 20 % du cholestérol corporel total (Mahley, 2016). Le cholestérol est donc un composé essentiel du système nerveux central (SNC). Le cholestérol périphérique est essentiellement synthétisé par le foie (80 %) mais il peut également être apporté par l'alimentation (20%). Du fait de son hydrophobicité, le cholestérol périphérique est incapable de traverser la barrière hémato-encéphalique ce qui oblige le SNC à synthétiser son propre cholestérol. Ce dernier est synthétisé, principalement, au niveau des astrocytes. La synthèse du cholestérol étant trop coûteuse en énergie, les neurones auraient transférés cette activité aux astrocytes afin de consacrer leur énergie à la transmission nerveuse. Cette synthèse met en jeu une vingtaine d'enzymes et débute par la condensation de deux molécules d'acétyl-CoA pour former de l'acétoacétyl-coenzyme A (Figure 3). Ce dernier réagit avec une nouvelle molécule d'acétyl-CoA pour former du HMG-CoA (β -hydroxy- β -méthyl-glutarylcoenzyme A). Le HMG-CoA formé est ensuite réduit par la HMG-CoA réductase en mévalonate. Cette étape étant limitante pour la synthèse du cholestérol, elle est la cible des statines dont le but est de réduire les niveaux de cholestérol plasmatique (hypolipémiant) pour le traitement des maladies cardiovasculaires. Après une succession de réactions, le mévalonate est transformé en squalène puis en cholestérol.

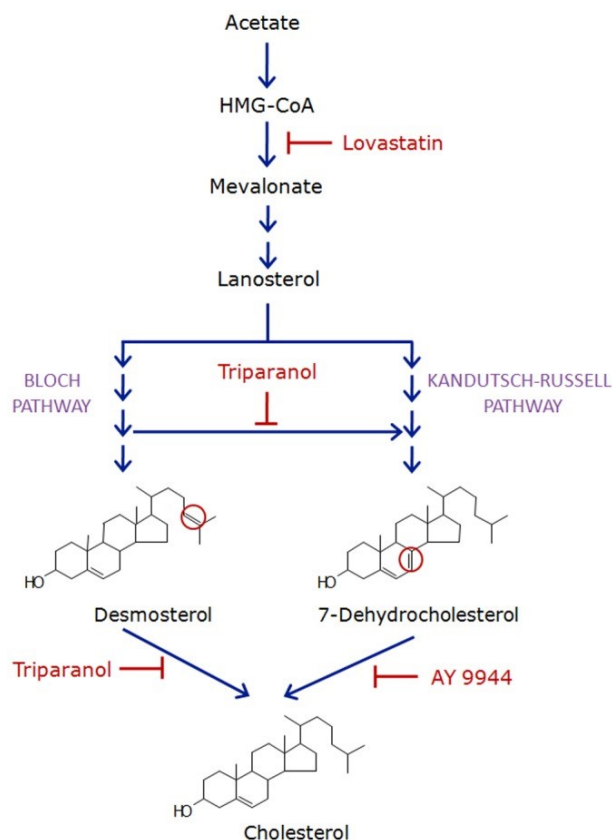


Figure 3 : Biosynthèse du cholestérol

Il existe deux voies de biosynthèse du cholestérol : la voie de Bloch et la voie de Kandutsch-Russell. Cependant, les premières étapes de biosynthèse du cholestérol sont communes aux deux voies. En effet, la synthèse débute par la réaction de l'acétoacétyl-coenzyme A avec une molécule d'acétyl-CoA ce qui permet la formation du HMG-coA. Le HMG-CoA formé est ensuite réduit par la HMG-CoA réductase en mévalonate. Après une succession de réaction, le mévalonate est transformé en lanostérol qui est le point de départ des voies de Bloch et de Kandutsch-Russell. Dans la voie de Bloch, la synthèse du cholestérol passe par la formation de desmostérol alors que dans la voie de Kandutsch-Russell, la synthèse du cholestérol passe par la formation de 7-déhydrocholestérol. Les statines comme la lovastatine sont des inhibiteurs compétitifs de la HMG-coA réductase et permettent de bloquer l'étape limitante de la biosynthèse du cholestérol. (Singh *et al.*, 2013)

Il est à noter qu'une faible quantité de cholestérol périphérique est capable de pénétrer dans le SNC sous forme d'oxystérol. En effet, le foie est capable de transformer le cholestérol en un composé plus hydrosoluble, le 27-hydroxycholestérol grâce à une enzyme, la CYP27A1. Ce composé peut traverser la barrière hémato-encéphalique pour rejoindre le cerveau où il est utilisé.

Un régime riche en cholestérol pourrait conduire à une altération de la barrière hémato-encéphalique contribuant ainsi à l'entrée du cholestérol périphérique dans le SNC. En effet, une étude a montré que la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique est augmentée chez les lapins qui ont reçu une alimentation riche en cholestérol (Jiang *et al.*, 2012). De plus, l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique serait perturbée chez les lapins néo-zélandais ayant reçu un régime riche en cholestérol du fait d'une baisse de l'expression des protéines des tight junction (Chen *et al.*, 2008a). Suite à l'altération de la barrière hémato-encéphalique, des composés neurotoxiques provenant du sang pourrait s'accumuler dans le cerveau et provoquer des perturbations neuronales. Tous ces événements pourraient participer au développement de la MA d'autant plus que le dysfonctionnement de la barrière hémato-encéphalique est un événement clé dans le développement et la progression de cette maladie (Xue-Shan *et al.*, 2016).

2) Relation entre le cholestérol et la maladie d'Alzheimer

L'importance de l'homéostasie du cholestérol pour le bon fonctionnement du système nerveux central a pu être mise en évidence par l'étude de la maladie de Niemann-Pick type C (NPC). Cette maladie est provoquée par des mutations autosomales récessives dans les gènes *Npc1* et *Npc2* codant pour des transporteurs intracellulaires du cholestérol. Ainsi, le transport du cholestérol et des lipides est altéré dans cette maladie ce qui entraîne une accumulation de cholestérol et de lipides dans les lysosomes. Il en résulte une baisse de la disponibilité membranaire de ces molécules et une diminution des précurseurs de la synthèse des stéroïdes. La maladie de NPC se caractérise essentiellement par une neurodégénérescence progressive ce qui indique que le cholestérol joue un rôle important dans le cerveau et pourrait être impliqué dans d'autres maladies neurodégénératives comme la MA.

Des études ont montré que le cholestérol est présent dans les plaques séniles matures selon un rapport d'une molécule de cholestérol pour une molécule de A β (Mori *et al.*, 2001 ; Panchal *et al.*, 2010). Ces études vont donc dans le sens d'une implication du cholestérol dans la MA. L'étude réalisée par Martins et ses collaborateurs suppose que

le cholestérol participerait à la transformation des fibrilles amyloïdes matures qui sont inertes en oligomères amyloïdes solubles qui sont toxiques (Martins *et al.*, 2008). Au sein des plaques séniles matures, le cholestérol pourrait donc agir comme une molécule permettant la re-solubilisation des A β , les rendant doublement toxiques.

L'implication du cholestérol dans la MA a été démontrée par des études réalisées *in vitro* et *in vivo* chez l'animal ainsi que par des études épidémiologiques. Les études réalisées *in vitro* et *in vivo* sont les plus convaincantes quant à la relation existante entre le cholestérol et la MA. A l'inverse, les études épidémiologiques réalisées sur le sujet donnent des résultats contradictoires qui peuvent être expliqués par la taille des échantillons, par les habitudes de vie des sujets, et par l'hétérogénéité du groupe de patients souffrant de la MA. En effet, ce groupe peut être composé de sujets présentant une MA au stade léger, modéré ou sévère. Au sein de la membrane plasmique, le cholestérol n'est pas distribué de manière homogène mais, il se concentre dans des domaines membranaires que l'on appelle : radeaux lipidiques. Ces derniers permettent, entre autres, de concentrer les molécules nécessaires à la transmission du signal. Des études ont montré que les sécrétases, impliquées dans le clivage de la protéine APP, peuvent être présentes ou non dans les radeaux lipidiques (Figure 4). Ainsi, les β et γ sécrétases sont préférentiellement localisées dans les radeaux lipidiques alors que l' α sécrétase est plutôt localisée en dehors des radeaux lipidiques (Figure 4) (Hicks *et al.*, 2012).

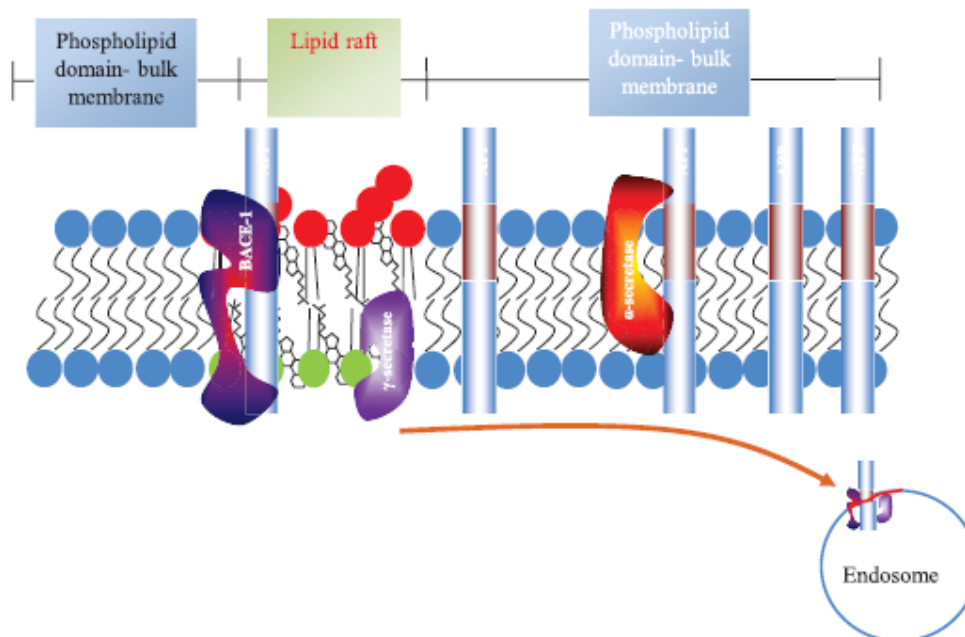


Figure 4 : Localisation des sécrétases au niveau de la membrane plasmique (Hicks *et al.*, 2012).

Le cholestérol étant une des composantes principales des radeaux lipidiques, son niveau membranaire pourrait avoir un effet sur l'activité des sécrétases et ainsi, favoriser la production des $A\beta$. Une étude réalisée *in vitro*, sur des neurones, a pu montrer qu'une augmentation des niveaux de cholestérol membranaire conduit à une localisation de la protéine APP préférentiellement dans les radeaux lipidiques et ainsi, permet un rapprochement entre APP et BACE-1 entraînant donc, une augmentation de la production des $A\beta$ (Marquer *et al.*, 2011). Les résultats de cette étude permettent de conclure que les niveaux de cholestérol membranaire peuvent réguler la production des $A\beta$ en favorisant le contact entre APP et les β -sécrétases plutôt qu'en agissant directement sur l'activité des sécrétases.

Une étude réalisée *in vitro*, sur des astrocytes, a montré que le traitement de ces cellules par du cholestérol conduit à une augmentation de la production du peptide C99 et du fragment $APP\beta$ soluble qui sont les produits de clivage de APP par les β -sécrétase (Avila-Munõz et Arias, 2015). Le cholestérol favoriserait donc le clivage amyloïdogénique de la protéine APP dans les astrocytes. Les auteurs montrent également que l'exposition des astrocytes à du cholestérol conduit à une augmentation de la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) lesquelles seraient

impliquées dans l'expression de APP. Le cholestérol pourrait donc agir à deux niveaux pour augmenter la production des A β . D'une part, il pourrait augmenter la production des ROS et ainsi augmenter l'expression d'APP et d'autre part, il pourrait favoriser l'interaction entre APP et BACE-1 favorisant ainsi le clivage amyloïdogénique d'APP.

Une étude réalisée sur des neurones en culture a montré qu'une augmentation de 30 % des niveaux de cholestérol membranaire, identique à celle observée dans le cerveau des personnes atteintes de la MA, conduit à des changements phénotypiques similaires à ceux observables à des stades précoces de la forme sporadique de la MA. A savoir : surproduction des A β 42, agrandissement des endosomes, déficit du transport vésiculaires et modification de l'expression des gènes (Marquer *et al.*, 2014).

La protéine APP possède un domaine de liaison au cholestérol et l'interaction d'APP avec le cholestérol pourrait favoriser le clivage amyloïdogénique de cette protéine (Barrett *et al.*, 2012). En effet, les auteurs supposent que l'interaction APP/cholestérol permettrait la localisation d'APP dans les radeaux lipidiques qui contiennent les β et γ -sécrétase favorisant ainsi le clivage amyloïdogénique. La liaison du cholestérol à APP pourrait également favoriser la reconnaissance de cette protéine par les sécrétases ou encore favoriser sa catalyse.

Le site de liaison d'APP au cholestérol est adjacent au site de clivage de l' α -sécrétase. De ce fait, le clivage par cette enzyme pourrait être réduit par la liaison du cholestérol à l'APP (Barrett *et al.*, 2012).

Une baisse de 70 % des niveaux de cholestérol cellulaire par la lovastatine ou le méthyl- β -cyclodextrine (M β CD) conduit à une inhibition de la production des A β (Simons *et al.*, 1998).

D'autres travaux ont montré que l'exposition des astrocytes à du cholestérol induit une baisse de la sécrétion de APP α et une diminution de la viabilité cellulaire suggérant que de fortes concentrations en cholestérol peuvent inhiber le clivage non-amyloïdogénique de APP et ainsi, induire une neurotoxicité (Xiu *et al.*, 2006). A l'inverse, le traitement des astrocytes par la lovastatine, dans le but de réduire les niveaux de cholestérol cellulaire, entraîne une augmentation de la production d'APP α et permet donc, de favoriser le clivage par l' α -sécrétase (Xiu *et al.*, 2006).

Le rôle du cholestérol dans la production des A β a été confirmé par une étude réalisée sur des plaquettes isolées à partir de sang humain (Shi *et al.*, 2011). Les plaquettes sont utilisées comme modèle cellulaire pour étudier le métabolisme d'APP car ces cellules expriment cette protéine et possèdent toute la machinerie enzymatique nécessaire à son clivage. Le β -sitostérol est le stérol de plante le plus commun. Il est utilisé pour réduire les niveaux de cholestérol cellulaire. Les résultats obtenus montrent que le β -sitostérol diminue l'activité des β et γ -sécrétase ainsi que la production des A β par les plaquettes en agissant sur la composition en cholestérol membranaire. Le β -sitostérol posséderait la même structure que le cholestérol et pourrait entrer en compétition avec lui pour s'intégrer à la membrane plasmique (Shi *et al.*, 2011). Ces résultats ont été confirmés par une étude réalisée sur des cellules d'hippocampe de souris. La substitution du cholestérol membranaire par du β -sitostérol permet de favoriser la voie non-amyloïdogénique d'APP en relocalisant cette protéine dans les domaines non-rafts (Wang *et al.*, 2013a).

Les résultats obtenus *in vitro*, sur le rôle du cholestérol dans la MA, ont été confirmés par des études réalisées *in vivo* chez l'animal. Ainsi, une hypercholestérolémie induite par un régime riche en graisse entraîne chez le lapin une accumulation de peptides amyloïdes (Sparks *et al.*, 1994) et une augmentation d'ApoE dans leur cerveau (Sparks *et al.*, 1995). Cette apolipoprotéine est le principal transporteur du cholestérol dans le SNC. Elle est également capable d'interagir avec les A β pour permettre leur transport et leur élimination. Chez le lapin, une hypercholestérolémie pourrait induire une augmentation des niveaux de cholestérol dans leur cerveau, par un mécanisme inconnu, ce qui conduirait à une augmentation des niveaux d'A β ainsi qu'à une augmentation d'ApoE par un mécanisme compensatoire.

Ces résultats supposent que les niveaux de cholestérol plasmatique peuvent avoir un effet sur la production cérébrale des A β . Ainsi, Refolo et ses collaborateurs ont montré que chez la souris APP/PS1 (utilisée comme modèle de MA), l'hypercholestérolémie induite par un régime riche en cholestérol entraîne un clivage de la protéine APP en faveur de la voie amyloïdogénique. En effet, les résultats montrent une baisse de la libération du fragment APP α et une augmentation de la libération du fragment β -CTF. Il en résulte une augmentation des niveaux de peptides A β dans le SNC ainsi qu'une augmentation de la taille et du nombre de dépôts amyloïdes (Refolo *et al.*, 2000). Ces

résultats sont confirmés par l'administration aux souris APP/PS1 du composé BM15.766 (un hypolipémiant efficace) pour réduire les niveaux de cholestérol plasmatique. Les souris traitées présentent une baisse des niveaux de peptides A β et une baisse de la charge amyloïde dans leur cerveau. Ces baisses sont dues à un clivage de la protéine APP en faveur de la voie non-amyloïdogénique (Refolo *et al.*, 2001).

Une autre étude réalisée chez la souris a permis de montrer que les statines peuvent être efficaces pour réduire la charge amyloïde. Dans cette étude, les souris TgCRND8 exprimant la protéine APP humaine et utilisées comme modèle de MA ont été traitées par la lovastatine (statine lipophile) ou par la pravastatine (statine hydrophile). Les résultats montrent que ces deux statines favorisent le clivage non-amyloïdogénique de la protéine APP (baisse des niveaux de peptide A β et augmentation de la libération d'APP α). Cependant, la lovastatine augmente l'inflammation cérébrale (augmentation des niveaux d'IL-1 β et de TNF α) ce qui remet en cause son utilisation pour le traitement de la MA (Chauhan *et al.*, 2004).

Chez le rat, l'hypercholestérolémie est capable d'induire une pathologie de type Alzheimer avec dysfonctionnement du système cholinergique, augmentation des peptides β -amyloïde et de la phosphorylation de la protéine tau, inflammation, micro-saignement et déclin cognitif (Ullrich *et al.*, 2010).

Ces résultats indiquent qu'il existe une relation entre les niveaux de cholestérol périphérique et la MA. Ils ont pu être confirmés par une étude réalisée chez la souris ayant reçu une injection de peptide A β ₂₅₋₃₅ dans ses ventricules cérébraux afin d'induire une neuroinflammation comme c'est aussi le cas dans la MA. Chez ces souris, l'hypercholestérolémie induite par un KO d'*ApoE* et par un régime riche en cholestérol permet d'accélérer l'accumulation des A β , la phosphorylation de tau et l'activation des cellules microgliales. De plus, l'hypercholestérolémie permet d'accentuer le déclin cognitif chez ces animaux (Park *et al.*, 2013). Cette étude suggère que l'hypercholestérolémie pourrait aussi accélérer l'évolution de la MA. A l'inverse, une diminution des niveaux de cholestérol périphérique pourrait diminuer les signes de la MA. Ainsi, les souris Tg19959, exprimant la protéine APP humaine mutée, présentent une baisse du déficit de mémoire, une réduction des dépôts amyloïdes et de la phosphorylation de tau ainsi qu'une diminution de la microgliose lorsqu'elles sont

traitées par l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine utilisé pour réduire les niveaux de cholestérol membranaire (Yao *et al.*, 2012).

Pour réduire les niveaux de cholestérol dans le cerveau, la CYP46A1 peut être surexprimée. Cette enzyme transforme le cholestérol en 24-S-hydroxycholestérol qui est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique. Ce mécanisme est utilisé pour éliminer le cholestérol du SNC. Les souris APP et APP/PS1, utilisées comme modèle de MA, qui sur-expriment la CYP46A1 avant ou après l'apparition des plaques amyloïdes, présentent une baisse des dépôts amyloïdes. La surexpression de la CYP46A1 permet de diminuer la concentration en cholestérol et ainsi, de réduire le recrutement d'APP et de PSEN1 dans les radeaux lipidiques conduisant ainsi à une baisse du clivage par la γ -sécrétase (Hudry *et al.*, 2010).

Les études réalisées chez l'homme ont donné des résultats contradictoires c'est pourquoi le rôle du cholestérol dans la MA reste controversé. Certaines études ont montré qu'une augmentation des niveaux de cholestérol en milieu de vie augmenterait les risques de développer la MA (Kivipelto *et al.*, 2001 ; Whitmer *et al.*, 2005 ; Solomon *et al.*, 2009). A l'inverse, certaines études montrent que les niveaux de cholestérol sérique ne sont pas associés à un risque de développer la MA (Tan *et al.*, 2003 ; Li *et al.*, 2005 ; Stewart *et al.*, 2007). Certaines études ont montré que la prise de statines permet de réduire les risques de développer la MA (Jick *et al.*, 2000 ; Wolozin *et al.*, 2000 ; Cramer *et al.*, 2008) cependant, ces résultats restent controversés (Vos et Nehrllich, 2009). Une étude a montré que l'environnement en début de vie a un effet sur la structure vasculaire cérébrale et sur sa capacité à éliminer les A β (Hawkes *et al.*, 2015). Ainsi, les personnes âgées ayant une histoire d'hypercholestérolémie ont des niveaux d'A β vasculaires plus élevés que les personnes âgées ayant des niveaux de cholestérol normaux. De plus, les auteurs montrent que l'exposition prénatale à un régime riche en graisse conduit à une altération des structures vasculaires cérébrales et à une baisse de leur capacité à éliminer les A β chez l'adulte (Hawkes *et al.*, 2015). Des études ont montré que les niveaux de cholestérol sérique sont inchangés entre les groupes Alzheimer et contrôle (Kuo *et al.*, 1998 ; Popp *et al.*, 2012), que les niveaux de cholestérol sont significativement diminués chez les personnes présentant la maladie d'Alzheimer par rapport aux sujets contrôle (Romas *et al.*, 1999 ; Wood *et al.*, 2014) ou que les niveaux de cholestérol sont significativement plus élevés chez les personnes

présentant la maladie d'Alzheimer que chez les sujets contrôle (Popp *et al.*, 2013). En ce qui concerne les niveaux de cholestérol dans le cerveau des personnes Alzheimer, des études ont montré qu'ils peuvent être augmentés, diminués ou inchangés par rapport à ceux des personnes en santé (Wood *et al.*, 2005). Les résultats contradictoires, obtenus au cours de ces études, peuvent probablement être expliqués par l'hétérogénéité du groupe de patients étudiés et par le fait que la définition des stades cliniques de la MA est encore relativement floue.

Le mécanisme par lequel le cholestérol périphérique a un effet sur les fonctions cérébrales et sur la MA n'est pas connu. Cependant, on peut penser que les oxystérols, comme le 27-hydroxycholestérol, puissent être le lien manquant. En effet, au niveau du foie, le cholestérol peut être transformé en 27-hydroxycholestérol par l'action de l'enzyme CYP27A1. Contrairement au cholestérol, le 27-hydroxycholestérol est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique. De plus, un régime riche en cholestérol peut entraîner une perturbation du fonctionnement de la barrière hémato-encéphalique conduisant probablement à un passage de cholestérol périphérique vers le SNC. Ce mécanisme pourrait expliquer comment le cholestérol périphérique peut avoir un effet sur le SNC et sur le développement de la MA.

III. Le transport du cholestérol

1) Transport du cholestérol dans le système nerveux central

Dans le cerveau, le cholestérol est principalement synthétisé par les astrocytes puis, il est transporté vers les neurones où il sera utilisé. Le transport du cholestérol se fait par l'intermédiaire de lipoprotéines sécrétées par les astrocytes.

L'efflux du cholestérol des astrocytes vers un accepteur du cholestérol se fait par l'intermédiaire des transporteurs ABCA1 et ABCG1 (Liu *et al.*, 2010 ; Mahley, 2016). Ces deux transporteurs sont exprimés par les astrocytes et les neurones. Ils font partie de la famille des transporteurs ABC qui est composée de 49 protéines réparties dans 7

sous-classes (de A à G). Les protéines appartenant à cette famille transportent de nombreux matériaux comme des ions, des médicaments, des peptides, des protéines, des sucres et des lipides (Liu *et al.*, 2010).

Dans le SNC, le principal accepteur du cholestérol est l'ApoE qui est essentiellement synthétisée par les astrocytes. Il faut savoir que l'ApoE périphérique est incapable de traverser la barrière hémato-encéphalique et ne peut donc pas être utilisée par le SNC (Figure 5) (Pfrieger et Ungerer, 2011 ; Hottman *et al.*, 2014 ; Mahley, 2016). L'Apolipoprotéine J (ApoJ), encore appelée clusterin, est également présente dans le cerveau. Elle est exprimée par les astrocytes mais des études ont pu montrer qu'elle est présente dans des sous populations de neurones chez les rongeurs et l'homme. Elle est également impliquée dans le transport du cholestérol (Pfrieger et Ungerer, 2011 ; Mahley, 2016). A l'inverse, l'apolipoprotéine A1 (ApoA-I) périphérique est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique sous sa forme pauvre en lipides. Elle peut donc être utilisée comme accepteur du cholestérol dans le SNC et participe ainsi à l'efflux du cholestérol (Figure 5) (Hottman *et al.*, 2014 ; Mahley, 2016).

Le transporteur ABCA1 permet de transporter le cholestérol et les phospholipides vers une apolipoprotéine pauvre en lipides pour former une lipoprotéine naissante. Les lipoprotéines formées ont une structure discoïdale, une taille comprise entre 8 et 17 nm et leur densité est similaire à celle des HDL périphériques. C'est pourquoi, on les appelle des particules de type HDL (Figure 5) (Pfrieger et Ungerer, 2011).

La LCAT (lécithine cholestérol acyl transférase), qui est l'enzyme permettant d'estérifier le cholestérol présent dans les lipoprotéines, est exprimée dans le SNC par les neurones et les astrocytes. Elle est capable d'estérifier le cholestérol des lipoprotéines discoïdales pour former des particules sphériques (Figure 5) (Mahley, 2016). La présence de CETP (Cholesterol Ester Transfer Protein) dans le SNC est encore controversée (Hottman *et al.*, 2014). En périphérie, cette protéine permet aux HDL d'échanger du cholestérol estérifié avec les autres lipoprotéines et ainsi, elle participe aux mécanismes de maturation des HDL. Sa présence étant controversée dans le SNC, les mécanismes de maturation des HDL, dans le cerveau, ne sont pas connus. Contrairement à ABCA1 qui transporte le cholestérol vers des apolipoprotéines pauvre

en lipides, le transporteur ABCG1 transporte le cholestérol vers des particules HDL déjà formées (Mahley, 2016).

Les particules de type HDL vont entrer dans les neurones par une endocytose médiée par des récepteurs spécifiques. Il existe deux récepteurs impliqués dans l'entrée du cholestérol dans les neurones. Il s'agit de LDLR (LDL receptor) et de LRP1 (low-density lipoprotein receptor-related protein-1). LDLR est exprimé dans les neurones et les cellules gliales alors que LRP1 est exprimés principalement par les neurones (Figure 5) (Pfrieger et Ungerer, 2011 ; Mahley 2016).

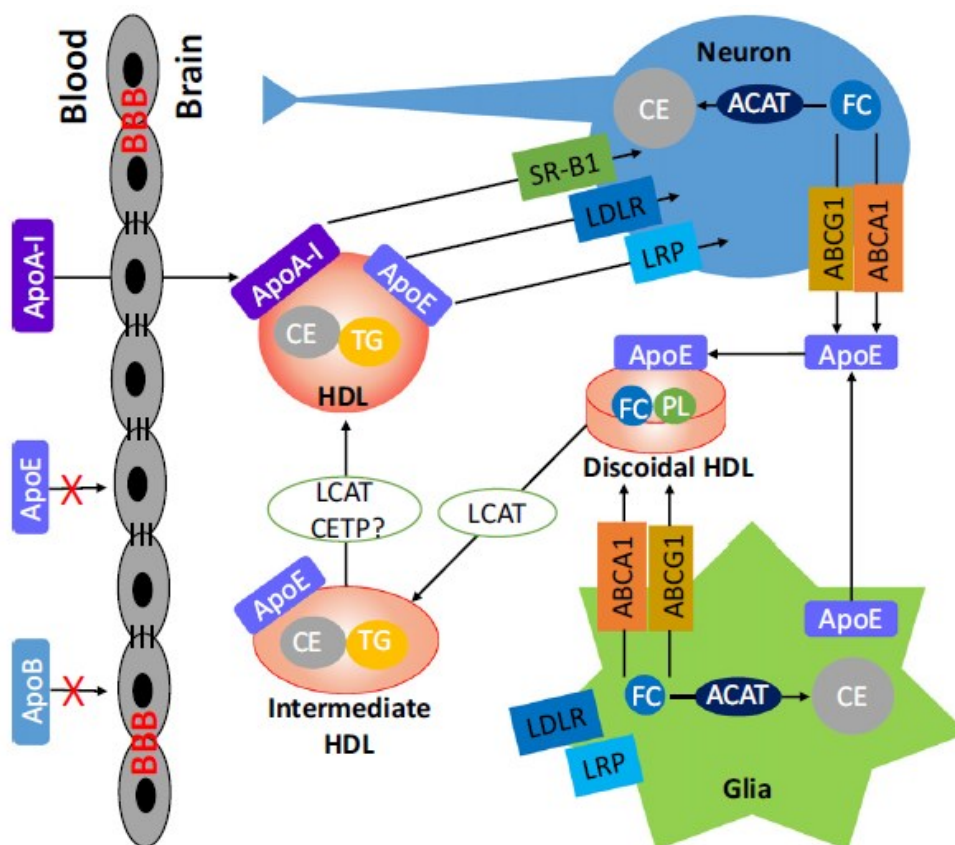


Figure 5 : Transport du cholestérol dans le SNC (Hottman *et al.*, 2014)

Le cholestérol (FC) est principalement synthétisé par les astrocytes, et le cholestérol en excès peut être estérifié par l'ACAT pour être stocké sous forme de gouttelettes lipidiques. L'efflux du cholestérol est réalisé par les transporteurs ABCA1 et ABCG1 vers un accepteur du cholestérol. Dans le SNC, le principal accepteur du cholestérol est l'ApoE qui est synthétisée principalement par les astrocytes. Il se forme alors une particule de type HDL discoïdale. Le cholestérol présent dans cette particule va être estérifié par la LCAT ce qui conduit à la formation d'une particule HDL intermédiaire (sphérique). La présence de CETP dans le SNC est encore controversée, de ce fait, les

mécanismes de maturation des HDL ne sont pas connus. Les particules HDL peuvent être modifiées par interaction avec les récepteurs SR-B1, LDLR et LRP. Les HDL pourront entrer dans les neurones par un mécanisme d'endocytose médiée par les récepteurs LDLR et LRP1 ce qui permettra l'apport de cholestérol aux neurones. Dans les neurones, le cholestérol en excès peut être estérifié par l'ACAT et stocké sous forme de gouttelettes lipidiques. Il peut également être transporté à l'extérieur des cellules via les transporteurs ABCA1, ABCG1 et ABCG4 (non présent sur la figure mais exprimé également par les neurones) vers un accepteur du cholestérol (ApoE). Il est à noter que l'ApoE périphérique ne peut pas traverser la barrière hémato-encéphalique et ne peut donc pas être utilisée par le cerveau. En revanche, l'ApoA-I périphérique est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique de ce fait, elle peut participer au métabolisme des HDL dans le SNC.

FC = Cholestérol libre, **CE** = Cholestérol estérifié, **PL** = Phospholipides, **TG** = Triglycérides, **BBB** = Barrière hémato-encéphalique

Dans les neurones, le cholestérol en excès peut être estérifié par l'ACAT1 (Acetyl-coA acyltransférase 1), encore appelée SOAT1 (sterol O-acyl transférase 1), et stocké dans des gouttelettes lipidiques. Dans le cerveau, l'ACAT1 est exprimée dans les neurones et les astrocytes (Figure 6) (Pfrieger et Ungerer, 2011).

Le cholestérol en excès peut également être oxydé en 24-S-hydroxycholestérol encore appelé, cérébrostérol. Cette réaction est catalysée par la cholestérol-24-hydroxylase (CYP46A1) qui appartient à la famille des cytochromes P450. Celle-ci est exprimée dans les neurones mais pas dans les astrocytes. Le 24-S-hydroxycholestérol est lipophile et peut donc traverser la membrane plasmique des neurones. Il est également capable de traverser la barrière hémato-encéphalique pour rejoindre la périphérie. Il est le principal mécanisme d'élimination du cholestérol par le SNC (Figure 6) (Pfrieger et Ungerer, 2011 ; Mahley, 2016).

Le cholestérol, en excès dans les neurones, peut également être transporté via les transporteurs ABCA1, ABCG1 et ABCG4 vers un accepteur du cholestérol. Les particules de type HDL formées peuvent entrer dans les astrocytes par un mécanisme d'endocytose induit par l'interaction de la particule avec le récepteur des LDL (Figure 6) (Pfrieger et Ungerer, 2011).

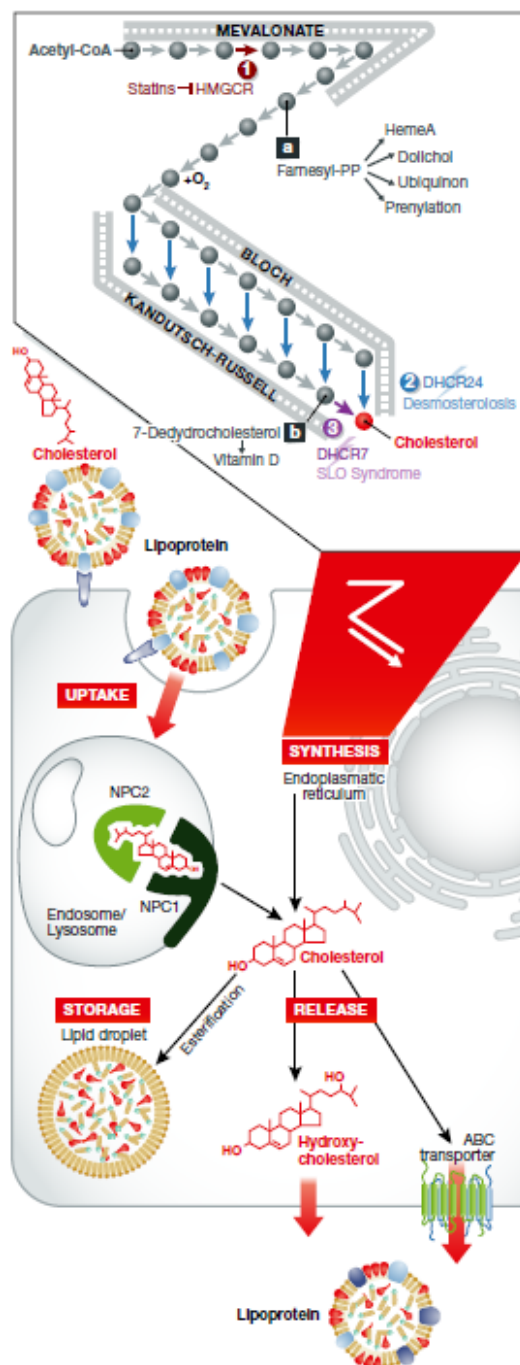


Figure 6 : Homéostasie du cholestérol cellulaire (Martin *et al.*, 2014)

Le cholestérol synthétisé par les astrocytes est transporté vers les neurones sous forme de lipoprotéines. Il peut entrer dans les neurones par un mécanisme d'endocytose médiée par un récepteur. Les protéines NPC1 et NPC2 permettent au cholestérol de quitter le système endosome/lysosome pour qu'il puisse être disponible pour la cellule. Le cholestérol peut également être estérifié et stocké dans des gouttelettes lipidiques, être oxydé en 24-S-hydroxycholestérol ce qui lui permet de traverser la membrane cellulaire ou être transporté à l'extérieur de la cellule via un transporteur ABC.

2) Le transport du cholestérol en périphérie

Le SNC n'est pas totalement isolé de la périphérie puisque du cholestérol périphérique est capable de pénétrer dans le cerveau sous forme de 27-hydroxycholestérol (Heverin *et al.*, 2005 ; Gamba *et al.*, 2015). De plus, l'ApoA-1 est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique pour entrer dans le SNC où elle pourra participer au transport du cholestérol. Une altération de l'ApoA-1 périphérique peut donc conduire à une altération de l'efflux du cholestérol en périphérie et dans le cerveau. Par conséquent, une altération de l'efflux du cholestérol périphérique pourrait refléter une altération de l'efflux du cholestérol dans le SNC.

L'efflux du cholestérol est réalisé par toutes les cellules périphériques cependant l'efflux du cholestérol à partir des macrophages est le mécanisme le plus étudié car il est associé au développement du processus d'athérosclérose (Khera *et al.*, 2011 ; Rohatgi *et al.*, 2014 ; Yamamoto *et al.*, 2016). En effet, cette pathologie se caractérise par l'accumulation de lipides dans les macrophages ce qui conduit à la formation de cellules spumeuses et au dépôt de plaques d'athérome dans les artères.

L'efflux du cholestérol peut se faire par des mécanismes passif et actif. La diffusion passive permet de transporter le cholestérol libre de la membrane plasmique vers les HDL qui sont utilisées comme accepteurs du cholestérol. Ce processus semble être important pour l'élimination des lipides des macrophages spumeux. Le mécanisme à l'origine de ce processus n'est pas bien connu et un transporteur encore non-identifié pourrait y participer (Favari *et al.*, 2015). Les mécanismes actifs permettant l'efflux du cholestérol font intervenir les transporteurs ABCA1 et ABCG1. Le transporteur ABCA1 permet de transporter le cholestérol et les phospholipides de la cellule vers une ApoA-1 libre ou pauvre en lipides ce qui conduit à la formation de particules HDL naissantes (pré- β -HDL) (Favari *et al.*, 2015 ; Zannis *et al.*, 2015). La LCAT plasmatique est une protéine de 416 acides aminés, sécrétée principalement par le foie, et à moindre niveau par le cerveau et les testicules. Elle permet d'estérifier le cholestérol présent dans les particules HDL naissantes pour les convertir en HDL discoïdaux puis en HDL sphériques matures. Cette protéine utilise l'ApoA-1 comme activateur (Favari *et al.*, 2015 ; Zannis *et al.*, 2015). Le transporteur ABCG1 va pouvoir transporter le cholestérol des cellules vers les particules HDL matures. Il peut également induire

l'efflux de 7-ketocholestérol et d'oxystérols liés des macrophages et des cellules endothéliales vers les HDL pour les protéger de l'apoptose (Favari *et al.*, 2015 ; Zannis *et al.*, 2015).

Les particules HDL peuvent être remodelées par différents acteurs protéiques pour permettre la formation de différents types de particules HDL. La taille, la forme, les compositions apolipoprotéiques et lipidiques ainsi que la fonctionnalité de ces différents HDL peuvent varier (Kontush *et al.*, 2015 ; Zannis *et al.*, 2015).

La CETP est une protéine principalement exprimée par le foie et le tissu adipeux. En circulation, elle permet de transférer le cholestérol estérifié des HDL matures vers les VLDL (very low density lipoproteins), les IDL (intermediate density lipoproteins) et les LDL (low-density lipoproteins) en échange de triglycérides (Kontush *et al.*, 2015 ; Zannis *et al.*, 2015).

Le transporteur SR-B1 est une glycoprotéine membranaire de 82 kDa appartenant à la famille CD36. Il est principalement exprimé dans le foie, les tissus stéroïdogéniques, les cellules endothéliales et les macrophages. Son rôle physiologique est de transférer le cholestérol estérifié des HDL vers les cellules. Le mécanisme précis utilisé par SR-B1 pour absorber le cholestérol estérifié présent dans les HDL n'est pas bien compris. SR-B1 permet également de réaliser l'efflux de cholestérol des cellules vers les HDL cependant, son rôle dans l'efflux du cholestérol n'est pas très clair. SR-B1 permet donc un flux bidirectionnel de cholestérol entre les cellules et les HDL. Ce flux dépend de la concentration en cholestérol cellulaire, de la composition et de la concentration en accepteur du cholestérol (Favari *et al.*, 2015 ; Zannis *et al.*, 2015).

Les lipases hépatiques et endothéliales sont deux lipases plasmatiques qui permettent d'hydrolyser les phospholipides, et dans une moindre mesure, les triglycérides présents dans les HDL. Ce mécanisme permet de transformer les HDL matures en HDL naissants.

L'apolipoprotéine M (ApoM) est une glycoprotéine de 26 kDa qui appartient à la superfamille des lipocalines. Elle est sécrétée par le foie et à moindre niveau par les reins. Elle est associée aux HDL par l'intermédiaire de son peptide signal situé en N-terminal et dans une moindre mesure, aux autres lipoprotéines. Dans le plasma, elle est impliquée dans le remodelage et la maturation des HDL (Zannis *et al.*, 2015).

La protéine de transfert des phospholipides (PLTP) est synthétisée par le placenta, le pancréas, les poumons, les reins, le cœur, le foie, les muscles squelettiques et le cerveau. Dans la circulation, la PLTP est principalement associée aux HDL et les convertit en des particules plus larges et plus petites. Elle est également capable de transférer des phospholipides, du diacylglycérol, du cholestérol libre, de la vitamine E et du LPS (lipopolysaccharide) entre les lipoprotéines ou entre les lipoprotéines et les cellules (Kontush *et al.*, 2015 ; Zannis *et al.*, 2015).

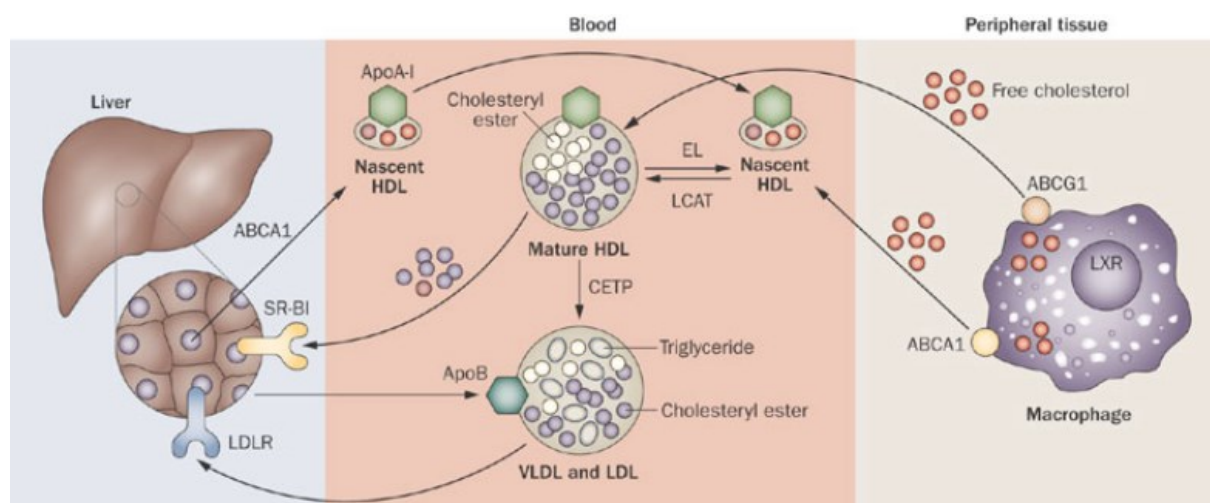


Figure 7 : Efflux du cholestérol et remodelage des HDL (Duffy et Rader, 2009)

ABCA1 permet de transporter le cholestérol libre des macrophages vers l'ApoA-1 libre ou pauvre en lipides ce qui conduit à la formation de particules HDL naissantes. La LCAT va estérifier le cholestérol présent dans les particules HDL naissantes ce qui conduit à la formation de HDL matures. A l'inverse, la lipase endothéliale (EL) va hydrolyser les phospholipides et les triglycérides des HDL matures ce qui conduit à la formation de HDL naissants. Le transporteur ABCG1 induit l'efflux de cholestérol des macrophages vers les particules HDL matures. SR-B1 qui est principalement exprimé par le foie est capable d'absorber le cholestérol estérifié présent dans les HDL matures. Ce mécanisme permet au cholestérol de retourner vers le foie où il pourra être éliminé. SR-B1 peut également induire l'efflux de cholestérol des cellules vers les HDL matures (non montré sur le schéma). La CETP est une protéine qui permet de transférer le cholestérol estérifié des HDL matures vers les VLDL, les IDL et les LDL en échange de triglycérides. Les HDL seront endocytés par les hépatocytes via le récepteur des LDL (LDLR). Ce mécanisme permet au cholestérol de retourner vers le foie où il pourra être éliminé.

3) Efflux du cholestérol et maladie d'Alzheimer

Certaines études ont pu montrer que des gènes impliqués dans l'homéostasie du cholestérol et plus particulièrement, dans l'efflux du cholestérol, sont associés au risque de développer la MA. Ainsi, des études ont montré que le polymorphisme R219K du gène *Abca1* est associé au risque de développer la MA et à l'âge du début de la maladie (Wollmer *et al.*, 2003 ; Katzov *et al.*, 2004 ; Sundar *et al.*, 2007 ; Sun *et al.*, 2012 ; Xiao *et al.*, 2012 ; Lupton *et al.*, 2014). Ce polymorphisme est localisé dans la boucle extracellulaire du transporteur ABCA1 qui est située en N-terminale et qui est importante pour l'efflux du cholestérol. Cependant, une méta-analyse, réalisée par Wang et ses collaborateurs (Wang *et al.*, 2013b), impliquant 12 248 sujets ne permet pas de montrer de lien entre le polymorphisme du gène *Abca1* et le risque pour développer la MA. Une autre étude a pu montrer que le gène *Abcg1*, codant pour le transporteur ABCG1 qui est impliqué dans l'efflux du cholestérol vers les HDL, est associé au risque de développer la forme sporadique de la MA (Wollmer *et al.*, 2007). En revanche, le gène *Sr-b1*, codant pour le transporteur SR-B1 qui est impliqué dans le transport bidirectionnel du cholestérol, ne serait pas associé au risque de développer la MA (Luedeking-Zimmer *et al.*, 2003). Une étude a pu aussi montrer que le polymorphisme -75 bp A/G, localisé dans la région promotrice d'ApoA-I, est associé au risque de développer la MA à début précoce, et à l'âge du début de la maladie (Vollbach *et al.*, 2005). Ainsi, l'allèle A serait associé à une augmentation des risques de développer la MA, et à un début plus précoce de la maladie. En revanche, l'étude réalisée par Helbecque et ses collaborateurs n'a pas pu montrer que ce polymorphisme est associé au risque de développer la MA dans la population caucasienne bien qu'il semble légèrement associé au déclin cognitif (Helbecque *et al.*, 2008). Une autre étude n'a pas pu montrer de relation entre le polymorphisme -75 bp A/G d'ApoA-I et les risques de développer la MA dans la population tunisienne (Smach *et al.*, 2011). Une étude testant 25 SNPs (Single nucleotide polymorphism) d'ApoA-I n'a pas pu montrer de relation entre un de ces SNPs et l'âge du début de la maladie (Shibata *et al.*, 2013). Une étude a été réalisée sur l'association de 5 SNPs du gène codant pour la PLTP et la forme sporadique de la MA dans la population japonaise. Les résultats ne permettent pas de montrer une association génétique entre le gène codant pour la PLTP et la MA. Cependant, l'échantillon testé est de petite taille et les SNPs ne recouvrent pas la totalité du gène (Kuerban *et al.*, 2010). Une étude a pu montrer que le polymorphisme -250 G/A de la lipase endothéliale est associé à la forme sporadique de la MA ainsi qu'aux scores cognitif et de mémoire dans la population chinoise (Xiao *et al.*, 2012). En

revanche, deux études testant plusieurs SNPs localisés dans le gène codant pour la lipase endothéliale ne montrent aucune relation entre la lipase endothéliale et les risques de développer la MA (Zhu *et al.*, 2008 ; Laws *et al.*, 2010). En ce qui concerne la CETP, des études ont pu montrer que le polymorphisme Taq1B du gène codant pour la CETP n'est pas associé au risque de développer la MA (Fidani *et al.*, 2004 ; Zhu *et al.*, 2005 ; Xiao *et al.*, 2012). En revanche, une étude réalisée par Li et ses collaborateurs montre que les homozygotes B2B2 pour le polymorphisme Taq1B du gène codant pour la CETP ont plus de risque de développer la MA lorsqu'ils sont porteur de l'allèle ApoE ϵ 4 (Li *et al.*, 2014). Une autre étude a pu montrer que le polymorphisme C-629A du gène codant pour la CETP est associé au risque de développer la MA de manière dépendante de la présence de l'allèle ApoE ϵ 4. Ainsi, l'allèle A du polymorphisme C-629A diminue de 3 fois les risques de développer la MA chez les porteurs de l'allèle ApoE ϵ 4 par rapport au homozygote et au hétérozygote pour l'allèle C. Il faut savoir que l'allèle A est associé à une baisse des niveaux de CETP et à une augmentation des niveaux de HDL (Rodriguez *et al.*, 2006). Une étude réalisée sur la population chinoise a pu montrer que le polymorphisme D442G du gène codant pour la CETP est associé au risque de développer la MA. Ce polymorphisme a un effet sur l'activité de la CETP. Les porteurs de l'allèle G auraient moins de risque de développer la MA particulièrement lorsqu'ils sont porteurs de l'allèle ApoE ϵ 4 (Chen *et al.*, 2008b). Des études testant le polymorphisme I405V du gène codant pour la CETP ont pu montrer que ce polymorphisme est associé à une augmentation des risques de développer la MA. Ainsi, les porteurs de l'allèle V auraient plus de risque de développer la maladie (Arias-Vasquez *et al.*, 2007 ; Yu *et al.*, 2012). Au contraire, l'étude réalisée par Sanders et ses collaborateurs a montré que le génotype VV est associé à un ralentissement du déclin cognitif, et à une baisse de l'incidence des démences et de la MA (Sanders *et al.*, 2010).

Ces études nous amènent à penser que des gènes impliqués dans l'efflux du cholestérol (ABCA1, ABCG1) et dans le remodelage des HDL (CETP) puissent être associés à la MA. Il est à noter que l'ApoE ϵ 4 est le principal facteur de risque génétique de la forme sporadique de la MA. Tous ces résultats nous conduisent à penser que l'efflux du cholestérol puisse être altéré dans la MA.

Une étude réalisée par Pani et ses collaborateurs a montré que les PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) de patients ayant une forme sporadique de MA présentent un

plus fort niveau de lipides neutres, notamment d'ester de cholestérol, que les PBMC des sujets contrôles. De plus, les auteurs montrent que les PBMC des patients Alzheimer réalisent moins d'efflux de lipides, notamment de cholestérol, que les PBMC des sujets contrôles. Enfin, les niveaux plasmatiques de HDL sont diminués chez les personnes qui souffrent de la MA par rapport aux sujets contrôles, et les niveaux de HDL sont corrélés négativement avec l'accumulation de lipides neutres. Cette étude montre donc que les PBMC des patients présentant la forme sporadique de la MA réalisent moins d'efflux de cholestérol ce qui entraîne une accumulation de cholestérol sous forme d'ester de cholestérol dans les cellules. Il en résulte donc une diminution des niveaux de HDL (Pani *et al.*, 2009).

Une autre étude a montré que le sérum et les HDL des patients Alzheimer réalisent moins efficacement l'efflux du cholestérol via les voies ABCA1 et SR-B1 (Khalil *et al.*, 2012). De plus, l'efflux du cholestérol réalisé par le sérum et par les HDL est corrélé inversement avec la sévérité de la maladie (score obtenu en MMSE). Les résultats montrent également que l'efflux du cholestérol réalisé par ApoA-I est altéré chez les personnes présentant la MA. L'altération de l'efflux du cholestérol a été attribuée aux modifications oxydatives des HDL obtenus à partir des patients Alzheimer (Khalil *et al.*, 2012).

Ces études suggèrent que l'efflux du cholestérol puisse être altéré dans la MA conduisant ainsi à une accumulation de cholestérol, sous forme d'ester de cholestérol, à l'intérieur des cellules. L'altération de l'efflux du cholestérol pourrait être due à une oxydation des HDL conduisant ainsi à une perturbation de leur fonctionnalité.

La relation entre la MA et l'efflux du cholestérol peut, également, résider dans la fonctionnalité des peptides A β au niveau de l'homéostasie du cholestérol. Des expériences réalisées *in vitro* et *in vivo* ont pu montrer qu'au cours de leur sécrétion, les peptides A β peuvent s'associer au cholestérol pour former des particules de type HDL et ainsi, permettre son efflux de la cellule. Le transporteur ABCA1 serait impliqué dans l'efflux du cholestérol réalisé par les A β et l'interaction peptide/transporteur aurait lieu à l'intérieur de la cellule (Umeda *et al.*, 2010). Une étude réalisée *in vivo* chez la souris a pu mettre en évidence que les peptides amyloïdes sont capables d'accélérer le transport du cholestérol du cerveau vers les tissus périphériques (Umeda *et al.*, 2010).

Cette étude permet donc de mettre en évidence un nouveau rôle physiologique pour les peptides amyloïdes à savoir son rôle dans le l'homéostasie du cholestérol.

La mutation Osaka (E693Δ), dans la protéine APP, conduit à une baisse de la sécrétion des peptides amyloïdes et à leur accumulation dans la cellule. L'équipe de Nomura a donc émis comme hypothèse que cette mutation pourrait conduire à une altération de l'efflux du cholestérol réalisé par les Aβ du fait d'une baisse de leur sécrétion (Nomura *et al.*, 2013). Leur étude montre que les cellules exprimant la protéine APP Osaka présentent une accumulation de peptides Aβ dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi mais également, une accumulation de cholestérol dans le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et le système endosome/lysosome. La mutation Osaka, dans la protéine APP, conduit donc à une perturbation du transport des peptides Aβ du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique ce qui va affecter l'efflux du cholestérol et ainsi, provoquer son accumulation dans la cellule. Cette étude montre également que les peptides Aβ et le cholestérol s'accumulent dans les mitochondries des cellules exprimant APP Osaka ce qui provoquent une augmentation de la production des ROS (Reactive Oxygen Species). Cette étude suggère que les peptides Aβ sont importants pour le transport intracellulaire du cholestérol et pour son efflux. Ainsi, une perturbation de la sécrétion des Aβ (par mutation Osaka dans APP) entraîne une altération de l'efflux du cholestérol, et son accumulation dans la cellule et les mitochondries ce qui conduit à augmenter la toxicité intracellulaire des Aβ (Nomura *et al.*, 2013).

IV. Les HDL

Les études sur le polymorphisme de gènes impliqués dans le transport du cholestérol suggèrent que certains de ces gènes soient associés à la MA. De plus, les études réalisées *in vitro*, sur des cellules de patients, ont montré que l'efflux du cholestérol est perturbé dans la MA. L'efflux du cholestérol étant réalisé par les HDL, leur fonctionnalité pourrait être altérée dans la MA.

1) Généralités sur les HDL

Les lipoprotéines sont des particules impliquées, au sein de l'organisme, dans le transport des lipides. Elles se distinguent par leur taille, leur densité et leur composition. Ainsi, les chylomicrons (CM) ont une densité de 0,93 g/mL, sont composés essentiellement de triglycérides et contiennent principalement ApoB48, ApoE et ApoC. Les CM sont impliqués dans le transport entéro-hépatique des lipides. Les VLDL (very low density lipoproteins) ont une densité de 0,93-1,006 g/mL, sont composées essentiellement de triglycérides et contiennent principalement ApoB100, ApoE et ApoC. Elles sont impliquées dans le transport des lipides du foie vers les tissus périphériques. Les IDL (intermediate Density Lipoproteins) ont une densité de 1,006-1,019 g/mL et sont produites à partir des VLDL. En effet, la lipoprotéine lipase hydrolyse les triglycérides des VLDL ce qui conduit à la formation d'IDL. Les ApoC perdent leur affinité pour les IDL donc, les principales apolipoprotéines des IDL sont l'ApoB100 et l'ApoE. Les LDL (Low Density Lipoproteins) ont une densité de 1,019-1,063 g/mL, sont composées essentiellement de cholestérol estérifié et contiennent principalement ApoB100. Les LDL sont formées à partir des IDL et des VLDL par hydrolyse de leurs triglycérides par les lipases. Les LDL sont impliquées dans le transport des lipides du foie vers les tissus périphériques (Source : Nouvelle Société Française d'Athérosclérose).

Les HDL sont des particules lipoprotéiques impliquées dans le transport du cholestérol des cellules périphériques vers le foie. Elles sont composées : d'un cœur hydrophobe riche en triglycérides et en esters de cholestérol, et d'une surface hydrophile riche en phospholipides, en cholestérol libre et en protéines (Figure 8). Ces particules ont une densité comprise entre 1.063 et 1.21 g/mL, et une taille comprise entre 8 et 10 nm. Il existe différents types de particules HDL qui se distinguent par leur densité, leur taille, leur structure et leur composition lipidique et protéique (Kontush *et al.*, 2015 ; Zannis *et al.*, 2015).

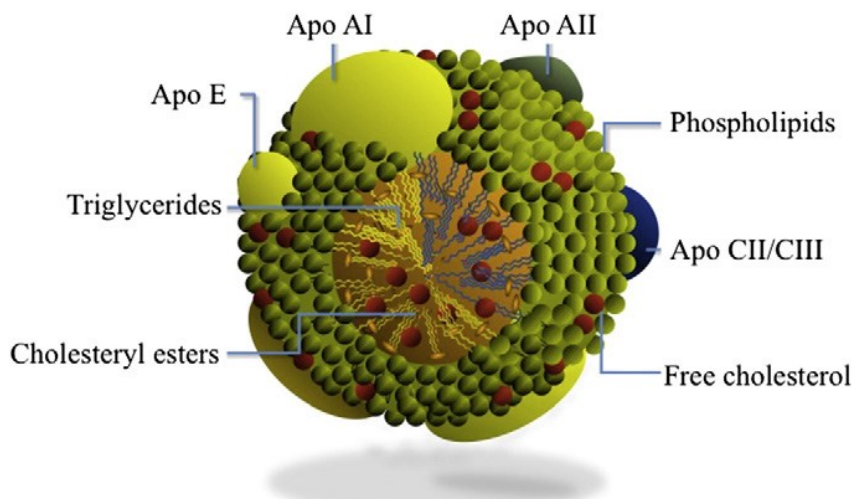


Figure 8 : Structure des particules HDL (Pérez-Méndez *et al.*, 2014)

Les HDL sont des particules lipoprotéiques composées : d'un cœur hydrophobe riche en triglycérides et en esters de cholestérol, et d'une surface hydrophile riche en phospholipides, en cholestérol libre et en protéines. L'ApoA-1 est la principale apolipoprotéine des HDL.

Les particules HDL peuvent être séparées, en fonction de leur densité, par ultracentrifugation. On peut ainsi distinguer deux classes de HDL : des particules moins denses (1.063-1.125 g/mL), relativement riches en lipides, que l'on appelle HDL2 et des particules plus denses (1.125-1.21 g/mL), relativement riches en protéines, que l'on appelle HDL3 (Kontush *et al.*, 2015).

Les HDL2 et HDL3 peuvent être séparées, en fonction de leur taille, sur un gel de polyacrylamide en condition non dénaturante. On peut ainsi mettre en évidence 3 sous-classes de HDL3 : HDL3c (7.2-7.8 nm), HDL3b (7.8-8.2 nm), HDL3a (8.2-8.8 nm) et 2 sous-classes de HDL2 : HDL2a (8.8-9.7 nm) et HDL2b (9.7-12 nm) (Kontush *et al.*, 2015).

Les HDL peuvent être également séparées, en fonction de leur charge et de leur forme, par migration sur un gel d'agarose. Cette méthode permet d'identifier des particules α -HDL correspondant à la majorité des HDL circulants, et des particules pré β -HDL correspondant aux HDL discoïdaux naissants ainsi qu'aux HDL pauvres en lipides (Kontush *et al.*, 2015).

On peut également séparer les HDL, en fonction de leur charge et de leur taille, par électrophorèse 2D, suivis d'une détection de l'ApoA-1 à l'aide d'un anticorps anti-ApoA-1. A l'aide de cette méthode, plus de 12 sous-classes de HDL ont été identifiées (Kontush *et al.*, 2015).

On peut classer les HDL en fonction de la présence ou non de l'ApoA-II. Ainsi, on peut distinguer : les LpA-I : A-II correspondant aux HDL contenant l'ApoA-I et l'ApoA-II, et les LpA-I correspondant aux HDL contenant seulement l'ApoA-I (Kontush *et al.*, 2015).

La RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) a également été utilisée pour séparer les HDL. Cette technique a permis d'identifier 3 sous-classes de HDL : les grands HDL (8.8-13 nm), les moyens HDL (8.2-8.8 nm), et les petits HDL (7.3-8.2 nm) (Kontush *et al.*, 2015).

Récemment, une classification des HDL qui intègre les données obtenues à l'aide de plusieurs méthodes a été proposée. Ainsi, 5 sous-classes ont pu être identifiées : les très grands HDL, les grands HDL, les moyens HDL, les petits HDL et les très petits HDL (Kontush *et al.*, 2015).

On peut donc constater que la classification des HDL est assez complexe puisqu'en utilisant des méthodes différentes, on arrive à identifier différentes sous-classes de HDL. Cette complexité reflète la grande diversité des particules lipoprotéiques au sein de la famille des HDL. Cette diversité peut traduire des fonctionnalités différentes en fonction des différentes sous-classes de HDL.

Les HDL sont composées de protéines qui sont importantes pour leur structure et leur fonction. Ils renfermeraient plus de 80 protéines différentes dont des apolipoprotéines, des enzymes, des protéines de transfert des lipides, des protéines de réponse de phase aiguë, des composants du complément, et des inhibiteurs des protéinases. Parmi les apolipoprotéines présentes au sein des HDL, il y a l'ApoA-I qui est la principale protéine structurale et fonctionnelle de ces particules et représente environ 70 % des protéines totales des HDL. Il faut savoir que la majorité des HDL contient de l'ApoA-I. Les principales fonctions réalisées par cette protéine sont : l'activation de la LCAT, et la participation à l'efflux du cholestérol en interagissant avec le transporteur ABCA1. Les principaux sites de synthèse et de sécrétion de l'ApoA-I sont le foie et le petit intestin (Brunham et Hayden, 2015 ; Kontush *et al.*, 2015)

Après l'ApoA-I, l'apolipoprotéine la plus représentée dans les HDL est l'ApoA-II. En effet, elle représente environ 15 à 20 % des protéines totales des HDL. Il faut savoir qu'environ la moitié des particules HDL peuvent contenir de l'ApoA-II. Cette protéine peut exister sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère. Elle est principalement synthétisée par le foie mais elle peut également l'être par l'intestin (Kontush *et al.*, 2015).

Parmi les autres apolipoprotéines, on trouve l'apoA-IV qui s'échange entre les particules lipoprotéiques mais qui peut également circuler sous forme libre (Kontush *et al.*, 2015). On trouve également, les Apo-C qui font parties d'une famille contenant de petites apolipoprotéines. Ces protéines sont capables de s'échanger entre les lipoprotéines, et elles sont principalement synthétisées par le foie (Kontush *et al.*, 2015). L'apoC-I est la plus petite apolipoprotéine associée aux HDL et aux VLDL. Elle peut rapidement s'échanger entre ces deux particules. L'ApoC-I est principalement impliquée dans l'activation de la LCAT, et dans l'inhibition de la LH et de la CETP (Kontush *et al.*, 2015). L'ApoC-II est également associée aux HDL et aux VLDL, et elle est impliquée dans l'activation de plusieurs triacylglycérol lipases (Kontush *et al.*, 2015). L'ApoC-III est peu présente dans les HDL et elle est impliquée dans l'inhibition de la lipoprotéine lipase et de la LH (Kontush *et al.*, 2015). L'ApoD est également associée aux HDL. Elle est exprimée dans de nombreux tissus dont le foie et les intestins. Elle appartient à la famille des lipocalines qui regroupent de petites protéines de transfert des lipides. L'ApoD est capable de transporter de petits ligands hydrophobes comme l'acide arachidonique pour lequel elle a une forte affinité. Dans le plasma, l'ApoD est présente sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère en association avec l'ApoA-II (Kontush *et al.*, 2015). Tout comme l'ApoA-I, l'apoE est importante pour la structure et la fonction des HDL bien qu'elle y soit présente en plus faible quantité. L'ApoE est synthétisée dans de nombreux tissus et cellules dont le foie, le tissu endocrinien, le SNC et les macrophages (Kontush *et al.*, 2015). En périphérie, son rôle dans l'efflux du cholestérol est moindre. En revanche, dans le SNC, elle est importante pour le transport du cholestérol des astrocytes vers les neurones mais également, pour le transport et l'élimination des A β . Au sein des HDL, on trouve également l'ApoF qui est synthétisée par le foie et qui est capable d'inhiber la CETP (Kontush *et al.*, 2015).

Parmi les enzymes présentes dans les HDL, on peut citer la LCAT qui catalyse l'estérification du cholestérol en ester de cholestérol. Il faut savoir qu'environ 75 % de l'activité LCAT plasmatique est associée aux HDL. Elle est principalement exprimée dans le foie et à moindre niveau dans le cerveau et les testicules (Brunham et Hayden, 2015 ; Kontush *et al.*, 2015). La Paraoxonase fait également partie des enzymes associées aux HDL. Dans les HDL, on trouve également la GSPx3 pour glutathion sélénoperoxydase 3 encore appelée, glutathion peroxydase 3. Comme toutes les GSPx, elle est capable de protéger les biomolécules des dommages oxydatifs. En effet, elle

catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène, des peroxydes lipidiques et des hydroperoxydes organiques au cours d'une réaction qui utilise le GSH. La GSPx3 humaine est synthétisée dans le foie, les reins, le cœur, les poumons, les seins et le placenta. Dans le plasma, la GSPx3 est exclusivement associée aux HDL (Kontush *et al.*, 2015).

Les principales protéines de transfert des lipides qui sont associées aux HDL sont la CETP et la PLTP. Leur rôle a été décrit dans la troisième partie de mon introduction portant sur le transport du cholestérol. La CETP et la PLTP sont deux protéines impliquées dans la maturation des HDL. Brièvement, la CETP permet de transférer du cholestérol estérifié des HDL vers des lipoprotéines contenant ApoB (VLDL, LDL) en échange de triglycérides. La PLTP est une protéine qui transfère des phospholipides ainsi que d'autres molécules entre les lipoprotéines mais également, entre les lipoprotéines et les cellules (Brunham et Hayden, 2015 ; Kontush *et al.*, 2015).

En plus des protéines, les HDL peuvent transporter de nombreux petits peptides dont la masse est comprise entre 1 et 5 kDa. Ces peptides représentent environ 1 % des protéines totales des HDL (Kontush *et al.*, 2015). Parmi les peptides associés aux HDL, on trouve les peptides A β (Biere *et al.*, 1996; Koudinov *et al.*, 1996; Kuo *et al.*, 1999).

Au vu de la grande diversité de protéines et de peptides que transportent les HDL, il est fort probable que ces particules ne jouent pas seulement un rôle dans le métabolisme lipidique.

Les HDL sont également composés de lipides parmi lesquels des phospholipides, des sphingolipides et des lipides neutres. La phosphatidylcholine est le principal phospholipide associé aux HDL. En effet, elle représente 32 à 35 % des lipides totaux des HDL. La lysophosphatidylcholine (lysoPC) est également un phospholipide important pour les HDL. Elle provient de la dégradation de la phosphatidylcholine par les phospholipases A2. La sphingomyéline est le principal sphingolipide présent dans les HDL circulant. Parmi les lipides neutres composant les HDL, on trouve des stérols libres (non estérifiés). Ils sont localisés à la surface de la particule HDL et contrôlent sa fluidité. Le principal stérol trouvé dans les HDL est le cholestérol. Les esters de cholestérol qui sont très hydrophobes sont localisés dans le cœur de la particule HDL. Ils proviennent de l'estérification du cholestérol par la LCAT. Ils représentent 36 % des lipides totaux des HDL. Les triacylglycérides sont également des lipides neutres présents dans les HDL mais, ils ne représentent que 3 % des lipides totaux des HDL (Kontush *et al.*, 2015).

2) HDL et maladie d'Alzheimer

Les HDL permettent l'efflux du cholestérol et par conséquent une altération de leur fonctionnalité pourrait conduire à une accumulation de cholestérol dans les cellules et ainsi, à une augmentation de la production des A β . La fonctionnalité des HDL pourrait être altérée dans la MA et/ou l'environnement pro-oxydant et pro-inflammatoire qui est caractéristique de la MA pourrait entraîner une altération de la structure et de la fonction des HDL ce qui conduirait à accentuer les signes de la MA. Des études ont montré que les HDL peuvent empêcher l'association des A β en fibrilles et ainsi, diminuer leur toxicité (Koudinov *et al.*, 1999 ; Olesen et Dago, 2000). Du fait de leurs diverses fonctions, les HDL pourraient être impliquées dans le développement de la MA.

Des études ont montré que des niveaux élevés de HDL sont associés à de meilleures fonctions cognitives (Atzmon *et al.*, 2002 ; Barzilai *et al.*, 2006) et à une diminution des risques de développer une démence (Van Exel *et al.*, 2002 ; Zuliani *et al.*, 2010). De plus, des études ont montré qu'une augmentation des niveaux de HDL est associée à une baisse des risques de développer la MA (Bonarek *et al.*, 2000 ; Launer *et al.*, 2001 ; Reitz *et al.*, 2004 ; Vollbach *et al.*, 2005 ; Saczynski *et al.*, 2007 ; Reitz *et al.*, 2010). Il est à noter qu'une étude a montré que les niveaux de HDL sont corrélés avec la sévérité de la maladie. En effet, les niveaux de HDL seraient corrélés positivement avec le score obtenu en MMSE (Merched *et al.*, 2000). A l'inverse, l'étude réalisée par Sabbagh et ses collaborateurs ne montre aucune relation entre les niveaux de HDL et le score obtenu en MMSE (Sabbagh *et al.*, 2004). Enfin, les niveaux de HDL seraient diminués chez les personnes ayant une MA (Kuo *et al.*, 1998).

L'oxydation des HDL conduit à une perturbation de leur structure, et à une altération de leur fonctionnalité. Des équipes de recherche se sont donc intéressées à l'état d'oxydation des HDL dans la MA. Les études réalisées donnent des résultats contradictoires. En effet, l'étude réalisée par Bergt et ses collaborateurs montre que les niveaux de HDL oxydées sont diminués dans le plasma du groupe Alzheimer par rapport au plasma du groupe contrôle (Bergt *et al.*, 2006). A l'inverse, les études réalisées par Bassett et ses collaborateurs ainsi que par Schippling et ses collaborateurs montrent que les lipoprotéines du plasma et du fluide cérébrospinal des personnes atteintes de la MA sont plus sensibles à l'oxydation (Bassett *et al.*, 1999 ; Schippling *et al.*, 2000).

L'ApoA-I (apolipoprotéine majoritaire des HDL) est capable d'interagir avec les peptides A β pour empêcher leur agrégation. Ainsi, elle peut réduire le stress oxydant et les dommages neuronaux induits par ces peptides (Paula-Lima *et al.*, 2009). L'ApoA-I jouerait donc un rôle neuroprotecteur en interagissant avec les peptides A β . Des études réalisées sur des souris APP/PS1, utilisées comme modèle de MA, ont montré que la surexpression périphérique de l'ApoA-I humaine permet de préserver les fonctions cognitives de ces souris en atténuant la neuroinflammation induite par les peptides A β , et en réduisant l'angiopathie amyloïde cérébrale (dépôts de peptides A β dans les vaisseaux sanguins cérébraux). En revanche, la charge amyloïde totale n'est pas altérée par la surexpression de l'ApoA-I humaine (Lewis *et al.*, 2010). A l'inverse, chez les souris APP/PS1, un *knock out* du gène codant pour l'ApoA-I conduit à une exacerbation du déficit cognitif sans altérer la charge amyloïde totale (Lefterov *et al.*, 2010). L'ApoA-I pourrait donc être un des constituants des HDL impliqués dans le développement de la MA.

Des études ont montré que les niveaux d'ApoA-I dans le plasma (Kawano *et al.*, 1995), dans le fluide cébrospinal (Castano *et al.*, 2006) et dans le sérum (Merched *et al.*, 2000, Liu *et al.*, 2006) sont diminués chez les sujets Alzheimer par rapport aux sujets contrôles. En revanche, certaines études ont montré que les niveaux d'ApoA-I sont inchangés dans le fluide cébrospinal et dans le cerveau des sujets Alzheimer par rapport aux contrôles (Harr *et al.*, 1996 ; Song *et al.*, 1997 ; Merched *et al.*, 2000). Enfin, des études ont montré que les niveaux d'ApoA-I sont inversement corrélés avec les risques de développer la MA (Saczynski *et al.*, 2007 ; Lin *et al.*, 2015). En somme, présentement, il est très difficile de savoir quel est l'état physique et fonctionnel des HDL dans la MA.

La paraoxonase 1 (PON1) est une enzyme associée aux HDL qui confère à ces particules des propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes (Durrington *et al.*, 2001 ; Rosenblat et Aviram, 2009 ; Loued *et al.*, 2012 ; Devarajan *et al.*, 2014 ; Soran *et al.*, 2015). De plus, cette enzyme est capable d'hydrolyser des composés organophosphorés neurotoxiques (Furlong *et al.*, 2016). De ce fait, son rôle dans les maladies neurodégénératives, notamment dans la MA, a été étudié.

V. Rôle de la PON1 dans la maladie d'Alzheimer

Les Paraoxonases (PON) humaines sont des lactonases dépendantes du Ca^{2+} . Il existe trois PON différentes chez l'homme : PON1, PON2 et PON3. Le locus PON codant pour les trois PON est localisé sur le bras long du chromosome 7 (7q21.3) et s'étend sur environ 120 kb. Les trois PON présentent environ 65 % de similarité au niveau de leur séquence en acides aminés (Menini et Gugliucci, 2014).

Les PON1 et PON3 sont principalement exprimées par le foie et sont associées aux HDL. Il faut savoir que la PON1 est associée à l'ApoA-I et à l'ApoJ dans les HDL.

La PON1 possède trois activités. Une activité paraoxonase, appelée également organophosphatase, qui hydrolyse les organophosphates et les pesticides. Le nom paraoxonase vient du fait que la PON1 est capable d'hydrolyser le paraoxon qui est un dérivé du parathion (pesticide). Elle possède également une activité arylestérase qui catalyse l'hydrolyse des arylesters non-phosphorés comme le phénylacétate. Enfin, elle possède une activité lactonase qui est dirigée contre les lactones qui sont considérés comme les principaux substrats (Menini et Gugliucci, 2014).

La PON3 possède une activité lactonase efficace, une activité arylestérase limitée et aucune activité paraoxonase (Menini et Gugliucci, 2014).

Contrairement aux PON1 et PON3, la PON2 est une enzyme intracellulaire qui n'est pas détectable dans le sérum. Elle est largement exprimée dans le cœur, le cerveau, les reins, le foie, les poumons, les testicules et le tractus gastro-intestinal. Elle possède les activités lactonase et arylestérase (Costa *et al.*, 2014).

Dans le présent travail, je me suis, uniquement, intéressée à la PON1 en raison de ses propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires, de sa capacité à éliminer les composés organophosphorés, et de sa participation à l'efflux du cholestérol.

1) Généralités sur la PON1

La PON1 est une glycoprotéine de 354 acides aminés et possède un poids moléculaire allant de 43 à 47 kDa. C'est une protéine qui est exprimée chez les mammifères. En revanche, elle n'est pas présente chez les poissons, les oiseaux et les invertébrés comme les athropodes (Durrington *et al.*, 2001).

La PON1 est le membre de la famille des PON qui a été le plus étudié du fait de son rôle dans l'élimination des pesticides organophosphorés et des gaz neurotoxiques. Ces molécules n'étant pas présentes habituellement dans l'organisme, des recherches ont été

réalisées afin de mettre en évidence de nouveaux substrats et éventuellement, d'attribuer à la PON1 de nouvelles fonctionnalités.

Ainsi, des études ont montré que la PON1 possède des propriétés anti-oxydantes (Durrington *et al.*, 2001 ; Devarajan *et al.*, 2014, Soran *et al.*, 2015). En effet, elle est capable de protéger les HDL et les LDL de l'oxydation en hydrolysant les lipides oxydés (Mackness *et al.*, 1993 ; Watson *et al.*, 1995 ; Aviram *et al.*, 1998a). La cystéine située en position 283 est essentielle pour l'activité anti-oxydante de la PON1 (Aviram *et al.*, 1998b). Une étude réalisée en utilisant des HDL aviaires qui ne contiennent pas de PON1 a montré qu'ils ne peuvent pas protéger les LDL de l'oxydation (Mackness *et al.*, 1998). Ces résultats ont permis de montrer que la PON1 est importante pour les propriétés anti-oxydantes des HDL (Mackness *et al.*, 1998). D'autre part, les HDL provenant de souris KO pour la PON1 sont incapables de protéger les LDL de l'oxydation. De plus, les HDL et les LDL de ces souris sont plus sensibles à l'oxydation (Shih *et al.*, 1998). L'utilisation de souris transgéniques pour la PON1 humaine a permis de confirmer ces résultats. En effet, les HDL provenant de ces souris protègent plus efficacement les LDL de l'oxydation (Tward *et al.*, 2012). La PON1 possède également des propriétés anti-inflammatoires. La production de MCP-1 (Monocyte chemoattractant Protein-1) induite par les lipoprotéines et les lipides oxydés est une étape importante du processus inflammatoire (Camps *et al.*, 2012). Des études ont montré que la PON1, en hydrolysant les lipides oxydés des LDL, empêche la production de MCP-1 par les cellules endothéliales (Shi *et al.*, 1998 ; Mackness *et al.*, 2004). Elle réalise ainsi son effet anti-inflammatoire.

Les travaux réalisés par Rosenblat et ses collaborateurs ont permis de montrer que la PON1, en induisant la production de LysoPC, est capable d'augmenter la liaison des HDL aux macrophages et de stimuler l'efflux du cholestérol via ABCA1. Les histidine en position 115 et 134 seraient indispensables à l'activité de la PON1 (Rosenblat *et al.*, 2005 ; Rosenblat *et al.*, 2006a). Des études réalisées par mon laboratoire d'accueil ont permis de montrer que la PON1, en hydrolysant les lipides oxydés présents dans les LDL, induit la formation de LysoPC. Cette dernière stimulerait l'expression des transporteurs ABCA1 et ABCG1 et ainsi, favoriserait l'efflux du cholestérol vers ApoA-1 (Berrougui *et al.*, 2012 ; Ikhlef *et al.*, 2016).

La PON1 possède également une activité homocystéine-thiolactonase qui lui permet d'hydrolyser et d'éliminer l'homocystéine-thiolactone. Ce dernier est capable de modifier le résidu lysine des protéines (N-homocystéinylation) ce qui va conduire à une

altération de leur structure et de leur fonction. Il est à noter que l'hyperhomocystéinémie est un facteur de risque pour les maladies cardiovasculaires et les maladies neurologiques (Perla-Kajan et Jakubowski, 2010 ; Perla-Kajan et Jakubowski, 2012 ; Menini et Gugliucci, 2014).

Les deux principaux polymorphismes du gène codant pour la PON1 sont : 192Q/R qui correspond à la substitution d'une glutamine en position 192 par une arginine, et 55L/M qui correspond à la substitution de la leucine en position 55 par une méthionine. Ils sont situés dans la région codante du gène. Le polymorphisme 192Q/R a un effet sur l'activité paraoxonase de la PON1 alors que le polymorphisme 55L/M est associé à la concentration plasmatique de la PON1. L'allèle R du polymorphisme 192Q/R est associé à une plus forte activité paraoxonase, et l'allèle L du polymorphisme 55L/M est associé à une plus forte concentration plasmatique de PON1. Ainsi, le phénotype 192QQ/55MM est généralement associé à une faible activité PON1. En revanche, ce phénotype est le plus efficace pour l'élimination des lipides oxydés (Mackness *et al.*, 2000). Les travaux réalisés par Gaidukov et ses collaborateurs ont montré que la PON1 192Q se fixe avec une plus faible affinité aux HDL que la PON1 192R ce qui entraîne une baisse de sa stabilité et une diminution de sa capacité à stimuler l'efflux du cholestérol (Gaidukov *et al.*, 2006).

Il existe d'autres polymorphismes dans le gène codant pour la PON1. En effet, plus de 160 SNP ont été identifiés. Ils sont localisés dans la région codante du gène, dans les introns et dans la région régulatrice du gène (Menini et Gugliucci, 2014).

2) La PON1 dans la MA

La PON1 est capable d'hydrolyser les composés organophosphorés comme les pesticides et les gaz neurotoxiques. De ce fait, une baisse de l'activité PON1 pourrait conduire à un défaut d'élimination de ces composés neurotoxiques et ainsi, à une augmentation des risques de développer des maladies neurodégénératives comme la MA.

Le stress oxydant et l'inflammation sont des événements caractéristiques de la MA. Or, la PON1 confère aux HDL des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires. De ce fait, une baisse de la fonctionnalité de la PON1 pourrait être impliquée dans le développement de la MA.

La PON1 serait capable de stimuler l'efflux du cholestérol via la production de LysoPC. De ce fait, une baisse de fonctionnalité de cette protéine pourrait conduire à une altération de l'homéostasie du cholestérol cellulaire provoquant ainsi, une augmentation des activités β et γ -sécratases.

Des études ont montré que l'activité PON1 est diminuée chez les personnes ayant la MA (Paragh *et al.*, 2002 ; Wehr *et al.*, 2009 ; Zengi *et al.*, 2012). De plus, l'étude réalisée par Wehr et ses collaborateurs a pu montrer que l'activité PON1 est corrélée positivement avec le score obtenu en MMSE chez les personnes présentant une démence (Wehr *et al.*, 2009). Enfin, des études ont montré qu'une faible activité PON1 serait associée à une augmentation des risques de développer la MA (Erllich *et al.*, 2012 ; Bednarska-Makaruk *et al.*, 2013). Il est à noter que l'étude réalisée par Dantoine et ses collaborateurs a montré que l'activité PON1 est diminuée chez les personnes présentant une démence vasculaire alors qu'elle est augmentée chez les personnes ayant la MA. En revanche, l'activité PON1 est inchangée chez les MCI par rapport aux contrôles. Les auteurs en concluent que l'activité PON1 pourrait servir à distinguer les démences vasculaires de la MA (Dantoine *et al.*, 2002). Une étude réalisée par Cervellati et ses collaborateurs a eu pour but de déterminer si les activités Paraoxonase et Arylestérase peuvent servir à prédire la conversion clinique des MCI en MA ou en démence vasculaire. Les activités Paraoxonase et Arylestérase ont été mesurées chez 141 MCI et 78 contrôles. Après deux années de suivis, 86 MCI sont restés stables, 34 sont convertis en MA et 21 ont évolués vers une démence vasculaire (Cervellati *et al.*, 2015). Les résultats montrent qu'une faible activité Arylestérase et Paraoxonase sont associées à une augmentation des risques de conversion des MCI en démence vasculaire (Cervellati *et al.*, 2015). Une étude s'est intéressée à la relation entre les niveaux de LDL oxydées et l'activité PON1 ou l'activité PAF-AH dans la MA. Les niveaux de LDL oxydées, l'activité PON1 (Paraoxonase, Arylestérase et Lactonase) et l'activité PAF-AH ont été mesurés dans le plasma de 49 patients ayant la MA et dans le plasma de 34 contrôles. Les résultats montrent que l'activité PAF-AH et les niveaux de LDL oxydées sont augmentés chez les personnes souffrant de la MA par rapport aux sujets contrôles alors que l'activité PON1 est diminuée chez les personnes souffrant de la MA par rapport aux sujets contrôles. Ces résultats conduisent à une baisse du rapport PON1/PAF-AH qui peut contribuer à l'inflammation et au stress oxydant des lipoprotéines plasmatiques. En effet, cette étude a pu montrer qu'il existe une

corrélation négative entre le rapport PON1/PAF-AH et les niveaux de LDL oxydées (Bacchetti *et al.*, 2015).

Plusieurs études se sont intéressées au rôle de certains polymorphismes de la PON1 dans la MA et ont montré que le polymorphisme 192Q/R de la PON1 n'est pas associé à la MA (Pola *et al.*, 2003 ; Shi *et al.*, 2004 ; Leduc et Poirier, 2008 ; Chapuis *et al.*, 2009 ; Leduc *et al.*, 2009 ; Klimkowicz-Mrowiec *et al.*, 2011b ; Pi *et al.*, 2012 ; Wingo *et al.*, 2012). À l'inverse, certaines études ont montré que l'allèle R du polymorphisme 192Q/R serait un facteur protecteur pour la MA (Scacchi *et al.*, 2003 ; He *et al.*, 2006). Le polymorphisme 192Q/R aurait, également, un effet sur les niveaux de peptides amyloïdes dans le cortex frontal des personnes Alzheimer. Ainsi, les personnes Alzheimer porteuses d'au moins un allèle R présentent une baisse d'environ 1.8 fois des niveaux d'A β 42, et une diminution d'environ 3.8 fois du rapport A β 42/A β 40 par rapport aux personnes Alzheimer possédant le génotype QQ (Leduc *et al.*, 2009).

Concernant le polymorphisme 55L/M, certaines études ont montré qu'il ne serait pas associé au risque de développer la MA (Klimkowicz-Mrowiec *et al.*, 2011b ; Pi *et al.*, 2012 ; Wingo *et al.*, 2012). À l'inverse, d'autres études ont montré que le polymorphisme 55L/M serait associé au risque de développer la MA, et aurait un effet sur les niveaux de peptides amyloïdes, l'accumulation des plaques séniles et sur le système cholinergique. L'allèle M du polymorphisme 55L/M serait associé à une augmentation des risques de développer la MA. Les personnes présentant la MA qui portent le génotype MM ont une baisse de leur niveau d'A β 40 et une augmentation de leur rapport A β 42/A β 40 dans leur hippocampe et leur cortex frontal par rapport aux personnes atteintes de la MA de génotype LM et LL (Leduc et Poirier, 2008 ; Leduc *et al.*, 2009). Le polymorphisme 55L/M a un effet sur la densité des plaques séniles chez les hommes et chez les femmes. Ainsi, les hommes porteurs du génotype MM ont plus de plaques séniles que les porteurs du génotype LL. À l'inverse, chez les femmes porteuses d'au moins un allèle M, la densité des plaques séniles est plus faible que chez les femmes porteuses du génotype LL (Leduc et Poirier, 2008 ; Leduc *et al.*, 2009). Le polymorphisme 55L/M aurait également un effet sur le système cholinergique. Ainsi, dans le cortex frontal, la densité de récepteurs nicotiques est significativement diminuée chez les personnes atteintes de la MA porteuses de l'allèle M par rapport aux contrôles et par rapport aux personnes atteintes de la MA non porteuses de l'allèle M.

Le polymorphisme 55L/M est associé à l'activité acétylcholine transférase dans le cortex temporal, l'hippocampe et le thalamus. En effet, les personnes atteintes de la MA de génotype MM ont une plus faible activité acétylcholine transférase que les personnes atteintes de la MA porteuses des génotypes LL et LM (Leduc et Poirier, 2008 ; Leduc *et al.*, 2009).

Une étude a montré que le polymorphisme -161C/T, situé dans la région promotrice du gène codant pour la PON1, serait associé à la MA. Ainsi, l'allèle T serait un facteur de risque pour le développement de la MA (Erlich *et al.*, 2006). Au contraire, certaines études ont montré que ce polymorphisme n'est pas associé à la MA (Cellini *et al.*, 2006 ; Chapuis *et al.*, 2009 ; Klimkowicz-Mrowiec *et al.*, 2011b). L'étude réalisée par Chapuis et ses collaborateurs a montré que le polymorphisme -107G/A, situé dans la région promotrice du gène codant pour PON1, est associé à la MA (Chapuis *et al.*, 2009).

Les inhibiteurs des acétylcholinestérases sont utilisés dans le traitement de la MA. Cependant, tous les patients ne répondent pas avec la même efficacité à ce traitement. Une étude a montré que le polymorphisme 192Q/R de la PON1 a un effet sur l'efficacité de la réponse aux inhibiteurs des acétylcholinestérases chez les personnes atteintes de la MA. Ainsi, les individus qui répondent aux inhibiteurs des acétylcholinestérases ont plus fréquemment l'allèle R (Pola *et al.*, 2005). A l'inverse, une étude a montré que les polymorphismes 192Q/R, 55L/M et -161C/T du gène codant pour PON1 n'ont pas d'effet sur l'efficacité de la réponse aux inhibiteurs des acétylcholinestérases chez les personnes atteintes de la MA (Klimkowicz-Mrowiec *et al.*, 2011a).

Les études réalisées sur le rôle de la PON1 dans la MA ont donné des résultats contradictoires. De ce fait, nous ne pouvons pas conclure quant à une implication de cette enzyme dans le développement de cette maladie.

VI. Projet de Recherche

1) Hypothèses

Nous faisons l'hypothèse que l'efflux du cholestérol périphérique puisse être altéré dans la MA. Cette altération pourrait refléter une perturbation de l'efflux du cholestérol au niveau du SNC. En effet, l'ApoA-I périphérique est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique pour rejoindre le SNC où, elle participe, entre autre, à l'efflux du cholestérol. Une perturbation de l'efflux du cholestérol conduirait à une accumulation de cholestérol dans les cellules et ainsi, à une localisation de la protéine APP préférentiellement au niveau des radeaux lipidiques où sont localisés les β et γ -sécrétases. Il en résulterait une augmentation de la production des peptides A β .

De plus, une perturbation de l'efflux du cholestérol périphérique pourrait avoir des conséquences sur le SNC. En effet, les études réalisées *in vivo* ont montré qu'une hypercholestérolémie, induite par l'alimentation, conduit à une augmentation de la production des peptides amyloïdes, et à une accumulation de plaques séniles. Donc, une perturbation périphérique de l'homéostasie du cholestérol pourrait avoir des conséquences sur le SNC.

Il est à noter qu'une altération du transport reverse du cholestérol, dont l'efflux du cholestérol est la première étape, est une caractéristique des maladies cardiovasculaires. Une altération de l'efflux du cholestérol périphérique pourrait donc conduire à une perturbation de l'unité cérébro-vasculaire et ainsi, à une altération de la barrière hémato-encéphalique ce qui entraînerait un passage de cholestérol de la périphérie vers le SNC. Des composés neurotoxiques périphériques pourraient également pénétrer dans le SNC et favoriser le développement de la MA.

L'altération de l'efflux du cholestérol pourrait être due à un dysfonctionnement des HDL et/ou à une modification de l'expression des transporteurs impliqués dans l'efflux du cholestérol.

Des études ont montré que les peptides amyloïdes sont capables de stimuler l'efflux du cholestérol, du cerveau vers la périphérie, en formant des particules de type HDL. De plus, des études ont montré que ces peptides sont transportés par les HDL dans le plasma. En fonction de leur concentration dans les HDL, ils seraient soit antioxydant soit prooxydant pour ces particules. On peut donc se demander si les peptides amyloïdes sont capables de stimuler l'efflux du cholestérol des macrophages ou s'ils sont capables d'altérer l'efflux du cholestérol en perturbant la fonctionnalité des HDL.

La PON1 qui est une protéine associée aux HDL est impliquée dans l'élimination des composés organophosphorés comme les pesticides et les gaz neurotoxiques. Elle possède des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires. De plus, elle serait capable de stimuler l'efflux du cholestérol réalisé par les HDL via la production de LysoPC. Nous pensons donc qu'une altération des fonctionnalités de la PON1 pourrait contribuer au développement de la MA. En effet, une réduction de l'activité paraoxonase pourrait conduire à un défaut d'élimination des composés organophosphorés neurotoxiques et ainsi, contribuer au développement de la MA. De plus, une baisse de fonctionnalité de la PON1 pourrait conduire à une altération des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires des HDL ce qui pourrait contribuer au développement du stress oxydant et de l'inflammation dans la MA. Enfin, une altération de la PON1 pourrait conduire à une baisse de sa capacité à stimuler l'efflux du cholestérol réalisé par les HDL. Les polymorphismes 192Q/R et 55L/M ayant un effet sur l'activité PON1 et sur la concentration plasmatique de l'enzyme, respectivement, pourraient être associés à la MA.

2) Objectifs

Objectif général : étudier le rôle des HDL dans la régulation du cholestérol dans la MA.

Objectif 1 :

Investiguer le niveau d'altération de l'efflux du cholestérol périphérique dans la MA, et les mécanismes à l'origine de cette altération.

Objectif 2 :

Déterminer le lien entre le niveau d'activité de la PON1 et ses polymorphismes 192Q/R et 55L/M dans la MA.

Article 1

Alteration of High-Density Lipoproteins functionality in Alzheimer's disease patients

Auteurs de l'article : Camponova Paméla, Le Page Aurélie, Hicham Berrougui, Lamoureux Julie, Pawelec Graham, Witkowski M. Jacek, Fulop Tamas, Khalil Abdelouahed

Statut de l'article : Article accepté dans le Canadian Journal of Physiology and Pharmacology

Avant-propos : Pour la réalisation de cet article, j'ai effectué l'intégralité des expériences à l'exception, du recrutement des patients. J'ai contribué à l'analyse et à l'interprétation des résultats mais également, à la rédaction de l'intégralité du manuscrit avec l'aide de mes directeurs de recherche.

Résumé :

Le but de cette étude est de déterminer si l'efflux du cholestérol réalisé par les HDL est altéré dans la MA, et de rechercher le rôle et les effets des peptides amyloïdes dans la régulation de l'activité anti-athérogène des HDL. Quatre vingt sept (87) personnes âgées ont été recrutées parmi lesquelles, 27 sujets en santé, 27 sujets ayant un MCI, et 33 personnes présentant la MA (mAD). Nos résultats montrent que le niveau de cholestérol total est négativement corrélé avec le score obtenu en MMSE ($r = -0.2602$, $p = 0.0182$). Les HDL des patients mAD réalisent moins efficacement l'efflux du cholestérol des macrophages J774 ($p < 0.05$) que les HDL des sujets santé et des sujets MCI. Les HDL des sujets MCI réalisent moins efficacement l'efflux du cholestérol des macrophages J774 que les HDL des sujets santé mais, la différence n'est pas statistiquement significative. Il est à noter que la baisse de capacité des HDL MCI et mAD à réaliser l'efflux du cholestérol par rapport aux HDL santé n'est plus statistiquement significative lorsque les macrophages J774 surexpriment le transporteur ABCA1.

La fluidité des HDL est inversement corrélée avec le score en MMSE ($r = -0.4137$, $p < 0.009$). Nos résultats montrent également que ni $A\beta_{1-40}$ ni $A\beta_{1-42}$ stimulent l'efflux du cholestérol des macrophages J774 enrichis ou non en ABCA1.

Mots-clés : HDL, efflux du cholestérol, bêta-amyloïde, maladie d'Alzheimer

List of abbreviations:

A β : amyloid-beta

ABCA1 : ATP-binding cassette transporter sub-family A member 1

ABCG1 : ATP-binding cassette transporter sub-family G member 1

AD : Alzheimer's disease

ApoA-1 : Apolipoprotein A-1

APP : amyloid precursor protein

BACE : Beta-Site APP-Cleaving Enzyme

HDL : High-Density Lipoproteins

LDL : Low Density Lipoproteins

mAD : mild Alzheimer's disease

MDA : malondialdehyde

MDM : monocyte-derived macrophages

MCI : mild cognitive impairment

MFI : Mean fluorescence intensity

MMSE : Mini Mental State Examination

PBMC : Peripheral blood monocyte cells

SR-B1 : Scavenger receptor class B type 1

SH : Sulfhydryl

Abstract

The aims of the present study were to determine whether High-Density Lipoproteins functionality (HDL)-mediated cholesterol efflux is altered in Alzheimer's disease and to investigate the role and effect of amyloid-beta ($A\beta$) in the regulation of the anti-atherogenic activity of HDL. Eighty-seven elderly subjects were recruited, of whom 27 were healthy, 27 had mild cognitive impairment (MCI), and 33 had mild Alzheimer's disease (mAD). Our results showed that total cholesterol levels are negatively correlated with the Mini Mental State Examination (MMSE) score ($r = -0.2602$, $p = 0.0182$). HDL from the mAD patients was less efficient at mediating cholesterol efflux from J774 macrophages ($p < 0.05$) than HDL from the healthy subjects and MCI patients. While HDL from the MCI patients was also less efficient at mediating cholesterol efflux than HDL from the healthy subjects, the difference was not significant. Interestingly, the difference between the healthy subjects and the MCI and mAD patients with respect to the capacity of HDL to mediate cholesterol efflux disappeared when ABCA1-enriched J774 macrophages were used. HDL fluidity was significantly inversely correlated with the MMSE scores ($r = -0.4137$, $p < 0.009$). *In vitro* measurements of cholesterol efflux using J774 macrophages showed that neither $A\beta_{1-40}$ nor $A\beta_{1-42}$ stimulate cholesterol efflux from unenriched J774 macrophages in basal or ABCA1-enriched J774 macrophages.

Keywords: HDL, cholesterol efflux, amyloid beta, Alzheimer's disease

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the principal cause of dementia worldwide, affecting approximately 35 million people. Since the major risk factor for AD is age, the aging of the population means that the number of people suffering from AD will only increase. The mechanism underlying AD is not clearly understood. As such, no treatments are currently available to prevent, slow, or arrest this disease.

The two main pathological characteristics of AD are the accumulation of amyloid-beta ($A\beta$) peptides in senile plaques and the presence of neurofibrillary tangles in the brain. Senile plaques are formed by the aggregation of $A\beta$ peptides, mainly $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$. These peptides are derived from the two-step proteolytic cleavage of the amyloid precursor protein (APP). During the first step, APP is cleaved either by an α -secretase (non-amyloidogenic pathway) or by a β -secretase (BACE) (amyloidogenic pathway). During the second step, γ -secretase induces the production of $A\beta$ if APP has been cleaved by BACE. $A\beta$ are also produced in healthy aged people. However, the physiological role of $A\beta$ is not clear. Some studies have shown that the $A\beta$ are involved in cholesterol transport by forming HDL-like particles (Michikawa *et al.*, 2001; Nomura *et al.*, 2013; Umeda *et al.*, 2010).

Cholesterol is an essential component of the brain. Cholesterol in the brain accounts for 25% of all cholesterol in the body and plays an important role in neuronal plasticity and function. High cholesterol levels in cells, particularly in lipid rafts, induce the amyloidogenic cleavage of APP, resulting in enhanced $A\beta$ formation (Xiong *et al.*, 2008). Conversely, low cholesterol levels induce the non-amyloidogenic cleavage of APP and a decrease in β -secretase activity. Cholesterol metabolism, especially cholesterol transport, may thus be involved in the development and progression of AD.

Epidemiological and experimental studies have shown that hypercholesterolemia is a risk factor for AD (Refolo *et al.*, 2000; Refolo *et al.*, 2001; Shie *et al.*, 2002; Umeda *et al.*, 2012; Wolozin, 2001). Moreover, total cholesterol levels in the AD brain are higher than those in the healthy brain (Xiong *et al.*, 2008). These studies suggest that cholesterol metabolism, especially cholesterol efflux, may be altered in AD. Alterations of cholesterol efflux can also induce an increase in cholesterol levels in the brains, contributing to an increase in $A\beta$ levels.

Cholesterol efflux is mediated by apoA-1 and HDL particles and allows the transport of cholesterol from cells to the circulation for elimination by the liver. Three cholesterol efflux pathways have been identified: passive diffusion, SR-BI receptor mediated-cholesterol efflux, and ABCA1/ABCG1-mediated cholesterol transport. Cholesterol efflux is initiated by the efflux of phospholipids and cholesterol to apoA-1 via its interaction with the ABCA1 transporter. A study by Khalil et al. suggested that the interaction between apoA-1 and the ABCA1 transporter may be altered in AD (Khalil *et al.*, 2012). They also showed that ApoA-1 purified from the plasma of AD patients is less effective at mediating cholesterol efflux from J774 macrophages via the ABCA1 pathway than apoA-1 purified from healthy plasma (Khalil *et al.*, 2012).

Given the importance of cholesterol efflux in the regulation of membrane cholesterol and the modulation of A β formation, the aims of the present study were to determine whether HDL-mediated cholesterol efflux is altered in AD and to investigate the role and effect of A β in the regulation of HDL-mediated cholesterol efflux.

Materials and methods

Reagents

n-butanol and methanol were from Fisher (Canada). 1,1,3,3-Tetraethoxypropane, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 8-(4-chlorophenylthio)adenosine 3',5'-cyclic mono-phosphate sodium salt (cpt-cAMP), sodium hydroxide (NaOH), polyethylene glycol (PEG), Lipopolysaccharide (LPS), butylated hydroxytoluene (BHT), 2-thiobarbituric acid, 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH), DNPH, and DTNB were from Sigma (USA). The J774 cells were from the American Type Culture Collection (ATCC, USA). RPMI 1640, Dulbecco's-modified medium (DMEM), penicillin/streptomycin, sodium pyruvate, PBS, bovine serum albumin (BSA), and fetal bovine serum (FBS) were from Wisent Inc. (Canada). M-CSF was from Peprotech (Canada). [³H]-cholesterol was from Perkin Elmer. A β 40 and A β 42 were from Tocris Bioscience (USA).

Subjects

Eighty-seven elderly subjects were recruited, of whom 27 were healthy (mean age 71 \pm 5.39 years), 27 had mild cognitive impairment (MCI) (mean age 74 \pm 5.02 years), and 33 had mild Alzheimer's disease (mAD) (mean age 79 \pm 4.7 years). The healthy elderly subjects were living at home and were functionally independent and cognitively intact. They were selected based on the SENIEUR (Senior Europeans) protocol recognized by the EURAGE Program on Aging of the European Community as the standard selection protocol for immuno-gerontological studies (Ligthart *et al.*, 1984). The MCI and mAD patients were selected from the records of the Memory Clinic of the Sherbrooke University Geriatric Institute. The mAD patients had been diagnosed with probable AD based on the fourth edition of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV) published by the American Psychiatric Association in 1994 and the criteria of the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke/Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS_ADRDA) (McKhann *et al.*, 1984). All the healthy subjects and MCI and AD patients underwent the Folstein Mini-Mental State Examination (MMSE) test (Folstein *et al.*, 1975). All other dementias and neurological and psychiatric disorders were excluded. The AD patients had no vascular problem, no kidney or liver disease, and were only slightly hypertensive. None had cancer or a history of cerebral vascular accident, and none was

taking a statin or lipid-lowering agent. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the University of Sherbrooke. Informed, written consent was obtained from all the participants and/or their representatives. Their characteristics are summarized in Table 1.

Blood collection

After overnight fasting, 80 ml of blood was collected in heparin-containing vacuum tubes. The plasma was separated by low speed centrifugation (260 x g, 15 min, 22°C) and was stored at – 80°C until used. The pellet was used to isolate monocytes.

Human monocyte isolation and differentiation into macrophages

Peripheral blood monocyte cells (PBMC) were separated by density gradient centrifugation on Ficoll-Paque™ Plus columns (GE Healthcare Life Sciences). They were resuspended in RPMI 1640 medium containing penicillin and streptomycin.

Six-well or twelve-well plates were pre-coated with heat-inactivated AB human serum (Invitrogen) for 30 min. The PBMC were plated in twelve-well (3×10^6 cells per well) or six-well (10×10^6 cells per well) plates and were allowed to attach for 30 min. Unattached cells were removed, and adherent monocytes were washed twice with RPMI 1640 medium. The monocytes were cultivated in RPMI 1640 medium containing 10% heat-inactivated FBS, penicillin/streptomycin, and 50 ng/ml of M-CSF to allow differentiation into monocyte-derived macrophages (MDM). The medium was changed every 2-3 days. Differentiation into macrophages was complete after 7 days. The MDM were stimulated with 100 ng/mL of LPS for 24 h to direct the macrophages to the M1 route and to induce them to overexpress the ABCA1 transporter. These macrophages were used to measure cholesterol efflux and ABCA1 expression.

Measurement of ABCA1 expression on MDM

The MDM were incubated in 1% fixation buffer (BioLegend, USA) for 10 min and were then centrifuged at 5000 rpm for 5 min at 22°C. Non-specific sites were blocked for 15 min with 1% BSA in PBS. The cells were permeabilized for 15 min in Permwash (BD Bioscience, Canada) and were incubated for 30 min at room temperature with an anti-ABCA1 primary antibody (ab18180, 3 µg/10⁶ cells; Abcam). The MDM were

washed three times with PBS and were then incubated for 30 min at room temperature with goat anti-mouse IgG H&L (Alexa Fluor 488) antibody (ab150113, 1:500; Abcam). Following three washes with PBS, the cells were resuspended in 200 μ L of PBS, sorted by fluorescence activated cell sorting (FACS), and analyzed using FlowJo software.

Isolation of HDL

HDL were isolated by using the polyethylene glycol (PEG) precipitation method. Briefly, the plasma was mixed with an equal volume of PEG solution (20%, MW 5000-7000), and the mixture was incubated for 20 min at room temperature. The mixture was then centrifuged at 2000 x g for 20 min at 4°C, and the supernatant was collected (Izzo *et al.*, 1981).

Cholesterol efflux measurements

Cholesterol efflux was measured as described previously (Berrougui *et al.*, 2012). Briefly, MDM and J774 macrophages were loaded with [³H]-cholesterol (1 μ Ci/ml) for 24 h. Labeled macrophages were washed and were equilibrated in serum-free medium containing 1% BSA for an additional 12 h.

To produce ABCA1-enriched cells, [³H]-cholesterol-loaded J774 macrophages were equilibrated in DMEM containing 1% BSA and 0.3 mM cAMP (8-(4-chlorophenylthio)adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt) for 12 h (Bortnick *et al.*, 2000). The macrophages were then washed before being used for the cholesterol efflux measurements.

Labeled MDM were incubated for 4 h with plasma obtained from the same patient. J774 macrophages and ABCA1-enriched J774 macrophages were incubated for 4 h with HDL obtained from each patient. The medium was recovered and was centrifuged at 17 000 x g for 15 min at 4°C to eliminate cell debris. The cells were washed in PBS and were lysed in PBS containing 1 M NaOH. The radioactivity in the medium and the cell lysate was measured using a liquid scintillation counter (LS6500 multi-purpose scintillation counter; Beckman, USA). The percentage of cholesterol efflux was calculated using the following formula: [radioactivity of medium / (radioactivity of medium + radioactivity of lysate of cells)] x 100. The radioactivity is expressed in counts per minute (cpm).

Measurement of sulfhydryl groups

Free sulfhydryl (SH) groups on proteins in the plasma and HDL were measured using the DTNB method as described by Hu (Hu, 1994).

Measurement of carbonyl groups

Plasma and HDL protein carbonyl levels were assayed as described previously (Reznick & Packer, 1994). Briefly, carbonyl levels were determined by dinitrophenylhydrazine (DNPH) derivatization. DNPH reacts with carbonyl groups to form hydrazones, and the change in absorbance is measured at 360 nm ($\epsilon = 22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Measurement of lipid peroxidation

Lipid peroxidation was determined in the plasma and HDL by measuring malondialdehyde (MDA) and conjugated diene levels, respectively.

Plasma MDA levels were measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a 5 μm ODS 100 mm x 4.6 mm HP Hypersil column, a 5 μm ODS guard column, and a methanol:buffer (40:60, v:v) mobile phase. The buffer was 50 mM potassium monobasic phosphate. The pH was adjusted to 6.8 using 5 M KOH (Agarwal & Chase, 2002). The fluorescence detector was set at an excitation wavelength of 515 nm and an emission wavelength of 553 nm. Plasma samples were treated with BHT and were heat derivatized at 100°C for 1 h with thiobarbituric acid at acidic pH. Plasma MDA was extracted with *n*-butanol, and 10 μL was injected on the column. A standard curve of 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP) was prepared to determine the concentration of MDA.

HDL lipid peroxidation was evaluated by measuring conjugated diene formation. Briefly, the absorbance was measured at 234 nm in a 1 cm path length cuvette using a spectrophotometer (UH5300; Hitachi, Canada).

Measurement of HDL fluidity

HDL fluidity was based on measurements of the steady-state anisotropy of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) as described previously (Helal *et al.*, 2013). Briefly, 25 μg of HDL was incubated with 1 μM DPH for 15 min at 37°C. The steady-state fluorescent polarization of DPH was measured using a fluorescence spectrophotometer

(model F-4500; Hitachi, Canada). Fluidity is the inverse value of anisotropy and is expressed as $[1/r: \text{steady-state fluorescence anisotropy}]$. r was calculated using the following formula: $[(I_v - GI_p) / (I_v - 2GI_p)]$, where I_v and I_p are the parallel and perpendicular polarized fluorescence intensities, respectively, and G is the monochromator grating correction factor.

Measurement of plasma A β 42 levels

Plasma A β 42 levels were measured by ELISA using SensoLyte[®] Anti-Human β -Amyloid (1-42) Quantitative ELISA colorimetric kits (Anaspec) according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Values are expressed as means \pm SEM. A one-way ANOVA was used for multiple comparisons, followed by a Bonferroni and the Pearson correlation was calculated to assess the association between two continuous variables. All results were interpreted at an alpha level of 0.05. The statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6.0 software.

Results

The baseline characteristics of the healthy and patient groups are summarized in Table 1. There was a significant difference between the healthy subjects and the MCI and mAD patients with respect to age (71 ± 5.39 , 74 ± 5.02 and 79 ± 4.70 years, respectively). There was also a significant difference between the MMSE scores of the healthy subjects (MMSE = 29.67 ± 0.73) and the MCI (MMSE = 27.26 ± 1.95 , $p < 0.001$) and mAD (MMSE = 23.36 ± 3.85 , $p < 0.0001$) patients. However, there were no significant differences for the other biochemical parameters, including lipid profiles (triglycerides, total cholesterol, LDL and HDL cholesterol), apoA-1 concentrations, and apoA-1/HDL ratios.

Table 1 : Fasting plasma lipid parameters and Mini Mental State Examination (MMSE) scores of participating individuals.

	Healthy subjects	MCI	mAD
Age (years)	71 ± 5.39	74 ± 5.02	79 ± 4.7 ****
Sex, n (Male/Female)	8/19	5/22	7/26
Triglycerides (mM)	2.75 ± 1.93	2.19 ± 1.59	2.19 ± 1.53
Total cholesterol (mM)	4.00 ± 1.47	4.43 ± 1.57	4.51 ± 1.39
LDL cholesterol (mM)	2.15 ± 0.94	2.45 ± 1.17	2.53 ± 1.00
HDL cholesterol (mM)	1.57 ± 0.48	1.54 ± 0.51	1.39 ± 0.41
ApoA-1 (g/L)	1.63 ± 0.30	1.58 ± 0.31	1.61 ± 0.28
HDL/LDL	0.91 ± 0.59	0.79 ± 0.57	0.63 ± 0.29
Cholesterol/HDL	2.65 ± 0.95	3.05 ± 1.10	3.53 ± 1.57
ApoA-1/HDL	2.89 ± 0.95	2.79 ± 0.69	3.2 ± 0.87
MMSE scores	29.67 ± 0.73	27.26 ± 1.95 ***	23.36 ± 3.85 ****

Results are expressed as means \pm SD. *** $p < 0.001$ vs. Healthy subjects and **** $p < 0.0001$ vs. Healthy subjects

Measurement of plasma-mediated cholesterol efflux

In order to investigate the difference between the healthy subjects and the MCI and mAD patients with respect to the efflux of cholesterol from macrophages to the plasma, MDM from each patient were separately loaded with [3 H]-cholesterol for 24 h and were then incubated with 5% plasma from the same patient for 4 h. Cholesterol efflux from the MDM to the plasma was significantly lower for the MCI and mAD patients than for

the healthy subjects ($p < 0.05$) (**Figure 1A**). However, efflux was identical for the MCI and AD patients, suggesting that the alterations had already occurred in the MCI patients prior to AD development.

The level of cholesterol efflux depends on the capacity of macrophages to liberate cholesterol and on apoA-I/HDL to accept cholesterol. The process is initiated by an interaction between apoA-1 and the ABCA1 transporter on macrophages. To determine which factor is involved in the decrease in cholesterol efflux from the MDM to the plasma of the MCI and mAD patients, we measured ABCA1 expression on the MDM obtained from each patient and from the healthy subjects. There were no significant differences between ABCA1 expression on the MDM from the healthy subjects and from the MCI and mAD patients (**Figure 1B**), indicating that disease-associated differences did not reside at the level of ABCA1 transporter expression.

Figure 1

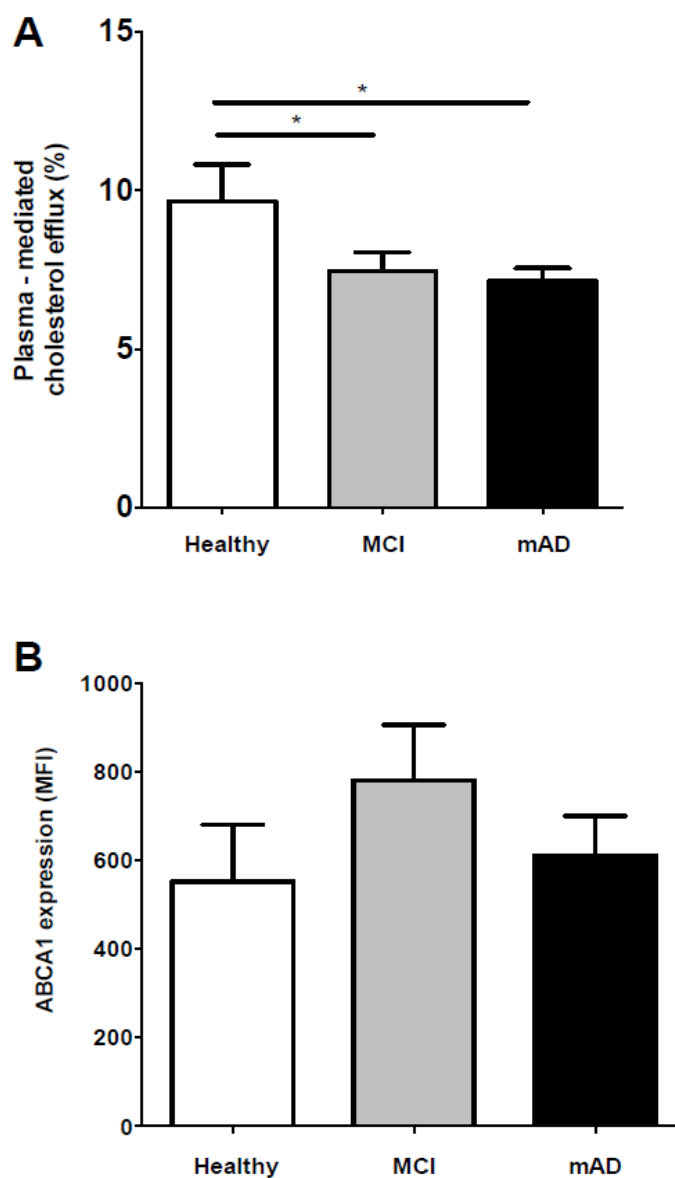


Figure 1: Alteration of cholesterol efflux in patients with cognitive decline is not caused by a decrease in the expression of the ABCA1 transporter

(A) Monocytes were differentiated into macrophages, were loaded with [³H]-cholesterol for 24 h, and were incubated for 4 h in efflux medium containing 5% plasma. The radioactivity in the medium and the cells was measured. The percentage of cholesterol efflux was calculated using the following formula: (cpm in medium / cpm in medium + cpm in cells) x 100. The results are expressed as means ± SEM. A one-way ANOVA test was used to compare the means of the patient groups with the mean of the healthy group. * $p < 0.05$ vs. healthy subjects. $n = 30$ ($n = 8$ healthy, $n = 10$ MCI, $n = 13$ mAD). **(B)** Monocytes were differentiated into macrophages for 7 days. ABCA1 expression was measured by FACS. The results are expressed as means ± SEM. A one-way ANOVA test was used to compare the means of the patient groups with the mean of the healthy group.

Alteration in the capacity of HDL to mediate cholesterol efflux in Alzheimer's disease

To further investigate why cholesterol efflux is altered in AD, the capacity of HDL from each patient to mediate cholesterol efflux from macrophages was measured. J774 macrophages were used to compare the cholesterol efflux capacity of HDL as a function of health status (healthy, MCI, and mAD). HDL was incubated for 4 h with unenriched J774 and ABCA1-enriched J774 macrophages (pre-incubated with 0.3 mM cAMP to induce ABCA1 expression) previously loaded with [³H]-cholesterol. The capacity of HDL from the mAD patients to mediate cholesterol efflux from unenriched J774 macrophages was relatively low ($p < 0.05$) (Figure 2) compared to the healthy and MCI groups.

Figure 2

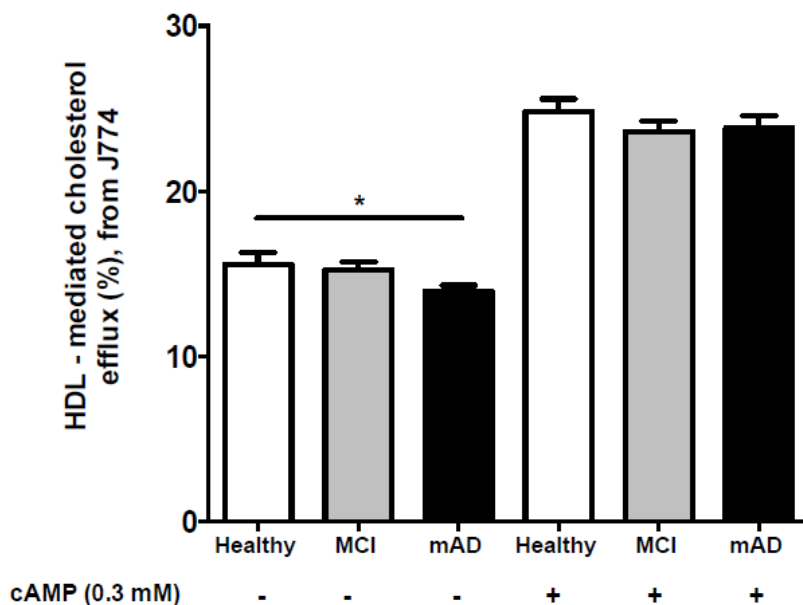


Figure 2: Alteration of HDL-mediated cholesterol efflux in Alzheimer's disease patients

J774 macrophages were loaded with [³H]-cholesterol for 24 h and were then equilibrated for 12 h in efflux medium containing cAMP (0.3 mM) to induce the expression of ABCA1. They were washed and were incubated for 4 h in efflux medium containing 5% HDL. The radioactivity in the medium and the cells was measured. The percentage of cholesterol efflux was calculated using the following formula: (cpm in medium / cpm in medium + cpm in cells) x 100. The measurements were performed in

triplicate for each subject. The results are expressed as means \pm SEM. A one-way ANOVA test was used to compare the means of the patient groups with the mean of the healthy group. * $p < 0.05$ vs. healthy subjects. $n = 57$ ($n = 17$ healthy, $n = 15$ MCI, $n = 25$ mAD).

Measurement of the oxidation of proteins and lipids in the plasma and HDL

In order to understand the alteration in the capacity of HDL to mediate cholesterol efflux, protein oxidation and lipid peroxidation levels were measured in the plasma and HDL. We previously showed that the age-related reduction of HDL-mediated cholesterol efflux is due, in part, to oxidative modifications to apoA-1 (Berrougui *et al.*, 2007). Oxidative modifications to proteins are determined by measuring free sulfhydryl (SH) and carbonyl group content. Interestingly, our results showed that AD patients possess a high plasma SH group content compared to the healthy subjects ($p < 0.05$) (**Figure 3A**). On the other hand, there was no significant difference among the three groups in terms of plasma carbonyl group content and MDA content (**Figures 3B and 3C**).

Figure 3

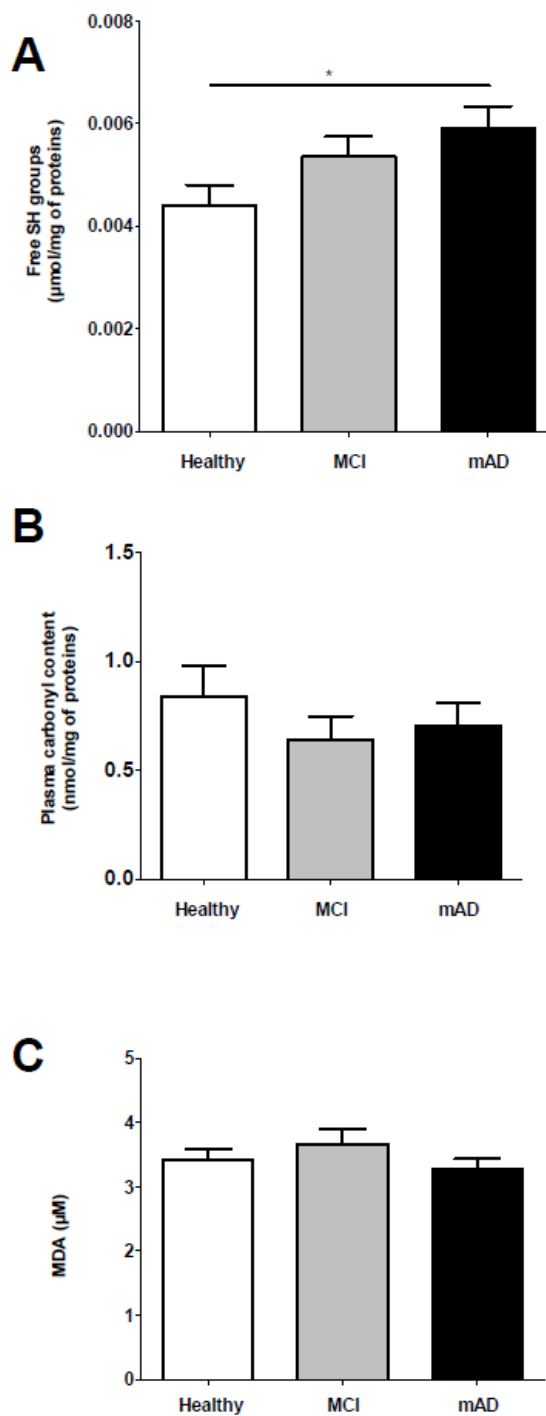


Figure 3: Effect of cognitive decline on the oxidation states of proteins and lipids in the plasma

(A) Free sulfhydryl groups were measured in the plasma using the DTNB method. $n = 59$ ($n = 15$ healthy, $n = 15$ MCI, $n = 29$ mAD). (B) Carbonyl groups were measured in the plasma. $n = 60$ ($n = 16$ healthy, $n = 15$ MCI, $n = 29$ mAD). (C) Lipid peroxidation was evaluated by measuring malondialdehyde (MDA) levels. $n = 59$ ($n = 15$ healthy, $n = 15$ MCI, $n = 29$ mAD). The results are expressed as means \pm SEM. A one-way ANOVA test was used to compare the means of the patient groups with the mean of the healthy group. * $p < 0.05$ vs. healthy subjects.

We then measured the free SH group, carbonyl group, and conjugated diene content of HDL from the three groups of subjects. The SH group content of the HDL from the mAD patients was significantly decreased compared to the healthy subjects (**Figure 4A**; $p < 0.05$). On the other hand, there was no significant difference among the three groups in terms of carbonyl group content. (**Figure 4B**). Interestingly, the conjugated diene content of the HDL from the MCI and mAD patients was significantly higher than that of the healthy subjects (**Figure 4C**).

Figure 4

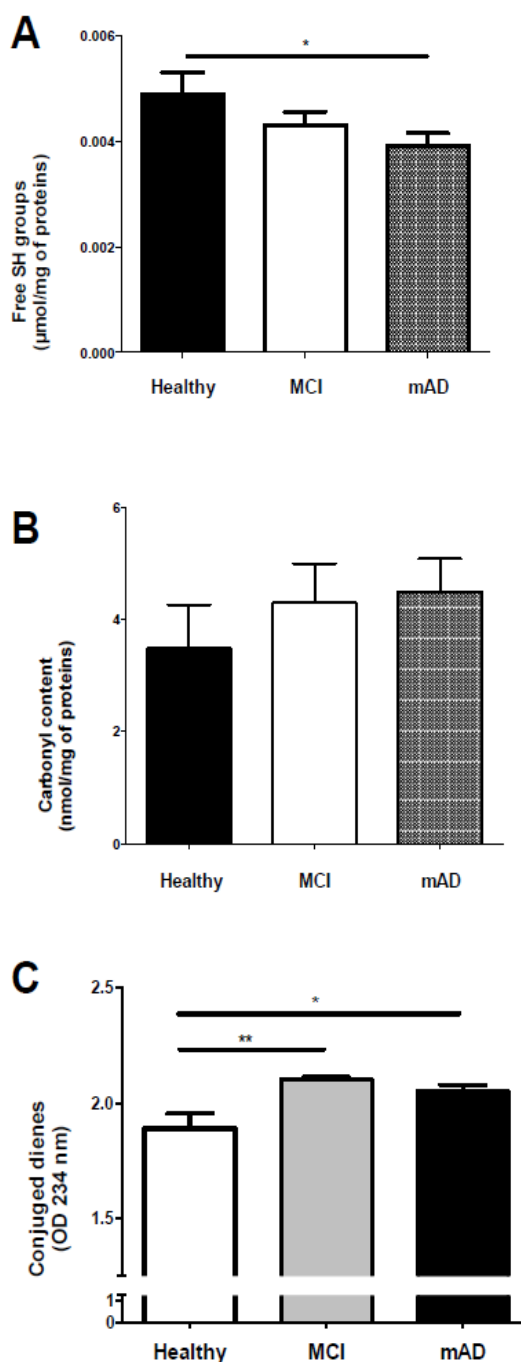


Figure 4: Effect of cognitive decline on the oxidation states of proteins and lipids in the HDL

(A) Free sulfhydryl groups were measured in the HDL using the DTNB method. $n = 59$ ($n = 15$ healthy, $n = 15$ MCI, $n = 29$ mAD). (B) Carbonyl groups were measured in the HDL. $n = 36$ ($n = 9$ healthy, $n = 9$ MCI, $n = 18$ mAD). (C) Lipid peroxidation was evaluated by measuring conjugated diene levels. $n = 29$ ($n = 10$ healthy, $n = 9$ MCI, $n = 10$ mAD). The results are expressed as means \pm SEM. A one-way ANOVA test was used to compare the means of the patient groups with the mean of the healthy group. * $p < 0.05$ vs. healthy subjects and ** $p < 0.01$ vs. healthy subjects.

Alteration of HDL fluidity during cognitive decline

In addition to oxidative modifications to HDL, the biophysical properties of HDL may help explain the decrease in the capacity of HDL from mAD patients to mediate cholesterol efflux. The fluidity of the lipid fraction of HDL is a major determinant of the capacity of HDL to mediate cholesterol efflux. Interestingly, despite the oxidative alterations to HDL as measured by conjugated diene formation, the fluidity of HDL from the mAD patients was higher than that of HDL from the healthy subjects (**Figure 5A**). In addition, HDL fluidity was significantly inversely correlated with the MMSE scores ($r = -0.4137$, $p < 0.009$, **Figure 5B**). The increase in the fluidity of HDL from the mAD patients suggested that the HDL particles had undergone biochemical changes.

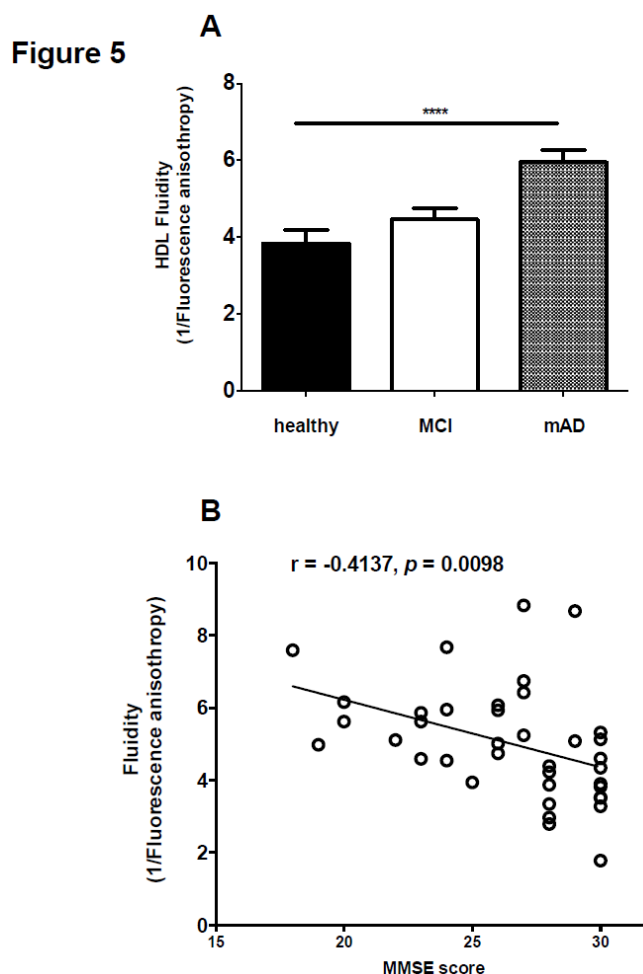


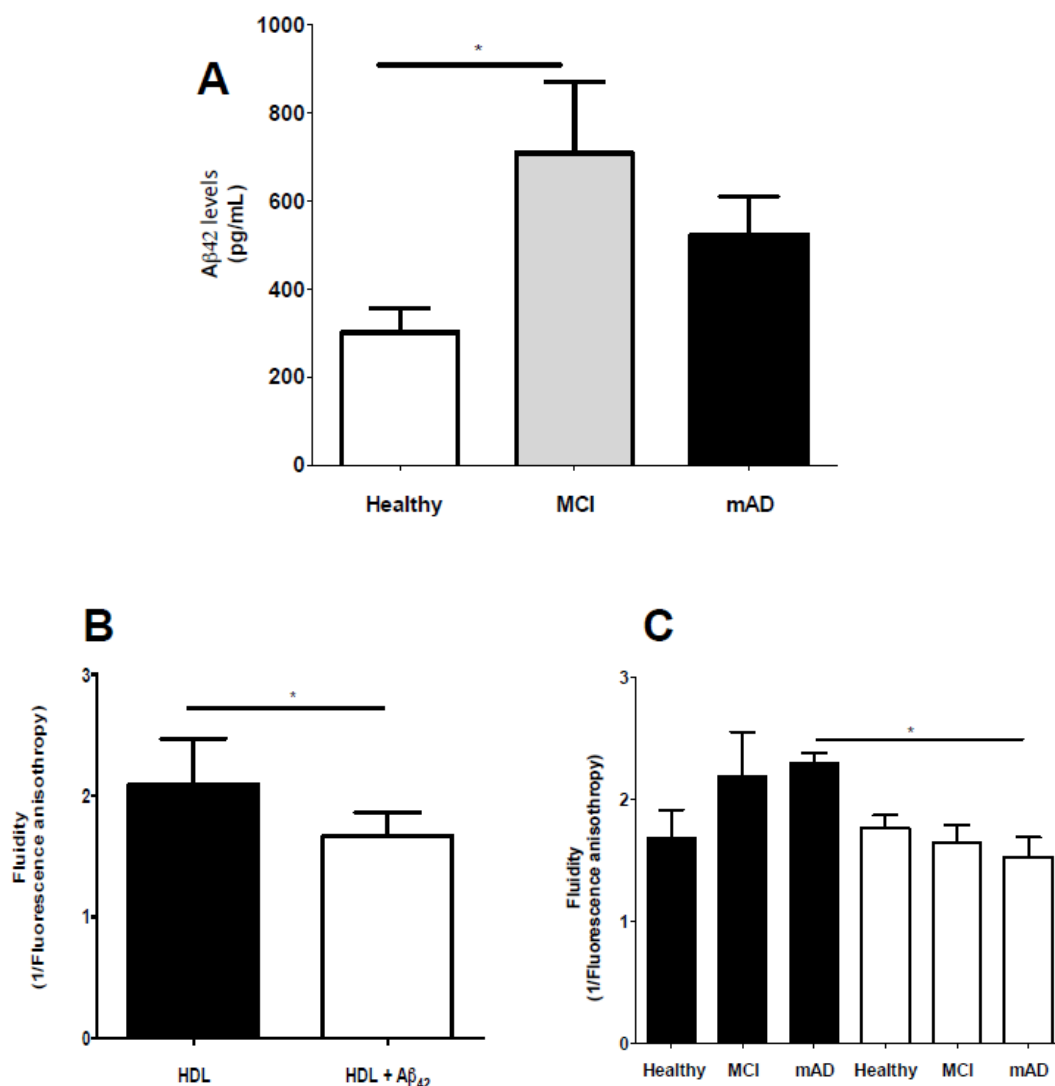
Figure 5: Effect of cognitive decline on HDL fluidity

Fluidity was measured by fluorescence polarization using the 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene probe. Fluidity is the inverse of anisotropy and is expressed as $1/r$ (r : steady-state fluorescence anisotropy). The measurements were performed in duplicate or triplicate for each subject. **(A)** Comparison of HDL fluidity among the groups. The results are expressed as means \pm SEM. A one-way ANOVA test was used to compare the means of the patient groups with the mean of the healthy group. **** $p < 0.0001$ vs. healthy subject. $n = 40$ ($n = 10$ healthy, $n = 10$ MCI, $n = 20$ mAD). **(B)** Correlation between HDL fluidity and the level of cognitive decline. The Pearson correlation was used to study the relationship between HDL fluidity and the MMSE score (cognitive decline). $n = 38$, $r = -0.4137$, $p = 0.0098$.

Effect of $A\beta_{1-42}$ on HDL fluidity

We next investigated the relationship between $A\beta_{1-42}$ levels and cholesterol homeostasis. A previous study by Umeda et al. had shown that $A\beta_{1-42}$ mediates cholesterol transport from the brain to the circulation, suggesting that $A\beta$ is involved in

the maintenance of cellular cholesterol homeostasis (Umeda *et al.*, 2010). Based on this, we measured the A β ₁₋₄₂ content of plasma from the healthy subjects and the MCI and mAD patients. Our results showed that MCI patients had significantly higher levels of plasma A β ₁₋₄₂ than the healthy subjects (**Figure 6A**). Since A β can be transported by HDL (Koudinov *et al.*, 1996), we hypothesized that A β ₁₋₄₂ associates with and modifies the structure of HDL, altering cholesterol efflux. To investigate this possibility, we measured HDL fluidity in the presence of A β ₁₋₄₂. Our results showed that incubating pooled purified HDL with A β ₁₋₄₂ for 4 h significantly reduced HDL fluidity (**Figure 6B**), depending on the origin of the HDL (**Figure 6B**). While no changes were observed in HDL fluidity when A β ₁₋₄₂ was incubated with HDL from the healthy subjects, A β ₁₋₄₂ significantly decreased the fluidity of HDL from the mAD patients (**Figure 6C**; $p < 0.05$). It should be noted that this decrease resulted in a return of the fluidity of HDL from MCI and mAD patients to the normal level seen in healthy subjects.

Figure 6**Figure 6: Effect of Aβ₄₂ on HDL fluidity**

(A) Measurement of Aβ₄₂ levels in the plasma. $n = 47$ ($n = 13$ healthy, $n = 13$ MCI, $n = 21$ mAD). The results are expressed as means \pm SEM. A one-way ANOVA test was used to compare the means of the groups. * $p < 0.05$ vs. healthy. (B and C) HDL were isolated from the plasma using the PEG method. The HDL were incubated for 4 h at 37°C with Aβ₄₂ (0.5 nM). After 4 h, HDL fluidity was measured by fluorescence polarization using the 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene probe. Fluidity was equal to $1/r$ (r : steady-state fluorescence anisotropy). The measurements were performed in triplicate. The results are expressed as means \pm SEM. A one-way ANOVA test was used to compare the means of the groups. * $p < 0.05$.

Effect of A β ₁₋₄₂ and A β ₁₋₄₀ on cholesterol efflux

We measured the capacity of A β ₁₋₄₂ and A β ₁₋₄₀ to stimulate HDL-mediated cholesterol efflux *in vitro*. Our results showed that A β ₁₋₄₂ and A β ₁₋₄₀, alone or in the presence of HDL, had no effect on cholesterol efflux from unenriched J774 macrophages (**Figure 7**). However, when ABCA1-enriched J774 macrophages were used, A β ₁₋₄₂ significantly reduced the capacity of HDL to mediate cholesterol efflux compared to HDL alone or to HDL incubated in the presence of A β ₁₋₄₀. A β ₁₋₄₂ appeared to alter HDL-mediated cholesterol efflux via the ABCA1 transporter by interacting with the transporter or by altering the structure of the HDL.

Figure 7

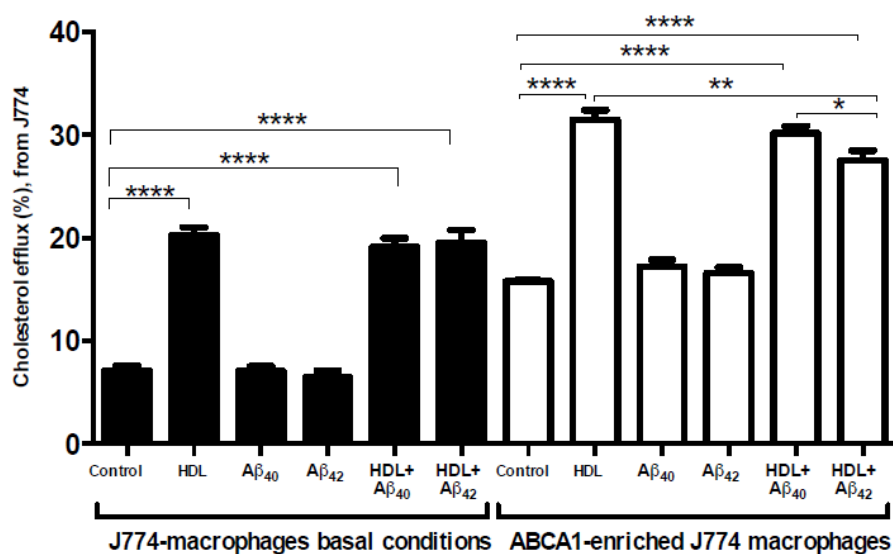


Figure 7: Effect of A β on cholesterol efflux

J774 macrophages were loaded with [³H]-cholesterol for 24 h and were then equilibrated for 12 h in efflux medium containing cAMP (0.3 mM) to induce ABCA1 expression. They were washed and incubated for 4 h in efflux medium (control), efflux medium containing 5% HDL (HDL), efflux medium containing A β ₄₀ or A β ₄₂ (0.5 nM), or efflux medium containing 5% HDL and A β ₄₀ or A β ₄₂ (0.5 nM). The radioactivity in the medium and the cells was measured. The percentage of cholesterol efflux was calculated using the following formula: (cpm in medium / cpm in medium + cpm in cells) x 100. The measurements were performed in triplicate. The results are expressed as means \pm SEM. A one-way ANOVA test was used to compare the means of the groups. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$.

Discussion

While the exact cause of AD is unknown, A β plaques contribute to AD and are correlated with disease progression. The production of A β is influenced by the cholesterol content of neuron membranes (Abad-Rodriguez *et al.*, 2004) and increases in parallel with the increase in cholesterol content (Simons *et al.*, 1998; Xiong *et al.*, 2008). Cellular cholesterol levels are strictly regulated by apoA-1/HDL-mediated cholesterol efflux via membrane ABCA1/ABCG1 transporters and the SR-BI receptor (Phillips, 2014; Zannis *et al.*, 2006). We previously showed that ABCA1-mediated cholesterol efflux is altered in AD (Khalil *et al.*, 2012). In the present study, we examined cholesterol efflux in MCI and AD and found that changes to the oxidative status and fluidity of HDL also have an impact on cholesterol efflux, with a putative very early protective role followed by the deleterious participation of A β . We also investigated these changes in MCI, which is the prodromal state of AD.

The lipid measurements showed that total cholesterol levels tended to be higher in the MCI and mAD patients than in the healthy subjects. In addition, total cholesterol levels were negatively correlated with the MMSE scores ($r = -0.2602$, $p = 0.0182$). LDL levels also tended to be higher in the mAD patients than in the healthy subjects, but not significantly so; reciprocally, HDL levels were lower in the mAD patients than in the healthy subjects, but again this difference was not statistically significant. These results suggest that cholesterol metabolism may be altered in MCI and AD, albeit not markedly. However, in biological terms, this could have an important impact over the long term. Indeed, some studies have shown that a decrease in HDL levels is a risk factor for dementia (Singh-Manoux *et al.*, 2008; Zuliani *et al.*, 2010) and that an increase of HDL levels can lower the risk of developing AD (Reitz *et al.*, 2010). Together, these data suggest that cholesterol efflux may influence the development and progression of AD.

Our results showed that the apoA-1 levels of the MCI and mAD patients and the healthy subjects did not change. A study by Bergt *et al.* showed that the plasma levels of apo-A1 were the same in AD patients and in healthy subjects (Bergt *et al.*, 2006). In contrast, some studies have shown that apo-A1 levels decrease during the progression of cognitive decline (Kawano *et al.*, 1995). Collectively, these findings suggest that cholesterol transport may be altered in AD and that a decrease in apo-A1 levels does not explain this alteration.

To determine whether cholesterol efflux is altered in AD, we measured this parameter using macrophages isolated from the patients; and their plasma as a cholesterol acceptor. Our results showed that cholesterol efflux was significantly lower in the MCI and mAD patients than in healthy subjects, suggesting that cholesterol efflux is disrupted in MCI and mAD but that the disruption cannot be explained by a decrease in apo-A1 levels. PBMCs of Alzheimer's patients accumulate more cholesterol and are less effective at mediating cholesterol efflux than those of healthy subjects (Pani *et al.*, 2009). Our results also showed that HDL levels and cholesterol efflux were lower in mAD patients than in the healthy subjects. A recent study by Voloshyna *et al.* (Voloshyna *et al.*, 2013) showed that the plasma of patients with rheumatoid arthritis manifested disturbed cholesterol homeostasis in macrophages due to decreased expression of cholesterol transporters (ABCA1 or ABCG1). So, unknown deleterious substances in the plasma could reduce the expression of cholesterol transporters on macrophages and result in a reduction of the cholesterol efflux. Besides, the lower cholesterol efflux observed in AD could be due to a decrease in the capacity of HDL to mediate cholesterol efflux.

The present study showed that cholesterol efflux was altered in the MCI and the mAD patients compared to the healthy subjects. Because there were no significant difference between the three groups in terms of ABCA1 expression on MDM, it is unlikely that the plasma-mediated decrease in cholesterol efflux observed in the MCI and mAD patients can be explained by a decrease in the expression of ABCA1 expression or a decrease in apo-A1 levels. Manda *et al.* recently reported that ABCA1 transporter mRNA levels in macrophages are the same Alzheimer's patients and aged healthy subjects (Mandas *et al.*, 2012).

We also hypothesized that alterations in cholesterol efflux observed with the mAD patients could be explained by a decrease capacity of HDL to mediate cholesterol efflux or by a decrease in ABCA1/apo-A1 interaction. We used unenriched J774 and ABCA1-enriched J774 macrophages to measure cholesterol efflux and showed that HDL from the mAD was less efficient at mediating cholesterol efflux from unenriched J774 macrophages than HDL from the healthy subjects. However, this difference disappeared when ABCA1-enriched J774 macrophages were used. These results showed that the interaction between apoA-1 and the ABCA1 transporter is not altered in AD and that the reduction in cholesterol efflux in the MCI and mAD patients compared to the healthy subjects was not due to a change in the ABCA1/ApoA-I pathway. As such, the

decrease in cholesterol efflux observed in the mAD patients may be caused by an alteration in cholesterol efflux via the SR-B1 receptor and/or the ABCG1 transporter. The results of a study by Koudinov et al., which are in agreement with this assumption, showed that the compositions of different subclasses of HDL is altered in Alzheimer patients (Koudinov *et al.*, 2001). However, there was an apparent discrepancy between the capacity of plasma and purified HDL to mediate cholesterol efflux in the MCI patients, suggesting that changes to HDL may be less important in MCI patients than in mAD patients and that the major determinant of reduced cholesterol efflux may be other components of the plasma such as increased A β levels.

Some studies have shown that oxidized HDL are less efficient at mediating cholesterol efflux (Girona *et al.*, 1997). AD has been associated with stresses encompassing oxidation of proteins, lipids, and nucleic acids (Reddy *et al.*, 2009). Accordingly, we measured oxidative modifications to proteins and lipids in plasma and HDL obtained from each patient and healthy subject. Our results showed that there was a slight but significant increase in SH groups in the plasma of mAD patients relative to the healthy subjects. A study by Russell and Siedlak (Russell *et al.*, 1999) showed that there are more SH groups in the plasma of AD patients than in the plasma of healthy subjects. They suggested that the increase in SH groups in AD is due to a compensatory response to an oxidative stress. The increase in the SH group content observed in the plasma from the mAD patients might thus be explained by an increase in oxidative stress. The compensatory mechanism that is activated in the presence of AD may explain the reduction in the formation of carbonyl groups in these patients compared to healthy subjects as previously shown by Aldred et al. (Aldred *et al.*, 2010). The fact that MDA levels were same in the plasma of the MCI and mAD patients and the healthy subjects lends support to this finding.

Interestingly, our measurements of the oxidative modifications of HDL indicated that there was an increase in oxidized lipids and proteins in the HDL particles. Indeed, our results showed that there were significantly fewer SH groups in the HDL from the mAD patients than in the HDL from the healthy subjects and that the conjugated diene content were higher in the HDL from the MCI and mAD patients than in the HDL from the healthy subjects. In a previous study, we showed that the HDL from AD patients were more oxidized than the HDL from healthy subjects (Khalil *et al.*, 2012). Moreover, a study by Schippling et al. (Schippling *et al.*, 2000) showed that AD lipoproteins in the

cerebrospinal fluid are more sensitive to oxidation than healthy lipoproteins. All these studies appear to suggest that HDL are oxidized in AD.

The oxidation of HDL particles leads to an alteration of the composition and structure of HDL, which modifies their functionality (Ferretti *et al.*, 2006). Our results showed that there was a significant increase in the fluidity of HDL from the mAD patients compared to the HDL from the healthy subjects. We also showed that HDL fluidity is inversely correlated with cognitive decline as measured by MMSE scores. Sibmooh *et al.* showed that the oxidative modification of HDL is accompanied by an increase in fluidity as measured by fluorescence anisotropy (Sibmooh *et al.*, 2004). Our results thus confirmed that the alterations to the HDL structure caused by oxidative modification of proteins and lipids may explain the reduction of the capacity of the HDL from the mAD patients to mediate cholesterol efflux.

A β plasma levels may also influence the capacity of HDL to mediate cholesterol efflux. Several studies have shown that A β associates with HDL in the plasma and the cerebrospinal fluid through an interaction with apolipoproteins (Biere *et al.*, 1996; Koudinov *et al.*, 1996; Kuo *et al.*, 1999). The association of A β with HDL in AD may affect the structure and functionality of HDL particles, leading to a decrease in their functionality and especially in their capacity to mediate cholesterol efflux. Our results showed that A β_{1-42} levels were significantly higher in the plasma of MCI patients compared to healthy subjects. Since the increase in A β_{1-42} levels did not appear to modify the capacity of HDL to mediate cholesterol efflux ($r = -0.1606$, $p = 0.2808$), the increase cannot not fully explain the reduction in cholesterol efflux in MCI. Umeda *et al.* used a mouse model to show that A β_{40} and A β_{42} can stimulate cholesterol efflux via ABCA1 by inducing the formation of HDL-like particles and that A β_{40} can transport cholesterol from the brain to the periphery (Umeda *et al.*, 2010). In the present study, the *in vitro* measurements of cholesterol efflux showed that neither A β_{1-40} nor A β_{1-42} stimulates cholesterol efflux from unenriched J774 or ABCA1-enriched J774 macrophages. Our results also showed that A β_{1-42} -enriched HDL from healthy subjects significantly affected their capacity to mediate cholesterol efflux from ABCA1-enriched J774 macrophages. This suggested that A β_{1-42} can alter cholesterol efflux by interacting with the ABCA1 transporter or by altering the structure of HDL. Measurements of HDL fluidity showed that the effect of A β_{1-42} on the structure HDL depends on the origin of the HDL. While no effect was observed with HDL from the healthy subjects, A β_{1-42}

significantly decreased the fluidity of HDL from mAD patients. Treating HDL from mAD patients with A β ₁₋₄₂ reduced the fluidity of HDL to levels comparable to those seen in healthy subjects, suggesting that A β ₁₋₄₂ can restore the structure but not the functionality of HDL. A study by Kontush et al. showed that 0.1 nM to 1 nM of A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ have an antioxidant effect on plasma and cerebrospinal fluid lipoproteins (Kontush *et al.*, 2001), suggesting that the beneficial effect of A β ₁₋₄₂ with respect to restoring the fluidity of HDL from the mAD patients may be due to the antioxidant activity of A β ₁₋₄₂. However, we suggest that the increase in A β ₁₋₄₂ levels in MCI and AD patients will ultimately decrease HDL functionality.

In conclusion, the loss of HDL functionality in mAD is likely due to the oxidation of this particules and to the concomitant alteration in their structure. Even though A β ₁₋₄₂ restores HDL fluidity, it is unable to maintain functionality because of these oxidative changes. Because such oxidative changes are less marked in MCI, A β ₁₋₄₂ might be able to restore HDL functionality by restoring fluidity but, on the other hand, it would alter the capacity of the plasma to sustain cholesterol efflux, most likely by interacting with the ABCA1 receptor. There is thus a clear difference in the mechanisms mediating cholesterol efflux in MCI and mAD. Further studies are needed to identify other plasma components that may interfere with HDL functionality and alter cholesterol efflux in MCI. This will be important for more precisely understanding why the functionality of HDL is altered in AD and for developing effective therapeutic strategies, which may be different in MCI than in AD, where HDL functionality per se is also altered.

Acknowledgements

The authors wish to thank Odette Baril for managing the patients as well as all the participants who made this study possible. The authors also thank Dr. M. Richter, who kindly provided access to the FACS ARIA III cytofluorimeter and to Isabelle Marois for her help with the cytofluorimetric analyses. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (No. 106634 and MOP-89912) and the Geriatrics Division of the Research Center on Aging at Université de Sherbrooke.

References

- Abad-Rodriguez, J., Ledesma, M. D., Craessaerts, K., Perga, S., Medina, M., Delacourte, A. et al. 2004. Neuronal membrane cholesterol loss enhances amyloid peptide generation. *J Cell Biol.* 167, 953-960.
- Agarwal, R., Chase, S. D. 2002. Rapid, fluorimetric-liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences.* 775, 121-126.
- Aldred, S., Bennett, S., Mecocci, P. 2010. Increased low-density lipoprotein oxidation, but not total plasma protein oxidation, in Alzheimer's disease. *Clin Biochem.* 43, 267-271.
- Bergt, C., Nakano, T., Ditterich, J., DeCarli, C., Eiserich, J. P. 2006. Oxidized plasma high-density lipoprotein is decreased in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 41, 1542-1547.
- Berrougui, H., Cherki, M., Koumbadinga, G. A., Isabelle, M., Douville, J., Spino, C. et al. 2007. Antiatherogenic activity of extracts of *Argania spinosa* L. pericarp: beneficial effects on lipid peroxidation and cholesterol homeostasis. *Can J Physiol Pharmacol.* 85, 918-927.
- Berrougui, H., Loued, S., Khalil, A. 2012. Purified human paraoxonase-1 interacts with plasma membrane lipid rafts and mediates cholesterol efflux from macrophages. *Free radical biology & medicine.* 52, 1372-1381.
- Biere, A. L., Ostaszewski, B., Stimson, E. R., Hyman, B. T., Maggio, J. E., Selkoe, D. J. 1996. Amyloid beta-peptide is transported on lipoproteins and albumin in human plasma. *J Biol Chem.* 271, 32916-32922.
- Bortnick, A. E., Rothblat, G. H., Stoudt, G., Hoppe, K. L., Royer, L. J., McNeish, J. et al. 2000. The correlation of ATP-binding cassette 1 mRNA levels with cholesterol efflux from various cell lines. *J Biol Chem.* 275, 28634-28640.
- Ferretti, G., Bacchetti, T., Negre-Salvayre, A., Salvayre, R., Dousset, N., Curatola, G. 2006. Structural modifications of HDL and functional consequences. *Atherosclerosis.* 184, 1-7.
- Folstein, M. F., Folstein, S. E., McHugh, P. R. 1975. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res.* 12, 189-198.
- Girona, J., La Ville, A. E., Heras, M., Olive, S., Masana, L. 1997. Oxidized lipoproteins including HDL and their lipid peroxidation products inhibit TNF-alpha secretion by THP-1 human macrophages. *Free Radic Biol Med.* 23, 658-667.
- Helal, O., Berrougui, H., Loued, S., Khalil, A. 2013. Extra-virgin olive oil consumption improves the capacity of HDL to mediate cholesterol efflux and increases ABCA1 and ABCG1 expression in human macrophages. *The British journal of nutrition.* 109, 1844-1855.
- Hu, M. L. 1994. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol.* 233, 380-385.
- Izzo, C., Grillo, F., Murador, E. 1981. Improved method for determination of high-density-lipoprotein cholesterol I. Isolation of high-density lipoproteins by use of polyethylene glycol 6000. *Clin Chem.* 27, 371-374.
- Kawano, M., Kawakami, M., Otsuka, M., Yashima, H., Yaginuma, T., Ueki, A. 1995. Marked decrease of plasma apolipoprotein AI and AII in Japanese patients with late-onset non-familial Alzheimer's disease. *Clin Chim Acta.* 239, 209-211.

- Khalil, A., Berrougui, H., Pawelec, G., Fulop, T. 2012. Impairment of the ABCA1 and SR-BI-mediated cholesterol efflux pathways and HDL anti-inflammatory activity in Alzheimer's disease. *Mechanisms of ageing and development*. 133, 20-29.
- Kontush, A., Berndt, C., Weber, W., Akopyan, V., Arlt, S., Schippling, S. et al. 2001. Amyloid-beta is an antioxidant for lipoproteins in cerebrospinal fluid and plasma. *Free Radic Biol Med*. 30, 119-128.
- Koudinov, A. R., Koudinova, N. V., Kumar, A., Beavis, R. C., Ghiso, J. 1996. Biochemical characterization of Alzheimer's soluble amyloid beta protein in human cerebrospinal fluid: association with high density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 223, 592-597.
- Koudinov, A. R., Berezov, T. T., Koudinova, N. V. 2001. The levels of soluble amyloid beta in different high density lipoprotein subfractions distinguish Alzheimer's and normal aging cerebrospinal fluid: implication for brain cholesterol pathology? *Neurosci Lett*. 314, 115-118.
- Kuo, Y. M., Emmerling, M. R., Lampert, H. C., Hempelman, S. R., Kokjohn, T. A., Woods, A. S. et al. 1999. High levels of circulating Abeta42 are sequestered by plasma proteins in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 257, 787-791.
- Ligthart, G. J., Corberand, J. X., Fournier, C., Galanaud, P., Hijmans, W., Kennes, B. et al. 1984. Admission criteria for immunogerontological studies in man: the SENIEUR protocol. *Mechanisms of ageing and development*. 28, 47-55.
- Mandas, A., Abete, C., Putzu, P. F., la Colla, P., Dessi, S., Pani, A. 2012. Changes in cholesterol metabolism-related gene expression in peripheral blood mononuclear cells from Alzheimer patients. *Lipids Health Dis*. 11, 39.
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., Stadlan, E. M. 1984. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*. 34, 939-944.
- Michikawa, M., Gong, J. S., Fan, Q. W., Sawamura, N., Yanagisawa, K. 2001. A novel action of alzheimer's amyloid beta-protein (Abeta): oligomeric Abeta promotes lipid release. *J Neurosci*. 21, 7226-7235.
- Nomura, S., Umeda, T., Tomiyama, T., Mori, H. 2013. The E693Delta (Osaka) mutation in amyloid precursor protein potentiates cholesterol-mediated intracellular amyloid beta toxicity via its impaired cholesterol efflux. *J Neurosci Res*. 91, 1541-1550.
- Pani, A., Mandas, A., Diaz, G., Abete, C., Cocco, P. L., Angius, F. et al. 2009. Accumulation of neutral lipids in peripheral blood mononuclear cells as a distinctive trait of Alzheimer patients and asymptomatic subjects at risk of disease. *BMC Med*. 7, 66.
- Phillips, M. C. 2014. Molecular mechanisms of cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem*. 289, 24020-24029.
- Reddy, V. P., Zhu, X., Perry, G., Smith, M. A. 2009. Oxidative stress in diabetes and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 16, 763-774.
- Refolo, L. M., Malester, B., LaFrancois, J., Bryant-Thomas, T., Wang, R., Tint, G. S. et al. 2000. Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiology of disease*. 7, 321-331.
- Refolo, L. M., Pappolla, M. A., LaFrancois, J., Malester, B., Schmidt, S. D., Thomas-Bryant, T. et al. 2001. A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid

- pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 8, 890-899.
- Reitz, C., Tang, M. X., Schupf, N., Manly, J. J., Mayeux, R., Luchsinger, J. A. 2010. Association of higher levels of high-density lipoprotein cholesterol in elderly individuals and lower risk of late-onset Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 67, 1491-1497.
- Reznick, A. Z., Packer, L. 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 233, 357-363.
- Russell, R. L., Siedlak, S. L., Raina, A. K., Bautista, J. M., Smith, M. A., Perry, G. 1999. Increased neuronal glucose-6-phosphate dehydrogenase and sulfhydryl levels indicate reductive compensation to oxidative stress in Alzheimer disease. *Arch Biochem Biophys.* 370, 236-239.
- Schippling, S., Kontush, A., Arlt, S., Buhmann, C., Sturenburg, H. J., Mann, U. et al. 2000. Increased lipoprotein oxidation in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 28, 351-360.
- Shie, F. S., Jin, L. W., Cook, D. G., Leverenz, J. B., LeBoeuf, R. C. 2002. Diet-induced hypercholesterolemia enhances brain A beta accumulation in transgenic mice. *Neuroreport.* 13, 455-459.
- Sibmooh, N., Yamanont, P., Krudsood, S., Leowattana, W., Brittenham, G., Looareesuwan, S. et al. 2004. Increased fluidity and oxidation of malarial lipoproteins: relation with severity and induction of endothelial expression of adhesion molecules. *Lipids Health Dis.* 3, 15.
- Simons, M., Keller, P., De Strooper, B., Beyreuther, K., Dotti, C. G., Simons, K. 1998. Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 95, 6460-6464.
- Singh-Manoux, A., Gimeno, D., Kivimaki, M., Brunner, E., Marmot, M. G. 2008. Low HDL cholesterol is a risk factor for deficit and decline in memory in midlife: the Whitehall II study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 28, 1556-1562.
- Umeda, T., Mori, H., Zheng, H., Tomiyama, T. 2010. Regulation of cholesterol efflux by amyloid beta secretion. *Journal of neuroscience research.* 88, 1985-1994.
- Umeda, T., Tomiyama, T., Kitajima, E., Idomoto, T., Nomura, S., Lambert, M. P. et al. 2012. Hypercholesterolemia accelerates intraneuronal accumulation of A beta oligomers resulting in memory impairment in Alzheimer's disease model mice. *Life Sci.* 91, 1169-1176.
- Voloshyna, I., Modayil, S., Littlefield, M. J., Belilos, E., Belostocki, K., Bonetti, L. et al. 2013. Plasma from rheumatoid arthritis patients promotes pro-atherogenic cholesterol transport gene expression in THP-1 human macrophages. *Exp Biol Med (Maywood).* 238, 1192-1197.
- Wolozin, B. 2001. A fluid connection: cholesterol and A beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 98, 5371-5373.
- Xiong, H., Callaghan, D., Jones, A., Walker, D. G., Lue, L. F., Beach, T. G. et al. 2008. Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high beta- and gamma-secretase activities and A beta production. *Neurobiol Dis.* 29, 422-437.
- Zannis, V. I., Chroni, A., Krieger, M. 2006. Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J Mol Med.* 84, 276-294.
- Zuliani, G., Cavalieri, M., Galvani, M., Volpato, S., Cherubini, A., Bandinelli, S. et al. 2010. Relationship between low levels of high-density lipoprotein cholesterol

and dementia in the elderly. The InChianti study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 65, 559-564.

Partie 2 : Etude de la PON1 dans la MA

I. Hypothèse et objectif :

La PON1 qui est une protéine associée aux HDL est impliquée dans l'élimination des composés organophosphorés comme les pesticides et les gaz neurotoxiques. Elle possède des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires. De plus, elle serait capable de stimuler l'efflux du cholestérol réalisé par les HDL via la production de LysoPC. Nous pensons donc qu'une altération des fonctionnalités de la PON1 pourrait contribuer au développement de la MA. En effet, une réduction de l'activité paraoxonase pourrait conduire à un défaut d'élimination des composés organophosphorés neurotoxiques et ainsi, contribuer au développement de la MA. De plus, une baisse de fonctionnalité de la PON1 pourrait conduire à une altération des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires des HDL ce qui pourrait contribuer au développement du stress oxydant et de l'inflammation dans la MA. Enfin, une altération de la PON1 pourrait conduire à une baisse de sa capacité à stimuler l'efflux du cholestérol réalisé par les HDL. Les polymorphismes 192Q/R et 55L/M ayant un effet sur l'activité PON1 et sur la concentration plasmatique de l'enzyme, respectivement, pourraient être associés à la MA.

L'objectif de cette partie 2 est donc de déterminer le lien entre le niveau d'activité de la PON1 et ses polymorphismes 192Q/R et 55L/M dans la MA.

II. Matériel et méthodes

1) Recrutement des sujets

Quatre vingt sept (87) sujets âgés ont été recrutés parmi lesquels 27 sont en bonne santé (moyenne d'âge de 71 ans \pm 5.39), 27 présentent un léger déficit cognitif ou mild cognitive impairment (moyenne d'âge de 74 \pm 5.02) et 33 présentent un Alzheimer léger

(mAD) (moyenne d'âge de 79 ± 4.7). Les sujets âgés en bonne santé (contrôles) vivent à la maison, sont indépendants et ne présentent aucune altération cognitive. Les sujets âgés en bonne santé sont recrutés sur la base du protocole SENIEUR qui est reconnu par le programme EURAGE, sur le vieillissement de la population européenne, comme protocole standard de sélection dans les études d'immuno-gérontologie (Ligthart *et al.*, 1984). Les patients MCI et mAD ont été recrutés à partir des registres de la clinique de la mémoire de l'institut de gériatrie de l'université de Sherbrooke. Les patients mAD ont été diagnostiqués selon les critères de la 4^{ième} édition du Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders (DSM-IV) publié par l'association américaine de psychiatrie en 1994, et selon les critères de la National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke/Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS_ADRDA) (McKhann *et al.*, 1984). Tous les sujets recrutés subissent un test de Folstein ou Mini-Mental State Examination (MMSE) (Folstein *et al.*, 1975). Tout autre démence, désordre neurologique ou psychiatrique a été exclue. Les patients mAD n'ont aucun problème vasculaire, aucune maladie rénale ou hépatique, aucun cancer cependant, ils présentent une légère hypertension. Aucun antécédent d'accident vasculaire cérébral n'a été décrit. Aucun des sujets recrutés ne prend de statines ou tout autre hypolipémiant. Le protocole d'étude a été approuvé par le comité d'éthique de l'université de Sherbrooke. Un consentement informé et signé a été obtenu pour chacun des participants et/ou leur représentant légal. Les caractéristiques des sujets sont résumées dans le **Tableau 1** (voir article 1 page 57).

2) Collecte des échantillons biologiques (sang et plasma)

Après une nuit de jeûne, 80 mL de sang ont été collectés dans des tubes héparinés. Le sang a été centrifugé à $260 \times g$ pendant 15 minutes, et à $22 \text{ }^\circ\text{C}$. Le plasma a été récupéré et stocké à $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ jusqu'à utilisation. Il est à noter qu'environ 1 mL de sang a été mis de côté et conservé à $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ afin d'en extraire l'ADN.

3) Préparation des HDL

Les HDL ont été isolées en utilisant la méthode de précipitation au polyéthylène glycol (PEG). Le plasma et la solution de PEG (20 %, MW 5000-7000) ont été incubés volume/volume pendant 20 minutes à température ambiante. Le mélange a été

centrifugé à 2000 x g pendant 20 minutes, et à 4 °C. Le surnageant a été récupéré et stocké à 4 °C jusqu'à utilisation (Izzo *et al.*, 1981).

4) Expression et purification de la Paraoxonase recombinante humaine (PON1r)

La PON1 humaine recombinante (PON1r) est produite dans *Escherichia coli*. Les cellules compétentes OrigamiB (Novagen) ont été transformées par le plasmide pET32b (G3C9-8His) qui contient le gène codant pour la PON1 humaine fusionné à une histidine Tag. Le plasmide pET32b a été gentiment donné par le Dr. D. Tawfik (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israël). Les cellules ont été mises en croissance dans du milieu 2xTY pendant 8 heures à 30 °C puis pendant 12 heures à 20 °C. L'expression de la PON1r a été induite par l'ajout d'isopropylbeta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) à 0.5 mM. Les cellules ont été récupérées par centrifugation et lysées à l'aide de la solution commerciale Bug Buster (Novagen). Les protéines ont été purifiées sur résine Ni-NTA (Qiagen). Le tampon d'élution utilisé est le Tris.HCl 50 mM, pH = 8 contenant 1 mM CaCl₂, 50 mM NaCl, 0.1 % tergitol et 250 mM d'imidazole. L'activité PON1 a été mesurée dans chacune des fractions et celles contenant une forte activité PON1 ont été poolées et dialysées intensivement à 4 °C dans du tampon Tris.HCl 50 mM, pH = 8 contenant 1 mM CaCl₂. Les aliquots de PON1r ont été stockés à – 80°C jusqu'à utilisation. L'expression et la purification de la PON1r ont été réalisées selon le protocole décrit par Gaidukov et Tawfik (Gaidukov et Tawfik, 2005).

5) Mesure de l'activité PON1 plasmatique

L'activité PON1 a été mesurée dans le plasma des patients en utilisant le paraoxon (O,O-Diethyl O-(4-nitrophenyl) phosphate) (sigma) comme substrat. La mesure a été réalisée en utilisant un lecteur de plaque (Victor™ X5, Perkin Elmer). Dix (10) µL de plasma ont été déposés dans un des puits d'une plaque de 96 puits. Le paraoxon a été utilisé à une concentration de 5.5 mM dans du tampon Tris.HCl 100 mM, pH = 8 contenant 2 mM de CaCl₂ et 1 M de NaCl. 250 µL de substrat ont été ajoutés automatiquement, grâce à la pompe du lecteur de plaque, dans chacun des puits. La mesure a été réalisée à température ambiante. L'absorbance à 405 nm a été mesurée

toutes les 10 secondes pendant 2 minutes. La libération du 4-nitrophénol a été mesurée à 405 nm et l'activité enzymatique a été calculée en utilisant comme coefficient d'extinction molaire $13893 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Une unité d'activité PON1 est définie comme 1 μM de 4-nitrophénol formé par minute. Pour chaque patient, la mesure a été réalisée en duplicata.

6) Génotypage de la PON1

L'ADN a été extrait à partir des cellules sanguines en utilisant le kit BS483 de chez Biobasic. Le protocole utilisé est celui fournis par le fabricant. Les génotypes 192Q/R et 55L/M du gène codant pour la PON1 ont été déterminés en utilisant la technique RFLP (restriction fragment length polymorphism). Tout d'abord, une PCR a été réalisée afin d'amplifier la région du gène qui renferme le polymorphisme 192 ou le polymorphisme 55. Pour le polymorphisme 192, l'amorce sens utilisée est la suivante : 5'-TATTGTTGCTGTGGGACCTGAG-3' et l'amorce anti-sens utilisée est la suivante : 5'-CACGCTAAACCCAAATACATCTC-3'. Pour le polymorphisme 55, l'amorce sens utilisée est la suivante : 5'-GAAGAGTGATGTATAGCCCCAG-3' et l'amorce anti-sens utilisée est la suivante : 5'-TTTAATCCAGAGCTAATGAAAGCC-3'. Le mélange de PCR contient : Thermopol Reaction Buffer (2X) (*New England BioLabs*), dNTPs (400 μM) (*New England BioLabs*), amorce sens (0.4 μM) (IDT), amorce anti-sens (0.4 μM) (IDT), *Taq* DNA Polymerase (2.5 U) (*New England BioLabs*), ADN (100 ng). La PCR débute par une étape de dénaturation à 95 °C pendant 5 minutes. La PCR est composée de 40 cycles comprenant une étape de dénaturation à 95 °C pendant 2 minutes, une étape d'hybridation à 55 °C pendant 35 secondes, une étape d'élongation à 68 °C pendant 1 minute, et une extension finale à 68 °C pendant 5 minutes. L'efficacité de la PCR a été vérifiée en utilisant un gel d'agarose à 3 %. Pour le polymorphisme 192, les produits de PCR qui ont une taille de 99 bp ont été digérés par l'enzyme de restriction *AlwI* (5U, *New England BioLabs*) pendant 2 heures à 37 °C. Pour le polymorphisme 55, les produits de PCR qui ont une taille de 170 bp ont été digérés par l'enzyme de restriction *NlaIII* (5U, *New England BioLabs*) pendant 2 heures à 37 °C. Les réactions ont été arrêtées à 65 °C pendant 30 minutes. Les produits de restriction ont été séparés sur un gel d'agarose à 3 % et visualisés en utilisant le SYBRGreen (Invitrogen). La taille des produits de restriction a été déterminée à l'aide du marqueur de poids moléculaire N3233S de chez *New England BioLabs*. Pour le polymorphisme

192, le génotype Q (glutamine) n'entraîne pas la formation d'un site de restriction AlwI et donc, une seule bande de 99 bp apparaît sur le gel d'agarose. En revanche, le génotype R (arginine) permet la formation d'un seul site de restriction AlwI ce qui conduit à la production d'un fragment de restriction de 66 bp et d'un fragment de restriction de 33 bp. Pour le polymorphisme 55, le génotype L (leucine) ne permet pas la formation d'un site de restriction NlaIII et donc, une seule bande de 170 bp apparaît sur le gel d'agarose. En revanche, le génotype M (méthionine) entraîne la formation d'un site de restriction NlaIII ce qui conduit à la production d'un fragment de restriction de 126 bp et d'un fragment de restriction de 44 bp.

7) Mesure de l'efflux du cholestérol

Les mesures d'efflux du cholestérol ont été réalisées comme décrit précédemment (Berrougui *et al.*, 2012). Les macrophages J774 ont étéensemencés dans des plaques de 12 puits à raison de 500 000 cellules/puits. Après 24 heures, les cellules ont été chargées en cholestérol tritié (1 μ Ci/mL) pendant 24 heures. Les macrophages radiomarqués ont été lavés 3 fois dans du PBS puis, incubés pendant 12 heures, dans du milieu sans sérum contenant 1 % de BSA (Bovine Serum Albumin), pour permettre l'équilibration. Pour produire des cellules J774 enrichis en ABCA1, les macrophages J774 chargés en cholestérol radioactif ont été équilibrés pendant 12 h dans du milieu DMEM contenant 1 % de BSA et de l'AMPc à 0.3 mM (Bortnick *et al.*, 2000). Après équilibration, les macrophages J774 ont été lavés 3 fois dans du PBS puis, incubés avec un accepteur du cholestérol pour permettre l'efflux du cholestérol. Les macrophages J774 enrichis en ABCA1 ont été incubés avec des HDL de patient « santé » pendant 4 heures ou 24 heures en présence ou non de PON1r humaine (20 U/mL, 30 U/mL ou 40 U/mL). A la fin de la période d'incubation, le milieu de culture a été récupéré et centrifugé à 17 000 x g pendant 15 minutes et à 4 °C pour éliminer les débris cellulaires. Les cellules ont été lavées 3 fois dans du PBS puis lysées dans du PBS contenant 1 M de NaOH. La radioactivité a été mesurée dans les milieux et dans les lysats cellulaires en utilisant un compteur à scintillation liquide (LS6500 multipurpose scintillation counter, Beckman, USA). Le pourcentage d'efflux du cholestérol a été calculé par la formule suivante : $[\text{radioactivité du milieu} / (\text{radioactivité du milieu} + \text{radioactivité du lysat cellulaire})] \times 100$. La quantité de radioactivité est exprimée en coup par minute (cpm).

8) Oxydation et mesure de l'état d'oxydation des HDL

Les HDL sont utilisées à une concentration de 200 µg/mL dans du PBS. Elles ont été oxydées à 37 °C pendant 24, 48 ou 72 heures à l'air libre, et en présence ou non de PON1r humaine (50 U/mL).

L'état d'oxydation des HDL a été évalué par la mesure de la formation des diènes conjugués. Brièvement, l'absorbance à 234 nm a été mesurée dans une cuve de 1 mm de largeur en utilisant un spectrophotomètre (UH5300, Hitachi).

9) Analyses statistiques

Les valeurs correspondent à des moyennes ± SEM. Un test one-way ANOVA a été utilisé pour réaliser des comparaisons multiples, et un test chi-carré a été utilisé pour comparer les distributions génotypiques. Un résultat est considéré comme statistiquement significatif lorsque $p < 0.05$. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6.0.

III. Résultats

1) Activité PON1 plasmatique

La PON1 est une enzyme associée aux HDL dont le rôle physiologique est encore inconnu. Toutefois, plusieurs études ont montré que la PON1 protège les HDL et les LDL de l'oxydation (Devarajan *et al.*, 2014). D'autres travaux ont montré que la PON1 est capable de stimuler l'efflux du cholestérol réalisé par les HDL (Rosenblat *et al.*, 2005 ; Rosenblat *et al.*, 2006b ; Berrougui *et al.*, 2012 ; Ikhlef *et al.*, 2016).

Dans la première partie de mon doctorat, j'ai pu montrer que les HDL des patients mAD sont plus oxydées que les HDL des sujets Santé. En effet, les HDL des patients mAD présentent une baisse des groupements SH et une augmentation des niveaux de diènes conjugués par rapport aux HDL des sujets Santé. J'ai également montré que les HDL des patients mAD réalisent moins efficacement l'efflux du cholestérol que les HDL des sujets Santé. Au vue de ces observations, nous pouvons penser que les propriétés de la PON1 puissent être altérées dans la MA.

Pour savoir si la PON1 est altérée dans la MA, tout d'abord, nous avons mesuré l'activité PON1 dans le plasma des différents sujets (**Figure 1**).

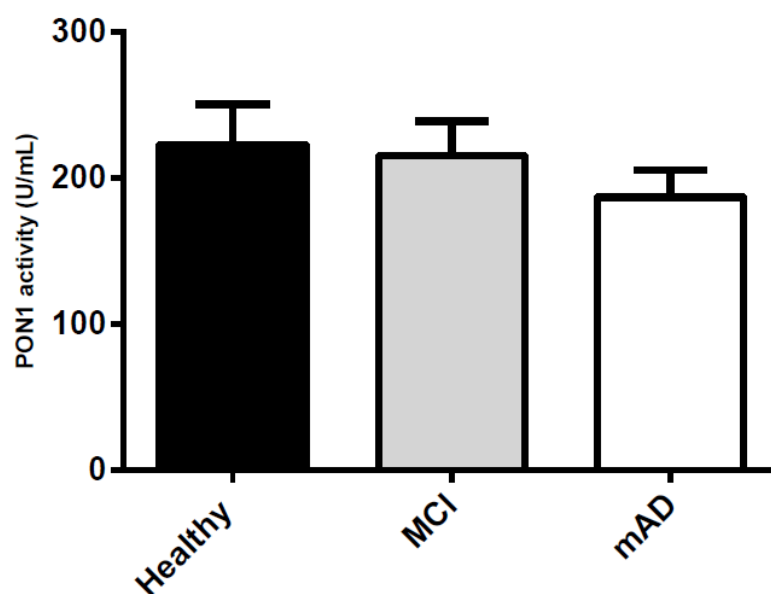


Figure 1 : activité PON1 dans le plasma des sujets

L'activité PON1 a été mesurée en utilisant le Paraoxon comme substrat et en suivant l'absorbance à 412 nm pendant deux minutes. n santé = 25, n MCI = 24 et n mAD = 29.

Les résultats sont exprimés comme des moyennes \pm SEM. Un test one-way ANOVA a été utilisé pour comparer les moyennes entre elles.

Les résultats ne montrent aucun changement dans le niveau d'activité plasmatique de la PON1 chez les patients MCI en comparaison aux sujets Santé. En revanche, l'activité PON1 plasmatique est diminuée de manière non significative chez les patients mAD par rapport aux patients MCI et Santé.

Le polymorphisme 192Q/R a un effet sur l'activité PON1 c'est pourquoi, nous avons comparé l'activité PON1 plasmatique entre les différents groupes de sujets en fonction du polymorphisme 192Q/R (**Figure 2**).

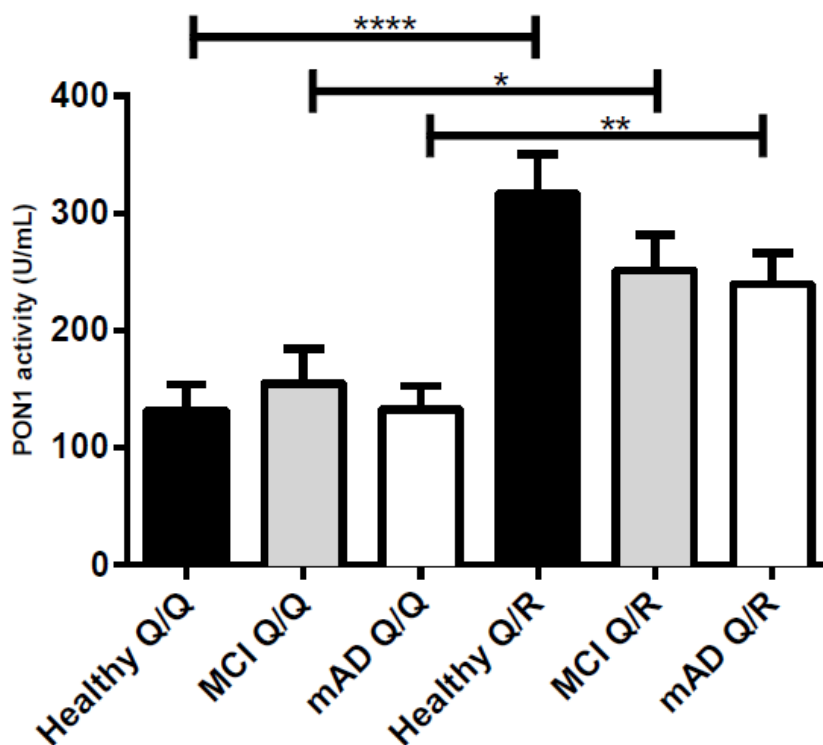


Figure 2 : Activité PON1 plasmatique en fonction du polymorphisme 192Q/R

n santé Q/Q = 13, n MCI Q/Q = 12, n mAD Q/Q = 14, n santé Q/R = 7, n MCI Q/R = 9 et n mAD Q/R = 7. Les résultats sont exprimés comme des moyennes \pm SEM. Un test one-way ANOVA a été utilisé pour comparer les moyennes entre elles (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$).

Les résultats montrent que les individus de polymorphisme QQ ont une activité PON1 plasmatique significativement plus faible que les individus de polymorphisme Q/R (**Figure 2**). Les résultats montrent également qu'il n'y a pas de différence entre les

activités PON1 plasmatique des groupes santé Q/Q, MCI Q/Q et mAD Q/Q (**Figure 2**). En ce qui concerne le polymorphisme Q/R, les résultats montrent que l'activité PON1 plasmatique est réduite de manière non significative dans les groupes MCI Q/R et mAD Q/R par rapport au groupe Santé Q/R (**Figure 2**).

L'activité PON1 est donc modulée par le polymorphisme 192Q/R mais probablement pas par l'état de santé du patient.

2) Le polymorphisme 192Q/R de la PON1 et la MA

Certaines études ont montré que l'allèle R du polymorphisme 192Q/R de la PON1 est un facteur protecteur pour la MA (Scacchi *et al.*, 2003 ; He *et al.*, 2006). Ce polymorphisme serait également associé aux niveaux des peptides amyloïdes dans le cortex frontal des personnes présentant la MA (Leduc *et al.*, 2009). Le polymorphisme 192Q/R de la PON1 aurait une influence sur l'efficacité du traitement par les inhibiteurs des acétylcholinestérases utilisés dans la MA. Ainsi, les personnes répondant à ces inhibiteurs ont plus fréquemment l'allèle R (Pola *et al.*, 2005) suggérant ainsi un lien entre le polymorphisme 192Q/R de la PON1 et la MA. Pour vérifier une telle association, j'ai réalisé un génotypage de la PON1 chez tous les sujets de mon étude. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Polymorphisme 192Q/R de la PON1 dans la MA

Le groupe AD regroupe les données de génotypage de personnes Alzheimer à différents stades de la maladie (léger, modéré, sévère).

	Healthy	MCI	AD
Patient total	24	22	36
Q/Q polymorphism	17 (70.8%)	13 (59.1 %)	25 (69.4%)
Q/R polymorphism	7 (29.2 %)	9 (40.9)	9 (25 %)
R/R polymorphism	0 (0 %)	0 (0%)	2 (5.6 %)
Q allele	41 (85.4 %)	35 (79.5 %)	59 (81.9 %)
R allele	7 (14.6 %)	9 (20.5 %)	13 (18.1 %)

Les résultats ne montrent pas de différences significatives dans la distribution du polymorphisme 192Q/Q entre les groupes Santé et AD. En revanche, le polymorphisme 192Q/Q a tendance à être moins représenté dans le groupe MCI par rapport aux groupes Santé et AD. En ce qui concerne la distribution du polymorphisme 192Q/R, il n'y a pas de différence entre les groupes Santé et AD. En revanche, ce polymorphisme a tendance à être plus représenté dans le groupe MCI par rapport aux groupes Santé et AD. En ce qui concerne le polymorphisme 192R/R, il n'y a aucun sujets Santé et MCI qui présentent ce polymorphisme. En revanche, il y a deux patients AD présentant le polymorphisme 192R/R (**Tableau 2**).

L'analyse des distributions alléliques montre que les allèles Q et R ont globalement la même distribution dans les trois groupes de sujets (**Tableau 2**).

3) Le polymorphisme 55L/M de la PON1 et la MA

Certaines études ont montré que le polymorphisme 55L/M est associé au risque de développer la MA. Ce polymorphisme aurait également un effet sur les niveaux de peptides amyloïdes, l'accumulation des plaques séniles et sur le système cholinergique. En revanche, ce polymorphisme n'aurait pas d'effet sur l'efficacité du traitement par les inhibiteurs des acétylcholinestérases utilisés dans la MA (Leduc et Poirier, 2008 ; Leduc *et al.*, 2009 ; Klimkiewicz-Mrowiec *et al.*, 2011a).

Le polymorphisme 55L/M pourrait donc jouer un rôle dans la MA. Pour savoir si un génotype ou un allèle est plus fréquent chez les personnes présentant un déclin cognitif, j'ai réalisé un génotypage de la PON1 chez tous les sujets de mon étude. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 : Polymorphisme 55L/M de la PON1 dans la MA

Le groupe AD rassemble les données de génotypage de personnes Alzheimer à différents stades de la maladie (léger, modéré, sévère).

	Healthy	MCI	AD
Patient total	25	22	40
L/L polymorphism	11 (44 %)	6 (27.3 %)	14 (35 %)
L/M polymorphism	11 (44 %)	14 (63.6 %)	24 (60 %)
M/M polymorphism	3 (12 %)	2 (9.1 %)	2 (5 %)
L allele	33 (66 %)	26 (59.1 %)	52 (65 %)
M allele	17 (34 %)	18 (40.9 %)	28 (35 %)

Les résultats montrent que le génotype 55L/L a tendance à être moins représenté chez les patients MCI et AD (27.3 % et 35 %, respectivement) par rapport aux sujets Santé (44 %). A l'inverse, le génotype 55L/M a tendance à être plus représenté chez les patients MCI et AD (63.6 % et 60 %, respectivement) par rapport aux sujets Santé (44 %). En ce qui concerne le génotype 55M/M, qui est peu présent dans la population, les résultats montrent qu'il a tendance à être un peu moins représenté chez les patients MCI et AD (9.1 % et 5 %, respectivement) par rapport aux sujets Santé (12 %) (**Tableau 3**).

L'analyse des distributions alléliques montre que les allèles L et M présentent la même distribution chez les sujets Santé et AD. En revanche, chez les sujets MCI, l'allèle L a tendance à être moins représenté que chez les sujets Santé et AD, et l'allèle M a tendance à être plus représenté que chez les sujets Santé et AD (**Tableau 3**).

Le polymorphisme 55L/M de la PON1 est associé à la concentration plasmatique de l'enzyme (Garin *et al.*, 1997). Ainsi, ce polymorphisme permet indirectement de moduler l'activité PON1 plasmatique. Nous avons donc décidé de comparer l'activité PON1 plasmatique des différents groupes de sujets en fonction du polymorphisme 55L/M (**Figure 3**).

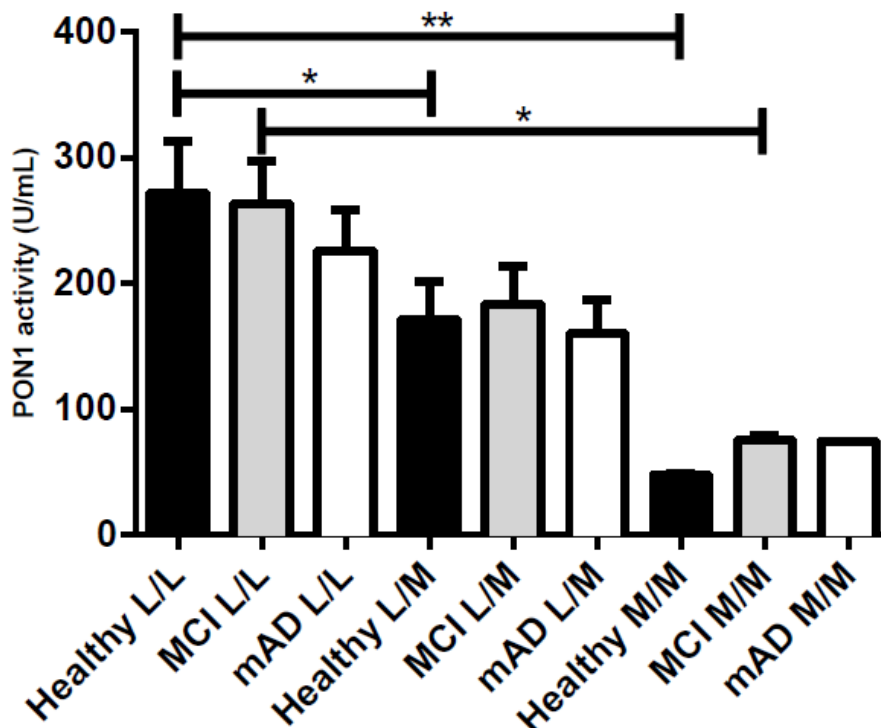


Figure 3 : Activité PON1 plasmatique en fonction du polymorphisme 55L/M

n santé L/L = 9, n MCI L/L = 6, n mAD L/L = 10, n santé L/M = 10, n MCI L/M = 13, n mAD L/M = 12, n santé M/M = 2, n MCI M/M = 2, n mAD M/M = 1. Les résultats sont exprimés comme des moyennes \pm SEM. Un test one-way ANOVA a été utilisé pour comparer les moyennes entre elles (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Les résultats montrent que les sujets Santé de génotype L/L ont une activité PON1 statistiquement plus élevée que les sujets Santé de génotype L/M et de génotype M/M. Des résultats similaires sont trouvés chez les sujets MCI et mAD bien que tous les résultats ne soient pas statistiquement significatifs. On peut donc dire que les individus de génotype L/L ont tendance à avoir une activité PON1 plus élevée que les individus de génotype L/M ou de génotype M/M. De plus, les individus de génotype L/M ont tendance à avoir une activité PON1 plus élevée que les individus de génotype M/M. Dans l'ordre, on a donc $L/L > L/M > M/M$ (Figure 3).

Les résultats avec le génotype L/L montrent qu'il n'y a pas de différence entre les sujets Santé et MCI au niveau de l'activité PON1. Les résultats montrent également que les sujets mAD de génotype L/L ont tendance à avoir une activité PON1 plus faible que les sujets Santé et MCI de génotype L/L (Figure 3). De même, les résultats avec le

génotype L/M ne montrent aucune différence entre les groupes Santé, MCI et mAD au niveau de l'activité PON1 (**Figure 3**).

En ce qui concerne le génotype M/M, le nombre de sujets possédant ce génotype étant très faible, on ne peut pas tirer de conclusions claires (**Figure 3**).

4) Effet de la PON1 sur l'efflux du cholestérol réalisé par les HDL

Des études ont montré que la PON1 est capable de stimuler l'efflux du cholestérol réalisé par les HDL (Rosenblat *et al.*, 2005 ; Rosenblat *et al.*, 2006b ; Berrougui *et al.*, 2012 ; Ikhlek *et al.*, 2016). Nous avons donc voulu vérifier si la PON1r humaine est capable de stimuler la capacité des HDL à permettre l'efflux du cholestérol à partir des macrophages J774. Pour cela, les cellules J774 surexprimant le transporteur ABCA1 ont été chargées en cholestérol radioactif puis incubées pendant 4 ou 24 heures avec les HDL de sujet Santé en présence ou non de concentration croissante de PON1r humaine (20, 30 ou 40 U/mL) (**Figure 4**).

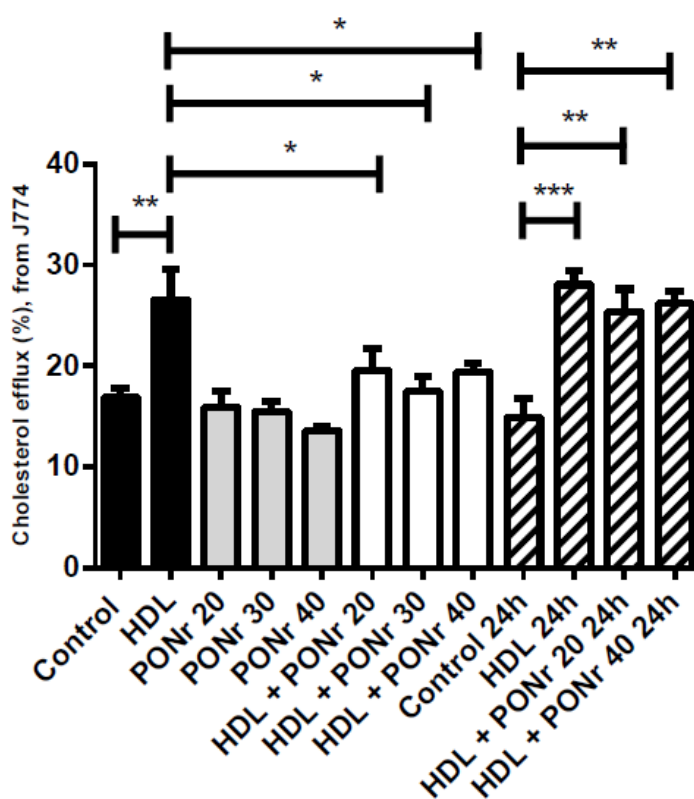


Figure 4 : Effet de la PON1 recombinante humaine sur l'efflux du cholestérol réalisé par les HDL

Les macrophages J774 ont été chargés en [³H]-cholestérol pendant 24 h. Ils ont été équilibrés pendant 12 h dans du milieu efflux contenant de l'AMPc (0.3 mM) pour induire l'expression du transporteur ABCA1. Ensuite, ils ont été lavés et incubés pendant 4 h ou 24h dans du milieu efflux contenant 5 % de HDL ou contenant de la PON1 recombinante humaine (20 U/mL, 30 U/mL ou 40 U/mL) ou contenant de la PON1 recombinante humaine (20 U/mL, 30 U/mL ou 40 U/mL) et 5 % de HDL. La radioactivité a été mesurée dans le milieu et dans les cellules. Le pourcentage d'efflux du cholestérol a été calculé en utilisant la formule suivante : (cpm du milieu / cpm du milieu + cpm des cellules) x 100. Les mesures ont été réalisées 3 fois. Les résultats correspondent à des moyennes ± SEM. Un test one-way ANOVA a été utilisé pour comparer les moyennes entre elles (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Les résultats montrent que la PON1r humaine seule n'est pas capable de stimuler l'efflux du cholestérol lorsqu'elle est utilisée à 20, 30 ou 40 U/mL. En effet, les résultats obtenus sont identiques à ceux obtenus pour le contrôle (sans PON1r) (**Figure 4**).

Les résultats montrent également que la PON1r humaine utilisée à 20, 30 ou 40 U/mL est capable de diminuer de manière significative l'efflux du cholestérol induit par les HDL après 4 heures d'incubation (**Figure 4**). Il est intéressant de noter qu'après 24 heures d'incubation, l'efflux du cholestérol réalisé par les HDL en présence de PON1r (20 ou 40 U/mL) retourne à la normal. En effet, les résultats d'efflux du cholestérol obtenus en utilisant les HDL en présence de PON1r sont quasiment identiques à ceux obtenus en utilisant les HDL seules (**Figure 4**). Il faut souligner que les résultats d'efflux du cholestérol obtenus en utilisant les HDL seules sont identiques après 4 heures et 24 heures d'incubation avec les macrophages J774 (**Figure 4**). On peut donc dire que la PON1r ajoutée de manière exogène à du milieu de culture n'est pas capable de stimuler l'efflux du cholestérol lorsqu'elle est utilisée à 20, 30 ou 40 U/mL. De plus, la PON1r ajoutée de manière exogène à des HDL n'est pas capable d'augmenter leur capacité à induire l'efflux du cholestérol.

5) Effet de la PON1 sur l'état d'oxydation des HDL

Dans une étude précédente, réalisée dans mon laboratoire, les auteurs ont montré que les HDL des personnes Alzheimer sont plus oxydées que les HDL des personnes Santé (Khalil *et al.*, 2012). Tel que présenté dans la première partie de ce travail, mes résultats sont en accord avec ceux obtenus par Khalil *et al.* (2012). En effet, j'ai montré que les niveaux de groupements SH libres sont diminués dans les HDL des mAD par rapport aux HDL des sujets Santé et que les niveaux de diènes conjugués sont augmentés dans les HDL des mAD par rapport aux HDL des sujets Santé (Camponova *et al.*, 2017,

article accepté). La PON1 étant impliquée dans la protection des HDL et des LDL contre l'oxydation, nous pouvons penser que la capacité de la PON1 à protéger les HDL de l'oxydation soit altérée dans la MA. Pour répondre à cette question, nous avons oxydés les HDL pendant 72 heures à 37 °C et à l'air libre en présence ou non de PON1r humaine. L'état d'oxydation des HDL a été évalué par la mesure des diènes conjugués (DO à 234 nm). Les résultats sont présentés dans la **figure 5**.

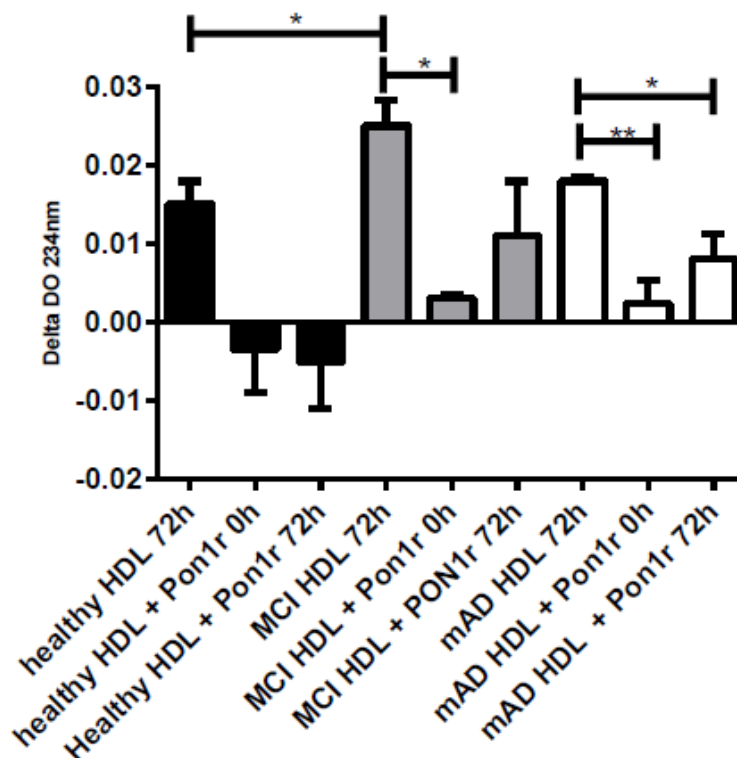


Figure 5 : Effet de la PON1 recombinante humaine sur l'état d'oxydation des HDL

Les HDL (Santé, MCI et mAD) ont été isolées en utilisant la méthode du PEG. Elles ont été oxydées pendant 72 heures à 37 °C et à l'air libre. L'état d'oxydation des HDL a été évalué par la mesure des diènes conjugués (DO à 234 nm). L'expérience a été réalisée en utilisant les HDL de 3 patients différents pour chaque groupe. Les résultats sont exprimés comme des moyennes \pm SEM. Un test one-way ANOVA a été utilisé pour comparer les moyennes entre elles (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Les résultats montrent qu'après 72 heures d'oxydation, les HDL des MCI sont significativement plus oxydées que les HDL des personnes en Santé. Il est à noter que les HDL des mAD sont légèrement plus oxydées que les HDL des personnes en Santé mais, la différence n'est pas statistiquement significative (**Figure 5**). Ces résultats

suggèrent que les HDL des MCI et des mAD sont donc plus sensibles à l'oxydation que les HDL des personnes en Santé.

Au début de l'expérience, l'ajout de PON1r humaine ne permet pas d'améliorer l'état d'oxydation des HDL Santé, MCI ou mAD. En effet, nous n'observons pas de diminution de la production des diènes conjugués au temps $t = 0$ (**Figure 5**). En revanche, l'ajout de PON1r humaine s'avère bénéfique après 72 heures d'oxydation. En effet, la PON1r humaine permet de réduire la production des diènes conjugués dans les HDL Santé, MCI et mAD. Il est à noter que l'ajout de PON1r aux HDL des personnes en Santé permet de les protéger totalement de l'oxydation voire d'améliorer leur statut oxydatif. En effet, la valeur de delta DO mesurée est négative ce qui signifie que les niveaux de diènes conjugués, après 72 heures d'oxydation, sont plus faibles que les niveaux de diènes conjugués aux temps $t = 0$. En revanche, l'ajout de PON1r aux HDL MCI et mAD ne permet pas de les protéger complètement de l'oxydation tel que déterminé par les valeurs de delta DO mesurées chez les sujets MCI et mAD en comparaison aux sujets santé (**Figure 5**).

Discussion

La MA est une maladie dont le pathomécanisme est encore inconnu et par conséquent la mise au point de traitements efficaces semble difficile. Les peptides A β qui sont à l'origine de la formation des plaques séniles, caractéristiques de la MA, ont leur niveau qui est, entre autre, régulé par le contenu en cholestérol membranaire. En effet, une augmentation des niveaux de cholestérol membranaire entrainerait une localisation de la protéine APP préférentiellement dans les radeaux lipidiques où sont situées les β et γ -sécrétases. Il en résulterait une augmentation de la production des peptides A β .

L'homéostasie du cholestérol cellulaire est réalisée par le mécanisme d'efflux du cholestérol. Ce dernier consiste à transporter le cholestérol à l'extérieur des cellules vers l'apoA-I ou les HDL et ce, en utilisant les transporteurs ABCA1, ABCG1 et le récepteur SR-B1. Dans la MA, le mécanisme d'efflux du cholestérol pourrait être perturbé ce qui conduirait à une altération des niveaux de cholestérol cellulaire et ainsi, à une augmentation de la production des A β . Une étude réalisée précédemment dans mon laboratoire d'accueil a pu montrer que l'efflux du cholestérol, réalisé via ABCA1, est altéré dans la MA (Khalil *et al.*, 2012). Les résultats obtenus dans le cadre du présent travail vont dans le même sens. En effet, j'ai pu confirmer que l'efflux du cholestérol est altéré chez les personnes présentant la MA. D'autre part, les HDL des personnes mAD (Alzheimer modéré) réalisent moins efficacement l'efflux du cholestérol que les HDL des personnes en Santé. Cette altération s'expliquerait, en partie, par une modification de l'état d'oxydation des HDL et par une perturbation de leur fluidité. Ainsi, les peptides amyloïdes qui sont transportés par les HDL pourraient contribuer à perturber la fonctionnalité des HDL.

Les particules HDL sont composées, entre autre, de protéines parmi lesquelles la PON1. Cette dernière confère aux HDL des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires (Durrington *et al.*, 2001 ; Rosenblat et Aviram, 2009 ; Loued *et al.*, 2012; Devarajan *et al.*, 2014 ; Soran *et al.*, 2015). De plus, la PON1 participerait à l'efflux du cholestérol réalisé par les HDL (Rosenblat *et al.*, 2005 ; Rosenblat *et al.*, 2006b ; Berrougui *et al.*, 2012 ; Ikhlef *et al.*, 2016). Enfin, la PON1 est une enzyme qui permet l'élimination des composés organophosphorés neurotoxiques. Du fait de ces différentes fonctions, de nombreuses études se sont intéressées au rôle de la PON1 dans la MA. Mes résultats

montrent que les HDL du groupe mAD réalisent moins efficacement l'efflux du cholestérol que les HDL du groupe Santé, et cette altération peut s'expliquer, en partie, par une oxydation des HDL. Ces résultats nous amènent à penser que la PON1 pourrait être impliquée dans la MA.

Dans la première partie de mon travail, j'ai voulu déterminer si l'efflux du cholestérol est altéré chez les personnes présentant la MA. Pour cela, des mesures d'efflux du cholestérol ont été réalisées en utilisant les monocytes humains transformés en macrophages et le plasma obtenu des mêmes patients comme accepteur du cholestérol. Nos résultats montrent que l'efflux du cholestérol médié par le plasma est significativement plus faible chez les patients MCI et mAD que chez les sujets Santé. Ces résultats suggèrent que l'efflux du cholestérol est altéré chez les patients MCI et mAD mais, cette perturbation ne peut pas s'expliquer par une baisse des niveaux d'apoA-1. En effet, l'analyse des profils lipidiques des sujets ne montre pas de différence dans les niveaux d'apoA-1 entre les différents groupes de patients. Une étude réalisée par Pani et ses collaborateurs montre que les PBMC des patients Alzheimer accumulent plus de cholestérol et ont une plus faible capacité à réaliser l'efflux du cholestérol que les PBMC des sujets Santé (Pani *et al.*, 2009). Nos résultats sont donc en accord avec leur étude. Une étude récente a montré que le plasma issu de patients atteints d'arthrite rhumatoïde est capable de perturber l'homéostasie du cholestérol des macrophages en réduisant l'expression de certains transporteurs du cholestérol comme ABCA1 et ABCG1 (Voloshyna *et al.*, 2013). Comme pour l'arthrite rhumatoïde, l'altération de l'efflux du cholestérol que nous avons observée chez les patients MCI et mAD pourrait être due à des molécules contenues dans le plasma qui induiraient une baisse de l'expression des transporteurs du cholestérol. La baisse de l'efflux du cholestérol, observée chez les patients MCI et mAD, pourrait également s'expliquer par une diminution de la capacité des HDL des patients MCI et mAD à réaliser l'efflux du cholestérol.

Le transporteur ABCA1 est le premier à intervenir dans le mécanisme d'efflux du cholestérol. En effet, il permet de transporter le cholestérol et les phospholipides vers l'apoA-1 libre ou pauvre en lipides afin de former des particules HDL naissantes. Ces dernières pourront interagir avec les transporteurs ABCG1 et SR-B1 pour permettre l'efflux du cholestérol et ainsi, la formation de particules HDL matures. Nous avons observé une diminution de l'efflux du cholestérol chez les patients MCI et mAD. Cette

altération de l'efflux du cholestérol pourrait s'expliquer, entre autre, par une diminution de l'expression du transporteur ABCA1 à la surface des macrophages. C'est pourquoi nous avons mesuré l'expression de ce transporteur à la surface des MDM (macrophages dérivés des monocytes). Nos résultats montrent que l'expression du transporteur ABCA1 n'est pas différente significativement entre les trois groupes de sujets. La baisse de l'efflux du cholestérol que nous avons observée chez les patients MCI et mAD ne peut donc pas s'expliquer par une diminution de l'expression du transporteur ABCA1 ou par une réduction des niveaux d'apoA-1. Nos résultats sont en accord avec une étude publiée récemment qui montre que les niveaux d'ARNm codant pour ABCA1 sont inchangés dans les macrophages des patients Alzheimer comparé aux sujets âgés en Santé (Mandas *et al.*, 2012).

Pour déterminer si l'altération de l'efflux du cholestérol observée chez les patients MCI et mAD est due à une diminution de la capacité des HDL à réaliser l'efflux du cholestérol ou à une baisse de l'interaction ABCA1/apoA-1, des expériences d'efflux du cholestérol ont été réalisées en utilisant des macrophages J774 enrichis ou non en ABCA1, et des HDL de patients comme accepteurs du cholestérol. Nos résultats montrent que les HDL des patients mAD réalisent moins efficacement l'efflux du cholestérol à partir des macrophages J774 non enrichis en ABCA1 que les HDL des sujets Santé. Cependant, lorsque les macrophages J774 surexpriment ABCA1, les différences entre les groupes ne sont plus statistiquement significatives. Nos résultats suggèrent que l'interaction entre apoA-1 et ABCA1 n'est pas altérée dans la MA et que la baisse de l'efflux du cholestérol observée chez les patients mAD n'est pas due à une perturbation de la voie ABCA1/apoA-1. Il est intéressant de noter que ces résultats ne sont pas en accord avec l'étude de Khalil *et al.* montrant que la voie ABCA1/ApoA-1 est altérée dans la MA (Khalil *et al.*, 2012). La baisse de l'efflux du cholestérol que nous avons observée chez les patients mAD peut donc être due à une altération des voies ABCG1 et/ou SR-B1. Une étude réalisée par Koudinov et ses collaborateurs va dans ce sens (Koudinov *et al.*, 2001). En effet, les auteurs montrent que les HDL du fluide cérébrospinal des patients Alzheimer ont une composition en apolipoprotéine et en A β différente de celle des HDL des personnes en Santé (Koudinov *et al.*, 2001). Ces résultats suggèrent que le processus de maturation des HDL peut être altéré dans la MA ce qui conduirait à une modification de la composition des HDL. Ceci pourrait expliquer la baisse de l'efflux du cholestérol que nous avons observé chez les patients

mAD. Il est à noter que chez les patients MCI, la réduction de l'efflux du cholestérol est significative lorsque le plasma des patients est utilisé comme accepteur du cholestérol alors qu'elle ne l'est plus lorsque les HDL sont utilisés. Ces résultats suggèrent que les HDL des patients MCI ont probablement subi moins de modifications que les HDL des patients mAD. De plus, la baisse de l'efflux du cholestérol observée chez les patients MCI pourrait s'expliquer par la présence de certains composants dans le plasma par exemple une augmentation des niveaux de peptides A β .

Des études ont montré que les HDL oxydées réalisent moins efficacement l'efflux du cholestérol (Girona *et al.*, 1997). Or, la MA se caractérise par un stress oxydant qui conduit à l'oxydation des protéines, des lipides et des acides nucléiques. Donc, la MA pourrait être associée à une oxydation des HDL ce qui pourrait expliquer l'altération de l'efflux du cholestérol que nous avons observée. Nous avons donc mesuré l'état d'oxydation des protéines et des lipides dans les HDL de chacun de nos patients. Nos résultats montrent que ces biomolécules sont plus oxydées dans les HDL des patients mAD que dans les HDL des sujets Santé. En effet, les groupements SH sont significativement diminués dans les HDL des patients mAD par rapport aux HDL des sujets Santé. De plus, nos résultats montrent que les diènes conjugués sont significativement plus élevés dans les HDL des patients MCI et mAD que dans les HDL des sujets Santé. Ces résultats viennent confirmer ceux d'une étude précédemment publiée qui montrent que les HDL des patients Alzheimer sont plus oxydées que les HDL des sujets Santé (Khalil *et al.*, 2012). Il est à noter que des études ont montré que les lipoprotéines du plasma et du fluide cérébrospinal des personnes Alzheimer sont plus sensibles à l'oxydation que les lipoprotéines des personnes en Santé (Bassett *et al.*, 1999; Schippling *et al.*, 2000). Tous ces résultats indiquent que les HDL sont oxydées chez les patients mAD.

Il est bien établi que l'oxydation des HDL conduit à une altération de leur composition et de leur structure ce qui entraîne une modification de leur fonctionnalité (Ferretti *et al.*, 2006). Nos résultats montrent que les HDL des mAD ont une fluidité plus élevée que les HDL des personnes en Santé. De plus, nos résultats montrent que la fluidité des HDL est inversement corrélée avec le score obtenu en MMSE. Ces résultats indiquent que la structure des HDL est altérée lors du déclin cognitif. Une étude réalisée par Sibmooch et ses collaborateurs montre que les HDL des personnes atteintes de la malaria sont oxydées, et leur oxydation s'accompagne d'une augmentation de leur fluidité tel

que mesurée par anisotropie de fluorescence (Sibmooh *et al.*, 2004). Tous nos résultats indiquent que, dans la MA, les HDL sont oxydées ce qui entraîne une altération de leur structure et ainsi, une baisse de leur capacité à réaliser l'efflux du cholestérol.

Les niveaux d'A β plasmatiques peuvent également avoir un effet sur la capacité des HDL à réaliser l'efflux du cholestérol. En effet, de nombreuses études ont montré que les peptides A β peuvent s'associer aux HDL du plasma et du fluide cérébrospinal en interagissant avec les apolipoprotéines (Biere *et al.*, 1996; Koudinov *et al.*, 1996; Kuo *et al.*, 1999). Dans le cas de la MA, l'association des A β avec les HDL pourrait conduire à une altération de leur structure et de leur fonction notamment, une baisse de leur capacité à réaliser l'efflux du cholestérol. Nos résultats montrent que les niveaux d'A β_{1-42} sont significativement plus élevés dans le plasma des MCI que dans le plasma des sujets Santé. En revanche, les niveaux d'A β_{1-42} ne sont pas corrélés avec la capacité des HDL à réaliser l'efflux du cholestérol ($r = -0.1606$, $p = 0.2808$). Donc, une augmentation des niveaux d'A β_{1-42} ne peut pas expliquer la baisse de l'efflux du cholestérol chez les MCI et les mAD. Une étude réalisée par Umeda et ses collaborateurs a pu montrer, qu'*in vitro*, A β_{40} et A β_{42} peuvent stimuler l'efflux du cholestérol via ABCA1 et en formant des particules de type HDL (Umeda *et al.*, 2010). De plus, cette étude a montré, *in vivo*, que A β_{40} est capable d'accélérer le transport du cholestérol du cerveau vers les tissus périphériques (Umeda *et al.*, 2010). Nous pouvons donc penser que les peptides A β peuvent stimuler l'efflux du cholestérol des cellules périphériques ou au contraire, inhiber l'efflux du cholestérol réalisé par les HDL. Nos résultats montrent que ni A β_{1-40} ni A β_{1-42} peuvent stimuler l'efflux du cholestérol des macrophages J774 enrichis ou non en ABCA1. Nos résultats montrent également que le peptide A β_{1-42} est capable de réduire, de manière significative, l'efflux du cholestérol des macrophages J774 enrichis en ABCA1 et réalisé par des HDL de personnes en Santé. Ces résultats suggèrent qu'A β_{1-42} puisse altérer l'efflux du cholestérol en interagissant avec le transporteur ABCA1 ou en altérant la structure des HDL. Pour déterminer si A β_{1-42} est capable d'altérer la structure des HDL, nous avons mesuré la fluidité des HDL de personnes en Santé, MCI ou mAD en présence d'A β_{1-42} . Nos résultats montrent qu'A β_{1-42} ne modifie pas la fluidité des HDL provenant de personnes en Santé. En revanche, ce peptide diminue significativement la fluidité des HDL provenant de personnes mAD. Le peptide A β_{1-42} est donc capable de modifier la

structure des HDL en fonction de l'origine de ce dernier. Il est intéressant de noter que le peptide $A\beta_{1-42}$ réduit la fluidité des HDL mAD à une valeur similaire à celle des HDL des personnes en Santé. Ce résultat suggère que ce peptide est capable de restaurer la structure mais probablement pas la fonction des HDL. Une étude réalisée par Kontush et ses collaborateurs a montré que les peptides $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$, utilisés à des concentrations allant de 0.1 nM à 1 nM, ont des effets antioxydants sur les lipoprotéines du plasma et du fluide cérébrospinal (Kontush *et al.*, 2001). Nous pensons donc que l'effet positif du peptide $A\beta_{1-42}$ sur la fluidité des HDL mAD puisse résulter de son activité anti-oxydante. Cependant, nous pensons que l'augmentation des niveaux d' $A\beta_{1-42}$ chez les patients MCI et mAD, à long terme, ne puisse pas protéger les HDL de modifications structurales ce qui entraînerait une baisse de leur fonctionnalité.

En conclusion, la première partie de mon doctorat a donc permis de montrer que l'efflux du cholestérol est réduit chez les personnes présentant la MA. Cette altération de l'efflux du cholestérol s'expliquerait par une baisse de la fonctionnalité des HDL qui serait due, entre autre, à l'oxydation de ces particules, et à une modification de leur structure. Nos résultats montrent également que le peptide $A\beta_{1-42}$ est capable de restaurer la fluidité des HDL issues de patients Alzheimer. Cependant, nous pensons que ce peptide soit incapable de restaurer la fonctionnalité de ces particules du fait de dommages oxydatifs trop importants. En revanche, nous pensons que le peptide $A\beta_{1-42}$ puisse restaurer la fluidité des HDL MCI ainsi que leur fonctionnalité du fait de dommages oxydatifs moins importants. Néanmoins, ce peptide pourrait contribuer à la baisse de l'efflux du cholestérol que nous avons observé chez les patients MCI en interagissant avec le transporteur ABCA1. Ainsi, une double fonction dépendante des circonstances pour le peptide $A\beta_{1-42}$ a été montrée. Ceci va dans le sens d'études récentes qui ont montré que le peptide $A\beta_{1-42}$ peut aussi jouer un effet bénéfique contre les virus (Bourgade *et al.*, 2016). Ces résultats soulignent l'importance du métabolisme du cholestérol dans la MA et indiquent des cibles thérapeutiques potentielles dans le futur.

La PON1 est une enzyme associée aux HDL qui possède des propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes. De plus, elle jouerait un rôle dans l'efflux du cholestérol réalisé par les HDL. Nos résultats précédents ont montré que la capacité des

HDL à réaliser l'efflux du cholestérol est altérée dans la MA du fait de l'oxydation de ces particules. Nous pensons donc que la PON1 puisse aussi être impliquée dans la MA.

La PON1 possède de nombreuses activités enzymatiques parmi lesquelles l'activité paraoxonase. Celle-ci est impliquée dans l'élimination des composés organophosphorés qui sont neurotoxiques. Une baisse de l'activité paraoxonase pourrait donc conduire à une accumulation de composés neurotoxiques ce qui pourrait favoriser l'apparition de maladies neurodégénératives comme la MA. De plus, une étude réalisée par Jaouad et ses collaborateurs a montré que l'oxydation des HDL s'accompagne d'une baisse de l'activité paraoxonase (Jaouad *et al.*, 2003). Nos résultats précédents ont montré que les HDL des patients mAD sont plus oxydées que les HDL des personnes en Santé. L'activité paraoxonase pourrait donc être altérée au cours du déclin cognitif. Nos résultats montrent que l'activité paraoxonase est diminuée de manière non significative dans le plasma des patients mAD par rapport aux sujets Santé et MCI. Bien que non significatifs, ces résultats suggèrent que l'activité paraoxonase puisse être altérée dans la MA. De nombreuses études sont en accord avec ces observations (Paragh *et al.*, 2002 ; Wehr *et al.*, 2009 ; Zengi *et al.*, 2012). De plus, l'étude réalisée par Wehr et ses collaborateurs a montré que l'activité paraoxonase est corrélée positivement avec le score obtenu en MMSE (Wehr *et al.*, 2009). Tous ces résultats suggèrent que l'activité paraoxonase soit réduite chez les personnes présentant la MA, et cette baisse d'activité pourrait favoriser l'accumulation de composés neurotoxiques. De plus, la baisse de l'activité paraoxonase pourrait refléter une altération de la fonctionnalité de la PON1.

L'activité paraoxonase est notamment régulée par le polymorphisme 192Q/R. De ce fait, la baisse de l'activité paraoxonase que nous avons observée chez les patients mAD pourrait être due, en partie, à la présence plus fréquente d'un génotype ou d'un allèle. De plus, de nombreuses études ont montré qu'il existe une relation entre le polymorphisme 192Q/R et la MA. En effet, l'allèle R serait un facteur protecteur pour la MA (Scacchi *et al.*, 2003 ; He *et al.*, 2006). De plus, le polymorphisme 192Q/R pourrait moduler les niveaux de peptides amyloïdes dans le cortex frontal des personnes Alzheimer. En effet, les personnes Alzheimer porteuses d'au moins un allèle R possèdent des niveaux de peptides A β 42 environ 1,8 fois plus faibles que les personnes Alzheimer de génotype QQ (Leduc *et al.*, 2009). Enfin, le polymorphisme 192Q/R pourrait moduler la réponse aux inhibiteurs des acétylcholinestérases chez les personnes Alzheimer. Ainsi, les individus répondant le mieux à ce traitement ont plus

fréquemment l'allèle R (Pola *et al.*, 2005). Le polymorphisme 192Q/R pourrait donc être impliqué dans la MA. Nos résultats montrent que les pourcentages d'individus de génotype QQ et de génotype QR sont globalement les mêmes dans le groupe de patients mAD et dans le groupe de sujets Santé. En revanche, dans le groupe de patients mAD, on note la présence de deux individus de génotype RR. Ce génotype est peu fréquent dans la population, et il est associé aux risques de développer des maladies cardiovasculaires (Abello *et al.*, 2014 ; Bounafaa *et al.*, 2015). La présence de ce génotype dans le groupe de patients mAD peut refléter la relation existante entre les maladies cardiovasculaires et la MA. Nos résultats montrent, également, que la distribution des allèles R et Q est globalement la même dans le groupe de patients mAD et dans le groupe de sujets Santé. Ces résultats suggèrent qu'un allèle ou qu'un génotype ne soit pas plus fréquent chez les patients mAD que chez les sujets Santé et donc, que le polymorphisme 192Q/R ne soit pas associé à la MA. Ces résultats sont en accord avec de nombreuses études (Pola *et al.*, 2003 ; Shi *et al.*, 2004 ; Leduc et Poirier, 2008 ; Chapuis *et al.*, 2009 ; Leduc *et al.*, 2009 ; Klimkowicz-Mrowiec *et al.*, 2011b ; Pi *et al.*, 2012 ; Wingo *et al.*, 2012). Nos résultats montrent, également, que le pourcentage d'individus de génotype QQ est plus faible dans le groupe des MCI que dans le groupe des Santé, et que le pourcentage d'individus de génotype QR est plus élevé dans le groupe des MCI que dans le groupe des Santé. Il est à noter que le génotype QQ est associé à une plus faible activité paraoxonase que le génotype QR. Bien que ces résultats ne soient pas significatifs, ils suggèrent que l'activité paraoxonase doit être plus élevée chez les patients MCI que chez les sujets Santé. Or, nos résultats montrent que l'activité paraoxonase des patients MCI n'est pas différente de l'activité paraoxonase des sujets Santé. Cette absence de différence peut s'expliquer par une baisse d'activité de la PON1 chez les patients MCI.

L'activité paraoxonase est régulée par le polymorphisme 192Q/R, nous avons donc comparé les activités paraoxonase des différents groupes de sujets en tenant compte du génotype de la PON1. En accord avec la littérature, nos résultats montrent que les individus de génotype QQ ont une activité paraoxonase plus faible que les individus de génotype QR. Si on s'intéresse au génotype QQ, nos résultats montrent que l'activité paraoxonase est inchangée dans les groupes MCI et mAD par rapport au groupe Santé. En revanche, si on s'intéresse au génotype QR, les résultats montrent que l'activité paraoxonase est diminuée de manière non significative dans les groupes de patients

MCI et mAD par rapport au groupe de sujets Santé. Nos résultats suggèrent donc que l'activité paraoxonase soit réduite chez les patients MCI et mAD de génotype QR par rapport aux sujets Santé de même génotype. Ces résultats peuvent s'expliquer par une baisse de fonctionnalité de l'isoenzyme QR de la PON1 du fait de son oxydation. En effet, l'isoenzyme QR pourrait être plus sensible à l'oxydation que l'isoenzyme QQ. Dans la première partie de mon travail de doctorat, mes résultats montrent que les HDL des patients mAD sont plus oxydées que les HDL des sujets Santé. De ce fait, une oxydation de la PON1 dans les HDL des patients mAD est tout à fait envisageable.

La concentration plasmatique de PON1 est, entre autre, régulée par le polymorphisme 55L/M. De ce fait, ce polymorphisme peut, indirectement, influencer l'activité de l'enzyme. Donc, la baisse d'activité paraoxonase que nous avons observée dans le groupe des patients mAD pourrait être due à un génotype ou à un allèle qui serait plus fréquent dans ce groupe de patients. De plus, certaines études ont montré que le polymorphisme 55L/M est associé aux risques de développer la MA, et qu'il a un effet sur les niveaux de peptides amyloïdes, l'accumulation des plaques séniles et sur le système cholinergique (Leduc et Poirier, 2008 ; Leduc *et al.*, 2009). Le polymorphisme 55L/M pourrait donc jouer un rôle dans la MA. Nos résultats montrent que le pourcentage de génotype LL a tendance à être plus faible chez les patients MCI et mAD que chez les sujets Santé alors que, le pourcentage de génotype LM a tendance à être plus élevé chez les patients MCI et mAD que chez les sujets Santé. Il est à noter que le génotype LL est associé à une plus forte activité paraoxonase que le génotype LM. De ce fait, la légère baisse d'activité paraoxonase, que nous avons observée dans le groupe des mAD, pourrait s'expliquer par une plus forte proportion d'individus de génotype LM dans ce groupe de patients. De plus, l'absence de différence entre les groupes MCI et Santé, au niveau de l'activité paraoxonase, pourrait s'expliquer par le fait qu'il y ait une plus forte proportion d'individus de génotype QR dans le groupe des MCI par rapport au groupe Santé, et qu'il y ait une plus faible proportion d'individus de génotype LL dans le groupe des MCI par rapport au groupe Santé. En effet, dans le groupe des MCI, le pourcentage plus élevé d'individus de génotype QR aurait tendance à augmenter l'activité paraoxonase du groupe mais, cet effet serait annulé par le fait qu'il y ait un plus faible pourcentage d'individus de génotype LL dans ce groupe. Les résultats montrent également que les distributions alléliques ne sont pas différentes entre les groupes mAD et Santé. Ces résultats suggèrent que ni l'allèle L ni l'allèle M ne

soient associés à la MA. Ces résultats vont dans le sens des études qui n'ont montré aucune association entre le polymorphisme 55L/M et les risques de développer la MA (Klimkowicz-Mrowiec *et al.*, 2011b ; Pi *et al.*, 2012 ; Wingo *et al.*, 2012). En revanche, dans le groupe des MCI, l'allèle L a tendance à être moins fréquente que dans le groupe des Santé. A l'inverse, l'allèle R a tendance à être plus fréquente dans le groupe des MCI que dans le groupe des Santé. Bien que les différences entre les groupes MCI et Santé ne soient pas significatives, ces résultats suggèrent que la concentration plasmatique de PON1 soit plus faible chez les patients MCI que chez les sujets Santé. Cette baisse de concentration pourrait conduire à une plus faible protection des HDL et des LDL contre l'oxydation.

Le polymorphisme 55L/M régule, indirectement, l'activité paraoxonase donc, nous avons comparé les activités paraoxonase des différents groupes de sujets en tenant compte du génotype de la PON1. Les résultats montrent que les individus de génotype LL ont une plus forte activité paraoxonase que les individus de génotype LM ou MM. De plus, les individus de génotype LM ont une plus forte activité paraoxonase que les individus de génotype MM. Ces résultats sont en accord avec la littérature. Si on s'intéresse au génotype LL, les résultats montrent que l'activité paraoxonase est diminuée de manière non significative dans le groupe mAD par rapport au groupe MCI et Santé. En revanche, on ne note aucune différence entre les groupes MCI et Santé. La réduction d'activité paraoxonase que nous avons observée dans le groupe des mAD serait probablement due à une altération de l'enzyme. En ce qui concerne le génotype LM, les résultats montrent que l'activité paraoxonase est très légèrement réduite dans le groupe des mAD par rapport aux groupes MCI et Santé. Ces résultats vont également dans le sens d'une baisse de la fonctionnalité de la PON1 chez les patients mAD. Dans la première partie de ce travail, j'ai montré que les HDL des patients mAD sont plus oxydées que les HDL des sujets Santé (Camponova *et al.*, 2016, en évaluation). Ces résultats peuvent s'expliquer par une plus grande sensibilité des HDL à l'oxydation du fait d'une déficience en système antioxydant notamment, une baisse de fonctionnalité de la PON1.

Une étude réalisée, en 2012, a pu montrer que les HDL des patients Alzheimer sont plus oxydées que les HDL des sujets Santé (Khalil *et al.*, 2012). Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Khalil et al (2012) (Camponova *et al.*, 2016, en évaluation). La PON1 étant impliquée dans la protection des HDL et des LDL contre l'oxydation, les

résultats obtenus peuvent s'expliquer par une baisse de fonctionnalité de la PON1. Pour tester cette hypothèse, nous avons oxydé les HDL de nos patients, pendant 72 heures, en présence ou non de PON1r humaine. L'état d'oxydation des HDL a été évalué par la mesure des diènes conjugués (absorbance à 234 nm). Les résultats montrent que le niveau de diènes conjugués tel que mesuré par la ΔDO à 234 nm est significativement plus élevé chez les patients MCI, et légèrement plus élevé chez les patients mAD que chez les sujets Santé. Ces résultats suggèrent que les HDL des patients MCI et mAD soient plus sensibles à l'oxydation. Ces résultats sont en accord avec les études réalisées par Bassett et ses collaborateurs et par Schippling et ses collaborateurs qui montrent que les lipoprotéines du plasma et du fluide cérébrospinal des personnes Alzheimer sont plus sensibles à l'oxydation (Bassett *et al.*, 1999 ; Schippling *et al.*, 2000). L'ajout de PON1r humaine à des HDL Santé permet de les protéger totalement de l'oxydation voire d'améliorer leur statut oxydatif. En effet, la valeur de ΔDO à 72 h est légèrement inférieure à la valeur de ΔDO à 0h. En revanche, l'ajout de PON1r humaine aux HDL des patients MCI et mAD ne permet pas de les protéger totalement de l'oxydation. En effet, la valeur de ΔDO à 72 h des MCI ou des mAD n'atteint pas la valeur de ΔDO à 0 h. Ces résultats peuvent s'expliquer par une altération de l'activité de la PON1 endogène et par une altération des autres systèmes antioxydants dans les HDL des patients MCI et mAD. En effet, la PON1 endogène des HDL MCI et mAD pourrait avoir une baisse de fonctionnalité alors que la PON1 endogène des HDL des personnes en Santé fonctionnerait normalement. L'ajout de PON1r humaine à des HDL de personnes en Santé permettrait donc de les rendre insensibles à l'oxydation alors que l'ajout de PON1r humaine à des HDL MCI ou mAD permettrait de compenser la baisse de fonctionnalité de la PON1 endogène et de protéger partiellement les HDL de l'oxydation. En effet, pour une protection totale des HDL MCI et mAD, les autres systèmes antioxydants devraient être restaurés. Une étude réalisée par Khalil et al. a montré que les niveaux d' α -tocophérol (vitamine E) sont diminués significativement chez les patients mAD par rapport aux Santé (Khalil *et al.*, 2012). Ces résultats vont donc dans le sens d'une réduction des autres systèmes antioxydants. De plus, une étude réalisée par Kontush et ses collaborateurs a montré que la supplémentation de patients Alzheimer en vitamines E et C, pendant un mois, permet de réduire la sensibilité des lipoprotéines du plasma et du fluide cérébrospinal à l'oxydation (Kontush *et al.*, 2001). Tous ces résultats vont dans le sens d'une altération de la fonctionnalité de la PON1 et

des autres systèmes antioxydants chez les patients MCI et mAD ayant pour conséquence, une augmentation de la sensibilité des HDL MCI et mAD à l'oxydation. La MA se caractérise par un stress oxydant, il en résulte donc une augmentation de l'état d'oxydation des HDL.

Des études ont montré que la PON1 est capable de stimuler l'efflux du cholestérol réalisé par les HDL (Rosenblat *et al.*, 2005 ; Rosenblat *et al.*, 2006b). Nos résultats précédents ont montré que la capacité des HDL à réaliser l'efflux du cholestérol est altérée dans la MA, nous pensons donc que le rôle de la PON1 dans l'efflux du cholestérol puisse être altéré dans la MA. Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer si la PON1r humaine est capable de stimuler l'efflux du cholestérol des macrophages J774 surexprimant ABCA1. Nos résultats montrent que la PON1r humaine seule n'est pas capable de stimuler l'efflux du cholestérol. Ces résultats sont en accord avec le mécanisme employé par la PON1 pour stimuler l'efflux du cholestérol et qui est décrit dans la littérature. La PON1 agirait sur les phospholipides des macrophages pour former de la LysoPC. Cette dernière permettrait d'améliorer la liaison des HDL aux cellules ce qui stimulerait l'efflux du cholestérol via le transporteur ABCA1 (Rosenblat *et al.*, 2005). La PON1, seule, utilisée sans accepteur du cholestérol, ne permettrait donc pas de stimuler l'efflux du cholestérol. Dans un second temps, nous avons voulu savoir si la PON1 est capable de stimuler l'efflux du cholestérol réalisé par les HDL d'un patient Santé. Nos résultats montrent que la PON1r humaine, utilisée à des concentrations de 20, 30 ou 40 U/mL, n'est pas capable de stimuler l'efflux du cholestérol réalisé par les HDL. Au contraire, la PON1r humaine induit une baisse de l'efflux du cholestérol après 4 heures de stimulation. La PON1 humaine est presque exclusivement associée aux HDL dans le plasma humain. Donc, la baisse de l'efflux du cholestérol que nous avons observée pourrait s'expliquer par une altération transitoire de la structure des HDL du fait de l'intégration de la PON1r humaine aux particules HDL. Nos résultats montrent, également, que l'efflux du cholestérol réalisé par les HDL en présence de PON1 est restauré après 24 heures de stimulation. Après 24 heures de stimulation, la PON1r humaine est probablement bien intégrée aux HDL et donc, la structure de ces particules est probablement rétablie ainsi que leur fonctionnalité. Nos résultats suggèrent, également, que l'ajout de PON1r humaine à des HDL Santé ne puisse pas augmenter leur capacité à stimuler l'efflux du cholestérol probablement parce que l'efflux est déjà à sa valeur maximale. Il est à noter que, dans la première partie de

mon doctorat, mes résultats montrent que la capacité des HDL MCI et mAD à réaliser l'efflux du cholestérol des macrophages J774 n'est pas altérée lorsque ces cellules surexpriment ABCA1. Il est donc illusoire de penser que l'ajout de PON1r humaine aux HDL MCI et mAD puisse augmenter leur capacité à réaliser l'efflux du cholestérol.

En conclusion, cette deuxième partie montre que l'activité paraoxonase est légèrement réduite dans le plasma des mAD par rapport aux MCI et aux Santé. Cette baisse d'activité peut refléter une légère altération de la fonction de la PON1 dans la MA notamment, sa capacité à protéger les HDL contre l'oxydation. Nos résultats montrent que les HDL des MCI et des mAD sont plus sensibles à l'oxydation. De plus, l'ajout de PON1r humaine à des HDL MCI et mAD ne permet pas de les protéger totalement de l'oxydation contrairement aux HDL des personnes en Santé. Ces résultats laissent supposer que les systèmes antioxydants des HDL MCI et mAD soient défectueux. Nos résultats montrent, également, que les polymorphismes 192Q/R et 55L/M de la PON1 ne sont pas associés à la MA. Enfin, les expériences réalisées pour déterminer si la fonction de la PON1, dans l'efflux du cholestérol, est altérée dans la MA n'ont pas pu donner des résultats concluants. En effet, nos résultats montrent que la PON1r humaine, seule, ne peut pas stimuler l'efflux du cholestérol, et que l'ajout de PON1r humaine à des HDL Santé ne peut pas augmenter leur capacité à stimuler l'efflux du cholestérol. Donc, notre projet de tester les PON1 Santé, MCI et mAD, purifiées à partir du plasma humain, n'a pas pu aboutir. Il faudrait donc utiliser une autre méthode pour comparer les capacités des PON1 à stimuler l'efflux du cholestérol.

Conclusion et perspectives

Les résultats obtenus dans ce travail ont permis de montrer que l'efflux du cholestérol est altéré dans la MA. Cette baisse de l'efflux du cholestérol est due à une altération de la fonctionnalité des HDL et non, à une baisse de l'expression du transporteur ABCA1. Les résultats obtenus suggèrent, également, que la voie d'efflux du cholestérol utilisant ABCA1 ne soit pas altérée dans la MA supposant donc, que les voies ABCG1 et/ou SR-B1 soient altérées dans la MA. La baisse de la fonctionnalité des HDL serait due à une oxydation de ces particules, et à une altération de leur structure. Les peptides A β ₁₋₄₂ sont capables de restaurer la fluidité des HDL mAD mais ne permettraient probablement pas de rétablir leur fonctionnalité.

L'efflux du cholestérol est également réduit chez les personnes présentant un MCI cependant, le mécanisme à l'origine de cette altération semble différent de celui retrouvé chez les Alzheimer. En effet, la capacité des HDL à induire l'efflux du cholestérol n'est pas altérée chez les MCI. En revanche, les peptides A β ₁₋₄₂ présents dans le plasma des MCI pourraient perturber l'efflux du cholestérol en interagissant avec les transporteurs ABCA1 et/ou ABCG1 ou encore, en interagissant avec le récepteur SR-B1. En effet, les niveaux de peptides A β ₁₋₄₂ sont augmentés dans le plasma des MCI, et ces peptides sont capables de réduire l'efflux du cholestérol des macrophages J774 lorsqu'ils surexpriment ABCA1.

Ces résultats ont également permis de montrer que l'activité paraoxonase est réduite de manière non significative dans le plasma des mAD. Cette activité est impliquée dans l'élimination des composés organophosphorés neurotoxiques. Cette baisse d'activité pourrait donc conduire à une accumulation de ces composés dans l'organisme. La baisse de l'activité paraoxonase peut également refléter une baisse de la fonction anti-oxydante de la PON1. En effet, nos résultats ont montré que les HDL des mAD sont plus sensibles à l'oxydation que les HDL des personnes en Santé. De plus, l'ajout de PON1r humaine à des HDL mAD permet de les protéger partiellement de l'oxydation. A l'inverse, l'ajout de PON1r humaine à des HDL de personnes en Santé les rend insensibles à l'oxydation. Nos résultats suggèrent donc que la fonctionnalité de la PON1 ainsi que les autres systèmes antioxydants soient altérés dans la MA. Nos résultats montrent également que les polymorphismes 192Q/R et 55L/M ne sont pas associés à la

MA. Enfin, la méthode utilisée pour mesurer la capacité de la PON1 à stimuler l'efflux du cholestérol ne semble pas la bonne. En effet, la PON1r humaine seule ne stimule pas l'efflux du cholestérol, et l'ajout de PON1r humaine à des HDL de personnes en Santé ne permet pas d'augmenter leur capacité à réaliser l'efflux du cholestérol. Nous n'avons donc pas pu comparer les capacités des PON1 purifiées à partir des plasma Santé, MCI et mAD à stimuler l'efflux du cholestérol. Le mécanisme utilisé par la PON1 pour stimuler l'efflux du cholestérol passe par la production de LysoPC. Pour comparer les capacités des PON1 à stimuler l'efflux du cholestérol, nous pourrions donc mesurer le taux de production de LysoPC. Nous pourrions également refaire les expériences d'efflux du cholestérol en utilisant un autre accepteur du cholestérol.

Les perspectives envisagées pour ce projet de recherche sont les suivantes :

- Déterminer quelle(s) voie(s) d'efflux du cholestérol est altérée dans la MA. Pour cela, des expériences d'efflux du cholestérol doivent être réalisées en utilisant des cellules exprimant le récepteur SR-B1 ou le transporteur ABCG1. Les HDL des patients seront utilisés comme accepteurs du cholestérol. Les cellules Fu5AH sont des cellules d'hépatome de rat qui expriment en grande quantité le récepteur SR-B1. De ce fait, ces cellules peuvent être utilisées pour étudier cette voie. En ce qui concerne la voie ABCG1, le recours à des cellules exprimant transitoirement ce transporteur devra être envisagé. Nous pourrions utiliser les cellules COS-1 qui sont des cellules de rein de singe pour réaliser les transfections.
- Déterminer quelle(s) fraction(s) de HDL dont la fonctionnalité serait altérée dans la MA. Pour cela, il faudrait isoler les différentes fractions de HDL et tester leur capacité à réaliser l'efflux du cholestérol. Dans un premier temps, les cellules J774 pourraient être utilisées. En effet, elles expriment les transporteurs ABCA1 et ABCG1 ainsi que le récepteur SR-B1 avec le même niveau d'expression. La voie d'efflux du cholestérol qui est altérée dans la MA n'a pas encore été identifiée donc, l'utilisation des cellules J774 serait à privilégier.
- Etudier la composition lipidique des HDL. Nos résultats ont montré que la fluidité des HDL est altérée dans la MA, et la fluidité est régulée par la composition lipidique. Nous pourrions donc comparer les compositions lipidiques des HDL des personnes en Santé et des patients mAD.

- Déterminer quelles protéines sont oxydées dans les HDL mAD. Pour cela, il faudrait utiliser l'électrophorèse 2D.
- Etudier l'affinité des HDL pour les transporteurs/récepteurs. Nous avons montré que la capacité des HDL à réaliser l'efflux du cholestérol est altérée dans la MA. La baisse de l'efflux du cholestérol pourrait, également, s'expliquer par une altération de l'affinité des HDL pour les transporteurs. Il faudrait donc réaliser des tests de liaison entre les HDL et les transporteurs.
- Etudier les voies de signalisation ABCA1, ABCG1 et SR-B1. Nous savons qu'en interagissant avec les transporteurs ABCA1 et ABCG1 ou, avec le récepteur SR-B1, apoA-1 ou les HDL induisent des voies de signalisation. De ce fait, ces voies de signalisation pourraient être altérées dans la MA. Nous pourrions donc étudier ces voies de signalisation en utilisant la technique du FACS.

Remerciements

Je tiens, tout d'abord, à remercier les Pr. Chraïbi, Ramassamy et Roucou, d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens à remercier, sincèrement, mes directeurs de recherche les Pr. Tamas Fülöp et Abdelouahed Khalil pour la confiance qu'ils m'ont accordée en m'acceptant dans leur laboratoire. Ils m'ont permis de réaliser mon rêve à savoir, obtenir un doctorat, et de vivre une expérience exceptionnelle dans un pays que je ne connaissais pas.

Je tiens également à remercier le Centre de Recherche sur le Vieillissement (CDRV) pour la bourse octroyée lors de ma première année de doctorat.

Je remercie également tous les membres des laboratoires des Pr. Khalil et Fülöp notamment, Souade Ikhlef, pour les discussions et les fous rires pendant nos manips. Grace à tous ces moments, le temps paraissait moins long.

J'aimerais remercier l'infirmière de recherche, Odette Baril, pour le recrutement des sujets et sans qui l'étude n'aurait pas été possible.

Je tiens sincèrement à remercier les personnes qui ont accepté de participer à cette étude et qui ont permis la réalisation de ce projet.

Les derniers remerciements s'adressent à ma famille qui m'a soutenu pendant toutes ces années de doctorat.

Liste des références

- Abad-Rodriguez, J., Ledesma, M.D., Craessaerts, K., Perga, S., Medina, M., Delacourte, A., Dingwall, C., De Strooper, B., and Dotti, C.G. (2004). Neuronal membrane cholesterol loss enhances amyloid peptide generation. *J Cell Biol* 167, 953–960.
- Abello, D., Sancho, E., Camps, J., and Joven, J. (2014). Exploring the role of paraoxonases in the pathogenesis of coronary artery disease: a systematic review. *Int J Mol Sci* 15, 20997–21010.
- Agarwal, R., and Chase, S.D. (2002). Rapid, fluorimetric-liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 775, 121–126.
- Aldred, S., Bennett, S., and Mecocci, P. (2010). Increased low-density lipoprotein oxidation, but not total plasma protein oxidation, in Alzheimer’s disease. *Clin Biochem* 43, 267–271.
- Allinquant, B., Clamagirand, C., and Potier, M.-C. (2014). Role of cholesterol metabolism in the pathogenesis of Alzheimer’s disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 17, 319–323.
- Alzheimer, A., Stelzmann, R.A., Schnitzlein, H.N., and Murtagh, F.R. (1995). An English translation of Alzheimer’s 1907 paper, “Über eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde”. *Clin Anat* 8, 429–431.
- Arias-Vasquez, A., Isaacs, A., Aulchenko, Y.S., Hofman, A., Oostra, B.A., Breteler, M., and van Duijn, C.M. (2007). The cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene and the risk of Alzheimer’s disease. *Neurogenetics* 8, 189–193.
- Atzmon, G., Gabriely, I., Greiner, W., Davidson, D., Schechter, C., and Barzilai, N. (2002). Plasma HDL levels highly correlate with cognitive function in exceptional longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 57, M712–M715.
- Avila-Munoz, E., and Arias, C. (2015). Cholesterol-induced astrocyte activation is associated with increased amyloid precursor protein expression and processing. *Glia*.
- Aviram, M., Billecke, S., Sorenson, R., Bisgaier, C., Newton, R., Rosenblat, M., Erogul, J., Hsu, C., Dunlop, C., and La Du, B. (1998a). Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18, 1617–1624.
- Aviram, M., Rosenblat, M., Bisgaier, C.L., Newton, R.S., Primo-Parmo, S.L., and La Du, B.N. (1998b). Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 101, 1581–1590.

Bacchetti, T., Vignini, A., Giulietti, A., Nanetti, L., Provinciali, L., Luzzi, S., Mazzanti, L., and Ferretti, G. (2015). Higher Levels of Oxidized Low Density Lipoproteins in Alzheimer's Disease Patients: Roles for Platelet Activating Factor Acetyl Hydrolase and Paraoxonase-1. *J Alzheimers Dis* 46, 179–186.

Balducci, C., and Forloni, G. (2011). APP transgenic mice: their use and limitations. *Neuromolecular Med* 13, 117–137.

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

Barzilai, N., Atzmon, G., Derby, C.A., Bauman, J.M., and Lipton, R.B. (2006). A genotype of exceptional longevity is associated with preservation of cognitive function. *Neurology* 67, 2170–2175.

Bassett, C.N., Neely, M.D., Sidell, K.R., Markesbery, W.R., Swift, L.L., and Montine, T.J. (1999). Cerebrospinal fluid lipoproteins are more vulnerable to oxidation in Alzheimer's disease and are neurotoxic when oxidized ex vivo. *Lipids* 34, 1273–1280.

Bednarska-Makaruk, M.E., Krzywkowski, T., Graban, A., Lipczynska-Lojkowska, W., Bochynska, A., Rodo, M., Wehr, H., and Ryglewicz, D.K. (2013). Paraoxonase 1 (PON1) gene-108C>T and p.Q192R polymorphisms and arylesterase activity of the enzyme in patients with dementia. *Folia Neuropathol* 51, 111–119.

Bergt, C., Nakano, T., Ditterich, J., DeCarli, C., and Eiserich, J.P. (2006). Oxidized plasma high-density lipoprotein is decreased in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 41, 1542–1547.

Berrougui, H., Cherki, M., Koumbadinga, G.A., Isabelle, M., Douville, J., Spino, C., and Khalil, A. (2007). Antiatherogenic activity of extracts of *Argania spinosa* L. pericarp: beneficial effects on lipid peroxidation and cholesterol homeostasis. *Can J Physiol Pharmacol* 85, 918–927.

Berrougui, H., Loued, S., and Khalil, A. (2012). Purified human paraoxonase-1 interacts with plasma membrane lipid rafts and mediates cholesterol efflux from macrophages. *Free Radic Biol Med* 52, 1372–1381.

Biere, A.L., Ostaszewski, B., Stimson, E.R., Hyman, B.T., Maggio, J.E., and Selkoe, D.J. (1996). Amyloid beta-peptide is transported on lipoproteins and albumin in human plasma. *J Biol Chem* 271, 32916–32922.

Bonarek, M., Barberger-Gateau, P., Letenneur, L., Deschamps, V., Iron, A., Dubroca, B., and Dartigues, J.F. (2000). Relationships between cholesterol, apolipoprotein E polymorphism and dementia: a cross-sectional analysis from the PAQUID study. *Neuroepidemiology* 19, 141–148.

Bortnick, A.E., Rothblat, G.H., Stoudt, G., Hoppe, K.L., Royer, L.J., McNeish, J., and Francone, O.L. (2000). The correlation of ATP-binding cassette 1 mRNA levels with cholesterol efflux from various cell lines. *J Biol Chem* 275, 28634–28640.

Bounafaa, A., Berrougui, H., Ghalim, N., Nasser, B., Bagri, A., Moujahid, A., Ikhlef,

S., Camponova, P., Yamoul, N., Simo, O.K., et al. (2015). Association between Paraoxonase 1 (PON1) Polymorphisms and the Risk of Acute Coronary Syndrome in a North African Population. *PLoS One* *10*, e0133719.

Bourgade, K., Dupuis, G., Frost, E.H., and Fulop, T. (2016). Anti-Viral Properties of Amyloid-beta Peptides. *J Alzheimers Dis.*

Brion, J.P., Passareiro, H., Nunez, J., and Flament-Durand, J. (1985). Mise en évidence immunologique de la protéine tau au niveau des lésions de dégénérescence neurofibrillaire de la maladie d'alzheimer. *Arch Biol (Bruxelles)* *95*, 229–235.

Brunham, L.R., and Hayden, M.R. (2015). Human genetics of HDL: Insight into particle metabolism and function. *Prog Lipid Res* *58*, 14–25.

Buée, L., and Delacourte, A. (2002). La maladie d'alzheimer : Une tauopathie parmi d'autres ? *Médecine Sciences* *18*, 727–736.

Camps, J., Garcia-Heredia, A., Rull, A., Alonso-Villaverde, C., Aragonés, G., Beltran-Debon, R., Rodriguez-Gallego, E., and Joven, J. (2012). PPARs in Regulation of Paraoxonases: Control of Oxidative Stress and Inflammation Pathways. *PPAR Res* *2012*, 616371.

Cao, X., and Sudhof, T.C. (2001). A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* *293*, 115–120.

Castano, E.M., Roher, A.E., Esh, C.L., Kokjohn, T.A., and Beach, T. (2006). Comparative proteomics of cerebrospinal fluid in neuropathologically-confirmed Alzheimer's disease and non-demented elderly subjects. *Neurol Res* *28*, 155–163.

Castellano, J.M., Kim, J., Stewart, F.R., Jiang, H., DeMattos, R.B., Patterson, B.W., Fagan, A.M., Morris, J.C., Mawuenyega, K.G., Cruchaga, C., et al. (2011). Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid-beta peptide clearance. *Sci Transl Med* *3*, 89ra57.

Cellini, E., Tedde, A., Bagnoli, S., Nacmias, B., Piacentini, S., Bessi, V., Bracco, L., and Sorbi, S. (2006). Association analysis of the paraoxonase-1 gene with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* *408*, 199–202.

Cervellati, C., Trentini, A., Romani, A., Bellini, T., Bosi, C., Ortolani, B., Zurlo, A., Passaro, A., Seripa, D., and Zuliani, G. (2015). Serum paraoxonase and arylesterase activities of paraoxonase-1 (PON-1), mild cognitive impairment, and 2-year conversion to dementia: A pilot study. *J Neurochem* *135*, 395–401.

Chapuis, J., Boscher, M., Bensemain, F., Cotel, D., Amouyel, P., and Lambert, J.-C. (2009). Association study of the paraoxonase 1 gene with the risk of developing Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* *30*, 152–156.

Chartier-Harlin, M., Araria-Goumidi, L., and Lambert, J.C. (2002). Les formes tardives de la maladie d'Alzheimer : de la génétique à la biologie. *Médecine Sciences* *18*, 709–716.

- Chauhan, N.B., Siegel, G.J., and Feinstein, D.L. (2004). Effects of lovastatin and pravastatin on amyloid processing and inflammatory response in TgCRND8 brain. *Neurochem Res* 29, 1897–1911.
- Chen, X., Gawryluk, J.W., Wagener, J.F., Ghribi, O., and Geiger, J.D. (2008a). Caffeine blocks disruption of blood brain barrier in a rabbit model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 5, 12.
- Chen, D.-W., Yang, J.-F., Tang, Z., Dong, X.-M., Feng, X.-L., Yu, S., and Chan, P. (2008b). Cholesteryl ester transfer protein polymorphism D442G associated with a potential decreased risk for Alzheimer's disease as a modifier for APOE epsilon4 in Chinese. *Brain Res* 1187, 52–57.
- Cipriani, G., Dolciotti, C., Picchi, L., and Bonuccelli, U. (2011). Alzheimer and his disease: a brief history. *Neurol Sci* 32, 275–279.
- Claeyssen, S., Cochet, M., Donneger, R., Dumuis, A., Bockaert, J., and Giannoni, P. (2012). Alzheimer culprits: cellular crossroads and interplay. *Cell Signal* 24, 1831–1840.
- Costa, L.G., de Laat, R., Dao, K., Pellacani, C., Cole, T.B., and Furlong, C.E. (2014). Paraoxonase-2 (PON2) in brain and its potential role in neuroprotection. *Neurotoxicology* 43, 3–9.
- Cramer, C., Haan, M.N., Galea, S., Langa, K.M., and Kalbfleisch, J.D. (2008). Use of statins and incidence of dementia and cognitive impairment without dementia in a cohort study. *Neurology* 71, 344–350.
- Dantoine, T.F., Debord, J., Merle, L., Lacroix-Ramiandrisoa, H., Bourzeix, L., and Charmes, J.-P. (2002). Paraoxonase 1 activity: a new vascular marker of dementia? *Ann N Y Acad Sci* 977, 96–101.
- Devarajan, A., Shih, D., and Reddy, S.T. (2014). Inflammation, infection, cancer and all that...the role of paraoxonases. *Adv Exp Med Biol* 824, 33–41.
- Duffy, D., and Rader, D.J. (2009). Update on strategies to increase HDL quantity and function. *Nat Rev Cardiol* 6, 455–463.
- Durrington, P.N., Mackness, B., and Mackness, M.I. (2001). Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 473–480.
- Erlich, P.M., Lunetta, K.L., Cupples, L.A., Huyck, M., Green, R.C., Baldwin, C.T., and Farrer, L.A. (2006). Polymorphisms in the PON gene cluster are associated with Alzheimer disease. *Hum Mol Genet* 15, 77–85.
- Erlich, P.M., Lunetta, K.L., Cupples, L.A., Abraham, C.R., Green, R.C., Baldwin, C.T., and Farrer, L.A. (2012). Serum paraoxonase activity is associated with variants in the PON gene cluster and risk of Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* 33, 1015.e7–e23.
- Van Exel, E., de Craen, A.J.M., Gussekloo, J., Houx, P., Bootsma-van der Wiel, A., Macfarlane, P.W., Blauw, G.J., and Westendorp, R.G.J. (2002). Association between high-density lipoprotein and cognitive impairment in the oldest old. *Ann Neurol* 51,

716–721.

Favari, E., Chroni, A., Tietge, U.J.F., Zanotti, I., Escola-Gil, J.C., and Bernini, F. (2015). Cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Handb Exp Pharmacol* 224, 181–206.

Ferretti, G., Bacchetti, T., Negre-Salvayre, A., Salvayre, R., Dousset, N., and Curatola, G. (2006). Structural modifications of HDL and functional consequences. *Atherosclerosis* 184, 1–7.

Fidani, L., Goulas, A., Crook, R., Petersen, R.C., Tangalos, E., Kotsis, A., and Hardy, J. (2004). An association study of the cholesteryl ester transfer protein TaqI B polymorphism with late onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 357, 152–154.

Folstein, M.F., Folstein, S.E., and McHugh, P.R. (1975). "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12, 189–198.

Furlong, C.E., Marsillach, J., Jarvik, G.P., and Costa, L.G. (2016). Paraoxonases-1, -2 and -3: What are their functions? *Chem Biol Interact*.

Gaidukov, L., and Tawfik, D.S. (2005). High affinity, stability, and lactonase activity of serum paraoxonase PON1 anchored on HDL with ApoA-I. *Biochemistry* 44, 11843–11854.

Gaidukov, L., Rosenblat, M., Aviram, M., and Tawfik, D.S. (2006). The 192R/Q polymorphs of serum paraoxonase PON1 differ in HDL binding, lipolactonase stimulation, and cholesterol efflux. *J Lipid Res* 47, 2492–2502.

Gamba, P., Testa, G., Gargiulo, S., Staurengi, E., Poli, G., and Leonarduzzi, G. (2015). Oxidized cholesterol as the driving force behind the development of Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* 7, 119.

Garin, M.C., James, R.W., Dussoix, P., Blanche, H., Passa, P., Froguel, P., and Ruiz, J. (1997). Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest* 99, 62–66.

Geldenhuys, W.J., and Darvesh, A.S. (2015). Pharmacotherapy of Alzheimer's disease: current and future trends. *Expert Rev Neurother* 15, 3–5.

Girona, J., La Ville, A.E., Heras, M., Olive, S., and Masana, L. (1997). Oxidized lipoproteins including HDL and their lipid peroxidation products inhibit. *Free Radic Biol Med* 23, 658–667.

Glenner, G.G., and Wong, C.W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120, 885–890.

Gong, J.-S., Kobayashi, M., Hayashi, H., Zou, K., Sawamura, N., Fujita, S.C., Yanagisawa, K., and Michikawa, M. (2002). Apolipoprotein E (ApoE) isoform-dependent lipid release from astrocytes prepared from human ApoE3 and ApoE4

knock-in mice. *J Biol Chem* 277, 29919–29926.

Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y.C., Zaidi, M.S., and Wisniewski, H.M. (1986). Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 261, 6084–6089.

Harr, S.D., Uint, L., Hollister, R., Hyman, B.T., and Mendez, A.J. (1996). Brain expression of apolipoproteins E, J, and A-I in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 66, 2429–2435.

Hawkes, C.A., Gentleman, S.M., Nicoll, J.A., and Carare, R.O. (2015). Prenatal high-fat diet alters the cerebrovasculature and clearance of beta-amyloid in adult offspring. *J Pathol* 235, 619–631.

He, X., Zhang, Z., Zhang, J., Zhou, Y., Tang, M., Wu, C., and Hong, Z. (2006). Gln192Arg polymorphism in paraoxonase 1 gene is associated with Alzheimer disease in a Chinese Han ethnic population. *Chin Med J (Engl)* 119, 1204–1209.

Helal, O., Berrougui, H., Loued, S., and Khalil, A. (2013). Extra-virgin olive oil consumption improves the capacity of HDL to mediate cholesterol efflux and increases ABCA1 and ABCG1 expression in human macrophages. *Br J Nutr* 109, 1844–1855.

Helbecque, N., Codron, V., Cotel, D., and Amouyel, P. (2008). An apolipoprotein A-I gene promoter polymorphism associated with cognitive decline, but not with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 25, 97–102.

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

Hicks, D.A., Nalivaeva, N.N., and Turner, A.J. (2012). Lipid rafts and Alzheimer's disease: protein-lipid interactions and perturbation of signaling. *Front Physiol* 3, 189.

Hottman, D.A., Chernick, D., Cheng, S., Wang, Z., and Li, L. (2014). HDL and cognition in neurodegenerative disorders. *Neurobiol Dis* 72 Pt A, 22–36.

Hu, M.L. (1994). Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol* 233, 380–385.

Hudry, E., Van Dam, D., Kulik, W., De Deyn, P.P., Stet, F.S., Ahouansou, O., Benraiss, A., Delacourte, A., Bougneres, P., Aubourg, P., et al. (2010). Adeno-associated virus gene therapy with cholesterol 24-hydroxylase reduces the amyloid pathology before or after the onset of amyloid plaques in mouse models of Alzheimer's disease. *Mol Ther* 18, 44–53.

Ikhlef, S., Berrougui, H., Kamtchueng Simo, O., and Khalil, A. (2016). Paraoxonase 1-treated oxLDL promotes cholesterol efflux from macrophages by stimulating the PPARgamma-LXRalpha-ABCA1 pathway. *FEBS Lett* 590, 1614–1629.

Izzo, C., Grillo, F., and Murador, E. (1981). Improved method for determination of high-density-lipoprotein cholesterol I. Isolation of high-density lipoproteins by use of polyethylene glycol 6000. *Clin Chem* 27, 371–374.

Jaouad, L., Milochévitch, C., and Khalil, A. (2003). PON1 paraoxonase activity is reduced during HDL oxidation and is an indicator of HDL antioxidant capacity. *Free Radic Res* 37, 77–83.

Jiang, X., Guo, M., Su, J., Lu, B., Ma, D., Zhang, R., Yang, L., Wang, Q., Ma, Y., and Fan, Y. (2012). Simvastatin blocks blood-brain barrier disruptions induced by elevated cholesterol both in vivo and in vitro. *Int J Alzheimers Dis* 2012, 109324.

Jick, H., Zornberg, G.L., Jick, S.S., Seshadri, S., and Drachman, D.A. (2000). Statins and the risk of dementia. *Lancet* 356, 1627–1631.

Katzov, H., Chalmers, K., Palmgren, J., Andreassen, N., Johansson, B., Cairns, N.J., Gatz, M., Wilcock, G.K., Love, S., Pedersen, N.L., et al. (2004). Genetic variants of ABCA1 modify Alzheimer disease risk and quantitative traits related to beta-amyloid metabolism. *Hum Mutat* 23, 358–367.

Kawano, M., Kawakami, M., Otsuka, M., Yashima, H., Yaginuma, T., and Ueki, A. (1995). Marked decrease of plasma apolipoprotein AI and AII in Japanese patients with late-onset non-familial Alzheimer's disease. *Clin Chim Acta* 239, 209–211.

Khalil, A., Berrougui, H., Pawelec, G., and Fulop, T. (2012). Impairment of the ABCA1 and SR-BI-mediated cholesterol efflux pathways and HDL anti-inflammatory activity in Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev* 133, 20–29.

Khera, A.V., Cuchel, M., de la Llera-Moya, M., Rodrigues, A., Burke, M.F., Jafri, K., French, B.C., Phillips, J.A., Mucksavage, M.L., Wilensky, R.L., et al. (2011). Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *N Engl J Med* 364, 127–135.

Kivipelto, M., Helkala, E.L., Laakso, M.P., Hanninen, T., Hallikainen, M., Alhainen, K., Soininen, H., Tuomilehto, J., and Nissinen, A. (2001). Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *BMJ* 322, 1447–1451.

Klimkowicz-Mrowiec, A., Marona, M., Spisak, K., Jagiella, J., Wolkow, P., Szczudlik, A., and Slowik, A. (2011a). Paraoxonase 1 gene polymorphisms do not influence the response to treatment in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 32, 26–31.

Klimkowicz-Mrowiec, A., Marona, M., Wolkow, P., Witkowski, A., Maruszak, A., Styczynska, M., Barcikowska, M., Szczudlik, A., and Slowik, A. (2011b). Paraoxonase gene polymorphism and the risk for Alzheimer's disease in the polish population. *Dement Geriatr Cogn Disord* 31, 417–423.

Kontush, A., Berndt, C., Weber, W., Akopyan, V., Arlt, S., Schippling, S., and Beisiegel, U. (2001a). Amyloid-beta is an antioxidant for lipoproteins in cerebrospinal fluid and plasma. *Free Radic Biol Med* 30, 119–128.

Kontush, A., Lindahl, M., Lhomme, M., Calabresi, L., Chapman, M.J., and Davidson, W.S. (2015). Structure of HDL: particle subclasses and molecular components. *Handb Exp Pharmacol* 224, 3–51.

Kontush, A., Mann, U., Arlt, S., Ujeyl, A., Luhrs, C., Muller-Thomsen, T., and

Beisiegel, U. (2001b). Influence of vitamin E and C supplementation on lipoprotein oxidation in patients with Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 31, 345–354.

Koudinov, A.R., Koudinova, N.V., Kumar, A., Beavis, R.C., and Ghiso, J. (1996). Biochemical characterization of Alzheimer's soluble amyloid beta protein in human cerebrospinal fluid: association with high density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 223, 592–597.

Koudinov, A.R., Koudinova, N.V., Berezov, T.T., and Ivanov, Y.D. (1999). HDL phospholipid: a natural inhibitor of Alzheimer's amyloid beta-fibrillogenesis? *Clin Chem Lab Med* 37, 993–994.

Koudinov, A.R., Berezov, T.T., and Koudinova, N.V. (2001). The levels of soluble amyloid beta in different high density lipoprotein subfractions distinguish Alzheimer's and normal aging cerebrospinal fluid: implication for brain cholesterol pathology? *Neurosci Lett* 314, 115–118.

Kuerban, B., Shibata, N., Komatsu, M., Ohnuma, T., and Arai, H. (2010). Genetic association between PLTP gene polymorphisms and Alzheimer's disease in a Japanese population. *Dement Geriatr Cogn Disord* 30, 78–82.

Kuo, Y.M., Emmerling, M.R., Bisgaier, C.L., Essenburg, A.D., Lampert, H.C., Drumm, D., and Roher, A.E. (1998). Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain abeta 1-42 levels. *Biochem Biophys Res Commun* 252, 711–715.

Kuo, Y.M., Emmerling, M.R., Lampert, H.C., Hempelman, S.R., Kokjohn, T.A., Woods, A.S., Cotter, R.J., and Roher, A.E. (1999). High levels of circulating Abeta42 are sequestered by plasma proteins in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 257, 787–791.

LaDu, M.J., Falduto, M.T., Manelli, A.M., Reardon, C.A., Getz, G.S., and Frail, D.E. (1994). Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid. *J Biol Chem* 269, 23403–23406.

LaDu, M.J., Pederson, T.M., Frail, D.E., Reardon, C.A., Getz, G.S., and Falduto, M.T. (1995). Purification of apolipoprotein E attenuates isoform-specific binding to beta-amyloid. *J Biol Chem* 270, 9039–9042.

Launer, L.J., White, L.R., Petrovitch, H., Ross, G.W., and Curb, J.D. (2001). Cholesterol and neuropathologic markers of AD: a population-based autopsy study. *Neurology* 57, 1447–1452.

Laws, S.M., Eckart, K., Friedrich, P., Eisele, T., Kurz, A., Forstl, H., and Riemenschneider, M. (2010). No association of lipase C polymorphisms with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 31, 2192–2193.

Leduc, V., and Poirier, J. (2008). Polymorphisms at the paraoxonase 1 L55M and Q192R loci affect the pathophysiology of Alzheimer's disease: emphasis on the cholinergic system and beta-amyloid levels. *Neurodegener Dis* 5, 225–227.

Leduc, V., Theroux, L., Dea, D., Robitaille, Y., and Poirier, J. (2009). Involvement of paraoxonase 1 genetic variants in Alzheimer's disease neuropathology. *Eur J Neurosci*

30, 1823–1830.

Lefterov, I., Fitz, N.F., Cronican, A.A., Fogg, A., Lefterov, P., Kodali, R., Wetzel, R., and Koldamova, R. (2010). Apolipoprotein A-I deficiency increases cerebral amyloid angiopathy and cognitive deficits in APP/PS1DeltaE9 mice. *J Biol Chem* 285, 36945–36957.

Lewis, T.L., Cao, D., Lu, H., Mans, R.A., Su, Y.R., Jungbauer, L., Linton, M.F., Fazio, S., LaDu, M.J., and Li, L. (2010). Overexpression of human apolipoprotein A-I preserves cognitive function and attenuates neuroinflammation and cerebral amyloid angiopathy in a mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 285, 36958–36968.

Li, G., Shofer, J.B., Kukull, W.A., Peskind, E.R., Tsuang, D.W., Breitner, J.C.S., McCormick, W., Bowen, J.D., Teri, L., Schellenberg, G.D., et al. (2005). Serum cholesterol and risk of Alzheimer disease: a community-based cohort study. *Neurology* 65, 1045–1050.

Li, Q., Huang, P., He, Q.-C., Lin, Q.-Z., Wu, J., and Yin, R.-X. (2014). Association between the CETP polymorphisms and the risk of Alzheimer's disease, carotid atherosclerosis, longevity, and the efficacy of statin therapy. *Neurobiol Aging* 35, 1513.e13–e23.

Ligthart, G.J., Corberand, J.X., Fournier, C., Galanaud, P., Hijmans, W., Kennes, B., Muller-Hermelink, H.K., and Steinmann, G.G. (1984). Admission criteria for immunogerontological studies in man: the SENIEUR protocol. *Mech Ageing Dev* 28, 47–55.

Lin, Q., Cao, Y., and Gao, J. (2015). Decreased expression of the APOA1-APOC3-APOA4 gene cluster is associated with risk of Alzheimer's disease. *Drug Des Devel Ther* 9, 5421–5431.

Liu, H.-C., Hu, C.-J., Chang, J.-G., Sung, S.-M., Lee, L.-S., Yuan, R.-Y., and Leu, S.-J. (2006). Proteomic identification of lower apolipoprotein A-I in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 21, 155–161.

Liu, J.-P., Tang, Y., Zhou, S., Toh, B.H., McLean, C., and Li, H. (2010). Cholesterol involvement in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Mol Cell Neurosci* 43, 33–42.

Loued, S., Isabelle, M., Berrougui, H., and Khalil, A. (2012). The anti-inflammatory effect of paraoxonase 1 against oxidized lipids depends on its association with high density lipoproteins. *Life Sci* 90, 82–88.

Lovestone, S. (2000). Fleshing out the amyloid cascade hypothesis: the molecular biology of Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci* 2, 101–110.

Luedecking-Zimmer, E., DeKosky, S.T., Nebes, R., and Kamboh, M.I. (2003). Association of the 3' UTR transcription factor LBP-1c/CP2/LSF polymorphism with late-onset Alzheimer's disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 117B, 114–117.

Lupton, M.K., Proitsi, P., Lin, K., Hamilton, G., Daniilidou, M., Tsolaki, M., and

Powell, J.F. (2014). The role of ABCA1 gene sequence variants on risk of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 38, 897–906.

Mackness, B., Durrington, P.N., and Mackness, M.I. (1998). Lack of protection against oxidative modification of LDL by avian HDL. *Biochem Biophys Res Commun* 247, 443–446.

Mackness, B., Hine, D., Liu, Y., Mastorikou, M., and Mackness, M. (2004). Paraoxonase-1 inhibits oxidised LDL-induced MCP-1 production by endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 318, 680–683.

Mackness, M.I., Arrol, S., Abbott, C., and Durrington, P.N. (1993). Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis* 104, 129–135.

Mackness, M.I., Durrington, P.N., and Mackness, B. (2000). How high-density lipoprotein protects against the effects of lipid peroxidation. *Curr Opin Lipidol* 11, 383–388.

Mahley, R.W. (2016). Central Nervous System Lipoproteins: ApoE and Regulation of Cholesterol Metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 36, 1305–1315.

Mandas, A., Abete, C., Putzu, P.F., la Colla, P., Dessi, S., and Pani, A. (2012). Changes in cholesterol metabolism-related gene expression in peripheral blood mononuclear cells from Alzheimer patients. *Lipids Health Dis* 11, 39.

Marquer, C., Devauges, V., Cossec, J.-C., Liot, G., Lecart, S., Saudou, F., Duyckaerts, C., Leveque-Fort, S., and Potier, M.-C. (2011). Local cholesterol increase triggers amyloid precursor protein-Bace1 clustering in lipid rafts and rapid endocytosis. *FASEB J* 25, 1295–1305.

Marquer, C., Laine, J., Dauphinot, L., Hanbouch, L., Lemerrier-Neuillet, C., Pierrot, N., Bossers, K., Le, M., Corlier, F., Benstaali, C., et al. (2014). Increasing membrane cholesterol of neurons in culture recapitulates Alzheimer's disease early phenotypes. *Mol Neurodegener* 9, 60.

Martin, M.G., Pfrieger, F., and Dotti, C.G. (2014). Cholesterol in brain disease: sometimes determinant and frequently implicated. *EMBO Rep* 15, 1036–1052.

Martins, I.C., Kuperstein, I., Wilkinson, H., Maes, E., Vanbrabant, M., Jonckheere, W., Van Gelder, P., Hartmann, D., D'Hooge, R., De Strooper, B., et al. (2008). Lipids revert inert Aβ amyloid fibrils to neurotoxic protofibrils that affect learning in mice. *EMBO J* 27, 224–233.

Maurer, K., Volk, S., and Gerbaldo, H. (1997). Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet* 349, 1546–1549.

McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., and Stadlan, E.M. (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34, 939–944.

Menini, T., and Gugliucci, A. (2014). Paraoxonase 1 in neurological disorders. *Redox Rep* 19, 49–58.

Merched, A., Xia, Y., Visvikis, S., Serot, J.M., and Siest, G. (2000). Decreased high-density lipoprotein cholesterol and serum apolipoprotein AI concentrations are highly correlated with the severity of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21, 27–30.

Michaelson, D.M. (2014). APOE epsilon4: the most prevalent yet understudied risk factor for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 10, 861–868.

Michikawa, M., Fan, Q.W., Isobe, I., and Yanagisawa, K. (2000). Apolipoprotein E exhibits isoform-specific promotion of lipid efflux from astrocytes and neurons in culture. *J Neurochem* 74, 1008–1016.

Michikawa, M., Gong, J.S., Fan, Q.W., Sawamura, N., and Yanagisawa, K. (2001). A novel action of alzheimer's amyloid beta-protein (Abeta): oligomeric Abeta promotes lipid release. *J Neurosci* 21, 7226–7235.

Minagawa, H., Gong, J.-S., Jung, C.-G., Watanabe, A., Lund-Katz, S., Phillips, M.C., Saito, H., and Michikawa, M. (2009). Mechanism underlying apolipoprotein E (ApoE) isoform-dependent lipid efflux from neural cells in culture. *J Neurosci Res* 87, 2498–2508.

Moller, H.J., and Graeber, M.B. (1998). The case described by Alois Alzheimer in 1911. Historical and conceptual perspectives based on the clinical record and neurohistological sections. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 248, 111–122.

Mori, T., Paris, D., Town, T., Rojiani, A.M., Sparks, D.L., Delledonne, A., Crawford, F., Abdullah, L.I., Humphrey, J.A., Dickson, D.W., et al. (2001). Cholesterol accumulates in senile plaques of Alzheimer disease patients and in transgenic APP(SW) mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 60, 778–785.

Muller, T., Schrotter, A., Loosse, C., Pfeiffer, K., Theiss, C., Kauth, M., Meyer, H.E., and Marcus, K. (2013). A ternary complex consisting of AICD, FE65, and TIP60 down-regulates Stathmin1. *Biochim Biophys Acta* 1834, 387–394.

Musico, M., Caltagirone, C., Sorbi, S., and Bonavita, V. (2004). Italian Neurological Society guidelines for the diagnosis of dementia: revision I. *Neurol Sci* 25, 154–182.

Nalivaeva, N.N., and Turner, A.J. (2013). The amyloid precursor protein: a biochemical enigma in brain development, function and disease. *FEBS Lett* 587, 2046–2054.

Nomura, S., Umeda, T., Tomiyama, T., and Mori, H. (2013). The E693Delta (Osaka) mutation in amyloid precursor protein potentiates cholesterol-mediated intracellular amyloid beta toxicity via its impaired cholesterol efflux. *J Neurosci Res* 91, 1541–1550.

Olesen, O.F., and Dago, L. (2000). High density lipoprotein inhibits assembly of amyloid beta-peptides into fibrils. *Biochem Biophys Res Commun* 270, 62–66.

Ozaki, T., Li, Y., Kikuchi, H., Tomita, T., Iwatsubo, T., and Nakagawara, A. (2006). The intracellular domain of the amyloid precursor protein (AICD) enhances the p53-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 351, 57–63.

- Panchal, M., Loeper, J., Cossec, J.-C., Perruchini, C., Lazar, A., Pompon, D., and Duyckaerts, C. (2010). Enrichment of cholesterol in microdissected Alzheimer's disease senile plaques as assessed by mass spectrometry. *J Lipid Res* 51, 598–605.
- Pani, A., Mandas, A., Diaz, G., Abete, C., Cocco, P.L., Angius, F., Brundu, A., Mucaka, N., Pais, M.E., Saba, A., et al. (2009). Accumulation of neutral lipids in peripheral blood mononuclear cells as a distinctive trait of Alzheimer patients and asymptomatic subjects at risk of disease. *BMC Med* 7, 66.
- Paragh, G., Balla, P., Katona, E., Seres, I., Egerhazi, A., and Degrell, I. (2002). Serum paraoxonase activity changes in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 252, 63–67.
- Pardossi-Piquard, R., and Checler, F. (2012). The physiology of the beta-amyloid precursor protein intracellular domain AICD. *J Neurochem* 120 Suppl 1, 109–124.
- Park, S.H., Kim, J.H., Choi, K.H., Jang, Y.J., Bae, S.S., Choi, B.T., and Shin, H.K. (2013). Hypercholesterolemia accelerates amyloid beta-induced cognitive deficits. *Int J Mol Med* 31, 577–582.
- Paula-Lima, A.C., Tricerri, M.A., Brito-Moreira, J., Bomfim, T.R., Oliveira, F.F., Magdesian, M.H., Grinberg, L.T., Panizzutti, R., and Ferreira, S.T. (2009). Human apolipoprotein A-I binds amyloid-beta and prevents Aβ-induced neurotoxicity. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 1361–1370.
- Perez-Mendez, O., Pacheco, H.G., Martinez-Sanchez, C., and Franco, M. (2014). HDL-cholesterol in coronary artery disease risk: function or structure? *Clin Chim Acta* 429, 111–122.
- Perla-Kajan, J., and Jakubowski, H. (2010). Paraoxonase 1 protects against protein N-homocysteinylation in humans. *FASEB J* 24, 931–936.
- Perla-Kajan, J., and Jakubowski, H. (2012). Paraoxonase 1 and homocysteine metabolism. *Amino Acids* 43, 1405–1417.
- Pfrieger, F.W., and Ungerer, N. (2011). Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. *Prog Lipid Res* 50, 357–371.
- Phillips, M.C. (2014). Molecular mechanisms of cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem* 289, 24020–24029.
- Pi, Y., Zhang, L., Chang, K., Li, B., Guo, L., Fang, C., Gao, C., Wang, J., Xiang, J., and Li, J. (2012). Lack of an association between Paraoxonase 1 gene polymorphisms (Q192R, L55M) and Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Neurosci Lett* 523, 174–179.
- Piau, A., Nourhashemi, F., Hein, C., Caillaud, C., and Vellas, B. (2011). Progress in the development of new drugs in Alzheimer's disease. *J Nutr Health Aging* 15, 45–57.
- Pola, R., Gaetani, E., Flex, A., Gerardino, L., Aloisi, F., Flore, R., Serricchio, M., Pola, P., and Bernabei, R. (2003). Lack of association between Alzheimer's disease and Gln-Arg 192 Q/R polymorphism of the PON-1 gene in an Italian population. *Dement Geriatr Cogn Disord* 15, 88–91.

- Pola, R., Flex, A., Ciaburri, M., Rovella, E., Valiani, A., Reali, G., Silveri, M.C., and Bernabei, R. (2005). Responsiveness to cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease: a possible role for the 192 Q/R polymorphism of the PON-1 gene. *Neurosci Lett* 382, 338–341.
- Popp, J., Lewczuk, P., Kolsch, H., Meichsner, S., Maier, W., Kornhuber, J., Jessen, F., and Lutjohann, D. (2012). Cholesterol metabolism is associated with soluble amyloid precursor protein production in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 123, 310–316.
- Popp, J., Meichsner, S., Kolsch, H., Lewczuk, P., Maier, W., Kornhuber, J., Jessen, F., and Lutjohann, D. (2013). Cerebral and extracerebral cholesterol metabolism and CSF markers of Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol* 86, 37–42.
- Querfurth, H.W., and LaFerla, F.M. (2010). Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 362, 329–344.
- Reddy, V.P., Zhu, X., Perry, G., and Smith, M.A. (2009). Oxidative stress in diabetes and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 16, 763–774.
- Refolo, L.M., Malester, B., LaFrancois, J., Bryant-Thomas, T., Wang, R., Tint, G.S., Sambamurti, K., Duff, K., and Pappolla, M.A. (2000). Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis* 7, 321–331.
- Refolo, L.M., Pappolla, M.A., LaFrancois, J., Malester, B., Schmidt, S.D., Thomas-Bryant, T., Tint, G.S., Wang, R., Mercken, M., Petanceska, S.S., et al. (2001). A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 8, 890–899.
- Reitz, C., Tang, M.-X., Luchsinger, J., and Mayeux, R. (2004). Relation of plasma lipids to Alzheimer disease and vascular dementia. *Arch Neurol* 61, 705–714.
- Reitz, C., Tang, M.-X., Schupf, N., Manly, J.J., Mayeux, R., and Luchsinger, J.A. (2010). Association of higher levels of high-density lipoprotein cholesterol in elderly individuals and lower risk of late-onset Alzheimer disease. *Arch Neurol* 67, 1491–1497.
- Reznick, A.Z., and Packer, L. (1994). Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 233, 357–363.
- Rodriguez, E., Mateo, I., Infante, J., Llorca, J., Berciano, J., and Combarros, O. (2006). Cholesteryl ester transfer protein (CETP) polymorphism modifies the Alzheimer's disease risk associated with APOE epsilon4 allele. *J Neurol* 253, 181–185.
- Rohatgi, A., Khera, A., Berry, J.D., Givens, E.G., Ayers, C.R., Wedin, K.E., Neeland, I.J., Yuhanna, I.S., Rader, D.R., de Lemos, J.A., et al. (2014). HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. *N Engl J Med* 371, 2383–2393.
- Romas, S.N., Tang, M.X., Berglund, L., and Mayeux, R. (1999). APOE genotype, plasma lipids, lipoproteins, and AD in community elderly. *Neurology* 53, 517–521.
- Rosenblat, M., and Aviram, M. (2009). Paraoxonases role in the prevention of cardiovascular diseases. *Biofactors* 35, 98–104.

Rosenblat, M., Vaya, J., Shih, D., and Aviram, M. (2005). Paraoxonase 1 (PON1) enhances HDL-mediated macrophage cholesterol efflux via the ABCA1 transporter in association with increased HDL binding to the cells: a possible role for lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis* 179, 69–77.

Rosenblat, M., Gaidukov, L., Khersonsky, O., Vaya, J., Oren, R., Tawfik, D.S., and Aviram, M. (2006a). The catalytic histidine dyad of high density lipoprotein-associated serum paraoxonase-1 (PON1) is essential for PON1-mediated inhibition of low density lipoprotein oxidation and stimulation of macrophage cholesterol efflux. *J Biol Chem* 281, 7657–7665.

Rosenblat, M., Karry, R., and Aviram, M. (2006b). Paraoxonase 1 (PON1) is a more potent antioxidant and stimulant of macrophage cholesterol efflux, when present in HDL than in lipoprotein-deficient serum: relevance to diabetes. *Atherosclerosis* 187, 74–81.

Russell, R.L., Siedlak, S.L., Raina, A.K., Bautista, J.M., Smith, M.A., and Perry, G. (1999). Increased neuronal glucose-6-phosphate dehydrogenase and sulfhydryl levels indicate reductive compensation to oxidative stress in Alzheimer disease. *Arch Biochem Biophys* 370, 236–239.

Sabbagh, M., Zahiri, H.R., Ceimo, J., Cooper, K., Gaul, W., Connor, D., and Sparks, D.L. (2004). Is there a characteristic lipid profile in Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis* 6, 585–589; discussion 673–681.

Saczynski, J.S., White, L., Peila, R.L., Rodriguez, B.L., and Launer, L.J. (2007). The relation between apolipoprotein A-I and dementia: the Honolulu-Asia aging study. *Am J Epidemiol* 165, 985–992.

Sanders, A.E., Wang, C., Katz, M., Derby, C.A., Barzilai, N., Ozelius, L., and Lipton, R.B. (2010). Association of a functional polymorphism in the cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene with memory decline and incidence of dementia. *JAMA* 303, 150–158.

Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D., George-Hyslop, P.H., Pericak-Vance, M.A., Joo, S.H., Rosi, B.L., Gusella, J.F., Crapper-MacLachlan, D.R., and Alberts, M.J. (1993). Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43, 1467–1472.

Scacchi, R., Gambina, G., Martini, M.C., Broggio, E., Vilardo, T., and Corbo, R.M. (2003). Different pattern of association of paraoxonase Gln192-->Arg polymorphism with sporadic late-onset Alzheimer's disease and coronary artery disease. *Neurosci Lett* 339, 17–20.

Schippling, S., Kontush, A., Arlt, S., Buhmann, C., Sturenburg, H.J., Mann, U., Muller-Thomsen, T., and Beisiegel, U. (2000). Increased lipoprotein oxidation in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 28, 351–360.

Selkoe, D.J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81, 741–766.

Shi, C., Liu, J., Wu, F., Zhu, X., Yew, D.T., and Xu, J. (2011). beta-sitosterol inhibits

high cholesterol-induced platelet beta-amyloid release. *J Bioenerg Biomembr* 43, 691–697.

Shi, J., Zhang, S., Ma, C., Tang, M., Liu, X., Wang, Y., Han, H., Guo, Y., Feng, R., and Miao, G. (2004). [Gln192Arg polymorphism of the paraoxonase-1 gene is not associated with Alzheimer's disease in Chinese]. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 24, 371–374.

Shibata, N., Nagata, T., Shinagawa, S., Ohnuma, T., Shimazaki, H., Komatsu, M., Kuerban, B., Tomson, K., Nakayama, K., Yamada, H., et al. (2013). Genetic association between APOA1 and APOD polymorphisms and Alzheimer's disease in a Japanese population. *J Neural Transm (Vienna)* 120, 1599–1603.

Shie, F.-S., Jin, L.-W., Cook, D.G., Leverenz, J.B., and LeBoeuf, R.C. (2002). Diet-induced hypercholesterolemia enhances brain A beta accumulation in transgenic mice. *Neuroreport* 13, 455–459.

Shih, D.M., Gu, L., Xia, Y.R., Navab, M., Li, W.F., Hama, S., Castellani, L.W., Furlong, C.E., Costa, L.G., Fogelman, A.M., et al. (1998). Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 394, 284–287.

Sibmooh, N., Yamanont, P., Krudsood, S., Leowattana, W., Brittenham, G., Looareesuwan, S., and Udomsangpetch, R. (2004). Increased fluidity and oxidation of malarial lipoproteins: relation with severity and induction of endothelial expression of adhesion molecules. *Lipids Health Dis* 3, 15.

Simons, M., Keller, P., De Strooper, B., Beyreuther, K., Dotti, C.G., and Simons, K. (1998). Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6460–6464.

Singh, P., Saxena, R., Srinivas, G., Pande, G., and Chattopadhyay, A. (2013). Cholesterol biosynthesis and homeostasis in regulation of the cell cycle. *PLoS One* 8, e58833.

Singh-Manoux, A., Gimeno, D., Kivimaki, M., Brunner, E., and Marmot, M.G. (2008). Low HDL cholesterol is a risk factor for deficit and decline in memory in midlife: the Whitehall II study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 1556–1562.

Slomnicki, L.P., and Lesniak, W. (2008). A putative role of the Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain (AICD) in transcription. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 68, 219–228.

Smach, M.A., Edziri, H., Charfeddine, B., Ben Othman, L., Lammouchi, T., Ltaief, A., Nafati, S., Dridi, H., Bennamou, S., and Limem, K. (2011). Polymorphism in apoA1 Influences High-Density Lipoprotein Cholesterol Levels but Is Not a Major Risk Factor of Alzheimer's Disease. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra* 1, 249–257.

Solomon, A., Leoni, V., Kivipelto, M., Besga, A., Oksengard, A.R., Julin, P., Svensson, L., Wahlund, L.-O., Andreasen, N., Winblad, B., et al. (2009). Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol reflect brain volumes in patients without objective cognitive impairment but not in those with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 462, 89–93.

- Song, H., Saito, K., Seishima, M., Noma, A., Urakami, K., and Nakashima, K. (1997). Cerebrospinal fluid apo E and apo A-I concentrations in early- and late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 231, 175–178.
- Soran, H., Schofield, J.D., and Durrington, P.N. (2015). Antioxidant properties of HDL. *Front Pharmacol* 6, 222.
- Sparks, D.L., Scheff, S.W., Hunsaker, J.C. 3rd, Liu, H., Landers, T., and Gross, D.R. (1994). Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. *Exp Neurol* 126, 88–94.
- Sparks, D.L., Liu, H., Gross, D.R., and Scheff, S.W. (1995). Increased density of cortical apolipoprotein E immunoreactive neurons in rabbit brain after dietary administration of cholesterol. *Neurosci Lett* 187, 142–144.
- Stewart, R., White, L.R., Xue, Q.-L., and Launer, L.J. (2007). Twenty-six-year change in total cholesterol levels and incident dementia: the Honolulu-Asia Aging Study. *Arch Neurol* 64, 103–107.
- Strassnig, M., and Ganguli, M. (2005). About a peculiar disease of the cerebral cortex: Alzheimer's original case revisited. *Psychiatry (Edgmont)* 2, 30–33.
- Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S., and Roses, A.D. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1977–1981.
- De Strooper, B. (2003). Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* 38, 9–12.
- Sun, Y.-M., Li, H.-L., Guo, Q.-H., Wu, P., Hong, Z., Lu, C.-Z., and Wu, Z.-Y. (2012). The polymorphism of the ATP-binding cassette transporter 1 gene modulates Alzheimer disease risk in Chinese Han ethnic population. *Am J Geriatr Psychiatry* 20, 603–611.
- Sundar, P.D., Feingold, E., Minster, R.L., DeKosky, S.T., and Kambh, M.I. (2007). Gender-specific association of ATP-binding cassette transporter 1 (ABCA1) polymorphisms with the risk of late-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 28, 856–862.
- Tan, Z.S., Seshadri, S., Beiser, A., Wilson, P.W.F., Kiel, D.P., Tocco, M., D'Agostino, R.B., and Wolf, P.A. (2003). Plasma total cholesterol level as a risk factor for Alzheimer disease: the Framingham Study. *Arch Intern Med* 163, 1053–1057.
- Tward, A., Xia, Y.-R., Wang, X.-P., Shi, Y.-S., Park, C., Castellani, L.W., Lusis, A.J., and Shih, D.M. (2002). Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation* 106, 484–490.
- Ullrich, C., Pirchl, M., and Humpel, C. (2010). Hypercholesterolemia in rats impairs the cholinergic system and leads to memory deficits. *Mol Cell Neurosci* 45, 408–417.
- Umeda, T., Mori, H., Zheng, H., and Tomiyama, T. (2010). Regulation of cholesterol efflux by amyloid beta secretion. *J Neurosci Res* 88, 1985–1994.

- Umeda, T., Tomiyama, T., Kitajima, E., Idomoto, T., Nomura, S., Lambert, M.P., Klein, W.L., and Mori, H. (2012). Hypercholesterolemia accelerates intraneuronal accumulation of A β oligomers resulting in memory impairment in Alzheimer's disease model mice. *Life Sci* 91, 1169–1176.
- Vollbach, H., Heun, R., Morris, C.M., Edwardson, J.A., McKeith, I.G., Jessen, F., Schulz, A., Maier, W., and Kolsch, H. (2005). APOA1 polymorphism influences risk for early-onset nonfamilial AD. *Ann Neurol* 58, 436–441.
- Voloshyna, I., Modayil, S., Littlefield, M.J., Belilos, E., Belostocki, K., Bonetti, L., Rosenblum, G., Carsons, S.E., and Reiss, A.B. (2013). Plasma from rheumatoid arthritis patients promotes pro-atherogenic cholesterol transport gene expression in THP-1 human macrophages. *Exp Biol Med (Maywood)* 238, 1192–1197.
- Vos, E., and Nehrlich, H.H. (2009). Use of statins and incidence of dementia and cognitive impairment without dementia in a cohort study. *Neurology* 73, 406; author reply 406–407.
- Wang, J., Wu, F., and Shi, C. (2013a). Substitution of membrane cholesterol with beta-sitosterol promotes nonamyloidogenic cleavage of endogenous amyloid precursor protein. *Neuroscience* 247, 227–233.
- Wang, X.-F., Cao, Y.-W., Feng, Z.-Z., Fu, D., Ma, Y.-S., Zhang, F., Jiang, X.-X., and Shao, Y.-C. (2013b). Quantitative assessment of the effect of ABCA1 gene polymorphism on the risk of Alzheimer's disease. *Mol Biol Rep* 40, 779–785.
- Watson, A.D., Berliner, J.A., Hama, S.Y., La Du, B.N., Faull, K.F., Fogelman, A.M., and Navab, M. (1995). Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 96, 2882–2891.
- Wehr, H., Bednarska-Makaruk, M., Graban, A., Lipczynska-Lojkowska, W., Rodo, M., Bochynska, A., and Ryglewicz, D. (2009). Paraoxonase activity and dementia. *J Neurol Sci* 283, 107–108.
- Whitmer, R.A., Sidney, S., Selby, J., Johnston, S.C., and Yaffe, K. (2005). Midlife cardiovascular risk factors and risk of dementia in late life. *Neurology* 64, 277–281.
- Wingo, T.S., Rosen, A., Cutler, D.J., Lah, J.J., and Levey, A.I. (2012). Paraoxonase-1 polymorphisms in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and. *Neurobiol Aging* 33, 204.e13–e15.
- Witte, M.M., Foster, N.L., Fleisher, A.S., Williams, M.M., Quaid, K., Wasserman, M., Hunt, G., Roberts, J.S., Rabinovici, G.D., Levenson, J.L., et al. (2015). Clinical use of amyloid-positron emission tomography neuroimaging: Practical and bioethical considerations. *Alzheimers Dement (Amst)* 1, 358–367.
- Wollmer, M.A., Streffer, J.R., Lutjohann, D., Tsolaki, M., Iakovidou, V., Hegi, T., Pasch, T., Jung, H.H., Bergmann, K. von, Nitsch, R.M., et al. (2003). ABCA1 modulates CSF cholesterol levels and influences the age at onset of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 24, 421–426.

Wollmer, M.A., Slegers, K., Ingelsson, M., Zekanowski, C., Brouwers, N., Maruszak, A., Brunner, F., Huynh, K.-D., Kilander, L., Brundin, R.-M., et al. (2007). Association study of cholesterol-related genes in Alzheimer's disease. *Neurogenetics* 8, 179–188.

Wolozin, B. (2001). A fluid connection: cholesterol and Abeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5371–5373.

Wolozin, B., Kellman, W., Ruosseau, P., Celesia, G.G., and Siegel, G. (2000). Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with. *Arch Neurol* 57, 1439–1443.

Wood, W.G., Igbavboa, U., Eckert, G.P., Johnson-Anuna, L.N., and Muller, W.E. (2005). Is hypercholesterolemia a risk factor for Alzheimer's disease? *Mol Neurobiol* 31, 185–192.

Wood, W.G., Li, L., Muller, W.E., and Eckert, G.P. (2014). Cholesterol as a causative factor in Alzheimer's disease: a debatable hypothesis. *J Neurochem* 129, 559–572.

Xiao, Z., Wang, J., Chen, W., Wang, P., Zeng, H., and Chen, W. (2012). Association studies of several cholesterol-related genes (ABCA1, CETP and LIPC) with serum lipids and risk of Alzheimer's disease. *Lipids Health Dis* 11, 163.

Xiong, H., Callaghan, D., Jones, A., Walker, D.G., Lue, L.-F., Beach, T.G., Sue, L.I., Woulfe, J., Xu, H., Stanimirovic, D.B., et al. (2008). Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high beta- and gamma-secretase activities and Abeta production. *Neurobiol Dis* 29, 422–437.

Xiu, J., Nordberg, A., Qi, X., and Guan, Z.-Z. (2006). Influence of cholesterol and lovastatin on alpha-form of secreted amyloid precursor protein and expression of alpha7 nicotinic receptor on astrocytes. *Neurochem Int* 49, 459–465.

Xue-Shan, Z., Juan, P., Qi, W., Zhong, R., Li-Hong, P., Zhi-Han, T., Zhi-Sheng, J., Gui-Xue, W., and Lu-Shan, L. (2016). Imbalanced cholesterol metabolism in Alzheimer's disease. *Clin Chim Acta* 456, 107–114.

Yamamoto, S., Narita, I., and Kotani, K. (2016). The macrophage and its related cholesterol efflux as a HDL function index in atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 457, 117–122.

Yao, J., Ho, D., Calingasan, N.Y., Pipalia, N.H., Lin, M.T., and Beal, M.F. (2012). Neuroprotection by cyclodextrin in cell and mouse models of Alzheimer disease. *J Exp Med* 209, 2501–2513.

Yu, L., Shulman, J.M., Chibnik, L., Leurgans, S., Schneider, J.A., De Jager, P.L., and Bennett, D.A. (2012). The CETP I405V polymorphism is associated with an increased risk of Alzheimer's disease. *Aging Cell* 11, 228–233.

Zannis, V.I., Chroni, A., and Krieger, M. (2006). Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J Mol Med (Berl)* 84, 276–294.

Zannis, V.I., Fotakis, P., Koukos, G., Kardassis, D., Ehnholm, C., Jauhiainen, M., and Chroni, A. (2015). HDL biogenesis, remodeling, and catabolism. *Handb Exp Pharmacol*

224, 53–111.

Zengi, O., Karakas, A., Ergun, U., Senes, M., Inan, L., and Yucel, D. (2012). Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine level and plasma paraoxonase 1 activity with Alzheimer's disease. *Clin Chem Lab Med* 50, 529–534.

Zhou, F., Gong, K., Song, B., Ma, T., van Laar, T., Gong, Y., and Zhang, L. (2012). The APP intracellular domain (AICD) inhibits Wnt signalling and promotes neurite outgrowth. *Biochim Biophys Acta* 1823, 1233–1241.

Zhu, H., Gopalraj, R.K., Kelly, J.F., Bennett, D.A., and Estus, S. (2005). Lack of genetic association of cholesteryl ester transfer protein polymorphisms with late onset Alzheimers disease. *Neurosci Lett* 381, 36–41.

Zhu, H., Taylor, J.W., Bennett, D.A., Younkin, S.G., and Estus, S. (2008). Lack of association of hepatic lipase polymorphisms with late-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 29, 793–794.

Zuliani, G., Cavalieri, M., Galvani, M., Volpato, S., Cherubini, A., Bandinelli, S., Corsi, A.M., Lauretani, F., Guralnik, J.M., Fellin, R., et al. (2010). Relationship between low levels of high-density lipoprotein cholesterol and dementia in the elderly. The InChianti study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 65, 559–564.